



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

MATE

**MOLECULAR CYTOLOGICAL
INVESTIGATION OF SELECTIVE
CHROMOSOME ELIMINATION IN
WHEAT × BARLEY HYBRID LINES**

DOI: 10.54598/005400

Doktori (PhD) Értekezés Tézisei

MIHÓK EDIT

Gödöllő

2023

A Doktori Iskola megnevezése: Növénytudományi Doktori
 Iskola

A Doktori Iskola vezetője: *Prof. HELYES Lajos*

Témavezetők: *SEPSI Adél PhD, SÁGI László PhD*

Mezőgazdasági Kutatóközpont,

Martonvásár, Magyarország

.....

Az Iskolavezető jóváhagyása

.....

A Témavezető(k) jóváhagyása

BEVEZETÉS - A TÉMA JELENTŐSÉGE

A gabonatermesztés a mezőgazdaság vezető ágazatát képviseli, mind Magyarországon, mind Európában, és világszerte is. Az utóbbi évek legnagyobb kihívását a növénytermesztésben, a gabonafélék termésátlagának kiszámíthatatlan éves ingadozása jelentette, a szélsőséges időjárási események gyakoribbá válása miatt. Egy száraz vagy szélsőségesen meleg évben a terméskiesések negatívan befolyásolhatják az ország gazdasági növekedésének ütemét és kiszámíthatóságát.

Az éghajlatváltozás korában, a fajon belüli genetikai sokféleség kulcsfontosságú a fajoknak, az új biotikus-, és abiotikus stresszhatások összetett, és együttes jelenlétéhez való alkalmazkodása szempontjából. A búza (*Triticum aestivum* L.) az emberi táplálkozásra és takarmányozásra használt egyik legfontosabb gabona, és az egyik legkorábban házasított növény. A házasítás hosszú időszaka alatt, a nagy hozamú tulajdonságokra irányuló emberi szelekció csaknem kiirtotta a búza egykor meglévő (de az ősfajokban azóta is fennmaradt) genetikai sokféleséget (Haas et al., 2019; Venske et al., 2019). Új genetikai anyag bevitele a búza genetikai hátterébe, lehetőséget biztosíthatna, olyan mezőgazdaságilag kívánatos tulajdonságok beépítéséhez, ami bővítené a búza genetikai potenciálját, és megoldhatná a házasítás által létrehozott " szűk genetikai keresztmetszetet".

A különböző fajok spontán kereszteződésével, vagy irányított keresztezéssel történő interspecifikus hibridizáció a hasznos tulajdonságokat hordozó gének búzába történő átvitelének hagyományos módja. A búza előnemesítésében a *Triticeae* alcsaládon belüli, a búzával ivarosán kompatibilis rokon fajokat lehetne

használni, mint a diploid őszi árpa (*Hordeum vulgare* L.), amely a búzához képest 7-10 nappal korábban betakarítható, így gyorsabb szemfejlődést eredményezne, elkerülve a nyár eleji aszályos időszakokat. A búzanemesítés is hasznosíthatná az árpa kedvező tápanyagtartalmi összetételét, mint például az esszenciális aminosavak (lizin), az élelmi rostok (β -glükán) és a prebiotikum-tartalom.

Bár a búza és az árpa (*Hordeum vulgare* L.) közötti életképes hibridek létrehozására irányuló kísérletek több mint százéves múltra tekintenek vissza, ez technikailag továbbra is nagy kihívást jelentő folyamat, amelynek sikerességi aránya igen alacsony. Ráadásul az árpa genomjának átadását, az eleve nagyon kevés túlélő embrióban tovább akadályozza az úgynevezett uniparentális (egyszülős) kromoszómaelimináció, amely az (apai) árpa szülőtől származó kromoszómák részleges vagy teljes elvesztéséhez vezet. Az uniparentális kromoszómaelimináció a korai embrionális sejtosztódások során, vagy a meiózis során következhet be (Houben et al., 2011; Ishii et al., 2016), és haploid (steril) utódot eredményez. Annak ellenére, hogy a kromoszómakiesés folyamata a kívánatos kromoszómaátvitelben jelentős gátló szerepet játszik, a távoli hibridekben, a kromoszómaelimináció mögötti molekuláris mechanizmusok pontos feltárása még nem történt meg.

A centromérák olyan specifikus kromoszómarégiók, amelyek a sejtosztódás során a kromoszómák mozgásához és az utódsejtekbe történő átviteléhez nélkülözhetetlenek. A centroméra sejtosztódásban betöltött pontos szerepe a centroméra-specifikus H3-hiszton (növényekben CENH3) fehérjéknek a centromérikus DNS-be való bekötődésén alapul, ami biztosítja a centroméra aktivitásának

epigenetikai kontrollját. Jelen tanulmány célja a CENH3 fehérjék uniparentális kromoszómaeliminációban betöltött lehetséges szerepének a vizsgálata volt, búza $\times$ árpa hibridekben. A kromoszómaelimináció kiváltó tényezőinek azonosításával és azok megszüntetésével egy új genetikai forrás bevonása válna lehetővé a búza előnemesítési és nemesítési programjaiba.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. HIBRID NÖVÉNY-ELŐÁLLÍTÁS

Jelen kutatásban elemzett búza $\times$ árpa F1 hibrideket a nőivarú szülőként használt "M1" ($2n=6x=42$) anyai kétszeres haploid vonal (Polgári et al., 2014), amely a hexaploid tavaszi búza "Sichuan" tájfajtából származtatható vonal, és a hímivarú szülőnek használt "Golden Promise" ($2n=2x=14$) diploid kétsoros tavaszi árpa fajta keresztezéséből nyertük.

A keresztezéseket és az azt követő embriómentést a beporzást követő 14. napon végeztük a Polgári és mtsai. (2014) által leírtak szerint. A szülői növényeket és a regenerált hibrid palántákat tőzegtömbökben neveltük (hathetes vernalizációs időszakot követően 4°C hőmérsékleten, 12 órás megvilágításban), majd átültettük őket cserepekbe, fitotron kamrákban (PGR-15, Conviron), illetve növénynevelő szekrényekben (MLR-352-PE, PHCbi, Panasonic Corporation), neveltük, 16 órás fotoperiódus mellett.

2. MOLEKULÁRIS MARKER-ELEMZÉS

Az uniparentális kromoszómaelimináció miatt, a regenerált F1 hibrid növényeket először árpa kromoszóma-specifikus molekuláris markerekkel vizsgáltuk, hogy meghatározzuk a hibridekben található árpa kromoszómák pontos összetételét, különös tekintettel a CENH3

fehérjevariánsokat kódoló kromoszómákra (1H és 6H). Ehhez PCR-primerpár-készletet terveztünk, és PCR-futtatásokat végeztünk a hibridek szűrésére, az F₁ növények aktuális árpa kromoszóma tartalmának pontos azonosítására.

3. ELLENANYAG - TERVEZÉS, ELŐÁLLÍTÁS ÉS TESZTELÉS

A búzából és árpából származó, különböző CENH3 fehérje-változatokat felismerő poliklonális antitesteket terveztünk és állítottunk elő. Miután immunjelöléssel teszteltük a specificitásukat. eszközként használtuk a CENH3 fehérje-változatok búza-árpa hibridekbe történő fajközi beépülésének elemzésére.

4. CENTROMÉRA-SPECIFIKUS FISH PRÓBÁK ELŐÁLLÍTÁSA

A CENH3 interspecifikus bekötődésének vizsgálatához, a CENH3 fehérje vizualizálásán kívül, arra is szükségünk volt, hogy meg tudjuk különböztetni egymástól a két szülői fajból származó kromoszómák centromérikus régióit. A két faj centroméra-specifikus szekvenciái közötti nagyfokú (85%-os) hasonlóság ellenére, sikerült olyan szülői centromérikus mintázatokat izolálnunk, amelyek egyedinek tekinthetők. A centromérikus FISH-próbákat PCR-reakciókban amplifikáltuk, majd direkt jelöléssel különböző fluoreszcens pigmenteket konjugáltunk hozzájuk, majd *in situ* hibridizációval igazoltuk a specificitásukat.

5. ÚJ MIKROSZKÓPI PREPARÁTUM – KÉSZÍTÉSI MÓDSZER OPTIMALIZÁLÁSA

Egyszerűen használható, növényi sejtmag-preparátum készítési eljárást dolgoztunk ki, amelynek célja az volt, hogy olyan minőségű sejtmag preparátumokat készítsünk, amelyekben megőrizzük a sejtmagok 3D ultrastruktúráját, és egyidejűleg

biztosítjuk az ellenanyagoknak az epitóphoz való hozzáférését is. A kívánt eredményt a fixálási idő lerövidítésével, valamint a fixálószernek az intakt szövetek belső sejtrétegeihez való hatékonyabb bejuttatásával értünk el, olyan módon, hogy a nem denaturáló fixálószerhez (4%-os PFA), detergenst (IGEPAL) adtunk hozzá, külön enzimek használata nélkül. Továbbá, a fixálási idő optimalizálása révén, csökkent a sérült sejtek száma, és a sejtörmelék aránya a preparátumokon, különösen a búzában. Ezért a jelen vizsgálatban használt genotípusok esetében ezt a módszert tekintettük optimális fixálási időnek. A sejtflat és a citoplazmát mechanikusan távolítottuk el, egy erre a célra szolgáló szövetzúzó eszközkészlettel, ami lehetővé tette, hogy jelentősen rövidebb idő alatt, nagy mennyiségű növényi anyagot dolgozzunk fel, és nagyszámú sejtmag-preparátumot állítsunk elő, a korábban használt enzimes emésztés, illetve kézi macerálás módszerével összehasonlítva. Az LB01 puffer használata a szövetek oldatban történő homogenizálása során, a sejtmagok optimális elválasztását, és a legkevesebb összetapadt sejtet (sejtaggregátumot) eredményezte. Az optimalizált módszer publikálásra került (Lásd az Eredmények részt).

6. CITOLÓGIAI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI ELEMZÉSEK

Az árpa-kromoszóma-készlet összetétele alapján, két növényt választottunk ki az F1 hibrid növények közül, amelyeket további ImmunoFISH vizsgálatokkal elemeztünk, hogy meghatározzuk a CENH3 fajspecifikus-, és fajok közötti beépülését, mitózisban, és meiózisban, és hogy nyomon követhessük a kromoszóma-eliminációs folyamat jellegét a búza $\times$ árpa elsődleges hibridekben a mitózisban, és a meiózisban.

7. A CENH3 FEHÉRJE BEKÖTŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA F₁ HIBRIDEK MITOTIKUS SEJTJEIBEN

Annak feltárására, hogy a hibrid sejtmagban jelenlévő búza és árpa centromérák (FISH-sel azonosítva) képesek-e kölcsönösen beépíteni a különböző szülői eredetű CENH3 fehérjét (immunjelöléssel azonosítva), a mitotikus sejtekben, vagy csak a fajazonos (endogén) CENH3 fehérjét töltik be, ImmunoFISH, kombinált módszert használtunk, amely a fehérje immunjelölés mellett, a centroméra-specifikus CRW (búza)-, és G+C (árpa) régiókat egyidejűleg és szelektíven detektáltuk.

8. MIKROSZKÓPIA

Konfokális lézerpasztázó mikroszkópot használtunk az immunjelölt CENH3 fehérjeváltozatok és a szülői centromérikus DNS-szekvenciába való beépülésük egyidejű kimutatására.

EREDMÉNYEK

1-2. NÖVÉNYANYAG ÉS MOLEKULÁRIS MARKER- ELEMZÉSEK

14 nappal a keresztezés, majd az ezt követő embriómentés és növényregenerálás után az F₁ hibrid palántákat molekuláris marker PCR-analízissel vizsgáltuk, amely feltárta az apai eredetű árpa kromoszómák egyedi összetételét az egyes növényekben. Az eredmények alapján két hibrid növényt

választottuk ki, hogy a kutatás céljának megfelelően, további vizsgáljuk.

3. ANTITEST-ELŐÁLLÍTÁS, TESZTELÉS

A saját tervezésű, négy db poliklonális antitest közül három (Búza α , Búza β , Árpa α) alkalmasnak bizonyult a CENH3 fehérjék faj-, illetve variáns-specifikus beépülésének célzott kimutatására a búza $\times$ árpa hibrid növények gyökércsúcsból izolált sejtmagjaiban.

4. CENTROMÉRA-SPECIFIKUS FISH PRÓBÁK TERVEZÉSE ÉS ELŐÁLLÍTÁSA

A szülői centromérák vizuális elkülönítését a hibrid sejtmagban a centroméraspecifikus FISH próbák tették lehetővé, és az F1 növények mitotikus és meiotikus sejtjeiben a CENH3 fehérjeváltozatok betöltésének vizsgálataiban használtuk fel.

5. ÚJ MIKROSKÓPI PREPARÁTUM-KÉSZÍTÉSI MÓDSZER OPTIMALIZÁLÁSA

Egy új, optimalizált mikroszkópi preparátum-készítési módszert dolgoztunk ki és publikáltunk, amely hatékonyan megőrzi a sejtmag 3D szerkezetét, és előmozdítja az antitestek hozzáférését az epitóphoz. Egyidejűleg, nagy mennyiségű növényanyag feldolgozását teszi lehetővé, és előzetes gyakorlat nélkül is könnyen kivitelezhető és reprodukálható az eredmény. További előny, hogy a preparálási módszer lehetővé teszi az *in situ* hibridizációs-, illetve az immunjelölési módszerek egyidejű, kombinált alkalmazását (Makai, Diána – Mihók, Edit és mtsai., 2023).

6. KÉT BÚZA $\times$ ÁRPA F₁ HIBRID CITOLÓGIAI JELLEMZÉSE

A tizenhat előállított F₁ hibrid növény molekuláris marker-elemzéssel megállapított árpa kromoszóma-tartalma alapján, két növényt választottunk ki, további elemzések céljára. A citológiai vizsgálatok megerősítették a két hibrid növény egyedi árpa és búza kromoszóma-összetételét, különös tekintettel a CENH3-kódoló szekvenciákat hordozó árpa kromoszómákra (1H és 6H).

A No. 22/2020 számú hibrid, az árpa genom tekintetében **"részleges hibrid"**, mivel az árpa **kromoszóma-specifikus marker-elemzés** csak 4 árpa kromoszómát (3H, 4H, 5H és 6H) tartalmazott, és ezek közül csak egy kromoszóma (6H) volt CENH3 β -kódoló, de a CENH3 α -kódoló 1H nem volt jelen). (Árpa CENH3 α - és β +)

A **citogenetikai elemzések** a négy árpakromoszómán kívül további 21 búzakromoszómát azonosítottak, azaz a hibridben a teljes anyai haploid genom is jelen volt a No. 22-es hibridben.

A **gyökércsúcs sejtek (n=75) citológiai vizsgálata** árpa genomi DNS- és 5S rDNS-t próbaként használva egyidejű GISH-FISH módszerrel 21 búza- és 4 árpa- (3H, 4H, 5H és 6H) kromoszómát mutatott ki, ezzel megerősítette két árpa-kromoszóma CENH3-változatokat kódolók hiányát és jelenlétét: CENH3 α -t kódoló 1H hiányát, és a CENH3 β -t kódoló 6H jelenlétét a hibrid szomatikus sejtjeiben.

A No. 28/2020 számú hibrid az árpa genomot tekintve, **"teljes hibrid"**-ként jellemezhető, mivel a kromoszóma-marker-

elemzés és a hibrid genom *in situ* hibridizációja mind a 14 árpa kromoszómát azonosított, ami az apai genom duplikációját jelenti ($n=48$). Az árpa kromoszómákon kívül, változó számú búzakromoszómát (0-20) is azonosítottak. Az elemzett sejtek többségében (79%) a búzakromoszómák száma 14 és 20 között változott, ami mitotikus instabilitásra és a búzakromoszómák eliminációjára utal. Az elemzett mitotikus sejtmagok egy részhalmazában (21%) csak az árpa szülőktől származó kromoszómák maradtak meg, míg a búzakromoszómák teljesen eliminálódtak.

(Barley CENH3 α^+ and β^+)

7. CENH3 BEKÖTŐDÉS ÉS A SEJTMAGI SZERVEZŐDÉS AZ F₁ No. 22/2020 SZÁMÚ HIBRID MITOTIKUS SEJTJEIBEN

A 22/2020 számú F₁ hibrid, amely a búza teljes haploid kromoszómakomponensét (21 kromoszómát) és négy árpa kromoszómát tartalmazott: 3H, 4H, 5H, 6H. Az 1H kromoszóma hiánya (feltehetően az embrionális sejtosztódások során eliminálódott) arra utalt, hogy hiányzik az árpa α (B α) CENH3 hisztonfehérjét kódoló gén is.

(CENH3 B α -, CENH3 B β +))

Annak feltárására, hogy a búza és árpa centromérák, egyazon sejttagon belül képesek-e kölcsönösen (interspecifikusan) beépíteni a különböző CENH3 fehérjéket, vagy csak saját (endogén eredetű) CENH3 fehérjéket tudják beépíteni, ImmunoFISH-t végeztünk, búza CRW és árpa G+C próbákkal, valamint faj- és variáns-specifikus CENH3 antitestekkel. Így szelektíven detektáltuk a búza és az árpa centroméráit, és

egyidejűleg a CENH3 bekötődést is. A B α CENH3 antitest nem adott immunjelet a centromérákon belül a vizsgált szomatikus sejtmagokban, ami megerősítette a B α CENH3 fehérje hiányát, a 22/2020 számú búza $\times$ árpa F1 hibridben.

További kísérletekben a CRW és G+C próbákkal és W α vagy W β CENH3 immunfluoreszcenciával végzett immunoFISH változó számú 11-24 búza centromérikus jelet és 2-4 árpa centromérikus jelet mutatott ki (n=44). A búza és árpa centromérikus jelek száma az árpa centromérák közötti társulások (asszociációkat) jelezte, és a búza centromérák között is hasonló társulások voltak megfigyelhetők. Néhány esetben az árpa centromérák részben kolokalizált helyzetben voltak a búza centromérákkal, ami feltárja a lehetséges társulást a két szülőfaj centromérái között.

A W α és W β CENH3 immunfluoreszcens jelek kolokalizálódtak a búza centromérák CRW szekvenciáival, ami normális anyai centroméra-aktivitásra utal. Hasonlóképpen, a W α és W β CENH3 hisztonok kolokalizálódtak az árpa centromerikus DNS G+C jeleivel, függetlenül attól, hogy külön-külön helyezkedtek-e el. Ez azt jelezte, hogy az anyai CENH3 búza hisztonváltozatok a búza $\times$ árpa 22/2020 számú F1 hibridben mind a búza-, mind az árpa centromérákba betöltődnek, ami azt mutatja, hogy az árpa centromérikus ismétlődései képesek rokon fajból származó CENH3 fehérjéket betölteni.

8. CENH3 BEKÖTÖDÉS ÉS A SEJTMAGI SZERVEZŐDÉS AZ F₁ No. 28/2020 SZÁMÚ HIBRID MITOTIKUS SEJTJEIBEN

A 28/2020 számú F1 hibrid citológiai elemzése alapján 14 árpa kromoszómát tartalmaz, amely az árpa teljes diploid genomját (1H-

7H) képviseli, a változó számú (0-20) búza kromoszómák mellett. (CENH3 B α +, CENH3 B β +))

A W α , W β vagy B α CENH3 immunfluoreszcenciával végzett immunoFISH, valamint a CRW és G+C búza- és árpa-centroméraspecifikus próbák *in situ* hibridizációja változó számú, 0-19 közötti búzacentroméra jelet azonosított, a szintén változó 7-14 árpa centroméra jel mellett, amelyek a sejtmag-periféria közelében, egy csoportba rendeződtek (n=45). A búza centromérák a centroméracsoport perifériáján, az árpa centromérákat körülvevően helyezkedtek el. Az árpa centromerikus jelek száma megegyezett az árpa szomatikus sejtjeinél számoltakkal, ami azt mutatja, hogy az árpa centroméra-centroméra társulások (asszociációk) a hibrid sejtmagokban is végbemennek. A búza centromerikus jelek számának nagyfokú eltérése, vagy esetenként, a teljes hiánya, a búzakromoszóma-készlet folyamatos eliminációjára utalt. Ez egybeesett a búza centromérákon belüli, kevésbé intenzív vagy hiányzó W α CENH3 jellel. Ezzel szemben, az árpa centromérák egyértelmű W α CENH3 jelet mutattak, ami arra utal, hogy a W α CENH3 átíródik a hibrid sejtmagokban. A W β CENH3 jelek kolokalizálódtak mind a búza, mind az árpa centroméraival, és számuk 8 és 22 között változott, ami azt jelzi, hogy a 28/2020 számú F1 hibrid szomatikus sejtmagjaiban centroméra-centroméra társulások fordulnak elő. A B α CENH3 antitesttel végzett immunoFISH kimutatta a B α CENH3 hisztonfehérje betöltődését az árpa centromérákba, azonban a búza centromérákban nem volt a módszerünkkel kimutatható immunlokalizáció.

9. CENH3 BEKÖTŐDÉS ÉS CENTROMÉRA-SZERVEZŐDÉS BÚZA $\times$ ÁRPA F1 HIBRIDEK MEIOTIKUS SEJTJEIBEN

Annak kimutatására, hogy a búza CENH3 variánsok betöltődnek-e az árpa centromerikus ismétlődéseibe a meiotikus sejtekben is, immunoFISH-t végeztünk a 22/2020 és 28/2020 számú búza × árpa F1 hibridek meiotikus profázis I. sejtmagjain.

A **22/2020** számú hibridben a G+C próbával jelölt árpa centromerikus jel 2-4 között változott, hasonlóan a mitotikus sejtekben megfigyelthez. A búza centromerikus jelek száma 11-20 között mozgott (n=18, 19. ábra). Eredményeink megerősítették, hogy a W α és W β CENH3 fehérje jelek kolokalizáltak, mind a búza, mind az árpa centromérákkal a 22/2020 számú részleges hibrid meiocitáiban.

A **28/2020** számú hibrid meiotikus sejteiben csak árpa centromérákat lehetett kimutatni, ami a búzakromoszómák teljes eliminációját igazolta. Az árpa centroméra jelek száma 5-13 között változott. A búza W α W β , az árpa B α CENH3 CRW GC-repeat Merge + DAPI specifikus CENH3 fehérjeváltozatok (W α és W β) jelét egyetlen elemzett meiotikus mintán sem lehetett kimutatni, míg a B α CENH3 kolokalizálódott az árpa centromérákkal.

MEGVITATÁS

A jelen vizsgálat célja az volt, hogy feltárjuk a szülői CENH3 hisztonfehérjék beépülését az újonnan előállított búza × árpa F1 hibridekben, és megértsük ennek az egyszülős kromoszómaeliminációban betöltött szerepét. A kutatási projekt a molekuláris citológiai technikák optimalizálását igényelte, hogy nagy mennyiségű, jó minőségű növényi sejtmagot tudjunk előállítani, amely alkalmas a komplex molekuláris citológiai vizsgálatok rutinszerű elvégzésére.

Számos kritikus tényezőt kellett optimalizálni ahhoz, hogy az eljárást következetesen alkalmazni lehessen.

Az új növényi sejtmag-előkészítési eljárás lehetővé tette a CENH3-változatok immunjelölésének kombinálását 3D FISH-sel, amely lehetővé teszi több centromerikus DNS-szekvencia kimutatását, így a búza és az árpa centromerikus DNS-eit még a hibrid sejtmagba zárva is meg lehetett különböztetni. Ez a megközelítés lehetővé tette a búza és árpa CENH3 fehérje variánsok búza és árpa centromerikus DNS-ekbe való beépülésének értékelését búza $\times$ árpa hibridekben, egysejtes felbontásban.

Két búza $\times$ árpa F1 hibridet állítottunk elő és vizsgáltuk a búza és árpa α - és β CENH3 fehérje variánsok centromerikus DNS-ekbe történő fajközi beépülését. A búza és árpa α - és β CENH3 variánsok betöltését a hibrid mitotikus sejtmagokban centroméra-specifikus repetitív DNS-próbák, valamint faj- és variáns-specifikus CENH3 antitestek kombinációjával értékeltük. Vizsgálatunk megerősítette az árpa α CENH3 fehérje hiányát a 22/2020-as hibridből, és kimutatta, hogy a búza CENH3 variánsok mind a búza, mind az árpa centroméraiba beépülhetnek. A négy árpakromoszóma megtartása és fenntartása egymást követő mitózisokon keresztül a 22/2020-as hibridben azt jelezte, hogy az árpakromoszómák stabilan öröklődhetnek a saját (endogén) illetve „kon-specifikus” CENH3 fehérje variánsok hiánya ellenére.

A cereba retroelem a fűfélék centroméraiban erősen konzervált (Presting és mtsai., 1998; Qi és mtsai., 2013). Az árpa cereba és búza ortológjának, a CRW-nek az egyes példányai 85%-os szekvencia-homológiát mutatnak (Liu et al., 2008). Az árpa cereba és a búza

CRW retrotranszpozonok közötti nagyfokú homológia hozzájárulhat a búza CENH3 fehérje sikeres beépüléséhez az árpa centroméraiba. Bár az árpa centromérák között is vannak eredendően eltérő ismétlődő szekvenciák, például a G+C-gazdag szatellit, a centromerikus DNS és a CENH3 fehérjék közötti kölcsönhatás a *Triticeae* alcsaládban nem teljesen konzervatív, mivel a CENH3 a natív centromérából teljesen hiányzó neocentromerikus ismétlődésekbe is beépülhet (Nasuda et al., 2005).

JAVASLATOK

A kromoszómák stabilitásának/eliminációjának megértéséhez, majd a növénytermesztési programokban történő befolyásolásához, előbb a centromérák epigenetikai és genetikai jellemzőinek további elemzése szükséges, a gabonafélék minél szélesebb körében vizsgálva. A centroméra DNS és a CENH3 fehérjék elképesztő fejlődési sebességének a háttérben működő hajtóerő megértése esetén, az ismeret alkalmazható lenne a növénynemesítésben, vagyis lehetővé tehetné a növénynemesítés számára eddig elérhetetlen hibridkombinációk előállítását.

Ha megértjük a centroméra DNS és a CENH3 fehérje adaptációs potenciálját meghatározó és mozgató törvényszerűségeket, folyamatokat, akkor felhasználhatjuk majd azokat a növénynemesítésben.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Jelen munkában egy új növényi sejtmag-előkészítési módszert dolgoztunk ki, amely a legmodernebb molekuláris citológiai-, és mikroszkópos módszerekkel (pl. immunhisztokémia, *in situ* hibridizáció, valamint ezek együttes alkalmazásai immunoFISH, immunoGISH) lehetőséget biztosítanak a kiváló minőségű egysejtes analízisre.
2. A bemutatott kutatási projektben első ízben fejlesztettük ki és teszteltük hatékonyan a búza és árpa CENH3 fehérje három változatának kimutatására alkalmas specifikus poliklonális antitestek palettáját. A kapott fehérje-antitestek alkalmasak a CENH3 fehérjeváltozatok fajspecifikus kimutatására búza × árpa hibrid vonalakban és származékaikban.
3. A molekuláris citológia és a nagy felbontású mikroszkópia kombinálásával az árpa és búza centromerikus DNS-t, a megfelelő CENH3 fehérjevariánsokkal, egyidejűleg vizualizáltuk a búza-árpa F1 hibridek mitotikus és meiotikus sejtmagjainak háromdimenziós szerkezetében. Ez lehetővé tette a különböző CENH3 hisztonfehérje-változatok endogén és fajközi beépülésének vizsgálatát.
4. A jelen kutatási munka mutatta ki először, hogy az árpa centromerikus DNS képes mind a búza, mind az árpa CENH3 fehérjeváltozatát, a CENH3 a-t betölteni a búza × árpa F1 hibridek mitotikus sejtciklusa során. Ez a munka feltárta, hogy az árpa kromoszómák stabil kromoszóma-öröklődést követnek, még akkor is, ha az egyik endogén, árpa CENH3 variáns nem áll rendelkezésre a hibrid sejtmagban.

5. Az árpa centromerikus DNS plaszticitását a búza CENH3 fehérjék betöltésére meiotikus sejtekben kimutatták, és az árpa kromoszóma stabilitását megerősítették az F1 hibrid meiotikus I. profázisában.

A TÉZISEK IRODALMI HIVATKOZÁSAI

Haas, M., Schreiber, M. and Mascher, M. (2019) Domestication and crop evolution of wheat and barley: Genes, genomics, and future directions. *J. Integr. Plant Biol.*, 61, 204–225.

Houben, A., Sanei, M. and Pickering, R. (2011) Barley doubled-haploid production by uniparental chromosome elimination. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 104, 321–327. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-010-9856-8> [Accessed October 4, 2023].

Liu, Z., Yue, W., Li, D., et al. (2008) Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. *Chromosoma*, 117, 445–456. Available at: <http://www>. [Accessed July 5, 2023].

Makai, D.- Mihók, E.*, Polgári, D., Cseh, A., Lenykó-Thegze, A., Sepsi, A. and Sági, L. (2023) Rapid in-solution preparation of somatic and meiotic plant cell nuclei for high-quality 3D immunoFISH and immunoFISH-GISH. *Plant Meth.*, 19, 80. (*Co-first author)

Nasuda, S., Hudakova, S., Schubert, I., Houben, A. and Endo, T.R. (2005) Stable barley chromosomes without centromeric repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 9842–9847. Available at: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0504235102> [Accessed July 4, 2023].

Polgári, D., Cseh, A., Szakács, É., Jäger, K., Molnár-Láng, M. and Sági, L. (2014) High-frequency generation and characterization of intergeneric hybrids and haploids from new wheat–barley crosses. *Plant Cell Rep.*, 33, 1323–1331. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00299-014-1618-3>.

Presting, G.G., Malysheva, L., Fuchs, J. and Schubert, I. (1998) A TY3/GYPSY retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes. *Plant J.*, 16, 721–728. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10069078/> [Accessed July 4, 2023].

Qi, L.L., Wu, J.J., Friebe, B., Qian, C., Gu, Y.Q., Fu, D.L. and Gill, B.S. (2013) Sequence organization and evolutionary dynamics of

Brachypodium-specific centromere retrotransposons. *Chromosome Res.*, 21, 507–521. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10577-013-9378-4> [Accessed July 4, 2023].

Venske, E., Santos, R.S. Dos, Busanello, C., Gustafson, P. and Costa de Oliveira, A. (2019) Bread wheat: a role model for plant domestication and breeding. *Hereditas*, 156, 16

A SZERZŐNEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓI

Első szerzős, Impakt faktoros, angol nyelvű tudományos cikkek:

Makai, D., Mihók, E.*, Polgári, D., Cseh, A., Lenykó-Thegze, A., Sepsi, A. and Sági, L. (2023) Rapid in-solution preparation of somatic and meiotic plant cell nuclei for high-quality 3D immunoFISH and immunoFISH-GISH. Plant Meth., 19, 80. (*co-first author)

Mihók, E., Polgári, D., Lenykó-Thegze, A., Makai, D., Fábíán, A., Ali, M., Kis, A., Sepsi, A. and Sági, L. Plasticity of parental CENH3 incorporation into the centromeres in wheat × barley F1 hybrids. submitted

Impakt faktoros, társszerzős, angol nyelvű tudományos cikkek:

Polgári, D., Mihók, E. and Sági, L. (2019) Composition and random elimination of paternal chromosomes in a large population of wheat × barley (*Triticum aestivum* L. × *Hordeum vulgare* L.) hybrids. Plant Cell Rep., 38, 767–775.

Konferencia kiadványok magyar nyelven:

Mihók E; Sági, L (2017) Szinkronizációs módszer embriókultúrából regenerált növények citológiai vizsgálataihoz. In: Veisz, Ottó (szerk.) XXIII. Növénynemesítési Tudományos Nap: összefoglalók. Budapest, Magyarország: Magyar Tudományos Akadémia (MTA) (2017) 161 p., pp. 125-125, 1 p.

Mihók, E; Polgári, D; Icsó, D; Kis, A; Lenykó-Thegze, A; Fábíán, A; Sepsi, A; Sági, L (2022) Immunhisztokémiai módszer a kromoszómaelimináció vizsgálatára búza × árpa nemzetségihibridekben. In: Polgár, Zsolt; Karsai, Ildikó; Bóna, Lajos; Matúz, János; Taller, János (szerk.) XXVIII. Növénynemesítési Tudományos Napok; összefoglalók. Keszthely, Magyarország, Magyar Növénynemesítők Egyesülete (2022) 122 p., pp. 61- 61, 1 p.

Polgári, D; Mihók, E; Fábíán, A; Szakács, É; Sági, L (2017) Búza × árpa intergenerikus hibridek hatékony előállítása. In: Veisz Ottó

(szerk.) XXIII. Növénynevelési Tudományos Nap: összefoglalók. Budapest, Magyarország: Magyar Tudományos Akadémia (MTA) (2017) 161 p., pp. 133-133, 1 p.

Polgári, D; Mihók, E; Sepsi, A; Sági, L (2019) Fertilis utódok búza-árpa keresztezésből. In: Karsai Ildikó (szerk.) Növénynevelés a 21. század elején: kihívások és válaszok. XXV. Növénynevelési Tudományos Nap: Budapest, Magyarország: MTA Agrártudományok Osztálya Növénynevelési Tudományos Bizottság (2019) 502 p., pp. 105-109, 5 p. 70