

## Szakmai zárójelentés

„Introgresszió és petesejt aktiváció távoli búza hibridekben” (OTKA/NKFIH K101786)

### Részletes jelentés (1 évre zárolandó!)

A projekt **alapvető célkitűzései** az alábbiak voltak:

- a petesejt aktiváció tanulmányozása idegen fajú (introgressziós) keresztezésekben,
- a megtermékenyülés és az azt megelőző lépések mikro-anatómiai jellemzése idegen fajú keresztezésekben,
- a kromoszóma kiesés jellemzése távoli hibridekben a gabonaféléknél.

Miért volt ezekre a célkitűzésekre szükség? Az idegen fajú keresztezések a génátvitel nem-GMO alapú változatai, amelyeket hagyományosan több, mint 100 éve alkalmaznak, és ezalatt számtalan sikeres növényfajta alapanyagául szolgáltak. A szokásosnál genetikailag távolibb szülők közti keresztezések gyakori velejárója a haploidok keletkezése, ami történhet az egyik (gabonaféléknél csaknem kizárólag az apai) partner genomjának teljes kiesése, az ún. uniparentális genom elimináció révén, a kettős megtermékenyülést követő mitotikus, majd meiotikus osztódások során. A haploid utódok létrejöttének másik lehetősége a petesejtből a pollen stimulációjával vagy teljesen megporzás nélkül végbemenő haploid partenogenezis folyamata, ami a (gametofitikus) apomiktikus szaporodás egyik speciális válfaja (ritkán pszeudogámiával vagy centrogámiával kombinációban). Bármi legyen is a szaporodás módja, ennek előfeltétele a petesejt aktivációja, ami felkészíti a petesejtet a megtermékenyülésre (ivaros utód és elimináció) vagy pedig az anélkül elinduló embriófejlődésre (apomiktikus út).

Mivel az így kapott haploidok felhasználásuktól függően lehetnek kívánatosak (pl. homozigóta vonalak előállítása) vagy éppen nem-kívánatosak (pl. „pre-breeding” alapanyag), ezért lényeges eredetüknek és kialakulásuk mechanizmusának az ismerete, mert ennek tükrében lehet azután befolyásolni vagy tervezni a haploidok és a hibridek gyakoriságát és egymáshoz viszonyított arányát.

Az elért **eredményeket** a fentiek alapján az **alábbi bontásban** részletezzük:

1. Egy hatékony búza × árpa keresztezési rendszer kidolgozása
2. A búza × árpa keresztezés progámikus (megporzástól a megtermékenyülésig) és posztgámikus (a megtermékenyüléstől a korai embriófejlődésig) szakaszainak mikro-anatómiai jellemzése
3. Az apai (árpa) genom eliminációjának jellemzése
4. Egyéb eredmények

## 1. Egy hatékony búza × árpa keresztezési rendszer kidolgozása\*

A petesejt aktivációnak a távoli hibridekben történő tanulmányozásához elengedhetetlen feltétel egy hatékony hibridizációs rendszer megléte, amellyel elégséges számú utódot lehet előállítani, majd azok fent részletezett (hibrid vagy apomiktikus) eredetét megállapítani.

A tervezett búza (♀) × kukorica (♂) hibridizációt az előkísérletek során elvetettük, mert a kukorica virágzási idejét szántóföldön nem lehetett összehozni az általunk használt búza genotípusokéval. Ezért a továbbiakban a hexaploid búza × árpa kombináció kidolgozására összpontosítottunk.

A rendelkezésre álló szakirodalom (amely több mint 40 évet ölel fel) alapos átvizsgálása és feldolgozása alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a megoldás kulcsa egyértelműen a megfelelő búza-árpa genotípus kombinációk azonosítása lehet. A búza szülők megválasztásához kiindulásként egy másik idegen fajjal, a rozssal való keresztezhetőséget vettük alapul, mert erre számos adat áll rendelkezésre, saját előkísérleteinkből is.

Végül három genotípus kombinációt vizsgáltunk részletesen. Két változatot a genetikai standardnak számító 'Chinese Spring' genotípusból (n=21 kromoszóma), amelyről ma már kevésbé ismert, hogy a 20. század elején éppen a rozssal való keresztezhetősége miatt figyeltek fel rá. Harmadikként pedig egy, a martonvásári génbankban 'Szecsuán' néven fenntartott tételt, egy szintén kínai tavaszi búzát választottunk, mert előkísérleteinkben keresztezhetősége a rozssal (>90%) még a 'Chinese Spring'-ét (83-86%) is meghaladta. Mindhárom búza genotípust egyaránt a 'Morex' tavaszi sörárpával (n=7 kromoszóma) (valamint párhuzamosan *H. bulbosum*mal is) kereszteztük, amely az első szekvenált árpagenom forrása is.

Várakozásainkat az árpával végzett keresztezések beigazolták: az embrióknak a megporzott virágokra vetített gyakorisága a 'Chinese Spring' genotípusok 3-6%-os értékéhez képest a 'Szecsuán' esetében megközelítette a 16%-ot. Mivel az embriókból a növényregeneráció határfoka elérte vagy meg is haladta a 80%-ot, ezért a 'Szecsuán' × 'Morex' kombinációban a megporzott virágokra vetített növénykihozatal értéke a kivételesen magas 14%-ra emelkedett a szakirodalom 1% körüli vagy az alatti átlagos értékeivel szemben.

Igazoltuk továbbá a kapott növények (összesen 95 db) haploid, valamint részleges vagy teljes hibrid voltát. Ehhez háromféle technikát alkalmaztunk: áramlási citometriát (79 db), genomi in situ hibridizációt (GISH, 20 db) és kromoszómakar-specifikus molekuláris markereket (32 db). Mindhárom elemzéssel hasonló eredményt kaptunk, amelynek lényege az anyai (21 kromoszómás) haploidok magas, 75-80%-os előfordulása, míg a teljes hibridek gyakorisága 10% alatt maradt.

Ezen feladat **összefoglalásaként** elmondható, hogy egy hatékony búza × árpa keresztezési rendszert dolgoztunk ki, ami azért is fontos, mert ez a két faj a legjelentősebb kalászos gabona a mérséklet égövön. Az anyai haploidok magas gyakorisága jellemző erre a nemzetség keresztezésre, és bár csökkentésük kívánatos (ld. 3. pont), a rendszer ebben a formában kifejezetten alkalmas a haploidok eredetének vizsgálatára.

---

\* Az ebben a pontban összefoglalt eredmények nagy része közlemény formájában megjelent nemzetközi, impakt faktoros szaklapban (Polgári és mtsi. 2014).

## 2. A búza × árpa keresztezés progámikus és posztgámikus szakaszainak mikro-anatómiai jellemzése<sup>+</sup>

A kitűzött célok között szerepelt a búza-árpa hibridek fejlődésének szisztematikus jellemzése annak érdekében, hogy az esetleges akadályok vagy szűk keresztmetszeti pont(ok) beazonosítható(k) legyen(ek). Ezért a megtermékenyüléshez mint középponthoz viszonyítva két fő fázisra bontottuk a vizsgálatot: az azt megelőző progámikus (prefertilizációs) és az azt követő posztgámikus (posztfertilizációs) szakaszra (ld. 2.1., ill. 2.2. pont).

### 2.1. A pollen életképessége és csíráképessége

A búza bibepapilláin megtapadt pollen (**1. ábra**) életképességének meghatározásához a saját vagy árpa pollennel egyaránt mesterségesen megporzott búza kalászközből a termőket 15, 30, 45 és 60 perccel a porzás után fixáltuk, majd trypan késsel festettük (**1B-C ábra**). Mindegyik időpontban 10-10 saját, ill. árpa pollennel porzott búza termőt vizsgáltunk, amelyeket véletlenszerűen választottunk ki a fixált mintákból. A különböző időpontokban meghatároztuk a még élő és a már elpusztult virágporszemek átlagos relatív gyakoriságát. Az árpa pollen életképességét minden időpontban a saját, kontroll pollenéhez hasonlítottuk, és ennek függvényében értelmeztük (**2A ábra**).

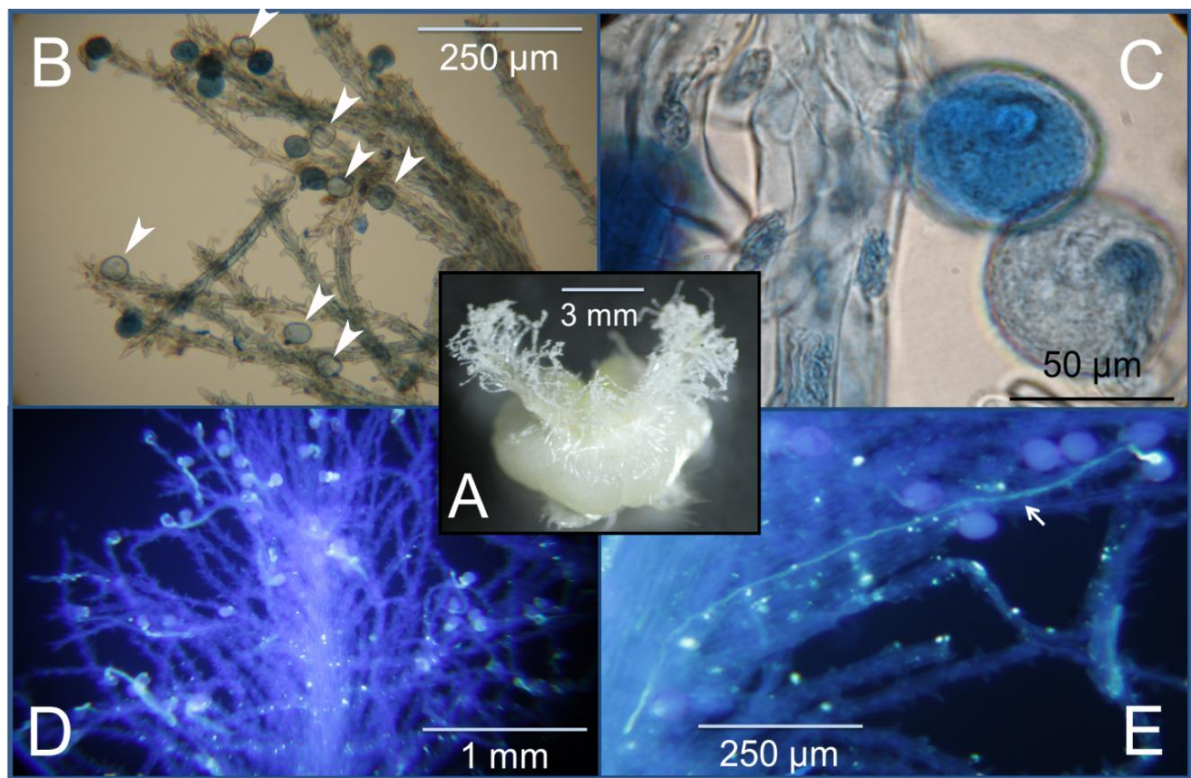
Megállapítottuk, hogy a búza bibe felszínén megtapadt búza és árpa virágporszemek életképességében nem volt számottevő különbség (**2A ábra**). Az első vizsgálati időpontban – 15 perccel a megporzást követően – a búza pollen 44,6%-a bizonyult élőnek, és az árpánál ez az érték 40,2% volt. Az ezt követő két időpontban – 30 és 45 perccel a megporzást követően – az árpa pollen szintén a búzáéval közel megegyező vitalitást mutatott: az árpánál 24,3%, illetve 35,3%, míg a búza esetében 22,8%, illetve 32,4% volt az élő virágporszemek gyakorisága. A saját és az árpa pollen vitalitása között jelentős eltérés csupán 60 perccel a megporzást követően volt tapasztalható, amikor az élő búza virágporszemek gyakorisága (19,1%) több, mint kétszerese volt az árpáénak (7,6%) (**2A ábra**).

Mivel szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a búza pollentömlő az embriózsákig megközelítőleg 30 perc alatt képes eljutni, és az árpa pollentömlő növekedési sebessége ettől nem tér el jelentősen, ezért az első pollentömlők a 60 perces mintavétel idején feltételezhetően már rég beléptek a csírákapun, meggátolva ezzel további pollentömlők célbaérését, és ez a csírázásnak indult pollen gyors pusztulását idézte elő. Ez lehet a magyarázata annak, hogy 60 perccel a megporzást követően miért csökkent drasztikusan mindkét faj virágporszemeinek életképessége.

A virágporszemekből előtörő pollentömlők vizsgálatához szintén termékenyített és fixált termőket festettünk anilin késsel (**1D-E ábra**). A megporzás után 15, 30, 45 és 60 perccel fixált termőkből véletlenszerűen kiválasztott 10-10 saját, ill. árpa pollennel megporzott búza termőn számoltuk meg azokat a virágporszemeket, amelyek legalább a pollen átmérőjének megfelelő hosszúságú tömlőt hajtottak.

---

<sup>+</sup> Az ebben a pontban összefoglalt eredmények közzlése (Polgári és mtsi.) jelenleg előkészületben van.

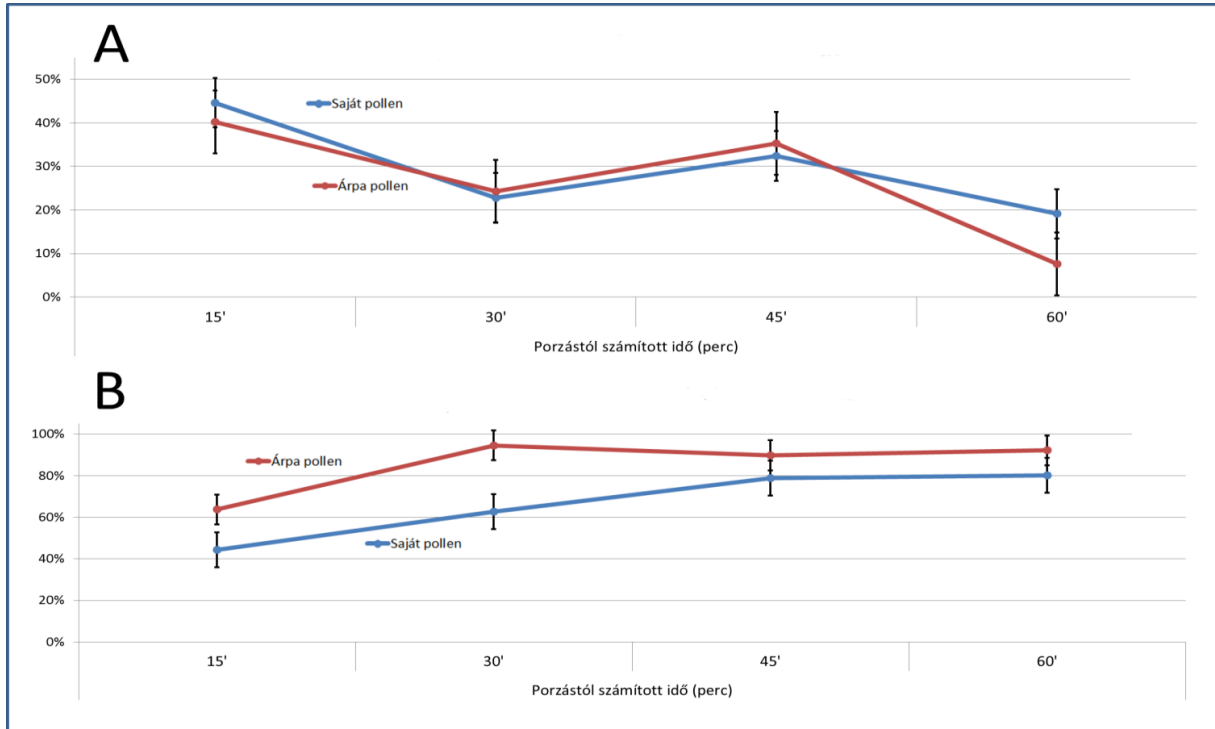


**1. ábra.** Az árpa pollen életképessége és tömlőhajtása búza bibén.

A: antézis állapotú búza termő; B: a bibe felszínén 30 perce megtapadt árpa pollen trypan kék festést követően; az intakt, élő pollen (nyíllal jelölve) nem vagy csupán kis mértékben mutat kék színeződést, az elhalt pollen kékre festődik; C: élő és elpusztult árpa virágporszemek 30 perccel a megporzás után; D: anilin kékkel festett árpa pollen tömlőhajtása búza bibe felszínén (30 perc); a kallózt tartalmazó pollen és pollentömlők erősen fluoreszkálnak; E: árpa pollentömlő növekedése a búza bibe belső szöveteiben (60 perc).

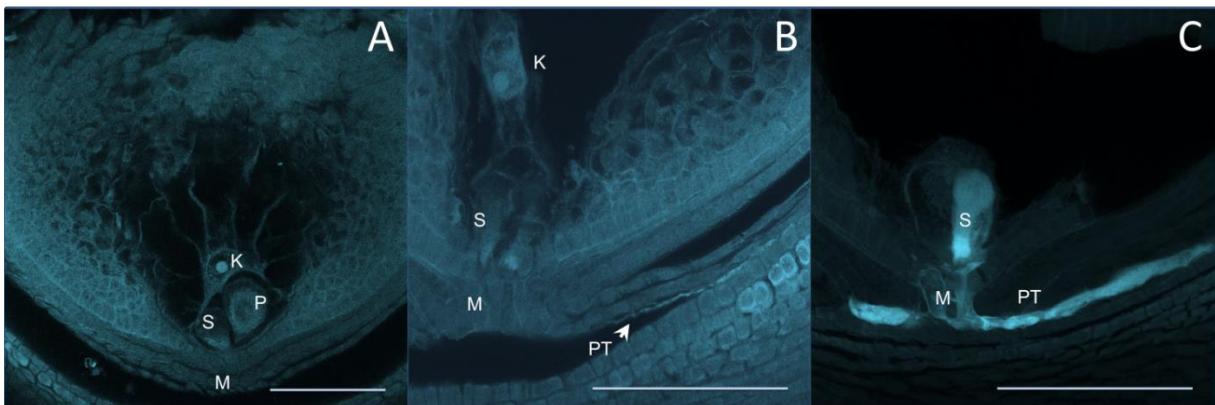
A pollen csírázókéességét az adott időpontban a 10 termőn kicsírázott virágporszemek átlagos relatív gyakoriságából határoztuk meg. Az árpa pollen csírázókéességét mindig a búza saját, kontroll pollenéhez hasonlítottuk, és ennek függvényében értelmeztük (**2B ábra**).

A búza bibe felszínén megtapadt saját és árpa pollen csírázását összehasonlítva megállapítható volt, hogy az árpa pollen és a búza bibe között nem áll fenn összeférhetetlenség. Az árpa virágporszemek a bibén történt megtapadás után azonnal csírázni kezdtek, és 15 perccel a megporzást követően már 63,8%-uknál megfigyelhető volt valamilyen mértékű tömlőnövekedés, ami jelentősen meg is haladta a búzánál észlelt 44,4%-ot. Ugyanez a különbség mutatkozott 30 perccel a megporzás után is, amikor árpa esetében a kicsírázott virágporszemek gyakorisága már elérte a maximumát (94,6%), míg a saját pollenek ilyenkor még mindig csak 62,7%-a mutatott tömlőnövekedést. A búzánál a csúcsértéket 45 perccel a megporzást követően mértük; ekkor a kicsírázott búza virágporszemek gyakorisága 78,8% volt, míg az árpa esetében (89,8%) már nem volt lényeges változás az előző időponthoz képest. Újabb 15 perc elteltével, azaz 1 órával a megporzást követően már egyik kombinációban sem nőtt a pollencsírázás: a búza bibe felszínén megtapadt árpa virágporszemek 91,9%-ánál volt látható pollentömlő. A búzánál ez az érték valamivel alacsonyabb volt: a pollen 81,7%-a kezdte meg a csírázást (**2B ábra**).



**2. ábra.** Saját (búza) és árpa pollen életképességének (A) és csíráképességének (B) a porzástól számított 15-60 perc alatt bekövetkezett időbeli változásai búza bibén.

Az anyai szövetekbe ágyazott csírapapunál és annak közvetlen közelében a saját (búza) és az árpa pollentömlőket anilin késsel végzett festés után konfokális mikroszkóppal követtük (**3. ábra**). Mindkét faj pollentömlői egyaránt elérték 1 óra alatt a csírapaput, és néhány esetben be is jutottak azon (**3C ábra**). Mindkét féle porzásnál találtunk olyan pollentömlőket is, amelyek a csírapapun még nem léptek ugyan be a fixálás pillanatában, de néhány mikrométerre megközelítették azt, valamint olyanokat is, amelyek a termő háti oldalán az integumentum és a magház falának belső epidermisze közti térben tartottak éppen a csírapapu irányába (**3B ábra**).



**3. ábra.** Árpa pollentömlő növekedése búza termőben.

A: a női gametofiton sejtjei a búza termőjében; B: pollentömlő (nyíllal jelezve) a csírapapu közelében 60 perccel a megporzást követően; C: pollentömlő belépése a csírapapun keresztül (60 perc).

K, központi sejt; P, petesejt; S, szinergida; M, csírapapu (mikropile); PT, pollentömlő

A mércse az ábrákon egységesen 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl.

**A szaporodás progámikus szakaszában** a saját (búza) és az árpa pollenszemek életképességét, valamint a pollentömlők hajtását a búza bibén összehasonlítva megállapítottuk, hogy a vizsgált genotípus kombinációk esetében nem tapasztalható lényeges eltérés. Mind a búza, mind az árpa pollen hasonló mértékben csírázott, hajtott tömlőt, és a csírákapun keresztül nagy gyakorisággal elérte a szinergida sejteket.

## *2.2. A posztgámikus (posztfertilizációs) szakasz citomorfológiai jellemzése*

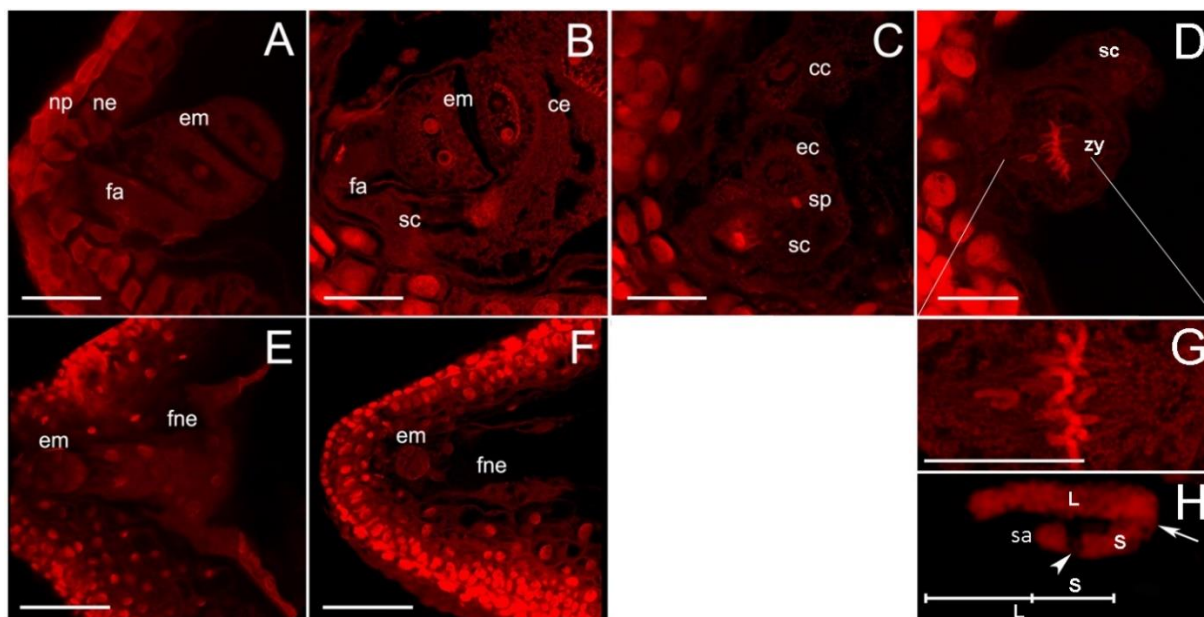
A megtermékenyült búza termők (**1A ábra**) belsejében lezajló változások részletesebb feltárásához összehasonlítottuk a búza vagy az árpa pollennel porzott búza termők embriózsákjában 1, 3 és 6 nappal a megporzás után lejátszódó folyamatokat. Konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk, van-e szemmel látható morfológiai különbség az eltérő apai genomot tartalmazó zigóták és proembriók esetében (**4. ábra**), valamint van-e számszerűsíthető eltérés a megtermékenyülések számában a saját vagy árpa pollennel porzott búza termőkben?

**Egy nap után** a saját pollennel porzott búza ovulumok (szemkezdemények) mindegyikében láthatóak voltak a megtermékenyülés egyértelmű bizonyítékai: a zigóta minden esetben túl volt az első osztódáson, az endospermiumban pedig megfigyelhető volt a cönocitikus fázisra jellemző intenzív sejtmagosztódás és citoplazma szaporulat (**4A ábra**). Ugyanakkor az árpával termékenyített búza ovulumok többségének morfológiája már láthatóan különbözött a kontroll ovulumokétól. Hús preparált ovulumot megvizsgálva, három esetben azt tapasztaltuk, hogy a zigóta első osztódása a kontrolléval megegyező módon teljesen végbement: itt az embriók jól láthatóan két eltérő méretű, kisebb apikális és nagyobb bazális sejtből álltak, az endospermium pedig már több sejtmagvas struktúrát alkotott (**4B ábra**).

Egy esetben sikerült közvetlenül a megtermékenyülés körüli állapotot megfigyelni. Az ovulumban látható volt a mikropilén át betörő és a szinergida sejtek filiform apparátusába belépő pollentömlő, valamint az egyik hímvarsejt, amely a szinergidán való áthaladás után közvetlenül a petesejt sejthártyájához tapadt, míg a központi sejtben megfigyelhető volt a termékenyülés utáni állapotra jellemző három sejtmag (**4C ábra**).

Egy másik alkalommal a zigóta épp az első mitózis metafázisában tartózkodott, és jól látható volt az osztódási orsó, valamint a mikrotubulusok és a sejt középvonalában felsorakozó erősen kondenzált kromoszómák (**4D ábra**). A szóban forgó árpa pollennel termékenyített zigótában egy kromoszóma jellegzetesen lemaradt a többi középsíkba vándorolt kromoszómától (**4D, 4G ábra**). Az ilyen lemaradó kromoszómák a zigóta sejtosztódásai során általában nem kerülnek át az utódsejtekbe, és az egyedfejlődés kezdeti szakaszában elvesznek. Itt tehát bizonyára egy apai kromoszóma korai eliminációját sikerült közvetlenül „tetten érni”, megerősítve ezzel azokat a megfigyeléseket, amelyek szerint az árpa kromoszómák a tökéletlen centroméra/mikrotubulus kapcsolatok miatt alkalmanként lemaradnak (**4G ábra**).

A fentiekén kívül három esetben találtunk sértetlen állapotú embriózsákokat, amelyekben feltételezhetően nem történt termékenyülés, vagy esetleg a folyamat annyival később az öntermékenyült ovulumokhoz képest, hogy 1 nappal a megporzást követően még nem voltak láthatóak a megtermékenyülés jelei. A fennmaradó 12 esetben nem lehetett egyértelmű következtetéseket levonni az embriózsákban zajló eseményekről.



**4. ábra.** Saját vagy árpa pollennel termékenyített búza termők embrióinak és endospermiumainak fejlődése.

Öntermékenyítéssel (A, E) és árpa keresztezéssel (B, C, D, F) előállított embriók és endospermiumok 1 nappal (A-D) és 3 nappal (E-F) a megporzás után. D és G (felnagyítva): egy kromoszóma lemaradása az első mitózis során. H: a lemaradó kromoszóma nagyított képe.

cc, központi sejt; ce, cönocitikus endospermium; dne, szabadsejtes endospermiumsejt; ec, petesejt; zy, zigóta; em, embrió; sc, szinergida sejt; fa, filiform apparátus; sp, hímivarsejt (spermium); ne, nucelláris epidermisz; np, nucelláris parenchima; L, hosszú kromoszómakar; S, rövid kar; sa, szatellita; nyíl: centroméra, nyílhegy: másodlagos befűződés

A mércse az egyes ábrákon 4  $\mu\text{m}$ -t (H), 20  $\mu\text{m}$ -t (A, B, C, D, G) vagy 100  $\mu\text{m}$ -t (E, F) jelöl.

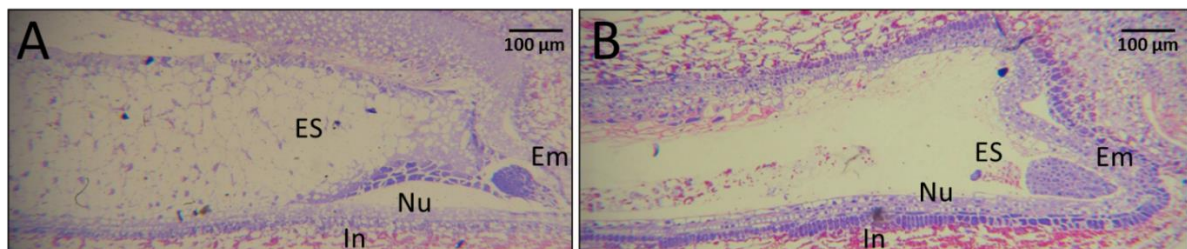
Az osztódási síkból lemaradó kromoszómát morfológiája, valamint a rövid (S) és hosszú (L) karok aránya alapján és részletes, nagy felbontású felvételek segítségével (**4H ábra**) az alább leírt módon azonosítottuk. A kromoszóma másodlagos befűződése (nyílhegygel jelölve) a lehetséges jelöltek körét – árpa esetében – kettőre, az 5H és 6H kromoszómákra szűkíti. A két kromoszóma S/L kararánya (a szatellitákkal nem számolva) a szakirodalmi adatok alapján régóta ismert és diagnosztikus értékkel bír: 5H – 0,41-0,49 (azaz a rövid kar hossza kevesebb, mint a hosszú kar fele), és 6H – 0,60-0,68. A lemaradó kromoszóma centroméra régiója (**4H ábra**, nyíllal jelölve) alapján megállapított kararány értéke 0,43-nak adódott, ami jó egyezést mutat az 5H kromoszómáéval (és csak azzal). Itt érdemes hozzátenni, hogy a többi, nem szatellités árpa kromoszóma (1H-4H, 7H) S/L kararánya még markánsabban eltér, mert 0,70 és 0,99 között mozog, tehát az 5H kromoszóma az árpa kariotípusában összetéveszthetetlenül beazonosítható.

Elvileg felmerülhet még, hogy a kérdéses lemaradó kromoszóma akár a búza genomból is származhatna. A gabonaféléknél az idegen fajú hibridekre jellemző uniparentális (csak apai) genom elimináció ismeretében ennek a feltevésnek nincsen realitása, de a teljesség kedvéért megvizsgáltuk ezt a lehetőséget is. A hexaploid búza genomjában csupán az alábbi szatellités kromoszómák (és S/L kararányaik) jöhetnek szóba: 1B – 0,59, 6B – 0,83, tehát ezek is messze esnek a kérdéses kromoszóma kararányától.

Okkal levonható tehát a **következtetés**, hogy a már a zigóta első osztódása során megfigyelt lemaradó (és feltehetően majd ki is esett) kromoszóma nagy valószínűséggel az 5H árpa kromoszóma. A kieső és bennmaradó árpa kromoszómák gyakoriságáról további részletes elemzést végeztünk regenerált F1 növények egy nagyobb populációjában (ld. 3. pont).

A **3 nappal** a megporzást követően vizsgált öntermékenyült kontroll ovulumokban az embrió már többsejtes csepp formát vett fel, és az endospermium túljutott a gyors sejtmagi osztódások egész során, teljesen megformálva a mikropiláris oldali, az embriót körülvevő sűrű citoplazmájú, az embriót a korai fejlődés során feltehetően tápanyagokkal ellátó zónát, valamint a vékony citoplazma rétegben a nucellusz mentén az endospermium kalazális vége felé gyöngyfüzérszerűen migráló sejtmagokat (**4E ábra**). A tíz kontroll ovulum mindegyikében találtunk embriót és endospermiumot, amelyek méretükben és megjelenésükben hasonlóak voltak. A tizenegy árpával termékenyített búza ovulumból tízben (90,9%) volt embrió és kezdeti stádiumban levő endospermium, amelyek azonban méretben és fejlettségben elmaradtak az öntermékenyült kontrolloktól, és egymáshoz képest is elég változatos képet mutattak. A 3 napos hibrid embriók nagy része gömbstádiumú volt, ami körülbelül 1 napos lemaradást jelent a csepp alakú, kontroll embriókhoz képest. Az endospermium minden esetben néhány sejtmagvas, fejletlen struktúra formájában volt látható (**4F ábra**).

A további generatív fejlődés követéséhez a porzás után **6 nappal** a kalászokból kigyűjtött termőket paraformaldehides fixálás után műgyantába ágyaztuk. Ezt követően 1  $\mu\text{m}$  vastag, félvékony metszeteket készítettünk, amelyeket hisztokémiai festés után fénymikroszkópban vizsgáltunk (**5. ábra**).



**5. ábra.** Saját (búza) (A) és árpa (B) pollennel termékenyített 6 napos búza szemkezdemények hosszszetszeti felvételei.

ES, endospermium; Em, embrió; Nu, nucellusz; In, integumentum

Az öntermékenyült szemkezdemények mindegyike tartalmazott csepp formájú, hajtás- és gyökérmerisztéma szerveződést mutató embriót, amelyek átlagos hosszúsága 100  $\mu\text{m}$  és szélessége 50  $\mu\text{m}$  körül volt (**5A ábra**). Az árpa pollennel porzott szemkezdemények ugyan hasonló méretűek és megjelenésűek voltak, de szerveződésükben jelentős eltéréseket mutattak az öntermékenyült, kontroll csoport szemkezdeményeihez képest (**5B ábra**). Az anyai nucelláris és integumentum rétegek megjelenésében és szerkezetében nem volt látható különbség, ezzel szemben a nucelláris epidermiszen belül csak egy megnyúlt üreg volt található az embriózsák helyén. Az embrió méretében egy fejlettebb, öntermékenyült embrióéval



egyezett meg, valamint morfológiája és szerkezete sem tért el a normális fejlődésmentet követő, öntermékenyült kontroll embrióktól (**5B ábra**).

A kétféle minták között a legjelentősebb különbség az endospermium fejlődésében mutatkozott. Míg az öntermékenyült kontroll szemkezdemények mindegyikében az egész magkezdeményt kitöltő nagy, parenchima jellegű sejteket tartalmazó endospermium látható, amely a jól elkülönülő mikropiláris nyaki részen keresztül az embrióhoz kapcsolódott (**5A ábra**), addig az árpatermékenyítésből származó szemkezdemény endospermiuma helyén csak egy folyadékkal telt üreg volt. Az embrióhoz kapcsolódó egyetlen szövet az embrió apikális, domború oldalához tapadt néhány sejtes struktúra volt. Ezen kívül csak kevés, a folyadékkal telt üregben nem lokalizált sejtfalak nélküli sejtmagot találtunk, amelyeken a lízis jelei mutatkoztak (**5B ábra**).

**A szaporodás posztgámikus szakaszában** a búza-árpa hibrid embriók fejlődése az öntermékenyültekhez képest fokozatosan lelassult: a porzást követő 3. npra általában körülbelül 1 napnak megfelelő lemaradás alakult ki. Az endospermium esetében ez a különbség még szembetűnőbb volt. Az öntermékenyült és a búza-árpa hibrid szemkezdemények további összehasonlító vizsgálatai során megállapítottuk, hogy utóbbiak fejlődése a 3. naptól egyre nagyobb mértékben lemarad. A lényegi különbség a két vizsgált csoport között, hogy a hibrid endospermium fejlődése néhány gyors osztódást követően elakadt, ami végső soron az embriók növekedésének teljes leállításához vezetett. A megporzást követő 3-14. nap között a hibrid embriók sikerrel kimenthetők és növényekké nevelhetők.

**Összefoglalva** elmondhatjuk, hogy kompatibilis búza-árpa kombinációban a szaporodás progámikus és a posztgámikus fázisa egyaránt végbement. A progámikus szakasz és a megtermékenyülés során nem fedeztünk fel lényegi eltérést az öntermékenyült búza kontrollhoz képest: a petesejt és a központi sejt kettős megtermékenyülése hasonló gyakorisággal ment végbe. A posztgámikus fázisban főleg az endospermium fejlődésének gátlása eredményezett az időben előrehaladva csökkenő hibrid embrió kihozatalt. Mindez a petesejt aktiváció normális lezajlására utal, és azt igazolja, hogy a keresztezésekben létrejövő anyai haploidok túlnyomó részben (vagy kizárólag) megtermékenyüléssel és azt követő genom elimináció révén keletkeznek.

### **3. Az apai (árpa) genom elimináció jellemzése<sup>§</sup>**

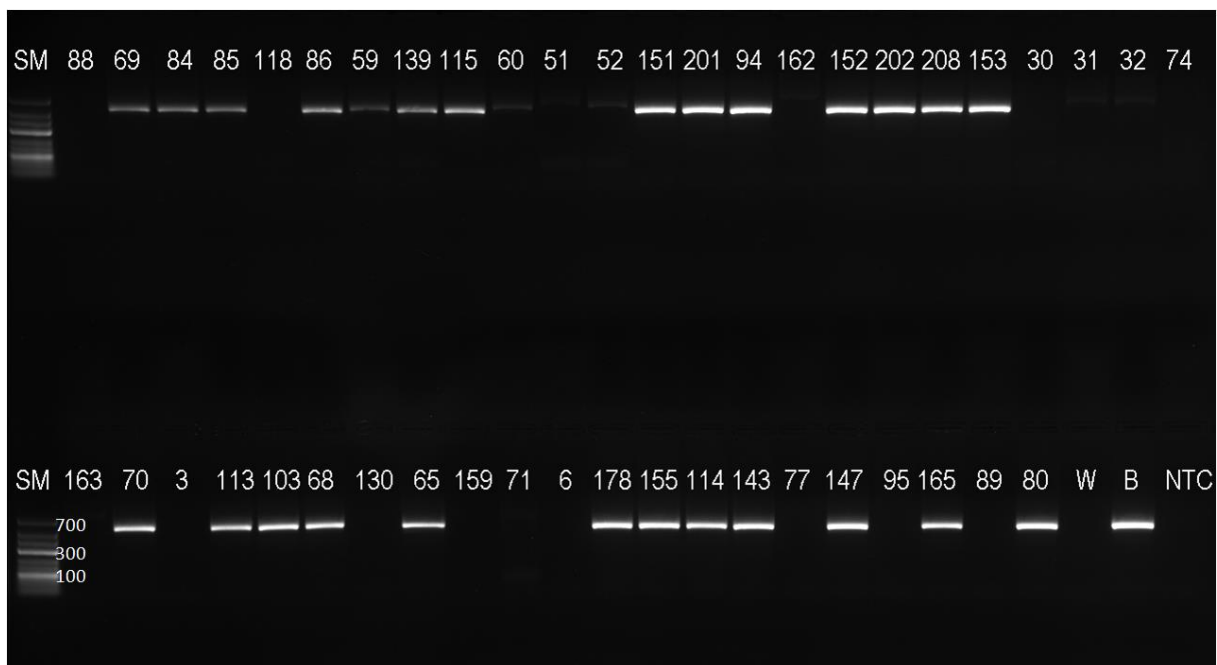
Az árpa kromoszómák eliminációjával kapcsolatban régóta felmerült kérdés, hogy vajon létezik-e bármilyen szisztéma a kromoszómák kiesésében? Pl. vannak-e kromoszómák, amelyek gyakrabban és hamarabb elvesznek a hibrid genomból, ill. olyanok, amelyek stabilabban öröklődnek? Azért van a kérdésnek jelentősége, mert a válasz jelentősen befolyásolja az egyes árpa kromoszómákon található gének átvitelének gyakoriságát (vagy egyáltalán lehetőségét) a búza genomba.

---

<sup>§</sup> Az ebben a pontban összefoglalt eredmények kézirat formájában közlésre el lettek küldve (Polgári és mtsi. 2017).

Az eddigi szórványos adatokból az a következtetés terjedt el a szakirodalomban, hogy igenis van különbség és preferencia az egyes kromoszómák kiesésében vagy bennmaradásában, és több ilyen árpa kromoszómát is azonosítottak vagy azonosítani véltek. Számunkra azonban a kérdés megoldása nem tűnt eléggé alaposnak és megnyugtatónak, elsősorban a vizsgált növények alacsony száma miatt.

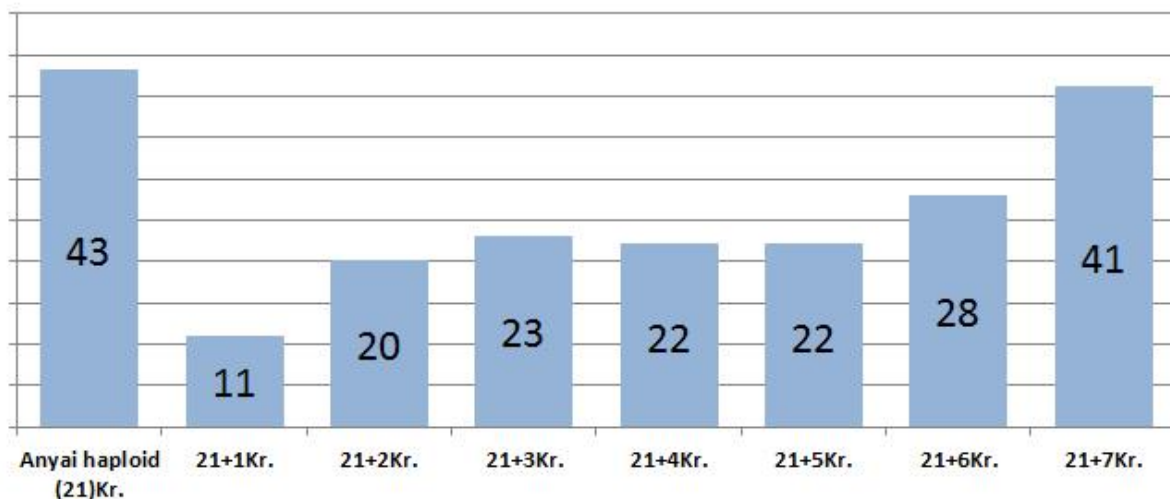
Ezért az apai kromoszómák előfordulási gyakoriságának pontosabb jellemzése érdekében egy újabb keresztezési kísérletben két genotípus kombinációval és embriómentés révén előállítottunk egy javított búza-árpa F1 populációt. Ez a populáció 218 független növényből állt, amit már alkalmasnak ítéltünk a kromoszóma kiesés lefutásának tanulmányozására. Összesen 210 F1 növényt elemeztünk specifikus molekuláris (SSR és STS) markerekkel, amelyek lefedték mind a hét árpa kromoszómát. Reprezentatív szemléltetésként a 3H árpa kromoszómára specifikus STS marker szűrése látható egy részpopuláción (**6. ábra**): ebben az esetben a 45 független F1 növényből 25 db hordozta a 3H kromoszómát.



**6. ábra.** Reprezentatív szűrés 45 búza-árpa F1 növényben a 3H árpa kromoszómára specifikus STS marker (ABG377) jelenlétére (25 db) vagy hiányára (20 db).

SM, DNS létra (GeneRuler™ Low Range DNA ladder); W, búza (anya); B, árpa (apa); NTC, templátmentes kontroll; a számok a véletlenszerűen kiválasztott növények azonosító kódjait jelölik.

Az adatokat összesítve feltűnő a populációban az aneuploid szintek (azaz a részleges kromoszóma kiesések) bimodális eloszlása: a legnagyobb számban ugyanis a haploidok és a teljes hibridek fordultak elő (43 és 41, vagyis 20,5% ill. 19,5%), míg a maradék 126 F1 növény (60%) az összes lehetséges, 1-6 árpa kromoszóma addíciót tartalmazta (**7. ábra**). Az adatokból az is látszik, hogy 167 F1 növény (79,5%) tartalmazott legalább egy árpa kromoszómát, és így a haploidok éppen csak 20% fölötti gyakorisága jóval alacsonyabb és kedvezőbb a korábban tapasztalt 80% körüli értéknél (ld. 1. pont). A különbséget az időközben elért technikai fejlődés okozhatta, amellyel a kromoszómák kiesését legalább részben kontrollálni tudtuk.

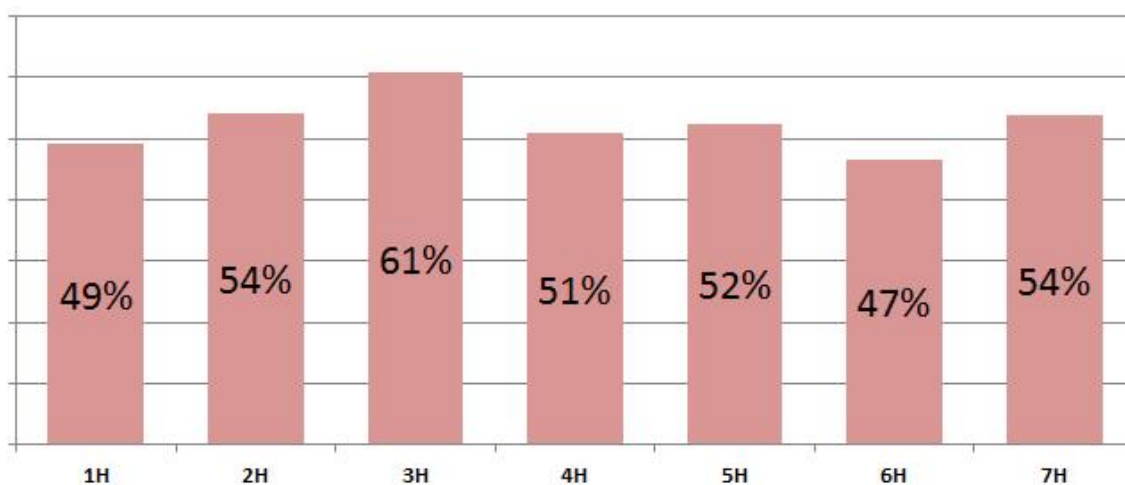


**7. ábra.** Búza × árpa keresztezésekből regenerált 210 F1 növény kromoszóma számának és molekuláris kariotípusának eloszlása.

A 126 aneuploid növény eloszlását vizsgálva nem volt statisztikailag kimutatható különbség [Chi-négyzet(5)=8,254;  $p=0,143$ ] az egyes aneuploid szintek között, ami egy első indikációnak is felfogható a kromoszóma kiesés véletlenszerűségére.

A legalább egy árpa kromoszómát tartalmazó populációban (167 F1 növény) az egyes apai kromoszómák relatív gyakorisága (**8. ábra**) szintén nem bizonyult statisztikailag igazolhatóan egymástól eltérőnek [Chi-négyzet(6)=10,499;  $p=0,105$ ], és így (ismét) teljesült az eredeti null hipotézis az eloszlás véletlenszerűségéről.

Legkevesebbszer a 6H (47%) és legtöbbször a 3H kromoszóma (61%) adott pozitív eredményt: a többi árpa kromoszóma a két érték közötti gyakorisággal fordult elő a hibridek genomjában (**8. ábra**). Tizenegy növény csak egyetlen apai kromoszómát tartalmazott (**7. ábra**): ez négy alkalommal a 3H, háromszor a 4H, és két-két ízben az 5H és a 7H kromoszóma volt. Az 1H, a 2H és a 6H nem fordult elő egyedüli apai kromoszómaként a hibridek genomjában.



**8. ábra.** Az egyes árpa kromoszómák előfordulási gyakorisága búza-árpa F1 hibridekben. (N=773)

Megítélésünk szerint az eddigi és az itt bemutatott adatok és következtetések közti gyökeres eltérés magyarázata két okban keresendő: egyrészt az eltérő mintaszámban, másrészt az eltérő elemzési módszerben.

Ami a mintaszámot illeti, a korábbi vizsgálatok 13-30 növény alapján vontak le következtetéseket, és ez statisztikai szempontból túl alacsony a megbízhatósági kritériumok teljesüléséhez. Ugyanakkor számításaink szerint a 210 egyedből álló F1 populáció statisztikailag már elérte a kritikus méretet ehhez a vizsgálathoz.

A módszertani eltérés lényege abban rejlik, hogy a korábbi kísérletek során a növények kromoszóma státuszát zömmel citológiai úton határozták meg, egyedi sejtek mitotikus osztódására alapozva. A regenerált F1 növények gyökércsúcsában azonban még gyakran eltérő kromoszómaszámú sejtek találhatóak, ezáltal az adott (mixoploid) növény besorolása bizonytalanná válik, és így kiesik a statisztikai úton elemezhető minták köréből. Ezzel szemben a levélből izolált DNS-sel végzett markerelemzés mentes ettől a technikai nehézségtől, mert a különböző sejtek esetleges mixoploid állapota kiátlagolódik a mintavétel során: molekuláris markerekkel így minden egyes növény egyértelműen besorolható valamelyik aneuploid kategóriába.

**Összefoglalva:** az eddigi legnagyobb búza-árpa hibrid populáció molekuláris markeres és statisztikai vizsgálata alapján az a következtetés vonható le, hogy az árpa kromoszómákra nézve nem igazolható preferencia a hibrid genomban történő kiesésüket vagy bennmaradásukat illetően. Más szóval, az apai (árpa) kromoszómák előfordulása és mozgása a hibrid genomban egészében véve véletlenszerűnek tekinthető, ami nemesítési szempontból mindenképpen biztató.

#### **4. Egyéb eredmények**

Az alábbiakban olyan új eredményeket ismertetünk, amelyek a projekt fő célkitűzései szempontjából másodlagosak, ám nem elhanyagolható hozadékot jelentenek, és főleg a gyakorlati hasznosíthatóságra (vö. 4.1. és 4.2. pontok) nézve fontosak.

##### *4.1. Új búza DH vonalak előállítása*

Az árpa kromoszómát nem tartalmazó, anyai haploid növények (ld. 1. pont) genomját megkettőzve kapott fertilis dihaploid (DH) növények utódait felszaporítottuk, és így DH vonalakat állítottunk elő az eredeti 'Szecsuán' genotípussal való összehasonlítás céljából. Mivel az anyai haploid növények mind árpával termékenyült embriókból fejlődtek, ezért feltételeztük, hogy az új DH vonalak is hordozzák a jó keresztezhetőséget, ráadásul rögtön homozigóta formában.

Kezdetben kiválasztottunk egy DH vonalat, amely a morfológiailag heterogén 'Szecsuán' genotípushoz hasonló mértékben kereszteződött árpával (ál-szemkötés: 83,8%, ill. 81,5%, továbbá embrió kihozatal: 17,6% és 19,8%, a vizsgált 16, illetve 18 kalász átlagában), de egyéb fontos tulajdonságban (pl. növénymagasság, növényenkénti kalász szám) a szülőnél jobb paraméterekkel rendelkezik. Ez a 'Szemafor' elnevezésű új DH vonal szignifikánsan, átlagosan 10 cm-rel alacsonyabb növésű az eredeti 'Szecsuán' genotípusnál (80 cm vs. 90 cm,  $p < 0,002$ ,  $N=14$ ), ami jelentősen csökkenti az egyébként meglehetősen gyenge szárszilárdság miatti

kalászveszteséget. Emellett az új DH vonalat a kiindulási genotípushoz viszonyítva szignifikánsan ( $p < 0,001$ ,  $N=14$ ) nagyobb bokrosodási hajlam jellemzi (6,5 ill. 5 kalász/növény). A növényenként kinevelt átlagosan 1,5 kalász többlet a fajlagos fitotroni és üvegházi nevelési költségek csökkentése szempontjából hasznos tulajdonság, ami egyúttal megnöveli az egy növényre jutó embrió kihozatait is.

Az elsőként jellemzett 'Szemafor' DH vonal kiválasztása óta több, mint 30, a fent leírt módon előállított DH vonalat teszteltünk: ezek között van olyan, amely keresztezhetőségben is felülmúl minden eddig ismert genotípust. A DH vonalak összehasonlító jellemzése folyamatban van, de ezek felszaporítása és ismétléses tesztelése időigényes folyamat, ezért az összefoglaló publikáció megjelenése még legalább 1-2 évet vesz igénybe.

#### 4.2. Új monoszómás és diszómás árpa addíciók előállítása\*

A 'Szecsuan' 12/5 jelű F1 növény mindhárom vizsgálatban (ld. 1. pont) részleges hibridnek bizonyult. A GISH vizsgálat szerint két teljes árpa kromoszómát tartalmazott, és a független molekuláris markerelemzés is a 2H és 6H árpa kromoszóma mindkét karjának meglétét igazolta. A 'Szecsuan' 12/5 növényről származó F1 magot felnevelve öntermékenyítés után három kalászból összesen 35 db F2 szemtermést kaptunk. A visszakeresztezés után nevelt F2BC1 populációban molekuláris markerekkel elemeztük az eredetileg azonosított két árpa kromoszóma öröklődését.

Az egyszeres anyai visszakeresztezés következtében hasadó populációban a 35 vonalból 20 db (57,1%) nem tartalmazott egyetlen árpa kromoszómát sem, ami pontosan megfelelt a mendeli öröklésment alapján várt hasadási aránynak. A 2H kromoszómát nyolc (22,9%), míg a 6H kromoszómát öt esetben (14,3%) találtuk monoszómás addícióként, további két növény (5,7%) pedig mindkét árpa kromoszómát megőrizte.

Az F2BC1 populációban azonosított kétféle monoszómás és a diszómás addíciós vonalak új genetikai háttérben tartalmaznak árpa kromoszómá(ka)t, ezért további vizsgálatok és terjesztés céljára felszaporítjuk és megőrizzük azokat.

#### 4.3. A távoli fajok genomjai közti kooperáció vizsgálata

Közelebbről annak a kérdésnek az elemzéséről van szó, hogy mi történik az olyan mesterségesen létrehozott, távoli hibridek genomjában, amelyekben két, egymástól genetikailag jelentősen eltérő faj lett „összekényszerítve”? Bár ezt a kérdést már tanulmányozzák a búza ún. szintetikus rekonstrukcióját (*Triticum durum* × *Aegilops squarrosa*) felhasználva, itt még mindig azon fajhibridek körén belül mozgunk, amelyek természetes úton jöttek létre. Ezt a kört jelentősen tágítják az általunk létrehozott és a természetben nem létező búza-árpa hibridek, amelyekkel tehát egyrészt azt lehet vizsgálni, hogy meddig lehet elmenni az idegen fajú keresztezésekkel, másrészt pedig segítségükkel újszerű genom kooperációs (vagy éppen genom eliminációs) mechanizmusok feltárására nyílik lehetőség. Ez azért izgalmas kutatási irány, mert ezen mechanizmusok megértése révén bepillantás nyerhető az evolúció működésébe, illetve ezáltal egyszer talán célzottan is hozzájárulhatunk az evolúcióhoz új, eddig elképzelhetetlen hibridek létrehozásával.

---

\* Az eredmény megjelent nemzetközi, impakt faktoros szaklapban (Polgári és mtsi. 2014).

Az említett mechanizmusok pontosabb megismerése érdekében első közelítésben részleges és teljes hibridek, illetve a két szülő genomjában található kisRNS-eket kódoló gének összehasonlító vizsgálatát kezdtük meg. Az újgenerációs szekvenálást követő bioinformatikai elemzés folyamatban van, és reményeink szerint feltárja, hogy mely kisRNS-gének működése változott meg a hibridekben a szülőkhöz képest. Mivel a kisRNS-ek az egész genom működésének és integritásának átfogó szabályozásában játszanak fontos szerepet, ezért rajtuk keresztül a hibridek részgenomjainak kezdeti összezsizolódásáról kaphatunk képet. A jövőben tervezzük az ilyen irányú vizsgálatok kiterjesztését más szintekre, pl. az epigenetikus (metilációs és más módosító) szabályozásra is.

### **Eltérések az eredeti munkatervtől (indoklás)**

A. A projekt futamideje során a mikroinjektáláshoz használni tervezett berendezések (mikromanipulátor és mikroinjektor) tönkrementek, és leamortizálódottságuk miatt már nem voltak javíthatóak, ezért kicserélésre kerültek (Jäger K., személyes közlés). Ennek a kiesésnek a pótlására (és kompenzálására) vettük használatba az újonnan beszerzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópot, amellyel további és részletesebb mikro-anatómiai vizsgálatokat tudtunk végezni (ld. 2. pont).

B. A költség nélküli 1 éves hosszabbítást már a jövőbeni kutatások megalapozására (is) fordítottuk. Ezek között hangsúlyosan szerepelt a genom kooperáció témájának felvetése, nevezetesen annak a kérdésnek az elemzése, hogy mi történik az olyan hibridek genomjában, amelyekben két távoli faj lett „összekényszerítve”? Első közelítésben az előállított hibridek és a szülők kisRNS-t kódoló génjeinek összehasonlító vizsgálatát kezdtük el újgenerációs szekvenálással és azt követő bioinformatikai elemzéssel (ld. 4.3. pont).

### **Tudományos közlemények jegyzéke\***

*Nemzetközi, impakt faktoros szaklapban (angol nyelven)*

Polgári D, Cseh A, Szakács É, Jäger K, Molnár-Láng M, Sági L (2014) High-frequency generation and characterization of intergeneric hybrids and haploids from new wheat barley crosses. *Plant Cell Reports* 33:1323-1331. IF=3,071, DOI 10.1007/s00299-014-1618-3

Polgári D, Mihók E, Sági L (2017) Chromosome constitution and distribution in a large-scale population of wheat-barley (*Triticum aestivum* L. × *Hordeum vulgare* L.) hybrids. *Közlésre beküldve (Frontiers Plant Sci)*

Polgári D, Fábrián A, Mihók E, Sági L Wheat × barley hybridization: a micro-anatomical study of the pre- and postfertilization reproductive phases. *Kézirat előkészületben (Plant Reproduction)*

---

\* A felsorolt közlemények mindegyike hivatkozik az OTKA/NKFIH K101786 sz. projekt támogatására.

*PhD fokozat odaitélését elnyert (summa cum laude) tudományos értekezés*

Polgári D (2017) A petesejt aktiváció sejt- és molekuláris biológiai vizsgálata gabonafélékben. Szent István Egyetem, Gödöllő, 136 old. (védés: 2017. május 2. avatás: 2017. június 17.)

*Konferencia közlemények (angol nyelven)*

Polgári D, Jäger K, Sági L (2013) „Globalization” in the sexual reproduction of cereals: Wider choice, better hybrids. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Biologia* 58:55. Plants for the Future Conference, Cluj-Napoca (Romania), 30 September – 2 October 2013

Polgári D, Sági L (2014) „Globalization” in the sexual reproduction of cereals. „Advances in Plant Breeding & Biotechnology Techniques” Pannonian Plant Biotechnology Association Conference for PhD Students in Plant Biology, Mosonmagyaróvár, 27-29 April 2014, pp. 22-23.

*Konferencia közlemények (magyar nyelven)*

Polgári D, Jäger K, Cseh A, Molnár-Láng M, Barnabás B, Sági L (2012) Genom átépítés távoli búzahibridekben. ATK Tudományos Nap, Martonvásár, 2012. november 14. p. 58.

Polgári D, Jäger K, Cseh A, Molnár-Láng M, Barnabás B, Sági L (2013) Genom átépítés távoli búzahibridekben. XIX. Növénynevelési Tudományos Nap, Keszthely, 2013. március 07. p. 130.

Polgári D, Fábrián A, Jäger K, Sági L (2015) A prefertilizációs fejlődési szakasz szövettani jellemzése intergenerikus búza-árpa keresztezésekben. XXI. Növénynevelési Tudományos Napok, Martonvásár, 2015. március 11-12. p. 113

Polgári D, Fábrián A, Szakács É, Sági L (2016) Búza-árpa intergenerikus hibridek kromoszóma kiesésének citológiai és molekuláris jellemzése. XXII. Növénynevelési Tudományos Nap, Budapest, 2016. március 10. p.

Polgári D, Fábrián A, Mihók E, Szakács É, Sági L (2017) Búza × árpa intergenerikus hibridek hatékony előállítás. XXIII. Növénynevelési Tudományos Nap, Budapest, 2017. március 07. p.

*Előadások (magyar és angol nyelven)*

Polgári D, Sági L (2013) „Globalizáció” a növények szexuális életében: Leépülő korlátok a párválasztásban. Pannon Tudományos Nap, Nagykanizsa, 2013. október 17.

Polgári D, Sági L (2014) „Globalization” in the sexual reproduction of cereals wider choice better hybrids? Festetics Imre Mezőgazdasági Biotechnológiai Szakkollégium, Szent István Egyetem, Gödöllő, 2014. február 26.

Polgári D, Sági L (2014) Fertilization and alien chromosome distribution in intergeneric hybrids. Pannonian Plant Biotechnology Association Conference on Advances in Plant Breeding and Biotechnology Techniques, Mosonmagyaróvár, 28 April 2014

## Összefoglalás

Egymással jól kereszteződő genotípus kombinációk azonosítása révén egy hatékony rendszert dolgoztunk ki búza-árpa (*T. aestivum* × *H. vulgare*) nemzetség hibridek előállítására. Áramlási citométeres, genomi in situ hibridizációs és kromoszóma-specifikus molekuláris markeres elemzésekkel igazoltuk, hogy részleges vagy teljes hibridek, valamint anyai, búza haploidok keletkeztek. A kidolgozott rendszer alkalmazásával egy 210 F1 növényből álló nagy populációt állítottunk elő az apai kromoszómáknak a kezdeti fejlődés során végbemenő kiesése jellemzésére. A molekuláris markerelemzés az egyes árpa kromoszómák véletlenszerű kiesési trendjét tárta fel.

A megtermékenyülést megelőző és az azt követő fejlődést kiterjedt mikro-anatómiai vizsgálatnak vetettük alá. A búza és az árpa pollen életképessége és tömlőhajtási képessége a búza bibén nem tért el egymástól. A megtermékenyülés gyakorisága, valamint a zigóták, embriók és az endospermium kezdeti fejlődése szintén hasonló volt az árpával végzett keresztezések és az öntermékenyítések esetében. Az endospermium fejlődése azonban megrekedt a cönocitikus állapotban, ami fokozatos fejlődésbeli lemaradáshoz és az embriók pusztulásához vezetett. Az adatok szerint nem figyelhető meg a termékenyülés előtt inkompatibilitás a búza-árpa hibrideknél, viszont fellép az ún. klasszikus triploid blokk, amelyről *Arabidopsis* és más fajok esetében ismert, hogy epigenetikus szabályozás alatt áll.

## Summary

Based on highly crossable genotype combinations, an efficient hybridization system was developed for the production of intergeneric wheat-barley hybrids (*T. aestivum* × *H. vulgare*). Flow cytometry, genomic in situ hybridization and chromosome-specific molecular marker analyses confirmed the generation of partial or full hybrids as well as maternal, wheat haploids. This system was used to make a large population of 210 F1 plants in order to characterize paternal chromosome elimination during early development. Molecular marker analysis revealed the random loss of each barley chromosome in this population.

To characterize the major events during the prefertilization as well as postfertilization stages of reproduction, a systematic micro-anatomical study was carried out. Vitality and tube formation capacity on wheat styles was not different between barley and wheat pollen. Fertilization frequencies and early development of zygotes, embryos and endosperm as monitored by confocal microscopy were also similar after cross-pollination with barley or self-fertilization. However, endosperm development was blocked during the coenocytic phase, which resulted in gradual developmental delay and deterioration of hybrid embryos. This study indicates no prefertilization incompatibility in wheat × barley crosses, and reveals a classical triploid or endosperm block under epigenetic control as described in *Arabidopsis* and other species.