

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**A PETESEJT AKTIVÁCIÓ SEJT- ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI  
VIZSGÁLATA GABONAFÉLÉKBEN**

Doktori értekezés

**POLGÁRI DÁVID**

Gödöllő

2017



**Doktori iskola:** *Növénytudományi Doktori Iskola*

**Vezetője:** Dr. Helyes Lajos, az MTA doktora  
egyetemi tanár, intézetigazgató  
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar  
Kertészeti Intézet

**Tudományága:** Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

**Témavezetők:** Dr. Sági László *Ph.D.*  
tudományos főmunkatárs, egyetemi magántanár  
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár

Dr. Jäger Katalin *Ph.D.*  
tudományos osztályvezető  
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár

.....  
Dr. Sági László  
témavezető

.....  
Dr. Jäger Katalin  
témavezető

.....  
Dr. Helyes Lajos  
iskolavezető



# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	5
Alkalmazott rövidítések jegyzéke .....	8
1. Bevezetés.....	9
2. Irodalmi áttekintés .....	13
2.1 A progámikus szakasz rövid jellemzése.....	14
2.2 Megtermékenyítés és petesejt aktiváció .....	16
2.3 Az embrió fejlődése.....	17
2.4 Az endospermium fejlődése.....	18
2.5 A szülői genomok kölcsönhatása.....	20
2.6 Az anyai hatás.....	23
2.7 Az anyai/zigotikus átmenet .....	25
2.8 A kromatinszerkezet változása.....	27
2.9 Genetikai imprinting (bevésődés) .....	29
2.9.1 A <i>FIS</i> gének .....	29
2.9.2 A Polycomb gének szerepe az egyedfejlődés során.....	32
2.10 Az idegen fajú hibridizáció rövid története.....	35
2.10.1 A kolchicin jelentősége az idegen fajú hibridizációban.....	36
2.10.2 A molekuláris citogenetika szerepe az idegen fajú hibridizáció fellendülésében .....	37
2.11 A termesztett búza keresztezhetősége .....	38
2.11.1 A búza génforrásai.....	39
2.11.2 Az idegen fajú keresztezések nemesítési célja.....	40
2.11.3 A rozs és az árpa mint két lehetséges keresztezési partner.....	41
2.12 A búza ( <i>T. aestivum</i> ) × árpa ( <i>H. vulgare</i> ) nemzetség hibridek .....	42
2.13 A keresztezhetőség genetikai faktorai a <i>Kr</i> gének.....	43
2.14 A búza ( <i>T. aestivum</i> ) × árpa ( <i>H. vulgare</i> ) keresztezések elméleti problémája .....	44
2.15 Célkitűzések.....	45
3. Anyag és módszer.....	47
3.1 Növényanyag.....	47
3.2 Nemzetség hibridek előállítása .....	47
3.2.1 Keresztezés.....	47
3.2.2 Demetilációs kezelés .....	48
3.2.3 Embriómentés .....	50

3.2.4 Genomduplikáció.....	50
3.2.5 Szövettenyésztés .....	51
3.3 Mikromorfológiai vizsgálatok a megporzást követően .....	51
3.3.1 Trypan kék festés.....	51
3.3.2 Anilin kék festés.....	51
3.3.3 Szövettani módszerek (fixálás, beágyazás és metszetkészítés).....	52
3.3.4 Konfokális mikroszkópia .....	52
3.3.4.1 In situ pollentömlő vizsgálat .....	52
3.3.4.2 In situ embriófejlődés vizsgálat .....	53
3.4 A hibrid utódnemzedék vizsgálata.....	54
3.4.1 Áramlási citometria .....	54
3.4.2 Molekuláris markerezés .....	54
3.4.3 Genomi (GISH) és fluoreszcens (FISH) in situ hibridizáció .....	57
3.5 Statisztikai elemzés.....	58
4. Eredmények és megvitatásuk.....	59
4.1 A progámikus (prefertilizációs) szakasz citológiája .....	59
4.1.1 Pollen életképesség .....	59
4.1.2 Pollen csíráképesség.....	60
4.1.2.1 Pollen csírázása és tömlőhajtás vizsgálata fénymikroszkóppal .....	60
4.1.2.2 Pollentömlők növekedésének vizsgálata konfokális mikroszkóppal .....	62
4.2 A posztgámikus (posztfertilizációs) szakasz citomorfológiája .....	63
4.2.1 A termők és ovulumok morfológiai és szövettani vizsgálata.....	63
4.2.2 Az in planta embriófejlődés konfokális mikroszkópos vizsgálata.....	67
4.3 Intergenerikus búza-árpa hibrid növények előállítása 2,4-D kezeléssel .....	70
4.3.1 Embriómentés .....	70
4.3.2 Növényregeneráció .....	70
4.3.3 A hibridek molekuláris elemzése.....	71
4.3.3.1 Genomméret és ploidszint meghatározása .....	71
4.3.3.2 Kromoszómakar-specifikus molekuláris markerek alkalmazása .....	74
4.3.3.3 Genomi in situ hibridizáció (GISH) .....	76
4.3.3.4 A molekuláris vizsgálatok eredményeinek összegzése.....	77
4.3.4 A hibrid genetikai háttér fixálása.....	79
4.3.5 Új búza dihaploid (DH) vonalak előállítása .....	81
4.4 Intergenerikus búza-árpa hibrid növények előállítása demetilációs kezeléssel.....	82
4.4.1 Fiatal (3-6 napos) búza-árpa hibrid szemkezdemények fénymikroszkópos vizsgálata .....	83

4.4.2 Két hetes hibrid szemkezdemények in situ fénymikroszkópos vizsgálata .....	87
4.4.3 Szemkötés és embrió kihozatal meghatározása .....	89
4.4.4 Növényregeneráció .....	90
4.4.5 Az apai genom öröklődésének vizsgálata a kezelések függvényében.....	91
4.4.6 A keresztezhetőség apai genotípustól függésének vizsgálata.....	93
4.4.7 A hibrid genetikai háttér fixálása.....	93
4.4.7.1 Genomduplikáció.....	93
4.4.7.2 A hibrid genotípus átörökítése a következő nemzedékbe .....	95
4.4.7.3 Az F1 nemzedék molekuláris vizsgálata .....	97
5. Következtetések és javaslatok.....	99
5.1 A progámikus szakasz kulcskérdései .....	99
5.1.1 A keresztezhetőség és a genotípus kapcsolata .....	100
5.1.2 Az idegen pollentömlő és a szinergidasejt kölcsönhatásai .....	101
5.2 A posztgámikus szakasz kulcskérdései .....	102
5.2.1 Az anyai szövetek és az auxin szerepe a posztgámikus folyamatokban .....	103
5.2.2 A fúziós termékek fejlődési defektusai a posztgámikus szakaszban.....	103
5.3 A posztgámikus fejlődési defektusok hátterének meghatározása.....	104
5.3.1 A búza és az árpa EBN értéke .....	105
5.3.2 A jelentős EBN különbség kiküszöbölésének lehetősége.....	106
5.3.3 A szelektív metiláción alapuló önvédelmi mechanizmus in vivo kémiai inaktiválása .....	107
5.4 A hibrid embriók eredetére vonatkozó kérdések .....	109
5.5 Az apai genom eliminációjával kapcsolatban felmerülő kérdések.....	109
6. Új tudományos eredmények.....	111
7. Összefoglalás .....	113
7. Summary.....	115
8. Mellékletek.....	117
8.1 Irodalomjegyzék .....	117
8.2 Táptalajok összetétele.....	132
8.2.1 N6D Táptalaj.....	132
8.2.2 RM1 Táptalaj .....	133
9. Köszönetnyilvánítás.....	135

## Alkalmazott rövidítések jegyzéke

2,4-D	2,4-Diklórfenoxi-ecetsav
AS	Antiszensz
BABB	Benzil alkohol és Benzil-benzoát (1:2 elegye)
BC	Backcross (visszakeresztezés)
CENH3	a H3 hisztonfehérje centroméras változata
DAP	Days after pollination (nap a megporzást követően)
DH	Dihaploid
DMSO	Dimetil-szulfoxid
dNTP	Dezoxiribonukleotid trifoszfát
EA1	EGG APPARATUS 1 fehérje
EBN	Endosperm Balance Number
EC1	EGG CELL 1 fehérje
EDTA	Etiléndiamin-tetraecetsav
FIE	FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM fehérje
FIS	FERTILIZATION INDEPENDENT SEED fehérje
FISH	Fluoreszcens in situ hibridizáció
GABA	$\gamma$ -aminovajsav
GDP	Bruttó hazai termék
GEX2	GAMETE EXPRESSED 2 fehérje
GFP	Green Fluorescent Protein (zölden fluoreszkáló fehérje)
GISH	Genomi in situ hibridizáció
GM	Génmódosított
Kr	Keresztezhetőség (gének)
KSH	Központi Statisztikai Hivatal
LAS	Leica Application Suite programcsomag
MEA	MEDEA fehérje
MET1	$\alpha$ -METILTRANSZFERÁZ enzim
MS	Microsoft
NaOCl	Nátrium-hipoklorit
NÉS	Nemzeti Éghajlatváltozási Stratégia
NTC	Templát nélküli kontroll
PAS	Perjódsavas Schiff festés
PcG	Polycomb Génkomplex
PCR	Polimeráz láncreakció
RBR1	RETINOBLASTOMA RELATED 1 fehérje
RT-PCR	Reverz-Transzkriptáz PCR
SSR	Simple Sequence Repeat
STS	Sequence Tagged Site
TTS	Transmitting-tissue-specific



# 1. Bevezetés

A földi népességnövekedés következtében felmerülő élelmiszerigény évről évre komolyabb kihívást jelent a mezőgazdaság és az élelmiszeripar számára. A növénynevelés ezért manapság egyre inkább fessegetni kényszerül a termesztett fajok genetikai terméspotenciáljának határait (Ray és mtsai. 2012; Hall és Richards 2013). Ezen felül a nagy területeken, monokultúrában történő termesztés és intenzív vegyszerhasználat, valamint az éghajlat változása és a globális mobilitás következtében gyakran bukkannak fel olyan virulens kórokozók és kártevők, amelyek ellen az adott élőhelyen termesztett fajták eredendően nem rendelkeznek ellenálló képességgel. Ezek a kórokozók és kártevők rövid idő alatt jelentős károkat képesek okozni, és ez kedvezőtlen években akár éhínséghez is vezethet. Éppen ezért minden társtudomány összefogására és alkalmazására szükség van annak érdekében, hogy az alapvető élelmiszerek iránti kereslet és kínálat közti tartós szakadék legalább ne növekedjen tovább (Lobell és mtsai. 2009; de Bossoreille de Ribou és mtsai. 2013; Curtis és Halford 2014).

Hasonlóképpen, a hazai növénytermesztés húzóágazatának számító gabonaféléknél is már jó ideje a termésmennyiség stabilitása a legfőbb probléma. A búza és a kukorica termésátlagainak szélsőértékei csak a legutóbbi 15 év során (2,6 és 5,1 t/ha, ill. 3,7 és 7,8 t/ha) egyaránt kb. 100%-os kilengést mutattak (KSH 2016a). Figyelembe véve, hogy az agráriumnak az élelmiszeriparral együtt alkotott részesedése a GDP-ből bőven meghaladja az 5%-ot (KSH 2016b), az exportból pedig a 7,5%-ot is, továbbá, hogy a gabonafélék részaránya a szántóföldi vetésszerkezetben hagyományosan több mint kétharmados, könnyen belátható, hogy a fenti szélsőséges termésingadozás jelenleg is érzékenyen érinti a gazdasági növekedés mértékét és tervezhetőségét.

Megtévezve a klímaváltozás Magyarországra nézve várhatóan erősen negatív nettó hatásával (Nemzeti Éghajlatváltozási Stratégia, 2014) a jövőben egy a mainál is nagyobb mértékű termés-instabilitás hazánkra nézve közvetlen gazdasági és társadalmi következményekkel járhat.

Ilyen fokú kitettség mellett az egyre magasabb és stabil terméshozamok eléréséhez minél szélesebb genetikai alapokra épített, bőtermő és kiváló környezeti alkalmazkodó képességgel rendelkező fajták szükségesek. S habár kontinensünkön rengeteg új fajtát bocsátanak ki évente, amelyek tulajdonságaikban valamelyest felülmúlják elődeiket, az új fajták ezektől lényegi tulajdonságaikban alapvetően nem térnek el.

Mivel a hagyományos nevelés csak lassan vagy egyáltalán nem biztosítja új tulajdonságokat kódoló gének megjelenését a genomban, jelentős előrelépést igazán olyan

megoldásoktól várhatunk, amelyek képesek közvetlenül vagy közvetve felhasználni más élőlények és fajok génkészletét, genetikai információját. Ilyen technológiák segítségével áttörhetőek és tágíthatók azok a korlátok, amelyek az ivaros szaporodás behatárolásával megakadályozzák az egy adott faj genomjából hiányzó hasznos tulajdonságok, illetve az ezeket kódoló gének kölcsönvételét, „kipótlását” más fajok genomjából.

Ez a folyamat alapvetően kétféle módon valósulhat meg: (i) izolált gének közvetlen beépítésével a géntechnológia alkalmazása révén (genetikai módosítás, genomszerkesztés, mesterséges kromoszóma), vagy (ii) idegen fajok (interspecifikus) és nemzetségek közti (intergenerikus) ivaros keresztezéssel.

Az idegen fajú keresztezéssel végrehajtott teljes vagy részleges genomátvitel lehetősége régóta kutatott terület, ami esélyt jelent idegen fajok egyedi tulajdonságainak egy új hibridben történő ötvözésére. A biotikus és abiotikus stressznek ellenálló egzotikus genetikai alapanyagok bevonása a nemesítésbe (pl. többszöri visszakeresztezés és szelekció után) jó adaptációs képességű és megnövekedett termésbiztonságú alapanyag előállításához vezethet, ami a nemesítés hagyományos módszereivel nem érhető el. Ennek érdekében a nemesítés a múlt század eleje óta keresi azokat a távoli kombinációkat, amelyek keresztezés útján életképes, mindkét szülő genetikai információját hordozó utódokat eredményeznek.

A termesztett, hexaploid búza (*Triticum aestivum* L.) a pászitfűfélék (Poaceae, Gramineae) *Triticum* nemzetségébe tartozik, ami mindössze 6 fajt foglal magába (Van Slageren 1994). A nemzetségen belüli hibridizáció lehetőségére a legkézenfekvőbb bizonyíték a magasabb ploidszintű fajok létezése, amelyek bizonyítottan a nemzetség diploid, egyszeres genomot tartalmazó fajainak spontán hibridizációjából eredeztethetőek. Annak ellenére, hogy az allopoliploid fajok és alfajok száma viszonylag magas, a *Triticeae* nemzetségcsoporton belüli kombinációk többsége nem eredményez utódokat, így a természetes poliploidok csak egy szűk halmaz genomjainak különböző kombinációiból állnak. A szövettenyésztési technikák fejlődésével lehetőség nyílt olyan távoli, nemzetségek közti keresztezésekből is utódokat nyerni, amelyek addig sikertelennek bizonyultak. Így állítottak elő a múlt század folyamán *Triticum* × *Secale*, *Triticum* × *Hordeum*, *Triticum* × *Agropyron* vagy *Triticum* × *Aegilops* kombinációkból nemzetség hibrideket, amelyek közül egyedül a sorban az első, a tritikálé futott be jelentős karriert. Ez részben talán annak tudható be, hogy időben jóval megelőzte a többieket, azonban sokkal inkább meghatározó lehet az a tény, hogy ez volt az egyetlen kombináció, amelynek mindkét szülője háziasított, és a mezőgazdasági termelésre közvetlenül alkalmas genommal rendelkezik. Ugyanez az előny más domesztikált fajok esetében is fennállhat, és különösen igaz ez az árpára, ami a búza egyik legközelebbi rokona és a második legjelentősebb gabonaféle az északi féltekén. Az (őszi) árpa (*Hordeum vulgare* L.) a búzánál általában, jobban bokrosodik

jobb sótűrővel rendelkezik, és 7-10 nappal korábban aratható, ami lehetővé teszi a korai nyári aszályos időszak elkerülését, és gyorsabb szemfejlődést is jelent. Ugyanakkor a minőségi paraméterek tekintetében sem elhanyagolandó, hogy esszenciális aminosavak (pl. lizin) és értékes tápanyagok ( $\beta$ -glikán, rostok és prebiotikumok) nagyobb mennyiségben található az árpában, mint a búzában. Összességében tehát a két faj eltérő genetikai potenciáljának egyesítése intergenerikus hibridizáció – azaz nem-GM közvetítette génátvitel – révén a búza termesztését és minőségi összetételét egyaránt kedvező irányba tolhatja el. Az in vitro technikák alkalmazásával növények regenerálhatók ugyan búza  $\times$  árpa, illetve reciprok keresztezésekből, a mindkét szülő teljes genomját hordozó amfiploid előállítását a mai napig nem sikerült megvalósítani.

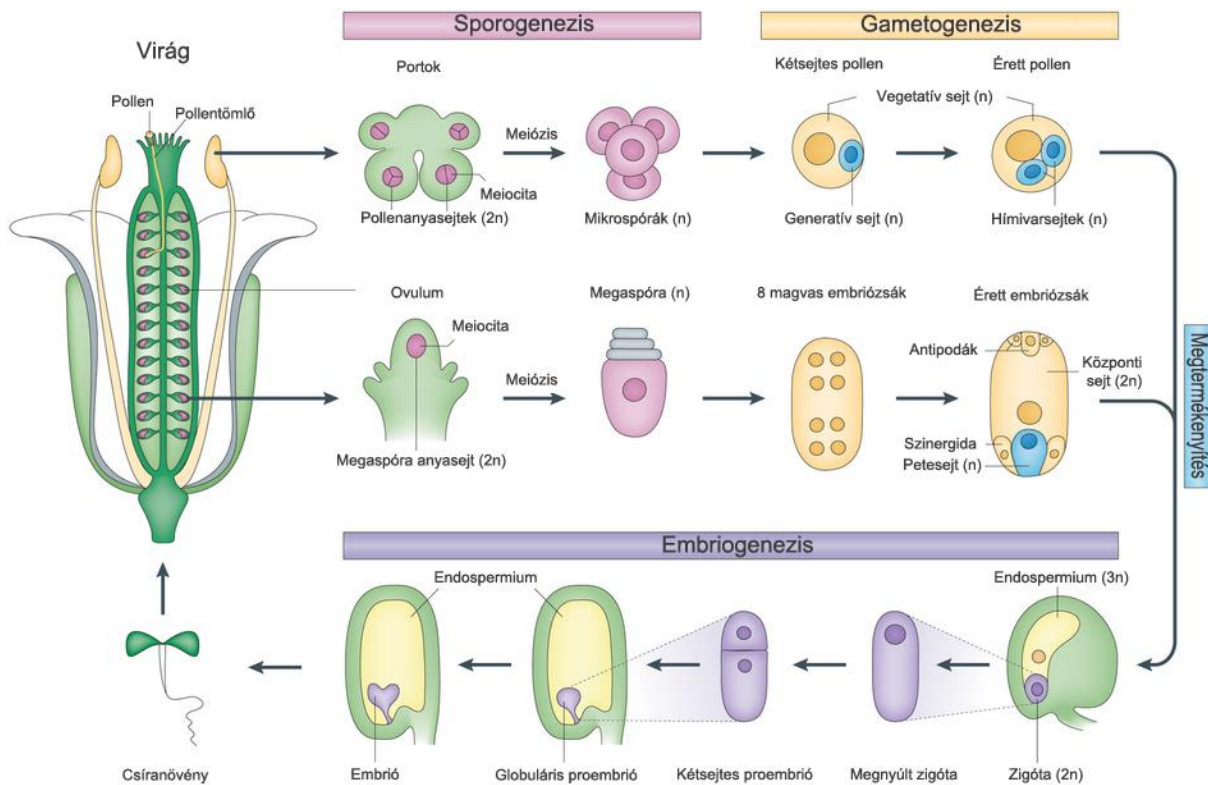
A nemzetség hibridek jelentősége a gabonaféléknél azonban egyáltalán nem merül ki a nemesítés bázisának megújításában, hiszen kiváló modellként szolgálnak a (távoli) genomok közti kooperációban szerepet játszó, valamint azt gátló molekuláris mechanizmusok feltárására is. Utóbbiak közé tartozik az „imprinting” (bevésődés), azaz a szülői genomok epigenetikus szabályozás révén kódolt eltérő expressziójának tartós vagy ideiglenes megőrzése a fejlődő utódban, valamint az ún. uniparentális kromoszómaelimináció, ami az egyik szülői genom kromoszómáinak tömeges (részleges/teljes) kiesését jelenti elsősorban a korai embriófejlődés mitotikus sejtosztódásai, majd pedig a rákövetkező meiózis során. Az ilyen növények többnyire, a búza  $\times$  árpa keresztezés esetében pedig kivétel nélkül sterilek, és kiegészítő technikák bevonása nélkül nem nevelhető belőlük ivaros utód. A jelenség háttere ma sem teljesen tisztázott, de nagy valószínűség szerint a szülők sejtciklusának diszharmonikus lefutásában vagy a mikrotubulusok és a hiszton fehérjék közötti összeférhetetlenségben keresendő (Sanei és mtsai. 2011). A dolgot még érdekesebbé teszi az, hogy egyes búza-árpa addíciós vonalakban a következő nemzedékbe átjutó apai árpa kromoszómák fixálódnak, és az anyai kromoszómákkal megegyezően viselkednek, más esetekben viszont a meiózisok során újra destabilizálódnak, és csak kis százalékban kerülnek át az utódokba (Szakács és Molnár-Láng 2010). Ezeknek a jelenségeknek a megértése kulcsfontosságú egyfelől a keresztezéses génátvitel hatékonyságának növelése szempontjából, másfelől a keresztezhetőség határainak kitágítása tekintetében is, amelynek révén új, az eddigieknél távolibb faj- és nemzetség kombinációk állíthatók elő.

Jól látható tehát, hogy a búza-árpa hibridek egyrészt hasznos nemesítési alapanyagot biztosíthatnak, de még fontosabb szerepük lehet a keresztezhetőség jelenlegi határainak kitolásában a gabonafélék körében: ebben a minőségben modellértékűvé válhatnak a genomok közti együttműködés és gátlás megértésében, sőt, talán új jelenségek felfedezésében is. Éppen ezért munkánkban célul tűztük ki a búza  $\times$  árpa keresztezés szisztematikus szaporodásbiológiai, biotechnológiai és genetikai megalapozását, valamint ebből kiindulva egy jól működő hibrid előállítási rendszer kialakítását (a konkrét célkitűzéseket ld. a 2. fejezet végén).



## 2. Irodalmi áttekintés

A földi élővilág evolúciójának egyik legmeghatározóbb mérföldköve az ivaros szaporodás megjelenése volt, amely azáltal, hogy biztosította az életük során eltérő tulajdonságokra szert tett egyedek genetikai információjának tetszőleges számú kombinációját, megnyitotta az utat az olyan bonyolult soksejtes életformák kialakulása előtt, mint a gombák, a növények, az állatok és mi magunk, emberek. A haploid (gametofiton) és diploid (sporofiton) nemzedékek periodikusan váltakozó életciklusainak metszéspontja és egyben az új egyed fejlődésének kiinduló pontja a zigóta, amely két ivarsejt összeolvadása után egyetlen sejtben tartalmazza az adott szervezet felépítéséhez és működéséhez szükséges genetikai információt. Az egyedfejlődés során ennek az egyetlen kitüntetett sejtnek a sorozatos osztódásai és az utódsejtek eltérő irányba történő differenciálódásának útján jönnek létre az eltérő morfológiájú és tulajdonságú sejtvonalak, amelyek újabb és újabb szövettípusokat létrehozva formálják meg az adott fajra jellemző új egyedeket. Az evolúció során a zigóta létrejöttéhez vezető folyamatoknak – az adott faj élőhelyétől és életformájától függően – számtalan alternatívája fejlődött ki, azonban a szülői tulajdonságok genetikai információit hordozó ivarsejtek egyesülése, majd a meiózis során új kombinációkban való szétválása, minden magasabb rendű élőlényben hasonlóképpen zajlik. Míg az állatok szaporodására az egyszerűség, a két szabadon álló ivarsejt fizikai találkozása jellemző, addig a zárvatermő növényekben a zigóta egy meglehetősen összetett eseménysorozat végső fázisában, a kettős megtermékenyítés bonyolult folyamatának eredményeképpen jön létre (Nawaschin 1898; Guignard 1899; Russell 1993) (**1. ábra**). A termő anyai szöveteivel körülvevett embriózsákban lezajló párhuzamos megtermékenyülési események során két fúziós termék jön létre: a diploid zigóta és a triploid endospermium, amelyek – azonos genetikai hátterük ellenére – lényegesen eltérő fejlődési utat járnak be (von Wangenheim 1962; Friedman 1995; von Wangenheim és Peterson 2004).



1. ábra. A sporogenezis, a gametogenezis és a kettős megtermékenyítést követő embriogenezis sematikus folyamata a zárvatermő növényekben. (Kawashima és Berger 2014 nyomán)

Az alábbiakban rendszerbe szedve tárgyaljuk az ivaros szaporodás során lezajló folyamatokat a pollen megtapadásától a hímivarsejtek petekészülékbe jutásán át (progámikus szakasz) a zigóta létrejöttével egészen a korai szemfejlődésig (posztgámikus szakasz). Ismertetjük és értékeljük az ez alatt lezajló fontosabb molekuláris folyamatokat, végül az intergenerikus hibridizáció sajátosságaival összefüggésben megvizsgáljuk azokat a kritikus pontokat, ahol a szülői genomok genetikai távolságából adódó inkompatibilitás következtében a szemfejlődés folyamata zavart szenvedhet.

## 2.1 A progámikus szakasz rövid jellemzése

A virágos növények esetében, –különösen igaz ez a szélporozta növényekre– elkerülhetetlen, hogy az adott egyed virágzása során ne kerüljön közvetlen kapcsolatba más növények ivarsejtjeivel, ezért a párválasztás „szertartása” az ő esetükben a bibe felszínén az ún. progámikus szakaszban zajlik le. A pollenszem bibe felszínén való megtapadásától (amit a pollenfal fehérjéi és a portok tapétum rétegének maradványai segítenek elő) a petesejt aktivációjáig tartó progámikus szakasz – rövidsége ellenére – meglehetősen összetett események

folyamata, ami a nem megfelelő, pl. idegen fajtól származó vagy az alacsony vitalitású pollen általi termékenyülést hivatott megakadályozni. A pollen és a bibe közti fizikai kontaktus létrejötte után intenzív kémiai párbeszéd indul meg a recipiens bibével, majd a termő különböző részeivel, ami azt bizonyítja, hogy a pollen csírázása, és ezt követően a tömlő hajtása távolról sem vak tapogatózás formájában zajlik, hanem az anyai (sporofitikus, majd gametofitikus) sejtek és szövetek aktív közreműködésével, sőt, támogatásával vagy éppen gátlása mellett.

Ennek a petekészülékig tartó útkeresésnek és „idegenvezetésnek” több szakasza különíthető el:

- preovuláris növekedés és kompetencia,
- ovulum és pollentömlő kölcsönhatás,
- a pollentömlő lezárása (Higashiyama és Takeuchi 2015).

A preovuláris szakasz kezdetén, a kölcsönös felismerésen alapuló előszűrést követően a pollenszemek csírázni kezdenek, majd az az anyai szövetek a növekedésnek indult pollentömlőket jellemzően válogatás nélkül a magház (ovárium) irányába terelik. A magház megközelítését elsősorban a specializált sejtekből álló transzmissziós (vagy stigmatoid) szövet, traktus könnyíti meg: ez pusztán mechanikailag segíti elő a pollentömlő haladását, ebben a szakaszban valódi kémiai attraktánsok nem vagy csak elenyésző mértékben működnek. A sporofitikus anyai szövetek által kibocsátott molekulák és hatóanyagok inkább csak a pollen csírázását, a tömlő növekedését és érését szabályozzák, ami szükséges az ezt követő, ovuláris kapcsolat megteremtéséhez. Ezeknek az anyagoknak a skálája igen széles, a teljesség igénye nélkül: víz, ionok (kalcium), kis molekulák ( $\gamma$ -aminovajsav, GABA) hormonok (brassinoszteroidok), peptidok és fehérjék (pl. arabinogalaktánok: glikoproteinek és TTS – transmitting-tissue-specific – fehérjék; ciszteinben gazdag, bibe-specifikus és lipidtranszfer fehérjék; stb.).

A direkt „párvalasztás” a progámikus fázis második, ovuláris szakaszában az egymással versengő pollentömlők közötti szelekció formájában valósul meg. Ebben a folyamatban az anyai gametofiton, pontosabban az embriózsák petekészüléke által kibocsátott peptidszignálok játszanak aktív szerepet, amelyeket az elmúlt évtizedben azonosítottak. Kétszikűekben (*Torenia* spp., *Arabidopsis* spp.) az úgynevezett LURE (csali) peptidok (Okuda és mtsai. 2009), míg egyszikűeknél – eddig jobbra csak kukoricában – az EA1 (EGG APPARATUS1) peptidok (Márton és mtsai. 2005) szerepét tárták fel. A LURE család 60-70 aminosavból álló, ciszteinben gazdag defenzin-szerű peptidekből áll, míg az EA1 és társai 50 aminosavból épülnek fel. Ezeket a peptidokat a szinergida sejtek bocsátják ki, és eljutnak egészen a transzmissziós csatorna alsó szakaszáig. Fajspecifikus hatásuk annyira erőteljes és univerzális, hogy ha például a kukorica *ZmEA1* gént lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) ovulumban kifejeztették, majd kukorica pollennel

megporozták, akkor az tömlőt hajtott, és a ZmEA1 peptid koncentráció grádiense mentén lejutott az Arabidopsis csírákapujához (mikropile) (Márton és mtsai. 2012).

Végül a harmadik szakaszban bekövetkezik a célba ért pollentömlő felrepedése, ami biztosítja a spermiumok szabaddá válását, és nélkülözhetetlen feltétele a megtermékenyítés általi petesejt aktivációnak (Dresselhaus és mtsai. 2016). A szinergida sejtekben található receptorszerű kináz fehérjék (pl. FERONIA) a közeledő pollentömlő hatására többféle folyamatot indítanak el. Egyrészt számos lépcsőn keresztül (pl. NADPH oxidázok aktiválása), közvetve serkentik az oxigén eredetű (főleg hidroxil) szabadgyökök képződését, ami viszont kalciumcsatornák közvetítésével indul be (Duan és mtsai. 2014). Másrészt egyéb peptidekkel kölcsönhatásban pektin metilészteráz enzimek gátlásán keresztül destabilizálják a pollentömlő sejtfalát. A kalciumcsatornák megnövekedett aktivitása a pollentömlőben hirtelen nagy mennyiségű kalciumion beáramlását eredményezi, ami a sejtfa meggyengülésével együtt a pollentömlő felhasadásához, valamint a spermiumokat a vegetatív sejtbe záró endocitikus membrán kinyílásához vezet, így biztosítva a két spermium szabadba jutását (Dresselhaus és mtsai. 2016).

## 2.2 Megtermékenyítés és petesejt aktiváció

A csírákapun át a receptív szinergidába behatoló egyetlen pollentömlő felhasadásának következtében (ld. 2.1 fejezet) a spermiumok kiszabadulnak az őket összezáró, vegetatív sejt membránjából, miközben ezzel egyidejűleg a receptív szinergida programozott sejthalállal egyetlen perc alatt szétesik. A hímivarsejtek az így felszabadult térben villámgyorsan, mintegy 10 másodperc alatt bevándorolnak a petesejt és a központi sejt közti síkba, majd néhány perc elteltével megtörténik a gaméták összeolvadása. A plazmogámia során a membránok összeolvadását elősegítő  $Ca^{2+}$  oszcilláció (Russell 1993; Denninger és mtsai. 2014) aktiválja a nyugalmi állapotban lévő petesejt (és központi sejt) anyagcsere-folyamatait, amelyek gyors újraszerveződést (de- és repolarizáció) követően felkészülnek az első osztódásra (Wendrich és Weijers 2013). Annak ellenére, hogy az ivaros szaporodás során az embrió kizárólag megtermékenyített petesejtből fejlődhet, a petesejt nem csak közvetlenül a megtermékenyítés révén, hanem közvetve, a progámikus események során keletkező szignálok hatására is aktiválódhat (Dresselhaus és mtsai. 2016). Az ilyen módon aktiválódott petesejtből kizárólag anyai genomot tartalmazó, haploid növény fejlődik, amiből vegetatív fejlődés során spontán genomduplikáció következtében fertilis, dihaploid (DH) növény jöhet létre (Coe 1959; Kumlehn és mtsai. 2001). A haploid partenogenezis kiindulópontjának tekinthető közvetett petesejt aktiváció jelenségére, a virágos növények esetében is széles körben találunk példákat.



Közvetett petesejt aktiváció során keletkeznek a *Datura stramonium* (Blakeslee és mtsai. 1921), az alloplazmatikus ‘Salmon’ búza (Kihara és Koichiro 1962; Tsunewaki 1964) vagy a *Solanum tuberosum* × *S. phureja* keresztezés haploid utódai (Hougas és Peloquin 1957; Hougas és Peloquin 1958). A kezdetben nyugalmi állapotban várakozó petesejt aktivációjával lezárul a progámikus szakasz, és kezdetét veszi az új nemzedék fejlődéséhez vezető posztgámikus szakasz.

### 2.3 Az embrió fejlődése

Az aktivációt követően az in planta fejlődő zigóta először többnyire aszimmetrikusan osztódik, és így két eltérő méretű és szerkezetű sejt, egy kisebb, apikális és egy nagyobb, bazális sejt keletkezik. A két utódsejt sorsa az egy- és kétszikű fajokban egyaránt már az osztódás pillanatában determinált, és az embrió előre meghatározott szöveteinek kialakításáért felelősek (Möller és Weijers 2009; Lau és mtsai. 2012). A bazális sejt és utódsejtjei formálják meg a kétszikűekben szuszpenzornak nevezett, tápanyagok és hormonok szállítását végző szervet (egyszikűekben ez kevésbé jellegzetesen különül el), valamint a hipofízist, amely a gyökércsúcs merisztéma kialakításában játszik fontos szerepet (Park és Harada 2008; Möller és Weijers 2009).

Az apikális sejt szimmetrikus osztódások sorozatában formálja meg a globuláris proembriót, amely méretében és sejtszámában a zárvatermőkben nagyon hasonló, differenciálatlan sejthalmazt alkot (Johri és mtsai. 1992; Möller és Weijers 2009; Lau és mtsai. 2012). A zárvatermők embrióira általánosan jellemző, hogy az első osztódási ciklus ideje viszonylag hosszú, kb. 24 óra, majd az ezt követő osztódások időtartama a sejtszám növekedésével fokozatosan csökken, aminek következtében eleinte csak lassan, majd egyre intenzívebben növekszik a sejtek száma (Johri és mtsai. 1992; Suzuki és mtsai. 1992).

A proembrió ezután jelentős morfológiai átalakuláson megy keresztül, először hosszúkás bunkóra emlékeztető alakot vesz fel, majd az addig homogén szövetállományban megkezdődik a szervek differenciálódása. A megnyúlt proembrió két ellentétes pólusán kialakul a hajtás- és gyökérmerisztéma, és megjelenik a sziklevékezdemény(ek), amely(ek) fajtól függő megjelenést biztosít(anak) a növényi embriónak (Johri és mtsai. 1992; Friedman 2001a; Möller és Weijers 2009; Lau és mtsai. 2012). Ez az úgynevezett átmeneti fázis – miután már valódi, specifikus szövetekkel rendelkező embrióról beszélhetünk – a kalászos gabonafélékben 6-9 nappal a megporzást követően megy végbe (Suzuki és mtsai. 1992; Kranz és Lörz 1993; Fábrián és mtsai. 2011). Az ilyen korú embriók, bár még nem képesek autotróf módon, a saját életfolyamataikhoz szükséges minden vegyület előállítására, de már elég fejlettek ahhoz, hogy aseptikus kultúrában

sikerrel felnevelhetőek legyenek. Az embriókultúra lehetőséget biztosít többek között olyan faj- vagy nemzetség-keresztelésből származó növények felnevelésére (ld. 4.3.2 fejezet), amelyek a szülők genetikai inkompatibilitása következtében egyébként fejlődésük korai szakaszában, már a magkezdeményben elhalnának (Ishikawa és mtsai. 2011).

## 2.4 Az endospermium fejlődése

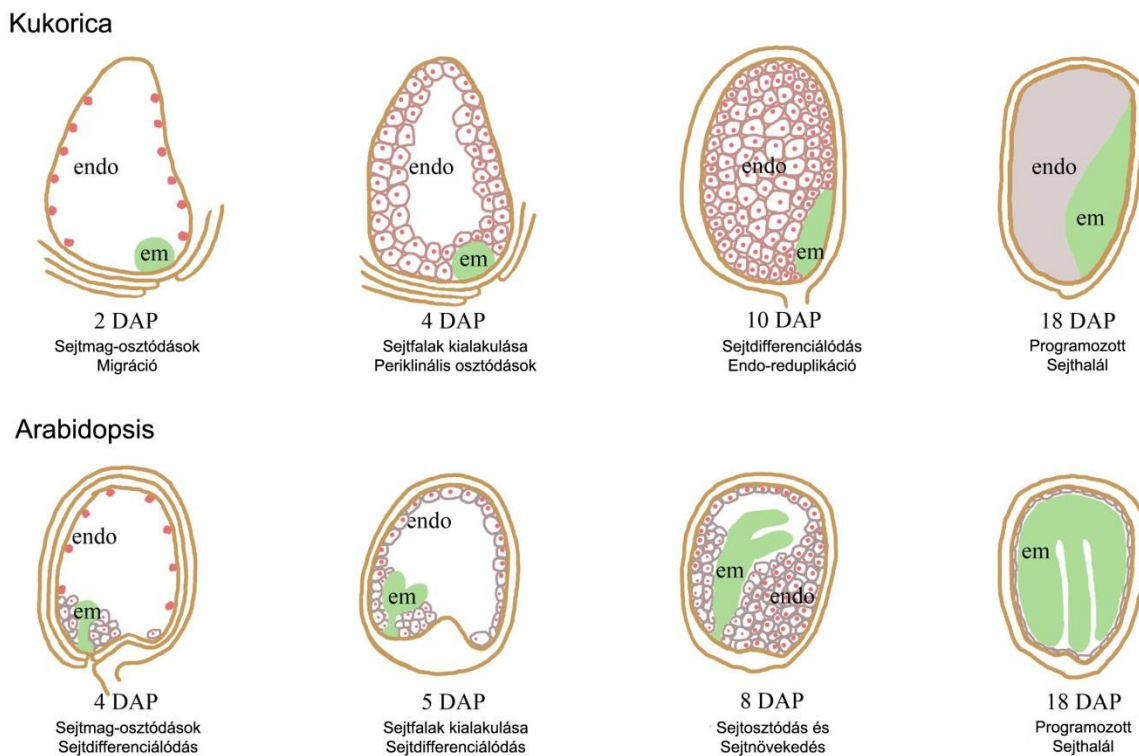
A zigóta fejlődésével párhuzamosan a három (két anyai és egy apai) sejtmagot tartalmazó másik fúziós termék, az endospermium, az embrióétól jelentősen eltérő fejlődési utat jár be, ami a különböző növényfajokban nagyon különböző megjelenésű szöveteket eredményezhet (Friedman 2001a). Az eltérő végeredmény ellenére a folyamat első, meghatározó lépései az endospermium esetében is erősen konzerválódtak a különböző növényfajokban (Friedman 2001a; Costa és mtsai. 2004). A kariogámiát követően az endospermium triploid sejtmagja a megagametogeneziséhez hasonló, gyors osztódások sorozatán megy keresztül (ld. 4.2.2 fejezet), amelyeket nem követ a szomatikus sejtek osztódásánál megszokott citokinézis, és nem szintetizálódnak új sejtfalak sem (Brown és mtsai. 1994; Costa és mtsai. 2004; Olsen 2004; Erilova és mtsai. 2009). Az így keletkező sokmagvú sejtet a szakirodalom cönocitikus vagy szabad sejtmagvas endospermiumnak nevezi, amely fajtól függően eltérő számú sejtmagot tartalmazhat (Bennett és mtsai. 1975; Walbot 1994; Boissard-Lorig és mtsai. 2001; Olsen 2004).

A cönocitikus endospermium a jelenlegi ismeretek szerint egy alapállapotban sejtes endospermiumhoz vezető program későbbi módosulásával alakulhatott ki az evolúció során (Friedman 1998; Friedman 2001a; Friedman 2001b; Olsen 2004). Kalászosok endospermium fejlődésében megfigyelhető, hogy az osztódást követően a sejtmagok között megkezdődik a fragmoplaszt szerveződése, amit azonban nem (vagy csak részben) követ a sejtfalalkotók berakódása (Brown és mtsai. 1994; Brown és mtsai. 1996a; Brown és mtsai. 1996b; Tian és mtsai. 1998; Sørensen és mtsai. 2002). A sejtfalak szintézise csak a fajra jellemző sejtmagszám elérése után, a kalászosokban kb. 3 nappal megporzást követően kezdődik el (Bennett és mtsai. 1975; Walbot 1994), amikor a cönocita már akár 2000 sejtmagot is tartalmazhat, amelyek a jelentősen megnövekedett sejt membránja mentén található vékony citoplazma sávban helyezkednek el (Bennett és mtsai. 1975).

A magok közötti sejtfalak kialakulása sugárirányú mikrotubulus szerveződést követően a cönocita sejtfalától a központi vakuólum irányába fokozatosan, fajtól függően 3-6 nap alatt megy végbe (Webb és mtsai. 1991; Brown és mtsai. 1994; Brown és mtsai. 1999; Boissard-Lorig és mtsai. 2001; Olsen 2001; Sørensen és mtsai. 2002; Olsen 2004; Sreenivasulu és Wobus 2013). Az első sejtréteg kialakulása után az új sejtek az ovulum felszínével párhuzamos (periklináris)

osztódások útján, annak belseje felé terjeszkedve kitöltik a megnövekedett embriózsák által biztosított teret, és kialakítják a végleges, sejtes szerkezetű endospermiumot (Brown és mtsai. 1994; Walbot 1994; Sørensen és mtsai. 2002).

A sejtfalak kialakulása után kezdődő differenciálódás során létrejönnek az endospermium speciális szövetei, amelyekben ugyan mutatkozik némi különbség az egy- és kétszikű fajok endospermiumai között, de alapvető funkcióik és felépítésük lényegében megfelel egymásnak (Friedman 1995; Friedman 2001a; Olsen 2004; Sreenivasulu és Wobus 2013). Minden endospermiumnak van egy, egyetlen vagy több sejtorsóból álló kültakarója, továbbá az embrió és az endospermium szövetei közötti tápanyag és hormon transzportot biztosító mikropiláris, valamint az endospermium és az anyai szövetek közötti összeköttetést megvalósító kalazális régiója (Brown és mtsai. 1999; Boissard-Lorig és mtsai. 2001; Vinkenoog és mtsai. 2003; Olsen 2004). Végül pedig funkciójából adódóan minden endospermium legnagyobb tömegét a jellegzetes, parenchima jellegű sejteket tartalmazó raktározó szövet adja. Az endospermium feladata mérettől és megjelenéstől függetlenül ugyanaz: egyrészt biztosítja a fizikai „anya-utód” kapcsolatot, másrészt „altruisztikus” pusztulása és felszívódása révén folyamatosan tápanyaggal látja el a fejlődő embriót (Carmichael és Friedman 1995; Friedman 1995; Friedman 1998; Friedman 2001b; Olsen 2004) (2. ábra).



**2. ábra.** Az egyszikű és kétszikű endospermium fejlődése, a fennmaradó és a felszívódó endospermium.

(Bai és Settles 2015 nyomán)

em: embrió, endo: endospermium, DAP: a megporzástól eltelt napok száma

Az egyszikűek fennmaradó endospermiuma a tápanyag felhalmozását követően programozott sejthalál útján egy mátrixba foglalt tápanyagraktárt hoz létre, amelyet a csírázás során az aleuron rétegből felszabaduló enzimek fokozatosan bontanak le, tartósan támogatva ezzel a csírázó embrió növekedését (Lopes és Larkins 1993; Grossniklaus és mtsai. 1998; Nguyen és mtsai. 2007; Sabelli és Larkins 2009; Sreenivasulu és Wobus 2013) (**2. ábra**).

## 2.5 A szülői genomok kölcsönhatása

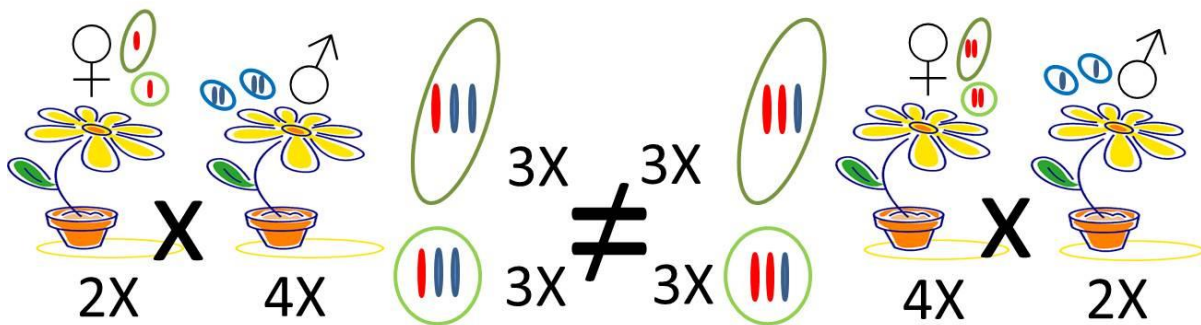
A két fúziós termékből kiinduló jelentősen eltérő életutak egy szelektív szabályozás meglétére engednek következtetni, amely – az azonos genetikai háttér ellenére – nyilvánvaló különbségeket eredményez a kiindulási sejtekben és utódaikban (Vinkenoog és mtsai. 2003). Már a múlt század elején is ismert volt a kettős megtermékenyítésben részt vevő anyai gaméták eltérő ploidszintje, ami akkoriban az az embrió és az endospermium közti különbségek első számú feltételezett okának számított (Scott és mtsai. 1998). Míg a petesejt egyszeres, addig a központi sejt kétszeres anyai genomot tartalmaz, ezért az egyszeres genomokat hordozó hímvarsejtekkel történt fúzió után egy kétszeres,  $1m + 1p$  ( $m$  = anyai vagy maternális,  $p$  = apai vagy paternális) genomot tartalmazó zigóta, illetve egy triploid,  $2m + 1p$  genomot tartalmazó endospermium keletkezik (Friedman 1995; Grossniklaus és mtsai. 1998; Olsen 2004; Gehring és mtsai. 2006), amelyek a magkezdeményen belül párhuzamosan, de egymástól függetlenül fejlődve alakítják ki a zárva-termőkre jellemző magot (Harper és mtsai. 1970; Grossniklaus és mtsai. 2001; Berger 2003; Berger és mtsai. 2006). Az 1920-as években figyeltek fel arra, hogy különböző ploidszintű szülők reciprok keresztezései eltérő mag-, ill. termés méretet eredményeztek, amit az endospermium fejlettségével hoztak összefüggésbe (Thompson 1930; Cooper és Brink 1947; Haig és Westoby 1991; Grossniklaus és mtsai. 2001). A *Triticum* nemzetség eltérő ploidszintű szülői kombinációiból általában akkor kapták a több és nagyobb méretű szemterméseket, amikor az anyai partner ploidszintje az apai partnerének kétszerese volt; a fordított irányú keresztezések pedig szinte mindig ráncos, kisméretű és kevesebb szemtermést eredményeztek, amelyek alulfejlett endospermiumot tartalmaztak (Watkins 1924; Thompson 1930). A nemzetségcsoport különböző fajainak keresztezéseit mindkét irányban szisztematikusan elvégezve alaposabban is igazolták, hogy eltérő ploidszintű keresztezésekben nagyobb mértékű szemkötés akkor figyelhető meg, amikor az alacsonyabb ploidszintű faj a pollenadó. Azokban a párosításokban, amelyekben a különbség már háromszoros volt a szülők ploidszintjében, nem vagy nagyon ritkán kaptak szemterméseket, és csak olyankor, amikor az anyai partner rendelkezett a nagyobb kromoszómakészlettel (Thompson 1930; Belea 1976; Sharma 1995; Scott és mtsai. 1998). Egyetlen kivételnek a búza (*Triticum aestivum*,  $2n = 6x = 42$ ) × rozs (*Secale cereale*,  $2n = 2x =$

14) keresztezés mutatkozott, ahol a háromszoros ploidszint különbség ellenére is viszonylag magas, akár 80% gyakorisággal is sikerült hibrid szemterméseket előállítani (Zeven 1987), míg reciprok keresztezésben ez a kombináció csak ritkán bizonyult sikeresnek (Meister és Tjumjakoff 1928; Thompson 1930). Más, pl. a *Brassica* (Sinskaia 1927; Morinaga 1934), *Nicotiana* (McCray 1932), *Secale* (Håkansson és Ellerström 1950), *Zea* (Cooper 1951) és *Hordeum* (Håkansson 1953) nemzetségeken belül eltérő ploidszintű fajokkal végzett reciprok keresztezések szintén arról tanúskodtak, hogy a jelenség a zárvatermőkre nézve általános érvényű. és a mag fejlődését döntően befolyásolja az anyai és az apai genomok egymáshoz viszonyított aránya. Optimális magfejlődés abban az esetben következett be, amikor az endospermiumban két anyai genomra egy apai genom jutott, és a fejlődési rendellenességek a  $2m : 1p$  aránytól bármelyik irányba távolodva egyre inkább fokozódtak (Lin 1984; Ehlenfeldt és Ortiz 1995; Grossniklaus és mtsai. 1998; Adams és mtsai. 2000; Vinkenoog és mtsai. 2003; Lafon-Placette és Köhler 2016). Ez egyben azt is jelentette, hogy a két fúziós termékben az anyai ill. apai genomok – szekvencia azonosságuk ellenére – funkcionálisan nem ekvivalensek egymással (Harper és mtsai. 1970).

Az eltérő ploidszintű keresztezések arra is rávilágítottak, hogy a megfelelő arányoktól való eltérés mindig az endospermium fejlődésében okoz rendellenességeket, és az embrió fejlődését többnyire nem befolyásolja (Scott és mtsai. 1998; Adams és mtsai. 2000; Vinkenoog és mtsai. 2000; Lafon-Placette és Köhler 2016). A leginkább perdöntő bizonyítékot kétségtelenül von Wangenheim (1962) kísérletei szolgáltatták, aki eltérő ploidszintű ligetszépe (*Oenothera elata* ssp. *hookeri*) speciális keresztezéseivel igazolta az anyai/apai hozzájárulás arányának az endospermium fejlődésére gyakorolt döntő hatását. Választása azért esett a ligetszépére, mert a zárvatermők többségével ellentétben központi sejtje – a *Polygonum* típusú embriózsákra jellemző kettő helyett – csak egyetlen anyai genomot tartalmaz (Maheshwari 1950; Cailleau és mtsai. 2010). Ezt a sajátosságot kihasználva diploid és tetraploid szülők keresztezésével olyan hibrideket állított elő, amelyek mindkét keresztezési irányban egyaránt triploid embriót és azzal genetikailag teljesen azonos triploid endospermiumot eredményeztek azzal a különbséggel, hogy a  $2x (\text{♀}) \times 4x (\text{♂})$  keresztezési irányban  $1m : 2p$ , míg a reciprok keresztezésnél  $2m : 1p$  volt az anyai és apai szülőktől származó genomok aránya (**3. ábra**). A genetikai azonosság ellenére a négy „zigóta” két, eltérő irányba fejlődött: míg a petesejt fúziós termékéből mindkét irányú keresztezésben embrió, addig a központi sejt eredetű fúziós termékéből mindkét irányú endospermium fejlődött (von Wangenheim 1962).

Továbbmenve, az endospermiumok a különböző ivarból származó genomok konkrét arányára is jóval nagyobb érzékenységet mutattak, mint az embriók. Míg az  $1m : 2p$  genom összetételű endospermium mindig a megszokottnál nagyobb méretű és későn sejtesedő volt,

addig a reciprok  $2m : 1p$  genomarány ennél jóval kisebb és korábban sejtesedő endospermiumot eredményezett. Von Wangenheim eredményei egyértelműen igazolták, hogy a fúziós termékek fejlődési iránya a genetikai háttértől függetlenül már a kiindulási sejtekben kódolva van, továbbá, hogy az endospermium normális fejlődéséhez – szemben az embrióéval – elengedhetetlen az eltérő ivarú szülőktől származó genomok megfelelő aránya (von Wangenheim 1962; Nishiyama és Inomata 1966; Sarkar és Coe 1966; Lin 1984; Scott és mtsai. 1998).



3. ábra. Az eltérő szülői genomarány hatása a ligetszépe embrió (fent) és endospermium (lent) fejlődésére reciprok keresztezésben.

E két jelenség az evolúciós távolság ellenére meglepő hasonlóságot mutat az emlős állatok embriófejlődésének sajátosságával, amelyben a méhlepény mint extraembrionális szövet egyfelől tápanyagtranszportot biztosít az anya és az embrió között, másfelől egy fejlődési „checkpoint” mechanizmuson keresztül ellenőrzi az eltérő ivarú gaméták kompatibilitását. A jelenleg legelfogadottabb nézet szerint a zárvatermő növények az endospermium e másodlagos funkcióján keresztül szabnak gátat a korlátlan (véletlenszerű) keresztezéseknek (Lafon-Placette és Köhler 2016). A szülő-specifikusan öröklődő faktorok egyensúlyának felborulására az endospermium – a placentához hasonlóan – érzékenyen reagál, fejlődése leáll kiváltva ezáltal a nem megfelelő genetikai háttérűnek ítélt embrió abortióját (ld. 4.2.1-2 fejezetek) annak ellenére is, hogy ennek fejlődése önmagában nem lenne rendellenes (Scott és mtsai. 1998; Adams és mtsai. 2000; Vinkenoog és mtsai. 2000; Vinkenoog és mtsai. 2003; Kinoshita 2007; Gao és mtsai. 2012).

Az endospermium szintjén megnyilvánuló önvédelmi mechanizmus léteére további egyértelmű bizonyítékot szolgáltatnak azok az inkompatibilis faj- és nemzetség keresztezések, amelyekből a kimentett éretlen embriók megfelelő szövetenyésztési technikák alkalmazása mellett életképes növényekké nevelhetők. Az embrió és az endospermium eltérő sorsának ploiditástól való függetlenségét azok az andro- vagy ginogenetikus haploidok is igazolják,

amelyek annak ellenére, hogy kizárólag csak anyai vagy apai genommal rendelkeznek, in vitro körülmények között, de akár spontán is, életképes embrióvá fejlődnek (Maheshwari és mtsai. 1980). A gametofiton eredetű szövettenyészetekben a kiindulási sejt ploidszintjétől függetlenül többnyire az embrionális fejlődési út a jellemző: a hexaploid növények triploid mikrosporáiból a megtermékenyített központi sejttel megegyező ploidszint ellenére is embriók vagy embrioid jellegű struktúrák fejlődnek. Ezen eredmények tükrében nyilvánvalónak látszik, hogy a sporofitikus embriófejlődés az alapvető fejlődési program, és az endospermiummá válás egy ploidszinttől független extrakromoszomális faktor létét feltételezi (von Wangenheim 1962; Vinkenoog és mtsai. 2003).

## 2.6 Az anyai hatás

Az embrió és az endospermium divergens fejlődésének magyarázatára a múlt század végéig több hipotézis is létezett. Von Wangenheim (1962) vetette föl először az azonos genetikai háttérű, de eltérő sorsú fúziós termékek vizsgálata során az extrakromoszomális determináló faktorok szükségességét. A gametogenezis során a gaméták citoplazmájába beépített ismeretlen faktor alternatívájaként hosszú ideig tartotta magát az anyai sporofitikus faktor elmélet, miszerint a fúziós termékek fejlődése azok embriózsákban elfoglalt pozíciójának a függvénye, és sorsukat kizárólag a környező anyai szövetekből származó szignálok határozzák meg (Grossniklaus és mtsai. 1998; Olsen 2004).

A kérdésre végül egyértelmű választ a technológia fejlődése biztosított, ami lehetővé tette az egyedi ivarsejtek preparálását és in vitro fúziójukat, valamint a fúziós termékek regenerációját, mindezt az anyai szövetektől függetlenül. A petesejt és a központi sejt in vitro fertilizációja során egyértelműen kiderült, hogy a sejtek sorsa az anyai szövetektől mentes környezetben is előre meghatározott: a megtermékenyített petesejtből csak embrioid struktúra, míg a központi sejt fúziós termékéből kizárólag endospermium jellegű szövet fejlődött (Kranz és Lörz 1993; Kranz és Dresselhaus 1996; Kranz és mtsai. 1998; Kranz 2001). Kiderült azonban, hogy a filiális szövetek megfelelő helyen és időben történő differenciálódásához azért az anyai szövetekre is szükség van, ugyanis a fent leírt in vitro fejlődött embriók és endospermiumok morfológiailag lényegesen eltértek in planta fejlődött társaiktól, habár a sorsukat meghatározó faktorok már a kiindulási sejtek citoplazmájában jelen kellett hogy legyenek (Kranz és Lörz 1993; Kranz és Dresselhaus 1996; Kranz és mtsai. 1998; Kranz 2001).

Az állati embriók vizsgálata során vált ismertté az anyai hatás néven ismert jelenség, miszerint az embrió korai osztódásait vezérlő program már a petesejt citoplazmájában jelen van RNS és fehérjék formájában (Baroux és mtsai. 2009; Nodine és Bartel 2012). Az embrió

genomjáról átíródó gének fajtól függően csak a 8-16 sejtes állapotban kapcsolódnak be, folyamatosan átvéve az irányítást a még az anyában expresszált génektől (Tadros és Lipshitz 2009). Az állatvilágban olyan extrém esetek is ismertek ahol az enukleált zigóták egészen lárvaállapotig képesek fejlődni pusztán az anyai hatású gének irányításával (Harvey 1936).

Az anyai gének mutáns allél alapú, fenotípusos vizsgálata a növényi embriók beágyazottsága miatt nem vagy csak nehezen kivitelezhető. Az adott gén ugyanis a direkt anyai hatás mellett sporofitikus úton, a környező diploid sporofitikus szövetekből származó szignálokön keresztül is képes közvetett hatást gyakorolni az embrió fejlődésére (Harper és mtsai. 1970; Ray 1997; Drews és mtsai. 1998; Grossniklaus és Schneitz 1998; Chaudhury és Berger 2001), és a kétféle hatás fenotípusos szétválasztása meglehetősen nehéz. Ennek ellenére az utóbbi években bizonyosságot nyert, hogy egyes növényfajokban már a zigótában megkezdődik azon gének transzkripciója (Harper és mtsai. 1970; Chaudhury és Berger 2001; Schauer és mtsai. 2002; Grimanelli és mtsai. 2005; Tadros és Lipshitz 2009), amelyek feltételezhetően az embrió korai sejtosztódásainak szabályozásában játszanak nélkülözhetetlen szerepet (Scholten és mtsai. 2002; Grimanelli és mtsai. 2005; Okamoto 2005; Ning és mtsai. 2006).

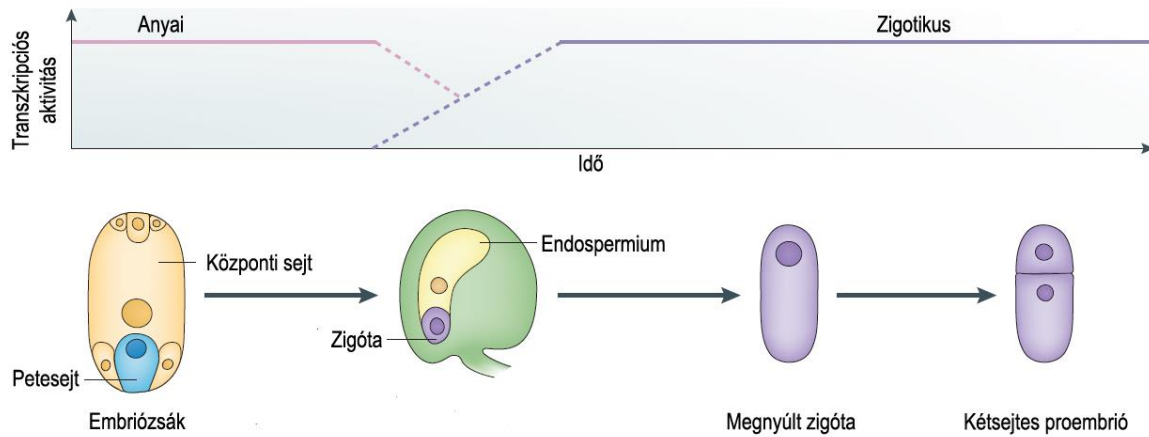
A megtermékenyítést követően aktiválódó gének közül sok a kromatin szerveződés, a DNS metiláció és a sejtciklus szabályozásában vesz részt, és a vegetatív szövetekben is expresszálódik (Sprunck és mtsai. 2005; Sprunck és mtsai. 2012). Ezeken felül számos, csak a petesejtben expresszálódó gént is felfedeztek (pl. új F-box és cink-ujj fehérjéket kódoló géneket), amelyek a petesejt identitásáért és a pollentömlők irányításáért lehetnek felelősek (Okamoto 2005; Sprunck és mtsai. 2005;). A nőivarú gaméták, valamint a fúziós termékek expressziós elemzése kimutatta, hogy a petesejtben nagy mennyiségben vannak jelen a transzkripcióért, valamint a fehérjeszintézisért és -lebontásért felelős génekről átíródott mRNS-ek, amelyek a megtermékenyítést követően aktivizálódva intenzív anyagcserefolyamatokat indítanak el (Okamoto 2005; Sprunck és mtsai. 2005; Domoki és mtsai. 2013). A petesejt proteomikai vizsgálata során arra is fény derült, hogy a petesejt citoplazmájában a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjék többsége a lebontó anyagcserében részt vevő enzimek közül került ki (Okamoto és mtsai. 2004). A petesejtek tehát intenzívebb anyagcserét mutatnak, mint azt korábban feltételezték (Taylor és Vasil 1995).



## 2.7 Az anyai/zigotikus átmenet

Az első zigóta eredetű transzkriptumokat búzánál a lúdfűhöz (*Arabidopsis thaliana*) hasonlóan, legkorábban a kétsejtes proembrióból sikerült kimutatni (Vielle-Calzada és mtsai. 2000; Sprunck és mtsai. 2005), ami arra utal, hogy a megtermékenyítést követő intenzív változások, valamint az első sejtosztódás kizárólag az anyai RNS-ek és fehérjék irányításával megy végbe. Az intenzív anyagcsere-folyamatok következtében a zigóta és a proembrió fehérje összetétele jelentősen megváltozik az első osztódások során (Okamoto 2005; Sprunck és mtsai. 2005), viszont az intenzív génexpressziós változások csak néhány ciklussal később, a gömb stádiumú embrióban tapasztalhatóak (Vielle-Calzada és mtsai. 2000; Sprunck és mtsai. 2005; Baroux és mtsai. 2009; Sreenivasulu és Wobus 2013). A vizsgált növényeknél ez az a fejlődési fázis, amikor befejeződik az úgynevezett anyai/zigotikus átmenet, amelynek során az embrió genomjáról átíródott zigotikus gének átveszik az irányítást az embrió fejlődése fölött (Breuninger és mtsai. 2008; Baroux és mtsai. 2009). Ezt támasztották alá az eltérő szülők genomjáról átíródott allélspecifikus RT-PCR eredmények is, amelyek segítségével arabidopsisban és kukoricában egyaránt bizonyítást nyert az apai genomról történő transzkriptumok gömb stádiumban történő tömeges megjelenése, ami együtt járt a citoplazmában tárolt anyai transzkriptumok hirtelen eltűnésével (Vielle-Calzada és mtsai. 2000; Baroux és mtsai. 2001; Grimanelli és mtsai. 2005; Baroux és mtsai. 2009). A legújabb tudományos eredmények azt is mutatják, hogy az anyai/zigotikus, illetve az anyai/apai expresszió ilyen dinamikájú változása csak az endospermiumra jellemző. Egyetlen sejtire korlátozott transzkriptumok vizsgálata során igazolódott, hogy az embrióban az anyai/zigotikus átmenet igen korán, már az első osztódás vége előtt megtörténik (Hale és Jacobsen 2012; Nodine és Bartel 2012; Domoki és mtsai. 2013; Kawashima és Berger 2014). Az anyai és apai transzkriptumok aránya már a megnyúló zigótában kiegyenlítődik, és ez az egyensúly az embriogenezis későbbi stádiumaiban is megmarad (Kawashima és Berger 2014) (**4. ábra**).

A zigotikus gének tömeges megjelenésével együtt járó anyai/zigotikus átmenet irányításában feltételezhetően fontos szerepe van az embriófejlődés korai szakaszában megjelenő zigotikus transzkripciós faktoroknak, amelyek amellet, hogy aktiválják további zigotikus gének expresszióját, kiváltják az anyai RNS degradálódását. Ilyen többek között a *MEA* (*MEDEA*) gén (ld. 2.9.1 fejezet), amelynek expressziója közvetlenül a megtermékenyítést követően kimutatható mindkét fúziós termék citoplazmájában (Vielle-Calzada és mtsai. 1999; Vinkenoog és mtsai. 2003; Jullien és mtsai. 2006).



**4. ábra. Az anyai és zigotikus transzkriptumok időbeli változásai az ivaros fejlődési szakaszban.**  
(Kawashima és Berger 2014 nyomán)

A zigotikus allélok termékenyülés előtti némasága feltételezhetően a zigotikus DNS erős metiláltságával, valamint a zigotikus genomot tömörítő kromatin szerkezetével van szoros összefüggésben. Arabidopsis különböző fejlődési stádiumú embriózsákjaiban a fúziós termékek mindkét szülőtől származó genomja erősen metilált, és ez a metilációs mintázat az embrionális fejlődés egymást követő szakaszaiban jelentős változásokon megy keresztül. A metiláció fokának csökkenésével párhuzamosan növekszik a transzkripciós aktivitás, ami alapján feltételezhető, hogy a szülők a gaméták DNS-ének metilálásán keresztül szabnak gátat a zigotikus transzkriptumok idő előtti megjelenésének (Vinkenoog és mtsai. 2003; Jullien és mtsai. 2006; Luo és mtsai. 2009).

A metilációs mintázat kialakítása és fenntartása növényekben két úton történhet, amelyek egymással együtt hatva alakítják ki a metiláció-függő DNS inaktivitást. Az első alternatíva a gének promóterein található, szimmetrikusan elhelyezkedő CG motívumok metilálása, amit a MET1 metiltranszferáz enzim végez (Xiao és mtsai. 2003; Costa és mtsai. 2004; Arnaud és Feil 2006; Gehring és mtsai. 2006; Jullien és mtsai. 2006; Kawashima és Berger 2014). Növényekben egy ezzel párhuzamos rendszer is működik, amely a nem CG motívumok metilációjában játszik szerepet: ez az útvonal közvetlen kapcsolatban van a siRNS-függő DNS metilációs úttal, amelynek kulcsenzime a CMT3 kromometiláz (Cao és Jacobsen 2002; Berger és mtsai. 2006; Jullien és mtsai. 2006; Kawashima és Berger 2014; Kim és mtsai. 2014).

## 2.8 A kromatinszerkezet változása

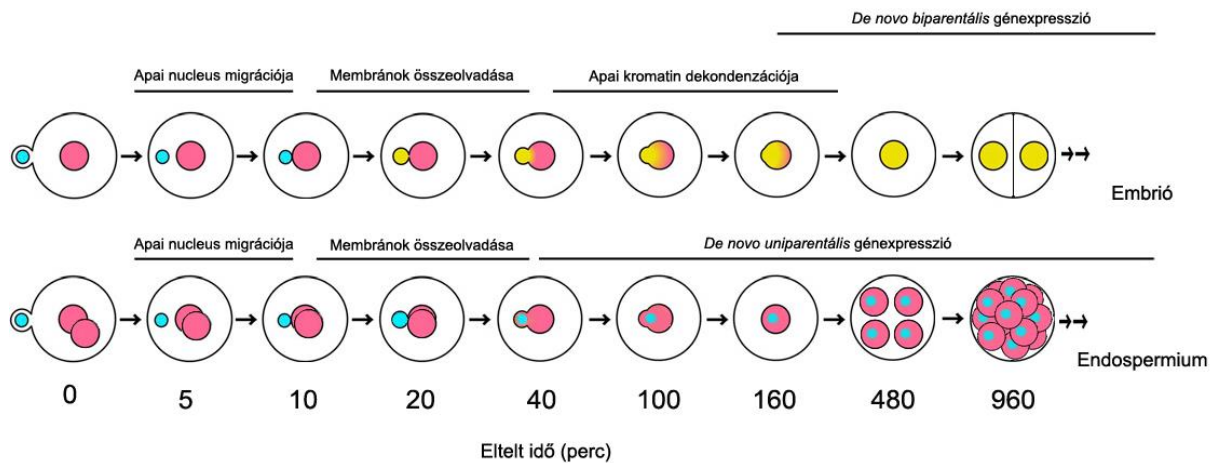
Az anyai/zigotikus átmenet során, a transzkripciós mintázatban történő nagymértékű változást a DNS szakaszok metiláltsága mellett a kromatin szerkezetének jelentős változásai okozzák, amelyek lefutása – amellett, hogy jelentős ivarspecifitás jellemzi – a kettős megtermékenyítés két fúziós termékében is különbségeket mutat. Annak fényében, hogy a folyamat az ivaros szaporodó élőlényekben nagyfokú hasonlóságot mutat (Ingouff és mtsai. 2007), feltételezhetjük, hogy az egyszikűekben is az Arabidopsisban megismert módon mennek végbe a fúziós termékek kromatin szerkezetének megtermékenyülést követő változásai.

A megtermékenyítés pillanatában a hímivarsejt genomja a petesejtéhez képest sokkal kompaktabb, amit a zigóta két sejtmagjának jelentős méretbeli különbsége is jól reprezentál (Scholten és mtsai. 2002; Ohnishi és mtsai. 2014). Ez a kompaktság a DNS-t és hozzá kapcsolódó hiszton és nem-hiszton fehérjéket magába foglaló kromatin szerkezetének a függvénye, ami a kromoszómán elfoglalt pozíció és az idő függvényében meglehetősen változatos lehet. A változatosságot a H3 hiszton fehérjék biztosítják, amelyekből az Arabidopsis genomjában kilenc változat található. Ide tartozik az általános centroméra hisztonfehérje, a CENH3 (Talbert és mtsai. 2002) és ennek némileg módosult H3.3-as változata, amelyek megjelenése a hímivarú gamétákra korlátozódik, és meghatározó szerepük van az extrém kondenzáció kialakításában (Okada és mtsai. 2005). CENH3-GFP fúziós fehérje alkalmazásával kimutatták, hogy a CENH3 expressziója az egysejtes haploid mikrospórában jelenik meg, és főként a kromoszómák centromérához közeli heterokromatikus régiójában koncentrálódik (Talbert és mtsai. 2002; Fang és Spector 2005; Lermontova és mtsai. 2006). A haploid mikrospóra első aszimmetrikus osztódása után kizárólag a generatív sejtben található, a vegetatív sejtben nem lehet kimutatni. A generatív sejt további osztódása során keletkező két hímivarsejt magjában az expresszió tovább fokozódik, és megtalálható mind az öt Arabidopsis kromoszóma centroméráiban (Ingouff és mtsai. 2007). Szemben a CENH3 fehérjével, a hímivarsejt-specifikus H3.3 a mikrospórában nem működik: a fehérje az aszimmetrikus osztódást követően a generatív sejtben jelenik meg, majd a második osztódást követően szintén a hímivarsejtek magjában akumulálódik (Ingouff és mtsai. 2007).

A kettős megtermékenyítést követő órákban történik meg a kariogámia, azaz az anyai és apai sejtmagok összeolvadása (Faure és mtsai. 1993; Ohnishi és mtsai. 2014). Az endospermium közvetlenül a kariogámia után mitotikusan aktív periódusba lép, aminek legfőbb bizonyítéka az RBR1 (RETINOBLASTOMA RELATED 1) fehérje gyors megjelenése, amelyről közismert, hogy a sejtciklus G1–S fázisa közötti átmenet egyik kulcsfehérjéje (Weinberg 1995; Inze és De Veylder 2006). A zigótában ugyanennek a fehérjének a termelődése csak később, a megnyúlási

periódusban kezdődik el, 8 órával a kariogámiát követően (Ingouff és mtsai. 2007), bizonyítva a zigóta kezdeti, mitotikus szempontból nyugalmi periódusát. Ez idő alatt a zigóta kromatin szerkezetében jelentős változások történnek, ami a H3.3 hiszton fehérje gyors degradálódásán keresztül biztosítja a kromatin állomány fellazulását, lehetővé téve a géneknek az apai genomról történő átíródását még az első osztódás előtt (Ingouff és mtsai. 2007; Ohnishi és mtsai. 2014; She és Baroux 2014).

Ezzel szemben az endospermiumban közvetlenül a kariogámiát követően megkezdődik az aktív DNS szintézis, és a triploid mag citokinézis nélküli gyors osztódásokba kezd, megformálva a szabad sejtmagvas vagy cönocitikus endospermiumot (Faure és mtsai. 1993). Mire a zigóta első osztódása befejeződik, a szabad sejtes endospermium fajtól függően akár már 8-16 sejtmagot is tartalmazhat (ld. 4.2.2 fejezet), ami 3-4 befejezett ciklust jelent (Randolph 1936; Narayanaswami 1954) (**5. ábra**). Az újonnan képződő sejtmagokban a H3.3 hiszton bár csökkenő intenzitással, de jól kimutatható az apai kromoszómákon, a 4. osztódási ciklus végéig fenntartva azok nagyfokú kondenzáltságát, majd ezt követően fokozatosan eltűnik (Ingouff és mtsai. 2007; Sanei és mtsai. 2011). Ez a lassú hígulás párhuzamba hozható a kizárólag a korai, szabad sejtmagvas endospermiumra jellemző apai genom inaktivitással, amit számos lókus anyai alléljának kizárólagos transzkripciója bizonyít.



**5. ábra.** A génexpresszió és az apai kromatin újraszerveződése az embrióban (fent) és az endospermiumban (lent) az idő és a sejtosztódások függvényében. (Ohnishi és mtsai. 2014 nyomán, a szerző által kiegészítve)  
kék: apai eredetű kromatin; bordó: anyai eredetű kromatin; sárga: zigotikus kromatin

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a DNS replikációnak – szemben a transzkripcióval – nem előfeltétele a H3.3 hiszton aktív lebontása által közvetített kromatin dekondenzáció, valamint hogy az apai genom reaktivációja a két fúziós termékben eltérő dinamikával történik (Ingouff és mtsai. 2007) (**5. ábra**). Míg a zigótában közvetlenül a kariogámiát követően a H3.3 hisztonfehérje aktív degradációja biztosítja a kromatin intenzív dekondenzálódását, addig az

endospermiumban ez egy fokozatos, több sejtcikluson átívelő folyamat: egy ún. lassú hígulás eredményeként megy végbe a hisztonfehérjék szubsztitúciója, amelynek fontos szerepe van a két fúziós termék eltérő irányba történő továbbfejlődésében (Ingouff és mtsai. 2007).

## 2.9 Genetikai imprinting (bevésődés)

A fúziós termékek spermium eredetű genomját érintő, eltérő kromatin szerveződése az expressziós mintázatukban is tetten érhető. A két fúziós termék expressziós változásainak követése során felfigyeltek arra, hogy bizonyos gének amellet, hogy expressziójuk specifikusan csak az egyik vagy csak a másik fúziós termékre korlátozódott, eltérő aktivitást mutattak annak függvényében, hogy a hím vagy a nőivarú partner irányából kerültek az embrió vagy az endospermium genomjába (Vielle-Calzada és mtsai. 2000; Baroux és mtsai. 2001; Weijers és mtsai. 2001; Scholten és mtsai. 2002; Ingouff és mtsai. 2007). Ez az ivarspecifikusan egyoldalú génexpresszió, ami tehát még a két fúziós termékben is jelentős különbségeket mutat, feltehetően szintén szerepet játszik az eltérő fejlődési utak meghatározásában (Vielle-Calzada és mtsai. 2000; Weijers és mtsai. 2001; Ning és mtsai. 2006; Ingouff és mtsai. 2007).

### 2.9.1 A *FIS* gének

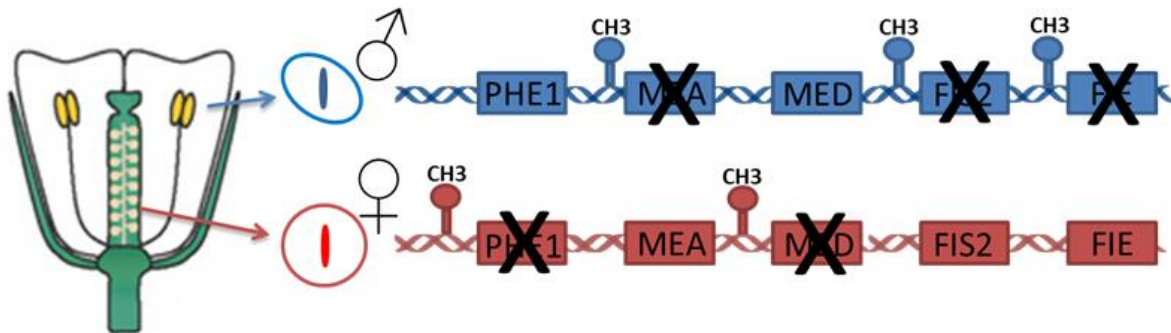
Az érintett gének között vannak az ún. *FIS* gének: a *MEA/FIS1 (MEDEA)*, a *FIS2 (FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2)* és a *FIE/FIS3 (FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM)* azok, amelyekről bebizonyosodott, hogy kizárólag a virág és a mag fejlődése során expresszálnak speciálisan az ivarszervekben és a termésben (Ohad és mtsai. 1996; Grossniklaus és Schneitz 1998; Kiyosue és mtsai. 1999; Ohad és mtsai. 1999; Ingouff és mtsai. 2005). Arabidopsis mutánsok fenotípusos vizsgálata igazolta, hogy mindhárom gén aktív szabályozója a korai endospermium fejlődésének azáltal, hogy gátolják a központi sejt megtermékenyülés előtti proliferációját. Azokban a növényekben, amelyek e három gén valamelyikének mutáns allélját hordozták, a központi sejt még a megtermékenyülés előtt autonóm módon osztódni kezdett, és részleges endospermium fejlődést eredményezett (Castle és mtsai. 1993; Ohad és mtsai. 1996; Chaudhury és mtsai. 1997; Grossniklaus és Schneitz 1998; Kiyosue és mtsai. 1999; Luo és mtsai. 1999). Mindhárom mutáns fenotípusára jellemző, hogy virágaikban megporzás hiányában is olyan magkezdemények fejlődnek, amelyekben bár nincs embrió, de endospermium kezdemény termékenyülés nélkül is kialakul bennük. Ennek a kezdetleges sejthalmaznak a fejlődése a szabad sejtmagvas fázis végén leáll, ezzel jelezve, hogy

az endospermium teljes kifejlődéséhez az embriózsákban további feltételeknek is teljesülniük kell (Ohad és mtsai. 1996; Grossniklaus és mtsai. 1998; Grossniklaus és Schneitz 1998; Kiyosue és mtsai. 1999; Ohad és mtsai. 1999; Vinkenoog és mtsai. 2003; Kinoshita 2007; Curtis és Grossniklaus 2008; Erilova és mtsai. 2009; Hehenberger és mtsai. 2012).

Mivel az endospermium abban az esetben is ugyanígy fejlődik, amikor az ilyen mutánsok virágait vad típusú pollennel megporozva azok petesejtje termékenyül, és a zigóta a vad típusú növényekkel azonos módon fejlődik, ez egyértelműen jelzi, hogy az endospermium fejlődésének elakadása nem az embrió hiányából ered, hanem az ok magában az endospermiumban keresendő (Vinkenoog és mtsai. 2003). A mutáns ovulumokban az embriók fejlődése a megfelelően fejlődő endospermium hiányának következtében ugyan leáll, de a torpedó stádiumú embriók aszeptikus tenyészetben képesek életképes növényekké fejlődni, bizonyítva ezzel, hogy a mutációk hatása egyedül az endospermium fejlődésére korlátozódik. Az autonóm fejlődésnek indult endospermium részleges fejlődésével kapcsolatban számos tanulmány született arról, hogy a jelenség szoros összefüggésben van a *MEA* génnek az apai genomot érintő specifikus inaktivitásával (Kinoshita és mtsai. 1999; Luo és mtsai. 2000; Jullien és mtsai. 2006).

A szekvencia-specifikus *MEA* próba a szabad sejtmagvas endospermiumban csak két anyai kromozómán adott jelet; ezt megerősítve az ivarspecifikus transzkriptumok kimutatására irányuló RT-PCR kísérletekkel a szabad sejtmagvas endospermiumban csak az anyai szekvenciáról átíródott RNS-t sikerült kimutatni, míg ezzel párhuzamosan az embrióban mindkét szülői szekvencia aktívan expresszált (Kinoshita és mtsai. 1999). A jelenség, miszerint meghatározott gének nem azonos mértékben íródnak át az eltérő ivarú szülőtől származó kromozómákról, nagy hasonlóságot mutat az állati embriogenezis során megismert szülő-specifikus imprinting mechanizmussal, amely mint speciális önvédelmi „checkpoint”, a megtermékenyülés és ezáltal az apai genomról származó géntermékek hiányában meggátolja a hibás termékenyülési eseményből származó utódok fejlődését (Kaufman és mtsai. 1977; Barton és mtsai. 1984; von Wangenheim és Peterson 2004; Guitton és Berger 2005; Kinoshita és mtsai. 2008; Ishikawa és mtsai. 2011; Piccolo és Fisher 2014). A jelenség magyarázata abban rejlik, hogy az ivarsejt fejlődése során a fejlődéshez nélkülözhetetlen gének az egyik szülő genomján inaktiválódnak, és csak a megfelelő szülővel való termékenyülés után, a fúziós termékben komplementálják egymást (Adams és mtsai. 2000; Cao és Jacobsen 2002; Vinkenoog és mtsai. 2003; Ishikawa és mtsai. 2011) (**6. ábra**). A tökéletes komplementációhoz az imprintált gének megfelelő aránya is szükséges: eltérő ploidszintű *Arabidopsis* reciprok keresztezések igazolják, hogy az endospermium helyes fejlődéséhez szükséges  $2m : 1p$  arány szoros összefüggésbe hozható az ivarspecifikus imprinting jelenség következményeivel (Grossniklaus és mtsai. 1998;

Adams és mtsai. 2000; Curtis és Grossniklaus 2008; Erilova és mtsai. 2009; Cailleau és mtsai. 2010).



6. ábra. Transzkripciósan aktív és inaktív gének a hímvarsejtben (fent) és a petesejtben (lent).  
(Berger és mtsai. 2006 nyomán)

A *MEA* lókusznak csak az endospermiumra jellemző és csak az apai genomot érintő speciális csendesítése lehet az egyik fő oka az endospermium szülői genomaránytól való függésének (Kermicle 1970; Chaudhuri és Messing 1994; Lund és mtsai. 1995; Kinoshita és mtsai. 1999; Vielle-Calzada és mtsai. 1999). A *MEA* kulcsszerepére további indirekt bizonyítékul szolgál, hogy a *FIS* gének szekvenciáit részletesen elemezve kiderült, hogy a *MEA* és a *FIE* egyaránt az ún. Polycomb csoportba tartozó fehérjét kódol, amelyek nagy hasonlóságot mutatnak az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) EZ (ENHANCER OF ZESTE) fehérjéjével, amely a szülő-specifikus imprinting egyik kulcsszereplője (Vinkenoog és mtsai. 2000; Guitton és Berger 2005; Arnaud és Feil 2006). Emellett található az Arabidopsisban csak az apai genomról átíródó gének is, mint a *MED* (*MEIDOS*) és a MADS-box gének csoportjába tartozó *PHE1* (*PHERES1*) (Erilova és mtsai. 2009). A *PHE1* génről ismert, hogy az anyai allél(ok) némaságáért a csak a nőivarban és többnyire az endospermiumban aktív *FIS* gének a felelősek (7. ábra). A *FIS* gének bármelyikére mutáns Arabidopsis vonalakban az anyai *PHE1* az apaival megegyező aktivitást mutat, igazolva a *PHE1* gén *FIS* géneknek alárendelt szerepét (Makarevich és mtsai. 2008). A mutáns *phe1* allélnak nincs az endospermium fejlődésére defektív hatása, ellenben azokban a növényekben, amelyekben a *FIS* gének valamelyikének mutációja következtében az endospermium korán abortálódik, a *phe1* mutánssal kombinálva a letális fenotípus jelentősen enyhíthető (Köhler és mtsai. 2003). Mindez azt mutatja, hogy a *mea*, *fis*, *fie* mutációi következtében fellépő abnormális anyai *PHE1* expresszió tehető legalábbis részben felelőssé az ilyen mutánsok endospermiumainak korai abortációjáért (Köhler és mtsai. 2003).

### 2.9.2 A Polycomb gének szerepe az egyedfejlődés során

A Polycomb gének az élővilágban széles körben elterjedtek, és jól ismert funkciójuk, hogy több alegységből álló komplexeket alkotva más géneket transzkripciósan inaktív állapotban tartanak az egyedfejlődés meghatározott szakaszaiban (Pirrotta 1997). A *FIS* gének mutációinak a fenotípusra gyakorolt hatása alapján feltételezhető, hogy ezek a gének más fejlődés-specifikus gének expresszióját szabályozzák, meggátolva többek között a központi sejt megtermékenyülés előtti poliferációját (Kiyosue és mtsai. 1999; Luo és mtsai. 1999; Ohad és mtsai. 1999). Az állati gaméták imprinting mechanizmusa közismerten egy specifikus DNS metilációs gátláson alapul (Neumann és Barlow 1996; Tilghman 1999), ami a gametogenezis meghatározott időpontjában az érintett gének promótereinek egyes motívumain történik meg. Bizonyítékok vannak arra is, hogy kukorica endospermium fejlődésében szerepet játszó gének imprinting mechanizmusa szintén összefüggésbe hozható a DNS metilációjával (Lund és mtsai. 1995; Finnegan és mtsai. 1998; Dickinson és mtsai. 2012).

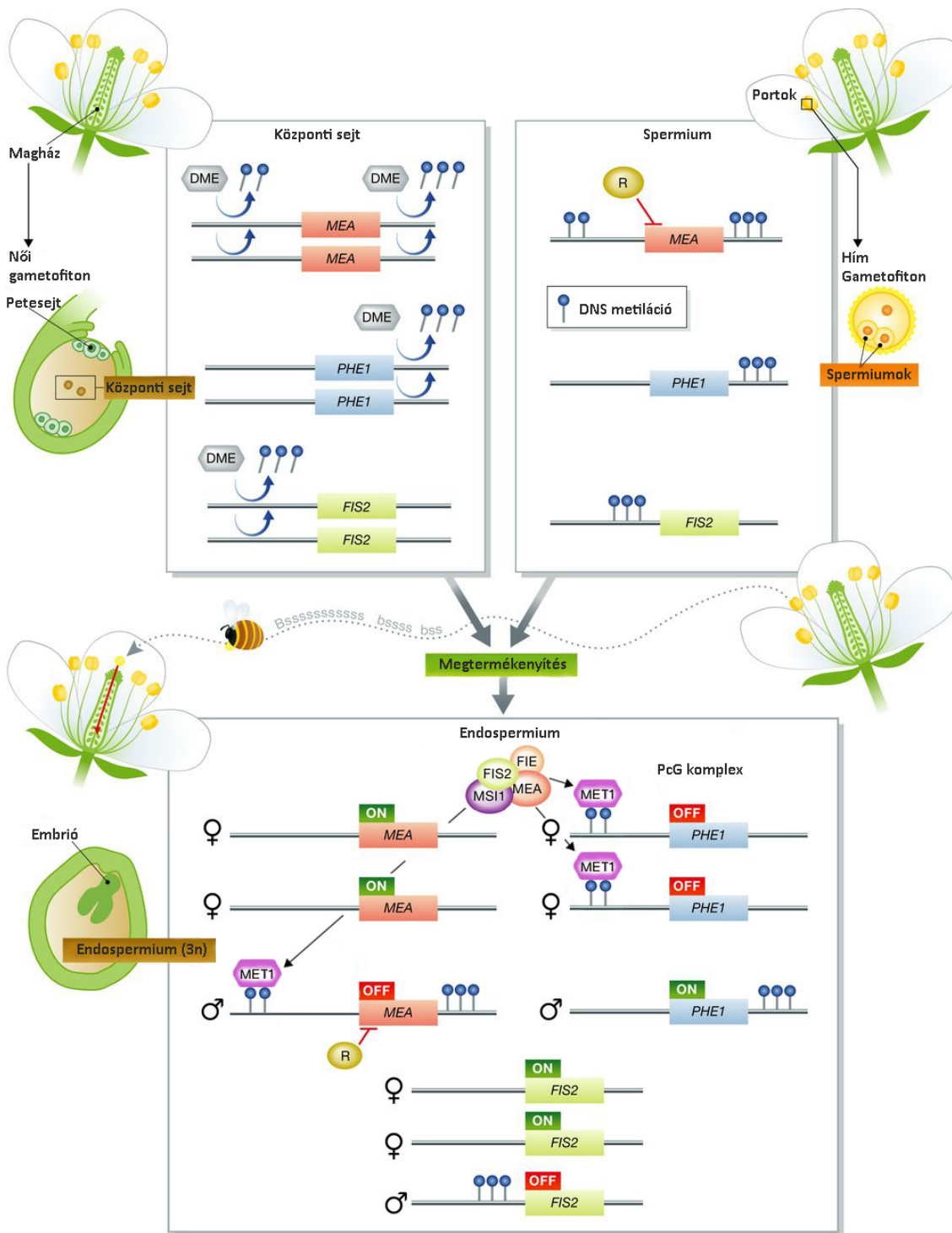
A *mea* mutáns növények magfejlődésének jellemzője, hogy ha a virágokat olyan pollennel termékenyítik, amelyekben a gén vad típusú változata található, a hímivarsejt által közvetített allél nem képes kompenzálni az anyai mutáns allél okozta magfejlődési defektust (Ohad és mtsai. 1996; Chaudhury és mtsai. 1997; Grossniklaus és mtsai. 1998; Kiyosue és mtsai. 1999; Ohad és mtsai. 1999). Ellenben, ha az apanövény homozigóta a *DDMI* (*DECREASE OF DNA METHYLATION*) lókuszt érintő mutációra, amely önmagában az érintett növény DNS-ének jelentős hipometiláltságát okozza (Vongs és mtsai. 1993), a pollen által közvetített vad típusú *MEA* allél komplementálja az anyai mutáns *mea* allél okozta fenotípusos defektust, igazolva az apai allél ivarspecifikus imprintingje és a DNS metiláció közti szoros összefüggést (Vielle-Calzada és mtsai. 1999; Vinkenoog és mtsai. 2000; Schatlowksi és mtsai. 2014).

A növényi sejtosztódás során az újonnan képződő DNS szálakra történő metilációs mintázat átíródásának kulcsenzime a DNS metiltranszferáz 1 (MET1) enzim (Genger és mtsai. 1999) (7. ábra). Az antiszensz génnel transzformált Arabidopsis növényekben a DNS metiláltsága a vad típusú növényekéhez képest 13%-ra csökkent (Finnegan 1996). Míg állatokban a genom ilyen mértékű hipometiláltsága végzetes következményekkel jár, addig a növények jelentősebb változások nélkül képesek végrehajtani fejlődési programjukat szinte teljes metilációs szabályozás hiányában is (Li és mtsai. 1993; Adams és mtsai. 2000). A MET1 antiszensz (AS) konstrukcióval transzformált növények leginkább a virág és a magfejlődés területén mutattak eltérést vad típusú társaikhoz képest. A MET1/AS növények termőiben öntermékenyítés esetén a vad típusúakhoz képest nagyobb méretű magok fejlődnek, ami leginkább a  $2n \times 4n$  keresztezés során tapasztalt kétszeres apai hozzájárulás esetén volt



megfigyelhető (Adams és mtsai. 2000; Vinkenoog és mtsai. 2000; Vinkenoog és mtsai. 2003). Ha a MET1/AS növényeket vad típusú pollennel termékenyítették, hasonló eredményt kaptak. Ellenben, ha a vad típusú anyai partnert termékenyítették MET1/AS növénytől származó hipometilált pollennel, a vad típusúhoz képest kisebb, a  $4n \times 2n$  keresztezésnél tapasztalhatóhoz hasonló magokat kaptak (Adams és mtsai. 2000; Vinkenoog és mtsai. 2000; Vinkenoog és mtsai. 2003).

Az a tény, hogy a hipometilált genom mindig az ellentétes oldali szülői hozzájárulás növekedéséhez hasonló fenotípushoz hasonlított, egyértelműen arra utal, hogy az endospermium fejlődés egyensúlyát biztosító gének alléljainak ivarspecifikus inaktiválása a DNS metilációs mechanizmuson, ezen belül a MET1 metiltranszferáz génen keresztül valósul meg. További bizonyítékként, ha az eltérő ploidszintű reciprok keresztezéseket a MET1/AS transzformációval kombinálták, az eltérő szülői genom hozzájárulásból adódó egyenlőtlenség a DNS hipometilációján keresztül redukálható volt (Adams és mtsai. 2000). A MET1/AS növények arra is rávilágítottak, hogy a *PHE1* gén *FIS* gének általi elnyomása a MET1 közvetítésével történik, ugyanis ezen növények női gametofitonjában a *PHE1* expressziója a vad típusú *FIS* allélok jelenléte ellenére kimutatható volt (Makarevich és mtsai. 2008). A *FIS* gének és a MET1 közvetítette DNS metiláció közötti szoros összefüggés legkésebb bizonyítéka, hogy a *mea*, a *fie* és a *fis* mutáció okozta fenotípust a MET1/AS allél komplementálni képes (Guitton és mtsai. 2004; Schatlowksi és mtsai. 2014). A magfejlődési defektust okozó letális *fie* mutációt hordozó virágokat MET1/AS allélt hordozó pollennel termékenyítve életképes, az apai túlsúly esetére hasonlító magokat eredményeztek, közvetlen bizonyítékot szolgáltatva a funkcióképes allél apai genomon történő metiláció általi inaktiváltságára (Vinkenoog és mtsai. 2000). Ezzel összhangban azok a termékenyítetlen *fie* ovulumok, amelyekben a központi sejt (autonóm proliferációval) apai genom híján csak a szabad sejtmagvas fázis végéig fejlődött, MET1/AS háttérrel kiegészítve az epigenetikai „checkpointot” áttörte, és sejtes szerkezetű endospermiumot, valamint embriót nem tartalmazó, vad típusúakhoz hasonló magokat eredményezett (Vinkenoog és mtsai. 2000; Schatlowksi és mtsai. 2014).



7. ábra. A szülői imprinting sematikus menete növényekben. (Iwasaki és Paszkowski 2014 nyomán)

A központi sejtben a DEMETER eltávolítja a metilcsoportokat a nőivar-specifikus *MEA* és *FIS2* promótereiről, valamint a hímivar-specifikus *PHE1* gén 3' végéről, és ezzel aktiválja a "polycomb group" (PcG) génkomplex elemeinek átíródását. Ezzel párhuzamosan a hím gametofitonban a DNS metiláció fenntartja ezeknek a géneknek a gátlását: a *MEA* gátlásához még egy ismeretlen represszor (R) is szükséges. A központi sejt megtermékenyülése után formálódó endospermiumban a működő anyai *MEA* és *FIS2* fehérjék a PcG komplex részeként metiláció útján gátolják az apai *MEA* allél, valamint az anyai *PHE1* allélok átíródását, és ezzel fenntartják az ivarspecifikus "imprinting"-et.

Az ivarspecifikus imprinting jelenség növényi megfelelőjének megértése egyrészt magyarázatot ad arra, hogy hogyan képesek egyes alapvetően ivaros fajok bizonyos esetekben apomiktikus úton, apai genom hozzájárulása nélkül is életképes utódokat létrehozni (Haig és Westoby 1991; Vinkenoog és mtsai. 2000), másrészt a „checkpoint” mechanizmus manipulálásán keresztül olyan lehetőséget biztosít, amellyel lehetővé válik olyan távoli keresztezésekből is utódokat nyerni, amelyek a szülők eltérő imprinting mintázata vagy a ploidszint különbség miatt fellépő endospermium fejlődési defektusok következtében természetes úton nem eredményeznek csíráképes magokat (ld. 4.4 fejezet).

## 2.10 Az idegen fajú hibridizáció rövid története

Az első dokumentált mesterséges fajhibrid előállítása Thomas Fairchild londoni kertész nevéhez fűződik (1717), aki *Dianthus barbatus* (♀) és *D. caryophyllus* (♂) keresztezéséből állított elő olyan utódokat, amelyek megjelenésükben részben mindkét szülőtől eltérő, részben mindkét szülőre emlékeztető köztes fenotípust mutattak (Zirkle 1935). Fairchild azt is megállapította, hogy az így létrehozott növényi „öszvér” az állati megfelelőjéhez hasonlóan nem hozott magot, fenntartása és szaporítása csak vegetatív úton történhetett (Zirkle 1935).

Az első átfogó tudományos munkát a témában fél évszázaddal később egy német botanikus Joseph Gottlieb Koelreuter jelentette meg 1760 és 1766 között, amelyben 65 különböző keresztezési kombináció (13 nemzetség, 54 faj) eredményei alapján bizonyította az eltérő fajok keresztezhetőségét. Első mesterséges hibridje a *Nicotiana rustica* és a *N. paniculata* fajok keresztezéséből származott (Roberts 1929), amely Fairchild *Dianthus* „öszvéreivel” szemben részben fertilisnek bizonyult. A különböző kombinációkból származó F1 növények megfigyelése során először észlelte és dokumentálta a hibrid nemzedék gyakori sterilitását, ami máig az egyik fő korlátozó tényezője a legtöbb nemzetség hibrid előállításának. Későbbi közleményeiben beszámolt a sterilitás általános mivoltáról, amit a természet önvédelmi mechanizmusának tulajdonított, hogy így szabjon gátat a különböző fajok kereszteződéséből származó zűrzavarnak. További jelentős tudományos eredménye volt, hogy elsőként dokumentálta a faj és nemzetség keresztezésekből származó utódokra jellemző és a keresztezési iránytól független uniformitást, amit *N. glutinosa* és *N. perennis* reciprok keresztezésekkel is alátámasztott, valamint leírta az F2 növények tulajdonságainak sokszínűségét (Roberts 1929).

A gabonaféléknél az első dokumentált nemzetség hibridet hexaploid búza (*Triticum aestivum*) és rozs (*Secale cereale*) keresztezésével Wilson (1876) írta le, és az általa létrehozott F1 növények a hibridekre jellemző módon virágzáskor sterilnek bizonyultak (Roberts 1929; Bajaj 1990). Részben ezért, és részben mert eredményeit a későbbiekben sohasem sikerült

minden kétséget kizárólag igazolnia, az első nemzetség hibrideket ma már Rimpau (1891) német növénynemesítő nevéhez kapcsolják (Bajaj 1990). Az általa ugyanebből a kombinációból felnevelt 12 fertilis növény tekinthető egyben az első sikeres hibrid gabonafélének, amelynek későbbi származékai és rokonai tritikálé néven a 20. század legszélesebb körben termesztett mesterséges hibridjei lettek. Rimpau F1 növényei küllemükben leginkább az anyai genotípusra emlékeztettek, nagyfokú uniformitást mutattak, öntermékenyítés után homogén, az F1 nemzedékkel azonos fenotípusú F2 nemzedéket eredményeztek, és uniform tulajdonságaik nagyszámú nemzedéken keresztül is változatlanul fennmaradtak (Bajaj 1990). Csak 45 évvel később tette lehetővé a citológiai technikák fejlődése, hogy Lindschau, Ohler, ill. Müntzing igazolják, hogy a Rimpau hibrid utódainak minden testi sejtjében 56 kromoszóma található, amelyekből 42 a búzától, 14 a rozstól származik, így a növény tökéletes oktoploid amfiploidként új szintetikus növényfajnak tekinthető (Lindschau és Ohler 1935; Müntzing 1936; Bajaj 1990).

A kezdeti sikereken felbuzdulva világszerte kutatások kezdődtek a termesztett kultúrnövények hibridizációs lehetőségeinek vizsgálatára. A múlt század második felében a heterózis nemesítés terjedésével egyre nagyobb hangsúlyt kapott a lehetőleg minél eltérőbb tulajdonságokkal rendelkező egyedek keresztezésével történő hibridek előállítására (Bajaj 1990). A virágok hormonkezelése, valamint az egyre fejlődő szövettenyésztési technikák olyan kombinációkból is lehetővé tették faj- és nemzetség hibrid utódok létrehozását, amelyek korábban elképzelhetetlenek voltak (Molnár-Láng 2011). Az ilyen hibridek mindamelllett, hogy ötvözték szüleik hasznos tulajdonságait, számos egyéb előnnyel rendelkeztek, mint pl. a szülőkénel magasabb mutációs ráta, gyorsabb növekedés, valamint a környezet változásaihoz való fokozott alkalmazkodó képesség (Stebbins és Pun 1953). Az összes között talán a legjelentősebb előny az olyan új tulajdonságok megjelenése, amelyek fenotípusosan egyik szülőre sem jellemzőek, pl. eltérő virágméret és morfológia vagy a szülői enzimek kölcsönhatásának következtében megjelenő új pigmentek és színvariánsok (Stebbins és Pun 1953; Harney és Grant 1981).

### **2.10.1 A kolchicin jelentősége az idegen fajú hibridizációban**

Annak ellenére, hogy a termékenyülést követően kimentett embriók aseptikus körülmények közötti felnevelése jelentősen kiszélesítette a potenciális keresztezési partnerek körét, nem váltotta be teljesen a hozzá fűzött reményeket. A mesterségesen felnevelt növények az esetek többségében steril virágokat hoztak, amelyek nem öröközték hibrid tulajdonságaikat a következő generációkba. A jelenség magyarázata, hogy a szülői fajok eltérő számú és szerkezetű kromoszómái a meiózis során a haploid növényekhez hasonlóan nem alkotnak párokat, és ez az

inompatibilitás a genetikai távolsággal arányosan egyre inkább fokozódik (Riley és Law 1965; Sharma 1995). A nagy genetikai távolságok áthidalására lehetséges alternatívaként olyan citosztatikumok (pl. kolchicin, orizalin, stb.) alkalmazása biztosított lehetőséget, amelyek lehetővé tették az adott faj genomjának megkettőzését.

A kolchicinnel kezelt sejtekben a hatóanyag a tubulin fehérje alegységeihez kapcsolódva megzavarja a mikrotubulusok polimerizációját, ezáltal meggátolja a megkettőződött kromoszómáknak a sejt ellentétes pólusaiba történő vándorlását. Ezekben a sejtekben a mitózis megakad, és olyan utódsejtet eredményez, amely a kiinduló sejt minden kromoszómájából kettőt tartalmaz (Blakeslee és Avery 1937). A kolchicin alkalmazásával létrehozott növények meiózisa az F1 hibridekkel szemben normális lefutású, kromoszómáik a meiózis első metafázisában bivalenseket alkotnak, majd egyenlően oszlanak el a keletkező leánysejtek között. Az így fertilissé tett növények virágait öntermékenyítve a tritikáléhoz hasonlóan mindkét szülő teljes genomját hordozó amphiploid növényeket lehet előállítani.

### **2.10.2 A molekuláris citogenetika szerepe az idegen fajú hibridizáció fellendülésében**

A múlt század végén a molekuláris citogenetika rohamos fejlődése újabb lendületet adott az idegen fajú hibridek létrehozását célzó kutatásoknak. Az 1990-es években olyan új technológiák kerültek bevezetésre, amelyek lehetővé tették az eltérő szülőktől származó DNS szakaszok azonosítását és nyomon követését. A fluoreszcensen jelölt DNS próbákkal történő hibridizáció (FISH) olyan pontossággal tette lehetővé a gabonafélék genomjainak molekuláris citogenetikai vizsgálatát, amilyenre korábban nem volt lehetőség (Jiang és Gill 1994). A GAA trinukleotidokat nagy kópiaszámban tartalmazó DNS próba a gabonafélék kromoszómáin specifikus hibridizációs mintázatot ad, ezért segítségével a kromoszómák jól megkülönböztethetőek egymástól (Pedersen és mtsai. 1996). Ez a próba lehetővé teszi a különböző gabonafélék kromoszómáinak egyedi azonosítását még az olyan összetett genommal rendelkező fajok esetében is, mint a termesztett búza (Pedersen és Langridge 1997). A módszer arra is alkalmasnak bizonyult, hogy idegen fajú keresztezésekből származó faj- és nemzetség hibridekben és azok származékaiban nagy biztonsággal azonosítani lehessen a különböző szülőktől származó kromoszómákat (Szakács és Molnár-Láng 2007). Az idegen fajú hibridek esetében a különböző fajhoz tartozó szülők genetikai anyaga, legyen szó teljes genomról, egész kromoszómákról vagy csak kromoszómatörödekről, genom *in situ* hibridizációval (GISH) szintén elkülöníthető egymástól az utódok mitotikus vagy meiotikus preparátumain (Schwarzacher és mtsai. 1989). Az eljárás során a repetitív próbák helyett a donor faj fluorokrómmal jelölt teljes vagy genom DNS-ét használják hibridizációs próbaként, és a

recipiens faj jelöletlen DNS-ét alkalmazzák blokkoló DNS-ként. Az így jelölt sejtmagpreparátumokon a különböző szülőktől származó DNS szakaszok élesen elkülönülnek egymástól, lehetővé téve az intergenomikus transzlokációk kimutatását. A transzlokációkban a beépült kromoszóma-szegmentum mérete és a transzlokációs töréspont helye is meghatározható (Mukai és mtsai 1993). A GISH módszer hatékonysága a genetikai távolsággal fordítottan arányos, így a közeli rokon fajok genetikai anyagának elkülönítése nehezen kivitelezhető, azonban az eljárás meglehetősen hatékonynak bizonyult olyan távoli kombinációknál mint a búza  $\times$  árpa (Molnár-Láng és mtsai. 2014).

Az 1990-es évek végére a molekuláris markerezési technikák fejlődése azt is lehetővé tette, hogy az idegen fajú keresztezésekből származó utódok genetikai anyagába beépült idegen fajú kromoszómákat vagy kromoszóma-szegmentumokat a citológiai módszerek mellett molekuláris markerekkel is nagy pontossággal lehessen azonosítani (Fedak 1998). Napjainkban a búza genom különböző kromoszómáira térképezett mikroszatellit markerek száma a 2000-et is meghaladja, de hasonló a helyzet a rozs (Korzun és mtsai, 2001; Ma és mtsai, 2001) és az árpa (Ramsay és mtsai, 2000; Li és mtsai, 2003) esetében is, ami lehetőséget biztosít az ezen fajok közötti transzlokációk kimutatására és behatárolására. Molekuláris markerekkel jól kimutatható például a köztermesztésben lévő búzafajták többségében megtalálható 1RS rozs kromoszómakar eredetű transzlokáció (Hsam és mtsai. 2000). Emellett a módszer rendkívül alkalmasnak bizonyult a búza  $\times$  árpa F1 hibridek molekuláris kariotípusának meghatározására (Polgári és mtsai. 2014).

## 2.11 A termesztett búza keresztezhetősége

A termesztett búza (*Triticum aestivum*) közismerten allohexaploid faj ( $2n = 6x = 42$ , AABBDD genom), ami kb. 8000-10000 évvel ezelőtt, három egyszeres genommal ( $2n = 2x = 14$ ) rendelkező növény természetes, két lépcsős hibridizációja során keletkezett (Huang és mtsai. 2002), és citológiailag tökéletes amfiploidnak tekinthető, azaz mindhárom szülője teljes kromoszómakészletét tartalmazza. A három ős: az A genom részéről a *Triticum urartu* (Chapman és mtsai. 1976; Dvorák és mtsai. 1993), a B genom részéről feltételezhetően az S genommal rendelkező *Aegilops speltoides* vagy annak mindmáig ismeretlen közeli rokona (Sarkar és Stebbins 1956; Tsunewaki 2009), és a D genom részéről az *Aegilops tauschii* (McFadden és Sears 1946) a *Triticeae* nemzetségcsoportba tartozó *Triticum* és *Aegilops* fajok. Az allopoliploidia következtében fellépő intergenomikus kölcsönhatások olyan új tulajdonságok megjelenését tették lehetővé, amelyekkel eredetileg egyik diploid ős sem rendelkezett. A

hexaploid búza termőképessége, jó sütőipari minősége, szárerőssége, télállósága, mind a három szülői genom interferenciájának eredményeként jött létre (Feldman és Levy 2012).

A három genom egy fajban történő egyesülésének a jelentős előnyök mellett számos hátulütője is van. Az egyik ilyen jelentős probléma, hogy az újonnan létrejött speciális genom következtében, jelentősen leszűkül azon vad fajok száma, amelyekkel az új faj természetes úton szaporodni, képes. A szülői genomok különbözősége a meiózis során olyan citogenetikai rendellenességeket eredményez, amelyek erősen redukálják az utódok élet- és szaporító képességét, ezáltal az új faj genetikai értelemben elszigetelődik természetes génforrásaitól (Soltis és Soltis 1999; Kinoshita 2007; Feldman és Levy 2012). A búzával rokon fajok nagy része ivaros úton keresztezhető ugyan a búzával, de az utódok gyakran csökkent fertilitásúak, ezért az igazi nehézséget a búza és az idegen fajok közötti hibridek fenntartása jelenti (Belea 1976). Mivel a hexaploid búzáéval homológ, csak AABBDD genomot hordozó faj a természetben, vadon nem fordul elő (Peng és mtsai. 2011), ezért a keresztezéses génátvitelhez elengedhetetlen különböző, a keresztezés sikerét elősegítő (porzási, hormonális és in vitro) technikák alkalmazása.

### 2.11.1 A búza génforrásai

A búza génforrásai közé tartozó fajok genomösszetételük alapján három csoportba sorolhatók (Friebe és mtsai. 1996). A hexaploid búza elsődleges génforrásai közé tartoznak azok a fajok, amelyek a búza valamely genomjával homológ (A, B vagy D) genomot tartalmaznak. Ide sorolhatók a tetraploid *Triticum* fajok, valamint az A és D genomok diploid ősei (Friebe és mtsai. 1996). Mivel az F1 nemzedék meiózisa során a pár nélküli kromoszómák instabilan viselkednek, ezért az átvitt tulajdonság fixálásához többszöri visszakeresztezés szükséges (Molnár-Láng 2011).

A másodlagos génforrások körébe azokat a fajokat soroljuk, amelyek legalább egy a hexaploid búzáéval homológ genommal rendelkeznek (Friebe és mtsai. 1996). Ilyenek a poliploid *Aegilops* és *Triticum* fajok, amelyek idegen fajú keresztezésekben történő felhasználása a különböző genomok inkompatibilitása miatt gyakran csak in vitro embriótenyésztés alkalmazása mellett lehetséges (Molnár-Láng 2011). Az ilyen kombinációkban a szemkötés aránya viszonylag magas, azonban az ilyen szemtermésekből csírázó F1 hibrid nemzedék az esetek nagy többségében steril, és nem vagy csak ritkán nyerhetőek tőlük természetes úton csíráképes szemtermések (Thompson 1930). A probléma oka a genetikai inkompatibilitás, vagyis a nem homológ genomok a meiózis során részben vagy teljesen haploidként viselkednek. A pár nélküli kromoszómák a keletkező ivarsejtekben egyenlőtlenül oszlanak el, ezért az F1 utódok

fertilitása erősen lecsökken. Ezt csak többszörös visszakeresztezés vagy teljes genomduplikáció alkalmazásával lehet kompenzálni (Molnár-Láng 2011).

A harmadlagos génforrások csoportjába azok a fajok tartoznak, amelyek nem tartalmazzak a hexaploid búzáéval azonos genomot (Friebe és mtsai. 1996). Ide tartoznak azok a *Secale*, *Hordeum*, *Agropyron* fajok, amelyek a nagyfokú különbségek ellenére, még ha kis számban is, de eredményeznek életképes utódokat. Az ilyen hibridek felnevelése szinte kizárólag csak in vitro embriókultúra alkalmazásával lehetséges, és az F1 utódok fertilissé tételéhez elengedhetetlen a meiózisban haploidként viselkedő genomok duplikálása (Molnár-Láng 2011).

### 2.11.2 Az idegen fajú keresztezések nemesítési célja

A hexaploid búza közvetlen rokonsági körébe tartozó vad fajok számos előnyös agronómiai tulajdonsággal rendelkeznek, többségük abiotikus és biotikus stresszekkel szemben ellenálló (Molnár-Láng 2011). A búzával ivaros úton keresztezhető, és a kedvező tulajdonságaikat hibrid utódaikba is örökítik (Belea 1976). Mindamellet, hogy az ilyen hibridek előállítására metodikailag viszonylag egyszerű, meg kell említenünk, hogy a hasznos tulajdonságot hordozó génekkel kapcsolatos olyan DNS szakaszok is átkerülnek, amelyek agronómiailag kedvezőtlen tulajdonságokat kódolhatnak (Ortelli és mtsai. 1996).

Az idegen fajú keresztezések végső célja az, hogy lehetőleg minél rövidebb, csak hasznos agronómiai tulajdonságot hordozó DNS szakaszt integráljunk a búza genomba transzlokációk formájában. A nemesítés számára hasznos és kedvezőtlen gének szétválasztása csak fáradságos munkával, sokszori visszakeresztezés és megismételt szelekció után lehetséges (Molnár-Láng 2011). Ezt a problémát elkerülendő, célszerű a keresztezést olyan rokonnal végezni, amely tartalmazza a kívánt tulajdonságot kódoló gént, viszont a kedvezőtlen agronómiai tulajdonságokat kódoló gének a domesztikáció során genomjukból már ki lettek szorítva (Kole 2011).

Szerencsére a pázsitfűfélék családja domesztikált fajokban nagyon gazdag (Kole 2011), viszont e széles körben termesztett fajok egyike sem közvetlen rokona a termesztett búzának, azaz nem tartozik annak elsődleges génforrásai közé (Friebe és mtsai. 1996). Ennek ellenére a búza domesztikált rokonai között is találunk olyan fajokat, amelyek a búzával ivaros úton keresztezhetőek és olyan hasznos agronómiai tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek a termesztett búzából hiányoznak (Kole 2011).



### 2.11.3 A rozs és az árpa mint két lehetséges keresztezési partner

A termesztett gabonafélék közül a rozs (*Secale cereale*) ( $2n = 2x = 14$ , RR genom), a búza legközelebbi rokona (Bendich és McCarthy 1970; Moore és mtsai. 1993). Alkalmazkodóképessége a gabonafélék között a legjobb, kiváló hideg- és szárazságtűrő növény, betegségekkel (levélrozsa, lisztharmat) szemben a búzánál ellenállóbb, illetve a termesztés körülményeivel, valamint a talajjal szemben igénytelenebb (Kole 2011). A rozs a búzával ivarosán szaporítható, az F1 hibridek részben fertilizsek, és örökítik szüleik intermedier tulajdonságait (Lindschau és Ohler 1935; Rajhathy és Kiss 1946; Belea 1976). A két faj kedvező tulajdonságainak egyesítésére hozták létre a két faj amfiploidját, a hexaploid *T. aestivum* és a rozs kombinációjából az oktoploid, valamint a tetraploid búza (*T. durum*) és a rozs kombinációjából a hexaploid tritikálét, amely mint az első szintetikus amfiploid növény, előnyös tulajdonságai miatt mára komoly gazdasági jelentőségre tett szert. A két faj hibridizációjának másik fontos hozadéka az 1B-1R transzlokáció, amely a köztermesztésben lévő búzafajták jelentős részében megtalálható (Hsam és mtsai, 2000).

Az árpa, *Hordeum vulgare* ( $2n = 2x = 14$ , HH genom), a genomelemzések alapján a termesztett búzának a rozsnál távolabbi rokona (Bendich és McCarthy 1970; Moore és mtsai. 1993). Keresztezhetőség szempontjából szintén a búza harmadlagos génforrásaihoz tartozik (Friebe és mtsai 1996): a két faj ősei feltételezhetően a pleisztocén korban váltak szét és különültek el egymástól, (Moore és mtsai. 1993; Gyulai és mtsai. 2004). Az árpa a hideg mérsékelt övnek ma is a legfontosabb gabonaféléje: az egyik legrégebben házasított növény, amely számos értékes, a búzától eltérő tulajdonsággal rendelkezik. Az őszi árpa az őszi búzánál általában egy héttel korábban aratható, jó bokrosodási képesség jellemzi, egyes genotípusai kiváló só- és szárazságtűrők. Takarmányozási szempontból az árpa a búzánál kedvezőbb összetételű, bizonyos esszenciális aminosavakat (pl. lizin) a búzánál nagyobb mennyiségben tartalmaz (Molnár-Láng 2011). A búza és az árpa mint az európai szubkontinens két legfontosabb termesztett gabonaféléjének keresztezésével megnyílna az út a két termesztett faj eltérő domesztikációja során és azóta szelektált előnyös tulajdonságok ötvözése előtt.

Az árpa és a rozs szintén keresztezhető egymással, de a két faj hibridizációjára tett minden eddigi kísérlet csak az anyai genom egyetlen kópiáját hordozó haploidokat eredményezett (Bajaj és mtsai. 1980; Sharma 1995), az apai genom az embrionális fejlődés korai szakaszában elveszett. Ugyanígy tetraploid árpa  $\times$  diploid rozs keresztezéséből diploid árpa regeneránsok születtek (Bajaj 1986).

## 2.12 A búza (*T. aestivum*) × árpa (*H. vulgare*) nemzetség hibridek

A *Triticum* és *Hordeum* nemzetségekre tartozó fajok keresztezéséből már származtak fertilis amfiploidok, amelyeket a tritikálé analógiájára tritordeumnak neveztek el. Az oktoploid tritordeumot ( $2n = 8x = 56$ ) a *Hordeum chilense* és a *T. aestivum*, a hexaploid tritordeumot ( $2n = 6x = 42$ ) a *H. chilense* és *T. turgidum* keresztezéséből állították elő az F1 hibridek genomduplikációjával (Martin és Chapman 1977; Martin és Sanchez-Monge 1980). Az így létrehozott szintetikus amfiploidok számos hasznos agronómiai tulajdonságot mutattak ugyan (Martin és Cubero 1981; Martín és mtsai. 1999; Hernández és mtsai. 2001; Gyulai és mtsai. 2004), de a vad *H. chilense* kedvezőtlen tulajdonságai miatt nem terjedtek el igazán (Martín és mtsai. 1999).

A két termesztett faj (*T. aestivum* és *H. vulgare*) közötti első dokumentált keresztezési próbálkozás még a múlt század elején történt (Farrer 1904), de sok más későbbi próbálkozással egyetemben sikertelennek bizonyult, és száz éves kísérletezés ellenére átütő eredményt, stabil amfiploid nemzetséghibridet, a mai napig nem sikerült elérni. Az első bizonyítottan eredményes keresztezés Kruse (1973) nevéhez köthető, akinek négysoros árpa *H. vulgare* mint anyai partner és különböző termesztett búzákat, *T. aestivum*, *T. dicoccum*, *T. monococcum* mint apai partnerek keresztezéseiből in vitro embriókultúrával sikerült életképes növényt felnevelnie (Kruse 1972), azonban az utódok hibrid mivoltát nem tudta minden kétséget kizáróan igazolni (Bajaj 1990). Ezt követően többször sikerült mindkét irányú keresztezési kombinációból életképes, részleges hibrideket létrehozni (Islam és mtsai. 1975; Fedak 1980; Islam és mtsai. 1981; Mujeeb-Kazi és Rodriguez 1984; Molnár-Láng és mtsai. 1985; Bajaj 1990; Koba és Shimada 1992; Polgári és mtsai. 2014). A vizsgált keresztezési kombinációk eredményeire általánosan jellemző, hogy amikor az árpa volt az anyai partner, az jóval nagyobb mértékű (15,4%) szemkötést eredményezett (Islam és mtsai. 1975), mint a fordított irányban (1,3%) (Islam és mtsai. 1981), azonban az ilyen irányú keresztezésből származó növények 100%-ban hímsteril virágokat hoztak. Feltételezhetően egy citoplazmáson öröklődő faktor miatt mind az F1, mind a BC populációk a piztilloidia fenotípusát mutatták, azaz a portokjaik helyett is termőre emlékeztető képletek fejlődtek (Islam és mtsai. 1981; Mujeeb-Kazi és Rodriguez 1984). Ezzel szemben, ha a búza volt az anyai partner, a kis gyakoriság ellenére sikerült fertilis utódokat nyerni mind az F1, mind a BC populációban, amelyeket öntermékenyítve addíciós vonalak formájában fixáltak az árpa genom egyes kromoszómáit (Islam és mtsai. 1981). A kezdeti sikerek hatására intenzív kutatások kezdődtek a világ számos pontján a búza × árpa kevert genetikai anyagot tartalmazó vonalak létrehozására. Ennek eredményeként jött létre többek között a hasznos agronómiai tulajdonságú szülőktől származó Mv9Kr1 × 'Igrí' teljes addíciós sorozat (Szakács és Molnár-

Láng 2007), azonban a tritikáléval analóg búza-árpa teljes amfiploidot nem sikerült létrehozni. A termékenyített virágok hormonkezelésével az embrió kihozatal jelentősen növelhető. Koba és munkatársa a búza  $\times$  kukorica keresztezésekben már bevált 2,4-D kezelés alkalmazásával 8,3%-os embrió kihozatalt ért el, amelyekből embriókultúra alkalmazásával nagy arányban tudtak növényeket regenerálni (Koba és Shimada 1992). Az így létrehozott növények többsége tartalmazta az árpa genomjának egy részét, azonban a kromoszómák eloszlására nézve nagyfokú mozaikosságot mutattak (Koba és Shimada 1992). Emellett sikerrel hoztak létre háromvonalas (trigenerikus) hibrideket is *H. vulgare*  $\times$  *T. aestivum*  $\times$  *S. cereale* kombinációjából *H. vulgare*  $\times$  *T. aestivum*  $\times$  *S. montanum* kombinációjából, valamint *H. vulgare*  $\times$  *Triticale* kombinációjából (Bajaj 1990). Ezek a kombinációk a több különböző eredetű genom interakciójának következtében minden esetben nagyfokú kromoszóma instabilitást mutattak (Bajaj 1990).

A két faj majdnem teljes inkompatibilitásának okaival csak kevés tanulmány foglalkozott, és ezek a mai napig sem tisztáztak teljes mértékben. A szakirodalmi adatok ellentmondásosak azzal kapcsolatban, hogy mi a konkrét oka a szemfejlődés hiányának. Míg egyes szerzők a pollentömlő fejlődési rendellenességeit hozzák összefüggésbe az jelenséggel (Vishnyakova és Willemse 1994), addig mások nem találtak összefüggést az idegen fajú pollen bibén történő csírázási aktivitása, a pollentömlő növekedési sebessége, illetve az abnormális pollentömlők aránya és a magkötés között. Némely esetben az árpa pollenszemek a búza bibéken nagyobb számban és gyorsabban csíráztak, mint a búza saját pollenje, továbbá a pollentömlők megjelenésükben nem mutattak eltérést a saját pollen tömlőihez képest (Neeraj és Khanna 1992).

### 2.13 A keresztezhetőség genetikai faktorai a *Kr* gének

A búza-rozs keresztezéseknél derült fény arra, hogy a búza kromoszómáin vannak olyan lokuszok, amelyek jelentősen befolyásolják a rozssal való keresztezhetőségét (Riley és Chapman 1967; Lange és Wojciechowska 1976). A *Kr* lokuszok a búza 5-ös homeológ kromoszómáin találhatóak, és eltérő kihatással vannak a keresztezhetőségre. A legerősebb változat az 5B kromoszómán található *Kr1* lokusz, de az 5A és az 5D kromoszómán található *Kr2* és *Kr3* lokuszok is jelentős befolyással bírnak a búza rozssal való keresztezhetőségére (Krolow 1970). A *Kr* gének domináns allélja a pollentömlő növekedésének gátlásán keresztül akadályozza meg a termékenyülést, és így az intergenerikus hibrid létrejöttét (Lange és Wojciechowska 1976). A *Kr* gének keresztezhetőségre gyakorolt hatásának részletes vizsgálata során arra is fény derült, hogy ezek a lokuszok a búzának más fajokkal való keresztezhetőségét is jelentősen befolyásolják. Azok a búza genotípusok, amelyek a rozssal jól keresztezhetőek, más fajokkal is könnyen kombinálódnak (Thomas és mtsai. 1980; Koba és Shimada 1992).

## 2.14 A búza (*T. aestivum*) × árpa (*H. vulgare*) keresztezések elméleti problémája

Az eddig leírtak alapján vetődik fel a szempontunkból lényeges kérdés: melyik fázisban mi és hogyan romolhat el, ami megakadályozza a sikeres idegen fajú hibrid keresztezést? Ezen a ponton érdemes különbséget tenni a progámikus és posztgámikus (azaz az ivarsejtek összeolvadását megelőző, ill. az azt követő) szakaszok között. A fajon belüli megtermékenyülés sikerét szabályozó heteromorf és homomorf (sporofitikus/gametofitikus) kereszt-összeférhetetlenség többnyire már a progámikus szakasz elején hatékonyan meggátolja a más fajtájú pollen csírázását és/vagy tömlőhajtását, esélyt sem adva a megtermékenyülésnek. Alapesetben a pollen alig vagy egyáltalán ki sem csírázik, de előfordul olyan forgatókönyv is, hogy a pollentömlő annyira lassan hajt, hogy vagy el sem ér a magkezdeményhez, vagy ha mégis, addigra már nincs lehetősége a termékenyítésre.

Sokkal összetettebb a helyzet a fajok (sőt, nemzetségek) közti, távoli keresztezések esetében, ahol a posztgámikus inkompatibilitás játszik meghatározó szerepet, amelynek különböző (akár kombinált) módozatai lehetnek: (i) a termékenyülés illetve a petesejt aktiváció elmaradása (ld. 2.2 fejezet), (ii) a fúziós termékek abnormális fejlődése a távoli genomok kölcsönhatásainak következtében, az embrió spontán abortiója (ld. 2.5 fejezet), (iii) az embrió közvetett abortiója az endospermium hiánya miatt (ld. 2.5 fejezet).

A korábbi fejezetekben részletesen ismertetett tényezők tükrében okkal feltételezhetjük tehát, hogy az általunk kiválasztott, a sikeres hibridizáció szempontjából távoli rokonnak számító fajok (ld. 2.11.1 fejezet) keresztezése során mind progámikus, mind posztgámikus okok felmerülhetnek mint az inkompatibilitás forrásai.

A *Poaceae* család más nemzetségeibe tartozó fajok keresztezése során megállapítást nyert, hogy a pollencsírázás illetve a tömlőhajtás még a fajon belül is jelentős genotípus függőséget mutat (ld. 2.13 fejezet). Különösen igaz lehet ez a keresztezhetőség határmezsgyéjén található búza × árpa kombináció esetében. A búza és az árpa reciprok keresztezések eltérő eredménye (ld. 2.12 fejezet) alapján szintén felmerülhet a szülők jelentősen eltérő ploidszintjének következtében fellépő anyai/apai aránytalanság mint az inkompatibilitás további forrása (ld. 2.4 fejezet). Ezt a feltételezést még inkább erősíti az a tény, hogy a termékenyült szemtermések kisszámú embrió mellett sosem tartalmaztak endospermiumot. A preparált embriók in vitro kultúrában sikerrel felnevelhetőek jelezve hogy az inkompatibilitás főként az endospermiumot érinti (ld. 2.12 fejezet).

Ezen tények tükrében egyértelmű, hogy a választott fajok keresztezhetőségének problémáit nem lehetséges egyetlen közvetlen okkal megmagyarázni, az inkompatibilitás kérdéseinek megválaszolására csak az összetett folyamat egymásra épülő kulcseseményeinek külön-külön részletes vizsgálata ad lehetőséget.

## 2.15 Célkitűzések

A 2. fejezetben áttekintett irodalmi adatok és összefüggések alapján, a dolgozatban később részletesen ismertetett kísérleteket az alábbi célok kitűzése mellett terveztük meg.

1. A progámikus szakasz kitüntetett eseményeinek (pollen megtapadása, csírázása és tömlőhajtása a csírákapuig; a hímvarsejtek kibocsátása, transzportja és a nőivari gaméták megtermékenyítése) fény-, fluoreszcencia és konfokális mikroszkópos vizsgálata in situ fixált mintákon és beágyazott szövettani metszeteken, különös tekintettel az árpa pollen – búza termő kölcsönhatásra.
2. A búza embriózsákjában, ezen belül a petekészülékben a megtermékenyítést követő (posztgámikus) változások nyomon követése: az ön- és idegen termékenyített ovulumokban lezajló folyamatok összehasonlítása fény- és konfokális mikroszkópos módszerekkel.
3. A búza × árpa keresztezések embrió és növénykihozatalának maximalizálása, a legjobban kereszteződő genotípusok, kombinációk, valamint támogató kezelések kiválasztásával.
4. A hibrid embriók kimentésének és felnevelésének hatékonyabbá tétele, valamint az in planta fejlődő hibrid embriók citológiai és szövettani vizsgálata, azok vad típusú társaival történő részletes összehasonlítása és az esetleges különbségek feltárása.
5. A búza × árpa F1 hibrid nemzedék genomösszetételének elemzése, különös tekintettel a kromoszóma kiesés, illetve bennmaradás folyamatának mélyebb részletekben történő megismerésére, valamint az idegen kromoszóma/szegmentum beépüléséhez vezető folyamatok sejtbiológiai vizsgálata.
6. Új, az árpával jól kereszteződő dihaploid búza vonalak szelekciója és jellemzése.
7. Annak megválaszolása, hogy kémiai kezeléssel lehetséges-e a távoli hibridek embrió és endospermium fejlődésére jellemző abortív defektusok enyhítése, illetve kiküszöbölése?



### 3. Anyag és módszer

#### 3.1 Növényanyag

A vizsgálatok tárgyát képező nemzetség hibridek előállításához anyai szülőként három tavaszi búza fajtát (*Triticum aestivum* L.;  $2n = 6x = 42$ , AABBDD genomképlet) használtunk. A nemzetközi referenciának számító ‘Chinese Spring’ (Sears és Miller 1985) mellett egy másik kínai fajta, a ‘Szecsuan’ (intézeti génbanki száma MVGB 1720) szerepelt. A harmadik búza genotípus, a CS  $Ph^1$  a ‘Chinese Spring’ származéka volt, ami az *Aegilops speltoides* (Tausch)  $Ph^1$  génjét hordozza, ezzel gátolva a homeológ kromoszómák párosodását szabályozó  $Ph1$  gént (Chen és mtsai. 1994; Dr. B. Friebe, Kansas State University, szívességéből). A hatsoros tavaszi sörárpa (*Hordeum vulgare* L.;  $2n = 2x = 14$ , HH genomképlet) fajta ‘Morex’ (Rasmusson és Wilcoxson 1979) volt az elsődleges apai partner, másodsorban pedig a ‘Golden Promise’ kétsoros tavaszi sörárpat alkalmaztuk, amit gamma besugárzás után szelektáltak a ‘Maythorpe’ fajtából (Sigurbjörnsson és Micke 1969). Belső kontrollként, a hibridek igazolásához, néhány keresztezést végeztünk haploid indukáló *Hordeum bulbosum* ( $2n = 2x = 14$ , HH genomképlet). A keresztezhetőség pozitív kontrolljaként pedig három őszi rozs fajtával is poroztunk: ‘Imperial’, ‘Mercator’ (mindkettő *Secale cereale* L.) és az évelő ‘Kriszta’ (*S. cereale* × *S. montanum* vagy *S. cereanum*).

A téli keresztezésekhez a növényeket 2 hetes (tavaszi fajták) és 6 hetes (őszi fajták) 2°C-on történt jarovizáció után 1,2 liter ürtartalmú műanyag cserepekbe ültetve, fitotroni kamrában (Conviron, Winnipeg, Kanada) Tavasz1 programon (Tischner és Kőszegi 1997) vagy üvegházban (Global Glasshouse Kft., Szentes) neveltük fel.

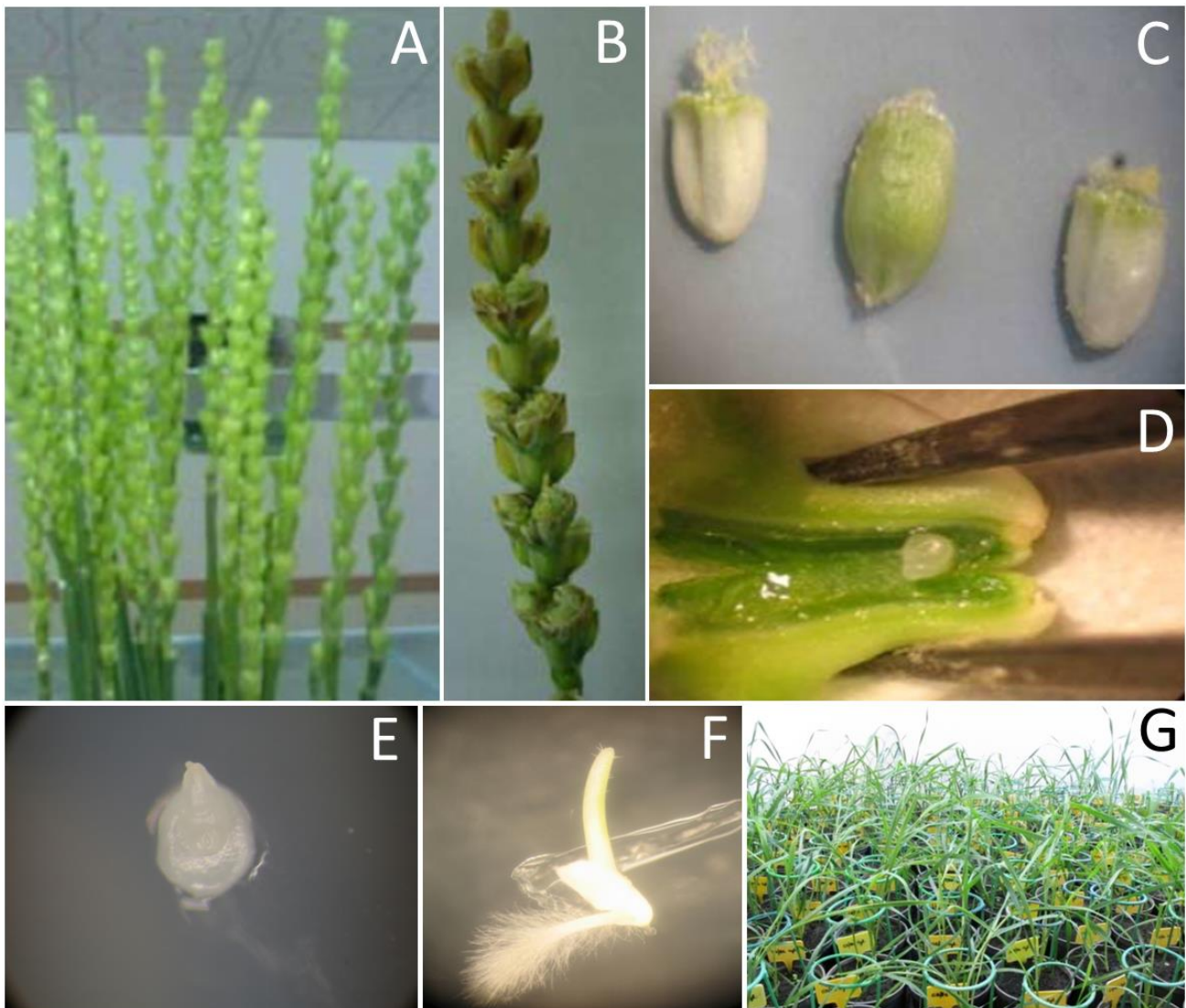
A tavaszi kísérletek növényanyagát jarovizáció után szabadterén, 1,2 liter ürtartalmú cserepekben blokkokra osztva neveltük fel. A virágzási idő szinkronizálásához az adott genotípusok fejlődésének megfelelően eltolt vetési idősorokat alkalmaztunk.

#### 3.2 Nemzetség hibridek előállítása

##### 3.2.1 Keresztezés

Az irányított megporzáshoz az anyanövények kalászkáit az antézis előtt 2-3 nappal visszavágtuk, majd a kalászkák belső virágait, valamint a megmaradt két virágból az összes portokot eltávolítottuk (**8. ábra/A**). A kasztrált kalászokat celofán zacskóval izoláltuk, kizárva ezzel az ismeretlen pollennel történő megtermékenyítést. A megporzás a virágzás napján kézből

pörgetéssel történt, ezután a celofán zacskókat visszazártuk. Egy nappal a megporzást követően a kalászkok alatti első internódiumba 1 mL 100 mg/L 2,4-D (2,4-diklórfenoxi-ecetsav, Sigma-Aldrich) vizes oldatot injektáltunk.



**8. ábra. Búza-árpa hibridek előállítási folyamat.**

A: porzásra előkészített, kasztrált kalászkok, B, C: megnyúlt szemkezdemények (ál-szemkezdemények) 14-16 nappal a megporzás után, D, E: hibrid embrió a szemkezdeményben, ill. táptalajra helyezve, F: táptalajon csírázó embrió, G: hibrid növények a nevelő kamrában

### 3.2.2 Demetilációs kezelés

Az ivarspecifikusan epigenetikailag inaktivált gének (ld. 2.8.2 fejezet) reaktiválásához a növényeket az újonnan képződő DNS szálakra a metilációs mintázat átíródását megakadályozó, kémiaiailag módosított nukleozid analóggal („demetiláló ágens”<sup>1</sup>) kezeltük. A demetiláló ágens különböző időpontokban a 2,4-D injektálással azonos módon juttattuk be a kalász alatti

<sup>1</sup>Az ágens megnevezését és az alkalmazott koncentrációt a bírálók titoktartási kötelezettség mellett megkapták.



internódiumba. A kezeléseket három időpontban 20-20 kalászos ismétlésben végeztük el. A kezelt kalászokat 1 nappal a megporzást követően 1 mL 100 mg/L 2,4-D oldattal minden esetben injektáltuk. Tíz-tíz megporzott virágzatból 14 nappal a megtermékenyítést követően kiszedtük a szemkezdeményeket, és felszíni sterilizálás után kimentettük a fejlődő hibrid embriókat (ld. 3.2.3 fejezet). Az embriók száma és fejlettsége alapján meghatároztuk a kezelések hatásában kimutatható eltéréseket, illetve a leghatékonyabb koncentrációt. A kezeléseket a korábban legnagyobb számban hibrid utódokat adó ‘Szecsuán’ × ‘Morex’ kombináción vizsgáltuk, a kontroll csoportot ugyanennek a kombinációnak az 1 mL 100 mg/L 2,4-D-vel injektált kalászaiban fejlődő szemkezdemények képezték.

### **3.2.2.1 A megfelelő fejlettségi állapot meghatározása**

Hogy meghatározzuk, melyik fejlettségi állapotban a legcélszerűbb gátolni a metilációs mintázat átíródását, a növényeket három csoportra osztottuk. Húsz kalászt injektáltunk demetilációs ágenssel a meiózis állapotában, 20 kalászt pedig a megtermékenyülés utáni első osztódás S fázisa előtt, azaz 8 órával a megporzást követően. A kezelt kalászokat 20 db kezeletlen, kontroll kalászhoz hasonlítottuk. Egy nappal a megporzást követően mindhárom csoport kalászait injektáltuk 1 mL 100 mg/L 2,4-D oldattal, majd a szemkezdeményeket 5-5 teljes kalászból 3 és 6 nappal a megporzást követően szövettani vizsgálat céljából fixáltuk és műgyantába ágyasztuk. Továbbá kezelésként 10-10 kalászból 14 napos korban sterilizálást követően kimentettük a fejlődő embriókat (ld. 3.2.3 fejezet).

### **3.2.2.2 Ivar szerinti demetiláció**

Annak eldöntésére, hogy a metilációs gátlás korlátozódik-e valamelyik ivarra, az anyai és apai növényeket külön-külön demetilációs kezelésnek vetettük alá. A korábbiakhoz hasonlóan a ‘Szecsuán’ × ‘Morex’ párosítást használtuk, és a kezelést hasban lévő kalászokon, meiózis állapotban végeztük. Mind az anyai, mind az apai oldalról 20-20 kalászt kezeltünk. A kezelt anyai kalászokat kezeletlen árpa kalászokból származó virágporral termékenyítettük meg, míg a kezelt árpa kalászokkal kezeletlen anyaiakat poroztunk meg. Megporzás után 1 nappal 1 mL 100 mg/L 2,4-D oldat injektálásával indukáltuk az ál- szemkezdemények fejlődését. A különbségek megállapításához 5-5 kalászból 3 nappal, és újabb 5-5 kalászból 6 nappal a megporzást követően kigyűjtöttük a szemkezdeményeket, amelyeket fixáltunk, majd műgyantába ágyasztuk be további vizsgálatok céljából. A maradék 10-10 kalászból 14 napos korban sterilizálást követően

kipreparáltuk az embriókat (ld. 3.2.3 fejezet). Eredményeinket 1 nappal a megporzást követően 1 mL 100 mg/L 2,4-D-vel injektált kontroll kalászkok szemkezdeményeivel vetettük össze. További kontrollként kezelt vagy kezeletlen búza pollennel öntermékenyített búzkalászkokat is alkalmaztunk.

### 3.2.3 Embriómentés

A megporzott kalászkokból 14-21 nappal a termékenyítést követően összegyűjtöttük a megnyúlt szemkezdeményeket (**8. ábra/B,C**), amelyeket 3 percen keresztül 70% etilalkoholban, majd 20 percen át 2% NaOCl (hipó) oldatban sterilizáltunk. Az így fertőtlenített szemkezdeményeket steril milliQ vízzel történt mosás után hosszanti irányban bonctűvel felhasítottuk, majd tartalmukat megvizsgáltuk (**8. ábra/D**). A preparálás során talált embriókat B5 (Gamborg és mtsai. 1968) vagy N6D (Chu és mtsai. 1975) táptalajra (Mellékletek 8.2 fejezet) helyezve csíráztattuk (**8. ábra/E,F**), és a meggyökeresedett növényeket felnevelés céljából tápkockába, majd 1,2 liter ürtartalmú cserepekbe ültettük (**8. ábra/G**).

A fejletlen embriók felnevelésére a későbbi kísérletek során egy módosított módszert is alkalmaztunk. A preparált embriókat félkemény, 3,4 g/L agarózt tartalmazó N6D táptalajra helyeztük a csírázás kezdetéig. A genom megkettőzésének céljából a hajtások megjelenése után az embriókat az előző táptalajjal azonos összetételű 0,01% kolchicinnel kiegészített táptalajon 3 napig kezeltük. A túlélő sejtekből történő növényregeneráció céljából az embriók néhány napra kalluszosító RM1 táptalajra (Murashige és Skoog 1962) kerültek (Mellékletek 8.2 fejezet). A növekedésnek induló struktúrákat újra N6D táptalajon regeneráltuk, majd a hajtások és gyökerek megjelenése után üvegházban, cserépben neveltük fel őket.

### 3.2.4 Genomduplikáció

A kromoszóma készlet megduplázásához, a meggyökeresedett növényeket 5-6 leveles állapotban kimostuk a talajból, majd gyökérzetüket és hajtásaikat ollóval 5-5 cm-re visszavágtuk. Az így előkészített növényeket éjszakára 0,04% kolchicin + 5% dimetil-szulfoxid (DMSO) oldatban áztattuk, ügyelve arra, hogy a bokrosodási csomó a folyadék szintje alá kerüljön. A kezelés után a növényeket 1 órán keresztül folyó víz alatt átmostuk, majd újra cserepekbe ültettük. A túlélő növényeket kihajtás után klímakamrában neveltük fel.

### 3.2.5 Szövettenyésztés

Eredménytelen genomduplikáció esetén a hasznos genotípusok megmentésére *in vitro* tenyésztést (szomatikus embriogenezis + organogenezis) alkalmaztunk. A növények kalászeit éretlen (2-3 cm?) állapotban kiperaráltuk, a fenti módon sterilizáltuk (ld. 3.2.3 fejezet), majd a virágzatot feldaraboltuk, és 2 mg/L 2,4-D-t tartalmazó RM1 táptalajra helyeztük. A kalluszosodó képleteket 2 hét után friss, 1 mg/L 2,4-D-t tartalmazó RM1 táptalajra helyeztük át, majd újabb 2 hét elteltével megismételtük az átrakást 0,5 mg/L 2,4-D-t tartalmazó RM1 táptalajra. Az így előállított kalluszokat N6D táptalajon regeneráltattuk, majd a kapott növénykéket ismételtén kolchicin kezelésnek vetettük alá a korábban leírtaknak (ld. 3.2.4 fejezet) megfelelően.

## 3.3 Mikromorfológiai vizsgálatok a megporzást követően

### 3.3.1 Trypan kék festés

A bibe felszínén megtapadt élő és elpusztult pollenszemek láthatóvá tételéhez (Keogh és mtsai. 1980) módszerét alkalmaztuk. A megporzott termőket 0, 15, 30 és 60 perccel a megporzást követően Clarke oldatban (jégecet:etanol, 1:3) fixáltuk (Clarke 1851). A fixált termőket 75°C vízfürdőben 5 percen keresztül 0,1 mg/mL trypan kék (Sigma-Aldrich) festékkel festettük, amelyet etanol és laktofenol 1:1 arányú elegyében oldottunk fel. A nem kötődött festék eltávolításához a termőket 2,5 mg/mL klorál hidrát (Reanal) oldatban szobahőmérsékleten éjszakán át derítettük. Ezt követően a termőkről a bibéket éles pengével levágtuk, majd a termőket tárgylemezen vízcseppbe helyezve fedőlemezzel lefedtük, és fénymikroszkóppal (Olympus BX51, Tokyo, Japán) vizsgáltuk.

### 3.3.2 Anilin kék festés

A saját és idegen pollenszemek funkcióképességének megállapításához a megporzott termőket 10, 30 és 60 perccel a megporzást követően egy éjszakán át Clarke oldatban (ld. 3.3.1 fejezet) fixáltuk, majd Na-foszfát pufferben (0,07 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 9) történt háromszori mosás után anilin kék oldatban (0,1% a fenti pH 9-es foszfát pufferben) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten festettük. A megfestett termőkről a bibéket éles szikével levágtuk, majd egy foszfát puffer cseppben fluoreszcencia mikroszkóppal (Olympus BX51) megfigyeltük.

### 3.3.3 Szöveti módszerek (fixálás, beágyazás és metszetkészítés)

Az idegen pollennel történt termékenyítésből származó embriók és egyéb szövetek fejlődésének vizsgálatához a megporzott virágokból antézis állapotban, továbbá 3 és 6 nappal a megporzást követően termőket fixáltunk, 4% (w/v) paraformaldehid és 2,5% (v/v) glutáraldehid tartalmú Na-foszfát pufferben (pH 7,2). A fixált termőket Na-foszfát pufferben mostuk 3x fél órán át, majd ezt követően növekvő koncentrációjú alkoholsorban (25–50–60–70–80–96–100%) víztelenítettük. A víztelenített mintákat növekvő koncentrációjú (1:3, 1:1, 3:1) Unicryl műgyanta (BBI Solutions, Cardiff, Nagy-Britannia) etanolos (100%) oldatával, majd kétszer 100% Unicryl műgyantával itattuk át. Végül az átítatott termőket Beam kapszulákba helyezve, 200 µL 100% Unicrylben 3 napon keresztül -20°C-on UV megvilágítás mellett polimerizáltattuk.

A mintákból a teljes megszilárdulás után Ultracut E ultramikrotóm (Reichert-Jung, jelenleg Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) segítségével a termők hasi barázdájával párhuzamos, mediális síkban félvékony (1 µm) metszeteket készítettünk. A szénhidrátokat 1% perjódsvavas Schiff (PAS) festéssel, a fehérjéket 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 festéssel jelöltük. A megfestett metszeteket Depex fedőanyaggal (EMS, Fort Washington, USA) fedtük le. A metszetek vizsgálata a BX51 fénymikroszkóppal (Olympus) történt.

### 3.3.4 Konfokális mikroszkópia

#### 3.3.4.1 In situ pollentömlő vizsgálat

A pollentömlőknek az anyanövény szövein belüli nyomon követéséhez antézis korú búzagalaszokat poroztunk búza, illetve árpa pollennel, majd 60 perc elteltével a kalászokból kigyűjtött termőket Clarke oldatban (ld. 3.3.1 fejezet) fixáltuk. A hisztokémiai festés előkészítéséhez az éjszakán át történt fixálást követően a termőket csökkenő koncentrációjú (50–30–10%) alkoholsor óránkénti cseréjével hidratáltuk, amit kétszeri pH 9-es foszfát pufferben történt mosás követett.

A pollentömlők láthatóvá tételéhez az így előkészített termőket anilin kék oldatban (0,1% a pH 9-es foszfát pufferben) éjszakán át történt inkubálással festettük, majd a nem kötődött festéket pH 9-es foszfát pufferben történt kétszeri mosással eltávolítottuk. A mosást követően a mintákat növekvő koncentrációjú (10–30–50–70–85–96–100%) alkoholsorban víztelenítettük, végül BABB oldatban (benzil-alkohol és benzil-benzoát 1:2 arányú elegye) történt 2 órás derítéssel tettük őket áttetszővé Sandaklie-Nikolova és mtsai. (2007 leírása alapján (eredetileg Dent és mtsai. 1989)).

A derített termőket sztereomikroszkóp alatt éles pengével, a hasi barázdával párhuzamosan a mediális síkban hosszába kettévágtuk ügyelve arra, hogy a vágás síkja a mikropiléhez a lehető legközelebb essen, és a vágás egyetlen határozott mozdulattal történjen, elejét véve a szövetek roncsolódásának. A mikropilét tartalmazó termő-felet fedőlemezre cseppentett 20  $\mu$ L BABB cseppbe helyeztük, gondosan ügyelve arra, hogy a metszési felület a fedőlemez felé nézzen. Az így előkészített termő-felekre 1 mm vastagságú szilikon távtartó alkalmazása mellett tárgylemezt tettünk, majd a mintákat TCS SP8 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk. Az anilin kék festéket HeNe lézerrel 405 nm-en történt gerjesztést követően 460-535 nm tartományban detektáltuk. A Z (optikai tengely) mentén képzett szeletsorozatok, valamint a térbeli rekonstrukciók a LAS (Leica Application Suite) programcsomag Advanced Fluorescence moduljával készültek.

### 3.3.4.2 In situ embriófejlődés vizsgálat

A pollentömlő csírapapun való behatolását követő események észleléséhez búza kalászokat poroztunk saját vagy árpa pollennel. A megporzás után 24 és 72 órával a termőket kipreparáltuk, majd a bibeszálak felé eső oldalon ejtett bemetszés után a termőket két preparáló tű segítségével ellentétes irányba húzva kettéhasítottuk. A bemetszésnél mindig ügyeltünk arra, hogy a roncsolás ne terjedjen néhány sejtrétegnél mélyebbre, és az integumentum csak az ellentétes irányú húzás következtében szakadjon el folyamatosan az alapi kalazától a csírapapu (mikropile) irányába. Ezzel vettük elejét a petekészülék megsérülésének, valamint annak, hogy az embriózsák sejtjei elmozdulhassanak. A termő-fél két szélének lenyomása után kiemeltük a szabaddá vált magkezdeményeket a helyükről, és Clarke oldatban (ld. 3.3.1 fejezet) fixáltuk, amit 1 nap után 70%-os alkoholra cseréltünk, majd az ecetsav teljes eltávolításához a cserét 30-30 percre még kétszer megismételtük.

A sejtmagok jelöléséhez a mintákat először óránként csökkenő koncentrációjú (50–30–10%) alkoholsorba helyeztük át, amit kétszeri pH 9-es foszfátpufferben történt mosás követett. A kimosott mintákat fél órán át festettük 50  $\mu$ M SYTO 63 (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) DNS festékkel, majd növekvő koncentrációjú (10–30–50–70–85–96–100%) alkoholsorban víztelenítettük, végül 1 órán át BABB derítő oldatban (benzil-alkohol és benzilbenzoát 1:2 arányú elegye) tettük áttetszővé Sandaklie-Nikolova és mtsai. (2007) leírása alapján (eredetileg Dent és mtsai. 1989).

A derített termőket mélyített tárgylemezen 20  $\mu$ L BABB cseppben 1 mm szilikon távtartó alkalmazása mellett TCS SP8 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (Leica Microsystems) vizsgáltuk. A SYTO fluorokróom specifikus emisszióját HeNe lézerrel 633 nm-en történt

gerjesztést követően 650-750 nm tartományban detektáltuk. A Z (optikai tengely) mentén képzett szeletsorozatok, valamint a térbeli rekonstrukciók a LAS programcsomag Advanced Fluorescence moduljával (Leica Microsystems) készültek.

### **3.4 A hibrid utódnemzedék vizsgálata**

#### **3.4.1 Áramlási citometria**

A sejtmagok izolálásához az 5-7 napos leveleket jégen, 800  $\mu\text{L}$  LB01 pufferben (15 mM Tris, 2 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 0,5 mM spermidin, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 15 mM  $\beta$ -merkaptotanol és 0,1% Triton X-100, pH 7,5) éles pengével bevagdostuk, és az így kapott, sejtmagokban gazdag szuszpenziót 40  $\mu\text{m}$  pórusátmérőjű Cell strainer szűrővel ellátott Falcon™ csövekbe (BD Biosciences, San Jose, USA) szűrtük. Az izolátumot 12,5  $\mu\text{L}$  25  $\mu\text{g/mL}$  koncentrációjú propidium jodid (Sigma-Aldrich) hozzáadásával 3 percig festettük. A méréseket FACScan™ citométerrel (BD Biosciences, San Jose, USA) 488 nm argon lézer és 560 nm optikai szűrő alkalmazása mellett végeztük. A genom méret meghatározása 5000 sejtmag alapján a CellQuest™ (BD Biosciences) programmal történt. Standardként az adott keresztezési kombináció szülői genotípusait használtuk.

#### **3.4.2 Molekuláris markerezés**

##### **3.4.2.1 Összes DNS tisztítása**

A néhány leveles fiatal növények leveleiből 10 mg-ot 2 órán át  $-80^\circ\text{C}$ -on történt fagyasztás után TissueLyserrel (Qiagen NV, Hilden, Németország) 2x1,5 percen át 29 Hz frekvenciával homogenizáltunk. Ezután a szuszpenziót 100  $\mu\text{L}$  AquaGenomic™ oldat (MoBiTec GmbH, Göttingen, Németország) és 10  $\mu\text{L}$  izopropanol hozzáadása után vortex-szel kevertük, majd centrifugával a fugacsó aljába gyűjtöttük. Az így kapott keveréket 30 percen át  $75^\circ\text{C}$ -os vízfürdőben inkubáltuk, utána 12.000 g-vel 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót 80  $\mu\text{L}$  izopropanollal összekeverve újból lecentrifugáltuk, majd a csapadékot  $4^\circ\text{C}$ -os 70% etanollal kétszer átmostuk. A megszáritott csapadékot 100  $\mu\text{L}$  milliQ vízben feloldottuk, centrifugáltuk, és a felülúszót 1,5 mL-es centrifuga csövekbe átöntve  $-20^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

A fragment analizátorral történő elemzéshez (ld. 3.4.2.4 fejezet) egy speciális, a növényi homogenizátum templátként való direkt felhasználását lehetővé tevő gyors DNS előkészítést (Phire Plant Direct PCR kit, Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk. A fiatal növények

leveleiből éles pengével mintát vettünk, amit  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra történt lehűtés után TissueLyserrel (Qiagen) 2 percen át 29 Hz-en homogenizáltunk. A homogenizátumból a templátot  $200\ \mu\text{L}$ -es pipettahegynek a homogenizátumba történő belemártásával, majd ennek a kitben található leoldó pufferben ( $50\ \mu\text{L}$ ) történő leáztatásával állítottuk elő.

### 3.4.2.2 PCR reakció

Az utódnemzedék kromoszóma összetételének agaróz géles meghatározásához (ld. 3.4.2.3 fejezet) az apai genom kromoszómáira specifikus primereket terveztünk (**1.táblázat**). Ezekkel a primerekkel Veriti PCR készülékben (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) polimeráz láncreakciót hajtottunk végre, ami a  $20\ \mu\text{L}$  végtérfogatban az  $1\ \mu\text{L}$  DNS templát mellett tartalmazott  $2\ \mu\text{L}$   $10\times$  DreamTaq™ puffert (Fermentas, Thermo Fisher Scientific),  $2\ \mu\text{L}$   $2\ \text{mM}$  dNTP-t,  $0,5\ \mu\text{L}$ -t mindkét primerből ( $0,5\ \text{mM}$ ),  $0,25\ \mu\text{L}$  ( $1\ \text{U}$ ) DreamTaq™ DNS polimerázt, kiegészítve a fennmaradó  $13,75\ \mu\text{L}$  milliQ vízzel. A reakciót 5 perc  $98^{\circ}\text{C}$ -os denaturációval kezdtük, amit követett egy 40 ismétléses ciklus ( $98^{\circ}\text{C}$  5 mp, primertől függően  $X^{\circ}\text{C}^*$  10 mp és  $72^{\circ}\text{C}$ , 25 mp), végül pedig egy  $72^{\circ}\text{C}$  7 perc elongációs lépéssel zártuk. A reakció ellenőrzésére minden reakcióban használtunk negatív (anyai, búza DNS), pozitív (apai, árpa DNS) és templát nélküli kontrollt (NTC).

\*A tapadási (annealációs) hőmérsékletet ( $T_m$ ) mindig az adott primer olvadási hőmérsékletének megfelelően módosítottuk.

1. táblázat. Az árpa kromoszómák azonosításához használt primer párok

Kromoszóma	Gén/Lókuszt	Primer szekvencia (5'-3')	T <sub>m</sub>	Termék (bp)
1H	HvCENH3α <sup>a</sup>	F 5'-AGA AGA AGA TCG GGT CCG CTA-3'	66,4C	801
		R 5'-GTG CAA ACG GGA TGA GAA AAT T-3'	66,2C	
2H	HvM36 <sup>b</sup>	F 5'-TCC AGC CGA CAA TTT CTT G-3'	64,2C	114
		R 5'-AGT ACT CCG ACA CCA CGT CC-3'	64,5C	
3H	ABG377 <sup>a</sup>	F 5'-GCT GCT ATG AGG AGA GAA CC-3'	60,6C	507
		R 5'-TGG TAT GAA ACA GGT GAA TA-3'	55,4C	
4H	ABG498 <sup>a</sup>	F 5'-TTA CTG AAG AAA AAC CTG TC-3'	53,4C	509
		R 5'-CTG ACT ACT GGA TGG ACC AC-3'	59,6C	
5H	HvCsIF7 <sup>a</sup>	F 5'-CCC TGC TCT TGC TTG TCG TAG-3'	66,1C	121
		R 5'-TAG CCA AGC AAT TGC ATT T-3'	60,8C	
6H	HvCENH3β <sup>a</sup>	F 5'-ATG GCT CGC ACG AAG AAA ACG G-3'	73,1C	453
		R 5'-ATG GCG TCG GCT TGT TGC ACC C-3'	73,4C	
7H	ABC465 <sup>a</sup>	F 5'-CAC GAC AGA CGG ACC AAA TG-3'	66,6C	438
		R 5'-GCT ACT GGG ACA AAA TCT CC-3'	60,1C	
Teszt/UPP	Búza cDNS (TA30797)	F 5'-GCCGTGCCATGCCAGTG-3'	58,1C	195
		R 5'-TTAGCCTGAACCACAGTGC-3'	60,1C	

<sup>a</sup> STS szekvenciák: HvCENH3α és β, Sanei és mtsai. (2011); ABGx és ABC465, Kleinhofs és mtsai. (1993); HvCsIF7, Burton és mtsai. (2008); <sup>b</sup> (GA)<sub>13</sub> SSR szekvencia: Liu és mtsai. (1996); UPP: universal plant primers (univerzális növény-specifikus primerek, (Paolacci és mtsai. 2009), F: forward, R: reverse

A fragment analízatoros meghatározáshoz (ld. 3.4.2.4 fejezet) egy optimalizált Direct PCR reakciót (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk, amely lehetővé tette a növényi homogenizátum közvetlen templátként történő felhasználását. Az előállított templátból 0,6 µL-t használtunk fel a 20 µL végtérfogatú PCR reakcióhoz, ami ezen kívül 10 µL Phire\_Plant PCR Buffert (a dNTP-vel együtt), primereket (0,5 µM) és 0,4 µL Phire Hot Start II DNS polimerázt tartalmazott. A templátot a kitben pozitív kontrollként található növény-specifikus (plasztisz trnV-GAC és rrn16 génekre specifikus) primer párokkal ellenőriztük. Az apai genom azonosításához az árpa kromoszómák karjain lokalizált SSR és STS markereket használtuk (**2. táblázat**). A primerek működését minden reakcióban ellenőriztük, a vizsgált hibrid mintákkal párhuzamosan negatív (anyai), pozitív (apai) és templátmentes kontroll (NTC) alkalmazásával. A Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Németország) készülékben az SSR markerekre optimalizált program a következő volt: 5 perc kezdeti denaturáció 98°C-on, majd 6x [98°C 6 mp, 61°C-55°C (-1°C/ciklus) 15 mp, és 72°C 25 mp], ezt követően 34x (98°C 6 mp, 55°C 15 mp, és 72°C 25 mp), végül pedig 72°C 1 perc. Az STS markerekre optimalizált PCR 5 perc kezdeti denaturáció 98°C-on, majd 36x (98°C 6 mp, 64°C 15 mp, 72°C 25 mp), végül 72°C 1 perc programon történt.



2. táblázat. Az árpa kromoszómakarok azonosításához használt SSR és STS markerek

Kromoszóma	Kromoszóma kar	Lókusz	SSR motívum	Termék (bp)	Hivatkozás
1H	1HS	HvCslF9	NA (STS)	113	Burton és mtsai. (2008)
	1HL	HvHVA1	(ACC) <sub>5</sub>	142	Ramsay és mtsai. (2000)
2H	2HS	HvCslF4	NA (STS)	160	Burton és mtsai. (2008)
	2HL	Bmag0125	(AG) <sub>19</sub>	131	Ramsay és mtsai. (2000)
3H	3HS	HvLTPPB	(AC) <sub>10</sub> (AT) <sub>5</sub>	220, 233	Ramsay és mtsai. (2000)
	3HL	HvM60	(AG) <sub>11</sub> (GA) <sub>14</sub>	137, 144	Liu és mtsai. (1996)
4H	4HS	HvM40	(GA) <sub>8</sub> (GT) <sub>4</sub> (GA) <sub>7</sub>	148	Liu és mtsai. (1996)
	4HL	HvM67	(GA) <sub>11</sub>	142	Liu és mtsai. (1996)
5H	5HS	Bmac0163	(AC) <sub>8</sub> (GC) <sub>3</sub> (AC) <sub>17</sub>	151	Ramsay és mtsai. (2000)
	5HL	AF043094	(CTGT) <sub>5</sub>	156	Ramsay és mtsai. (2000)
6H	6HS	Bmac0316	(AC) <sub>19</sub>	190	Ramsay és mtsai. (2000)
	6HL	EBmac0806	(CA) <sub>4</sub> GA(CA) <sub>8</sub>	183	Ramsay és mtsai. (2000)
7H	7HS	HvM04	(AT) <sub>9</sub>	218, 233	Liu és mtsai. (1996)
	7HL	HvCslF6	NA (STS)	153	Burton és mtsai. (2008)

### 3.4.2.3 Agaróz gélelektroforézis

A reakciótermékből 10 µL-t 2% agaróz gélen (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Németország) futtatva, a reakciótermék hosszának megfelelő létra alkalmazása mellett etídium bromidos festés után határoztuk meg a keresett kromoszóma jelenlétét vagy hiányát. Az elválasztás eredményét G:Box géldokumentációs rendszerrel (Syngene, Cambridge, Nagy-Britannia) fotóztuk le.

### 3.4.2.4 Fragment analízis

A PCR termékeket kétszeres hígítás után a kapilláris elektroforézis elvén működő Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies, Inc., Ames, USA) berendezésben választottuk el.

### 3.4.3 Genomi (GISH) és fluoreszcens (FISH) in situ hibridizáció

A hibrid növények kariotipizálásához a meiózis állapotú portokokat kigyűjtöttük a virágokból, és Clarke oldatban (ld. 3.3.1 fejezet) fixáltuk. A fixált antérákból a fejlődő mikrospórákat 45%-os ecetsavban tárgylemezen kiperéseltük, majd fedőlemezzel lefedtük, és láng felett felforrósítottuk a preparátumokat. A fedőlemezeket folyékony nitrogénben történt fagyasztás után eltávolítottuk, a mintákat pedig növekvő koncentrációjú (70-90-100%) alkoholsorban víztelenítettük. A lemezeket ezután megszáritottuk, majd -20°C-on tároltuk. Az árpa összes DNS-ből nick translációval állítottuk elő a jelölt próbát digoxigenin-16-dUTP-vel (DIG-Nick Translation Mix,

Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). A GISH analízist – néhány apró módosítástól (Szakács és mtsai. 2013) eltekintve – Anamthawat-Jónsson és Reader (1995) módszere alapján hajtottuk végre. A hibridizáció során a búza genomiális szekvenciákat jelöletlen búza DNS-sel blokkoltuk, amit a próba harmincszoros koncentrációjában adtunk a reakcióhoz. A detektáláshoz százszorosra hígított rodamin-konjugált juh antidigoxigenin Fab fragmentumot (Roche), a kontrasztfestéshez és a fluoreszcens jel kifakulásának gátlására pedig 1 µg/mL 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) tartalmazó Vectashield fedő oldatot (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) alkalmaztunk. A hibridizált mintákat Axioskop-2 epifluoreszcencia mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) vizsgáltuk. A felvételek SPOT CCD kamerával (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, USA) és Image-Pro Plus 4.0 szoftverrel (Media Cybernetics, Inc., Rockville, USA) készültek.

A FISH vizsgálathoz a preparátumról az előzőleg kapott GISH hibridizációs jeleket 50%-os formamidban 42°C-on (2×5perc) eltávolítottuk, amit szintén 2×5 perces 4×SSC+Tween oldatban végzett lemosás követett. A preparátumonként 30 µL hibridizációs keverék 50% formamidot, 10% 20×SSC-t, 1% SDS-t, 50 ng/µL lazac sperma (blokkoló) DNS-t és 40 ng (GAA)<sub>7</sub> centroméra körüli heterokromatinra specifikus (Pedersen és mtsai. 1996) FISH próbát tartalmazott. A hibridizált minták mikroszkópos vizsgálata a GISH-nél fent leírt módon történt.

### 3.5 Statisztikai elemzés

Az embrióindukciós és növényregenerációs adatok normál eloszlásának ellenőrzése kvantil–kvantil grafikon (Q-Q plot) és a Shapiro-Wilk teszt alkalmazásával történt. Mivel a normalitás és a variancia homogenitásának (Levene teszt) kritériumai az adatok nemlineáris (négyzetgyökös, logaritmikus és arkusz szinusz) transzformációja után sem teljesült (pl. bimodális eloszlás esetén), ezért a szignifikancia vizsgálathoz a nemparametrikus Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztuk a szigorúbb Bonferroni-féle korrekcióval, és ezt post-hoc elemzésként a páronkénti Mann-Whitney U teszt követte (Corder és Forema 2009). A számításokat különböző, az MS Excelbe épülő segédprogramokkal végeztük, elsősorban a Real Statistics Resource Pack ([www.real-statistics.com](http://www.real-statistics.com)) révén, és az eredményeket független online kalkulátorokkal is megerősítettük (pl. [scistatcalc.blogspot.co.uk](http://scistatcalc.blogspot.co.uk)).

## 4. Eredmények és megvitatásuk

Kitűzött céljaink első pontjai alapján (ld. 2.15 fejezet) a legfőbb feladat a búza-árpa hibridelőállítás folyamatának szisztematikus jellemzése volt annak érdekében, hogy az esetleges akadályok vagy szűk keresztmetszeti pont(ok) beazonosítható(k) legyen(ek). Ezért a megtermékenyítéshez mint középponthoz viszonyítva két fő fázisra bontottuk a folyamatot: az azt megelőző progámikus (prefertilizációs) és az azt követő posztgámikus (posztfertilizációs) szakaszra.

Az első szakaszban (ld. 4.1 fejezet) többféleképpen vizsgáltuk az árpa pollen kompatibilitását a búza bibéjével és termőjével a megporzást követően, nevezetesen a pollen életképessége, csírázása és tömlőhajtása a csírákapuig, majd a petekészülékbe való belépése szempontjából.

A második szakaszban (ld. 4.2 fejezet) egyrészt a megtermékenyülés tényét, másrészt a korai embrió és endospermium fejlődés lefolyását kíséreltük meg rögzíteni és nyomon követni.

A továbbiakban már a hibridelőállítás folyamatát optimalizáltuk különböző kémiai – növekedésszabályozó és/vagy demetilációs – kezelésekkel (ld. 4.3-4.4 fejezetek), illetve molekuláris és citológiai módszerekkel elemeztük a kapott növények kromoszóma összetételét.

### 4.1 A progámikus (prefertilizációs) szakasz citológiája

#### 4.1.1 Pollen életképesség

A búza bibepapilláin megtapadt pollen (**9. ábra/A**) életképességének meghatározásához a saját vagy árpa pollennel egyaránt mesterségesen megporzott búza kalászköböl a termőket 15, 30, 45 és 60 perccel a porzás után fixáltuk, majd trypan késsel festettük. Ezután fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk a megtapadt pollenszemek vitalitásának változását (**9. ábra/B,C**). 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, majd az így kapott adatokat összesítettük. Az árpa pollen életképességét minden időpontban a saját, kontroll pollenéhez hasonlítottuk, és ennek függvényében értelmeztük (**10. ábra/A**).

Megállapítottuk, hogy a búza bibe felszínén megtapadt búza és árpa virágporszemek életképességében nem volt számottevő különbség. 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%

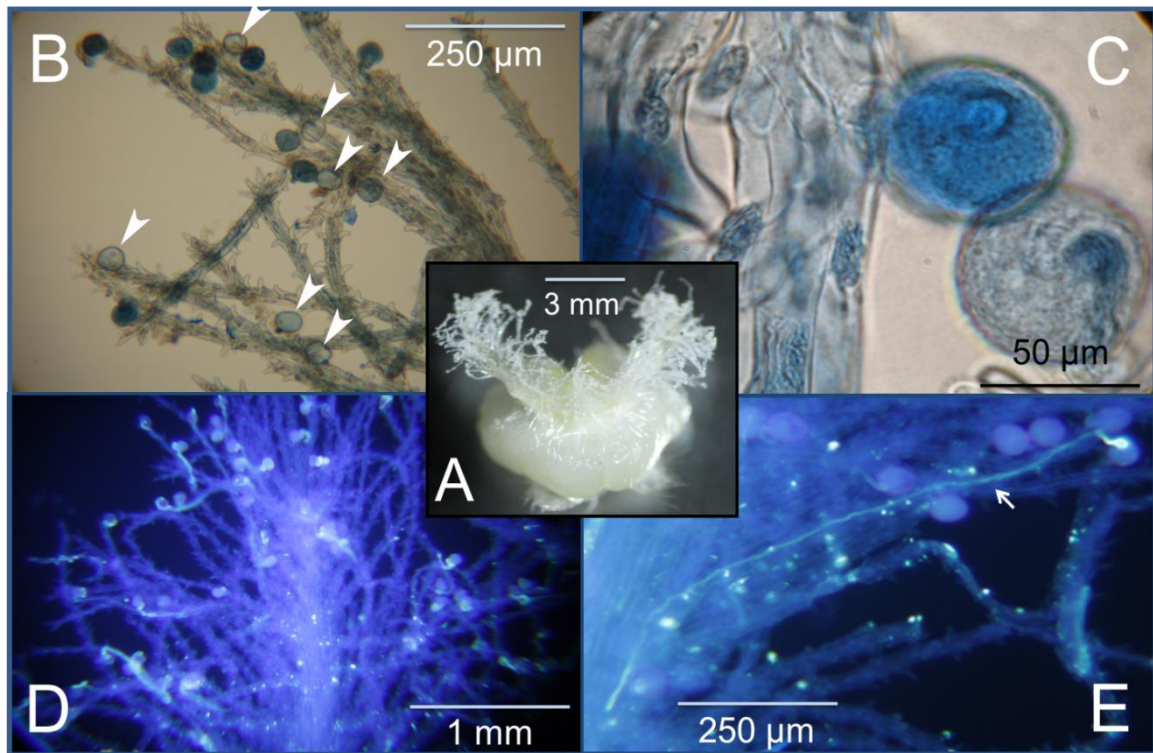
volt. Az ezt követő időpontokban – 30 és 45 perccel a megporzást követően – az árpa pollen szintén a búzáéval közel megegyező vitalitást mutatott: a búzánál 22,8%, illetve 32,4%, míg az árpa esetében 24,3%, illetve 35,3% volt az élő virágporszemek gyakorisága. A saját és az árpa pollen vitalitása között 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%) **(10. ábra/A)**.

Mivel szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a búza pollentömlő az embriózsákig megközelítőleg 30 perc alatt képes eljutni (Lange és Wojciechowska 1976), és az árpa pollentömlő növekedési sebessége ettől nem tér el jelentősen (Neeraj és Khanna 1992), ezért az első pollentömlők a 60 perces mintavétel idején feltételezhetően már beléptek a csírapapun, meggátolva ezzel újabb pollentömlők célba érését, ami a csírázásnak indult pollen gyors pusztulását idézte elő (Vishnyakova és Willemse 1994). Ez lehet a magyarázata annak, hogy 60 perccel a megporzást követően miért csökkent drasztikusan mindkét faj virágporszemeinek életképessége. Ennek megfelelően az 1 órával a megporzást követően is élő pollen feltehetően nagyon későn vagy egyáltalán nem csírázott ki, ezért a továbbiakban ezeket nem vizsgáltuk.

#### **4.1.2 Pollen csírákéesség**

##### **4.1.2.1 Pollen csírázása és tömlőhajtás vizsgálata fénymikroszkóppal**

A virágporszemekből előtörő pollentömlők (ld. 2.1 fejezet) vizsgálatához szintén termékenyített és fixált termőket festettünk anilin kékkel, majd fluoreszcencia gerjesztése mellett vizsgáltuk **(9. ábra/D,E)**. 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. A pollen csírázókéességét az adott időpontban a 10 termőn kicsírázott virágporszemek átlagos relatív gyakoriságából határoztuk meg. Az árpa pollen csírázókéességét mindig a saját, kontroll pollenéhez hasonlítottuk, és ennek függvényében értelmeztük **(10. ábra/B)**.

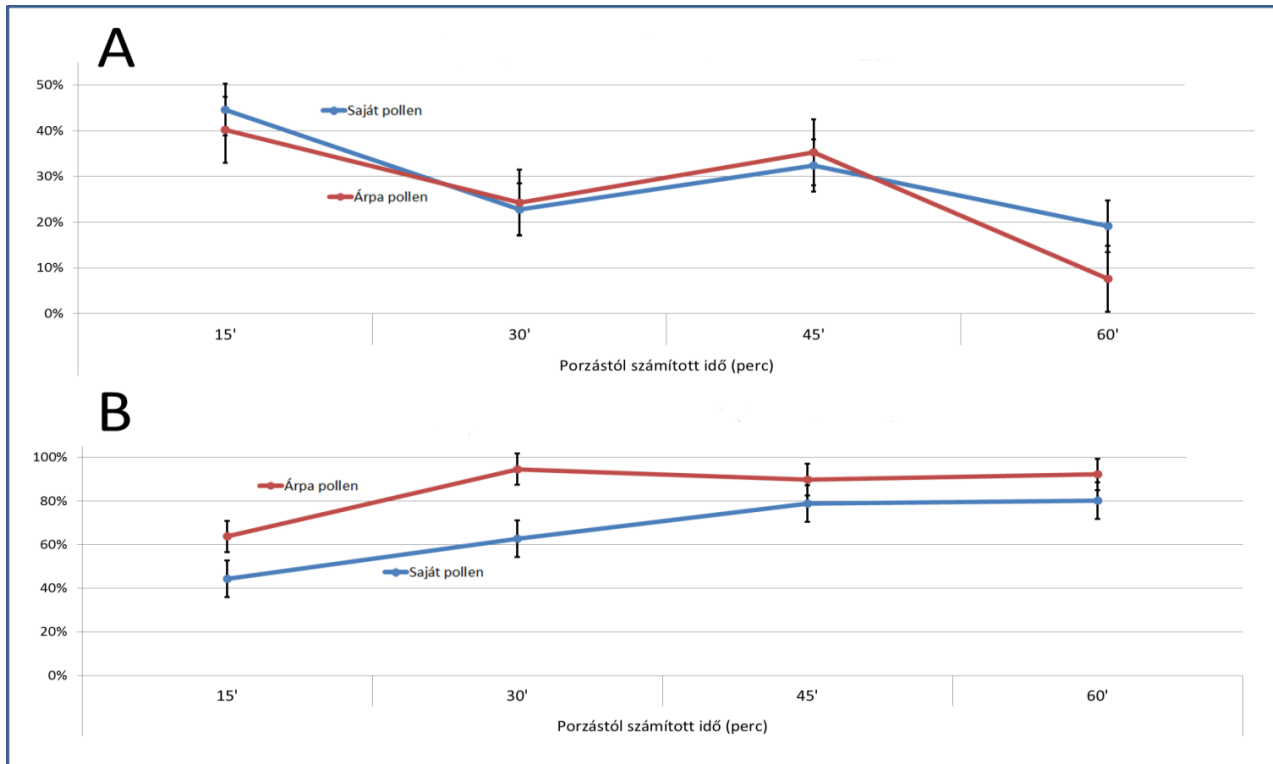


**9. ábra. Az árpa pollen életképessége és tömlőhajtása búza bibén.**

A: antézis állapotú búza termő; B: a bibe felszínén megtapadt, 30 perccel csírázó árpa pollen trypan kék festést követően. Az intakt plazmamembránú élő pollen (nyílal jelölve) nem vagy csupán kis mértékben mutat kék színeződést, az elhalt pollen kékre festődik; C: élő és elpusztult árpa virágporaszemek 30 perccel a megporzás után; D: anilin késsel festett árpa pollen tömlőhajtása búza bibe felszínén (30 perc). A kallózt tartalmazó pollentömlők erős fluoreszcens jelölődést mutatnak; E: árpa pollentömlő növekedése a búza bibe szöveteiben (60 perc).

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 összeférhetlenség. Az árpa virágporaszemek 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 virágporaszemek 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 virágporaszemek 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 virágporaszemek 91,9%-ánál volt látható pollentömlő. A búzánál ez az érték valamivel alacsonyabb volt: a pollen 81,7%-a kezdte meg a csírázást (**10. ábra/B**).

Mivel a kicsírázott virágporszemek gyakorisága 60 perc elteltével már egyik pollendonor esetében sem mutatott növekedést, valamint szakirodalmi adatokból is ismert, hogy körülbelül 1 órával a megporzást követően végbemegy a megtermékenyülés (Lange és Wojciechowska 1976), ezért a pollen csírázásának alakulását későbbi időpontokban nem vizsgáltuk.

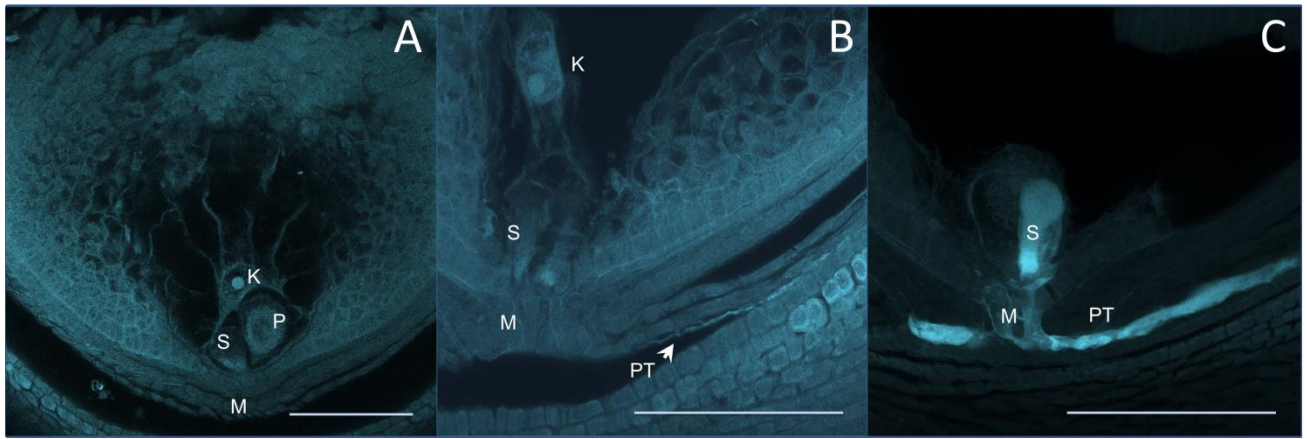


**10. ábra.** Saját (búza) és árpa pollen életképességének (A) és csíráképességének (B) a porzástól számított időbeli változásai búza bibén.

#### 4.1.2.2 Pollentömlők növekedésének vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A mélyen az anyai szövetekbe ágyazott csírapapunál (mikropile) és annak közvetlen közelében a saját (búza) és az idegen (árpa) pollen tömlők (ld. 2.1 fejezet) vizsgálatát anilin kék festést követően konfokális mikroszkóp segítségével végeztük (**11. ábra**). Megállapítottuk, hogy mind a búza, mind pedig az árpa pollen által hajtott tömlők képesek 1 óra alatt elérni a csírapaput, és némely jól látható esetben be is jutottak azon, elérve a szinergida sejtek filiform apparátusát (**11. ábra/C**). Mindkétféle porzásnál találtunk olyan pollentömlőket is, amelyek a csírapapun még nem léptek be ugyan 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 (**11. ábra/B**).





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

A: a női gametofiton sejtjeinek elhelyezkedése a búza termőjében, B: pollentömlő (nyíllal jelezve) a csírapapu közelében 60 perccel a megporzást követően, C: pollentömlő belépése a szinergidába a csírapapun keresztül  
 K: központi sejt, P: petesejt, S: szinergida, M: csírapapu (mikropile), PT: pollentömlő  
 a mérce az ábrákon egységesen 100 µm-t jelöl

Kvantitatív adatok gyűjtésére nem volt lehetőség, mert a legnagyobb elővigyázatosság ellenére is a minták jelentős része (>50%) megsérült a termők preparálása közben, vagy pedig a metszés síkja esett túlságosan távol a csírapaputól. Ez a probléma abból adódott, hogy a manuális metszést a minták kis mérete és nagyfokú rugalmassága miatt nem lehetett azonos módon elvégezni.

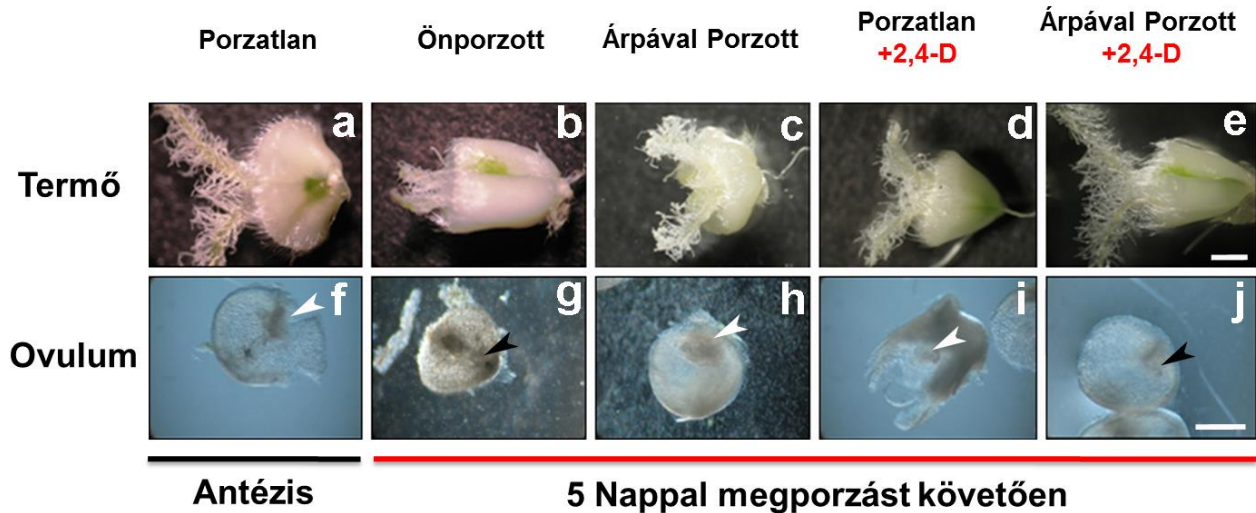
A megfigyelések eredményeként tehát vizuálisan azt a következtetést vonhattuk le, hogy a búza és az árpa pollenből induló tömlők morfológiájában és működésében nincs szemmel látható eltérés: mindkét faj pollenje egyaránt kicsírázik a búza bibén, és hasonló módon lehajt az ovulumba, majd – mint látni fogjuk (ld. 4.2 fejezet) – meg is termékenyíti a petekészüléket.

## 4.2 A posztgámikus (posztfertilizációs) szakasz citomorfológiája

### 4.2.1 A termők és ovulumok morfológiai és szövettani vizsgálata

A saját vagy árpa pollennel porzott búza termők (9. ábra/A) belsejében lezajló változások feltárásához a porzás után 5 nappal kigyűjtöttük a kalászból a termőket, majd sztereomikroszkóp alatt megvizsgáltuk (12. ábra/a,b,c,d,e). A morfológiai szemrevételezést követően a termőket félbevágtuk, majd kipreparáltuk a mikropiláris oldali, az embrió tartalmazó ovulum-felet (12. ábra/f,g,h,i,j), amelynek tartalmát izoozmotikus izoláló oldatban (400 mM mannitol, 200 mM glükóz, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH: 5,8) vizsgáltuk, és a porzatlan, antézis korú termőkhöz (12. ábra/a), ill. ovulumokhoz (12. ábra/f) hasonlítottuk. Megvizsgáltuk továbbá a

hibrid keresztezésekben a szakirodalmi adatok szerint az embriókötetést támogató 2,4-D kezelés hatását is (Koba és mtsai. 1991).



**12. ábra.** Saját (búza) vagy árpa pollennel termékenyített búza termők és ovulumok morfológiai összehasonlítása 5 nappal a megporzás után.

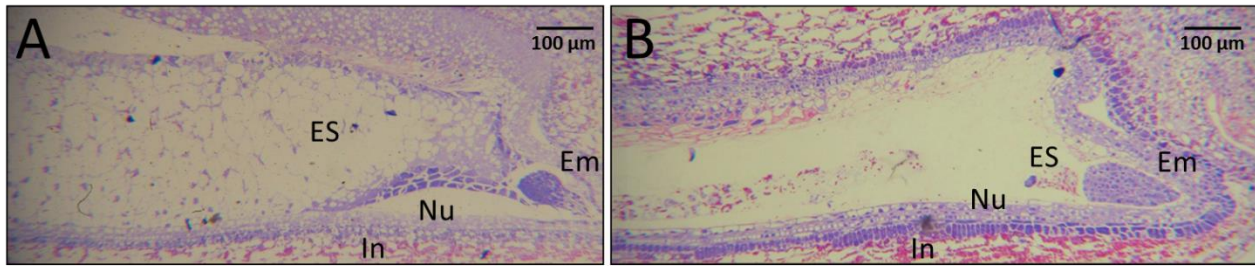
fehér nyílhegy: ellenlábás sejtek, fekete nyílhegy: embrió; a mérce az ábrákon egységesen 1 mm-t jelöl

Már a mintagyűjtés közben szembetűnő volt a kétféle pollennel porzott és 2,4-D-vel kezelt termők közti méretbeli különbség. A legnagyobb méretet az önporzott termők érték el, amelyek 5 nappal a megporzás után eredeti hosszuk háromszorosára nyúltak, és jellegzetes kerekded formát vettek fel (**12. ábra/b**). Megfigyelhető volt továbbá, hogy az önporzott termőkön a 2,4-D kezelés önmagában nem váltott ki szemmel látható hatást: ezek a termők méretükben és alakjukban is megegyeztek kezeletlen társaikkal (**12. ábra/b**). Az árpával porzott termők azonban a 2,4-D kezelés hatására jelentős változást mutattak. A kezeletlen termőkön egyáltalán nem látszottak a megnyúlás jelei, sőt, az antézis korú termők jellegzetes domború teteje (**12. ábra/a**) ellaposodott, vagy egyes esetekben homorúvá vált, színükben és állagukban pedig a dehidratálódás jelei mutatkoztak (**12. ábra/c**). Ezzel szemben a 2,4-D-vel kezelt termők méretükben és megjelenésükben sokkal inkább emlékeztettek önporzott, mint kezeletlen társaikra. Az egyetlen észrevehető eltérés az önporzott transzverzálisan kitélt, U betűre emlékeztető alakjához képest, hogy ezek a termők inkább hosszúkas, elnyújtott V betűre hasonlítottak (**12. ábra/e**). A nem porzott, de 2,4-D-vel kezelt termőknél minimális megnyúlás mutatkozott, méretükben és küllemükben – ahogy azt várni lehetett – leginkább az antézis korú termőkre hasonlítottak (**12. ábra/d**).



A kiperarált 5 napos ovulumokra ugyanezek a tendenciák voltak jellemzőek. Míg az árpával porzott kezeletlen búza termőkből kinyert ovulumok az antézis korú megporzatlanokhoz hasonlóan félgömb alakúak voltak (**12. ábra/h**), addig a többi esetben az ovulumokra is jellemző volt a termőknél tapasztalt kisebb-nagyobb mértékű hosszanti megnyúlás. A méretbeli eltérések mellett a legszembetűnőbb különbség a vágás síkjához legközelebb lévő ellenlábás sejtek degradációja volt, ami a szakirodalmi adatok szerint a megtermékenyülés egyik első, szemmel látható következménye (An és You 2004). Az ellenlábás sejtek hiányát az önporzott termők ovulumain kívül egyedül az árpával termékenyített és 2,4-D-vel kezelt termőkben figyeltük meg (**12. ábra/j**), azt önállóan sem az árpa pollennel végzett porzás (**12. ábra/h**), sem pedig a 2,4-D kezelés (**12. ábra/i**) nem váltotta ki, ezzel szolgáltatva közvetett bizonyítékot arra, hogy a búza-árpa hibridek szemfejlődésének indukálásához a porzás vagy megtermékenyítés és a hormonkezelés együttesen szükséges. A jelenség feltehetően összefügg a szemfejlődés másik fontos feltételével, az anyai szövetek megnyúlásával, amiről ismert, hogy kiváltásához a központi sejt megtermékenyülése és az endospermium fejlődése szükséges szemben az embriófejlődéssel, ami önmagában nem indukálja az anyai szövetek megnyúlását (Figueiredo és Köhler 2014). A fejlődésnek indult, búza és árpa pollennel megporzott ovulumok közti legjelentősebb különbség az volt, hogy míg az önporzott termők fél-ovulumainak csúcsában – a megfelelő szögben tartva – látható volt a környezetétől színében elkülönülő, az embriót takaró laza szerkezetű, áttetsző szövet, addig ilyen jellegű szövet az árpával termékenyített termőkben sohasem volt fellelhető (**12. ábra**).

Az embriózsákon belül zajló folyamatok részletesebb vizsgálatához az ön- és idegen pollennel porzott termőket 6 nappal a megporzást követően kigyűjtöttük, majd paraformaldehides fixálás után műgyantába ágyasztuk. Ezt követően 1 µm vastag, félvékony metszeteket készítettünk belőlük, amelyeket hisztokémiai festést követően fénymikroszkóp alatt vizsgáltunk. Csak az előkísérletek eredményei alapján aktiváltnak ítélt, árpa pollennel porzott és ezt 1 nappal követően 2,4-D kezeléssel támogatott termőket vizsgáltuk, amelyeket az önporzott és azonos környezetben fejlődő termőkből készített metszetekhez hasonlítottunk (**13. ábra**).



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

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

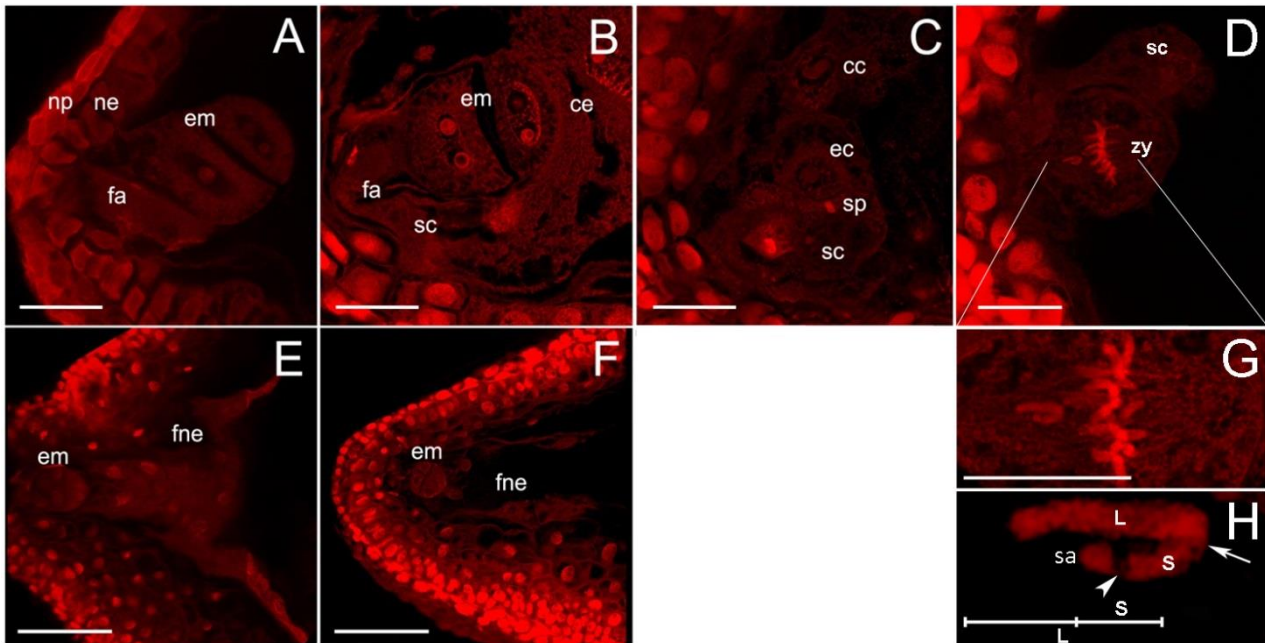
Az 1-1 kalászból származó szemkezdemények vizsgálata során megállapítottuk, hogy az öntermékenyítésből származó szemkezdemények mindegyike tartalmazott csepp formájú, hajtás- és gyökérmerisztéma szerveződést mutató embriót (ld. 2.3 fejezet), amelyek átlagos hosszúsága 100 µm és szélessége 50 µm volt (**13. ábra**), de ettől a mérettől a kalászban elfoglalt pozíciótól és a szemkezdemény méretétől függően 10-20% eltérés is előfordult. Ezzel szemben az árpa pollennel porzott és 2,4-D-vel kezelt szemkezdemények ugyan hosszra és alakra hasonló méretűek és megjelenésűek voltak, a metszetek alapján szerveződésükben jelentős eltéréseket mutattak az öntermékenyített, kontroll csoport szemkezdeményeihez képest. Az anyai szövetek, a nucellusz és az integumentum rétegek megjelenésében és szerkezetében nem volt látható különbség, ezzel szemben a nucelláris epidermiszen belül csak egy megnyúlt üreg volt található az embriózsák helyén (**13. ábra**). Az egyetlen kalászból származó termőkben összesen 1 db embriót találtunk: ez méretében egy fejlettebb, öntermékenyítésből származó embrióval egyezett meg, valamint morfológiája és szerkezete sem tért el a normális fejlődésmentet követő, öntermékenyített kontroll embrióktól (**13. ábra**). A két minta közötti legjelentősebb különbség az endospermiumban mutatkozott. Míg az öntermékenyített kontroll szemkezdemények mindegyikében az egész magkezdeményt kitöltő nagy, parenchima jellegű sejteket tartalmazó endospermiumot találtunk (ld. 2.4 fejezet), amely a jól elkülönülő mikropiláris nyaki részen keresztül az embrióhoz kapcsolódott (**13. ábra/a**), 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 sejtfaalak nélküli sejtmagot találtunk, amelyeken a leginkább a lízis jelei mutatkoztak (**13. ábra/b**).

#### 4.2.2 Az in planta embriófejlődés konfokális mikroszkópos vizsgálata

A mikroszkópos megfigyelés során összehasonlítottuk a búza vagy az árpa pollennel porzott búza termők embriózsákjában 1 és 3 nappal a megporzás után lejátszódó folyamatokat: megvizsgáltuk, van-e szemmel látható morfológiai különbség az eltérő apai genomot tartalmazó zigóták és proembriók esetében, valamint van-e számszerűsíthető különbség a megtermékenyülések számában a saját vagy árpa pollennel porzott búza termőkben (**14. ábra**)?

Az izolált és fixált ovulumokban található embriózsákok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a saját pollennel porzott búza termők mindegyikében láthatóak voltak a megtermékenyülés egyértelmű bizonyítékai: a zigóta minden esetben túl volt az első osztódáson (**14. ábra/A**), a permanens szinergida sejt a degradálódás jeleit mutatta, az endospermiumban pedig megfigyelhető volt a cönocitikus fázisra jellemző intenzív magosztódás és citoplazma szaporulat (ld. 2.4 fejezet) (**14. ábra/A**). A pollentömlő vizsgálatához (ld. 4.1.2.2 fejezet) hasonlóan itt is előfordult, hogy a gondos preparálás és fixálás ellenére az embriózsák sejtjei elmozdultak a helyükről, vagy megsemmisültek, ami lehetetlenné tette a számszerű adatgyűjtést. Az árpával termékenyített búza ovulumok többségének morfológiája láthatóan különbözött a kontroll ovulumokétól. Húsz preparált ovulumot megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a zigóta első osztódásával bezáruló első sejtciklus három esetben a kontroll termőkkel megegyező módon teljesen végbement: itt az embriók jól láthatóan két eltérő méretű, kisebb apikális és nagyobb bazális sejtből álltak, az endospermium pedig több sejtmagvas struktúrát alkotott (**14. ábra/B**). Egy 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 (**14. ábra/D**). Ebben az esetben a korai sejtosztódások alatt végbemenő apai kromoszóma eliminációt is sikerült közvetlenül „tetten érni”, megerősítve ezzel azokat az eredményeket, amelyek szerint az árpa kromoszómák a tökéletlen centroméra/mikrotubulus kapcsolatok miatt alkalmanként lemaradnak (**14. ábra/G**), és nem vesznek részt az osztódási orsó szerveződésében (Sanei és mtsai. 2011). Az ilyen lemaradó kromoszómák a zigóta korai sejtosztódásai során nem kerülnek át az utódsejtekbe, és az egyedfejlődés kezdeti szakaszában elvesznek (Sanei és mtsai. 2011). A szóban forgó árpa pollennel termékenyített búza termőben egy kromoszóma jól láthatóan lemaradt a többi középsíkba vándorolt kromoszómától (**14. ábra/D,G**). Egy esetben sikerült közvetlenül a megtermékenyülés előtti állapotot is megfigyelnünk. Az ovulumban jól látható volt a mikropilén át betörő és a szinergida sejtek filiform apparátusába belépő pollentömlő, valamint az egyik hímivarsejt, amely a szinergidán való áthaladás után közvetlenül a petesejt sejthártyájához tapadt, míg a központi sejtben megfigyelhető volt a termékenyülés utáni állapotra jellemző

három sejtmag (**14. ábra/C**). Ezeken az ovulumokon kívül három esetben találtunk ép, sértetlen állapotú embriózsákokat, amelyekben feltételezhetően nem történt termékenyülés, vagy esetleg a folyamat annyival később az öntermékenyített ovulumokhoz képest, hogy 1 nappal a megporzást követően még nem voltak láthatóak a megtermékenyülés jelei. A maradék 12 esetben a fentebb vázolt probléma miatt nem lehetett egyértelmű következtetéseket levonni az embriózsákban zajló eseményekről.



**14. 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 árpa kromoszóma kiesése az első mitózis során. H: a lemaradó árpa kromoszóma nagyított képe

cc: központi sejt, ce: cönocitikus endospermium, fne: 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 kar, S: rövid kar, sa: szatellita, nyíl: centroméra, nyílhegy: másodlagos befűződés a mércze az 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 árpa kromoszómát morfológiája, valamint a rövid (S) és hosszú (L) karok aránya alapján és részletes, nagy felbontású felvételek segítségével az alább leírt módon azonosítottuk. A kromoszóma másodlagos befűződése (**14. ábra/H**, nyílhegygel jelölve) a lehetséges jelöltek körét kettőre, az 5H és 6H kromoszómákra szűkíti (Linde-Laursen és mtsai. 1997). A két kromoszóma S/L kararánya (a szatellitokkal 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 (Tjio és Hagberg 1951; Noda és Kasha 1978; Singh és Tsuchiya 1982). A lemaradó kromoszóma centroméra régiója (**14. ábra/H**, 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

szatellitese árpa kromoszóma (1H-4H, 7H) kararánya még markánsabban eltér; 0,70 és 0,99 között mozog (Tjio és Hagberg 1951; Noda és Kasha 1978; Singh és Tsuchiya 1982), 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 szatellitese kromoszómák (és kararányaik) jöhetnek szóba: 1B – 0,59, 6B – 0,83 (Endo és mtsai. 1984), de ezek is messze esnek a kérdéses kromoszóma kararányától.

Okkal levonható tehát a következtetés, hogy a megfigyelt lemaradó (és feltehetően majd ki is esett) kromoszóma nagy valószínűséggel az 5H kromoszómával azonosítható már a zigóta első osztódása során. A kieső és bennmaradó árpa kromoszómák gyakoriságáról további részletes elemzést végeztünk regenerált növények egy nagyobb populációjában (ld. 4.4.5 fejezet).

A 3 nappal a megporzást követően fixált öntermékenyített kontroll ovulumokban az embrió már többsejtes csepp formát alkotott, 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 és a fejlődés későbbi fázisában kiürülő zónát (transzfer régió), valamint a vékony citoplazma rétegben a nucellusz mentén az endospermium kalazális vége felé gyöngyfüzérszerűen migráló sejtmagokat (**14. ábra/E**). A tíz kontroll ovulum mindegyikében találtunk embriót és endospermiumot, amelyek méretükben és megjelenésükben nem tértek el jelentősen egymástól. Ezzel szemben a tizenegy árpával termékenyített búza termőből tizenben (90,9%) találtunk embriót és kezdeti stádiumban levő endospermiumot, amelyek azonban méretben és fejlettségben elmaradtak az öntermékenyített kontroll társaiktól, és egymáshoz képest is elég változatos képet mutattak. A 3 napos 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 (**14. ábra/F**).

### 4.3 Intergenerikus búza-árpa hibrid növények előállítása 2,4-D kezeléssel<sup>2</sup>

#### 4.3.1 Embriómentés

A hibrid előállítás szempontjából legmegfelelőbb anyai genotípus megválasztásához próbakeresztezéseket végeztünk három anyai genotípussal: ‘Chinese Spring’ (44 kalász), ‘Chinese Spring’ *Ph<sup>I</sup>* (34 kalász) és ‘Szecsuán’ (10 kalász), amelyek mindegyikét a ‘Morex’ hatsoros tavaszi árpa pollenjével poroztuk meg. A 2,4-D kezelést követő 14. napon a megporzott kalászból kiszedtük a megnyúlt szemkezdeményeket, és sterilizálás után kipreparáltuk a tartalmukat (**8. ábra**).

A preparálás után összehasonlítottuk az egyes búza fajták árpával való keresztezhetőségét, amit a kimentett embriók és a megporzott virágok számának hányadosából határoztunk meg. (**3. táblázat**) Az eredmények szerint a ‘Szecsuán’ genotípus virágai kötöttek a legnagyobb számban embriókat (16%, 45 db), míg a szakirodalomban jól kereszteződő genotípusnak leírt ‘Chinese Spring’ virágai megközelítőleg ötször alacsonyabb gyakorisággal (3,1%, 31 db) tartalmaztak kimenthető embriókat. A harmadik genotípus a ‘Chinese Spring’ *Ph<sup>I</sup>* embriókötése a másik két fajta értékei közé esett: szemkezdeményei 7,2%-ban (62 db) tartalmaztak embriót (**3. táblázat**)

#### 4.3.2 Növényregeneráció

Az aseptikus körülmények között kipreparált embriókat szilárd N6D táptalajon neveltük fel, közben dokumentáltuk, hogy az adott búza genotípusoktól származó embriók milyen arányban életképesek, valamint milyen százalékban nevelhetőek szabad földbe kiültetve, hajtással és gyökérrel rendelkező egyedekké (**3. táblázat**). Az embriók funkcióképességét a kiültetett növények és a kimentett embriók számának hányadosából határoztuk meg. Azt találtuk, hogy a ‘Chinese Spring’ és a ‘Chinese Spring’ *Ph<sup>I</sup>* genotípussal való keresztezésből származó embriók megegyező gyakorisággal voltak életképes növényekké nevelhetőek. A 31 db ‘Chinese Spring’ embriónak 74,2%-a (23 db) csírázott ki, míg a 62 db ‘Chinese Spring’ *Ph<sup>I</sup>* embrió 75,8%-a (47 db) került kiültetésre. A ‘Szecsuán’ genotípus itt is kiemelkedő eredményt produkált: a 45 db embrió 88,9%-a (40 db) kicsírázott, és életképes zöld növényé fejlődött.

<sup>2</sup> A fejezetben közölt adatok az alábbi publikációban jelentek meg:

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 Rep* 33:1323–1331. doi: 10.1007/s00299-014-1618-3

3. táblázat A 2,4-D kezeléssel támogatott búza-árpa keresztezések hatékonysága

Búza genotípus	Megporzás		Embriók		Növények		
	Kalász (db)	Virág (db)	Száma (db)	Gyakorisága (%)	Száma (db)	Növény/Embrió (%)	Növény/Virág (%)
'Chinese Spring'	44	1014	31	3,1	23	74,2	2,3
'Chinese Spring' Phi	34	864	62	7,2	47	75,8	5,8
'Szecsuán'	10	285	45	16	40	88,9	14
Összesen	88	2163	138	6,4	110	79,7	5,1

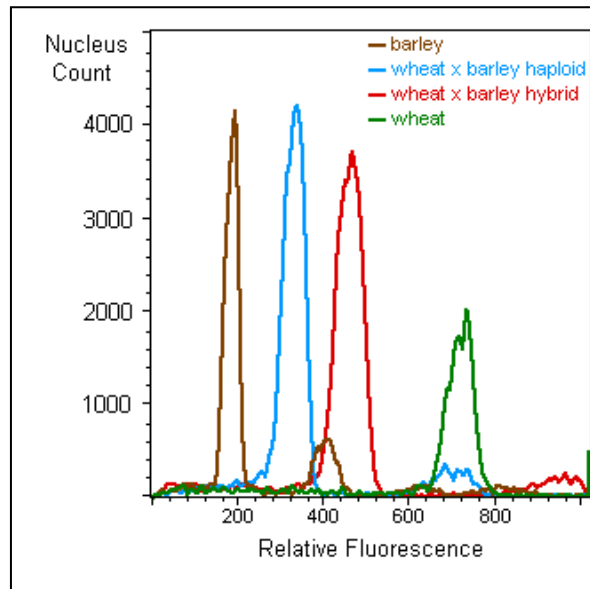
A kísérlet végeredményeképpen a kiültetett növények számából meghatároztuk az adott búza genotípusra jellemző növény kihozatalt, amit a kiültetett növények és a megporzott virágok hányadosából határoztunk meg. Mint a korábbi eredmények alapján feltételezhető volt, az árpa pollennel legjobb keresztezhetőséget mutató búza genotípusnak a 'Szecsuán' genotípus bizonyult, aminél a megporzott virágok 14%-ából sikerült növényeket felnevelnünk. Ezt követte a 'Chinese Spring'  $Ph^I$  5,8%-os növény kihozatallal, míg a leggyengébb eredményt itt is a 'Chinese Spring' hozta, hiszen a megporzott virágoknak mindössze 2,3%-ából tudtunk életképes növényeket felnevelni (3. táblázat).

### 4.3.3 A hibridek molekuláris elemzése

#### 4.3.3.1 Genomméret és ploidszint meghatározása

Az életképes embriókból kihajtott és kiültetett növényekből 4-5 leveles állapotban mintát vettünk, amelyeket áramlási citométeres elemzésnek vetettünk alá (15. ábra).

A friss levelekből feltárt sejtmagok DNS tartalmából meghatároztuk az egyes növények genom méretét, és ennek alapján következtettünk arra, hogy tartalmaztak-e a haploid anyai genom mellett apai kromoszómá(ka)t, esetleg kromoszóma szegmentumot. A citométeres elemzés során (4. táblázat) a diploid anyai és apai genotípusokat külső (referencia) kontrollként használtuk, továbbá a vizsgálat hitelességét ellenőrizendő a mintákat kiegészítettük öt belső (vak) kontrollal, amelyek *H. bulbosum*mal végzett porzásokból származó, haploid búza növények voltak: ezekről ismert (Barclay 1975; Inagaki 1985), hogy a megtermékenyítés utáni első osztódások alatt kivétel nélkül elveszítik az összes apai kromoszómát. A bizonyosan anyai haploid belső kontroll növények (4. táblázat, aláhúzott) kilétét csak a vizsgálat lezárásával, az eredmények kiértékelése során fedtük fel.



**15. ábra. Búza-árpa keresztezésből származó F1 nemzedék genom méretének meghatározása.**

(az áramlási citométer Cellquest szoftvere által generált eredeti hisztogram)

Az azonos színű görbék két-két csúcsa a sejtciklus G1 és G2 fázisában levő sejtmagok DNS molekuláihoz kötődött propidium-jodid fluoreszcencia emissziójának maximumait ábrázolja. A hexaploid búzának (zöld görbe) csupán a G1 csúcsa látható a hisztogramon, mivel a G2 csúcs az X tengely értéktartományán kívül esik.

A vizsgált növényeket a relatív fluoreszcencia értékek szerint növekvő sorrendbe rendeztük, majd a diploid szülők genomméretei alapján és a mérési pontatlanság figyelembe vételével meghatároztuk azt a minimum értéket, amely alatt a kapott eredmény nagy valószínűséggel csak az anyai haploid genomot reprezentálja (**4. táblázat**). Ennek függvényében a határt  $G1 < 98$  és  $G2 < 196$  relatív fluoreszcencia értéknél húztuk meg. Az ennél kisebb értékkel rendelkező növényeket anyai haploidnak minősítettük, az ennél nagyobb értéknél feltételeztük, hogy az adott növény genomja tartalmaz legalább egy apai kromoszómát.



4. táblázat. Búza-árpa keresztezések (F1 nemzedék) genomméretei és a hibridek azonosítása

Vizsgált minta	Genom méret		Következtetés
	G1	G2	
'Morex' Kontroll	45,1	98,2	Diploid
'Szecsuán' Kont.	180,5	-	Diploid
'Chinese Spring' Kontroll	178,2	-	Diploid
'Chinese Spring' PhI Kont.	193,6	-	Diploid
'Chinese Spring' PhI 7/1	68,0	148,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 7/3	75,5	169,0	Haploid
'Szecsuán' 4/4	94,6	171,4	Haploid
'Chinese Spring' PhI 31/1	85,0	172,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 12/A/2	81,3	174,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 12/4	85,0	175,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 24/1	87,1	177,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 8/6	87,8	177,7	Haploid
'Chinese Spring' PhI 11/2	89,6	178,2	Haploid
'Chinese Spring' 7/2	90,7	178,3	Haploid
'Chinese Spring' PhI 13/2	88,3	179,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 4/2	84,4	179,7	Haploid
'Chinese Spring' PhI 22/3	88,7	180,3	Haploid
'Chinese Spring' PhI 4/1	86,2	181,9	Haploid
'Szecsuán' 7/2	87,6	182,4	Haploid
'Chinese Spring' PhI 12/6	91,2	184,1	Haploid
'Szecsuán' 8/1	89,2	184,5	Haploid
'Chinese Spring' PhI 8/1	91,4	185,5	Haploid
'Chinese Spring' PhI 8/3	89,6	185,7	Haploid
'Szecsuán' 3/1	92,2	185,9	Haploid
'Chinese Spring' PhI 13/1	93,5	186,3	Haploid
'Szecsuán' 4/2	93,6	187,2	Haploid
'Chinese Spring' PhI 12/5	95,8	188,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 22/2	95,6	188,6	Haploid
'Chinese Spring' 7/5	96,6	188,9	Haploid
'Chinese Spring' PhI 12/A/1	91,9	189,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 10/A/1	93,3	189,3	Haploid
'Chinese Spring' PhI 2/1	98,1	190,2	Haploid
'Chinese Spring' PhI 8/2	95,1	190,8	Haploid
'Chinese Spring' PhI 11/1	93,8	192,0	Haploid
'Szecsuán' 9/1	92,8	193,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 7/2	98,0	195,0	Haploid
'Chinese Spring' PhI 8/4	98,0	201,0	Haploid???
'Chinese Spring' 20/1	105,6	202,6	Hibrid
'Chinese Spring' 7/6	98,1	204,6	Hibrid
'Szecsuán' 12/5	104,9	206,7	Hibrid
'Chinese Spring' PhI 29/1	110,0	215,0	Hibrid
'Chinese Spring' PhI 8/5	107,7	216,1	Hibrid
'Chinese Spring' PhI 25/1	107,3	217,0	Hibrid
'Szecsuán' 3/3	105,9	219,6	Hibrid
'Szecsuán' 3/11	111,7	227,8	Hibrid

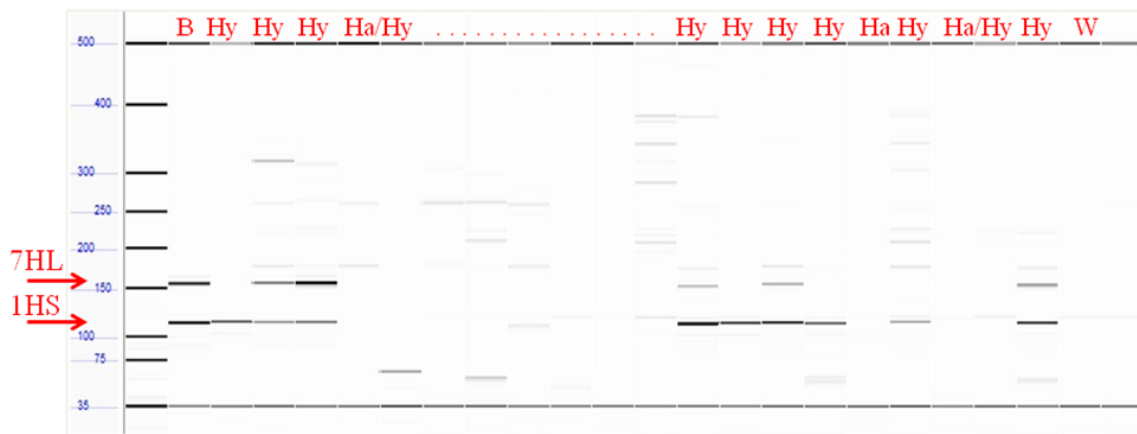
aláhúzá: búza × *H. bulbosum* anyai haploidok, félkövéen: feltételezett hibrid növények

Az eredmények alapján az összesen megvizsgált 74 növényből 66 esett genommérete alapján a biztosan haploidok csoportjába, ami a növények 83,5%-át jelentette. Mindössze nyolc

olyan növényi mintát (16,5%) találtunk, amelyek a genom méret alapján feltételezhetően tartalmaztak árpa kromoszómákat is a teljes haploid búza kromoszómakészlet mellett. A feltételezett hibrid növények közül kettő ‘Chinese Spring’, három ‘Chinese Spring’  $Ph^I$  és három ‘Szecsuán’ anyai háttérrel rendelkezett, ami azt jelzi, hogy a kromoszóma kiesés vizsgálatához, valamint a hibrid előállításához mindhárom genotípus alkalmas. Mivel a genom méret csak közvetett bizonyíték az apai kromoszómák meglétére (vagy hiányára), ezért a mintákat (az anyai haploidok mintegy felét és valamennyi hibrid-jelöltet, **4. táblázat**) további elemzésnek vetettük alá (ld. 4.3.3.2 és 4.3.3.3 fejezetek).

#### 4.3.3.2 Kromoszómakar-specifikus molekuláris markerek alkalmazása

Az utódnövények sejtjeiben az apai kromoszómák vagy kromoszóma szegmentumok azonosításához a növények leveleiből izolált DNS-t PCR reakcióban kromoszómakar-specifikus SSR és STS markerekkel teszteltük, amelyeket előzetesen az árpa SSR adatbázisból (**2. táblázat**) választottunk ki, majd a kapott PCR termékeket fragment analízátorral elemeztük (**16. ábra**).



**16. ábra. Búza-árpa keresztezések (F1 nemzedék egy része) 1H és 7H kromoszómára specifikus markerelemzése.**

B: árpa kontroll, W: búza kontroll, Ha: haploid, Hy: hibrid, 7HL és 1HS markerek: HvCsIF6, ill. HvCsIF9 (2. táblázat)

Összesen 32 növényből izolált DNS mintát elemeztünk, amelyet kiegészítettünk 4 db *H. bulbosum* keresztezésből származó, belső kontrollként használt, biztosan haploid növényvel (**5. táblázat, aláhúzott**), valamint a diploid szülői partnerek mintáival (**5. táblázat, árpa és búza kontroll**). Az eredményt akkor értékeltük pozitívnak, ha az adott kromoszóma mindkét karjára tervezett primerpárral pozitív jelet kaptunk (**5. táblázat**), míg felemás eredmény esetén további vizsgálatokat végeztünk, bizonyítandó vagy cáfolandó az esetleges apai és anyai kromoszómák közötti transzlokációk lehetőségét (ld. 4.3.3.3 fejezet).

5. táblázat. Búza-árpa keresztezések (F1 nemzedék) markerelemzésének összesítése

Vizsgált minta	Árpa kromoszóma karok														Genomösszetétel
	1HS	1HL	2HS	2HL	3HS	3HL	4HS	4HL	5HS	5HL	6HS	6HL	7HS	7HL	
Árpa Kontroll	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Diploid szülő
Búza Kontroll	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Diploid szülő
'Chinese Spring' 7/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 10/A/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 11/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 11/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 12/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 12/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 12/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
<b>'Chinese Spring' Phi 12/A/1</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	-	-	-	-	<b>X</b>	-	-	-	<b>X</b>	-	-	-	<b>Hibrid</b>
'Chinese Spring' Phi 12/A/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 13/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 13/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 18/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 19/A/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 2/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 22/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 24/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
<b>'Chinese Spring' Phi 25/1</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>Hibrid</b>
<b>'Chinese Spring' Phi 29/1</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	-	-	-	-	<b>Hibrid</b>
'Chinese Spring' Phi 33/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 4/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 4/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 7/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 7/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 7/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 8/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 8/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Chinese Spring' Phi 8/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
<b>'Chinese Spring' Phi 8/4</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>X</b>	-	<b>Hibrid</b>
<b>'Chinese Spring' Phi 8/5</b>	-	-	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>	-	<b>X</b>	-	<b>X</b>	-	<b>X</b>	-	-	<b>Hibrid</b>
'Chinese Spring' Phi 8/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
<b>'Szecsuán' 12/5</b>	-	-	<b>X</b>	<b>X</b>	-	-	-	-	-	-	<b>X</b>	<b>X</b>	-	-	<b>Hibrid</b>
'Szecsuán' 3/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
<b>'Szecsuán' 3/11</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>	-	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>	<b>X</b>	-	-	-	-	<b>Hibrid</b>
<b>'Szecsuán' 3/3</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	-	<b>X</b>	-	-	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>Hibrid</b>
'Szecsuán' 9/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid
'Szecsuán' 9/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Haploid

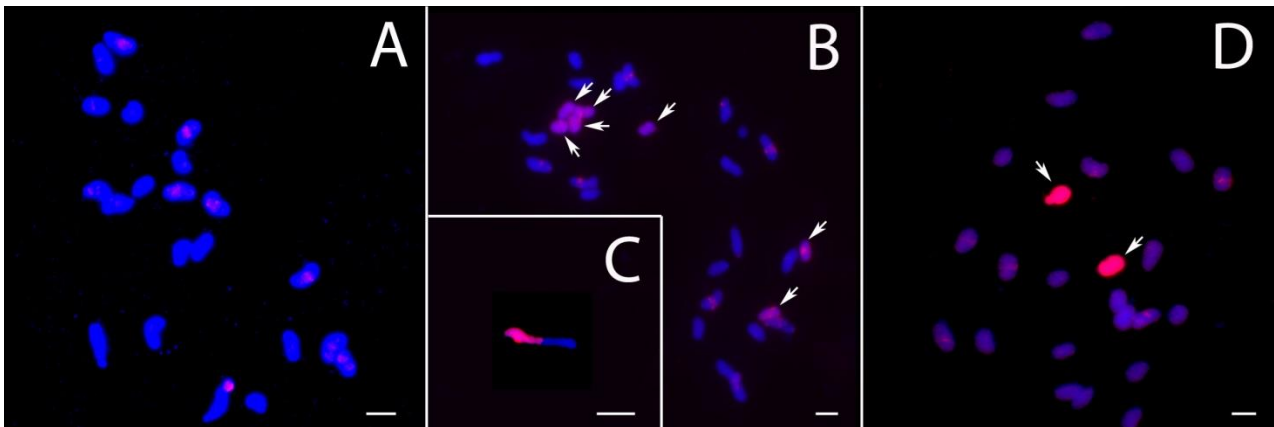
félkövéren: feltételezett hibrid növények

A 32 megvizsgált növényből 25 (78,1%) anyai haploidnak bizonyult, azaz egyetlen apai kromoszómakarra sem adott pozitív jelet. Ezzel összhangban negatív volt az anyai diploid kontroll, valamint a négy *H. bulbosum* keresztezésből származó belső kontroll növény is. A fenti érték (78,1%) közel esik a citométeres vizsgálat során kapott 83,5%-os haploid gyakorisághoz. A minták között egyetlen (3,1%) növény volt, amely az apai kontrollhoz hasonlóan az összes markerre nézve pozitív eredményt adott, tehát teljes hibridnek bizonyult, további hét növény

(18,8%) pedig részlegesen tartalmazta az apai genomot. Öt növény (11 árpa kromoszóma) esetében csak az egyik kromoszómakar adott pozitív jelet, ami jelentős genom átrendeződésekre utalhat: ennek megerősítésére vagy kizárására a minták egy csoportját további vizsgálatnak vetettük alá (ld. 4.3.3.3 fejezet, **6. táblázat**).

#### 4.3.3.3 Genomi in situ hibridizáció (GISH)

A kérdéses mintákon a továbbiakban, kariotípusuk szemléltetéséhez, GISH-t alkalmaztunk: ehhez a növények portokjaiból készített meiotikus kromoszóma preparátumokra rodaminnal jelölt árpa DNS-t hibridizáltunk, láthatóvá téve a nem eliminálódott apai kromoszómákat (**17. ábra**). A vizsgálatot 20 növényen végeztük el, amit a korábbiaknak megfelelően kiegészítettünk 3 db *H. bulbosum* keresztezésből származó növény mintájával (**6. táblázat**).



**17. ábra. Búza-árpa keresztezések (F1 nemzedék) GISH elemzése.**

A: anyai haploid növény ( $2n=21$ ), B: teljes hibrid ( $2n=28$ ) hét árpa kromoszómával, D: részleges hibrid ( $2n=23$ ) két árpa kromoszómával, C: transzlokáció az árpa kromoszómák nyíllal jelezve, az ábrán a mérce egységesen  $5\ \mu\text{m}$

Két növény (10%) tartalmazta a 21 anyai kromoszóma mellett mind a 7 apai kromoszómát (**17. ábra/B**). Két esetben (10%) a növények az apai genom nagy részét (6, illetve 5 kromoszóma) hordozták, és további növény (10%) csak 2-2 apai kromoszómát tartalmazott (**17. ábra/C**), ahol az egyikben ('Szecsuan' 3/6) a két apai kromoszóma mellett egy transzlokáció (**17. ábra/D**) is megfigyelhető volt, igazolva a szülői genomok közötti genom átrendeződést. A maradék 14 növényben (70%) csak úgy, mint a három belső kontrollnál (**6. táblázat**, aláhúzott) apai kromoszómák vagy kromoszóma szegmentumok nem voltak jelen (**17. ábra/A**).

6. táblázat. Búza-árpa keresztezések (F1 nemzedék) GISH elemzése

Minta	Apai kromoszómák száma	Kariotípus
'Chinese Spring' 20/1	5	Hibrid
'Chinese Spring' 7/2	0	Haploid
'Chinese Spring' 7/6	7	Hibrid
'Chinese Spring' 7/7	0	Haploid
'Chinese Spring' Phi 12/3	0	Haploid
'Chinese Spring' Phi 12/6	0	Haploid
'Chinese Spring' Phi 22/3	0	Haploid
'Chinese Spring' Phi 4/1	0	Haploid
'Chinese Spring' Phi 7/3	0	Haploid
'Chinese Spring' Phi 8/1	0	Haploid
'Chinese Spring' Phi 8/3	0	Haploid
'Szecsuán' 12/5	2	Hibrid
'Szecsuán' 12/8	0	Haploid
'Szecsuán' 3/1	0	Haploid
'Szecsuán' 3/11	6	Hibrid
'Szecsuán' 3/3	7	Hibrid
'Szecsuán' 3/6	2+1Tr	Hibrid
'Szecsuán' 4/2	0	Haploid
'Szecsuán' 4/4	0	Haploid
'Szecsuán' 7/2	0	Haploid
'Szecsuán' 8/1	0	Haploid
'Szecsuán' 9/1	0	Haploid
'Szecsuán' 9/2	0	Haploid

aláhúzva: búza × *H. bulbosum* anyai haploidok, **félkövén**: feltételezett hibrid növények

#### 4.3.3.4 A molekuláris vizsgálatok eredményeinek összegzése

A növények többféle elemzésével kapott részeredményeket egymással összevetve átfogó értékelést készítettünk (7. táblázat). Negyvenkét lehetséges hibrid növény, valamint 6 db *H. bulbosum*mal végzett keresztezésből származó haploid belső kontroll (7. táblázat, aláhúzott) mintáit vizsgáltuk meg részletesen. Az esetek 85%-ban (41 minta) legalább két módszerrel kaptunk értékelhető adatot, a maradék 15% (7 minta) esetében vagy a GISH (négy ízben), vagy a kromoszóma-specifikus markeres jellemzés (háromszor) eredménye kellően meggyőző volt ahhoz, hogy ezeket a mintákat megerősítő vizsgálat nélkül is elfogadjuk. Az adatok összesítése után megállapítottuk, hogy a hibrid populáció mindössze három egyede (7,1%) mutatkozott teljes hibridnek, azaz a 21 anyai kromoszóma mellett a 7 db apai kromoszómát is tartalmazta legalább egy példányban. Szerencsés véletlen, hogy a három teljes hibrid növény mindegyike más-más anyai genotípussal való keresztezésből származik. További hét növényben (14,2%,



szintén mindhárom búza genotípussal) volt kimutatható az apai genom egy része (legalább 2 db kromoszóma), és ezt (egy kivétellel) legalább két vizsgálat megegyező eredménye együttesen erősítette meg.

7. táblázat. Búza-árpa keresztezések (F1 nemzedék) molekuláris vizsgálatainak összesítése

Vizsgált minta	Vizsgálati módszerek			Genomösszetétel
	Citometria	Molekuláris markerek	GISH	
'Chinese Spring' 20/1	Hibrid	NT	Hibrid (5kr)	Hibrid (5kr)
'Chinese Spring' 7/2	Haploid	NT	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' 7/5	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' 7/6 *	Hibrid	NT	Hibrid (7kr)	Hibrid (7kr)
'Chinese Spring' 7/7	NT	NT	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' Phl 10/A/1	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 11/1	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 11/2	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 12/3	NT	NT	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' Phl 12/4	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 12/5	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 12/6	Haploid	Haploid	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' Phl 12/A/1	Haploid	Hibrid (3kr)	NT	Hibrid (3kr)
'Chinese Spring' Phl 12/A/2	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 13/1	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 13/2	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 18/1	NT	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 19/A/1	NT	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 2/1	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 22/2	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 22/3	Haploid	NT	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' Phl 24/1	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 25/1 *	Hibrid	Hibrid (7kr)	NT	Hibrid (7kr)
'Chinese Spring' Phl 29/1	Hibrid	Hibrid (5kr)	NT	Hibrid (5kr)
'Chinese Spring' Phl 33/1	NT	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 4/1	Haploid	Haploid	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' Phl 4/2	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 7/1	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 7/2	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 7/3	Haploid	Haploid	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' Phl 8/1	Haploid	Haploid	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' Phl 8/2	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 8/3	Haploid	Haploid	Haploid	Haploid
'Chinese Spring' Phl 8/4	Haploid	Hibrid	NT	Haploid
'Chinese Spring' Phl 8/5	Hibrid	Hibrid (5kr)	NT	Hibrid (5kr)
'Chinese Spring' Phl 8/6	Haploid	Haploid	NT	Haploid
'Szecsuán' 12/5	Hibrid	Hibrid (2kr)	Hibrid (2kr)	Hibrid (2kr)
'Szecsuán' 12/8	NT	NT	Haploid	Haploid
'Szecsuán' 3/1	Haploid	Haploid	Haploid	Haploid
'Szecsuán' 3/11	Hibrid	Hibrid (5kr)	Hibrid (6kr)	Hibrid (6kr)
'Szecsuán' 3/3 *	Hibrid	Hibrid (6kr)	Hibrid (7kr)	Hibrid (7kr)
'Szecsuán' 3/6	NT	NT	Hibrid (2kr+1Tr)	Hibrid (2kr+1Tr)
'Szecsuán' 4/2	Haploid	NT	Haploid	Haploid
'Szecsuán' 4/4	Haploid	NT	Haploid	Haploid
'Szecsuán' 7/2	Haploid	NT	Haploid	Haploid
'Szecsuán' 8/1	Haploid	NT	Haploid	Haploid
'Szecsuán' 9/1	Haploid	Haploid	Haploid	Haploid
'Szecsuán' 9/2	NT	Haploid	Haploid	Haploid

aláhúzza: búza × *H. bulbosum* anyai haploidok, **félkövén**: feltételezett hibrid növények, \* teljes hibrid növények, NT: Nem tesztelt, kr: árpa kromoszómák száma, Tr: Transzlokáció

Öt növénynél (11%, négy esetben kromoszóma marker és egy esetben GISH) találtuk jeleit a szülői genomok közötti átrendeződésnek. Az alkalmazott módszerekkel a minták 96%-ában (46 növény) a genomösszetételt pontosan meg lehetett határozni, beleértve az alkalmazott hat

belső (vak) kontroll növényt, amelyek minden vizsgálatban és minden esetben a várakozásnak megfelelően negatívnak bizonyultak. Mind a tíz növénynél (hét haploid és három hibrid), ahol mind a háromféle vizsgálat elvégzésre került, 100%-ban azonos eredményt kaptunk. Csupán két alkalommal fordult elő, hogy az eredmények ellentmondóak voltak: mindkétszer az áramlási citometria és a molekuláris markerek eredményei tértek el egymástól. A 'Chinese Spring' 12/A/1 mintát, ami négy molekuláris markerre nézve adott jelet (ebből kettőt az 1H kromoszóma két karjára), és bár genom mérete a citométerrel megállapított haploid tartományba esett (4. táblázat), pozitívnak értékeltük. A 'Chinese Spring'  $Ph^I$  8/4 mintánál egyetlen kromoszómakarra kaptunk pozitív jelet, de ezt más vizsgálatokkal nem sikerült megerősíteni, ezért a haploid minták közé (32 növény, 76,2%) soroltuk (**7. táblázat**).

#### 4.3.4 A hibrid genetikai háttér fixálása

Mivel mind a haploidok, mind az intergenerikus hibrid növények minden szülői kromoszómából csak 1 db-ot tartalmaznak, ezért a meiózis során a kromoszómapárosodás híján steril ivarsejteket tartalmazó virágok fejlődnek rajtuk, amelyekben nem kötődnek magok (ld. 2.10.1 fejezet). Az esetlegesen hasznos kariotípusok következő generációba történő átörökítéséhez a keresztezésekből származó növényeket kiültetés után két csoportra osztottuk. Az egyik csoportnál (18 növény) in vivo kolchicin kezelést alkalmaztunk, ami a sejtciklus mitotikus szakaszában gátolja a megkettőződött kromoszómák szétválását, és ezt követően normális, diploid növénynek megfelelő sejtciklust eredményez (Blakeslee és Avery 1937). A másik csoport (35 növény) esetében pedig az anyai szülővel való visszakeresztezéssel próbálkoztunk (Mujeeb-Kazi és Rodriguez 1984), ami ugyan nagyobb valószínűséggel eredményezhet magkötést, de az eltérő genetikai háttérű szülők miatt hasadó utódpopulációt eredményez, amelynek egyedeit öntermékenyíteni kell az addíciók fixálásához. Végül azoknál a növényeknél, amelyek jól bokrosodtak, megpróbálkoztunk az éretlen kalászkák in vitro tenyésztésével is (17 növény).

Bár a kolchicin kezelés eredményeként öt növény kalászaiban találtunk szemterméseket, az előzetes molekuláris markerelemzés alapján (ld. 4.3.3.2 fejezet) mindegyik anyai haploid növénytől származott (**8. táblázat**).

Az in vitro kalászkatenyésztés mint vegetatív szaporítási módszer csak részben volt alkalmas az F1 hibrid genomjának további generációba való átmentésére. A kalászkák megfelelően kalluszosodtak, majd a kalluszokból növényregeneráló táptalajon sikerült organogenezis révén új növényeket nevelnünk, kihagyva ezzel a meiózis kritikus lépését, amely általában az intergenerikus hibridek F1 nemzedékének a végét jelenti. Az így előállított in vitro

növényeket kiültetve elméletileg többször meg lehet ismételni a sporofiton szakaszt a gametofitonba történt átmenet nélkül. Mindössze négy esetben sikerült növényeket regenerálni, amelyek a molekuláris vizsgálatok eredményei alapján egyöntetűen haploid anyanövénytől származtak. Ennek ismeretében ezeket a növényeket sem vizsgáltuk tovább (**8. táblázat**).

**8. táblázat. Búza-árpa hibridek genetikai hátterének fixálása különböző módszerekkel**

Genotípus	Genomfixálás módszere			Genomösszetétel
	Kolchicin kezelés	Anyai backcross	In vitro tenyésztés	
'Chinese Spring' Phi 12/5	X			Haploid
'Chinese Spring' Phi 12/6		X		Haploid
'Chinese Spring' Phi 22/2	X			Haploid
'Chinese Spring' Phi 22/3	X			Haploid
'Chinese Spring' Phi 7/1	X			Haploid
'Chinese Spring' Phi 7/3		X		Haploid
'Chinese Spring' Phi 8/1		X	X	Haploid
'Chinese Spring' Phi 8/6	X			Haploid
'Szecsuán' 12/5		X		Hibrid
'Szecsuán' 4/2		X	X	Haploid
'Szecsuán' 4/4			X	Haploid
'Szecsuán' 9/1			X	Haploid

aláhúzva: búza × *H. bulbosum* anyai haploidok, félkövéren: feltételezett hibrid növény (X: életképes utód)

Az anyai partnerrel végzett visszakereszteszés szintén alacsony hatásfokkal működött: mindössze öt növényen volt magkötés, és ezekből négy anyai dihaploidnak bizonyult. Egyedül a 'Szecsuán' 12/5 jelű növény mutatott mindhárom vizsgálatban hibrid jelleget. A GISH alapján két teljes árpa kromoszómát tartalmazott, a molekuláris markerek ezzel egybecsengően a 2H és 6H árpa kromoszóma mindkét karjának meglétére szolgáltatott bizonyítékot (**7. táblázat**). A Szecsuán' 12/5 növényről származó magot a csírányugalom megtörése után felneveltük, majd öntermékenyítettük. A virágok küllemre fertisnek mutatkoztak, és három kalászból összesen 35 db F2 szemtermést kaptunk. A szemtermésekből nevelt F2BC1 populációban molekuláris markerekkel elemeztük az árpa genom(részek) öröklődését. Annak ellenére, hogy a szülő csak a 2H és a 6H kromoszómát tartalmazta, a vizsgálatot minden árpa kromoszómára elvégeztük, a többi kromoszómát negatív kontrollként felhasználva. Biológiai kontrollnak a két szülői genotípust, míg a reakció pozitív kontrolljának a Ta30797 (UPP) primer párt alkalmaztuk, amely az előkísérletek során mind a búza, mind az árpa DNS-re pozitív reakciót eredményezett (**1. táblázat**).

Az egyszeri anyai visszakereszteszés következményeként feltehetően hasadó populációban a 35 tétel közül 20 db (57,1%) nem tartalmazott egyetlen árpa kromoszómát sem, ami pontosan megfelel a mendeli öröklésment alapján várt 56%-os hasadási aránynak. A 2H kromoszómát



nyolc (22,9%), míg a 6H kromoszómát öt esetben (14,3%) találtuk addícióként, továbbá két növény (5,7%) mindkét apai kromoszómát megőrizte a genomjában (**9. táblázat**).

**9. táblázat. Apai (árpa) kromoszómák öröklődése F2BC1 hasadó populációban**

Vizsgált minta	Kontroll	Árpa kromoszómák							Következtetés
		1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H	
'Szecsuán'	X	-	-	-	-	-	-	-	-
'Morex'	X	X	X	X	X	X	X	X	1,2,3,4,5,6,7
12/5/1	X	-	X	-	-	-	X	-	2,6
12/5/3	X	-	-	-	-	-	X	-	6
12/5/4	X	-	X	-	-	-	-	-	2
12/5/7	X	-	-	-	-	-	X	-	6
12/5/10	X	-	-	-	-	-	X	-	6
12/5/11	X	-	-	-	-	-	-	-	-
12/5/12	X	-	-	-	-	-	-	-	-
12/5/13	X	-	-	-	-	-	-	-	-
12/5/14	X	-	X	-	-	-	-	-	2
12/5/19	X	-	X	-	-	-	-	-	2
12/5/20	X	-	X	-	-	-	-	-	2
12/5/26	X	-	X	-	-	-	-	-	2
12/5/27	X	-	-	-	-	-	X	-	6
12/5/28	X	-	-	-	-	-	X	-	6
12/5/29	X	-	X	-	-	-	-	-	2
12/5/31	X	-	X	-	-	-	X	-	2,6
12/5/34	X	-	X	-	-	-	-	-	2
12/5/35	X	-	X	-	-	-	-	-	2

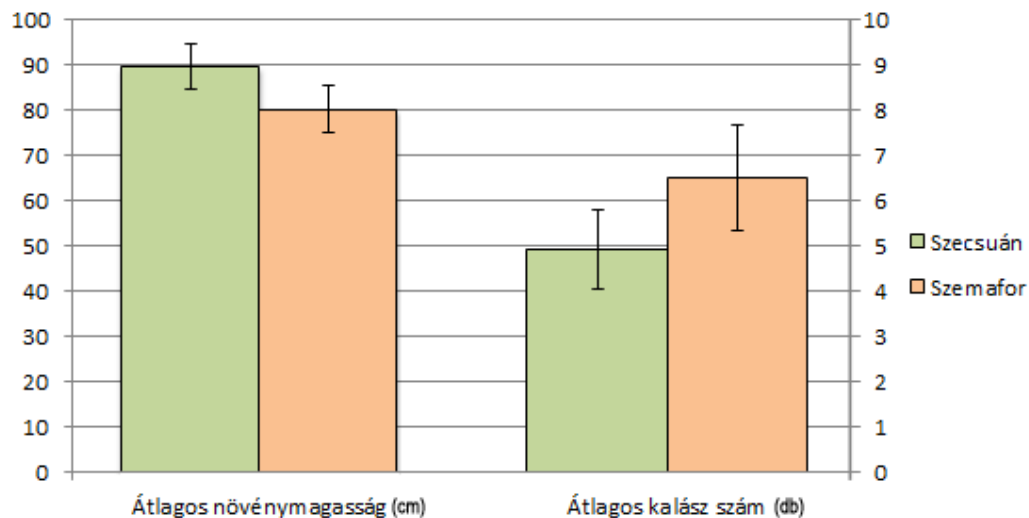
kontroll: UPP, univerzális növény-specifikus primer pár (Paolacci és mtsai. 2009)

A F2BC1 populációból az apai genom bármely részét tartalmazó növényeket felneveltük, majd öntermékenyítettük, és az így kapott szelektált mono- vagy diszómás addíciós vonalakat tartalmazó nemzedéket tételenként későbbi vizsgálat céljából megőriztük.

#### 4.3.5 Új búza dihaploid (DH) vonalak előállítása

Az árpa kromoszómát nem tartalmazó DH növények (ld. 4.3.3.5 fejezet, **8. táblázat**) utódait elvetve DH populációkat állítottunk elő, és ezek egyedeit összehasonlítottuk a 'Szecsuán' genotípussal. A gametoklonális variabilitás következtében létrejött új genetikai háttérű egyedek közül megpróbálkoztunk a kiindulási populációnál kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező, homozigóta vonalak kiválogatásával. Mivel eredetileg minden egyed árpával való termékenyítésből származott (csak utólag elveszthette az apai genomot), ezért feltételeztük, hogy az új genotípusok megőrzik a jó keresztezhetőséget. A 2 éves kísérlet során kiválasztottunk egy DH vonalat, amelyik a morfológiailag heterogén 'Szecsuán' genotípushoz hasonló mértékben

keresztteződik árpával (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 (növénymagasság, növényenkénti kalász szám) a szülőnél jobb paraméterekkel rendelkezik (**18. ábra**). A ‘Szemafor’ elnevezésű DH vonal átlagosan 10 cm-rel alacsonyabb növésű ( $p < 0,002$ ) az eredeti ‘Szecsuan’ genotípusnál, ami jelentősen csökkenti az egyébként meglehetősen gyenge szárszilárdság miatti kalászveszteséget. Emellett az új DH vonalat a kiindulási genotípushoz viszonyítva szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) nagyobb bokrosodási hajlam jellemzi. A növényenként átlagosan kinevelt 1,5 kalász többlet az egy növényre eső fitotroni és üvegházi nevelési költségek csökkentése szempontjából bizonyult hasznos tulajdonságnak, és egyben megnövelte az egy növényre jutó embrió kihozatalt is. A DH vonalak utódelemzését más potenciálisan hasznos növény esetében is elvégezzük: jelenleg további 25 DH vonal vizsgálata van folyamatban, amelyeknél az elsődleges cél az árpával való keresztezhetőség növelése.



**18. ábra.** A ‘Szecsuan’ genotípus és az abból szelektált ‘Szemafor’ DH vonal átlagos magassága és bokrosodási hajlama. mintaszám: n=14

#### 4.4 Intergenerikus búza-árpa hibrid növények előállítása demetilációs kezeléssel

Eddigi tapasztalataink szerint a preparált szemkezdemények az embrió mellett sosem tartalmaztak kifejlett endospermiumot, ami arra enged következtetni, hogy az embrió abortiója és fejlődésbeli lemaradása az endospermium hiányával, ill. csökevényességével hozhatók összefüggésbe (nem pedig a megtermékenyülés elmaradásával). Ezt a feltevést erősíti az az ismeret is, hogy az endospermium fejlődését nagyban befolyásolja az anyai és az apai szülőktől öröklött DNS specifikus szakaszainak eltérő metilációs mintázata (Kinoshita 2007), ami távoli fajok párosodásakor csak tovább komplikálódhat (Thompson 1930; Adams és mtsai. 2000) (ld.

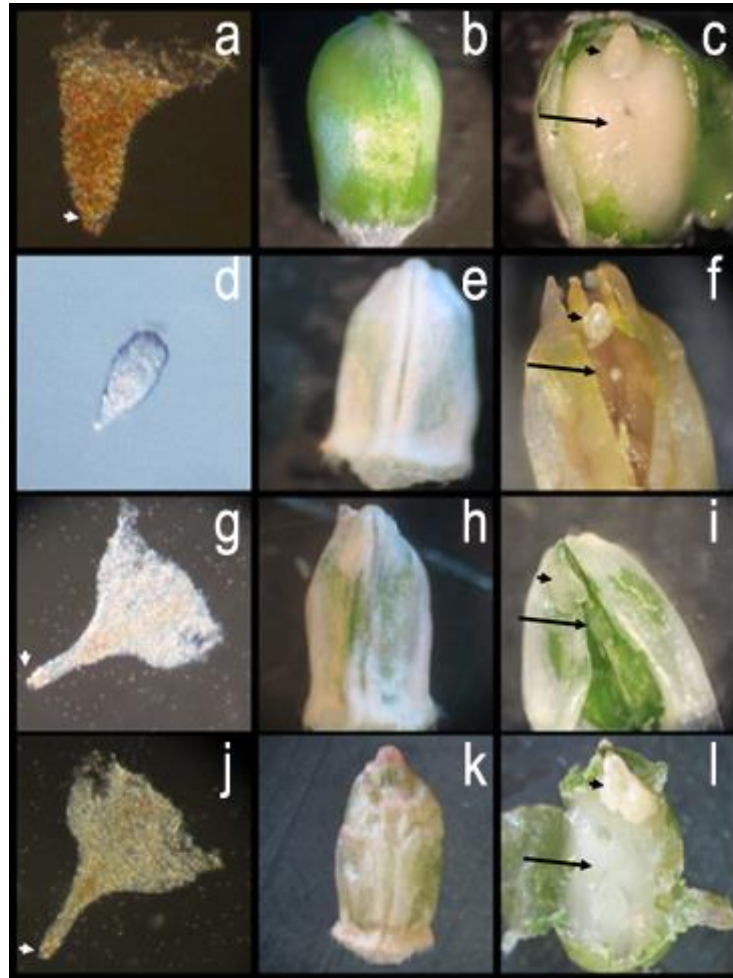
2.8 fejezet). Ennek felderítésére, és ezzel az endospermium kulcsszerepének bizonyítására állítottuk be azt a kísérletet, amelyben a sejtciklus során képződő új DNS szál metilációs mintázatának átíródását gátoltuk (Grossniklaus és mtsai. 1998). Külön figyelmet szenteltünk a megtermékenyülést követő első néhány napos időszaknak, amikor összehasonlítottuk a morfológiai és szövettani változásokat az árpa pollennel porzott vagy önporzott virágok ovulumaiban. Egyúttal választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy a zigóta és a sok sejtmagvas (cönocitikus) endospermium szintjén megvalósuló metiláción alapuló önvédelmi mechanizmus (Kinoshita 2007; Ishikawa és mtsai. 2011) megzavarásával befolyásolható-e az embrió kihozatal intergenerikus hibridekben?

A kísérletben árpával termékenyített búza növényeket demetilációs kezelésnek tettük ki, és ehhez két, a korábbi vizsgálatokban jól teljesítő anyai genotípust ('Chinese Spring' és 'Szecsuán') alkalmaztunk (ld. 4.3.1 és 4.3.2 fejezetek), a porzásokat pedig a 'Morex' árpafajtával végeztük. A metiláción alapuló önvédelmi mechanizmus megzavarására legmegfelelőbb időpont megválasztása érdekében három csoportot alakítottunk ki: az anyanövények kezelését két csoport esetében eltérő időben (meiózisban és 1 nappal a megporzást követően) alkalmaztuk, míg a harmadik csoportnál a kezelést az apaként szolgáló növények kalászain végeztük el szintén meiózis állapotban. A demetilációs kezelés mellett továbbra is alkalmaztuk a porzást követő napon az anyai szövetek fejlődését támogató 2,4-D kezelést. Minden kezelést 20-20 véletlenszerűen kiválasztott kalászon végeztünk el, kiegészítve csoportonként 15-15 öntermékenyített és egyébként azonos módon kezelt kontroll kalással. A kísérletet mindig az azonos kezelést kapott öntermékenyített kontroll csoport kalászához hasonlítva értékeltük ki, továbbá összehasonlítási alapként a csak 2,4-D kezelésből származó adatokat is felhasználtuk.

#### **4.4.1 Fiatal (3-6 napos) búza-árpa hibrid szemkezdemények fénymikroszkópos vizsgálata**

A szemkezdeményben zajló folyamatok követéséhez a különböző kezelést kapott kalászokból 5 nappal a megporzást követően mintát vettünk, amelyek szemkezdeményeit sztereomikroszkóp alkalmazásával hasonlítottuk össze. Mivel az 5 napos szemkezdeményben a szövetek kis mérete és áttetszősége miatt közvetlenül nem voltak jól láthatóak a különbségek, ezért a továbbiakban az ezekből preparált embriózsákokat izoozmotikus izoláló oldatban figyeltük meg. Az árpával porzott, preparált ovulumok jelentős részében találtunk embriót, amelyek fejlettségben nem különböztek láthatóan a kontroll csoport öntermékenyítésből származó embrióitól (**19. ábra/a,d,g,j** nyíllal jelölve).

Az endospermiumok tekintetében viszont már jelentős különbség volt tapasztalható. Míg az öntermékenyített ovulumokban az endospermiumnak az embrióval közvetlen kapcsolatban lévő transzfer régió tömött, több sejtsor vastagságú struktúrát alkotott (**19. ábra/a**), addig az árpa pollennel termékenyített kezelt minták nagy részében egyáltalán nem (**19. ábra/d**) vagy csak kezdetleges sejtes szerkezetű endospermiumot találtunk, amely többnyire egy sejtsor vastagságú volt, és az embrió domború oldalához kapcsolódó vékony nyaki részből állt (**19. ábra/g,j**).



**19. ábra. Búza-árpa hibrid embriók és endospermiumok fejlődése demetilációs kezelés hatására.**

a,d,g,j: izolált 5 napos embrió (nyílhegy) és endospermium, b,e,h,k: 12 napos szemkezdemények, c,f,i,l: embrió (nyílhegy) és endospermium (nyíl) 14 napos szemkezdeményekben; a,b,c: öntermékenyített, d,e,f: árpával termékenyített kezeletlen, g,h,i,j,k,l: árpával termékenyített demetilációs kezelésnek alávetett növények embriói, endospermiumai, ill. szemkezdeményei

A részletes szövettani vizsgálat érdekében 3 és 6 nappal a megporzást követően mindkét csoportból 3-3 kalász szemkezdeményeit paraformaldehides oldatban fixáltuk, majd gyantába való beágyazást követően 1  $\mu\text{m}$  vastagságú, félvékony metszeteket készítettünk, amelyeket hisztokémiai festés után fénymikroszkóppal részletesen megvizsgáltunk. Összehasonlítottuk az öntermékenyített vagy az árpa pollennel termékenyített és egyaránt demetilációs és 2,4-D

kezelést kapott búza szemkezdemények tartalmát, különös tekintettel az embrió és az endospermium korai fejlődésére (**20. ábra**).

Megállapítottuk, hogy 3 nappal a megporzást követően az öntermékenyített kontroll és a demetilációs kezelést kapott termőkben található embriók méretében és fejlettségében nem volt jelentős eltérés. Az embriók mindkét esetben átlagosan 10-20 sejtből álltak, és 50-60 µm hosszúságú csepp alakot vettek fel (**20. ábra/A,B**).

Az anyai szövetek morfológiájában látható volt némi különbség, ami leginkább a 2,4-D grádiens hatásának volt betudható. Megfigyeltük, hogy a kezelt kalászokban a legintenzívebben mindig az injekció helyéhez legközelebb található alsó szemkezdemények nyúltak meg, majd a megnyúlás mértéke a kalászban felfelé haladva folyamatosan csökkenő tendenciát mutatott, szemben az öntermékenyített kalászokkal, ahol a szemkezdemények mérete mindig a kalászok közepén volt a legnagyobb.

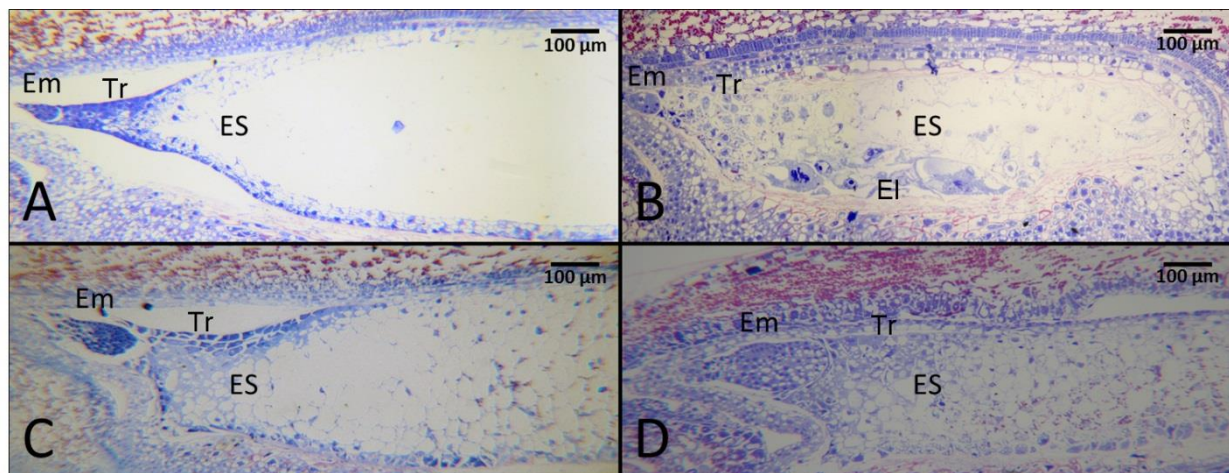
A legszembetűnőbb eltérés – hasonlóan az Arabidopsisnál leírtakhoz (Lafon-Placette és Köhler 2016) – ez esetben is az endospermium méretében és megjelenésében mutatkozott. A 3 napos öntermékenyített kontroll szemkezdeményekben az endospermium körül ekkorra kialakult a jól elkülönülő, sok citoplazmát tartalmazó sejtekből álló transzfer régió, ami az intenzív embriónövekedéshez szükséges tápanyag szállításában játszik szerepet (**20. ábra/A**) (ld. 2.4 fejezet). Az endospermium többi részét a megnövekedett nagy központi vakuólum töltötte ki, amelynek kerületén az endospermium szabad sejtmagjai egy vékony citoplazma rétegben helyezkedtek el egy sejtsor vastagságban, és kezdetét vette a nucelluszra merőleges irányú, antiklinális sejtfalak kialakulása a sejtmagok között, ami jellegzetes, kád alakú struktúrákat (alveolus) eredményezett (**20. ábra/A**).

Ezzel szemben az árpával termékenyített és kezelt szemkezdeményekben az embriók mellett nagyon ritkán találtunk endospermiumot, és amikor igen, akkor az esetek döntő többségében ez egy néhány sejtmagból és citoplazmából álló, csökevényes struktúra volt. Két alkalommal azonban találtunk olyan szemkezdeményeket, amelyekben az endospermium méretében és fejlettségében nem maradt el jelentősen az öntermékenyített kontrolltól, és egy ízben az endospermium méretében felülmúlta azt, továbbá szerkezetében is jelentősen különbözött a kontroll szemkezdeményekben talált endospermiumoktól (**20. ábra/B**). Ebben a szemkezdeményben az endospermium sejtesedése az alacsony sejtmagszám ellenére szinte teljesen befejeződött, csupán középen maradt néhány sejt, amelyek körül nem fejeződött be a sejtfalak szintézise, és a központi vakuólum irányába nyitottak voltak. A sejtmagok száma kevés, a sejtek mérete pedig többszöröse volt az öntermékenyített kontroll szemkezdeményekben megfigyeltékhez képest. További jelentős különbség volt, hogy míg a kontroll szemkezdeményekben a szinergidák és az ellenlábás sejtek minden esetben nyom nélkül

felszívódtak a 3. nap végére, az árpával termékenyített szemkezdeményekben az ellenlábás sejtek degradációja nem történt meg, ezeket a korán sejtesedő endospermium „körbenötte” (**20. ábra/B**)

A 6 napos szemkezdemények vizsgálata során ugyanilyen különbségeket figyeltünk meg. Az öntermékenyített szemkezdeményekben az embriók kb. 100  $\mu\text{m}$  hosszúságú soksejtes csepp formájú struktúrát alkottak (**20. ábra/C**). Az endospermium sejtesedése befejeződött, a transzfer régió jól elkülönült az endospermium többi részétől.

Az árpával termékenyített, kezelt szemkezdeményekben az embriók méretükben és megjelenésükben a kontroll embriókhoz hasonlóak voltak (**20. ábra/D**), de az endospermium mérete széles skálán változott a teljesen hiányzótól a teljesen lesejtesedett állapotig. A 3 napos szemkezdeményekhez hasonlóan a nagyméretű endospermiumokban itt is érzékelhető volt a kisebb fokú differenciáltság, és az ellenlábás sejtek maradványai ekkorra már eltűntek (**20. ábra/D**).



**20. ábra. Búza-árpa hibrid embriók és endospermiumok mikromorfológiája a demetilációs kezelés hatására.**

3 (A, B) és 6 napos (C, D) öntermékenyített kontroll (A, C), illetve kezelt (B, D) szemkezdemények hosszszetszeti képe

ES: endospermium, Em: embrió, Tr: transzfer régió, El: ellenlábás sejtek



#### 4.4.2 Két hetes hibrid szemkezdemények in situ fénymikroszkópos vizsgálata

A szemkötés és a kezelés hatékonyságának megállapításához 12-14 nappal a megporzást követően kigyűjtöttük a szemkezdeményeket. A szemkötés gyakoriságát a megnyúlt szemkezdemények és az összes megporzott virág hányadosaként határoztuk meg. Azokat a termőket, amelyek a 2,4-D hormonkezelés hatására nem nyúltak meg, a korábbi kísérletünk eredményei (ld. 4.2.1 fejezet) alapján nem-termékenyűltnek nyilvánítottuk (**10. táblázat**). A megnyúlás alapján történt megkülönböztetés megbízhatóságát tovább erősíti az a tény, hogy az önporzott kontrollban a virágok számához viszonyított szemkezdemények előfordulása (72,7%) nem tért el az árpával porzott virágokban található szemkezdemények gyakoriságától (74,8%). Mivel a különböző időszakokban és ivarban végzett kezelések szemkezdemény/virág arányai között nem találtunk szignifikáns különbséget, elvetettük azt a lehetőséget, hogy a nem megnyúlt szemkezdemények esetlegesen a kezeléseket követően pusztultak volna el (**10. táblázat**).

10. táblázat. A demetilációs kezelés hatása a szemkötésre

	Demetilációs kezelés	Porzás típusa	Virág (db)	Szemkezdemény (db)	Szemkötés (%)
'Szecsuán'	1 nap	x Árpa	680	383	56,3
		Kontroll	250	192	76,8
	Anyai meiózis	x Árpa	352	280	79,5
		Kontroll	423	284	67,1
	Apat meiózis	x Árpa	314	225	71,7
		Kontroll	163	117	71,8
'Chinese Spring'	1 nap	x Árpa	204	170	83,3
		Kontroll	240	191	79,6
	Anyai meiózis	x Árpa	172	130	75,6
		Kontroll	264	209	79,2
	Apat meiózis	x Árpa	56	46	82,1
		Kontroll	200	124	62,0
Összesen			3318	2351	73,8±8
	Árpa porzások szemkötési átlaga (%)				74,8
	Kontroll porzások szemkötési átlaga (%)				72,7

A szemkezdemények felszínét sterilizáltuk, majd fénymikroszkóp alatt, a háti oldalon ejtett hosszanti bemetszést követően szétnyitottuk, és belülről megvizsgáltuk azokat. Feljegyeztük a szemkezdeményben talált embriók és endospermiumok számát, valamint ezek méretét és morfológiáját. Az árpa porzásból származó szemkezdeményeket az azonos kezelést kapott, önporzott szemkezdeményekhez hasonlítottuk. Megállapítottuk, hogy 12-14 nappal a megporzást követően a kétféle porzásból származó szemkezdemények között már felnyitás előtt, jelentős méretbeli különbség tapasztalható. Míg az öntermékenyűlt szemkezdemények teltebbek

és kemény tapintásúak (**19. ábra/b**), addig az árpa termékenyítésből származó szemkezdemények hosszúkásak, ráncos, aszott megjelenésűek és puha tapintásúak voltak (**19. ábra/e,h,k**). A hosszirányú metszést követően az öntermékenyített szemkezdeményekben azonnal előtűnt a fejlett, minden funkcionális szervvel rendelkező embrió és az egész szemkezdemény belsejét kitöltő endospermium (**19. ábra/c**). Ezzel szemben az árpaporzásból kapott 2351 szemkezdemény nagy része (81%) teljesen üres volt, és sem embriót, sem endospermiumot nem tartalmazott.

Azokban a szemkezdeményekben, amelyekben találtunk embriót (332 db), ezek 78,3%-a (260 db) – bár többnyire fejlett és jól elkülönülő csírapajzzsal (scutellum), rügyecskével és gyököcskével is rendelkeztek – méretében jelentősen elmaradt (**19. ábra/f**) az öntermékenyített szemkezdeményekben fejlődő társaiktól (**19. ábra/c**). Ezekben a szemkezdeményekben – a csak 2,4-D kezeléshez hasonlóan (ld. 4.2.1 fejezet) – sohasem találtunk az embrióhoz kapcsolódó endospermiumot: az egyetlen szórványos jel, amely arra utalt, hogy az endospermium fejlődése már megkezdődött (28 esetben, 8,4%), az a folyadékkal telt magházak hasi barázdája mentén előforduló apró, különálló és tömött sejtcsoportok jelenléte (**19. ábra/f**). Ugyanakkor 66 esetben (19,9%) olyan embriókat is találtunk, amelyek fejlettségben és méretben teljesen azonosak voltak az öntermékenyített, kontroll szemkezdeményekben található társaikkal. Ezek mellett az embriók mellett mindig találtunk legalább az embrió méretével azonos méretű kocsonyás szerkezetű endospermiumot, amely fejlettségében elmaradt a kontroll szemkezdeményekben fejlődő endospermiumoktól, de elégséges méretűre nőtt ahhoz, hogy támogatása mellett funkcióképes, a kontrollnak megfelelő méretű embrió fejlődhetett ki (**19. ábra/i**). Tovább menve, ugyan csak négy esetben (1,2%), de a fejlett embrió mellett nagy, az egész szemkezdeményt kitöltő, az öntermékenyült kontrollhoz hasonló, bár attól kisebb méretű endospermium is fejlődött (**19. ábra/k,l**). Az ilyen szemtermések az érést követően ráncosra száradtak, de a csíranagyalom megtörése után nedves szűrőpapíron önállóan kicsíráztak, majd életképes növényé fejlődtek. Két esetben (0,6%) a szemkezdemények belsejében az endospermium helyén egy másik embriószerű képlet (embrioid) fejlődött (**11. táblázat**).

**11. táblázat. Endospermium fejlődés a demetilációs kezelések hatására**

	Endospermium fejlettsége					Összes
	Nem volt	Csőkevényes	Részleges	Csíráképes	Embrioid	
Előfordulás (db)	232	28	66	4	2	332
Gyakoriság (%)	69,9	8,4	19,9	1,2	0,6	100



#### 4.4.3 Szemkötés és embrió kihozatal meghatározása

A különböző időpontokban végzett demetilációs kezelések sikerességének megállapításához az embriók kimentése után meghatároztuk a szemkezdemények számához viszonyított embrió kihozatalát. A szemkezdemények és a megporzott virágok hányadosa (70,5%, **10. táblázat**) megegyezett a korábbi, 2,4-D kezelésben kapott aránnyal (72,6%): így megállapítottuk, hogy a szemkötésben nincs különbség a csak 2,4-D-t vagy emellett demetilációs kezelést is kapott növények között. Mivel a demetilációs kezeléstől azt vártuk, hogy késlelteti az endospermium fejlődés terminációját (ld. 2.9.2 fejezet), megnövelve ezzel az életképes embriók számát, ezért az egyes demetilációs kezelések hatására fejlődő embriók szemkezdeményekre vetített arányát (az embrió kihozatalát) a kizárólag 2,4-D kezeléssel elérthez hasonlítottuk (**12. táblázat**).

**12. táblázat. Az eltérő időpontban végzett demetilációs kezelések hatása a szemkötésre és az embrió kihozatalra**

Genotípus	Kezelés típusa	Virág (db)	Szemk. (db)	Szemk./Virág (%)	Embrió (db)	Embrió/Szemk. (%)	Embrió/Virág (%)
'Szecsuán'	Demet. 1 nap	680	383	56	88	23	13
	Demet. anya mei	352	280	80	88	31	25
	Demet. apa mei	314	225	72	92	41	29
	2,4-D 1 nap	285	233	82	45	19	16
	Demet. 1 nap	204	170	83	24	14	12
'Chinese Spring'	Demet. anya mei	172	130	76	31	24	18
	Demet. apa mei	56	46	82	3	7	5
	2,4-D 1 nap	1014	710	70	31	4	3

szemk.: szemkezdemény, aláhúzva: az embrió kihozatal értékei, **félkövén**: a legeredményesebb kezelések

Megállapítottuk, hogy az embrió kihozatal mindkét genotípusban és valamennyi demetilációs kezelésnél meghaladta a (kizárólag 2,4-D kezelést kapott) kontroll értékeit. A legszembetűnőbb különbséget a várakozásnak megfelelően (Schatlowski és mtsai. 2014) (ld. 2.9.1-2 fejezetek) a meiózisban kezelt 'Morex' pollennel termékenyített 'Szecsuán' esetében kaptuk: a szemkezdeményekre vetített 41%-os embriókihozatal több, mint kétszerese volt a csak 2,4-D-vel kezelt virágokban fejlődő embriók gyakoriságának (19%). Az anyanövények meiózisban történt demetilációs kezelése 31%, míg megporzás után 1 nappal történt kezelése 23%-os embrió kihozatalt eredményezett. A 'Chinese Spring' esetében hasonló volt a reakció: mindhárom kezelésre jelentősen növekedett az embrió kihozatal. A csak 2,4-D-vel kezelt, kontroll csoport 4%-os embrió kihozatalához képest a megporzást követő napon végzett demetilációs kezelésnél 14%, az anyanövények meiózisban történt kezelésénél pedig 24% volt az embriókihozatal. A pollenadó növények meiózisban történt demetilációs kezelése 'Chinese Spring' esetében csak 3%-os növekedést eredményezett, de itt meg kell említeni, hogy a szülők eltérő virágzási ideje miatt ezzel a genotípussal jóval kevesebb keresztezést tudtunk végrehajtani.

A mindössze két kalászból származó szemkezdemények száma (46) meglehetősen alacsony volt ahhoz, hogy erről a kezelésről megbízható képet kapjunk. Az eltérő virágzási idő, valamint a ‘Szecsuán’ genotípusénál szerényebb keresztezhetőség együttesen hozzájárult ahhoz, hogy a ‘Chinese Spring’ búzát a későbbiekben keresztezési partnerként nem alkalmaztuk.

#### 4.4.4 Növényregeneráció

A kimentett embriókat N6D növényregeneráló táptalajra helyeztük, majd meghatároztuk a kezelt virágok számára vetített növény kihozatalt, továbbá a funkcióképes embriók arányát, amelyet a növénné fejlődött és a kimentett embriók hányadosaként kaptunk meg. A vizsgálat során a két anyai genotípust és a demetilációs kezelések összesített értékeit összehasonlítottuk egymással, illetve a korábbi kontroll kísérlettel (**13. táblázat**).

**13. táblázat. Összesített embrió- és növény kihozatal a demetilációs kezelések hatására**

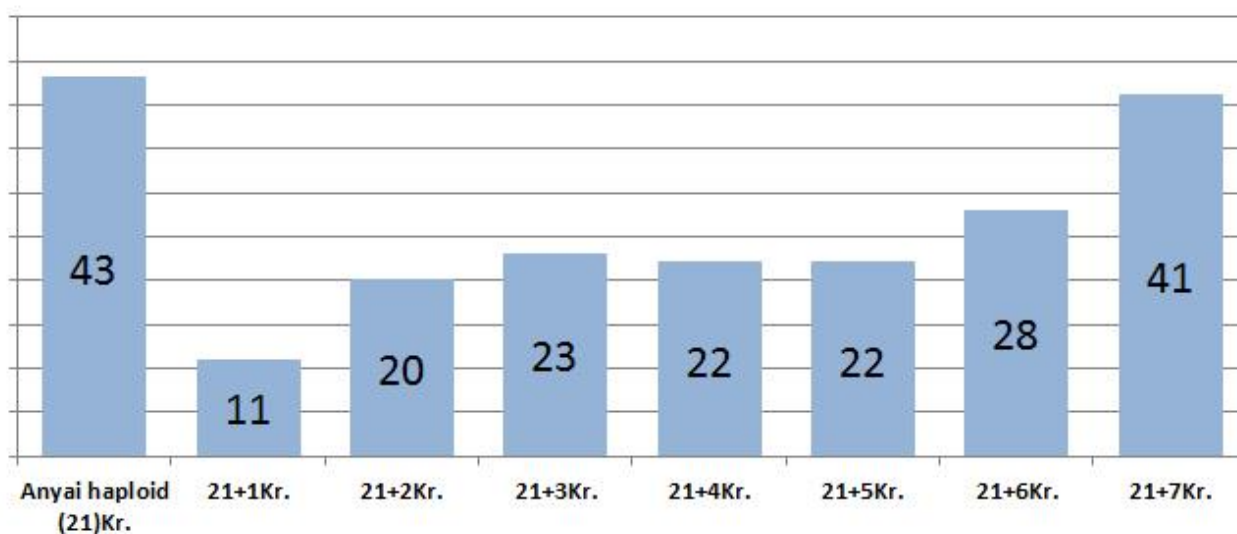
Genotípus	Kezelés típusa	Virág (db)	Szemk. (db)	Embrió (db)	Embrió/Szemk. (%)	Növény (db)	Növény/Embrió (%)	Embrió/Virág (%)	Növény/Virág (%)
‘Szecsuán’	2,4-D	285	233	45	<u>19</u>	40	89	16	14
	Demet. + 2,4-D	1346	888	268	<u>30</u>	210	78	20	<b>16</b>
‘Chinese Spring’	2,4-D	1014	710	31	<u>4</u>	23	74	3	2
	Demet. + 2,4-D	432	346	58	<u>17</u>	15	26	13	<b>3</b>

szemk.: szemkezdemény, aláhúzva: az embrió kihozatal értékei, **félkövénen**: a legmagasabb növény kihozatal

A ‘Szecsuán’ és a ‘Chinese Spring’ egymáshoz viszonyított keresztezhetősége az árpával szinte teljesen megegyezett a korábbi eredményekkel (ld. 4.3.2 fejezet): a ‘Szecsuán’ a korábbi 14%-hoz hasonlóan 16%-ban, a ‘Chinese Spring’ pedig a korábbi 2,3%-hoz hasonlóan 3%-ban eredményezett életképes növényeket. A növényregenerálás eredményeképpen 210 db ‘Szecsuán’ és 15 db ‘Chinese Spring’ háttérű növényt ültettünk ki, amelyeket további vizsgálatoknak vetettünk alá (ld. 4.4.4 fejezet). A két fajta közötti legjellegzetesebb különbség a funkcióképes embriók számában mutatkozott meg: míg a ‘Szecsuán’ anyanövényekből kimentett embriók 78%-ban, addig a ‘Chinese Spring’ embriók csak 26%-ban fejlődtek életképes növényekké (**13. táblázat**).

#### 4.4.5 Az apai genom öröklődésének vizsgálata a kezelések függvényében<sup>3</sup>

Az F1 nemzedék genetikai hátterének, valamint a különböző kezeléseknek az apai genom megmaradására gyakorolt esetleges hatásainak megvizsgálásához a kiültetett növények leveleiből DNS-t izoláltunk. Ezt templátként felhasználva, az árpa minden egyes kromoszómájára specifikus 7 primer párral, valamint a reakció működésének ellenőrzésére bevált Ta30797 (UPP) primer párral (**1. táblázat**) PCR-rel meghatároztuk a növények molekuláris kariotípusát. A kísérletet a 210 db, demetilációs kezelést kapott ‘Szecsuan’ × ‘Morex’ növényen végeztük el, és megállapítottuk, hogy a növények 79,5%-a (167 db) tartalmazott legalább egy apai kromoszómát, 20,5%-ukban (43 db) ellenben az összes apai kromoszóma eliminálódott. Ez az anyai haploid gyakoriság jóval alacsonyabb és kedvezőbb, mint a csak 2,4-D kezeléssel kapott érték (76,2%, ld. 4.3.3.4 fejezet). A vizsgált növények 19,5%-ának (41 db) genomjában mind a 7 árpa kromoszóma megtalálható volt, míg 60% (126 db) csak részben őrizte meg az apai genomot (**21. ábra**).



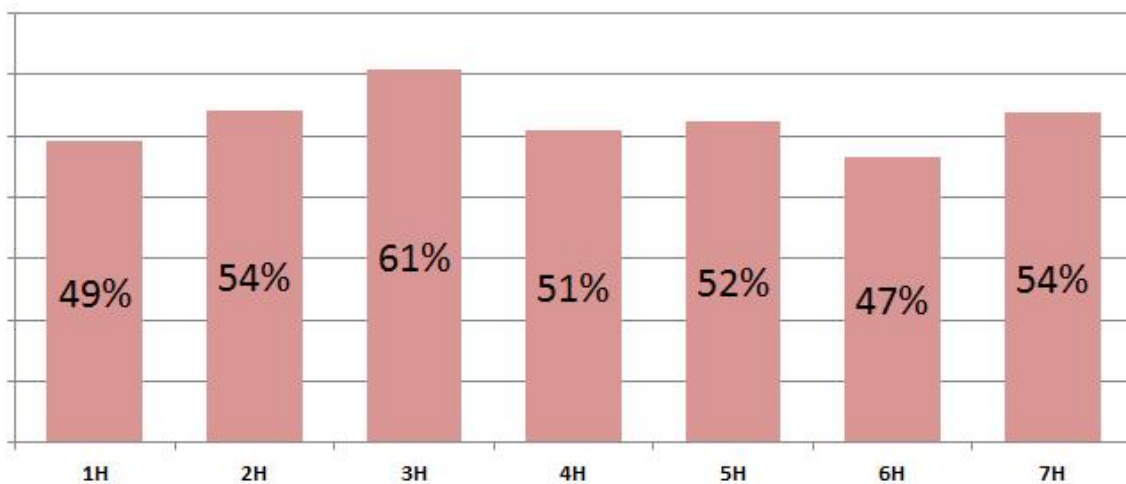
**21. ábra.** Búza-árpa F1 hibridek genomösszetételének megoszlása az árpa kromoszómák száma szerint. (n=210)

A (részleges) hibrid növényekben az egyes apai kromoszómák előfordulása hasonló volt a populációban. Legkevesebbszer a 6H (47%), és legtöbbször a 3H kromoszóma (61%) adott pozitív eredményt: a többi kromoszóma a két érték közötti gyakorisággal fordult elő a hibridek genomjában (**22. ábra**). Tizenegy esetben fordult elő, hogy a növény csak egyetlen apai kromoszómát tartalmazott (**21. ábra**): ez négy alkalommal a 3H, háromszor a 4H, és két-két

<sup>3</sup> A fejezetben közölt adatok az alábbi publikáció részét képezik:

Polgári D, Mihók E, Sági L Chromosome constitution and distribution in the first large-scale population of wheat-barley (*Triticum aestivum* L. × *Hordeum vulgare* L.) hybrids. (kézirat, bírálat alatt)

ízben az 5H és a 7H kromoszóma volt. Az 1H, a 2H és a 6H soha nem fordult elő egyedüli apai kromoszómaként a hibridek genomjában.



22. ábra. Az egyes árpa kromoszómák előfordulási gyakorisága búza-árpa F1 hibridekben. (n=773)

A kapott adatokat a különböző kezelések függvényében külön is értékeltük (**14. táblázat**). Az apai genom genetikai információját megőrző utódok gyakorisága abban a két csoportban volt a legmagasabb, ahol a demetilációs kezelés a meiózis idején történt. Mind az anya, mind az apa kezelése az utódok 86%-ában megtartott legalább 1 kromoszómát az idegen genomból, de még a termékenyítést követő napon történt kezelés 68%-os értékével is jóval magasabb volt a hibridek gyakorisága, mint a kontroll csoportnál, ahol csak a szemkezdemények fejlődését indukáló 2,4-D-vel történt kezelés (**14. táblázat**).

14. táblázat. Árpa kromoszómák előfordulása a 2,4-D és demetilációs kezelésekre hatására

Kezelés típusa	Tesztelt növények	Kromoszóma specifikus molekuláris markerek							Hibridek	
		1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H	(db)	(%)
Anyai mei. demet.	73	37	41	45	40	36	38	47	62	86
Apai mei. demet.	61	23	36	41	36	31	30	30	51	86
Demet. 1 nap	76	41	35	40	29	42	29	34	52	68
2,4-D 1 nap	36	5	6	5	6	5	4	3	8	22
Összesen	246	106	118	131	111	114	101	114	173	

félkövérien: a legeredményesebb kezelések

#### 4.4.6 A keresztezhetőség apai genotípustól függésének vizsgálata

A keresztezhetőség apai genotípus függőségének vizsgálatához tesztkeresztezéseket végeztünk, amelyekben a legjobban keresztezhető ‘Szecsuán’ búzát további két eltérő eredetű és tulajdonságú árpával poroztuk. A ‘California Mariout’ fajtát rendkívüli szárazságtűrése (Hendry 1919), a ‘Golden Promise’ sörárpát pedig jó szövettenyészési reakciója miatt választottuk a kísérlet tárgyául. A genotípus függőség meghatározásához a szemkötést, az embrió és növény kihozatalt a kizárólag 2,4-D kezelést kapott ‘Szecsuán’ × ‘Morex’ kombináció adatsoraihoz hasonlítottuk (**15. táblázat**). Megállapítottuk, hogy mindkét genotípus keresztezhető a búzával, továbbá szemkötésben (ál- szemkezdemény/virág) sem mutatkozott jelentős különbség: mindhárom esetben a korábbi kísérletek során tapasztalt 72,6%-os átlaghoz közeli értéket kaptunk (ld. 4.4.3 fejezet). Embrió kihozatal szempontjából a ‘California Mariout’ a másik két genotípushoz képest ugyan több, mint kétszeres eredményt produkált, de ezt a kiugró értéket az alacsony mintaszámra való tekintettel nem tekintettük mérvadónak. A jövőre nézve mindenképp szükségesnek tartjuk a vizsgálat további genotípusokkal, valamint nagyobb mintaszámmal való megismétlését.

**15. táblázat. Három árpa fajta keresztezhetősége a ‘Szecsuán’ búzával**

Anya	Apa	Virág (db)	Szemk.(db)	Embrió(db)	Embrió/Szemk. (%)	Növény (db)	Növény/Embrió (%)	Szemk./Virág (%)	Embrió/Virág (%)	Növény/Virág (%)
	‘Morex’	285	233	45	<u>19</u>	40	89	82	16	<b>14</b>
‘Szecsuán’	‘Calif. Mar.’	24	17	7	<u>41</u>	5	71	71	29	<b>21</b>
	‘Golden Pr.’	46	37	5	<u>14</u>	4	80	80	11	<b>9</b>

‘Morex’ kontroll: korábbi kísérlet adatai (ld. 4.3.2 fejezet), szemk.: szemkezdemény, aláhúzva: az embrió kihozatal értékei

#### 4.4.7 A hibrid genetikai háttér fixálása

##### 4.4.7.1 Genomduplikáció

A molekuláris elemzést követően kísérletet tettünk az átörökölt apai genom fixálására, amihez a korábban szerzett tapasztalatok fényében (ld. 4.3.4 fejezet) az in vivo kolchicin kezelést választottuk. A kezelést 210 növényen 4-5 leveles állapotban hajtottuk végre (**23. ábra/a**). A kezelés után kihajtó növényeket újra molekuláris markerelemzésnek vetettük alá ellenőrizendő, hogy az egyedfejlődés során történt-e változás az apai kromoszómák számában, ezt követően pedig a genom méret meghatározásával a kezelés sikerességét is ellenőriztük (**16. táblázat**).

16. táblázat. A genomduplikációt követő molekuláris markeres és áramlási citométeres elemzés összesítése

Vizsgált minta	Kromoszómaspecifikus markerek							Kontroll	Citometria G1 Csúcs	Árpa kr. (db)
	1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H			
'Morex'	X	X	X	X	X	X	X	+	43	7
'Szecsuán'	-	-	-	-	-	-	-	+	333	0
1X/2	-	-	X	-	X	-	-	+	NT	2
117/1	-	X	X	-	X	-	-	+	139	3
36/4/1	-	-	-	X	X	X	-	+	135	3
3X/3	X	-	X	X	X	-	-	+	141	4
20/3	-	X	X	-	X	-	X	+	134	4
2X/2	X	-	X	X	X	-	X	+	154	5
114/2	X	X	X	-	X	X	-	+	135	5
117/5	X	X	-	X	X	X	-	+	132	5
254/1	-	X	X	X	X	-	X	+	NT	5
1X/1	X	X	X	-	X	X	X	+	168	6
17/1	X	X	X	-	X	X	X	+	173	6
114/7	X	X	X	X	X	X	-	+	133	6
114/8	X	X	X	X	X	-	X	+	156	6
236/1	X	X	X	X	-	X	X	+	NT	6
1X/5	X	X	X	X	X	X	X	+	143	7
32/7	X	X	X	X	X	X	X	+	147	7
3X/6	X	X	X	X	X	X	X	+	135	7
34/4	X	X	X	X	X	X	X	+	NT	7
<b>109/2</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>+</b>	<b>345</b>	<b>7(x2)?</b>
112/3	X	X	X	X	X	X	X	+	141	7

Kontroll: növény-specifikus (UPP) primerek amplifikációjának sikere, **félkövéren**: a 109/2 növény jellemzői

A kolchicin kezeléssel átesett növények jelentős része elpusztult az első 3 hét során, és mindössze 20 db (9,5%) növény regenerálódott. A molekuláris marker elemzés eredményei alapján mindegyik növény hordozta az apai genom egy részét. Hat növény (30%) az apai genom valamennyi kromoszómájára pozitív jelet adott, míg öt egyedben (25%) csak egyetlen árpa kromoszóma hiányzott.

A duplikáció sikerességének meghatározásához áramlási citométerrel megmértük a növények genom méretét, amit a diploid anyai genotípus méretéhez hasonlítottunk. Megállapítottuk, hogy a genom duplikációja mindössze egyetlen növény, a 109/2 esetében volt sikeres, ami 0,5%-os hatékonyságot jelent a kiindulási populációhoz viszonyítva, és 5% a regeneránsokra nézve. Ez az alacsony hatékonyság a jövőben mindenképp egy javított duplikációs eljárás kidolgozását teszi szükségessé.

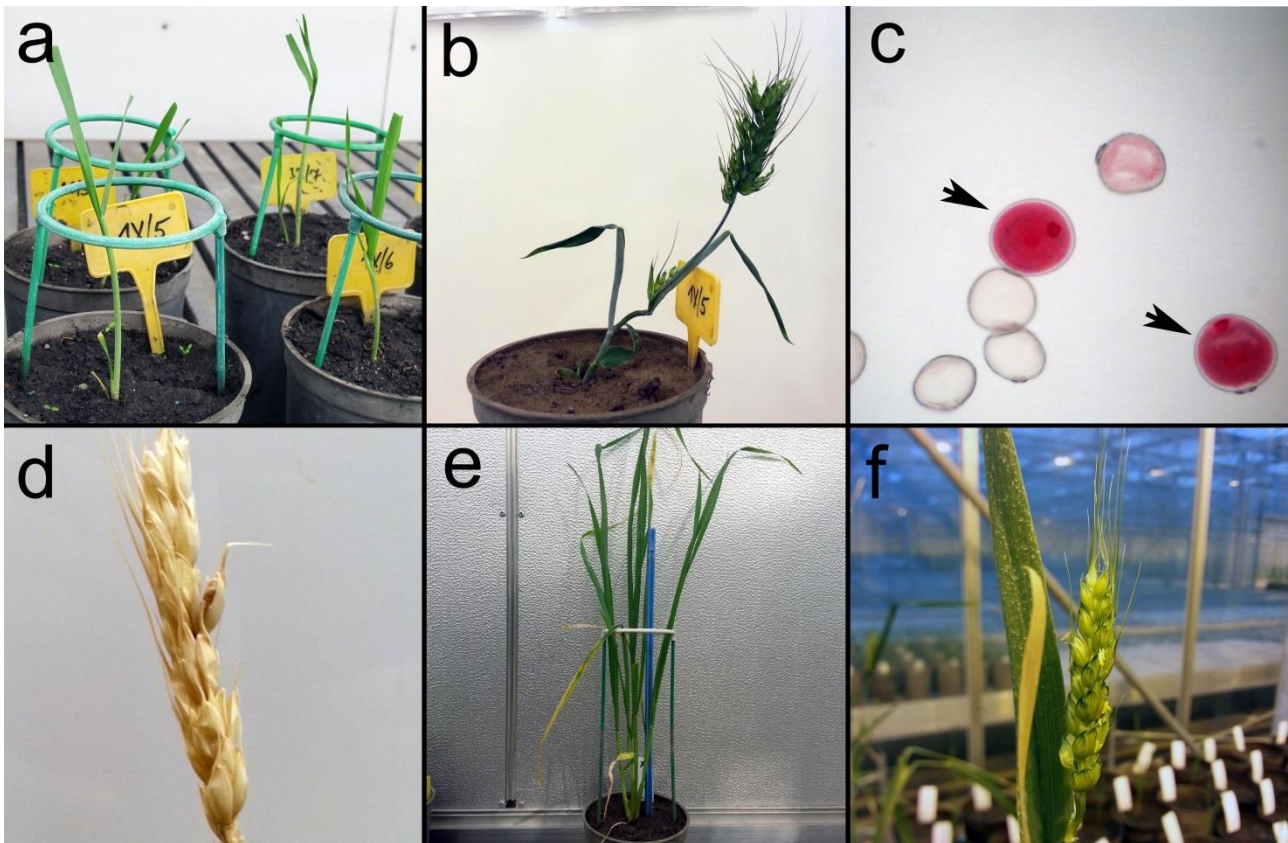
A fixált gyökércsúcsokból készített preparátumok fluoreszcens GISH vizsgálata egyrészt megerősítette a markeres elemzés eredményeit, másrészt rávilágított arra, hogy a duplikáció

legfeljebb csak a növény bizonyos részeiben következhetett be. A 109/2 F1 növény gyökércsúcsában található sejtekben ugyanis a 21 anyai kromoszóma mellett 9 apai kromoszómát találtunk. (**24. ábra/a**). A kiegészítő (GAA)<sub>7</sub> mikroszatellit próbával (Szakács és mtsai. 2013) végzett in situ hibridizáció (**24. ábra/b**) után megállapítottuk, hogy a 109/2 növény a 2H, 4H, 5H, 6H és 7H apai kromoszómából 1-1, míg az 1H és a 3H kromoszómából 2-2 példánnyal rendelkezett, tehát a teljes anyai és a teljes haploid apai genom mellett 2 db apai extra kromoszómát tartalmazott. A jelenséget az F1 növény embriogenezisének korai szakaszában lejátszódó mitotikus defektusokkal magyaráztuk.

#### **4.4.7.2 A hibrid genotípus átörökítése a következő nemzedékbe**

A regeneránsokat a molekuláris vizsgálat eredményétől függetlenül felneveltük, majd virágzáskor a megjelenő kalászokat izoláltuk. A növényekre általánosságban jellemző volt a törpe növény, a rossz bokrosodási hajlam és a rendellenes kalázmorfológia (**23. ábra/b**), ami minden esetben sterilitással párosult. A citométeres vizsgálat alapján a duplikáción sikerrel átesett egyetlen növény, a 109/2 megjelenésében ugyan jobban emlékeztetett egy diploid növényre, de portokjai virágzáskor steril megjelenésűek voltak, és nem szórtak magukból virágporszemeket. A sterilitás megállapításához a kalászból portokokat preparáltunk, a pollent kigyűjtöttük, majd ecetsavas-kármin festést követően fénymikroszkóp alatt megvizsgáltuk. Bár a pollen nagy része rendellenes morfológiát mutatott, mert sem citoplazmát, sem sejtmagokat nem tartalmazott, nagyon kis számban (1-2%) normális, citoplazmával, keményítőszemcsékkel, csírapuval és három sejtmaggal rendelkező virágporszemek is előfordultak (**23. ábra/c**).





**23. ábra. Búza-árpa hibridek genomduplikációja és az utódnemzedék jellemzése.**

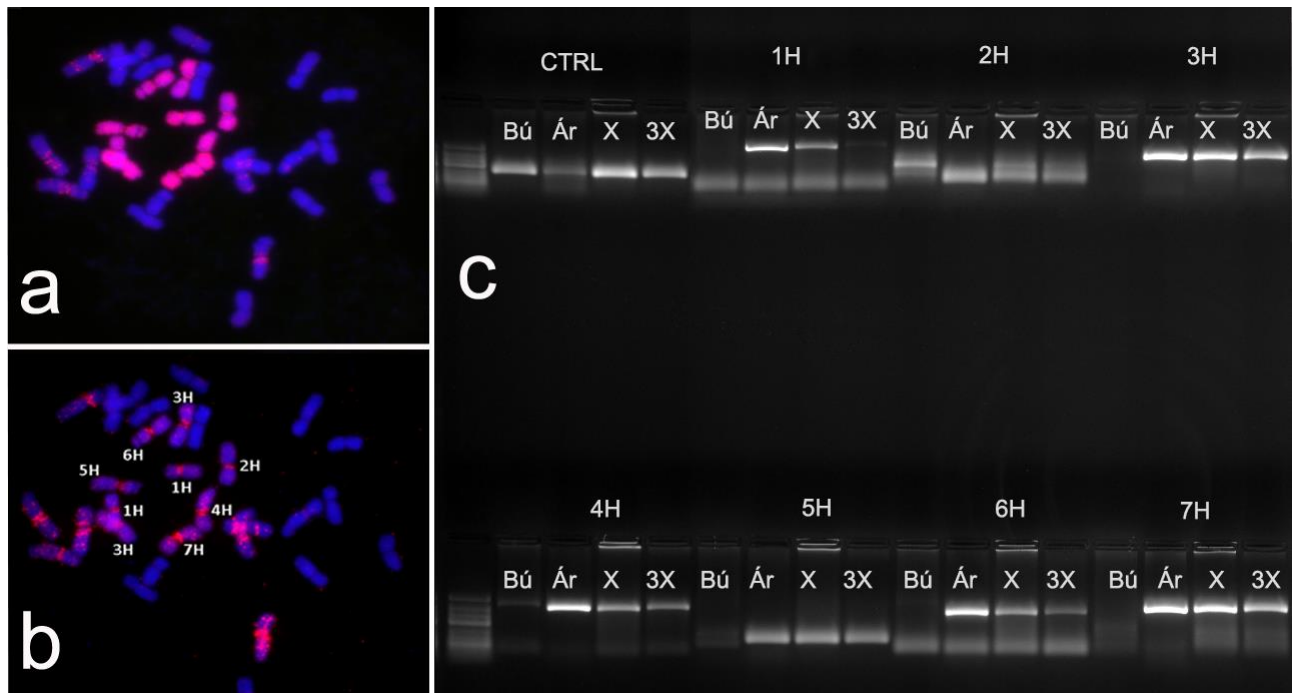
a: kolchicinnel kezelt növények, b: rendellenes kalázmorfológia, c: steril és normális (nyíllal jelölve) virágporszemek, d: szemkötés (109/2 kalász), e: F2 növény (109/2), f: fertilis F2 kalász (109/2)

Beérés után a kalászokban a várákozásnak megfelelően egyedül a 109/2 növénynél tapasztaltunk szemkötést: csak egy kalászban mindössze egyetlen szemtermést találtunk, ami csíráképesnek bizonyult (**23. ábra/d**), és belőle sikerrel fertilis (X jelű) növényt neveltünk (**23. ábra/e,f**).



#### 4.4.7.3 Az F1 nemzedék molekuláris vizsgálata

A csíranugalom megtörése után a fenti szemtermést kicsíráztattuk, majd DNS-t vontunk ki a fejlődő növény leveléből. A markerekkel ennek az X jelű növénynek a molekuláris kariotípusát a két szülői DNS-hez viszonyítva értelmeztük, továbbá kontrollként kiegészítettük egy 7 árpa kromoszómát tartalmazó növény (3X/6) DNS-ével (**24. ábra/c**). Megállapítottuk, hogy a 109/2-től származó egyetlen F2 növény az apai pozitív kontrollhoz hasonlóan minden kromoszóma markerre nézve pozitív eredményt adott, ugyanúgy, mint a 3X/6 kontroll DNS. A vizsgálatokat követően a növényt felneveltük, kalászeit izoláltuk, majd öntermékenyítettük (**23. ábra/e,f**), hogy az esetleges utódokban ellenőrizzük az apai genom öröklődését. Az F3 nemzedék molekuláris elemzése jelenleg is zajlik.



**24. ábra. Búza-árpa hibrid F1 és F2 nemzedékének molekuláris vizsgálata.**

- a: DNS marker elemzés, CTRL: kontroll, 1H – 7H: árpa kromoszóma-specifikus molekuláris markerek, Bú: búza, Ár: árpa, X: F2 és 3X: F1 hibrid növény, b: a 109/2 növény GISH elemzése, c: a 109/2 növény FISH mintázata; 1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H: az azonosított árpa kromoszómák



## 5. Következtetések és javaslatok

Az árpa pollennel termékenyített búza termőkben lezajló folyamatokat a pollennek a bibe felszínén történt megtapadása pillanatától a szemkezdemények két hetes koráig követtük, és összehasonlítottuk az öntermékenyített búza termőkből fejlődő szemkezdeményekkel. Minden meghatározó esemény vizsgálatához igyekeztünk megtalálni a megfelelő időpontot és módszert annak érdekében, hogy megbízhatóan azonosítsuk a hasonlóságokat és az esetleges különbségeket.

Vizsgálatainkban azokra a kulcseseményekre összpontosítottunk, amelyekről a távoli keresztezésekre vonatkozó szakirodalom alapján ismert, hogy a fajok közötti inkompatibilitás meghatározó tényezői (Pickersgill 1993). Ez kezdetben a pollen csírázása, majd a pollentömlő növekedése a bibe és a termő szöveteiben (Lange és Wojciechowska 1976), amihez mindkét szülői partner részéről számos feltételnek kell teljesülnie, amíg a pollentömlő eljut a csírapuig (Heslop-Harrison 1979; Hogenboom 1984; Serrano és mtsai. 2008). A következő eseménysorozat a pollentömlő behatolása a csírapun keresztül a szinergida sejtek filiform apparátusába, amit a szinergidákból származó specifikus szignálpeptidek irányítanak, majd a kibocsátott hímvarsejtek transzportja a célsejtek membránjáig, ami szintén egy sok lépcsős, a partnerek közt zajló bonyolult jelátviteli rendszeren alapuló kommunikáció végeredménye (Higashiyama és mtsai. 2002; Sprunck és mtsai. 2005). Végül az ivarsejtek fúzióját követően és a szülői genomok közötti kölcsönhatások eredményeként megindul az embrió és az endospermium fejlődése, amelynek önvédelmi mechanizmusa hatékony poszt-fertilizációs gátat alkothat az evolúciós értelemben téves megtermékenyülés kiküszöbölésére (Berger és mtsai. 2006).

### 5.1 A progámikus szakasz kulcskérdései

A búza bibéjén megtapadt saját és árpa pollen vizsgálata során megállapítottuk, hogy a tesztelt keresztezési kombinációban a két faj virágporszemeinek viselkedésében nincs jelentős eltérés. Megállapítottuk, hogy az árpa pollen a búza saját pollenjénél valamivel gyorsabban csírázott, ami összhangban van a búza és rozs pollenszemek vizsgálata során tapasztaltakkal (Jalani és Moss 1980). A termő meghatározott pontjain (bibepapillák, bibe, bibeszál) különböző időpontokban végzett szövettani vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az árpa pollenszemekből kihajtó tömlők a búzáéival teljesen megegyező módon fejlődtek: a vizsgált időpontokban bibefelszín és a csírapu közötti útvonal ugyanazon szakaszait érték el, mint

amelyeket a saját pollenszemekből kihajtó tömlők esetében figyeltünk meg. Az árpa pollentömlők morfológiai vizsgálata során sikerült igazolnunk, az idegen pollentömlők a sajátokéval megegyező viselkedését. Hasonlóan a búza × rozs keresztezések során korábban leírtakhoz (Lange és Wojciechowska 1976; Vishnyakova és Willemse 1994), a megtermékenyítési esemény vagy legalábbis a pollentömlők csírapun való behatolása a megporzástól számított 1 órán belül az idegen (árpa), és a saját (búza) pollenszemek tömlőinek esetében is bizonyíthatóan megtörtént (**25. ábra**). Az árpa pollen vitalitása az idő előrehaladtával a búza saját pollenjénél nagyobb mértékben csökkent ugyan, ám ez az eltérés nem befolyásolta a termékenyítés sikerességét, mivel az életképességbeli eltérés csak 1 órával a megporzást követően volt kimutatható, amikor az első pollentömlő már elérte a csíraput (ld. 5.1.2 fejezet).

### 5.1.1 A keresztezhetőség és a genotípus kapcsolata

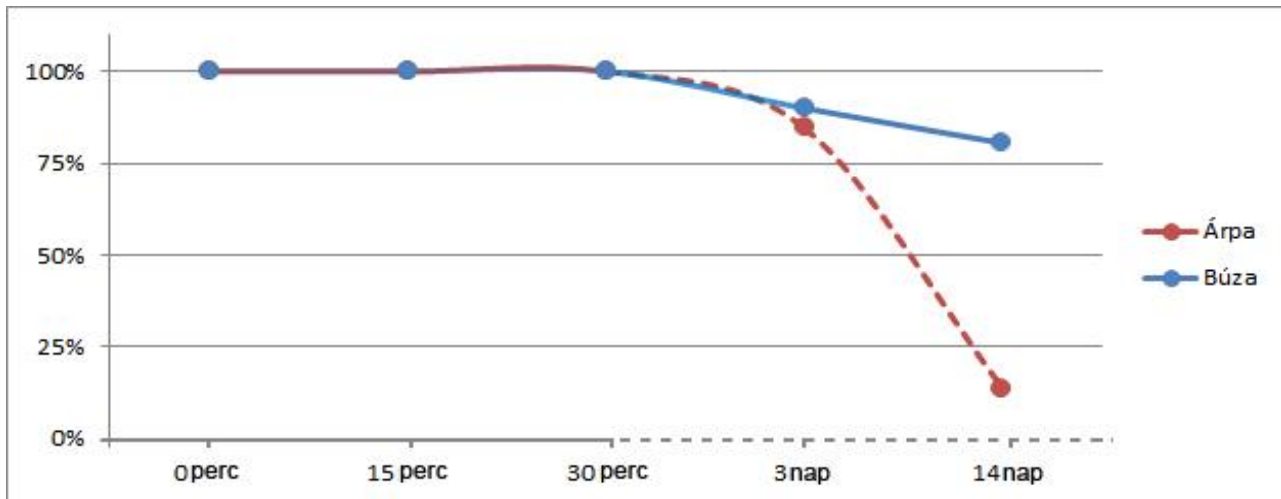
A búza keresztezhetősége szempontjából ismert, hogy a *Kr* lokuszokon található gének domináns alléljai negatívan befolyásolják az idegen pollentömlők növekedését (Lein 1943) és az árpa esetében is ismert a genotípus és a keresztezhetőség összefüggése (Taketa és mtsai. 1998). Az általunk tesztelt genotípus-kombinációban minden vizsgálati időpontban a búza kontrollal azonos arányban találtunk árpa pollentömlőket a termők meghatározott pontjain, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a búza × árpa hibridizáció esetében az esetleges progámikus inkompatibilitási faktorok a megfelelő genotípus választással jelentősen redukálhatóak, vagy akár nullára csökkenthetőek, mérsékelve ezáltal a prefertilizációs veszteséget. Mivel elsődleges célunk a petesejt aktiváció és az azt követő események vizsgálata volt, ezért a kísérleteket csak olyan genotípus-kombinációkkal végeztük el, amelyekről előkísérleteink és a szakirodalom alapján feltételeztük, hogy nagy arányban eredményeznek termékenyülést, és így elegendő számban biztosítanak embriót a posztgámikus események vizsgálatához. Ezért más genotípus-kombinációk esetében nem lehet kizárni, hogy a megfelelő pollentömlő hajtás és fejlődés, valamint az idegen pollen általi termékenyülés a búza-rozs keresztezésekhez hasonlóan erősen függhet mindkét szülő genotípusától.

### 5.1.2 Az idegen pollentömlő és a szinergidasejt kölcsönhatásai

Az idegen fajú keresztezések szempontjából második kritikus szakasz, a csírapu közelében, a pollentömlőknek a szinergida sejtek által irányított mozgásának vizsgálatához konfokális mikroszkópot alkalmaztunk, amelynek segítségével nyomon tudtuk követni a pollentömlőnek a csírapuhoz való megérkezését követő eseményeket. Más növényfajok ovulumainak részletes vizsgálatából tudjuk, hogy a pollentömlő – miután lehajtott a csírapu közelébe – a szinergida sejtek filiform apparátusának szignáljait követve hatol át azon, és ennek az összetett kölcsönhatásnak minimális zavara is a pollentömlők eltérülését okozza (Higashiyama és mtsai. 2002). Csak a tökéletes harmónia esetén valósul meg a pollentömlő csírapun keresztüli behatolása a szinergidába, felhasadása, majd a hímivarsejtek kibocsátása, és az aktin filamentumok általi transzportja a célsejtek membránjaihoz.

Megállapítottuk, hogy genetikai távolság ellenére az árpa pollentömlő a sajátjal azonos módon képes lehajtani a búza termő csírapujához, áthatolni rajta, majd a szinergidán való áthaladás után a kiszabaduló hímivarsejtek képesek megtermékenyíteni a búza nőivarú gamétáit. Következtéseinket két időpontban, 1 és 3 nappal a megporzást követően végzett összehasonlító vizsgálat eredményeire alapoztuk. Az eltérő termékenyítésből származó embriózsákokban mindkét vizsgálati időpontban inkább minőségbeli, mint mennyiségbeli különbségek mutatkoztak. Egy nappal a megporzást követően ugyan tapasztaltunk némi lemaradást az árpatermékenyítésből származó embriók és endospermiumok esetében, ami alapján arra következtethetünk, hogy a pollentömlő csírapun való belépése és az ivarsejtek fúziója közötti események lezajlásához az árpa termékenyítésnél hosszabb időre volt szükség. A 3 napos fúziós termékek száma nem tért el szignifikánsan az öntermékenyítettek 100%-os arányától, ami arra utal, hogy a csírapu közvetlen közelében lezajló kölcsönhatások, valamint az árpa hímivarsejteknek a szinergidán keresztül történő közvetítése ugyan lassabban zajlik le, de a nőivarú gaméták termékenyülése az árpa hímivarsejtjeinek közreműködésével is rendben megtörténik (**25. ábra**).

Megállapítottuk, hogy a vizsgált kombinációban a harmadik nap végéig nem volt számbeli különbség a megtermékenyítés gyakoriságában: a ‘Szecsuán’ szinergida sejtje sajátjaként ismerte fel a ‘Morex’ pollentömlőket, a kiszabaduló hímivarsejteket a petesejthez és a központi sejthez szállította, és megtörtént azok termékenyítése. Eredményeink jó egyezést mutatnak Laurie és Bennett (1988) megfigyeléseivel, akik hexaploid búza × köles keresztezések vonatkozásában dokumentálták a megtermékenyülés átlagosan 70%-os gyakoriságát.



25. ábra. Búza × árpa keresztezések (vörös vonal) eredményességének gyakorisága az öntermékenyített kontrollhoz (kék vonal) képest a porzástól eltelt idő függvényében.

folytonos vonal: általánosan tapasztalt értékek, szaggatott vonal: jelen munka alapján feltételezve,  
 0perc: életképes pollen az antéziskor, 15perc és 30perc: a pollentömlő lehajtása a bibeszálba, ill. a termőbe, 3nap: a globuláris embriók gyakorisága, 14nap: az éretlen embriók gyakorisága

## 5.2 A posztgámikus szakasz kulcskérdései

Az idegen fajúhibridek esetében általában kulcsfontosságú posztgámikus szakasz vizsgálatát ismételten két időpontban, 3 és 6 nappal a megporzást követően végeztük el, majd 14 nappal a megporzást követően preparáltuk a fejlődésnek indult szemkezdemények tartalmát. A 3 és 6 napos metszeteken már jelentős lemaradás mutatkozott az árpatermékenyítésből származó fúziós termékek fejlődésében, ami az endospermium esetében volt sokkal hangsúlyosabb. Még a 6 napos szemkezdemények embrióinak mérete sem különbözött jelentős mértékben az öntermékenyítésből származó embrióktól, azonban a sejtes endospermium az esetek döntő többségében teljesen hiányzott, vagy mindössze egy néhány sejtből álló csökevény formájában volt jelen az embrió szomszédságában.

Eredményeink a búza-árpa intergenerikus hibridek vonatkozásában megerősítik azt az általános tapasztalatot, miszerint a korai posztgámikus gátlás túlnyomó részt az endospermium fejlődési zavaiban nyilvánul meg, az embrióra is kiterjedő rendellenességet csak elvétve találni a szakirodalomban (Pickersgill 1993). Ezzel szemben feltűnő, hogy a normális fejlődésmentől való eltérés a posztgámikus szakasz későbbi fázisaiban fokozatosan áttérjed az embrióra is, majd az idegen fajú hibridekre jellemző módon a fúziós termékek fejlődése a megtermékenyítést követő 10 napon belül leáll. Mikroszkópos vizsgálataink eredményei alapján valószínűnek tűnik, hogy az eredetileg a vad típusúakkal azonos morfológiájú embriók fejlődésének elakadása elsősorban az endospermium aberrációira és pusztulására vezethető vissza. Ezt a megállapítást támasztják alá korábbi eredmények: árpa, búza és rozs pázsitfűfélékkel végzett távoli

keresztezéseiben tapasztalták azt, hogy a kombinációk egy részében az embriók legfeljebb a gömbstádiumig fejlődnek normálisan, majd ezt követően néhány napon belül elpusztulnak (Zenkteler és Nitzsche 1984).

### **5.2.1 Az anyai szövetek és az auxin szerepe a posztgámikus folyamatokban**

A hibrid fúziós termékek és a szemtermés megfelelő fejlődésében az anyai szöveteknek is meghatározó szerepe van. Alapesetben a megtermékenyítést követően a termő szövetek a fúziós termékek növekedésével párhuzamosan megnyúlnak, így biztosítva teret a növekvő embrió és endospermium számára (Bennett és mtsai. 1975; Ray 1997). Az árpával termékenyített búza termőkben ez a megnyúlásos növekedés elmaradt annak ellenére, hogy a megtermékenyülés megtörtént, és a fúziós termékek fejlődésnek indultak. Az anyai szövetek növekedésének szabályozásában feltételezhetően fontos szerepe van az auxin növényi hormonnak, amely más távoli keresztezések esetében bizonyítottan fontos szerepet játszik a fejlődő fúziós termékek és az anyai szövetek közötti kommunikációban (Ray 1997).

Eredményeink azt mutatták, hogy az árpával termékenyített termők megnyúlásának elmaradása feltételezhetően a fúziós termékek irányából származó szignálok, köztük az auxin hiányának a következménye. Exogén 2,4-D (mint auxin transzport inhibitor) alkalmazásával sikerült ugyanis kiváltani a megtermékenyülés után az anyai szövetek megnyúlását, közvetlen bizonyítékot szolgáltatva az auxin korai szemfejlődésben betöltött szerepére. Az a tény, hogy ez a hatás termékenyítetlen virágok esetében sokkal mérsékeltebb volt, vagy egyáltalán nem volt tapasztalható, arra is utal, hogy az anyai szövetek megnyúlásának indukálásában az auxin mellett más, a megporzás/megtermékenyítés által aktivált faktorok is fontos szerepet játszhatnak. Mivel ritkán olyan szemkezdeményekben is találtunk viszonylag nagyméretű embriót, amelyek nem vagy csak nagyon kis mértékben nyúltak meg, arra következtettünk, hogy az auxin elsősorban a fejlődő endospermiumból származik, vagy transzportja az endospermium aktív közreműködésével történik.

### **5.2.2 A fúziós termékek fejlődési defektusai a posztgámikus szakaszban**

A 14 nappal a megporzást követően preparált termőkben már jelentős mennyiségi és minőségbeli különbségeket tapasztaltunk az árpatermékenyítésből származó szemkezdeményekben az öntermékenyítettekhez viszonyítva. Míg az öntermékenyítés során közel 80%-ban csíráképes telt szemtermések fejlődtek, addig az árpatermékenyítésből származó szemkezdemények

mindegyike ráncos felszínű és aszott megjelenésű volt. Bennük csak az esetek 14%-ában (**25. ábra**) találtunk fejletlen embriót, de – mások eredményeihez hasonlóan (Koba és Shimada 1992) – endospermiumot egyetlen esetben sem. Megállapítottuk, hogy a búza × árpa keresztezések inkompatibilitása az egyéb fajokkal végzett távoli keresztezések során korábban feltárt progámikus szakaszt befolyásoló genotípus-függő pollen-bibe ellentétek mellett, a posztgámikus szakasz korai embrió és endospermium fejlődése során fellépő zavarokban nyilvánult meg, ami főként a hibrid endospermiumot érintette. A 3. és 14. nap közötti jelentős embrióvesztés (**25. ábra**), feltételezhetően az endospermium hiányából adódó fejlődési rendellenességek következménye. A megfelelő fejlettséget elért embriók a preparálást követően aszeptikus körülmények között, az endospermium hiányát kompenzáló táptalajra helyezve életképes, hibrid növényekké voltak nevelhetőek, bizonyítékot szolgáltatva azok élet és funkcióképességére a szülői genomok genetikai távolságának ellenére (Koba és Shimada 1992; Polgári és mtsai. 2014).

### 5.3 A posztgámikus fejlődési defektusok hátterének meghatározása

A búza-árpa keresztezések során fellépő inkompatibilitási tényezők helyének és idejének ismeretében új módszert dolgoztunk ki a hibrid előállítás hatékonyságának javítására. Miután a megfelelő fejlettséget elért embriókból képesek voltunk nagy százalékban növényeket regenerálni, továbbá a hibrid embrió abortiójának okát az endospermium defektusaiban és pusztulásában találtuk meg, ezért elsődleges célunk a rendellenességek kiküszöbölése, illetve az endospermium fejlődésének meghosszabbítása volt legalább addig az állapotig, hogy az embriók már biztonsággal kimenthetőek legyenek.

Az idegen fajú hibridek posztgámikus fejlődési defektusaival kapcsolatban régóta ismert, hogy az endospermium fejlődési zavarai sok esetben összefüggésbe hozhatók a szülők ploidszintjének különbségével. Allopoliploid fajok reciprok keresztezései során bizonyítást nyert, hogy minél nagyobb az eltérés a szülők ploidszintjében, az endospermium fejlődése annál nagyobb valószínűséggel és annál korábban szenved zavart, ami kis különbség esetén csökkent szemtermés méretet, nagyobb különbség esetén abortiót eredményez (Lin 1984; Scott és mtsai. 1998). Ezzel szemben viszont az is megfigyelhető, hogy az embrió fejlődésére nem vagy csak kis mértékben van hatással a szülői ploidszintkülönbség (Kinoshita 2007).



### 5.3.1 A búza és az árpa EBN értéke

Eltérő ploidszintű *Solanum* fajok keresztezése során vetették föl (Johnston és mtsai. 1980) az endospermium egyensúlyi érték (EBN) elméletét, melynek alapja, hogy az endospermium megfelelő fejlődéséhez és sejtesedéséhez az anyai és apai genomok 2:1 aránya szükséges. Az ettől való eltérés abszolút értékével arányban az endospermium fejlődése zavart szenved: nagy különbségek esetén az embrió életképességének ellenére az endospermium sejtesedése elmarad, ennek következtében a mag abortiója következik be (Ehlenfeldt és Ortiz 1995). Különböző keresztezési kombinációkban ugyanazon fajok EBN értéke eltérő lehet, amit az eltérő ploidszintű *Solanum* és *Avena* fajok reciprok keresztezései is bizonyítanak (Johnston és mtsai. 1980).

Zenkter és Nitzsche (1984) távoli keresztezéseinek eredményei arra utalnak, hogy a diploid rozs EBN értéke közelebb áll a hexaploid búzáéhoz, mint a diploid árpáéhoz (**17. táblázat**). Ezt alátámasztja a búza × rozs keresztezésekből származó hexaploid, valamint oktoploid tritikálé csaknem normális endospermiumfejlődése is (Boyes és Thompson 1937). Egyben arra is magyarázatot adhat, hogy a rozssal termékenyített búza termőkben miért fejlődik endospermium, míg a szintén diploid árpatermékenyítésből származó magkezdeményekben ez sohasem megy végbe (Koba és Shimada 1992). A Triticeae nemzetség távoli rokon fajaival elvégzett nagyszámú keresztezés összesített adatai alapján, meglehetősen hasonló kép rajzolódik ki, ami szembevető összefüggéseket mutat a genetikai rokonság mellett az eltérő fajok ploidszint különbsége, keresztezhetősége és a hibrid szemek méretének tekintetében (Watkins 1924; Belea 1976; részletesen Sharma 1995).

17. táblázat. A Triticeae nemzetség távoli rokon fajainak keresztezhetősége

Nőivari partner	Hímivari partner	m/p arány	EBN eltérés	Szemk. mérete <sup>#</sup>	Endospermium fejlődése	Kompatibilitás	Hivatkozás	
<b>Triticum aestivum</b>	<b>6x S. cereale</b>	<b>2x</b>	<b>6,0</b>	<b>-4,0</b>	<b>Normál</b>	<b>Késői sejtesedés</b>	<b>+</b>	<b>Boyes és Thompson 1937</b>
Triticum aestivum	6x H. vulgare	2x	6,0	-4,0	Kisebb	Nincs sejtesedés	-	Polgári és mtsai. Nem publ.
Hordeum vulgare	4x H. vulgare	2x	4,0	-2,0	Kisebb	Korai sejtesedés	-	Håkansson 1953
Secale cereale	4x S. cereale	2x	4,0	-2,0	Kisebb	Korai sejtesedés	-	Håkansson 1950
Hordeum jubatum	4x S. cereale	2x	4,0	-2,0	Kisebb	Nincs sejtesedés	-	Brinck és Cooper 1943
<b>Triticum turgidum</b>	<b>4x S. cereale</b>	<b>2x</b>	<b>4,0</b>	<b>-2,0</b>	<b>Normál</b>	<b>Késői sejtesedés</b>	<b>+</b>	<b>Taira és mtsai 1978</b>
Triticum aestivum	6x T. turgidum	4x	3,0	-1,0	Telt	Korai sejtesedés	+	Thompson 1930
Hordeum vulgare	2x H. vulgare	2x	2,0	0,0	Normál	Normál sejtesedés	+	Håkansson 1953
Hordeum vulgare	4x H. vulgare	4x	2,0	0,0	Normál	Normál sejtesedés	+	Håkansson 1953
Secale cereale	2x S. cereale	2x	2,0	0,0	Normál	Normál sejtesedés	+	Håkansson 1950
Secale cereale	4x S. cereale	4x	2,0	0,0	Normál	Normál sejtesedés	+	Håkansson 1950
Hordeum jubatum	4x H. jubatum	4x	2,0	0,0	Normál	Normál sejtesedés	+	Brinck és Cooper 1943
Triticum aestivum	6x T. aestivum	6x	2,0	0,0	Normál	Normál sejtesedés	+	Boyes és Thompson 1937
Hordeum vulgare	2x S. cereale	2x	2,0	0,0	Kisebb	Nincs sejtesedés	-	Brinck és Cooper 1944
Secale cereale	2x H. vulgare	2x	2,0	0,0	Kisebb	Nincs endospermiumfejlődés	-	Brinck és Cooper 1944
Triticum turgidum	4x T. aestivum	6x	1,3	0,7	Aszott	Késői sejtesedés	+	Thompson 1930
Hordeum vulgare	2x H. vulgare	4x	1,0	1,0	Nagyobb	Sejtesedés elmarad	-	Håkansson 1953
Secale cereale	2x S. cereale	4x	1,0	1,0	Nagyobb	Késői sejtesedés	-	Håkansson 1950
Secale cereale	2x T. aestivum	6x	0,7	1,3	Nagyobb	Nincs sejtesedés	-	Müntzing 1933
<b>Triticum aestivum*</b>	<b>6x H. vulgare*</b>	<b>2x</b>	<b>6-1</b>	<b>4-1</b>	<b>Nagyobb</b>	<b>Változatos</b>	<b>???</b>	<b>Polgári és mtsai. Nem publ.</b>

szürke zóna: EBN eltérés <1 alapján várhatóan kompatibilis kombináció, **félkövénen**: az EBN érték alapján feltételezhetően eltérő eredmény, \*: demetilációs kezelést kapott szülők, #: a szemkezdemény mérete az öntermékenyített anyai genotípuséhoz képest

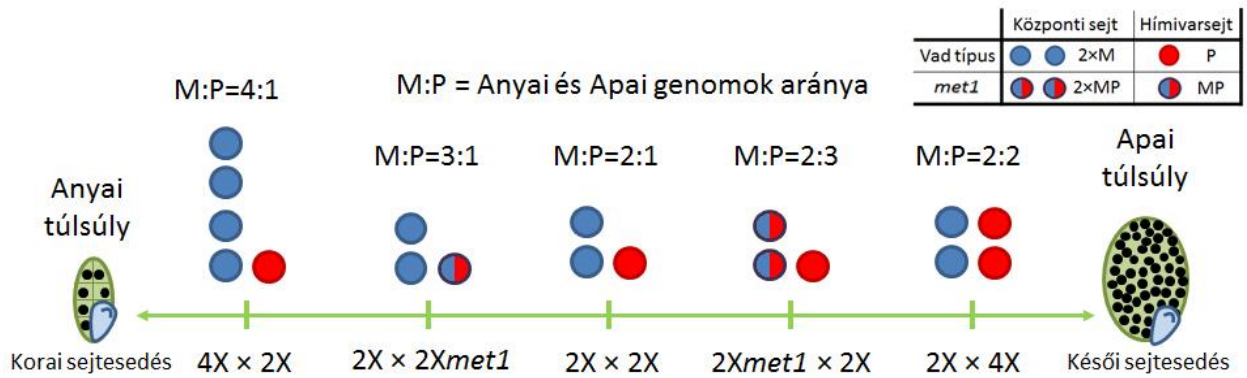
Ezen nemzetség keresztezések eredményeiből az is nyilvánvalóan látszik, hogy az endospermiumfejlődés defektusai ellenére az embriók a kombinációk többségében életképesek, (Finch és Bennett 1980), ami további bizonyítékot szolgáltat arra, hogy két faj keresztezhetőségének kulcsa főként az endospermium fejlődési problémáiban rejlik.

### 5.3.2 A jelentős EBN különbség kiküszöbölésének lehetősége

A búza × árpa keresztezések inkompatibilitásáért leginkább felelős nagyfokú ploidszint eltérés kiküszöbölésére olyan módszert dolgoztunk ki, amely lehetőséget biztosított az endospermiumban szülő-specifikusan megnyilvánuló gének kölcsönhatásainak kiegyensúlyozására. Az ivaros szaporodó élőlények csíravonaláiban történő ivarfüggő allélspecifikus gátlás az állatoknál és a növényeknél egyaránt az érintett DNS szakaszok szelektív metilációja révén valósul meg (Li és mtsai. 1993; Adams és mtsai. 2000).

A fenti „imprinting” mechanizmus kulcsenzime a metiltranszferáz, amely egy reakciósor utolsó lépéseként metilcsoportot helyez a DNS citozin bázisaira, ami meggátolja a célzott génekről történő expressziót. A metiltranszferáz gén mutációja a genom nagyfokú hipometiláltságát okozza, amit a növényi embriók (szemben a velük párhuzamosan fejlődő endospermiummal) jelentősebb következmények nélkül képesek elviselni (Adams és mtsai. 2000).

A metiltranszferáz deficiens növények anyai partnerként történő felhasználása esetén jelentősen csökkennek az eltérő ploidszint okozta jellegzetes endospermium fejlődési defektusok, valamint azon génmutációk (*MEA*, *FIS*, *FIE*) hatásai, amelyek az ivarspecifikus „imprinting” kialakításában játszanak szerepet, és expressziójuk a generatív szervekre, azon belül főképpen az endospermiumra korlátozódik (Vinkenoog és mtsai. 2000). A jelenség magyarázata, hogy a metiltranszferáz deficiens növények központi sejtjeiben nem alakul ki az ivarspecifikus metilációs mintázat, aminek következtében az endospermiumban mindkétféle ivarspecifikus géntermék azonos mennyiségben termelődik, ami a  $2m : 3p$  aránynak megfelelően (**26. ábra**) Arabidopsisban éppen elégséges endospermium és szemfejlődést eredményez (Vinkenoog és mtsai. 2003).



26. ábra. A metiltranszferáz enzim hiányának hatása az endospermium fejlődésére és az eltérő ploidszintű keresztezésekre. (Vinkenoog és mtsai. 2003 nyomán)

M: anyai hozzájárulás P: apai hozzájárulás

Mivel búzában és árpában nem áll rendelkezésre citozin metiltranszferáz mutáns, az *Arabidopsis thaliana* antiszensz konstrukció (Finnegan és mtsai. 1998) alkalmazása pedig egyrészt a búza alacsony hatásfokú transzformálhatósága, másrészt a poliploid genomja miatti több lókuszt együttes inaktiválásának szükségessége miatt tűnt kilátástalannak, ezért egy kémiai kezelés alkalmazása mellett döntöttünk, amelynek hatásával a genom *in vivo* részlegesen demetilálható. Az így kiváltott fenotípus ennek megfelelően ugyan mindig gyengébb a metiltranszferáz deficiens növények fenotípusához képest, de várhatóan detektálhatóvá válik.

### 5.3.3 A szelektív metiláció alapuló önvédelmi mechanizmus *in vivo* kémiai inaktiválása

A demetilációs ágens<sup>4</sup> egy nitrogénsubstitúciót hordozó, módosított nukleozid analóg. Az ágens a DNS replikáció során újonnan képződő DNS szál bázisait helyettesítheti: ezeken a pontokon a metilációs komplex metiltranszferáz enzime nem tud metilcsoportot elhelyezni, ezért a sejtosztódások során szintetizálódó új DNS szálak metiláltsági foka lecsökken (Lopez és mtsai. 2016). Mivel a sejtekben az ágens mellett az intakt nukleotidok is jelen vannak, ezért a beépülés az új DNS szálak megfelelő helyeire véletlenszerűen, a két típusú nukleotid arányának függvényében történik. Ennek következtében az ilyen kezeléseknél hatása a DNS hipometiláltságát tekintetében csak részleges, és a kiváltott fenotípus többnyire enyhébb a metiltranszferáz deficiens növények fenotípusához képest. A megfelelő koncentrációban alkalmazott demetilációs ágens az élővilágban univerzális hatású, ennek megfelelően a búza hibridjeiben is igazolták már aDNS metiláció által eredetileg inaktivált allélokon hasonló módon helyreállított géneexpressziót (Vieira és mtsai. 1990).

<sup>4</sup> Az ágens megnevezését és az alkalmazott koncentrációt a bírálók titoktartási kötelezettség mellett megkapták.

A különböző időpontokban elvégzett demetilációs kezelés eredményeként megállapítottuk, hogy az részlegesen valóban helyreállította a hibrid endospermiumok fejlődését. A kezelt kalászkok szemkezdeményeiben a hibrid endospermiumok pusztulását az esetek egy részében sikerült időben késleltetni, ami a kontroll vizsgálathoz képest jelentősen megnövelte a kimenthető embriók számát és méretét. A meiózisban kezelt ‘Szecsuan’ × ‘Morex’ kombinációban a kezelés több, mint kétszeresére növelte a funkcióképes embriók számát (41%), de a másik két időpontban elvégzett kezelés is jelentősen megnövelte az embrió kihozatalát. A 3 és 6 napos korban elvégzett szövettani vizsgálatok során az endospermium pusztulásának késleltetését figyeltük meg, sőt több esetben az endospermium teljes mértékben sejtesedett, bár ezen sejtek megjelenése és az endospermium szöveteinek struktúrája némileg eltért a vad típusú kontrollétól.

Ugyan a demetilációs kezelés jelentősen megnövelte a termékenyült szemkezdeményekre vonatkoztatott embrió kihozatalát, de a hibrid szemkezdeményekben az endospermium fejlődése továbbra is elmaradt a kontrolltól. Emellett jelentős szórás mutatkozott az egyes szemkezdemények endospermiumainak méretében és fejlettségében. Mindössze négy esetben, az összes termékenyítési esemény 1,2%-ban figyeltünk meg olyan mértékű endospermium fejlődést, ami a teljes érést követően a szakirodalomban leírt kompatibilis keresztezésekre jellemző ráncos felszínű, de önállóan csírázni képes szemterméseket eredményezett. Az egyes szemkezdemények közötti jelentős különbségek, valamint az endospermium fejlődés csak alacsony gyakorisággal történő sikeres helyreállítása, a demetilációs kezelés viszonylagos irányíthatatlanságának a következménye, ami sejtenként eltérő mértékű és mintázatú metiláltságot eredményez. Ezen eredmények függvényében a jövőre nézve mindenképp szükségesnek tartjuk az in vivo DNS demetiláció hatékonyságának javítását, amelyet TILLING populációkból kiválogatott DNS metiltransferáz mutánsok alkalmazásával, vagy CRISPR-Cas9 indukálta célzott génkiütéssel létrehozott metiltransferáz deficiens növények keresztezési partnerként történő felhasználásával kívánunk megvalósítani.

#### 5.4 A hibrid embriók eredetére vonatkozó kérdések

Annak ellenére, hogy egyes idegen fajú hibrid kombinációkban az apai genom az embrionális fejlődés első osztódásai során teljesen eliminálódik (Laurie és Bennett 1989), a hasznos genetikai információ kromoszómaszegmentumok vagy mobilis genetikai elemek formájában átkerülhet az eliminálódó kromoszómákról az utód genomjába (Laurie és Bennett 1988). Mivel a búza × árpa keresztezések egyik célja a két faj közötti génátvitel biztosítása, utolsó lépésként vizsgálatokat végeztünk az egyes kezelésekből származó növények hibrid eredetének igazolására. Az F1 utódokban található árpa genomszekvenciák előfordulásából vontunk le következtetéseket: a keresztezésekben nyert embriók nagy része ivaros úton az idegen pollenből származó hímivarsejt által megtermékenyített petesejtből fejlődik, azonban nem zárható ki a megporzás által kiváltott, csak anyai haploid vagy diploid sejtéből kiinduló partenogenetikus vagy apomiktikus eredet sem (Bakos 2007).

Az utódok genom méretei alapján egyértelműen kizárható a szomatikus eredet: a 74 megvizsgált növény egyike sem mutatott erre utaló diploid anyai genom méretet. Ezzel együtt az is kizárható, hogy a vizsgált embriók esetleg kasztrálási hiba következtében, öntermékenyítésből származtak volna. A vizsgálatok alapján a csak 2,4-D kezelést kapott növények közel 25%-ánál volt kimutatható apai DNS szekvencia, a fennmaradó mintegy 75% haploidnak bizonyult (Polgári és mtsai. 2014), amit korábbi kutatások is megerősítenek. Finch és Bennett (1982) két kombinációból kapott 10 növényből kilencet haploidnak talált, míg Taketa és mtsai. (1995) nyolcféle kombinációból regenerált 35 növény közül 19 haploidot (54,3%) azonosított. Végül Taketa és Takeda (1997) három értékelhető kombináció 65 növénye közül átlagosan 75,4% (49 növény) haploidot állított elő. Vizsgálataink során a különböző időpontokban a 2,4-D kezelést kiegészítő demetilációs kezeléssel összesen 210 növényenél ezt a haploid arányt sikerült 14-32%-ra leszorítani, azaz a (részleges) hibridek arányát 68-86%-ra emelni. Ez az eredmény egyben azt is igazolja, hogy a kiindulási embriók túlnyomó része a két szülő ivarsejtjeinek egyesüléséből, ivaros úton keletkezett, noha nem zárható ki teljes mértékben, hogy az anyai haploidok egy igen kis része nem az alloplazmás 'Salmon' búza mintájára partenogenetikus petesejt aktiváció útján fejlődne ki (Kumlehn és mtsai. 2001).

#### 5.5 Az apai genom eliminációjával kapcsolatban felmerülő kérdések

Az anyai haploidok zöme bizonyíthatóan gamétafüziót követő és több sejtcikluson át tartó fokozatos kromoszóma elimináció következtében jött létre. Az árpatermékenyítésből származó ovulumok vizsgálatakor konfokális mikroszkóppal sikeresen dokumentáltuk az apai

kromoszómák mitózisos lemaradását már az első osztódás során. Korábbi vizsgálatok során más kutatócsoportok is hasonló eredményekről számoltak be. Búza × kukorica esetében (Laurie és Bennett 1989), árpa és *H. bulbosum* esetében (Sanei és mtsai. 2011) tapasztaltak hasonló uniparentális eliminációt. Utóbbi kombináció vizsgálata során arra is fény derült, hogy 18°C alatti hőmérsékleten jelentősen csökken a kromoszóma elimináció mértéke a korai embriogenezis során (Pickering 1985).

Az eltérő vizsgálati csoportokból származó hibrid embriók genomösszetételének vizsgálata során mi is jelentős eltéréseket tapasztaltunk a hibrid utódok és az anyai haploidok arányában, amelyre vizsgálati körülményeink között nem találtunk magyarázatot. Mivel a megporzás után az anyanövények felnevelése szabadban, nem kontrollálható körülmények között történt, ezért feltételezhető, hogy a különböző kezelésnek kitett csoportok embriói eltérő hőmérsékleti tényezők mellett fejlődtek, ami megmagyarázhatja a kromoszóma kiesés gyakoriságának ilyen jelentős mértékű eltéréseit a különböző kezelések és ismétlések során. Ennek tisztázására a jövőben külön vizsgálatokat tervezünk elvégezni, amelyekben a kromoszóma kiesés gyakoriságát kontrollált körülmények között kívánjuk megvizsgálni.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy kompatibilis búza-árpa kombinációban a szaporodás progámikus és a posztgámikus fázisa egyaránt végbemegy. A progámikus szakasz és a megtermékenyítés során nem fedeztünk fel lényegi eltérést az öntermékenyített búza kontrollhoz képest. A posztgámikus fázisban is főleg az endospermium fejlődésének (epigenetikus) gátlása eredményezett az időben előrehaladva csökkenő hibrid embriókihozatal. Az endospermium gátlásának részleges felszabadítása kettős hozadékkal járt: egyrészt szignifikánsan megnövekedett az embrió és növény kihozatal, másrészt jelentősen csökkent az apai genom eliminációjának gyakorisága. Végeredményben tehát több részleges és teljes hibridet tudunk így előállítani, amelyek mind nemesítési, mind pedig genomikai célú hasznosításra alkalmasak.

## 6. Új tudományos eredmények

Munkánk során a búza árpával való keresztezhetőségének problémakörét jártuk körül: összehasonlítottuk és párhuzamba állítottuk a saját (búza) és árpa pollennel végzett porzás és megtermékenyítés során lejátszódó folyamatokat. Az összehasonlító vizsgálatok alapján új módszert dolgoztunk ki az idegen fajú hibridizációt megakadályozó gátek áttörésére, ami minden eddiginél hatékonyabb búza × árpa hibrid előállítását tesz lehetővé, megnyitva az utat új, szintetikus amphiploid növények létrehozása előtt. Eredményeink az alábbiakban foglalhatók össze:

1. 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 lényegi eltérés. Mind a búza, mind az árpa pollen hasonló mértékben csírázott, hajtott tömlőt, és a csírákapun keresztül nagy gyakorisággal elérte a szinergida sejteket.

2. A szaporodás posztgámikus szakaszában a búza × árpa hibrid embriók fejlődése az öntermékenyítettekhez képest fokozatosan lelassult: a porzást követő 3. npra átlagosan körülbelül 1 napnak megfelelő lemaradás alakult ki. Az endospermium esetében ez a különbség még szembetűnőbb volt.

3. Az öntermékenyített 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.

4. Új genotípus kombinációk alkalmazásával, valamint kémiai kezelésekkel minden eddiginél lényegesen magasabb, átlagosan 30% (maximum 41%) embrió kihozatalt értünk el, és az embriók közel négyötödéből (78%) növényeket regeneráltunk. Ez a hatékony hibrid előállítási rendszer már elégséges alapanyagot (268 embriót és 210 növényt) biztosított a további kísérletekhez (ld. 5-8. pontok), és alkalmas a jövőben genomikai vizsgálatok kivitelezésére.

5. Egy nagy, 210 felnevelt hibrid növény populációban molekuláris módszerek (áramlási citométer, kromoszóma-specifikus DNS markerek és GISH) alkalmazásával megállapítottuk, hogy az egyedek mintegy 20%-a hiánytalanul örökölte mindkét szülői genomot, míg 60% esetében az árpa genom legalább egy kromoszómája kiesett a fejlődés során. Végül szintén kb. 20%-ban anyai haploidokat kaptunk, amelyekből az apai genom teljesen eliminálódott, feltehetően még az embrionális fejlődés korai szakaszában. Ezek az arányok lényegesen kedvezőbbek az eddig leírtaknál, és hatékony hibrid előállítás tesznek lehetővé.

6. Modern mikroszkópos elemzés és klasszikus citogenetikai ismeretek ötvözésével már a zigóta első osztódása során igazoltuk a korai kromoszóma kiesés jelenségét, és egy lemaradó árpa kromoszómát (5H) sikerrel azonosítottunk.

7. A kizárólag anyai genommal rendelkező haploid növények genomjának duplikálásával fertilis dihaploid (DH) növényeket állítottunk elő, amelyek eredetileg kétségtelenül árpa termékenyítésből és uniparentális genomelimináció révén keletkeztek, így homozigóták lehettek minden olyan allélra, amelyek az árpával keresztezhetőséget befolyásolják. Ezekből a DH vonalakból új, a korábbiaknál jobb tulajdonságokkal rendelkező keresztezési alapanyagot szelektáltunk.

8. Megállapítottuk, hogy demetilációs kezeléssel késleltethető az endospermium fejlődésének leállása, sőt bizonyos esetekben annyira kitolható, hogy szinte normális anatómiájú és funkciójú endospermium fejlődik. Ezzel a módszerrel elsőként állítottunk elő búza × árpa keresztezésből autonóm csírázásra képes szemterméseket.



## 7. Összefoglalás

A földi népességnövekedés következtében felmerülő élelmiszerigény évről évre komolyabb kihívást jelent a mezőgazdaság és az élelmiszeripar számára. A növénynemesítés ezért manapság egyre inkább fessegetni kényszerül a természetett fajok genetikai terméspotenciáljának határait. Mindemellett a hazai vetésterület döntő hányadán természetett gabonaféléknél már jó ideje a termésmennyiség stabilitása a legfőbb probléma. Megtetézve a klímaváltozás Magyarország szempontjából várhatóan negatív nettó hatásával, a jövőben egy a mainál is nagyobb mértékű termés-instabilitás hazánkra nézve közvetlen gazdasági és társadalmi következményekkel járhat. Ilyen fokú éghajlati kitettség mellett az egyre magasabb és stabil terméshozamok eléréséhez minél szélesebb genetikai alapokra épített, bőtermő és kiváló környezeti alkalmazkodó képességgel rendelkező fajták szükségesek. A genetikai alapok kívánatos szélesítésének fontos elemei az ivaros keresztezhetőség határát képviselő távoli, rokon fajok. A távoli (faj és nemzetség) hibridek jelentősége a gabonaféléknél azonban egyáltalán nem merül ki a nemesítés bázisának megújításában, hiszen kiváló modellként szolgálnak a genomok közti kooperációban szerepet játszó, valamint azt gátló molekuláris mechanizmusok feltárására is. Ezeknek a jelenségeknek a megértése kulcsfontosságú egyfelől a keresztezéses génátvitel hatékonyságának növelése szempontjából, másfelől a keresztezhetőség határainak kitágítása tekintetében is, amelynek révén a jelenleginél távolibb faj- és nemzetség hibridek állíthatók elő.

A fentiek ismeretében célul tűztük ki egy új, az idegen fajú hibrid előállítás mai korlátain túlmutató módszer kidolgozását. Céljaink között szerepelt még: a búza × árpa keresztezések embrió és növény kihozatalának maximalizálása a legjobban kereszteződő genotípus kombinációk és támogató kezelések azonosítása, valamint a hibrid embriók felnevelésének hatékonyabbá tétele révén, végül pedig új, az árpával jól kereszteződő dihaploid (DH) búza vonalak szelekciója és a búza × árpa F1 hibrid nemzedék genomösszetételének vizsgálata, különös tekintettel a kromoszóma kiesés gyakoriságára.

A hibrid előállítás szempontjából legmegfelelőbb genotípus-kombináció megválasztásához különböző búza és árpa genotípusokkal végzett próbakeresztezésekkel megállapítottuk, hogy a 'Morex' hatsoros tavaszi sörárpa pollenjével termékenyített 'Szecsuán' tavaszi kínai búza virágai kötöttek a legnagyobb számban embriókat (átlagosan 16%), ami ötszöröse volt a szakirodalomban jól kereszteződőnek leírt 'Chinese Spring' embrió kihozatalának. Későbbi vizsgálatainkban a 'Szecsuán' genotípust fokozatosan felváltottuk az abból szelektált új, jobb tulajdonságokkal rendelkező, saját búza-árpa keresztezéssel előállított DH vonalakkal. Az epigenetikailag gátolt gének ivarspecifikus reaktiválásához a növényeket a DNS metilációját

gátló ágenssel kezeltük. Az általunk elsőként alkalmazott módszerrel az eddigi maximumnál lényegesen magasabb (átlagosan 30%, egy kezelés esetén 41%) embrió kihozatalt értünk el, amelyek közel négyötödéből (78%) növényeket is regeneráltunk. Megállapítottuk, hogy demetilációs kezeléssel az endospermium fejlődésének leállása késleltethető, sőt bizonyos esetekben annyira kitolható, hogy szinte normális morfológiájú endospermium fejlődik. Ezzel a módszerrel elsőként állítottunk elő autonóm csírázásra képes búza × árpa keresztezésből származó hibrid szemeket. A felnevelt hibrid növények genomját egy 210 egyedből álló populáción molekuláris módszerekkel (áramlási citométer, DNS markerek és GISH) elemeztük megállapítottuk, hogy az egyedek mintegy 20%-a hiánytalanul örökölte mindkét szülői genomot, 60% esetében az árpa genom részlegesen kiesett a fejlődés során, míg a növények további 20%-a anyai haploidnak bizonyult. Munkánk eredményeként sikerült a kitűzött céloknak megfelelően új módszert kidolgoznunk az idegen fajú hibridizációt akadályozó gátak áttörésére, ami minden eddiginél hatékonyabb búza × árpa hibrid előállítását tesz lehetővé, megnyitva az utat új, szintetikus amfiploid növények létrehozása előtt.

## 7. Summary

Food demand arising as a result of global population growth represents a more serious challenge with the year for agriculture and the food industry. Therefore, plant breeding today is increasingly forced to raise the limits of the genetic potential of crop plants. In addition, for cereals cultivated on a vast proportion of domestic arable land yield stability has long been a main problem. Combined with a projected negative net impact of climate change in Hungary, an even greater crop instability in the future may have direct national economic and social consequences. With such a high degree of climatic exposure the achievement of a higher and more stable output requires high-yielding varieties on a broader genetic basis and with excellent environmental adaptability. Important elements of the desirable widening of the genetic basis are the distantly related species that represent the current boundary of sexual crossability. The significance of ultrawide alien (interspecific and intergeneric) hybrids of cereals, however, is not at all exhausted in renewing the breeding base as they are an excellent model for exploring cooperative and inhibitory molecular mechanisms between the genomes involved. Understanding these mechanisms is the key to increasing the efficiency of gene transfer via sexual crossing as well as with regard to expanding the boundaries of crossability, by which even more distant interspecific and intergeneric hybrids can be produced.

In view of the above, we aimed to develop a new approach, going beyond the limits of today's ultrawide alien hybrid production. Also featured among our objectives: maximizing the yield of embryo induction and plant regeneration in wheat  $\times$  barley crossings via identification of the best crossing genotype combinations and supportive treatments, and by improving the efficiency of regeneration from hybrid embryos. And finally, the selection of new doubled haploid wheat lines crossing well with barley and the study of genome composition in wheat  $\times$  barley F1 generation hybrids, particularly with regard to the frequency of paternal chromosome elimination.

In order to find the most appropriate genotype combination for hybrid production, via test crosses performed between different wheat and barley genotypes we determined that florets of the Chinese spring wheat 'Sichuan' fertilized with pollen from 'Morex', a six-row spring malting barley variety have set the greatest number of embryos (average 16%), five times as high as the embryo yield obtained with the standard 'Chinese Spring' that is characterized as a highly crossable genotype in the literature.

In subsequent investigations, this 'Sichuan' genotype has gradually been replaced with DH lines with new and improved properties and selected from the original genotype via wheat-barley

crossing. To specifically reactivate epigenetic inhibition of gene expression the donor plants were treated with a DNA demethylating agent. With this method a substantially higher (average of 30%, in a single experiment 41%) embryo yield was achieved than the maximum hitherto, with four fifths (78%) of the embryos regenerating adult plants. We concluded that the breakdown of endosperm development can be delayed with the demethylating treatment, and in some cases even so that endosperms with almost normal morphology can develop. Using this method the first seeds capable of autonomous germination were produced from a wheat  $\times$  barley cross. A complex molecular analysis (flow cytometry, DNA markers and GISH) of the hybrids' genome in a population of 210 plants revealed that approximately 20% of the individuals fully inherited both parental genomes, for 60% the barley genome was partially eliminated during development, and a further 20% of the plants proved to be maternal haploids.

As a result of this work, in accordance with the objectives set, a new method has been elaborated to break the barriers preventing alien hybridization. This achievement enables an ever more efficient production of wheat  $\times$  barley hybrids, paving the way for the creation of new, synthetic amphiploid plants.

## 8. Mellékletek

### 8.1 Irodalomjegyzék

- Adams S, Vinkenoog R, Spielman M, et al. (2000) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development* 127:2493–2502.
- Ahokas H (1970) Some artificial intergeneric hybrids in the Triticeae. *Ann Bot Fenn* 7:182–192.
- An LH, You RL (2004) Studies on nuclear degeneration during programmed cell death of synergid and antipodal cells in *Triticum aestivum*. *Sex Plant Reprod* 17:195–201. doi: 10.1007/s00497-004-0220-1
- Anamthawat-Jónsson K, Reader SM (1995) Pre-annealing of total genomic DNA probes for simultaneous genomic in situ hybridization. *Genome* 38:814–816. doi: 10.1139/g95-104
- Arnaud P, Feil R (2006) *MEDEA* takes control of its own imprinting. *Cell* 124:468–470. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.020
- Bai F, Settles AM (2015) Imprinting in plants as a mechanism to generate seed phenotypic diversity. *Front Plant Sci* 5:780. doi: 10.3389/fpls.2014.00780
- Bajaj YPS (1990) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 13. Wheat*. Springer, 700 o.
- Bajaj YPS, Verma MM, Dhanju MS (1980) Barley x rye hybrids (*Hordecale*) through embryo culture. *Curr Sci* 49:362–363.
- Bakos F (2007) *In vitro* embriófejlődés a gabonafélék gametofitikus sejtvonalaiból. PhD értekezés, 128 o.
- Barclay IR (1975) High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature* 256:410–411. doi: 10.1038/256410a0
- Baroux C, Blanvillain R, Gallois P (2001) Paternally inherited transgenes are down-regulated but retain low activity during early embryogenesis in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 509:11–16. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03097-6
- Baroux C, Autran D, Gillmor CS, et al. (2009) The maternal to zygotic transition in animals and plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:89–100. doi: 10.1101/sqb.2008.73.053
- Barton SC, Surani MA, Norris ML (1984) Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 311:374–376. doi: 10.1038/311374a0
- Belea A (1976) Fajkeresztetések citogenetikája a Triticinae alakkörben. MTA doktori értekezés, 78 o.
- Bendich A, McCarthy B (1970) DNA comparisons among barley, oats, rye, and wheat. *Genetics* 65:545–565.
- Bennett MD, Smith JB, Barclay I (1975) Early seed development in the Triticeae. *Philos Trans Roy Soc B* 272:199–227. doi: 10.1098/rstb.1975.0083
- Berger F (2003) Endosperm: The crossroad of seed development. *Curr Opin Plant Biol* 6:42–50. doi: 10.1016/S1369526602000043
- Berger F, Grini PE, Schnittger A (2006) Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Curr Opin Plant Biol* 9:664–670. doi: 10.1016/j.pbi.2006.09.015
- Blakeslee AF, Avery A (1937) Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *J Hered* 28:393–411. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a104294

- Blakeslee AF, Belling J, Farnham M, Bergner A (1922) A haploid mutant in the jimson weed „*Datura stramonium*”. *Science* 55:646–647. doi: 10.1126/science.55.1433.646
- Boisnard-Lorig C, Colon-Carmona A, Bauch M, et al. (2001) Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell* 13:495–509. doi: 10.1105/tpc.13.3.495
- Boyes JW, Thompson WP (1937) The development of the endosperm and embryo in reciprocal interspecific crosses in cereals. *J Genet* 34:203–227. doi: 10.1007/BF02982263
- Breuninger H, Rikirsch E, Hermann M, et al. (2008) Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev Cell* 14:867–876. doi: 10.1016/j.devcel.2008.03.008
- Brown RC, Lemmon BE, Olsen OA (1994) Endosperm development in barley: Microtubule involvement in the morphogenetic pathway. *Plant Cell* 6:1241–1252. doi: 10.1105/tpc.6.9.1241
- Brown RC, Lemmon BE, Olsen OA (1996a) Development of the endosperm in rice (*Oryza sativa* L.): Cellularization. *J Plant Res* 109:301–313. doi: 10.1007/BF02344477
- Brown RC, Lemmon BE, Olsen OA (1996b) Polarization predicts the pattern of cellularization in cereal endosperm. *Protoplasma* 192:168–177. doi: 10.1007/BF01273889
- Brown RC, Lemmon BE, Nguyen H, Olsen OA (1999) Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*. *Sex Plant Reprod* 12:32–42. doi: 10.1007/s004970050169
- Cailleau A, Cheptou PO, Lenormand T (2010) Ploidy and the evolution of endosperm of flowering plants. *Genetics* 184:439–453. doi: 10.1534/genetics.109.110833
- Cao X, Jacobsen SE (2002) Role of the *Arabidopsis* *DRM* methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 12:1138–1144. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00925-9
- Carmichael JS, Friedman WE (1995) Double fertilization in *Gnetum gnemon*: the relationship between the cell cycle and sexual reproduction. *Plant Cell* 7:1975–1988. doi: 10.1105/tpc.7.12.1975
- Castle LA, Errampalli D, Atherton TL, et al. (1993) Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 241:504–514. doi: 10.1007/BF00279892
- Chapman V, Miller TE, Riley R (1976) Equivalence of the A genome of bread wheat and that of *Triticum urartu*. *Genet Res* 27:69–76. doi: 10.1017/S0016672300016244
- Chaudhuri S, Messing J (1994) Allele-specific parental imprinting of *dzr1*, a posttranscriptional regulator of zein accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4867–4871. doi: 10.1073/pnas.91.11.4867
- Chaudhury AM, Berger F (2001) Maternal control of seed development. *Semin Cell Dev Biol* 12:381–386. doi: 10.1006/scdb.2001.0267
- Chaudhury AM, Ming L, Miller C, et al. (1997) Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4223–4228. doi: 10.1073/pnas.94.8.4223
- Chen J, Gutjahr C, Bleckmann A, Dresselhaus T (2015) Calcium signaling during reproduction and biotrophic fungal interactions in plants. *Mol Plant* 8:595–611. doi: 10.1016/j.molp.2015.01.023
- Chen PD, Tsujimoto H, Gill BS (1994) Transfer of *Ph<sup>1</sup>* genes promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat. *Theor Appl Genet* 88:97–101. doi: 10.1007/BF00222400
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, et al. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* 18:659–668.

- Clarke JL (1851) Researches into the structure of the spinal chord. *Philos Trans Roy Soc Lond* 141:607–621. doi: 10.1098/rstl.1851.0029
- Coe EH (1959) A line of maize with high haploid frequency. *Am Nat* 93:381–382. doi: 10.1086/282098
- Cooper DC, Brink RA (1942) The endosperm as a barrier to interspecific hybridization in flowering plants. *Science* 95:75–76. doi: 10.1016/S0140-6736(58)90176-4
- Cooper DC (1951) Caryopsis development following matings between diploid and tetraploid strains of *Zea mays*. *Am J Bot* 38:702–708. doi: 10.2307/2437917
- Corder GW, Forema DI (2009) *Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach*. Wiley, 247 o.
- Costa LM, Gutiérrez-Marcos JF, Dickinson HG (2004) More than a yolk: The short life and complex times of the plant endosperm. *Trends Plant Sci* 9:507–514. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.007
- Curtis MD, Grossniklaus U (2008) Molecular control of autonomous embryo and endosperm development. *Sex Plant Reprod* 21:79–88. doi: 10.1007/s00497-007-0061-9
- Curtis T, Halford NG (2014) Food security: The challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Ann Appl Biol* 164:354–372. doi: 10.1111/aab.12108
- de Bossoreille de Ribou S, Douam F, Hamant O, et al. (2013) Plant science and agricultural productivity: Why are we hitting the yield ceiling? *Plant Sci* 210:159–176. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.05.010
- Denninger P, Bleckmann A, Lausser A, et al. (2014) Male-female communication triggers calcium signatures during fertilization in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 5:4645. doi: 10.1038/ncomms5645
- Dent JA, Polson AG, Klymkowsky MW (1989) A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development* 105:61–74.
- Dickinson H, Costa L, Gutierrez-Marcos J (2012) Epigenetic neofunctionalisation and regulatory gene evolution in grasses. *Trends Plant Sci* 17:389–394. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.002
- Domoki M, Jäger K, Szűcs A, et al. (2013) Identification of genes preferentially expressed in wheat egg cells and zygotes. *Plant Cell Rep* 32:339–348. doi: 10.1007/s00299-012-1367-0
- Dresselhaus T, Sprunck S, Wessel GM (2016) Fertilization mechanisms in flowering plants. *Curr Biol* 26:R125–R139. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.032
- Drews GN, Lee D, Christensen CA (1998) Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell* 10:5–17. doi: 10.1105/tpc.10.1.5
- Duan Q, Kita D, Johnson EA, et al. (2014) Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 5:3129. doi: 10.1038/ncomms4129
- Dvorák J, Terlizzi P, Zhang HB, et al. (1993) The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36:21–31. doi: 10.1139/g93-004
- Ehlenfeldt MK, Ortiz R (1995) Evidence on the nature and origins of endosperm dosage requirements in *Solanum* and other angiosperm genera. *Sex Plant Reprod* 8:189–196. doi: 10.1007/BF00228936
- Endo TR, Gill BS (1984) Somatic karyotype, heterochromatin distribution, and nature of chromosome differentiation in common wheat, *Triticum aestivum* L. em Thell. *Chromosoma* 89:361–369. doi: 10.1007/BF00331253
- Erilova A, Brownfield L, Exner V, et al. (2009) Imprinting of the Polycomb group gene *MEDEA* serves as a ploidy sensor in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 5:e1000663. doi: 10.1371/journal.pgen.1000663

- Fábián A, Jäger K, Rakszegi M, Barnabás B (2011) Embryo and endosperm development in wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels subjected to drought stress. *Plant Cell Rep* 30:551–563. doi: 10.1007/s00299-010-0966-x
- Fang Y, Spector D (2005) Centromere positioning and dynamics in living *Arabidopsis* plants. *Mol Biol Cell* 16:5710–5718. doi: 10.1091/mbc.E05-08-0706
- Farrer W (1904) Some notes on the wheat „Bobs” its peculiarities, economic value and origin. *Agric Gaz NSW* 15:849–854.
- Faure JE, Mogensen H, Dumas C, et al. (1993) Karyogamy after electrofusion of single egg and sperm cell protoplasts from maize: Cytological evidence and time course. *Plant Cell* 5:747–755. doi: 10.1105/tpc.5.7.747
- Fedak G (1980) Production, morphology and meiosis of reciprocal barley-wheat hybrids. *Can J Genet Cytol* 22:117–123. doi: 10.1139/g80-014
- Feldman M, Levy AA (2012) Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics* 192:763–774. doi: 10.1534/genetics.112.146316
- Figueiredo DD, Köhler C (2014) Signalling events regulating seed coat development. *Biochem Soc Trans* 42:358–363. doi: 10.1042/BST20130221
- Finch RA, Bennett MD (1980) Mitotic and meiotic chromosome behaviour in new hybrids of *Hordeum* with *Triticum* and *Secale*. *Heredity* 44:201–209. doi: 10.1038/hdy.1980.17
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8449–8454. doi: 10.1073/pnas.93.16.8449
- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998) DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:223–247. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.223
- Friebe B, Jiang J, Raupp WJ, et al. (1996) Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica* 91:59–87. doi: 10.1007/BF00035277
- Friedman WE (1995) Organismal duplication, inclusive fitness theory, and altruism: understanding the evolution of endosperm and the angiosperm reproductive syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3913–3917. doi: 10.1073/pnas.92.9.3913
- Friedman WE (1998) The evolution of double fertilization and endosperm: An „historical” perspective. *Sex Plant Reprod* 11:6–16. doi: 10.1007/s004970050114
- Friedman WE (2001a) Comparative embryology of basal angiosperms. *Curr Opin Plant Biol* 4:14–20. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00129-1
- Friedman WE (2001b) Developmental and evolutionary hypotheses for the origin of double fertilization and endosperm. *CR Acad Sci III* 324:559–567. doi: 10.1016/S0764-4469(01)01326-9
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
- Gao M, Gropp G, Wei S (2012) Combinatorial networks regulating seed development and seed filling. In: *Embryogenesis* (ed. Sato K). InTech, o. 189–228.
- Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, et al. (2006) *DEMETER* DNA glycosylase establishes *MEDEA* Polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124:495–506. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.034
- Genger RK, Kovac KA, Dennis ES, et al. (1999) Multiple DNA methyltransferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 41:269–278. doi: 10.1023/A:1006347010369



- Grimanelli D, Perotti E, Ramirez J, Leblanc O (2005) Timing of the maternal-to-zygotic transition during early seed development in maize. *Plant Cell* 17:1061–1072. doi: 10.1105/tpc.104.029819
- Grossniklaus U, Schneitz K (1998) The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Semin Cell Dev Biol* 9:227–238. doi: 10.1006/scdb.1997.0214
- Grossniklaus U, Spillane C, Page DR, Köhler C (2001) Genomic imprinting and seed development: Endosperm formation with and without sex. *Curr Opin Plant Biol* 4:21–27. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00130-8
- Grossniklaus U, Vielle-Calzada J-P, Hoepfner MA, Gagliano WB (1998) Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb* group gene in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 280:446–450. doi: 10.1126/science.280.5362.446
- Guignard L (1899) Sur les anthérozoïdes et la double copulation sexuelle chez les végétaux angiospermes. *Rev Gén Bot* 11:129–135.
- Guitton AE, Berger F (2005) Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants. *Int J Dev Biol* 49:707–716. doi: 10.1387/ijdb.051990ag
- Guitton AE, Page DR, Chambrier P, et al. (2004) Identification of new members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131:2971–2981. doi: 10.1242/dev.01168
- Gyulai G, Kiss E, Heszky L (2004) Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) biotechnológiája. In: Magyarország kultúrflórája (szerk. Tomcsányi L, Turcsányi G) VIII/14. Az árpa - *Hordeum vulgare* L. Akadémiai Kiadó, o. 274–289.
- Haig D, Westoby M (1991) Genomic imprinting in endosperm: Its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. *Philos Trans Roy Soc B* 333:1–13. doi: 10.1098/rstb.1991.0057
- Håkansson A (1953) Endosperm formation after 2x, 4x crosses in certain cereals, especially in *Hordeum vulgare*. *Hereditas* 39:57–64. doi: 10.1111/j.1601-5223.1953.tb03400.x
- Håkansson A, Ellerström S (1950) Seed development after reciprocal crosses between diploid and tetraploid rye. *Hereditas* 36:256–296. doi: 10.1111/j.1601-5223.1950.tb03376.x
- Hale CJ, Jacobsen SE (2012) Equal-parenting policy. *Nature* 482:2–4.
- Hall AJ, Richards RA (2013) Prognosis for genetic improvement of yield potential and water-limited yield of major grain crops. *Field Crop Res* 143:18–33. doi: 10.1016/j.fcr.2012.05.014
- Hamamura Y, Saito C, Awai C, et al. (2011) Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 21:497–502. doi: 10.1016/j.cub.2011.02.013
- Hamamura Y, Nishimaki M, Takeuchi H, et al. (2014) Live imaging of calcium spikes during double fertilization in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 5:4722. doi: 10.1038/ncomms5722
- Harney P, Grant F (1981) The cytogenetics of *Lotus* (Leguminosae). VII. Segregation and recombination of chemical constituents in interspecific hybrids between species closely related to *L. corniculatus* L. *Can J Genet Cytol* 6:140–146. doi: 10.1139/g64-019
- Harper JL, Lovell PH, Moore KG (1970) The shapes and sizes of seeds. *Annu Rev Ecol Syst* 1:327–356. doi: 10.1146/annurev.es.01.110170.001551
- Harvey EB (1936) Parthenogenetic merogony or cleavage without nuclei in *Arbacia punctulata*. *Biol Bull* 71:101–121. doi: 10.2307/1537411

- Hehenberger E, Kradolfer D, Köhler C (2012) Endosperm cellularization defines an important developmental transition for embryo development. *Development* 139:2031–2039. doi: 10.1242/dev.077057
- Hendry GW (1919) Mariout barley with a discussion of barley culture in California. *Univ Calif Bull* 312, 109 o.
- Hepler PK, Winship LJ (2010) Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. *J Integr Plant Biol* 52:147–160. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00923.x
- Hernández P, Barceló PHP, Martín A, Cabrera AMA (2001) The effect of *Hordeum chilense* and *Triticum* cytoplasms on anther culture response of tritordeum. *Plant Cell Rep* 20:542–546. doi: 10.1007/s002990100355
- Heslop-Harrison J (1979) Pollen-stigma interaction in grasses: a brief review. *New Zeal J Bot* 17:537–546. doi: 10.1080/0028825X.1979.10432570
- Higashiyama T (2002) The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *J Plant Res* 115:149–60. doi: 10.1007/s102650200020
- Higashiyama T, Takeuchi H (2015) The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annu Rev Plant Biol* 66:393–413. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-115635
- Hogenboom NG (1984) Incongruity: Non-functioning of intercellular and intracellular partner relationships through non-matching information. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 17: Cellular Interactions* (eds. Linskens HF, Heslop-Harrison J). Springer, o. 640–654.
- Hougas RW, Peloquin SJ (1957) A haploid plant of the potato variety Katahdin. *Nature* 180:1209–1210. doi: 10.1038/1801209a0
- Hougas RW, Peloquin SJ (1958) The potential of potato haploids in breeding and genetic research. *Am Potato J* 35:701–707. doi: 10.1007/BF02855564
- Hsam SKL, Mohler V, Hartl L, et al. (2000) Mapping of powdery mildew and leaf rust resistance genes on the wheat-rye translocated chromosome T1BL · 1RS using molecular and biochemical markers. *Plant Breed* 119:87–89. doi: 10.1046/j.1439-0523.2000.00444.x
- Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, et al. (2002) Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8133–8138. doi: 10.1073/pnas.072223799
- Inagaki M (1985) Embryo culture of wheat cultivar Norin 61 crossed with *Hordeum bulbosum* L. *Jpn J Breed* 35:59–64. doi: 10.1270/jsbbs1951.35.59
- Ingouff M, Haseloff J, Berger F (2005) Polycomb group genes control developmental timing of endosperm. *Plant J* 42:663–674. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02404.x
- Ingouff M, Hamamura Y, Gourgues M, et al. (2007) Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. *Curr Biol* 17:1032–1037. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.019
- Inzé D, De Veylder L (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* 40:77–105. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090431
- Ishikawa R, Ohnishi T, Kinoshita Y, et al. (2011) Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *Plant J* 65:798–806. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04466.x
- Islam AKMR, Shepherd KW, Sparrow DHB (1975) Addition of individual barley chromosomes to wheat. *Proc 3rd Intl Barley Genet Symp, Garching, WGermany*, o. 260–270.

- Islam AKMR, Shepherd KW, Sparrow DHB (1981) Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. *Heredity* 46:161–174. doi: 10.1038/hdy.1981.24
- Iwasaki M, Paszkowski J (2014) Epigenetic memory in plants. *EMBO J* 33:1987–1998. doi: 10.15252/embj.201488883
- Jalani BS, Moss JP (1980) The site of action of the crossability genes ( $Kr_1$ ,  $Kr_2$ ) between *Triticum* and *Secale*. I. Pollen germination, pollen tube growth, and number of pollen tubes. *Euphytica* 29:571–579. doi: 10.1007/BF00023204
- Jiang J, Gill BS (1994) Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 37:717–725. doi: 10.1139/g94-102
- Johnston SA, den Nijs TPM, Peloquin SJ, Hanneman RE (1980) The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet* 57:5–9. doi: 10.1007/BF00276002
- Johri B, Ambegaokar KB, Srivastava PS (1992) *Comparative Embryology of Angiosperms*, Vol. 1-2. Springer, 1221 o.
- Jullien PE, Kinoshita T, Ohad N, Berger F (2006) Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell* 18:1360–1372. doi: 10.1105/tpc.106.041178
- Kaufman MH, Barton SC, Surani MA (1977) Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature* 265:53–55. doi: 10.1038/265053a0
- Kawashima T, Berger F (2014) Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. *Nat Rev Genet* 15:613–624. doi: 10.1038/nrg3685
- Keogh RC, Deverall BJ, McLeod S (1980) Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. *Trans Br Mycol Soc* 74:329–333. doi: 10.1016/S0007-1536(80)80163-X
- Kermicle JL (1970) Dependence of the *R*-mottled aleurone phenotype in maize on mode of sexual transmission. *Genetics* 66:69–85.
- Kihara H, Koichiro T (1962) Use of an alien cytoplasm as a new method of producing haploids. *Jpn J Genet* 37:310–313. doi: 10.1266/jjg.37.310
- Kim J, Kim JH, Richards EJ, et al. (2014) *Arabidopsis* VIM proteins regulate epigenetic silencing by modulating DNA methylation and histone modification in cooperation with MET1. *Mol Plant* 7:1470–1485. doi: 10.1093/mp/ssu079
- Kinoshita T (2007) Reproductive barrier and genomic imprinting in the endosperm of flowering plants. *Genes Genet Syst* 82:177–186. doi: 10.1266/ggs.82.177
- Kinoshita T, Ikeda Y, Ishikawa R (2008) Genomic imprinting: A balance between antagonistic roles of parental chromosomes. *Semin Cell Dev Biol* 19:574–579. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.07.018
- Kinoshita T, Yadegari R, Harada JJ, et al. (1999) Imprinting of the *MEDEA* polycomb gene in the *Arabidopsis* endosperm. *Plant Cell* 11:1945–1952. doi: 10.1105/tpc.11.10.1945
- Kiss Á, Rajháthy T (1946) Untersuchungen über die Kreuzbarkeit innerhalb des Subtribus Triticinae. *Der Züchter* 26:127–136. doi: 10.1007/BF00713460
- Kiyosue T, Ohad N, Yadegari R, et al. (1999) Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA* polycomb gene in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4186–4191. doi: 10.1073/pnas.96.7.4186

- Koba T, Shimada T (1992) Variations in the crossability of common wheat cultivars with cultivated barley. *Hereditas* 116:187–192. doi: 10.1111/j.1601-5223.1992.tb00821.x
- Koba T, Handa T, Shimada T (1991) Efficient production of wheat-barley hybrids and preferential elimination of barley chromosomes. *Theor Appl Genet* 81:285–292. doi: 10.1007/BF00228665
- Koblitz H (1986) Barley (*Hordeum vulgare* L.): establishment of cultures and the regeneration of plants. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (ed. Bajaj YPS) 2. Springer, o. 181–203.
- Kole C (2011) Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Cereals. Springer, 497 o.
- Köhler C, Hennig L, Spillane C, et al. (2003) The *Polycomb*-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. *Genes Dev* 17:1540–1553. doi: 10.1101/gad.257403
- Kranz E (2001) *In vitro* fertilization. In: *Current Trends in the Embryology of Angiosperms* (eds. Bhojwani SS, Soh WY). Springer, o. 143–166.
- Kranz E, Dresselhaus T (1996) *In vitro* fertilization with isolated higher plant gametes. *Trends Plant Sci* 1:82–89. doi: 10.1016/S1360-1385(96)80039-2
- Kranz E, Lörz H (1993) *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell* 5:739–746. doi: 10.1105/tpc.5.7.739
- Kranz E, von Wiegen P, Quader H, Lörz H (1998) Endosperm development after fusion of isolated, single maize sperm and central cells *in vitro*. *Plant Cell* 10:511–524. doi: 10.1016/1369-5266(88)80041-4
- Krolow KD (1970) Untersuchungen über die Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. *Z Pflanzenzücht* 64:44–72.
- Kruse A (1972) *Hordeum* × *Triticum* hybrids. *Hereditas* 73:157–161. doi: 10.1111/j.1601-5223.1973.tb01078.x
- KSH (2016a) A fontosabb szántóföldi növények betakarított területe, összes termése és termésátlaga (1990–2015). [https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat\\_eves/i\\_omn007a.html](https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_omn007a.html).
- KSH (2016b) A bruttó hozzáadott érték értéke és megoszlása nemzetgazdasági áganként – ESA2010 (1995–2015). [https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat\\_eves/i\\_qpt002c.html](https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_qpt002c.html).
- Kumlehn J, Kirik V, Czihal A, et al. (2001) Parthenogenetic egg cells of wheat: cellular and molecular studies. *Sex Plant Reprod* 14:239–243. doi: 10.1007/s00497-001-0115-3
- Lafon-Placette C, Köhler C (2016) Endosperm-based postzygotic hybridization barriers: developmental mechanisms and evolutionary drivers. *Mol Ecol* 25:2620–2629. doi: 10.1111/mec.13552
- Lange W, Wojciechowska B (1976) The crossing of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.). I. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica* 25:609–620.
- Lau S, Slane D, Herud O, et al. (2012) Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annu Rev Plant Biol* 63:483–506. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105507
- Laurie DA, Bennett MD (1988) Cytological evidence for fertilization in hexaploid wheat × *Sorghum* crosses. *Plant Breed* 100:73–82. doi: 10.1111/j.1439-0523.1988.tb00220.x
- Laurie DA, Bennett MD (1989) The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. *Genome* 32:953–961. doi: 10.1139/g89-537
- Lein A (1943) Die Wirksamkeit von Kreuzbarkeitsgenen des Weizens in Kreuzungen von Roggen mit Weizen. *Der Züchter* 15:1–3. doi: 10.1007/BF01812374

- Lermontova I, Schubert V, Fuchs J, et al. (2006) Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell* 18:2443–2451. doi: 10.1105/tpc.106.043174
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362–365. doi: 10.1038/366362a0
- Lin BY (1984) Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107:103–115.
- Linde-Laursen I, Heslop-Harrison JS, Shepherd KW, Taketa S (1997) The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas* 126:1–16. doi: 10.1111/j.1601-5223.1997.00001.x
- Lindschau M, Oehler E (1935) Untersuchungen am konstant intermediären additiven Rimpau'schen Weizen-Roggenbastard. *Der Züchter* 7:228–233. doi: 10.1007/BF01812315
- Lobell DB, Cassman KG, Field CB (2009) Crop yield gaps: Their importance, magnitudes, and causes. *Annu Rev Environ Resour* 34:179–204. doi: 10.1146/annurev.enviro.041008.093740
- Lopes MA, Larkins BA (1993) Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* 5:1383–1399. doi: 10.2307/3869790
- Lopez M, Halby L, Arimondo PB (2016) DNA methyltransferase inhibitors: Development and applications. In: *DNA Methyltransferases - Role and Function* (eds. Jeltsch A, Jurkowska RZ). Springer, o. 431–474.
- Lund G, Ciceri P, Viotti A (1995) Maternal-specific demethylation and expression of specific alleles of zein genes in the endosperm of *Zea mays* L. *Plant J* 8:571–581. doi: 10.1046/j.1365-313X.1995.8040571.x
- Luo M, Bilodeau P, Koltunow A, et al. (1999) Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:296–301. doi: 10.1073/pnas.96.1.296
- Luo M, Bilodeau P, Dennis ES, et al. (2000) Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEA*, and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10637–10642. doi: 10.1073/pnas.170292997
- Luo M, Platten D, Chaudhury A, et al. (2009) Expression, imprinting, and evolution of rice homologs of the polycomb group genes. *Mol Plant* 2:711–723. doi: 10.1093/mp/ssp036
- Maheshwari P (1950) *An Introduction to the Embriology of Angiosperms*. McGraw-Hill, 453 o.
- Maheshwari SC, Tyagi AK, Malhotra K, Sopory SK (1980) Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms – the current status. *Theor Appl Genet* 58:193–206. doi: 10.1007/BF00288437
- Makarevich G, Villar CBR, Erilova A, Köhler C (2008) Mechanism of *PHERES1* imprinting in *Arabidopsis*. *J Cell Sci* 121:906–912. doi: 10.1242/jcs.023077
- Martin A, Chapman V (1977) A hybrid between *Hordeum chilense* and *Triticum aestivum*. *Cereal Res Commun* 5:365–368.
- Martin A, Sanchez-Monge EL (1980) A hybrid between *Hordeum chilense* and *Triticum turgidum*. *Cereal Res Commun* 8:349–353.
- Martin AA, Cubero JI (1981) The use of *Hordeum chilense* in cereal breeding. *Cereal Res Commun* 9:317–323.
- Martín A, Alavare JB, Martín LM, et al. (1999) The development of Tritordeum: a novel cereal for food processing. *J Cereal Sci* 30:85–95. doi: 10.1006/jcrs.1998.0235
- Márton ML, Cordts S, Broadhvest J, Dresselhaus T (2005) Micropylar pollen tube guidance by Egg Apparatus 1 of maize. *Science* 307:573–576. doi: 10.1126/science.1104954

- Márton ML, Fastner A, Uebler S, Dresselhaus T (2012) Overcoming hybridization barriers by the secretion of the maize pollen tube attractant ZmEA1 from *Arabidopsis* ovules. *Curr Biol* 22:1194–1198. doi: 10.1016/j.cub.2012.04.061
- Maruyama D, Völz R, Takeuchi H, et al. (2015) Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism. *Cell* 161:907–918. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.018
- McCray FA (1932) Compatibility of certain *Nicotiana* species. *Genetics* 17:621–636.
- McFadden ES, Sears ER (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J Hered* 37:81–107. doi: oxfordjournals.jhered.a105590
- Meister N, Tjumjakoff NA (1928) Rye-wheat hybrids from reciprocal crosses. *J Genet* 20:233–245. doi: 10.1007/BF02983142
- Molnár-Láng M (2011) Faj és nemzetségkeresztezések a genetikai variabilitás növelésére. In: *Növénygenetika* (szerk. Hoffmann B). o. 57–62.
- Molnár-Láng M, Linc G, Szakács É (2014) Wheat–barley hybridization: the last 40 years. *Euphytica* 195:315–329. doi: 10.1007/s10681-013-1009-9
- Molnár-Láng M, Sutka J, Barnabás B, et al. (1985) Production of barley (*Hordeum vulgare* L.) x wheat (*Triticum aestivum* L.) hybrids. *Növénytermelés* 34:257–262.
- Moore G, Gale MD, Kurata N, Flavell RB (1993) Molecular analysis of small grain cereal genomes: Current status and prospects. *Nat Biotechnol* 11:584–589. doi: 10.1038/nbt0593-584
- Morinaga T (1934) Interspecific hybridization in *Brassica*. VI. The cytology of F1 hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. *Cytologia (Tokyo)* 6:62–67. doi: 10.1508/cytologia.6.62
- Möller B, Weijers D (2009) Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:1–13. doi: 10.1101/cshperspect.a001545
- Mujeeb-Kazi A, Rodriguez R (1984) *Hordeum vulgare* × *Triticum aestivum* hybrids. *Cytologia (Tokyo)* 49:557–565. doi: 10.1508/cytologia.49.557
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Müntzing A (1936) Über die Entstehungsweise 56chromosomiger Weizen-Roggen-Bastarde. *Der Züchter* 8:188–191. doi: 10.1007/BF01812004
- Narayanaswami S (1954) The structure and development of the caryopsis in some indian millets. III. *Paspalum scrobiculatum* L. *Bull Torrey Bot Club* 81:288–299. doi: 10.2307/2997143
- Nawaschin S (1898) Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bull Acad Imp Sci St Petersburg* 9:377–382.
- Neeraj A, Khanna VK (1992) Studies on pollen germination, pollen tube growth and seed set in reciprocal wheat–barley crosses. *Wheat Inf Serv* 74:28–32.
- NÉS2 (2014) Második Nemzeti Éghajlatváltozási Stratégia 2014-2025 kitekintéssel 2050-re. <http://nak.mfgi.hu/hu/node/61>
- Neumann B, Barlow DP (1996) Multiple roles for DNA methylation in gametic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 6:159–163. doi: 10.1016/S0959-437X(96)80045-1
- Nguyen H, Sabelli P, Larkins B (2007) Endoreduplication and programmed cell death in the cereal endosperm. *Plant Cell Monogr* 8:21–43. doi: 10.1007/7089

- Ning J, Peng XB, Qu LH, et al. (2006) Differential gene expression in egg cells and zygotes suggests that the transcriptome is restructured before the first zygotic division in tobacco. *FEBS Lett* 580:1747–1752. doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.028
- Nishiyama I, Inomata N (1966) Embryological studies on cross-incompatibility between 2x and 4x in *Brassica*. *Jpn J Genet* 41:27–42. doi: 10.1266/jjg.41.27
- Noda K, Kasha KJ (1978) A proposed barley karyotype revision based on C-band chromosome identification. *Crop Sci* 18:925–930. doi: 10.2135/cropsci1978.0011183X001800060003x
- Nodine MD, Bartel DP (2012) Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos. *Nature* 482:94–97. doi: 10.1038/nature10756
- Ohad N, Margossian L, Hsu DC, et al. (1996) A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5319–5324. doi: 10.1016/S1369-5266(99)80006-5
- Ohad N, Yadegari R, Margossian L, et al. (1999) Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* 11:407–416. doi: 10.1105/tpc.11.3.407
- Ohnishi Y, Hoshino R, Okamoto T (2014) Dynamics of male and female chromatin during karyogamy in rice zygotes. *Plant Physiol* 165:1533–1543. doi: 10.1104/pp.114.236059
- Okada T, Endo M, Singh MB, Bhalla PL (2005) Analysis of the histone H3 gene family in *Arabidopsis* and identification of the male-gamete-specific variant *AtMGH3*. *Plant J* 44:557–568. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02554.x
- Okamoto T (2005) Identification of genes that are up- or down-regulated in the apical or basal cell of maize two-celled embryos and monitoring their expression during zygote development by a cell manipulation- and PCR-based approach. *Plant Cell Physiol* 46:332–338. doi: 10.1093/pcp/pci032
- Okamoto T, Higuchi K, Shinkawa T, et al. (2004) Identification of major proteins in maize egg cells. *Plant Cell Physiol* 45:1406–1412. doi: 10.1093/pcp/pch161
- Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, et al. (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458:357–361. doi: 10.1038/nature07882
- Olsen OA (2001) Endosperm development: Cellularization and cell fate specification. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:233–267. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.233
- Olsen OA (2004) Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16:S214–S227. doi: 10.1105/tpc.017111
- Ortelli S, Winzeler H, Winzeler M, et al. (1996) Leaf rust resistance gene *Lr9* and winter wheat yield reduction: I. Yield and yield components. *Crop Sci* 36:1590–1595. doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600060030x
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biol* 10:11. doi: 10.1186/1471-2199-10-11
- Park S, Harada JJ (2008) *Arabidopsis* embryogenesis. In: *Plant Embryogenesis* (eds. Suárez MF, Bozhkov PV). Humana Press, o. 3–16. doi: 10.1007/978-1-59745-273-1\_1
- Pedersen C, Langridge P (1997) Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome* 40:589–593. doi: 10.1139/g97-077
- Pedersen C, Rasmussen SK, Linde-Laursen I (1996) Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (Poaceae) by in situ hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome* 39:93–104. doi: 10.1139/g96-013

- Peng J, Sun D, Nevo E (2011) Wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, occupies a pivotal position in wheat domestication process. *Aust J Crop Sci* 5:1127–1143.
- Piccolo FM, Fisher AG (2014) Getting rid of DNA methylation. *Trends Cell Biol* 24:136–143. doi: 10.1016/j.tcb.2013.09.001
- Pickering RA (1985) Partial control of chromosome elimination by temperature in immature embryos of *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. *Euphytica* 34:869–874. doi: 10.1007/BF00035426
- Pickersgill B (1993) Interspecific hybridization by sexual means. In: *Plant Breeding: Principles and Prospects* (eds. Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa L). Chapman & Hall, o. 63–78. doi: 10.1007/978-94-011-1524-7\_6
- Pirrotta V (1997) PcG complexes and chromatin silencing. *Curr Opin Genet Dev* 7:249–258. doi: 10.1016/S0959-437X(97)80135-9
- Polgári D, Cseh A, Szakács É, et al. (2014) High-frequency generation and characterization of intergeneric hybrids and haploids from new wheat–barley crosses. *Plant Cell Rep* 33:1323–1331. doi: 10.1007/s00299-014-1618-3
- Randolph LF (1936) Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J Agr Res* 53:881–916.
- Rasmusson DC, Wilcoxson RD (1979) Registration of ‘Morex’ barley. *Crop Sci* 19:293.
- Ray A (1997) Three’s company: Regulatory cross-talk during seed development. *Plant Cell* 9:665–668. doi: 10.1105/tpc.9.5.665
- Ray DK, Ramankutty N, Mueller ND, et al. (2012) Recent patterns of crop yield growth and stagnation. *Nat Commun* 3:1293. doi: 10.1038/ncomms2296
- Riley R, Chapman V (1967) The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genet Res* 9:259–267. doi: 10.1017/S0016672300010569
- Riley R, Law C (1965) Genetic variation in chromosome pairing. *Adv Genet* 13:57–114. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60047-4
- Roberts HF (1929) *Plant Hybridization before Mendel*. Princeton Univ Press, 374 o.
- Russell SD (1993) The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell* 5:1349–1359. doi: 10.1105/tpc.5.10.1349
- Sabelli PA, Larkins BA (2009) The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol* 149:14–26. doi: 10.1104/pp.108.129437
- Sandaklie-Nikolova L, Palanivelu R, King EJ, et al. (2007) Synergid cell death in Arabidopsis is triggered following direct interaction with the pollen tube. *Plant Physiol* 144:1753–1762. doi: 10.1104/pp.107.098236
- Sanei M, Pickering R, Kumke K, et al. (2011) Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:E498–505. doi: 10.1073/pnas.1103190108
- Sarkar KR, Coe EH (1966) A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. *Genetics* 54:453–464.
- Sarkar P, Stebbins GL (1956) Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am J Bot* 43:297–304. doi: 10.2307/2438947
- Schatlowski N, Wolff P, Santos-González J, et al. (2014) Hypomethylated pollen bypasses the interploidy hybridization barrier in Arabidopsis. *Plant Cell* 26:3556–3568. doi: 10.1105/tpc.114.130120



- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A (2002) *DICER-LIKE1*: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 7:487–491. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02355-5
- Scholten S, Lörz H, Kranz E (2002) Paternal mRNA and protein synthesis coincides with male chromatin decondensation in maize zygotes. *Plant J* 32:221–231. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01418.x
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison P (1989) *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot* 64:315–324. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a087847
- Scott RJ, Spielman M, Bailey J, Dickinson HG (1998) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125:3329–3341.
- Sears ER, Miller TE (1985) The history of Chinese Spring wheat. *Cereal Res Commun* 13:261–263.
- Serrano I, Suárez C, Olmedilla A, et al. (2008) Structural organization and cytochemical features of the pistil in Olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual at anthesis. *Sex Plant Reprod* 21:99–111. doi: 10.1007/s00497-008-0075-y
- Sharma HC (1995) How wide can a wide cross be? *Euphytica* 82:43–64. doi: 10.1007/BF00028709
- She W, Baroux C (2014) Chromatin dynamics during plant sexual reproduction. *Front Plant Sci* 5:354. doi: 10.3389/fpls.2014.00354
- Sigurbjörnsson B, Micke A (1969) Progress in mutation breeding. In: *Induced Mutation in Plants*. Vienna, o. 673–697.
- Singh RJ, Tsuchiya T (1982) Identification and designation of telocentric chromosomes in barley by means of Giemsa N-banding technique. *Theor Appl Genet* 64:13–24. doi: 10.1007/BF00303644
- Sinskaia E (1927) Geno-systematical investigations of cultivated *Brassica*. *Appl Bot Plant Breeding* 17:1–116.
- Soltis DE, Soltis PS (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends Ecol Evol* 14:348–352. doi: 10.1016/S0169-5347(99)01638-9
- Sørensen MB, Mayer U, Lukowitz W, et al. (2002) Cellularisation in the endosperm of *Arabidopsis thaliana* is coupled to mitosis and shares multiple components with cytokinesis. *Development* 129:5567–5576. doi: 10.1242/dev.00152
- Sprunck S, Baumann U, Edwards K, et al. (2005) The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant J* 41:660–672. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02332.x
- Sprunck S, Rademacher S, Vogler F, et al. (2012) Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science* 338:1093–1097. doi: 10.1126/science.1223944
- Sreenivasulu N, Wobus U (2013) Seed-development programs: A systems biology-based comparison between dicots and monocots. *Annu Rev Plant Biol* 64:189–217. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120215
- Stebbins GL, Pun FT (1953) Artificial and natural hybrids in the Gramineae, tribe Hordeae. VI. Chromosome pairing in *Secale cereale* × *Agropyron intermedium* and the problem of genome homologies in the Triticinae. *Genetics* 38:600–608.
- Suzuki K, Taniguchi T, Maeda E (1992) Ultrastructure and cleavage pattern of rice proembryos. *Jpn J Crop Sci* 61:292–303. doi: 10.1626/jcs.61.292
- Szakács É, Molnár-Láng M (2007) Development and molecular cytogenetic identification of new winter wheat-winter barley ('Martonvásári 9 kr1' – 'Igrí') disomic addition lines. *Genome* 50:43–50. doi: 10.1139/g06-134

- Szakács É, Molnár-Láng M (2010) Identification of new winter wheat - winter barley addition lines (6HS and 7H) using fluorescence in situ hybridization and the stability of the whole 'Martonvásári 9 kr1' - 'Igri' addition set. *Genome* 53:35–44. doi: 10.1139/g09-085
- Szakács É, Kruppa K, Molnár-Láng M (2013) Analysis of chromosomal polymorphism in barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*) and between *H. vulgare* and *H. chilense* using three-color fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Appl Genet* 54:427–433. doi: 10.1007/s13353-013-0167-8
- Tadros W, Lipshitz HD (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136:3033–3042. doi: 10.1242/dev.033183
- Taketa S, Takahashi H, Takeda K (1998) Genetic variation in barley of crossability with wheat and its quantitative trait loci analysis. *Euphytica* 103:187–193. doi: 10.1023/A:1018344119747
- Talbert PB, Masuelli R, Tyagi AP, et al. (2002) Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant. *Plant Cell* 14:1053–1066. doi: 10.1105/tpc.010425
- Taylor MG, Vasil IK (1995) The ultrastructure of zygotic embryo development in pearl-millet (*Pennisetum glaucum*, Poaceae). *Am J Bot* 82:205–219. doi: 10.2307/2445528
- Thomas JB, Kaltsikes PJ, Anderson RG (1980) Relation between wheat-rye crossability and seed set of common wheat after pollination with other species in the Hordeae. *Euphytica* 30:121–127. doi: 10.1007/BF00033667
- Thompson WP (1930) Causes of difference in success of reciprocal interspecific crosses. *Am Nat* 64:407–421. doi: 10.1086/280326
- Tian G, You R, Guo F, Wang X (1998) Microtubular cytoskeleton of free endosperm nuclei during division in wheat. *Cytologia (Tokyo)* 63:427–433. doi: 10.1508/cytologia.63.427
- Tilghman SM (1999) The sins of the fathers and mothers: Genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96:185–193. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80559-0
- Tischner T, Kőszegi B (1997) Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron Hung* 45:85–104.
- Tjio JH, Hagberg A (1951) Cytological studies on some X-ray mutants of barley. *Ann Aula Dei* 2:149–167.
- Tsunewaki K (1964) Genetic studies of a 6x-derivative from an 8x *triticale*. *Can J Genet Cytol* 6:1–11. doi: 10.1139/g64-001
- Tsunewaki K (2009) Plasmon analysis in the *Triticum-Aegilops* complex. *Breed Sci* 59:455–470. doi: 10.1270/jsbbs.60.177
- Van Slageren MW (1994) Wild wheats: A monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae): a revision of all taxa closely related to wheat, excluding wild *Triticum* species, with notes on other genera in the tribe Triticeae, especially *Triticum*. Wageningen Agricultural University, 513 o.
- Vieira R, Queiroz Á, Morais L, et al. (1990) 1R chromosome nucleolus organizer region activation by 5-azacytidine in wheat × rye hybrids. *Genome* 33:707–712. doi: 10.1139/g90-106
- Vielle-Calzada JP, Thomas J, Spillane C, et al. (1999) Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis medea* locus requires zygotic *DDMI* activity. *Genes Dev* 13:2971–2982. doi: 10.1101/gad.13.22.2971
- Vielle-Calzada JP, Baskar R, Grossniklaus U (2000) Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 404:91–94. doi: 10.1038/35003595
- Vinkenoog R, Spielman M, Adams S, et al. (2000) Hypomethylation promotes autonomous endosperm development and rescues postfertilization lethality in *fi*e mutants. *Plant Cell* 12:2271–2282. doi: 10.1105/tpc.12.11.2271

- Vinkenoog R, Bushell C, Spielman M, et al. (2003) Genomic imprinting and endosperm development in flowering plants. *Mol Biotechnol* 25:149–184. doi: 10.1385/MB:25:2:149
- Vishnyakova MA, Willemse MT (1994) Pollen-pistil interaction in wheat. *Acta Bot Neerl* 43:51–64. doi: 10.1111/j.1438-8677.1994.tb00733.x
- von Wangenheim KH (1962) Zur Ursache der Abortion von Samenanlagen in diploid-polyploid Kreuzungen. II. Unterschiedliche Differenzierung von Endospermen mit gleichem Genom. *Z Vererbungsl* 93:319–334.
- von Wangenheim KH, Peterson HP (2004) Aberrant endosperm development in interploidy crosses reveals a timer of differentiation. *Dev Biol* 270:277–289. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.03.014
- Vongs A, Kakutani T, Martienssen RA, Richards EJ (1993) *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* 260:1926–1928. doi: 10.1126/science.8316832
- Walbot V (1994) Overview of key steps in aleurone development. In: *The Maize Handbook* (eds. Freeling M, Walbot V). Springer, o. 78–80.
- Watkins AE (1924) Genetic and cytological studies in wheat. I. *J Genet* 14:129–171. doi: 10.1007/BF02983089
- Webb MC, Gunning BES, Webb MC, Brian ES (1991) The microtubular cytoskeleton during development of the zygote, proembryo and free-nuclear endosperm in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 184:187–195. doi: 10.1007/BF01102418
- Weijers D, Geldner N, Offringa R, Jürgens G (2001) Early paternal gene activity in *Arabidopsis*. *Nature* 414:709–710. doi: 10.1038/414709a
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323–330. doi: 10.1016/0092-8674(95)90385-2
- Wendrich JR, Weijers D (2013) The *Arabidopsis* embryo as a miniature morphogenesis model. *New Phytol* 199:14–25. doi: 10.1111/nph.12267
- Xiao W, Gehring M, Choi Y, et al. (2003) Imprinting of the *MEA* Polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. *Dev Cell* 5:891–901. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00361-7
- Zenktele M, Nitzsche W (1984) Wide hybridization experiments in cereals. *Theor Appl Genet* 68:311–315. doi: 10.1007/BF00267883
- Zeven AC (1987) Crossability percentages of some 1400 bread wheat varieties and lines with rye. *Euphytica* 36:299–319. doi: 10.1007/BF00730677
- Zirkle C (1935) *The beginnings of plant hybridization*. Univ Pennsylvania Press, 231 o.

## 8.2 Táptalajok összetétele

### 8.2.1 N6D Táptalaj

	Név	Mennyiség (mg/L)
Makro	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	462
	KNO <sub>3</sub>	2830
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	166
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	186
Mikro	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	4
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,025
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025
Vitaminok	Retinol	0,01
	Thiamine	1
	Nicotinic acid	1
	Riboflavin	0,2
	Ca pantothenate	1
	Folic acid	0,4
	Pyridoxine	1
	Cobalamine	0,02
	Ascorbic acid	2
	Calciferol	0,01
	Biotin	0,01
	Cholin chloride	1
	Amino Benzoic acid	0,02
Savak	Malic acid	40
	Citric acid	40
	Fumaric acid	40
	Na-Pyruvate	20
	Myo Inositol	100
	Xylose	150
Egyéb	NaFeEDTA	25
	Glutamine	750
	Casein Hydrolyisate	250
	Maltose	54000
	Indolbutyric acid (IBA)	0,5
	Kinetin	0,5
	Phytigel	5000

## 8.2.2 RM1 Táptalaj

	Név	Mennyiség (mg/l)
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	232
	KNO <sub>3</sub>	1415
Makro	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	83
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	93
	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5
Mikro	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0125
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0125
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,0125
	KI	0,4
	Thiamine	0,5
	Nicotinic acid	0,5
Vitaminok	Ca-pantothenate	0,25
	Pyridoxine	0,5
	Ascorbic acid	0,5
	Biotin	0,25
	Glycine	1
	NaFeEDTA	16
	Asparagine monohidrate	150
Egyéb	Glucose	200
	Myo Inositol	100
	2,4-D	2
	Agar	21000



## 9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm az MTA ATK főigazgatójának, **Prof. Balázs Ervin** úrnak, az MTA rendes tagjának, hogy lehetővé tette dolgozatom elkészítését, amihez az anyagi fedezetet az OTKA K101786 sz. projekt biztosította. Szintén köszönettel tartozom **Prof. Heszky László** és **Prof. Hornok László** akadémikus uraknak a támogatásért, hogy posztgraduális tanulmányaimat a Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskolájában végezhettem el.

Köszönet illeti meg **Prof. Barnabás Beáta** akadémikust, korábbi osztály- és társ-témavezetőmet, aki amellet, hogy fölkellette érdeklődésemet a növényi szaporodásbiológia iránt, hasznos tanácsokkal és észrevételekkel segítette munkámat. Köszönettel tartozom **Dr. Jäger Katalinnak**, jelenlegi osztály- és társ-témavezetőmnek a mikroszkópos és szövettani munkák során nyújtott segítségéért és tanácsaiért.

Hálás köszönet témavezetőmnek, **Dr. Sági Lászlónak**, amiért hat év során mind szakmailag, mind emberileg támogatott, és mérhetetlen türelemről tanúbizonyságot téve mindig megtalálta a módját, hogy visszatereljen a helyes útra. Köszönetemet fejezem ki a Sejtbiológiai Osztály valamennyi munkatársának. **Dr. Fábíán Attilának** a mikroszkópos munkák mellett a dolgozatom elkészítése során adott hasznos tanácsait, **Gondos Erikának** a növényanyag kezelésében és a szövettenyésztésben végzett munkáját nagyra értékelem. Hálás köszönettel tartozom **Békné Kapral Emesének** a mindennapi munkám során nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, valamint azért, hogy a legmonotonabb munkákat is képes volt szórakozássá változtatni. Szeretnék köszönetet mondani **Eitel Gabriella** és **Mihók Edit** doktoranduszoknak a szaporodásbiológiai vizsgálatok során nyújtott segítségükért, valamint **Fodor Szilviának**, aki a tiszta eszközöket biztosította a vizsgálatokhoz.

Köszönettel tartozom **Dr. Juhász Angélnak** és **Dr. Soós Vilmosnak**, a proteomikai és a molekuláris markeres kísérletekhez nyújtott segítségükért, valamint hogy rendelkezésemre bocsátották az Alkalmazott Genomika Osztály műszereit és eszközeit. Köszönet illeti meg **Dr. Lángné Molnár Mártát**, **Dr. Linc Gabriellát**, **Dr. Cseh Andrást** és **Dr. Szakács Évát** az együttműködésért a molekuláris és citológiai munkák során. Köszönöm a Molekuláris Biológia Osztály doktoranduszainak, **Boldizsár Ákosnak** és **Kalapos Balázsnak** a dolgozatom elkészítése során nyújtott technikai tanácsait. Köszönettel tartozom **Kőszegi Ferencnének** az adminisztrációs teendőkből vállalt segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **Feleségemnek** és **Szüleimnek** a türelmet és megértést, amivel munkámat és dolgozatom megírását végig kísérték.