

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Doktori disszertáció

**Hazai nemesítésű kukorica tenyészanyagok genetikai forrásainak
bővítése innovatív módszerekkel.**

Rádi Feríz

Témavezetők: Prof. Dr. Dudits Dénes

Dr. Ayaydin Ferhan



2021.

Tartalmi összefoglaló, célkitűzés

A kukorica világgazdasági jelentősége évről évre nő, a Föld növekvő népességének folyamatosan csökkenő területen egyre több táplálékot kell előállítania. Az extenzív termelést gyorsuló ütemben az intenzív növénytermesztés váltja fel. Ahhoz, hogy a kukorica versenyben maradhasson a hatékonyan termeszthető haszonnövények közt meg kell felelnie az egyre szélsőségesebb környezeti hatások, és az intenzív termesztés kihívásainak. Ezt a fejlődést értelmezhetjük a genetikai alapok vonatkozásában, hiszen az időjáráshoz, talajtípusokhoz való alkalmazkodás genomi szinten kezdődik. Fontos megjegyezni, hogy ez a képesség nem spontán alakul ki, hanem a nemesítők hosszú és kitartó munkájának eredménye. Jelen értekezés a hazai kukoricavonalak legmodernebb, precíziós nemesítési technikákkal történő továbbfejlesztésével foglalkozik, kezdeményezve a jövőbe mutató, és versenyképes technológiák kidolgozását. A nemesítés egyik sarokköve az időtényező, minél rövidebb idő alatt kell a legjobb fajtákat piacra bocsátani, a verseny rendkívül kiélezett és gyors ütemű. A nemesítési folyamat lerövidítéséhez a dihaploid technológiát és annak részfolyamatait fejlesztettük tovább számos alternatívát nyújtva a felmerülő problémák megoldására. Az idő lerövidítése mellett cél a különleges tulajdonságok minél hatékonyabb örökítése a genotípusok széles körében. Ezek a módszerek megoldást nyújthatnak a kiemelkedő beltartalmi értékek, a többszörös vegyszer rezisztencia, a hímsterilitás és a szárazságtűrés hatékony kialakítására. A haploid növények birtokában célunk a recesszív, albínó mutációs marker felhasználásával az oligonukleotidok-irányított mutagenézis (ONIM) *in planta* módszerének kidolgozása volt. Az oligonukleotidok merisztémába juttatásával a genomban célzott helyen válik lehetővé pontmutációt előidéző erős fenotípusos visszacsatolással. Ez a technológia jelenleg a magyar precíziós kukoricanevelés úttörőjének számít. Feltett szándékunk és távlati célkitűzéseink közé tartozik, hogy az itt kifejlesztett módszereket rutinszerűen alkalmazzuk a hazai kukoricanevelés élmezőnyében. A hagyományos nemesítési módszerek során a genetikai történések véletlen események, a nemesítő csak a fenotípus értékelésére támaszkodhat. A precíziós nemesítési módszerek megoldást nyújthatnak a genomszintű folyamatok célzott irányíthatóságára. Nagyon fontos kiemelni, hogy az általunk használt és kifejlesztett technológiák genotípustól függetlenek, nem igénylik idegen gén beépítését. Ennek a két faktornak a kiküszöbölése kiemelt cél, mivel ezek a legnagyobb gátat szabták a kukorica molekuláris nemesítése során. A javasolt kísérleti fejlesztések eredményei hozzájárulhatnak ahhoz, hogy versenyképes magyar kukoricahibridek kerüljenek piaci bevezetésre.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés

1.1. A kukorica világgazdasági és hazai jelentősége	6
1.2. A hazai kukoricanemesítés rövid története	12
1.3. A kukoricahibridek nemesítésének kiemelt céljai, módszerei és eredményessége	14
1.4. Az értekezésben bemutatott kísérleti munka koncepciója és célja	16

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Beltenyésztett vonalak előállítása dihaploid technológiával	17
2.2. Növényi gének irányított mutagenézise: precíziós nemesítés	22
2.2.1. CRISPR-Cas9 technológia	23
2.2.2. Oligonukleotid- Irányított Mutagenézis (ONIM) növényekben	25
2.2.3 . A haploidok indukálási technológiájának összekapcsolása génszerkesztéssel: transzgénmentes nemesítési alapanyag előállítására	29

3. Anyagok és módszerek

3.1. Haploid indukciós keresztezések és szín-markerek	30
3.2. Genom méret meghatározás flow-citometriával	31
3.3. DNS izolálás és genotipizálás	31
3.4. A csíranövények rediploidizálása kolchicin kezeléssel	32
3.5. 5-FAM-jelölt mutagén oligonukleotidok tervezése és szintézise	32
3.6. Szintetikus egyszálú DNS molekulák injektálása haploid csíranövények merisztéma régiójába	33

3.7. Kukoricaszemek embrióiba történő DNS felvétele a csírázás időleges aktivációjával (seed priming)	33
3.8. Pollentömlőn keresztüli DNS felvétel a beporzás során	34
3.9. A fitoén deszaturáz (PDS) gén PCR amplifikációja és szekvenálása	34
3.10. Fluoreszcens mikroszkópiai módszerek	35

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. A dihaploid technológia optimalizálása a Pannon Genetik nemesítési programban

4.1.1. Keresztezési program az R1-navajo (R1-nj) markert hordozó inducer vonallal	35
4.1.2. Az előszelektált magok ploidszintjének meghatározása gyökércsúcsból, flow- citometriával	37
4.1.3. Genotípus meghatározás SSR markerekkel	39
4.1.4. A hajtás merisztémák dihaploidizációja kolchicin kezeléssel	40
4.1.5. A dihaploid technológia használatának tapasztalatai a Pannon Genetik nemesítési programjában.	41

4.2. A fitoén deszaturáz (PDS) kukoricagén Oligonukleotid- Irányított Mutagenézise (ONIM) a hajtásmerisztéma kezelésével

4.2.1. A kukorica fitoén deszaturáz (PDS) gén szekvencia-analízise és a cél nukleotidrégió meghatározása	43
4.2.2. A 5- karboxyfluoreszcein (5-FAM) jelölt oligonukleotidok felvétele a sejtekbe a kukorica hajtásmerisztéma injektálását követően	45
4.2.3. M1 haploid kukorica növények klorotikus fenotípusai	46
4.2.4. A klorofill hiányos szövetekből izolált DNS szekvencia analízise	48

4.3. A fitoén deszaturáz (PDS) kukoricagén irányított mutagenézise a csirázó (primed) kukoricaszemek embrióinak oligonukleotid molekulákkal történő kezelésével	
4.3.1. 5- FAM-jelölt oligonukleotidok kimutatása nyugalmi állapotú embriókban	52
4.3.2. Albínó szegregánsok megjelenése duzzasztott kukoricaszemek oligokezelését követő M2 generációban, a PDS gén szekvencia analízise	53
4.3.3. A „primed seed” módszer további variációinak tesztelése nem vezetett a PDS gén irányított mutációjához	55
4.4. A fitoén deszaturáz (PDS) kukoricagén irányított mutagenézise a pollentömlőn keresztül végzett szintetikus oligonukleotid felvétellel	
4.4.1. Tenyészkerti növények csöveinek visszavágása a virágzást megelőzően és módosított, szintetikus oligonukleotidokkal történő kezelése	59
4.4.2. A learatott szemekből nevelt növények önbeporzása, és az M2 nemzedékben a kukorica csíranövények fenotípusos értékelése	60
4.4.3. A klorofill hiányos szegregánsokból izolált DNS szekvencia analízise	61
5. Összefoglalás / Summary	63
Irodalomjegyzék	67
Rövidítések listája	75
Köszönetnyilvánítás	77
Nyilatkozat	78
Publikációk listája	79

1.Bevezetés

1.1. A kukorica világgazdasági és hazai jelentősége

A világ mezőgazdaságának 2030-ra 40%-kal több élelmiszert kell megtermelnie kisebb területen, kevesebb vízzel, csökkentett energia, műtrágya és növényvédőszer felhasználásával. Az üvegház hatású gázok kibocsátásának drasztikus csökkentésével mérsékelnünk kell a klímaváltozás hatásait. Ezek a kihívások közvetlenül érintik a magyar agráriumot. A gazda számára a növények különböző szervei jelentik a termést, amelyek a genetikailag beprogramozott növekedési, fejlődési folyamatok megvalósulása során környezeti hatások befolyása alatt alakulnak ki.

A hagyományos nemesítési módszerek esetében a genetikai folyamatok irányíthatatlanok, csak utólag, a fenotípus szintjén értékelhető az eredmény. A genetikai kód nagy pontosságú átprogramozása a genomszerkesztési módszerek kidolgozásával vált lehetővé mind a növénybiológiai kutatásban, mind a nemesítésben. Gazdasági növényeink biológiai teljesítőképessége messze nincs kihasználva, ha csak azt nézzük, hogy a hazai kukorica termésátlag hektáronként 3,6 tonnával alacsonyabb, mint az USA-ban. Magyarországon a kukorica vetésterülete megközelítőleg egy millió hektár, ami évente közel 8 millió tonna termést eredményez.

A kukorica a világ legelterjedtebb szántóföldi haszonnövénye. 2014-ben világszinten 939 millió tonna termést takarítottak be. Óvatos előrejelzések szerint az elkövetkező 5 évben további 63 millió, éves átlagban 12,6 millió tonnával várható a termelés növekedése. Az elmúlt évek számadatait figyelembe véve a növekedés 60 %-a a vetésterület nagyságának emelkedéséből származott. A klímaváltozást és a művelhető területek véges mennyiségét figyelembe véve a következő években sokkal nagyobb hangsúlyt kell fektetni a terméspotenciálból és termesztési technológiából származó többletermés garantálására.

Általában a termelés mintegy 1/3-át az USA adja, így ami az USA-ban történik, nagy hatással van a chicagói, de még a hazai tőzsdére is. Kukoricát legnagyobb mennyiségben az USA, Kína, Brazília és az EU országai termelik, fogyasztásban azonban az EU megelőzi Brazíliát. A világ kukoricaexportjában az USA tölti be a legnagyobb szerepet, utána Brazília következik. Meglepetésre a harmadik helyen Ukrajna áll és Argentína a negyedik.

A legnagyobb importőrök sorában Japán, Mexikó, Dél-Korea, Egyiptom a sorrend. A konkrét vetésterületi adatokat az 1. ábra mutatja be.

KUKORICA VETÉSTERÜLET			GKHÍRADÓ
EU-28, ha			
EUROSTAT, 2014			
Ország	Szemes	Siló	KUKORICA
France	1,848,070	1,411,800	3,259,870
Germany	481,300	2,092,600	2,573,900
Romania	2,504,420	48,050	2,552,470
Hungary	1,185,000	81,000	1,266,000
Poland	678,300	541,200	1,219,500
Italy	869,950	345,920	1,215,870
Spain	418,550	112,970	531,520
Bulgaria	408,400	25,130	433,530
Czech Republic	98,750	237,240	335,990
Slovakia	216,190	85,790	301,980
Austria	216,320	83,460	299,780
Croatia	252,570	28,660	281,230
Netherlands	18,000	226,000	244,000
Belgium	62,830	178,120	240,950
Portugal	107,640	85,390	193,030
Greece	181,380	11,630	193,010
Denmark	10,100	178,000	188,100
Great Britain	0	171,000	171,000
Slovenia	38,330	29,490	67,820
.....			0
EU-27	9,617,010	6,074,550	15,691,560

Változások 5 év alatt

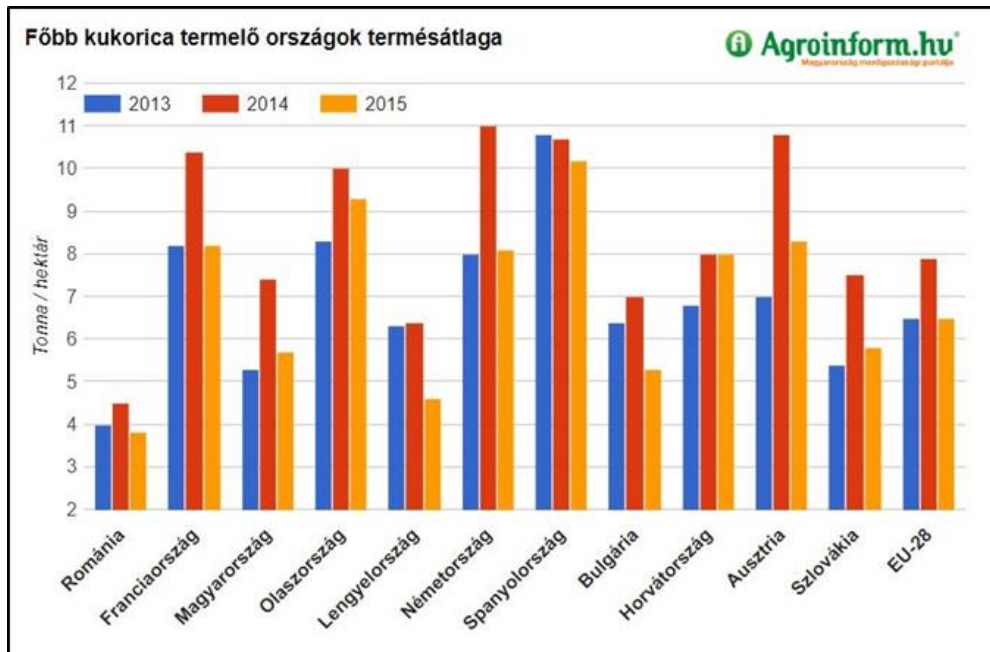
- Szemes terület
 - + 19%
 - + 1,5 millió ha
 - Franciaország
 - Lengyelország
- Siló terület
 - + 20%
 - + 1 millió ha
 - Németország
 - Csehország
 - Lengyelország
 - Olaszország

1. táblázat - Az EU tagállamokban a siló és szemes kukorica vetésterülete.

A kukorica vetésterület nagysága szempontjából az EU-s országok sorrendje: szemes kukorica tekintetében Románia és Franciaország után Magyarország a harmadik, szemes és silókukorica vonatkozásában pedig Franciaország, Németország és Románia után a negyedik előkelő helyet foglalja el. Európában a szemes kukorica vetésterülete 19 %-kal, azaz 1,5 millió hektárral (élenjáró ebben Franciaország és Lengyelország), a silókukorica vetésterülete pedig 20 %-kal, azaz 1 millió hektárral nőtt. Az utóbbiban élenjáró Németország, Csehország, Lengyelország és Olaszország közül külön figyelmet érdemel, hogy Németországban és Csehországban a növekedés főleg az energiacélú kukoricatermelés (biogáz) állami támogatásának köszönhető.

Természetesen a betakarítható termés mennyisége számos tényezőtől függ. A sikeres kukoricatermesztés titka azonban a jó fajtaválasztáson kívül a technológiai elemek -

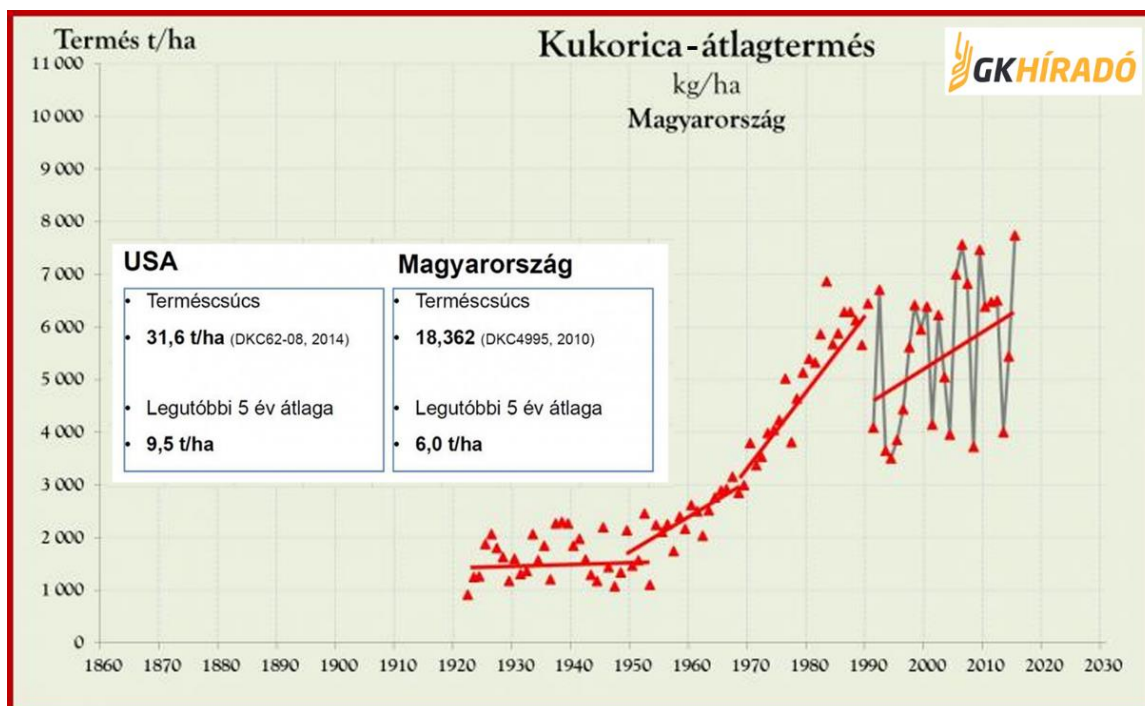
vetésforgó, talajművelés, tápanyag utánpótlás - helyes megválasztásában is rejlik. Ami a termésátlagok országonkénti nagyságát illeti sajnos hazánk nincs az élmezőnyben (2. ábra).



1. ábra - Az EU fő kukoricatermelő országainak termésátlaga.

A hozamok adatai alapján bőven van tennivalónk a kukorica termőképességének javítása érdekében, hogy az EU országok legjobbjait megközelíthessük.

A 3. ábra még fontosabb következtetésekre hívja fel a figyelmet. Az 1990-ig tartó felívelési tendencia megtorpanását követően igen erős évenkénti ingadozásokat mutat a statisztika. Ezt részben visszavezethetjük a klímahatásokra. A termésűcsökben látható lényeges különbség az amerikai farmerek javára igen komoly alapot ad számunkra, hogy javítsuk a hazai termésátlagot.



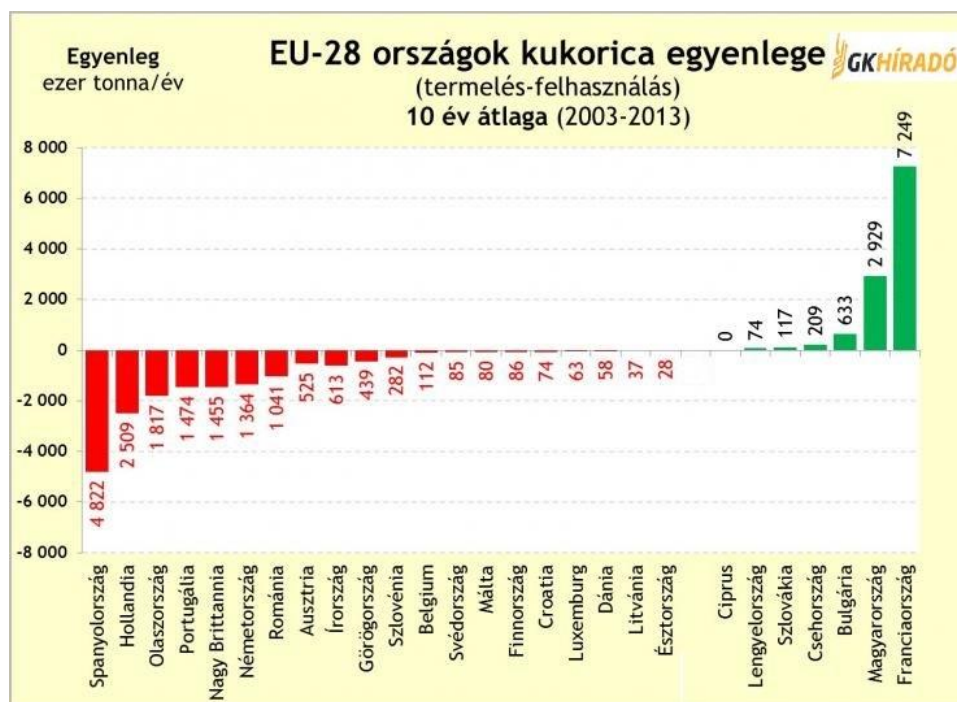
2. ábra - Magyarország kukorica átlagtermései

A hazai kukorica termésátlagok jelentős javítási lehetőséget rejtenek. Az USA-ban egy termésversenyen 2014-ben hektáronként 31,6 tonnát, Magyarországon 2010-ben egy hasonló versenyen 18,36 tonnát takarítottak be. Az USA-ban a legutóbbi 5 év termésátlaga 9,5 t/ha, Magyarországon 6,0 t/ha volt. Ez azt jelenti, hogy mind az USA-ban, mind Magyarországon a már gyakorlatban is elérhető terméspotenciálnak csak mintegy 1/3-át használjuk ki, vagy más megközelítésben, 2/3-át elveszítjük a kukoricaföldön a biotikus és az abiotikus tényezők következtében. Itt van az egyik nagy termesztéstechnológiai lehetőség. Jelentős biológiai potenciál van a kezünkben, de sokkal nagyobb hangsúlyt kell fektetni arra, hogy miként tudjuk kiiktatni azokat az akadályokat, amelyeket befolyásolni tudunk.

A kukorica sokoldalú felhasználását jellemzi, hogy ipari hasznosítása egyre dinamikusabban fejlődik. Az Egyesült Államokban folyamatosan nő a bioetanol gyártása. Az USA a jövőben a kukorica exportját mérsékelni kívánja a bioetanol előállítás fokozása miatt. Magyarországon a kukoricából történő bioetanol előállítás most van kibontakozóban. Amíg a kukorica tonnánkénti ára 24 ezer forintról 50–57 ezer forintra nőtt, a bioetanol ára nem változott. Az elkövetkezendő években megbízhatóan 35–45 ezer Ft/t körül fog stabilizálódni a kukorica ára. Bár az EU törvény előírja, hogy 2010-től a felhasznált

kőolajszármazék 5,7% -ának bioetanolnak kell lenni, az üzemanyag felhasználásnál. Azonban a jelenlegi kukoricaárak miatt a bioetanol előállítás veszteséges. Az etanol ára a világon (USA, Brazília) alacsony, és nem követi a kukorica árának növekedését.

A kukorica iránti igény Európában folyamatosan növekvő tendenciát mutat. Az európai országok közül csak nagyon kevesek képesek exportra, annál többen szorulnak importra. (3. ábra) Az exportra képes országok közül 10 év átlagában (2003-2013) Magyarország 2,9 millió tonna kukoricafeleslegével Franciaország után (7,2 millió tonna többlet) a második legnagyobb exportőr Európában. Európa több mint 18 millió tonna kukorica importjára kényszerült, amit Ukrajna, Szerbia, Brazília, az USA és Argentína fedezett.



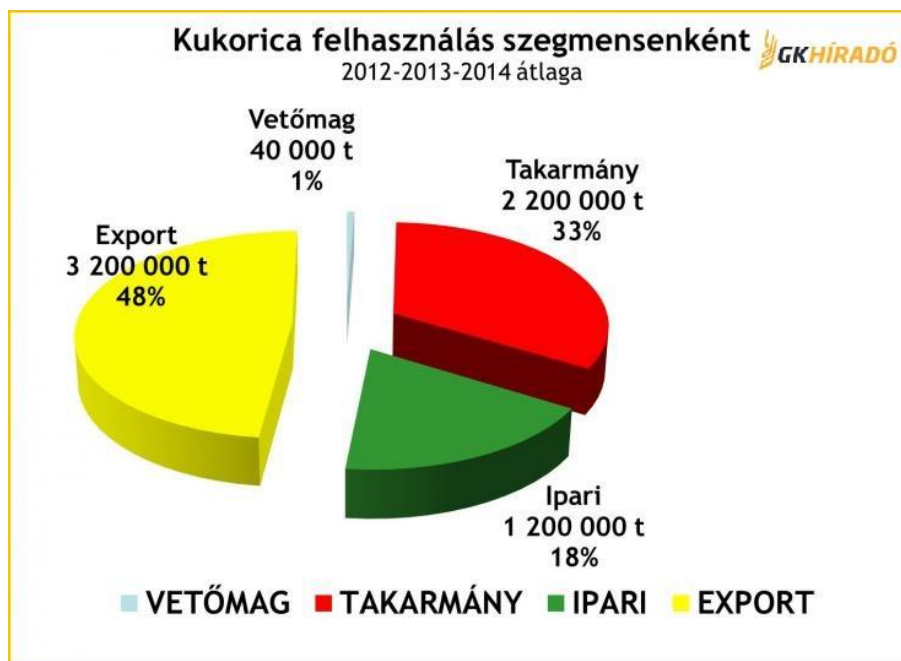
3. ábra - Magyarország jelentős exportőr, a kukorica piacon.

Ha a jelenlegi tendenciák folytatódnak, akkor a jövőben Magyarországnak a kukoricaexportban Ukrajnával, Szerbiával, Brazíliával, az USA-val és Argentínával, de az is lehet, hogy Romániával kell versenyeznie. Ha versenyben akarunk maradni, akkor nekünk magas technológiai színvonalon előállított, versenyképes árukukoricát kell termelni. A WTO tárgyalások eredményeként az USA európai exportjára is számítani lehet. Ha megnézzük az

USA vetésterületét, annak 93 %-án géntechnológiával nemesített (GMO) hibrideket vetnek, aminek 76 %-a gyomirtó szer és peszticid rezisztenciával rendelkezik, 13 %-ban szimplán csak herbicid-ellenálló hibrideket termesztnek. Brazíliában 2010/11-ben a GM kukoricák területének aránya elérte az összes vetett terület 59 %-át. És akkor még ott van Ukrajna, ahol a 200.000 ha-os gazdaság sem ritka, és ahol ma már a legnagyobb és legkorszerűbb gépek üzemelnek, a külföldi befektetők révén pedig nem csak megjelent, de működik is a digitalizációra alapozott precíziós technika.

Szerbia sem hagyható figyelmen kívül, ahol ugyan hozzánk hasonló szinten gazdálkodnak, de nagyon jó minőségű talajon. Az exportáló országok célközönsége, azaz 2014/15-ben a legnagyobb mennyiségben Spanyolország, Hollandia, Olaszország, Portugália, Anglia és Németország vásárolt kukoricát. De exportált kukoricát az EU Törökországba, Dél-Koreába, Egyiptomba, Izraelbe és Líbiába is.

A 4. ábra szerint 2012/15 három év átlagában megtermelt 6,64 millió tonna kukoricának 33 %-át takarmány, 18 %-át ipari, 1 %-át vetőmag-előállítás céljára használták fel, 48 %-át pedig export piacokon értékesítették. A magyar kukoricaexport külkereskedelmi jelentőségét mutatja, hogy a teljes hazai export 19 %-át adó gabonaexport 2/3-át, azaz a teljes hazai export több mint 12,5 %-át a kukorica adja. A kukorica tehát egy jelentős nemzetgazdasági tényező. Az export szempontjából – az eddigi tapasztalatok szerint – elsősorban Olaszország, Románia, Hollandia és Németország voltak a felvevő országok. Ezeken kívül azonban az előzőekben bemutatott célországokra is érdemes figyelmet fordítani. A jövőben a kukorica ipari felhasználásának jelentősége is biztosan nő, hiszen ez – már jelenleg is – az összes felhasználás egy meghatározó és ráadásul folyamatosan bővülő része.



4. ábra - A kukoricatermés hasznosításának magyarországi megoszlása a 2012/15 évi adatok alapján.

1.2. A hazai kukoricanemesítés rövid története

A kukoricanemesítés már a XIX. század második felében megjelent Magyarországon. Európai összevetésben a negyedik ország voltunk, amely szántóföldi növények nemesítésével kezdett foglalkozni. Az első nemesítési próbálkozások az ősi tájfajták továbbfejlesztésére irányultak, főleg betegségrezisztencia tekintetében. Az 1890-es évektől kezdve az óvári Mezőgazdasági Akadémián Cserhádi Sándor önálló tantárgyként oktatta a növénynemesítést. Hazánk egyik első és leghíresebb nemesítője Baross László 1895-ben Bánkúton kukoricanemesítéssel is foglalkozott. Munkássága során keresztezéssel és szelekcióval több „Bánkúti” kukoricafajtát állított elő. 1909-ben megalakult az Országos Nemesítő Intézet, majd 1916-ban bevezették a nemesített növényfajták állami törzskönyvezését, amely rendkívül nagy előrelépést jelentett a fajták elkülönítése, és a fajta tulajdonviszonyainak meghatározása érdekében. Hazánkban a klasszikus heterózis hatáson alapuló hibridizációs nemesítés az 1930-as évektől kezdte meg térhódítását. Feltétlen meg kell emlékezzünk Fleischmann Rudolfról, aki a kukorica mellett 30 növényfaj nemesítésével foglalkozott. Többek között ő vezette be 1914-ben a kukoricánál kiemelkedően fontos családnemesítési elveket. 1924-ben fajhibridek keresztezésével jól fattyasodó silókukoricát nemesített. Két kukoricafajta keresztezésével 1933-ban előállította a

Fleischmann féle lófogú heterózis kukoricát, amelyet 1953-ban Óvári-4 néven ismertek el. Neve a mai napig a patinás Fleischmann Rudolf díj fémjelzője. Az intenzív termelésre alkalmas hibridek és fajták az 1960-as évektől kezdődően az agrotechnikai újítások bevezetésével kaptak központi szerepet. Megjelent a beltenyésztett vonalakon alapuló hibridizáció, melynek hazánkban Papp Endre volt a kezdeményezője. A Martonvásári 5 névre hallgató beltenyésztett vonalokból álló kukorica hibrid nem csak Magyarországon, de egész Európában is az első klasszikus értelemben vett hibrid kukorica volt. Kezdetben négyvonalas hibridek nemesítésével foglalkoztak, ám 1968.-ban már elismerték az első kétvonalas kukorica hibrideket (Mv620, Mv630, Mv57). Ez idő alatt Szegeden a Szegedi Gabonakutató Intézetben. Fehér Károly és Németh János foglalkozott korai éréscsoportba tartozó hibridkukorica nemesítésével. A második világháború után kizárólag állami cégek foglalkozhattak nemesítéssel. Ez kukorica tekintetében Martonvásár és Szeged feladata volt egészen a rendszerváltásig, amikor is egy Egyiptomból Magyarországra települt nemesítő Prof Dr Samír Rády megalapította Magyarország első, és azóta is egyetlen magán kukoricanevelő intézetét a kiskunhalasi székhelyű Kiskun Kutatóközpont Kft-t. Mivel a kommunizmus uralta időszakban Magyarországon nem engedélyezték tevékenységét, a világ számos országában alakított ki tudományos kapcsolatokat és szerzett nemesítési tapasztalatot. A rendszerváltás után visszatért Magyarországra. Munkáját testvére Dr. Adel Rady is közvetlen nemesítési tevékenységével segítette. Kettejük neve egyedülálló módon összesen 126 államilag elismert kukorica hibrid nemesítéséhez köthető.

Napjainkra a multinacionális cégek térhódítása súlyosan érintette a magyar kukoricanevelő intézményeit. A három hazai nemesítőház összesen a piac 5%-át birtokolja. A tőkeerős nemzetközi cégek marketing költségvetése több mint a három intézet teljes éves árbevétele, és akkor még nem ejtettünk szót a kutatásra szánt összegekről. A nemesítőképzés a jelentkezők hiányában az agráregyetemen megszűnőben van, lassan az oktatók is végleg nyugdíjba vonulnak. Ahhoz, hogy 10 év múlva is legyen kukoricanevelés Magyarországon nem csak szakmai, hanem társadalmi összefogásra is szükség van. A nemesítő intézeteknek fel kell zárkózniuk a legújabb és leghatékonyabb nemesítési technikák rutinszerű alkalmazásával, a mindenkori magyar kormánynak és a gazdátársadalomnak pedig előnyben kell részesíteni a hazai nemesítők által létrehozott fajtákat.

A KUKORICANEMESÍTÉS NEMZETI FELLEGVÁRIAI



5. ábra - Kukoricanevelők arcképcsarnoka.

1.3. A kukorica-hibridek nemesítésének kiemelt céljai, módszerei és eredményessége

A hibrid kukoricanevelés sosem tartozott a könnyű hivatások közé. A nyári hőségben a tenyészkert pontos és aprólékos megtervezése a növények időben történő szigetelése, porzása minden genotípus külön kívánalmainak megfelelően, csak egy szükséges minimum ahhoz, hogy nemesítési munkát végezzünk. Egy nemesítőnek ismernie kell minden beltenyésztett vonala genetikai és agronómiai tulajdonságait ahhoz, hogy a heterózis hatáson alapuló keresztezési programot hatékonyan és jövőbe mutatóan tudja összeállítani. Kezdetben a nemesítési technológiák hajnalán, nem rendelkezünk még genetikai elemzésre alkalmas módszerekkel, de még beltartalmi értékvizsgálatokhoz szükséges laborszakosokkal sem. A terméseredményen kívül csak a növényi életciklus szemmel látható jelenségeit tudtuk alapul venni, mint például a virágzás ideje, vagy a felszáradás dinamikája. A cél természetesen a magasabb terméseredményen kívül az agronómiai tulajdonságok javítása és egyes tájegységekhez vagy talajtípusokhoz történő adaptálása volt. Ezt az eredményt a vetőmag genetikai és fizikai uniformitása elérésével kívánták elérni. A fizikai tisztaságért a vetőmag üzemek, a genetikai fejlődésért pedig a nemesítők voltak a felelősök. A nemesítési folyamat elején tájfajták szelekciójával folyt a munka. A heterózis hatás

előnyeinek felfedezése után a szelektált tájfajtákat hibridizálták, majd a hibridhatás növelése érdekében és a genetikai egyöntetűség teljes megvalósításának eléréséhez a tájfajtákból beltenyésztett vonalakat alakítottak ki, végül ezeket hibridizálták.

A kezdeti időkben egy nemesítő ha beltenyésztett vonalat akart kialakítani, nem kifejezetten sok eszköz állt rendelkezésére. Az első és legegyszerűbb lehetőség egy már meglévő homozigóta populációból a szántóföldön bekövetkezett mutáció által nyert pozitív tulajdonságú egyed kiválasztása és további szaporítása volt. Ezt egyszerű szelekciónak hívjuk. Később, ugyanezen elven alapulva elterjedté vált az indukált mutációk szelekciója, ami a homozigóta állomány röntgensugárzással vagy különböző mutagén vegyületekkel történő kezelésével volt kiváltható, majd szelektálható (Bálint Andor: Heterózis és mutáció a kukoricában, 1967 Akadémiai Kiadó Bp.). Meg kell jegyezzem ennek a módszernek napjaikban a csúcsa az oligonukleotid mediált mutagenézis, amely a random mutációk szelekciója helyett egyetlen egy célzott nukleotid cseréjét is lehetővé teszi idegen gén bevitel nélkül.

Hosszabb és bonyolultabb vonalelőállítási technika a back cross vagy visszakeresztezés. Ezen módszer során a nemesítő kiválaszt egy számára tetsző homozigóta vonalat, majd egy másik valamilyen pozitív tulajdonsággal rendelkező hibriddel, tájfajtával vagy vonnallal keresztezi azt. A kialakult F1 hibridet legalább négyszer keresztezi a kiindulási anyaggal, majd az F5 generációt elkezdi önporozni. Az önporzást legalább 3 évig folytatja, így lassan tiszta homozigóta anyagot kap, amely a kiindulási vonalra rendkívül hasonlít. A folyamat során több ezer szegregáló növény közül évről évre ki kell választanunk azokat az egyedeket, amelyek tartalmazzák az eredeti keresztezés pozitív tulajdonságaiért felelős géneket. Ez a folyamat rendkívül időigényes, a végeredmény a pontosan és precízen végzett munka esetén sem garantálható. Természetesen napjainkban genetikai előrejelzési modellek segítik a szelekcót (Guo T. et al. 2013).

Végezetül meg kell emlékezzünk a hibrid bontás lehetőségéről, ami az előző technika közeli rokona. Ilyenkor a nemesítőnek egy tetszőlegesen kiválasztott genetikai állománnyal rendelkező szülőpárt hibridizálva az F1 hibrid növényeket legalább 8 éven át kell önporoznia, ahhoz hogy a szintén megjelenő több ezer véletlenszerűen rekombinálódó hasadóanyag közül az önporzás során végzett szelekció segítségével végül tiszta vonalokhoz jussunk.

1.4. Az értekezésben bemutatott kísérleti munka koncepciója és céljai

A kukoricanevelés során az egyik legfontosabb tényező az idő. Az új homozigóta beltenyésztett vonalak létrehozása és ezek hibridizációja napjainkban már nem tarthat tovább 3 évnél. Az ezt követő teljesítmény kísérlet és regisztrációs folyamatok, valamint az alapanyag nagyüzemi felszaporítása újabb 4 évet vesz igénybe. Így egy hibrid piacra kerülési ideje 7-8 év. A régi hagyományos nevelési technikákkal ez 15-16 évbe telt. Ezen értekezés első része a Pannon Genetic Kft. nevelési programjában azt tűzte ki célul, hogy a dihaploid technológiát, amellyel a nevelési idő lerövidíthető, rutinszerűen, és saját genotípusainkra optimalizálva tudjuk végezni.

Egy kukoricahibrid nem csak úgy fejleszhető, hogy teljesen új genetikát hozunk létre. A génszerkesztés segítségével egy már jól bevált a piacon bevezetett és elterjedt, kiváló agronómiai tulajdonságokkal bíró hibridet, újabb fontos tulajdonságokkal ruházhatunk fel. Ha a genomban sikeresen létrehozunk egy célzott pontmutációt, az eredeti jól bevált hibridünk kiegészülhet többféle herbicid rezisztenciával, szárazság és általános stressztűrési képességgel, magméret növekedéssel és egyéb fontos beltartalmi értékek növekedésével illetve csökkenésével, amely új irányt adhat a hibrid ipari vagy takarmányozási felhasználásának. Hagyományos nevelési módszerekkel ez a folyamat legalább 8 évet venne igénybe, ezzel ellentétben a génszerkesztés segítségével akár 1 év alatt is megvalósítható. A disszertáció második fele azt a célt tűzte ki maga elé, hogy szintén a Pannon Genetic Kft. genetikai hátterén kidolgozza, optimalizálja, valamint rutinszerűen alkalmazza a transzgénmentes génszerkesztés technológiáját. Meg kell jegyezni, hogy hatalmas genetikai állományról, több mint 2500 beltenyésztett vonalról beszélünk, melyek közül első lépésként ki kellett választani a megfelelő kiindulási anyagot. A feladatot színesíti, hogy az eredeti genom változatlanul tartása, és a kukorica limitált regeneráló képessége miatt, kerülnünk kellett a szövettenyésztési munkát. Ennek során több *in vivo* génszerkesztési technikát értékeltünk. Az oligonukleotid embrióba, vagy merisztéma régióba juttatását 3 különféle módszerrel hajtottuk végre és elemeztük. A mutáció bekövetkezésének követésére a fitoén deszaturáz (PDS) gén kikapcsolását vizsgáltuk. Az albínó szövetrégiók illetve utód csiranövények megjelenése kis

gyakoriságú mutációs eseményt jeleztek. Ezzel összhangban volt a nukleotidcserék előfordulása a PDS gén szekvenálása során. A bemutatott előzetes eredmények alapot adnak a technológia továbbfejlesztéséhez, agronómiai értékkel bíró szelekciós markerek használatához. Ahhoz, hogy az ONIM módszer széleskörűen alkalmazható rutin módszer legyen a kukorica tenyésztésanyag előállításában, szükséges hatékonyabbá tenni a szintetikus oligonukleotid molekulák bejutását a sejtekbe, indokolt a sejtosztódási folyamatok optimalizálása, és a mutáns sejtek számára szelekciós előny biztosítása, hogy szerepet kapjanak az ivarsejtek képződésekor.

Fontos megjegyezni, hogy abból az igényünkből sem adtunk lejjebb, hogy ne a hatékonyabb Crispr-Cas9 rendszereket használjuk a génszerkesztésre, hanem pusztán az oligonukleotid editálási képességét használjuk fel, ami garantálja a transzgénmentes nemesítési módszert megvalósulását.

Miután a fenotípus elemzések alapján 3 különböző módszerrel is sikeresen végrehajtottuk az editálást, a következő évek munkája a legjobb módszer kiválasztása és hatékonyságának növelése lesz, hogy a rutinszerű nagyüzemi alkalmazásba is hatékonyan tudjuk hasznosítani.

A disszertáció mindkét része, a haploid technológia és a génszerkesztés is külön-külön megállja a helyét a kukoricanemesítés kiemelten fontos innovatív kutatási területei közt. Hosszútávú céljaink közé tartozik, hogy a haploid indukáló genotípusokat homozigóta konstrukcióban lássuk el Crispr-Cas9 vektorokkal, és a két részterületet egyesítsük. A haploid technológiában használt induciból származó apai genom eliminálásával szintén transzgénmentes génszerkesztés hajtható végre, az időtényező maximális lerövidítése mellett.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Beltenyésztett vonalak előállítása dihaploid technológiával

A kukoricanemesítés új módszereként használt dihaploid technológia (Chaikam et al. 2019) már a múlt század közepén megjelent a tudományos életben. A nemesítők igen korán megfigyelték a steril haploid növények jelenlétét bizonyos F1 keresztezésekben. Kézenfekvő volt tehát a gondolat, hogy a kromoszómaszerelvény a növényi egyedfejlődés megfelelő

stádiumban történő megduplázásával hasznos, tökéletesen tiszta nemesítési anyag nyerhető. A módszer alapvetően két fő irányvonalra bontható. Az egyik a növény haploid sejttorgánumainak kalluszosításán és regenerálásán alapul, a másik pedig különböző haploid inducer vonalakkal történő keresztezéssel zajlik. A portok kultúra bár hatékony módszer, mégsem terjedt el a kukorica dihaploidizációs nemesítése során. Ezzel ellentétben búzánál versenyképesen alkalmazzák. A művelet maga igen bonyolult, és rengeteg labor technikát igényel, ezért képtelenség megfelelő hatékonysággal használni a rentábilis vonal előállításához. Az éretlen hím virágzatokat izolálják, majd a mikrosporákat tartalmazó athéra triádokat először kalluszosító majd a kalluszkat regeneráló táptalajra helyezik a haploid növények felneveléséhez. Az éretlen címer, izolálás előtti elővizsgálata nagyon fontos a módszer alkalmazása során, csak azok a mikrosporák kalluszosodnak el megfelelően, amelyek sejtmagjai a szélső falhoz kitapadt stádiumában helyezkednek el. Ezt kármin festéssel és mikroszkópos vizsgálattal ellenőrizzük. További buktatója a módszernek, hogy a növényregenerálás kalluszból erősen genotípus függő, így nem minden nemesítési anyagnál használható. Miután eljutottunk a haploid felnevelt növényig a diploidizáció két módja lehetséges. Az egyik kevésbé függ a kutatóktól, megfigyelték, hogy az anthera kultúrából előállított haploid növények néhány százaléka spontán dihaploidizálódik, ám ez korántsem elég a versenyképes nemesítéshez. A másik lehetőség a kolchicin kezelés, amely jelen technológia alkalmazása során szintén nehézkes, mivel a kalluszból regenerált növények gyengék, a hajtásba injektált kolchicin hatalmas mortalitást eredményez. Meg kell jegyezzük, életerős növényeknél is nagy a mortalitási ráta (Dwivedi SL. et al. 2015). Másik irányvonala a dihaploid technológiának, a haploid inducer apai vonalként történő alkalmazása. (Chaikam et al. 2019) Ez a technológia, különböző kiegészítő módszerekkel napjainkra elterjedt, és versenyképes nemesítési eszközzé fejlődött. Kezdetben a nemesítők megfigyelték, hogy néhány genotípus keresztezésbe történő bevonásakor az utódok alacsony 1-2 %-a steril növényként jelenik meg. A genetikai és citológiai vizsgálatok alátámasztották, hogy a sterilitás oka a haploid kromoszóma szerelvény. A jelenség további vizsgálatai során kimutatták, hogy a kettős megtermékenyítés során a központi sejt megtermékenyül, így sikeresen endospermium fejlődik, ám a petesejt megtermékenyítése után az embrionális sejtosztódás igen korai fázisában feltehetőleg a magorsó fonalak kapcsolódási hibája miatt, az apai kromoszómakészlet elvész, haploid szemtermést eredményezve. A jelenség genetikai vizsgálata jelenlegi állása szerint centromer régióban történő génmutáció indukálhatja a folyamatot, ám a teljes analízis még nem készült el.

A haploid növények és az őket indukáló genotípusok felfedezése után azonban még rengeteg feladat állt a nemesítők előtt a módszer hatékony alkalmazásának eléréséhez. Növelni kellett az indukciós rátát, napjainkra akár a 20%-ot is elérheti az egy csövön található haploid szemek aránya. Továbbá hatékony marker rendszerrel kellett ellátni az inducer vonalat a haploid szemek előszelekciós izolálásához. A nemesítők a szem színéért felelős gének olyan kombinációját juttatták az inducer vonalak első generációjába, amelyek keresztezés esetén az anyai genotípus szemkoronáját és az embriót antociánnal feketére színezik. Haploid növények esetén az embrió fehér marad. A legújabb generációs inducer vonalak a zöld fluoreszcens fehérje génjével (GFP) történt transzformálásuk következtében fluoreszcens jellel teszik lehetővé a haploidok előszelekcióját (Yu and Bircher 2016). A sikeres haploid detektálás után csíranövény korban történő kolhicin kezelés következtében dihaploid növényt kaphatunk. Jelen doktori disszertáció többek között az inducerrel történő haploid indukálással, a haploidok detektálásával illetve a kolhicin kezelés optimalizálásával és továbbfejlesztésével foglalkozik.



6. ábra – (A) Antherák kalluszosító táptalajon (B) Kitapadt sejtmagvas mikrospóra

Méretarány: 10 µm

(C) K405 haploid inducer vonal

A XX. század során a hibridizáció kulcsfontosságú tényezővé vált a kukoricatermesztésben. A kiemelkedő termésátlagok, a gépi betakarításhoz szükséges uniformitás és a környezeti tényezőkkel szembeni stresszrezisztencia mára már alapvető feltételnek számít. Egy hibrid

teljesítménye közvetlenül függ az őt alkotó beltenyésztett vonalak agronómiai tulajdonságától, genetikai minőségétől. A nemesítés során ezen paramétereket fejlesztjük generációról generációra. A hagyományos back-cross technológiával történő vonal előállítás 8-10 évet vesz igénybe, így nem bizonyult versenyképes megoldásnak. A legtöbb piacvezető nemesítő cég a dihaploid (DH) technológiát fejlesztette tovább a versenyképes nemesítés és fajtaelőállítás megtartása érdekében (Chaikam et al. 2012).

A DH-technológia két különálló részre bontható. Az első szakaszban a haploid kromoszómakészlettel rendelkező csíranövények létrehozása a cél, amely a haploid inducer vonal apaként történő használatával érhető el. A folyamat során a kiindulási diploid anyai genom változatos rekombinációit kapjuk haploid kromoszómaszerelvényű csíranövényekben, azzal a feltétellel, hogy az apai genom az embrió sejtosztódása során eliminálódott. Az első leírt inducer vonal a Stock 6 nevet kapta (Coe 1959). Ez a genotípus a megtermékenyített embriók 2-3%-ában okozott haploid indukciót (Zhang et al. 2008). Elsődleges céllá vált tehát az indukciós képesség növelése, ami számos új vonalkeresztelésbe való bevonásával és továbbnemesítésével történt (Yu and Birchler 2016). Napjainkra a haploid indukáló képesség - genotípustól függően - elérte a 20%-os értéket.

A haploid indukciós arány (HIR) genetikai szabályozás alatt áll, és számos a genomra kiterjedő összehasonlító vizsgálattal (GWAS) azonosították a HI expresszióhoz szükséges genomi régiókat (Hu et al. 2016). Következésképpen az anyai genom központi szerepet játszhat a HIR meghatározásában bizonyos keresztezési kombinációkban. A haploid magok száma akár 1% -ra is csökkenhet, még akkor is, ha a legjobb haploid induktor vonalakat használjuk. Ilyen körülmények között a redukált genomméretű kukorica növények hatékony, és pontos azonosítása kulcseleme a beltenyésztett vonalak nagyléptékű előállításának.

A haploid / diploid osztályozás különféle fenotípusos markereken alapulhat. Az antocianin színjelölő, az R1-nj (navajo) az egyik legszélesebb körben alkalmazott módszer a számos haploid indukáló rendszerben (Chaikam and Prasanna 2012, Melchinger et al. 2013). Az anyai haploid utódok lila pigmentációt mutatnak a mag koronáján lévő endospermium szövetben és szintelen fenotípust az embriókban. Az aleuron színezése azt jelzi, hogy a megtermékenyítés sikeres volt az induktor vonallal (Chaikam et al. 2015). Az R1-nj marker funkcionalitása azonban korlátozható olyan domináns antocianin-inhibitor gének, mint például a C1-I expressziója által. Ha az anyai szülő gátló alléleket tartalmaz a C1-antocianin szabályozó

lókuszban, vagy eredetileg színes scutella van jelen, esetleg ha az endospermium és a scutella körülveszi az embriót, akkor a haploid magok pontos azonosítása nehéz vagy lehetetlen (Röber et 2005, Prigge et al. 2012). Az R1-nj markerrendszer ezen korlátozásainak kiküszöbölésére különböző megközelítéseket teszteltünk. Például, a haploid és diploid magok olajtartalmának különbségei szolgálhatnak molekuláris markerekként (Rotarencu et al. 2007, Melchinger et al. 2015), azonban ehhez speciális kromatográfiás berendezés szükséges. A meglévő rendszerek hibája minimalizálható olyan haploid induktorvonalak előállításával, amelyek domináns markerként expresszálják a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) (Yu and Bircher 2016). Ebben a megközelítésben a kicsírázott diploid magok GFP fluoreszcenciát mutatnak a gyökér illetve koleoptil régióban, míg a haploidok GFP negatívak a transzgen apai genommal történő eliminációja miatt. A háromszoros antocianin termelés szintén egy elterjedt módja a haploid detektálásnak, ezen folyamat során a diploid növények gyökér és hajtás régiója vörös színű míg a haploid növények gyengébben vagy egyáltalán nem színezettek (Chaikam et al. 2017).

A DH-technológia további fejlesztéseket igényel a haploidok pontos és hatékony azonosításához a különböző kukorica csíranövényekben. A haploidok szelektálásának legmegbízhatóbb módszere a kromoszómaszámlálás, melynek során a mitotikus sejteket 1% - os laktoecetsav-orcein oldattal festik (Milani et al. 2016). A kukorica nemesítési programjában szükség van a feltételezett haploidok gyors és olcsó azonosítására. A DNS-tartalom flow- citometriával történő azonosítása megfelelhet ezeknek a követelményeknek, de ennek hátránya, hogy drága berendezéseket, és tapasztalt műszaki támogatást igényel. Alternatív megoldásként a molekuláris markerek, mint mikroszatellitek (egyszerű szekvencia ismétlések (SSR)) igazolhatják az utódok haploid vagy diploid jellegét (Belicuas et al. 2007). (Battistelli et al. 2013).

A második szakasz, azaz a beltenyészett vonalak előállítása magában foglalja a genom rediploidizálását a növények termékenységének helyreállítása érdekében. A kromoszómakészlet megduplázódhat úgy, hogy a haploid csíranövények merisztéma régióját kolchicinnel, anti-mitotikus herbicidekkel vagy dinitrogén-oxiddal kezeljük (Chaikam et al. 2019).

Ebben a tanulmányban kvantitatív adatokat szolgáltatunk egy olyan integrált rendszer megbízhatóságáról, amelyben az R1-navajo (R1-nj) markert a flow-citometriára alapozott

genomméret-elemzéssel és (SSR) marker-szekvenciákkal kombináltuk, mint egy korai, magonkénti lépést a haploid utódok azonosítása során.

2.2. Növényi gének irányított mutagenezise: precíziós nemesítés

Mi az a genomszerkesztés, hogyan csináljuk, és miért hívjuk precíziós nemesítésnek? A hagyományos nemesítés során egy-egy előnyös tulajdonságú új kukorica hibrid létrehozása a legoptimálisabb esetben is 10 évet vesz igénybe. A klasszikus módszerek, mint a keresztezés során a szülői kukorica növények kétmilliárd kettőszázmillió nukleotidját a véletlenre bízva összekeverjük, majd vakon tapogatózva megpróbálunk egy harmadik, jobb tulajdonsággal bíró növényt kiválasztani a több ezer hasadóanyag közül. A genomszerkesztést több okból is nevezhetjük precíziós nemesítésnek. Először is rendelkezik azzal a tulajdonsággal, ami a nemesítésben a legfontosabb, redukálja az időt. Egy új hibrid 3 év alatt létrehozható a technológia alkalmazásával.

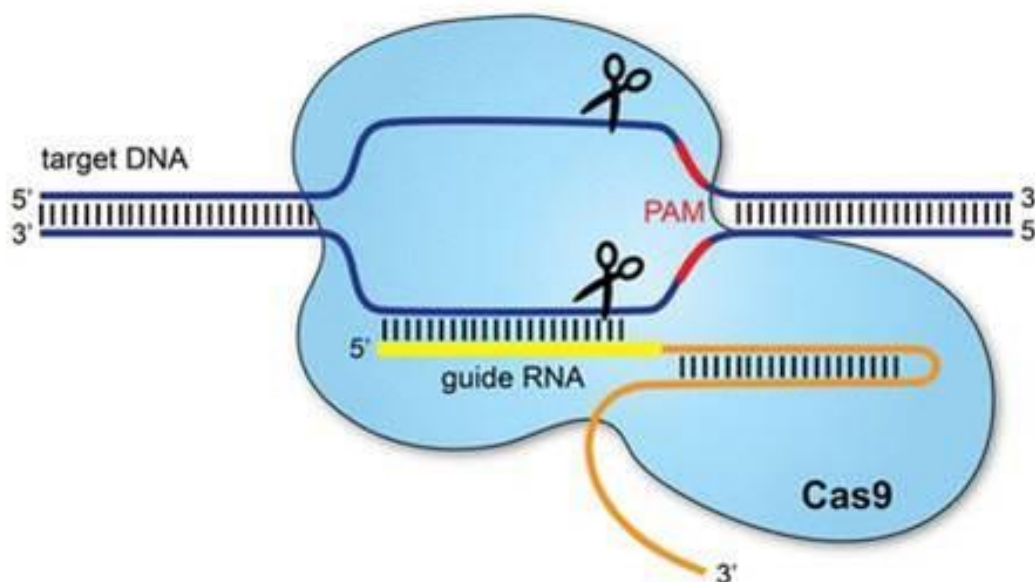
A kukorica génei a szántóföldön évről évre természetes módon változnak. Nobel díjat érdemlő kutatások leírták, hogy a növény genetikáját felépítő 2,2 milliárd nukleotidból teljesen spontán és önállóan akár 10% 220 millió is átrendeződhet minden tenyészidőszak során. A hagyományos nemesítés közben ezeket az átrendeződéseket keressük, és próbáljuk 10 év alatt átvinni egy új stabil beltenyésztett vonalba. Eközben véletlenszerűen átrendezzük a többi gén helyzetét és működését is.

A mai tudomány eljutott arra a szintre, hogy képesek vagyunk egy teljesen természetes mondhatni okos vegyület segítségével kiválasztani az előbb említett 2,2 milliárd építőegységből egyet, irányítottan módosítani, úgy ahogy azt a természet tenné véletlenszerűen és mindezt anélkül, hogy a másik 2 199 999 999 építőegységet módosítottuk volna.

Miután nyugtáztuk, hogy a technológia, gyors, precíz, és hatékony. Jogosan merül fel a kérdés, hogy mégis mire lehet jó egyetlen darab nukleotid megváltoztatása, ha a másik több mint egymilliárd változatlan marad. A genom rendkívül finomhangolt rendszer a kukorica esetében is. A módszer alkalmazásával szárazságtűrés, jobb emészthetőség, rezisztencia gomba, vírus vagy baktérium kórokozókkal szemben, illetve hidegtűrés csíra korban vagy hímsterilitás is előállítható.

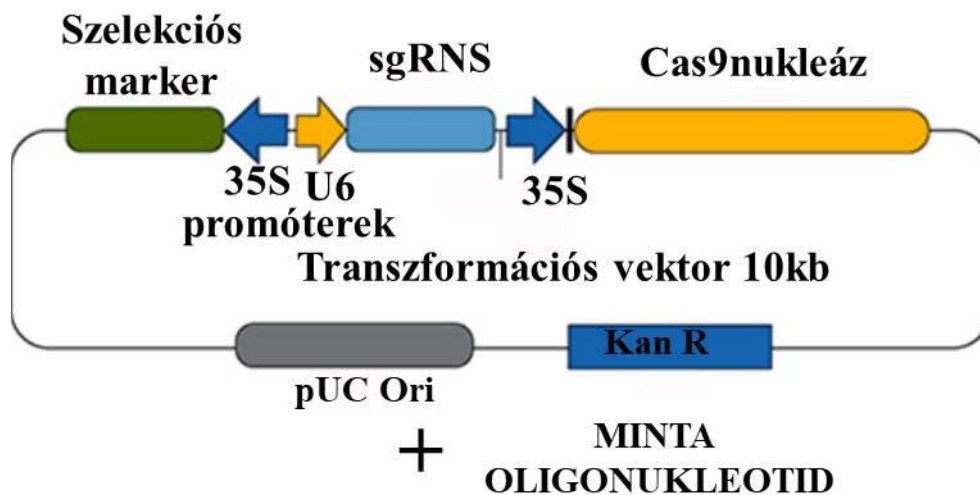
2.2.1. CRISPR-Cas9 technológia

A genomszerkesztésnek rendkívül sokféle és szerteágazó módjait ismerjük, de alapvetően két fő irányvonal létezik (Van et al. 2019). Az egyik a CRISPR-Cas9 technológia, a másik pedig az oligonukleotid irányított mutagenézis (ONIM). A CRISPR-Cas9 technológia alkalmazása során a kettős szálú DNS molekulán egy speciális nukleáz molekula törést indukál egy előre megtervezett helyen. Ahhoz, hogy a molekula a megfelelő szekvencia részlethez tapadjon, szükség van a fehérjéhez kapcsolódó gRNS-re, amely dimerizálódik a DNS szerkesztési kívánt szakaszával. Abban az esetben, ha nem csupán deléció, ami általában egy gén kikapcsolásához elegendő, hanem báziscserét szeretnénk végrehajtani, szükség van még egy rövid, templát oligonukleotid szekvenciára, ami az általunk előre meghatározott bázissortrendet kódolja. A Cas9 nukleáz által előidézett törést vagy deléciót az exciziós repair enzimek a DNS természetes javító folyamatain keresztül az általunk templátként megadott oligó alapján végzik el (Waqar et al. 2020).



7. ábra - A CRISPR-Cas9 működési mechanizmusa.

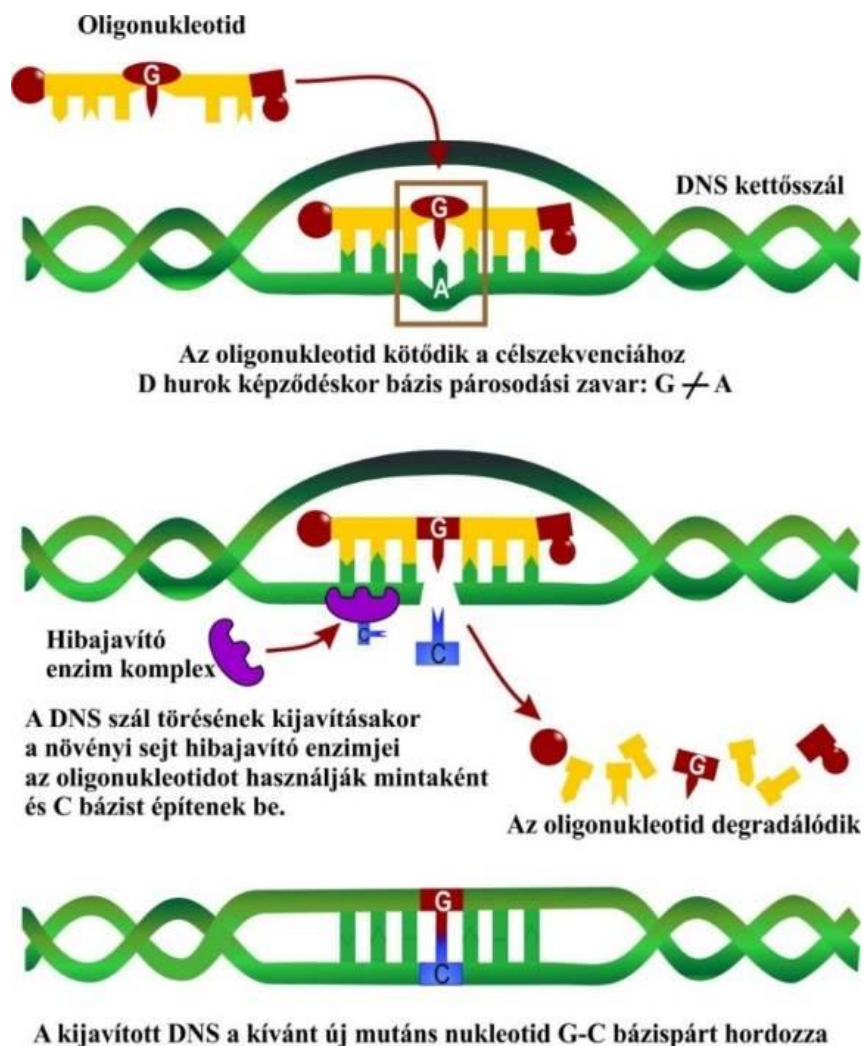
Az imént felsorolt alkotóelemek, Cas9 molekula, gRNS, templát oligó mindegyikének egyidejűleg jelen kell lennie a sejtben a folyamat sikeres végbemeneteléhez (7. ábra). A sejtbe történő bejuttatás módozatai alapján ismét két meghatározó részre oszthatjuk a technológiát. Megkülönböztetünk transzgenikus illetve transzgén mentes CRISPR-Cas9 technológiát (lásd összefoglaló Dudits Dénes: A bő termés biológiája, Mezőgazda Kiadó (2019).). A transzgenikus CRISPR módszer alkalmazása során a három alkotóelem genetikai kódját egy plazmid molekula segítségével juttatjuk be a sejtbe, majd az ott automatikusan történő átíró folyamatok segítségével szintetizáltatjuk. A plazmid vektor bejuttatásának módozatai rendkívül széles repertoárból választhatók ki, a leggyakrabban használt technikák a génpuskával történő belövés, az Agrobaktérium által közvetített transzfekció, vagy különböző polimer molekulák segítségével történő bevitel. Különböző tanulmányok hatékony megoldásokat mutatnak be a beépült plazmid molekula genomból történő kirekombináltatására. Amennyiben az eljárás sikerrel jár a transzformált sejt elveszti genetikailag módosított státuszát. Abban az esetben, ha a három komponenst *in vitro* szintetizált formában juttatjuk be a transzformálni kívánt sejtbe transzgén mentes CRISPR-Cas9 technikáról beszélhetünk (Sant’Ana. et al. 2020).



8. ábra - A CRISPR-Cas9 technológiához használt transzformációs vektor.

2.2.2. Oligonukleotid- Irányított Mutagenézis (ONIM) növényekben

A CRISPR-Cas9 technológia alkalmazásával párhuzamosan kutatócsoportunk a génszerkesztésnek egy génbeépítést nem igénylő változatát tökéletesíti. Az ONIM, azaz kémiai szintetizált DNS szakasz az u.n. oligonukleotid mediált mutagenézis, génszerkesztés mechanizmusát Ferenc és Dudits (2017) foglalta össze. Ezzel a technikával célzott nukleotid cserét kis gyakorisággal tudunk végrehajtani egyetlen szintetikus oligonukleotid szakasz segítségével is (9. ábra). Az oligonukleotid a célszekvencia homológiájára alapozva gRNS nélkül is megtalálja a módosítani kívánt szekvenciát a genomban.



9. ábra - Az oligonukleotid-irányított mutagenézis (ONIM) egyetlen nukleotid cseréjével specifikusan, a kiválasztott gén szekvenciájának szerkesztésével változtatja meg a kódolt fehérje működését, tulajdonságait. (Ferenc és Dudits 2017, Gocal G. nyomán.)

A jelenlegi genomszerkesztési technológiák, ideértve a leghatékonyabb CRISPR / Cas9 rendszert, a nukleáz enzimek által kettős szálú (ds) DNS-töréseket okoznak a növényi genom célszekvenciáiban (Jaganathan et al. 2018). Egyetlen nukleotid kicserélésével STOP kodont szintetizálva hatékonyan lehet géneket elcsendesíteni, vagy fehérjék térszerkezetét módosítani. Ezzel a precíziós módszerrel rövid időn belül nemesíthető szárazságtűrő, herbicid rezisztens vagy kiemelkedő beltartalmi értékekkel bíró beltenyésztett kukorica vonal. A technológia előnye, hogy a már meglévő egyéb agronómiai tulajdonságai miatt piacvezető (termés mennyiség, vízleadás, betegség toleráns) hibridek három éven belül további általunk meghatározott pozitív tulajdonságokkal ruházhatók fel az eredeti előnyöket kódoló gének bármilyen megváltoztatása nélkül, a tökéletes homozigóta genetikai tisztaság megtartása mellett. Ahhoz, hogy ezt a módszert a XXI. század legmodernebb precíziós nemesítési technikájának nevezhessük jelentős kutatási és fejlesztési munkára van szükség, mert jelenleg a technológia hatékonysága alacsony.

A növényi gének editálása sikeresen végezhető homológ szekvenciával rendelkező kémiai szintetizált oligonukleotidok (SDO-k) növényi sejtekbe vagy protoplastokba történő bejuttatásával és a mutáns növények regenerálásával (Rivera-Torres és Kmiec 2016; Sauer et al. 2016). Az oligonukleotid irányított mutagenézis (ONIM) a programozható nukleázok használatának alternatívája, valamint kiegészítő molekuláris mechanizmusokkal járó megközelítéseket jelent. Az SDO-molekula és a célszekvencia közötti eltérés, bázispárosodási hibát eredményez, amelyet a növényi enzimek javíthatnak sablonként az oligonukleotidot felhasználva (Gocal 2015). A nukleázok (Cas9, Cpf1) célzott DNS-törését követően kétféle DNS-javító mechanizmus létezik: nem-homológ végek kapcsolódása (NHEJ) vagy a homológ régiókon alapuló javítás (HDR). Az NHEJ események knockout fenotípust hoznak létre változó inszertációk vagy deléciók (indel) bevezetésével. A HDR útvonal sablont használ a javítási folyamathoz, és pontos törléseket, bázispárokat vagy új kódoló szekvenciákat hoz létre. A kettős szálú törések sablon-orientált javítását exogén módon szolgáltatott SDO-k jelenlétében a növényi rendszerekben is megvizsgálták (Svitashev et al. 2015; Wang et al. 2015; Sauer et al. 2016).

A gyakorlatban a kémiai úton szintetizált oligonukleotid molekulákat növényi protoplastokba, sejtekbe, embrióból származó kalluszsövetekbe juttathatjuk be, gyakran *in vitro* tenyészeteket használva. Az SDO molekulákat leggyakrabban kicsapják arany

mikrolövedékekre, és génpuska segítségével a tenyésztett sejtekbe belövik. A technológia úttörőjeként Beetham et al. (1999) dohány növény sejtuszpenziójába juttattak kiméra DNS és RNS szekvenciákat, majd az editálás hatékonyságát klórszulfuron rezisztens sejttelpek megjelenésével igazolták. A kukoricában mind az éretlen embrióból származó kallusz szöveteket, mind a tenyésztett sejteket kezelték szintetikus SDO-kkal (Zhu et al. 1999; Zhu et al. 2000; Svitashv et al. 2015; Tiricz et al. 2018). Az SDO-molekulák bejuttatása rizs kalluszsövetekbe pirimidinil-karboxi-herbicidez rezisztens növényeket eredményezett (Okuzaki and Toriyama 2004). A templát oligonukleotidok Cas9 és gRNS expressziós vektorokkal történő együttes belövését a kukorica acetolaktát szintáz gének szerkesztésére használták, ami klórszulfuronrezisztenciát eredményezett (Svitashv et al. 2015). Dong és munkatársai átmeneti plazmid génjavító rendszert fejlesztettek ki (Dong et al. 2006), amikor a mutált GFP konstrukciókat és a korrekciós oligonukleotidokat lőtték be a friss éretlen búza embriók scutellum sejtjeibe. Tiricz et al. (2018) ezt a rendszert használták a kromatin szerkezetének módosításával elérhető hatékonyságnövekedés kimutatására. A növényi protoplastok, mint membránnal körülvett sejtek, szolgálhatnak az SDO-molekulák recipiensként. A PEG-közvetített felvételt és az elektroporációt is sikerült felhasználni az oligonukleotid bejuttatására a dohányba, az olajrepcé és az Arabidopsis protoplastba (Kochevenko and Willmitzer 2003; Ruiter et al. 2003; Kim and Kim 2014; Gocal 2015). A kék fluoreszcens fehérje átalakulását zöld fluoreszcens fehérjévé Arabidopsis-ban a protoplastok különböző méretű oligonukleotidokkal történő kezelésével érték el (Sauer et al. 2016).

Az eddig leírt ONIM-módszerek különböző szövettenyésztési technikákon alapulnak, amelyek biztosítják a reproduktív növények regenerálódását az *in vitro* tenyésztett mutáns sejtekből. Mivel a differenciálódott kalluszszövetek morfogénikus vagy embriogén potenciálja nagymértékben függ a genotípustól is a kukoricában (Armstrong 1991), az editálási protokollok ezen része korlátozhatja az ONIM, mint új nemesítési technika széleskörű alkalmazását. Ezért a technológia széleskörű alkalmazására irányuló kísérletek során az *in planta* szerkesztési protokollok különféle lehetőségeit kell számításba venni.

A szintetikus oligonukleotid molekuláknak a különböző növényi szervek szövetébe és sejtjeibe történő bejuttatására vonatkozó kísérleti eredmények sok esetben antiszensz oligonukleotidokkal (asSDO-k) végzett vizsgálatokból ismertek. Ezen kísérletekben a molekulákat dohánylevelekbe juttatták fecskendő segítségével vagy vákuumkezeléssel (Dinc

et al. 2011; Wojtasik et al. 2014). A búzalevelek alsó 1-2 cm-es szakaszát lemetszés után merítették asSDO vizes oldatába. Hasonlóképpen, Arabidopsis és petunia esetében a levelek vágott felületét használták a DNS bejuttatására (Dinc et al. 2011; Xie et al. 2014). A csírázó Arabidopsis, a dohány és a petunia magvak képesek abszorbeálni az asSDO-kat, rezisztens 5-enolpiruvil-sikimát-3-foszfát-szintetáz (EPSPS) gént expresszáló transzgenikus növényeket létrehozva (Xie et al. 2014). A csírázó pollencsövek funkcionális asSDO molekulákat is képesek transzportálni (Mizuta and Higashiyama 2014). Mivel cukor jelenlétében kimutatták az SDO-k hatékony felvételét, Sun et al. arra a következtetésre jutottak, hogy az antiszensz oligonukleotid valószínűleg a cukor transzporterek útján jut be a növényi sejtekbe (Sun et al. 2007). Mindezek a kísérleti eredmények nyitnak kaput az optimális növényi szervek megtalálására, mutagén SDO-kkal kezelésére, azzal a céllal, hogy a mutált sejtek reproduktív szerveket hozzanak létre a növény egyedfejlődése során. Az ONIM-kezelés első számú célpontja lehet a hajtás apikális merisztémája (SAM), amelyet széles körben használtak a transzformációs protokollok során (Sticklen and Oraby 2005; Baskaran and Dasgupta 2012; Baskaran et al. 2016).

A hajtáscsúcs merisztémákat széles körben alkalmazták különböző genetikai transzformációs protokollokhoz, ideértve az Agrobacterium-mal történő fertőzést, vagy a hajtás apikális merisztémájának mikroinjekcióját (áttekintés Sticklen and Oraby 2005)). A kukorica csíkoltsági vírus Agrobacterium által történő beviteléhez a bakteriális sejtek szuszpenzióját injektálták merisztéma szövetekbe (Grimsley et al. 1988). A kukoricából izolált hajtás merisztémák L2 rétegének sejtjeit mikro-injekcióval injektálták antocianin előállításra szolgáló vektor konstrukciókkal (Lusardi et al. 1994). Nagyon lényeges annak hangsúlyozása, hogy a szövetek, így a merisztémák DNS molekulákkal történő kezelése csak bizonyos számú sejtet érint, ezért kimérák kialakulásával kell számolni. Ez jelentős korlátozást jelent abban, hogy az indukált mutált sejtek részt vesznek-e az ivarsejtek képződésében. Ez a feltétele annak, hogy öröklődjön a létrehozott tulajdonság.

2.2.3. A haploidok indukálási technológiájának összekapcsolása génszerkesztéssel: transzgénmentes nemesítési alapanyag előállítására

A haploid technológia egyik alapvető változata az apai növény különleges tulajdonságán alapul. A kukorica diploid, egylaki, váltivarú növények közé tartozik. Ha keresztezést hajtunk végre, megtermékenyítés után a zigótában egy apai és egy anyai kromoszómaszerelvény van jelen. A haploidiát indukáló (HI) növény különleges tulajdonsága, hogy apai szülőkomponensként használva a keresztezésben a korai sejtosztódás során kromoszóma készlete eliminálódik a szomatikus sejtekből. Ez a jelenség a növény kromoszómáinak centromer régiójában történt speciális mutáció jelenlétével magyarázható, amely megghiúsítja a magorsó fonalak csatlakozását a kromoszómához (Chen et al 2020). Kézenfekvő lehetőség ezt a tulajdonságot más, hatékony nemesítési technikákkal ötvözni.

A Crispr-Cas9 rendszer olyan növényi genomokban működik, amelyek tartalmaznak egy a Cas9 fehérjét kódoló szekvenciát és egy gRNS-t meghatározó szakaszt. Ezeket a faktorokat általában plazmidon juttatják be a növényi sejtekbe, így a transzformáns sejtek genomjának tartalmaznia kell a plazmiddal bevitt szelekciós markert, valamint promóter régiókat is. Ebben a felállásban a növény génmódosítottnak számít, aminek szántóföldi termesztését a jelenlegi jogi körülmények nem teszik lehetővé.

Abban az esetben, ha egy haploidiát indukáló növényt sikeresen transzformáltak egy működő homozigóta formában jelen levő Crispr-Cas9 konstrukcióval és keresztezést végeztek az editálandó genotípussal, úgy igazolni lehetett a mutáció bekövetkezését az apai kromoszómák elvesztését követően (Timothy et al.2019). Így ötvözni tudták a két technológia minden előnyét és elkerülhetők a GMO okozta jogi korlátozások is. Kiemelten fontos hogy a Crispr-Cas9 vektor homozigóta formában legyen jelen a HI genomban, mert így biztosított, hogy minden hím ivarsejt tartalmazni fogja a kívánt DNS szekvenciát. A petesejt megtermékenyítése után az apai genom fokozatosan eliminálódik a korai sejtosztódások során, így rövid ideig ugyan, de egyszerre van jelen a transzgénmentes anyai és a transzformált apai genom a sejtben. Az apai genomról átíródó Crispr-Cas9 konstrukció hatékonyan szerkesztheti az anyai genomot, mely végül haploid formában egyedül transzgénmentesen a kívánt pontmutációval marad jelen a haploid növényi sejtben. A colhicin kezelés elvégzése után az előnyös tulajdonságot indukáló pontmutáció stabil 100%-os homozigóta módon van jelen a beltenyésztett vonal genetikai állományában. A disszertáció

fontos célja, hogy szakmailag előkészítse ennek a nemesítési koncepciónak bevezetését a hazai nemesítési programokba.

A jelen tanulmányban bemutatásra kerülő módszertani fejlesztések elsődleges célja, hogy a Pannon Genetic cégnél folyó kukoricanemesítési programok eredményességét innovatív technológiákkal javítani tudjuk. Két területet választottunk ki erre a célra: a haploid indukálási (HI) technológia egyrészt lehetővé teszi a beltenyésztett vonalak előállításának hatékonyság növelését, másrészt a haploid genotípusok lehetőséget adnak arra, hogy az indukált recesszív mutációk fenotípusos megjelenése biztosított legyen. Annak ellenére, hogy nemzetközi szinten a CRISPR-Cas9 módszer széleskörű elterjedését tapasztalhatjuk, a jelen dolgozat a szintetikus rövid DNS molekulák által elérhető specifikus nukleotid csere lehetőségét vizsgálja. Kiemelten fontos annak figyelembe vétele, hogy az ONIM technológiára alapozott mutagenézis nem függ transzgenikus technológia használatától, idegen gén beépítésétől. A dihaploid technológia ma már integráns része a nemesítési programoknak, míg az ONIM módszer a jövő technológiája és további lényeges fejlesztést igényel. A jelen munkában kiemelt célként tekintettünk az *in planta* genomszerkesztésre melynek során elkerülhető az *in vitro* tenyésztésben történő növényregeneráció, amely jelentős részben felelős az off-target mutációk kialakulásáért (Tang et al. 2018).

3. Anyagok és módszerek

3.1. Haploid indukciós keresztezések és szín-markerek

A haploid indukciós kísérleti kert 2015-2016-ban jött létre az Alföld déli részén, Kiskunhalason. A későn virágzó (85 napos vegetatív növekedési fázisú) K405 kukorica-haploid indukáló vonalat apai komponensként használtuk a keresztezési programban a késői K4390 és K4368 anyai növényekkel, valamint a korai virágzású K4250 hibriddel. Miután az indukciós keresztezéssel előállított magvak beértek, antocianin markerrel szelektáltuk őket. Az endospermiumban elszíneződött, de az embrióban antociánmentes vetőmagokat potenciális haploidoknak tekintettük, míg az antocianint mind az endospermiumban, mind pedig az embrióban termelő magokat diploid kategóriába soroltuk.

3.2. Genomméret meghatározás flow-citometriával

Az előválogatásból kiszelektált csíranövények ploidszintjét a gyökércsúcsból vett mintákból flow-citometriával határoztuk meg 532 nm-en (BD FACS Calibur), 30 mW-on. Az endospermiumon lévő lila pigmentációval és szintelen embrióval rendelkező érett magokat 70% etanollal sterilizáltuk 1 percig, steril vízben öblítettük és 2,5% (v / v) nátrium-hipokloriddal kezeltük 30 percig. Steril vízben történő mosás után a második sterilizálást 0,2% (tömeg / térfogat) HgCl₂-oldattal végeztük 5 percig, amelyet 5-6 alkalommal, steril vízzel öblítettünk. A magokat sötétben, 24 ° C-on csíráztattam szűrőpapíron. A sejtmag extrahálásával a gyökércsúcsokat (körülbelül 5–10 mm) jégen borotvapengével aprítottuk 55 mm átmérőjű Petri-csészében, amely 1 ml extraháló puffert tartalmaz: 9,35 mM MgSO₄ x 7H₂O; 47,67 mM KCl; 4,77 mM HEPES (4- (2-hidroxi-etil) -1-piperazin-etánszulfonsav), 6,48 mM ditiotritol (DTT), 0,25% (v / v) Triton X-100 (pH = 8). Ezt a szuszpenziót egy 40 µm-es nejlonszűrőn szűrtük, és RNase A oldattal (100 µg / ml) kezeltük, majd 10 percig 1 µg / ml propidium-jodiddal (Sigma) festettük. Mintaként legalább 10 000 festett részecskét elemeztünk. Azonos beállításokat használtunk annak érdekében, hogy összehasonlítható relatív fluoreszcencia-intenzitási értékeket kapjunk. Diploid kontrollként a hibrid szülők sejtmagjait izoláltuk és azonos módon analizáltuk. A hisztogramokat a Cell Quest (BD Biosciences) program segítségével állítottuk elő, és a 2009-es WinMDI 2.8 szoftverrel elemeztük.

3.3. DNS izolálás és genotipizálás

A genomi DNS-t extraháltuk a MasterPure™ Complete DNS és RNS Purification Kit (Epicenter, USA) felhasználásával. 10 ng templát DNS-t használtunk a PCR reakciókban. A 20 µl-es reakció 0,25 µM primereket, 0,25 mM mindegyik dNTP-t, 2,5 mM MgCl₂-t és 0,75 U Go®Taq G2 Flexi DNS polimerázt tartalmaz (Promega, USA). A PCR reakciókat Veriti Thermal Cycler-ben (ThermoFisher Scientific, USA) végeztük az alábbiak szerint: denaturálás 2 percig 95 ° C-on, majd 35 ciklus 95 ° C-on 30 másodpercig, 60 ° C-on 30 másodpercig, 72 ° C-on 30 másodpercig, és végső meghosszabbítást 5 percig 72 ° C-on. Az UMC1152 SSR marker amplifikálására szolgáló oligonukleotid primerek szekvenciáját Shehata és munkatársai ismertetik. (2009). A PCR-termékeket (3 µl) összekeverjük kétszeres TBE-karbamid-pufferrel (Invitrogen, USA), és 10% -os TBE-karbamid gélekre (Invitrogen, USA) töltöttük. A DNS-mintákat 1xTBE pufferben (pH 8,3) elektroforézissel végeztük 180

V-on 3,5-4 órán át, a GeneRuler 50 bp méretű DNS létrát (Thermo Fisher Scientific) használva méretkontrollként. Végül a DNS-sávokat SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) alkalmazásával vizualizáltuk.

3.4. A csíranövények rediploidizálása kolchicin kezeléssel

A kromozómakészlet megduplázását Chase és Nanda (1965) módszere szerint néhány módosítással végeztük. A csírázott haploid magokat körülbelül 3–5 cm hosszú koleoptillekkel vízszintesen felvágtuk és 0,1% kolchicint 0,1% DMSO-ot és 0,1% Tween 20- t tartalmazó oldatba merítettük hat órán át, 22 °C hőmérsékleten. Ezeket a kolchicinnel kezelt palántákat háromszor csapvízben mostuk, majd tőzegmoha-tartalmú Styrofoam tálcákba ültettük, és 16 órás fény / 8 óra sötét fitotronban 28 °C-on, 3 levél állapotáig neveltük. A kinövő növényeket ezután a szabadba ültettük ki. A jól fejlett generatív szervekkel rendelkező növényeket önporoztuk. A sikeres magkötés a kezelés eredményességét is jelzi.

3.5. Az 5- FAM-jelölt mutagén oligonukleotidok tervezése és szintézise

Mutagenézis kísérleteinkben a fitoén deszaturáz (PDS) gén kikapcsolását szintetikus oligonukleotidok alkalmazásával kívántuk elérni. A 41-mer egyszálú, SDO-PDS elnevezésű oligonukleotidot (5'-g aa ATT ACT GGA GCT AGC TAG ACA AGA TCT TTT GCG ggc C-3', kisbetűk a foszforotioátokra vonatkoznak) úgy terveztük, hogy STOP kodont hozzon létre a kukorica PDS génben. Az oligonukleotidot a lehető legközelebb helyeztük a kiindulási kodonhoz, a célzott mutációt pedig az oligonukleotid közepére. A CAG-TAG mutáció mellett a GCA-ACA marker mutációt is terveztünk az SDO-PDS-be azzal a céllal, hogy elősegítse a sikeres mutáció DNS szekvenálással történő igazolását. Az SDO szintézisének, és tisztításának elősegítése érdekében a GGGG kvartettet GGGC-re cseréltük, amely tovább szolgálhat marker mutációként. Végül az SDO-PDS szekvencia specifikitását ellenőriztük a kukorica genomjában NCBI blastolással.

Az SDO-PDS molekula kémiai szintézisét DNS / RNS / LNA H-16 szintetizátor (K&A Laborgeraete) alkalmazásával végeztük standard β -ciano-etil-foszforamidit kémiai módszerrel, névleges méretarányban 0,2 μ mol. Az oligonukleotidfelvételi vizsgálatokhoz egy véletlenszerű non-szensz szekvenciákat tartalmazó 40-mer SDO-kat az 5'-végén karboxil

fluoreszcinnel (5-FAM) jelöltük. Az SDO-PDS-t fordított fázisú HPLC-vel tisztítottuk, majd kationcserével, Dowex 50 gyanta alkalmazásával tisztítottuk.

3.6. Szintetikus egyszálú DNS molekulák injektálása haploid csíranövények merisztémarégiójába

A jelen protokoll kísérleteihez haploid kukorica genotípust használtunk. A csíranövények valódi haploid voltát flow-citometriával ellenőriztük, ahogy azt korábban leírtuk (Tiricz et al. 2018). A haploid magokat nedves és hengerelt szűrőpapírban csíráztattam, függőlegesen igazítva 3 literes főzőpohárba, amelyet 0,5 liter csapvízzel töltöttünk fel. A csírázott haploid növények 6 nap elteltével kb. 2 cm hosszú koleoptilrel rendelkeztek 16 órás fény / 8 órás sötét, 24 ° C-os szobahőmérsékleten. Ebben a szakaszban vízszintesen bemetszést ejtettünk a hajtáson, körülbelül 1 centiméterrel a koleoptile-mezokotil csatlakozás felett, és a merisztéma régiót függőlegesen (a vágott oldalán) meglazítottuk egy 27 G-s tűvel. A PDS gén célszekvenciáját képviselő szintetikus oligonukleotidokat nukleázmentes vízben feloldottuk 100 pM koncentrációban. Az egyes növények merisztéma régiójába 3 µl oligo oldatot injektáltunk. Ezeket a kezelt csíranövényeket tözegmoha-tartalmú habszivacs-tálcákba ültettük, és üvegházban neveltük 16 órás / 8 órás fényperiódusokkal, 28 ° C-on a tenyésztő végéig.

3.7. Kukoricaszemek embrióiba történő DNS felvétele a csírázás időleges aktivációjával (seed priming)

Ezekhez a kísérletekhez, diploid érett embriókat használtunk. Az érett embriót tartalmazó kukoricaszemek első lépésként sterilizáción mentek keresztül. Ezt a folyamatot egybekötöttük a seed priming elvégzésével. A sterilizálás során először 1 percig 70%-os alkoholt használtunk, majd mosás következett desztillált vízzel. Ezután 30 percig 1,5%-os nátrium-hipoklorit oldatban áztattuk a szemeket, majd ismét mosás következett. Végül lépésként 0,2%-os HgCl₂ oldatot használtunk majd 4x desztillált vizes mosást végeztünk. A sterilizációtól megduzzadt magok embriópajzs előtti maghártyáját eltávolítottuk, majd 48 órás deszikkálás következett. A következő lépésben az embrió körüli szöveteket eltávolítottuk szabaddá téve, feltárva, a száraz érett embriót. A szemeket petricsészében steril homokba ágyaztuk, embrióval felfelé, hogy tökéletes vízszintes helyzetbe hozhassuk őket. A kukorica fitoén deszaturáz (PDS) gén kikapcsolása érdekében 6 különböző strukturájú ZmPDS oligóval végeztük a kísérletet, ebből 5 kombinációban 2mM-os szacharózban oldott oligókat használtunk, míg 1 esetben vízben

oldottuk fel ezeket a molekulákat. Az 50 µM-os oligonukleotid oldatot 2 óra különbséggel és 50 µl-es dózisokban cseppentettük az embrió felületére 2 alkalommal. Miután a magok beszívták az oligó oldatot nedves szűrőpapír segítségével over night előcsíráztattuk, majd kiültettük a mintákat. A kezelt magokból növényt neveltünk, önporozásuk után az utódgeneráció növényeinek fenotípusait vizsgáltuk.

3.8. Pollentömlőn keresztüli DNS felvétel a beporzás során

A 80-100% bibevirágzásban lévő szigetelt beltenyésztett vonalakat önporoztuk. 12 óra elteltével a csöveket kétféle képpen horizontálisan kettévágtuk. Azokat a mintákat, ahol a cső disztális végétől számítva 3-4 centiméterrel vágtuk vissza a csövet H1, ahol 10-13 centiméterrel H2 elnevezést kapták. A csövek átlagosan 20 cm hosszúak voltak. A vágás felületét antiszensz, vízben oldott 50 µM töménységű ZmPDS oligóval kezeltük 300 µl térfogatban. Az oligonukleotidokat foszfotioáttal (PTO) védtük a degradáció ellen. Az oldat felszívódása után ismételten beporoztuk a csöveket, majd szigetelő tasakkal fedtük be őket. Az utódgenerációt a következő évben ismét elvetettük, majd önporzás után a harmadik generáció fenotípusait vizsgáltuk.

3.9. A fitoen deszaturáz (PDS) gén PCR amplifikációja és szekvenálása

A genomi DNS-t a kezeletlen kontroll növényekből, valamint az SDO kezelésből származó és albínó fenotípust mutató kukorica növények levél fragmentjeiből CTAB-alapú extrakciós módszerrel izoláltuk (Doyle 1990). A célzott nukleotidcsere elemzéséhez PCR-amplifikációkat hajtottunk végre a következő fitoén-deszaturáz gén-specifikus primerekkel: ZmPDS_Forward: 5'-CAGTAGTCTGCCTGTACCTATTG-3', ZmPDS_Reverse: 5'-CGGTGTGTGATCTCC-3'. Phusion Hot Start II DNS polimerázt (Thermo Scientific) használtunk a PCR reakciókhoz, a következő beállításokkal: 1. Kezdeti denaturálás: 98 ° C 3 min-re. 2. Denaturálás: 98 ° C 30 másodpercig. 3. Lágyítás: 63 ° C 45 másodpercig. 4. Meghosszabbítás: 72 ° C 30 másodpercig. (2–4 lépés: 30 ciklus) 5. Végző meghosszabbítás: 72 ° C 10 percig. Az amplifikált fragmenteket GeneJet Gel Extraction kit (Thermo Scientific) segítségével tisztítottuk a gyártó ajánlása szerint. Ezeket a fragmentumokat felhasználtuk az Ion Torrent szekvenálásokhoz. (Tiricz et al. 2018).

3.10. Fluoreszcens mikroszkópiai módszerek

A 6 napos kukorica csiranövények fluoreszkáló oligonukleotiddal befecskendezett apikális merisztéma régióit Leica SP5 lézeres pásztázó konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) detektáltuk, az érintetlen cserepes növények levelét közvetlenül a tárgylemezhez rögzítettük egy fedőlemez segítségével. Másik lehetőségként petri-csészében (Fodor and Ayaydin 2018) a levél kimetszésével és 24 x 50 mm-es tárgylemezre történő rögzítéssel dolgoztunk. A klorofill detektáláshoz 543 nm-es lézert és 650-750 nm detektálási tartományt használtunk. A sejtfal autofluoreszcenciájához 405 nm gerjesztési és 415-530 nm emissziós tartományt használtunk. A makroszkopikus levélképeket a Samsung Galaxy Note 8 mobiltelefon-kamerával készítettük (Samsung Electronics, Szöul, Dél-Korea). A kiválasztott téglalap alakú területek profiljának mérését Fiji szoftver segítségével végeztük (Schindelin et al. 2012). Az ábrázolt profilok exportált intenzitási értékeit használtuk a diagramok megalkotására a Microsoft Excel 2010 programban (Microsoft, Redmond, WA, USA). A kompozit képeket a CorelDraw Graphics Suite X7 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) felhasználásával készítettük.

4. Eredmények és megvitatásuk

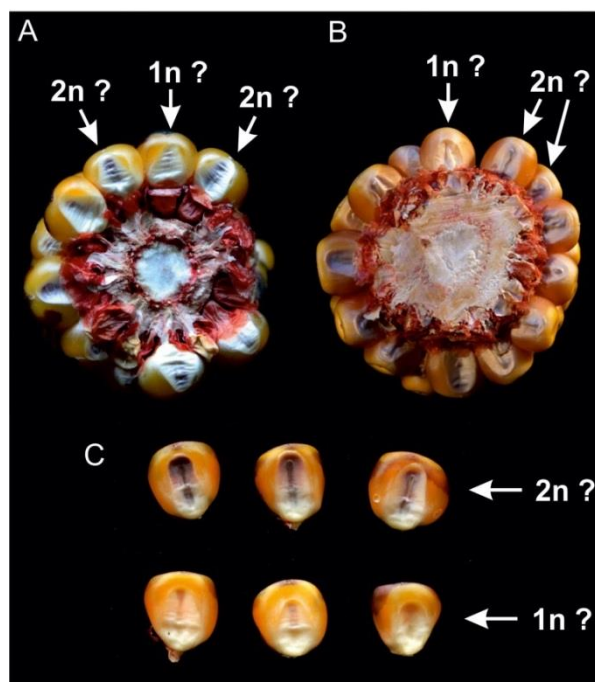
4.1. A dihaploid technológia optimalizálása a Pannon Genetik nemesítési programban

4.1.1. Keresztezési program az R1-navajo (R1-nj) markert hordozó inducer vonallal

Az *in vivo* kísérletekben a haploid indukciót úgy végeztük, hogy a három hibrid (K4390, K4368, K4250) petesetjeit megtermékenyítettük a K405 haploid inducer pollenjeivel, amelyek R1-nj gént hordoztak. A K4390 x K405, K4368 x K405 és K4250 x K405 hibridek érett csöveinek tanulmányozása után megállapíthattuk, hogy az endospermium és az embrió erős és gyenge antociános színeződése is jelen volt genotípustól függően (10. ábra).



10. ábra - Az R1-nj marker manifesztációja a szemkoronán. Az anyai szülő genotípusa módosítja az antocianin pigmentáció expresszióját az inducer növényekkel történő keresztezés után. Az eltérő R1-nj gén expresszió két hibrid összevetésében a szemkoronák erős (K4390) és gyenge (K4368) R1-nj fenotípusokat mutatnak.



11. ábra - A (A) K4390 és (B) K4368 hibridek csőmetszete haploid indukáló vonallal történt porzás után. (C) Az aleuron rétegben R1-nj fenotípussal rendelkező kukoricaszemek, 2n diploid színes embrióval, és 1n haploid színtelen embrióval.

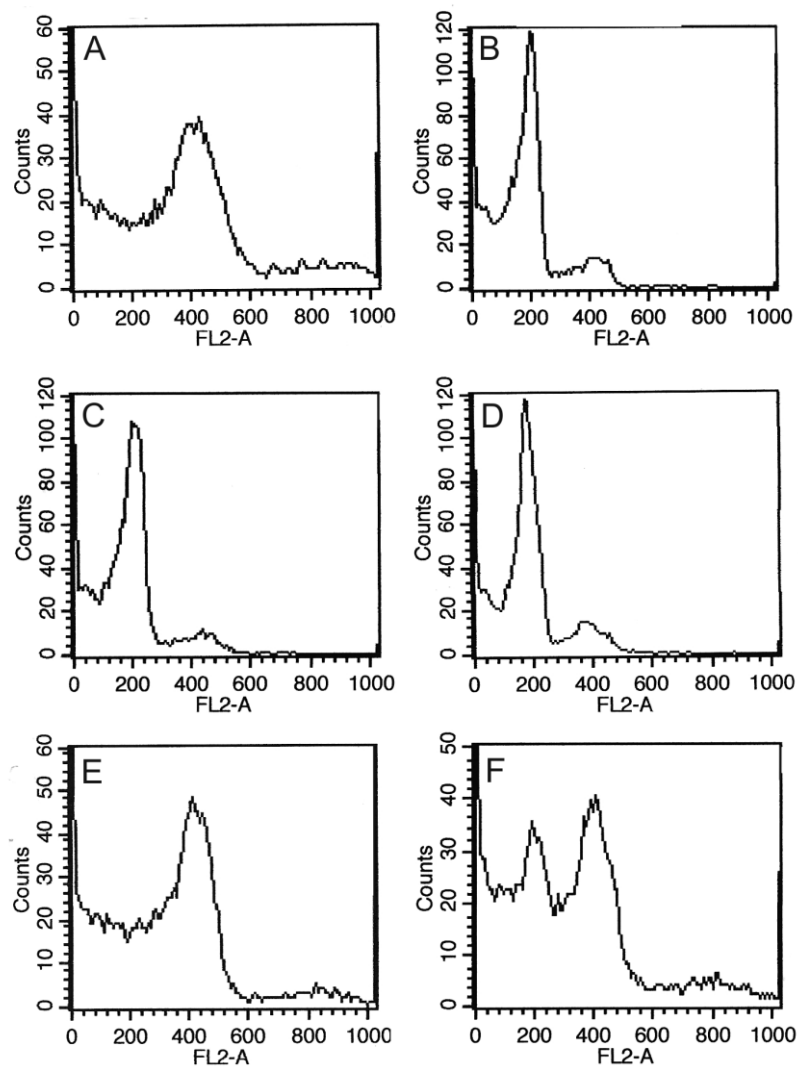
Ez a különbség azt jelzi, hogy az anyai szülők genetikai háttere valóban befolyásolja a markergén működését (Prigge et al. 2012). Az utóbbi megállapítás azért rendkívül fontos a technológia alkalmazása során, mert az előszelekcióban döntő szerepe van a színnek. Azok a szemek, amelyek szemkoronája egyáltalán nem pigmentált, feltételezhetően idegen beporzáson mentek keresztül, így alkalmatlanok a dihaploid technológia használata során. Az a jelenség is gyakran megfigyelhető, hogy az anyai genom gátló tulajdonságai miatt inducerrel történő porzás esetén sem színeződik az aleuron réteg, lehetetlenné téve a vizuális előszelekciót. Színes, piros vagy fekete aleuronnal rendelkező anyai genotípusok nemesítésére a technológia alkalmatlan. A ploidia szint meghatározására az embrió antociános pigmentáltságát használjuk fel. Ha az embrió erősen színezett, akkor tartalmazza az apai kromoszómaszerelvényből származó markergéneket, így feltételezhetjük, hogy a szem diploid. Amennyiben a pigmentáltság nagyon gyenge, vagy teljesen hiányzik úgy haploid genotípust feltételezhetünk. Az embrió színszelekciójára is érvényesek az aleuronnál már tárgyalt anyai gátló gének által okozott bizonytalanságok, illetve az eleve színezett embrióval bíró nemesítési anyagokra szintén használhatatlan a módszer. A technológia hatékony alkalmazásához további olcsó, gyors és pontos ploidszint meghatározására irányuló kiegészítő kísérletekre van szükség.

A jelen kísérleteinkben a három szegregáló populációból összesen 2280 magot szelektáltunk szín alapján. A lila endospermiumot és a fehér embriót tartalmazó szemeket elválasztottuk (Chase and Nanda 1965). Ez a fenotípusos szűrés 399 magot haploid utódokként azonosított, amelyek az apai kromoszómák embrionális osztódás során történő eliminálódásával jöttek létre. Így a magok 17,5% -a feltételezhetően haploid, 12,0% -tól 25,0% -ig változva a három populáció közt. Ez az indukciós ráta 4,1-32,1% tartományba esik, amelyet hat trópusi hibrid esetén is leírtak Krasnodar Embryo Marker Synthetic (KEMS) az inducerrel való keresztezés után (Battistelli et al. 2013). Az 11-b, c, ábrán bemutatott jellegzetes markerrel színezéssel rendelkező magok szemléltetik a vizuális detektálás során fellépő bizonytalanságokat. Ezért alternatív módszereket kerestünk a magok ploidia szintjének igazolására.

4.1.2. Az előszelektált magok ploidszintjének meghatározása gyökércsúcsból, flow-citometriával

Az előszelektált csíranövények ploidszintjének igazolásához a gyökércsúcsból izolált sejtmagokat flow-citometriás vizsgálatnak vetettük alá (Dudits et al. 2016). A 12. ábra a haploid (12-b, c, d), diploid (12-e. ábra) és a mixoploid (12-f. ábra) kukorica növények flow-

citometriás elemzésének hisztogramjait mutatja. Az egyes minták nukleáris DNS-tartalmának becslését úgy végeztük, hogy összehasonlítottuk a G1 csúcs helyzetét a standard kereskedelmi hibrid magjainak hisztogram képével (12-a. ábra). Gyökérmintákban találtunk mind haploid, mind diploid sejtmagokat, amelyek jelzik az analizált utódok mixoploid jellegét (12-f. ábra). Ez a megállapítás összhangban áll a mixoploid embriók kimutatásával egy olyan tanulmányban, amely a kromoszómák szelektív eliminációját írja le haploid indukciós mechanizmusok során (Zhao et al. 2013).



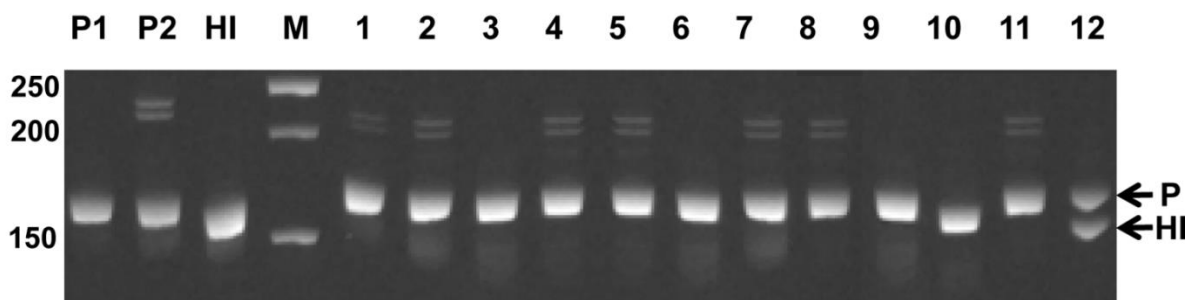
12. ábra - Az egyes utódok ploidszintjének meghatározása a feltételezett haploid mag gyökereiből izolált sejtmagok relatív DNS-tartalmának flow-citometriás elemzésével. (A) Diploid hibrid relatív DNS-tartalma. Reprezentatív hisztogramok a haploid (B, C, D), a diploid (E) és a mixoploid (F) kukorica csíranövényekről.

A flow-citometriás elemzésekből származó, kvantitatív genomméretre utaló adatok a diploid vagy mixoploid embriók magas gyakoriságát tárták fel a szín marker-alapú előválogatás után. A valódi haploidok száma 237 vetőmag, ami az elsődlegesen előre kiválasztott populáció 59,4% -ának és a teljes magszám 10,4% -ának felel meg. Az azonosított 162 diploid / mixoploid utód korai kiküszöbölése (az átlagos 40,6% - 35,8% -ról 57,8% -ra változik) jelentősen növeli a teljes beltenyésztett vonal-előállítási program hatékonyságát. A protokoll alkalmazásával elvégezhető az alapvető költségcsökkentés a következő lépések végrehajtása előtt, mint például a diploidizáció és a kolchicinnel kezelt növények szántóföldi nevelése.

A genomméret meghatározását flow-citometriával már alkalmazták különböző *in vivo* haploid indukciós projekteknél, de főleg a növények jellemzésére a dihaploidizáció után. Ezekben a vizsgálatokban a sejtmagokat a kolchicinnel kezelt növények leveleiből izolálták (Battistelliet al. 2013; De Oliveira Couto et al., 2015). Későbbi publikációkban található adatokat az R1-*navajo* marker szelekciót követően a genomméret meghatározás során feltárt 33,5% -os hibarány megfigyeléséről, amely összhangban van a 40,6% -os adatainkkal.

4.1.3. Genotípus meghatározás SSR markerekkel

Az olajtartalom, a fluoreszcencia vagy a ploidszint mérése drága berendezéseket igényel, amelyek általában nem állnak rendelkezésre a kis nemesítőcégek számára. Ezzel szemben a DNS-alapú molekuláris markerek használata egyszerű és olcsó. Ezért teszteltük a polimeráz láncreakció (PCR) alapú szűrési technikát. A mikroszatellitek vagy “egyszerű tandem elrendezésű szekvencia ismétlődések” (SSR) markerek kodomináns öröklődést mutatnak, azaz mindkét szülői allél jelenléte kimutatható abban az esetben, ha azok hossza eltérő. Az ilyen típusú markerek megfigyelhetők a kukoricafajták olyan populációiban, amelyek több mint 20 alléllal rendelkeznek (Senior et al. 1998). Kiválasztottuk az UMC1152 markert, amely polimorf volt a K405 haploid indukáló vonal és a K4390 hibrid szülői vonalai között. A 13. ábra a K405 és a K4390 szülő komponensei közötti UMC1152 polimorfizmust és 12 (R1-nj) marker pozitív, feltételezett haploid genotípust hasonlít össze. Két haploid jelölt kivételével a minták olyan UMC1152 allélt tartalmaznak, amelyek csak a K4390 hibridben vannak jelen, míg ezek az allélok egy albínó növényből (10. szám) és a K405 vonalból hiányoznak. Egy hamis pozitív jelölt (12. szám) diploidnak (vagy mixoploidnak) bizonyult, és mind a K405, mind a K4390 allélt hordozta.



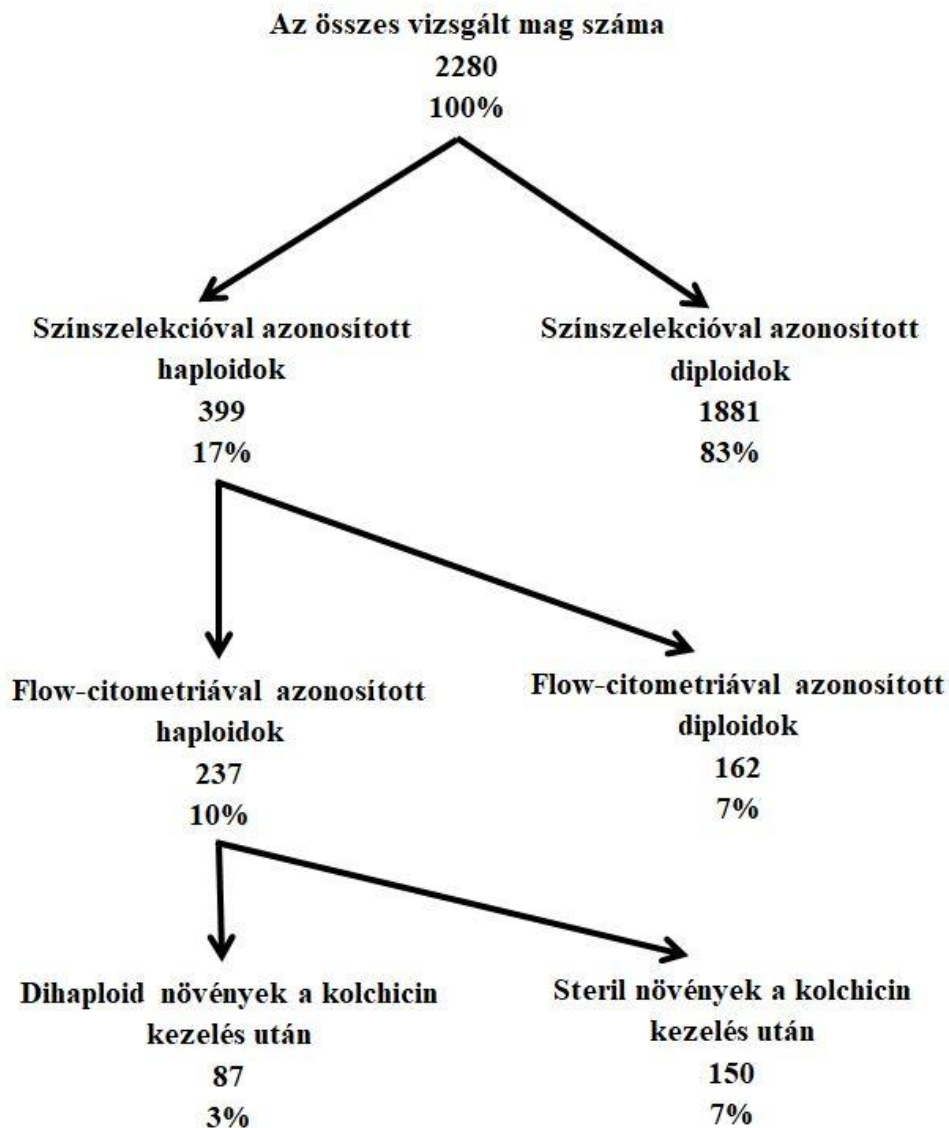
13. ábra - A K4390 hibrid szülői vonalainak (P1, P2), a haploid inducer (HI) K405 vonal és 12 feltételezett haploid genotípus, amelyet a K4390 és a K405 keresztezésével kaptunk. A gélekép az UMC1152 SSR markerrel történő PCR eredményét mutatja. A GeneRuler 50 bp méretű DNS létra három fragmentuma az (M) oszlopban látható, míg a szülői vonalakból (P) és a haploid inducerből (HI) származó DNS-fragmenseket a jobbra mutató nyilak jelzik.

4.1.4. A hajtás merisztémák dihaploidizációja kolchicin kezeléssel

Ebben a kísérletben 237 valódi haploid növényt használtunk a dihaploidizációhoz. A kukorica csíranövények kolchicin kezelése a leggyakrabban alkalmazott módszer a kromoszómakészlet megduplázására (Choe et al. 2012, Dang et al. 2012, Battistelli et al. 2013). A párhuzamosan végzett flow-citometriás vizsgálat igazolta a rediploidizáció hatékonyságát, ami a legoptimálisabb esetben 69,33% volt. A De Oliveira Couto (2015) által leírt módszer lehetővé tette, hogy jelentősen csökkenjen a haploid növénypopuláció kolchicin-oldattal történő kezelése. Ezeket a növényeket először üvegházi körülmények között neveltük, majd 30-50 cm magasság elérése után a kísérleti kertbe helyeztük ki. A kísérlet további részében nem használtunk flow-citométert, mivel a növények levelei mind mixoploid képet mutattak (Battistelli et al. 2013). A ploidszint növelésének sikerességét a kertben virágzó, termékeny növények, és a csövön kötött magokból állapítottuk meg. A sikeresen termékenyült növények száma azt mutatta, hogy a valódi haploid növények 36,7%-át sikeresen rediploidizáltuk. Ha a számolást kiterjesztjük, a kiindulási magok számára megkapjuk a haploid indukciós rátát, (HIR) ami jelen esetben a 2280 utód 3,8% -a.

A trópusi kukorica genotípusokkal végzett dihaploid nemesítési programokról szóló korábbi publikációk összhangban a jelen közép-európai tenyészállományokat használó tanulmánnyal hangsúlyozzák a valódi haploidok előválogatásának fontosságát az R1-navajo (R1-nj) markerrendszer flow-citometriával történő kombinálásával vagy egyszerű PCR-alapú SSR genotipizálással. Az összefoglaló táblázat (14. ábra) a beltenyésztett kukorica vonalak

előállításának különféle lépésein keresztül szemlélteti a hatékonysági adatokat. A leírt protokoll kiemeli a flow-citometria alkalmazásának fontosságát a post-szelektív fázisban.



14. ábra - Az összefoglaló ábra a dihaploid technológia különféle szakaszaiban megállapított hatékonyságot mutatja be az R1-navajo (R1-nj) markerrel és flow-citometriával végzett kettős előszelekció során.

4.1.5. A dihaploid technológia használatának tapasztalatai a Pannon Genetik nemesítési programjában.

Ezt a módszert a 2015-ös tenyészidőszakban vezettük be. Már a kezdetektől fogva egyértelművé vált, hogy a technológiát optimalizálni kell a versenyképes alkalmazás

eléréséhez. Előselekcio hiányában rendkivul sok nem valódi haploid került „rediploidizációra”, ami rontotta a tenyészkert kihasználtságát, és felesleges energia befektetést, valamint plusz költséget jelentett az első évekbén. Ezen anyagok, bár a virágzás tekintetében dihaploidokként viselkedtek, az állomány heterogenitása jól mutatta az előselekcio problémát. Néhány év alatt az előselekcio bevezetésével, és a technológia további optimalizálásával eljutottunk az évi 100-150 új dihaploid genotípus keresztezési-programba történő bevezetéséhez (15. ábra). A hagyományos nemesítési technikák, mint például a back cross vagy önporzás segítségével a hasadóanyag genetikai állománya fixálható ugyan, de a gélelektroforézises vizsgálatok gyakran mutatnak 8-10 év után is heterogenitást. Ezen tulajdonsága a régi technológiáknak megnehezítik az állami elismerést, és a teljesen tiszta, homozigóta beltenyésztett vonalak termesztésbe vételét. A dihaploid technológia segítségével a haploid genom tökéletes megduplázódása miatt a heterogenitási problémák megszűntek. A módszer folyamatos alkalmazása az új beltenyésztett vonalak keresztezésével évről évre elegendő F1 hibriddel látja el az aktuális nemesítési programot ahhoz, hogy azokat teljesítménykísérletbe állítva hazai nemesítésű, versenyképes hibrid palettát tartsunk fent, és nemesítsünk tovább fenntartható módon.



15. ábra – Dihaploid vonalokból előállított hibridek

4.2. A fitoén deszaturáz (PDS) kukoricagén Oligonukleotid-Irányított Mutagenézise (ONIM) a hajtásmerisztéma kezelésével

Tekintettel arra, hogy a tenyésztett kukorica sejtekből, protoplasztokból erősen genotípustól függően lehet fertilis növényeket felnevelni, indokoltnak láttuk az *in planta* módszerek kidolgozását az ONIM megközelítésekhez.

4.2.1. A kukorica fitoén deszaturáz (PDS) gén szekvencia-analízise, és a cél nukleotidrégió meghatározása

Jelen tanulmány elsődleges célja egy gén-specifikus mutagenézis protokoll létrehozása szintetikus egyszálú oligonukleotid molekulákat tartalmazó oldat (SDO) injektálásával a fiatal kukorica csíranövények merisztéma régiójába. A haploid szomatikus sejtekben a mutagén események fenotípusos monitorozására kiválasztottuk a fitoén deszaturáz (PDS) gént, amely kulcsfontosságú enzimet kódol a karotinoidok bioszintézisében, és amelyet széles körben használtak a CRISPR / Cas9 rendszerrel végzett genomszerkesztési kísérletekben (Jia and Wang 2014; Wang et al. 2015; Nishitani et al. 2016; Odipio et al. 2017). Az *Arabidopsis* PDS3 gén T-DNS inszerció mutánsai törpe és albínó fenotípusokat mutattak a klorofill, karotinoid és gibberellin bioszintézis károsodása miatt (Qin et al. 2007). A kísérleteinkben a recesszív mutáció fenotípusos megjelenése érdekében haploid kukorica növényeket használtunk. A mutáns szövetek klorotikus fenotípust mutattak az SDO-val kezelt M1 generációs növényekben. A kukorica haploid indukáló vonallal való keresztezés után a haploid magokat az R1-nj gén által kódolt antocianin pigmentáció alapján választottuk ki. A kezelt növények haploid jellegét egy későbbi fejlődési szakaszban megerősítettük a csíranövények levélből történő izolálásával, és a genom méretének flow-citometriával történő azonosításával.

A mutagén SDO molekulák megtervezéséhez, és szintéziséhez a ZmPDS gént szekvenáltuk a recipiens kukorica genotípusból (16. ábra). A fenti gén kikapcsolása érdekében a transzkripció kezdés után indokolt egy stop kodon kialakítása C-T nukleotid cserével, amit célszerű egy ACA marker triplettel kombinálni. A 16. ábra jelzi a 41 nukleotid hosszú molekulát szintetizáltuk TAG stop kodonnal.

***Zea mays* fitoén deszaturáz (PDS1) nukleotide sorrendje a cDNS alapján**

CTCTTCCCTCCATCTTATCATCGCCCACGTACACACCCAATTCCTCGCAACTGGGCTCCCC
GCCTCCACGACACTGCCCCCGCCTCAAGTCCGCCGCTCCATTCTTCAGCTCTCCTATCC
TCCGTAGTCTGCCTGTACCTATTGGCTGAAGCAGAGCTGACCCCCACTTTATCAAGAGTTG
CTCAACA ATG GAC ACT GGC TGC CTG TCA TCT **ATG** **AAT ATT ACT GGA GCT AGC**
CAG ACA AGA TCTTTT GCG GGG CAA CTT CCT CCT CAG AGA TGT TTT
GCGAGTAGTCACTATAACAAGCTTTGCCGTGAAAAAATTTGTCTCAAGGAATAAAGGAAG
GAGATCACACCGTAGACATCTGCCTTGCAGGTTGTCTGCAAGGATTTTCCAAGACCTCC
ACTAGAAAGCACAATAAACTATTTGGAAGCTGGACAGCTCTCTTCATTTTTTTAGAAACAG
CGAACGCCCCAGTAAGCCGTTGCAGGTCGTGGTTGCTGGTGCAGGATTGGCTGGTCTATC
AACAGCGAAGTATCTGGCAGATGCTGGACATAAACCCATATTGCTTGAGGCAAGAGATG
TTTTGGGTGGAAAGGTAGCTGCTTGGAAAGGATGAAGATGGAGATTGGTACGAGACTGGG
CTTCATATCTTTTTTGGAGCTTATCCCAACATACAGAATCTGTTTGGCGAGCTTAGGATTG
AGGATCGTTTACAGTGGAAAGAACTCTATGATATTGCGCATGCCAAACAAGCCAGGA
GAATTCAGCCGTTTGTATTTCCAGAACTTTGCCAGCACCTATAAATGGGATATGGGCC
ATATTGAGAAACAATGAAATGCTTACCTGGCCGAGAAGGTGAAGTTTGCAATCGGACTT
CTGCCAGCAATGGTTGGTGGTCAACCTTATGTTGAAGCTCAAGATGGCTTAACCGTTTCA
GAATGGATGAAAAAGCAGGGTGTTCCTGATCGGGTGAACGATGAGGTTTTTATTGCAATG
TCCAAGGCACTCAATTTTATAAATCCTGATGAGCTATCTATGCAGTGCATTTTGATTGCTT
TGAACCGATTTCTTCAGGAGAAGCATGGTTCTAAAATGGCATTCTTGATGGTAATCCGC
CTGAAAGGCTATGCATGCCTATTGTTGATCACATTCGGTCTAGGGGTGGAGAGGTCCGCC
TGAATTCTCGTATTA AAAAGATAGAGCTGAATCCTGATGGAAGTGTAAAACACTTCGCAC
TTAGTGATGGAAGTCAAGATAACTGGAGATGCTTATGTTTGTGCAACACCAGTCGATATCT
TCAAGCTTCTTGTACCTCAAGAGTGGAGTGAAATTAATTTCAAGAACTGGAGAAGT
TGGTGGGAGTTCTGTTATCAATGTTTATATATGGTTTGACAGAAAATGAACAACACAT
ATGACCACCTTCTTTTTCAGCAGGAGTTCACTTTTAAGTGTCTATGCAGACATGTCAGTAAC
CTGCAAGGAATACTATGACCCAAACCGTTCAATGCTGGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGA
CGAATGGATTGGTCAAGTGACACTGAAATCATCGATGCAACTATGGAAGAGCTAGCCA
AGTTATTTCTGATGAAATTGCTGCTGATCAGAGTAAAGCAAAGATTCTTAAGTATCATA
TTGTGAAGACACCGAGATCGGTTTACAAAATGTCCCAAATGTGAGCCTTGCCGGCCTC
TCCAAAGGTCACCTATCGAAGGTTTCTATCTAGCTGGTGATTACACAAAGCAGAAATACC
TGGCTTCATGGAAGGTGCAGTCCATCCGGAAGCTTTGCGCCCAGTCCATTGTGCAGG
ATTATAGCAGGCTCACACTCAGGAGCCAGAAAAGCCTACAATCAGGAGAAGTTCCTGTC
CCATCTTAGTTGTAGTTGGCTTTAGCTATCGTCATCCCCACTGGGTGCTATCTTATCTCCTA
TTTCAATGGGAACCCACCCAATGGTCATGTTGGAGACAACACCTGTTATGGTCTTTGAC
CATCTCGTGGTACTGTAGTTGATGTCATATTCGGATATATATGTA AAAAGGATCTGCATA
GCAATTGTTAGACCTTTGGGAAAGCAAAGCGATAAAGAGATCTCAGAT

1. cél régió:

ATGGACACTGGCTGCCTGTCATCT**ATG****AATATTACTGGAGCTAGC****CAGACAAGA**
TCTTTTGGGGGCAACTTCTCCTCAGAGATG**TTTT**GCG

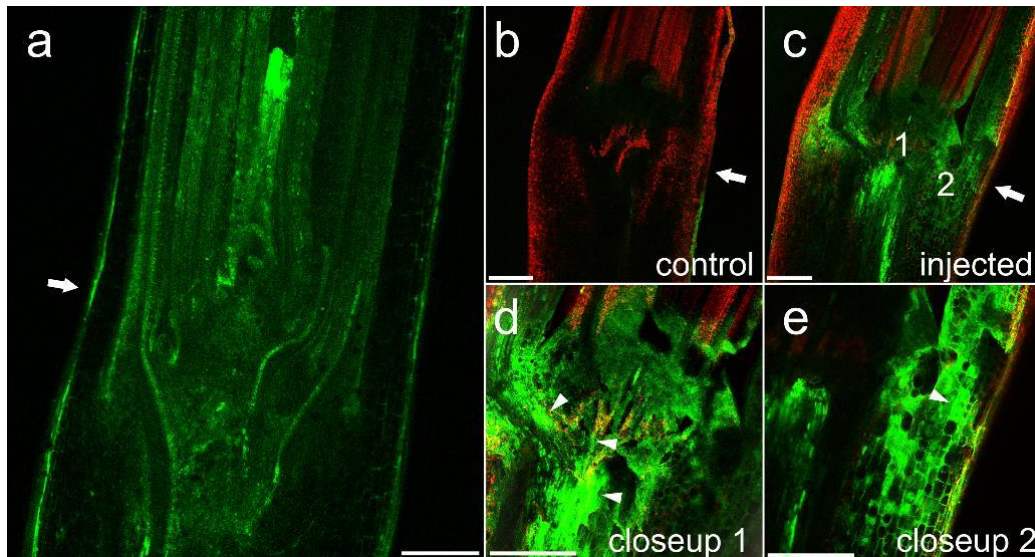
2. Oligo a STOP kodon beépítésére CAG-TAG mutációval:

ATG GAC ACT GGC TGC CTG TCA TCT **ATG** **AAT ATT ACT GGA GCT AGC** **TAG**
ACA AGA TCTTTT GCG GGG CAA CTT CCT CCT CAG AGA TGT TTT GCG

16. ábra - A kukorica fitoén deszaturáz (PDS) gén nukleotid sorrendje és a mutagén oligonukleotid szekvenciája.

4.2.2. A 5- karboxifluoreszcein (5-FAM) jelölt oligonukleotidok felvétele a sejtekbe a kukorica hajtásmerisztéma injektálását követően

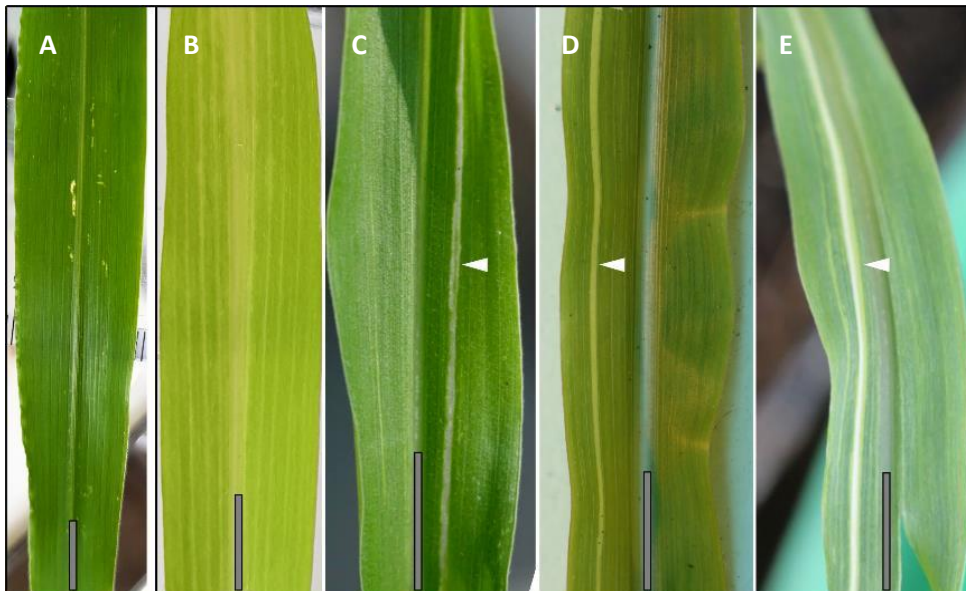
A csíranövények merisztémájába injektált SDO-molekulák felvételének, és szöveti eloszlásának monitorozására kovalensen kapcsolt 5'- karboxil fluoreszcein (5-FAM) festékkel szintetizáltunk 40 μ M random véletlenszerű nonszensz szekvenciákat képviselő SDO-kat. Ezen molekulák lokalizációját konfokális lézer pásztázómikroszkóppal vizsgáltuk. A palánták hosszanti metszeteiben a 24 órás befecskendezés után a zöld fluoreszcencia intenzitása magas volt a hajtáscsúcs merisztéma és a levél primordia vaszkuláris kötegeiben (17-a, c ábra). A merisztéma régió közeli képe azt mutatta, hogy a fluoreszcens anyag felhalmozódik a sejtekben (17-d. ábra, e nyílhegyekkel). A zöldfluoreszcencia hiánya a vízzel injektált kontrollmintákban azt mutatta, hogy a beinjektált minták megfigyelt zöldfluoreszcenciája nem sebzés által indukált autofluoreszcencia eredménye (17-b. ábra).



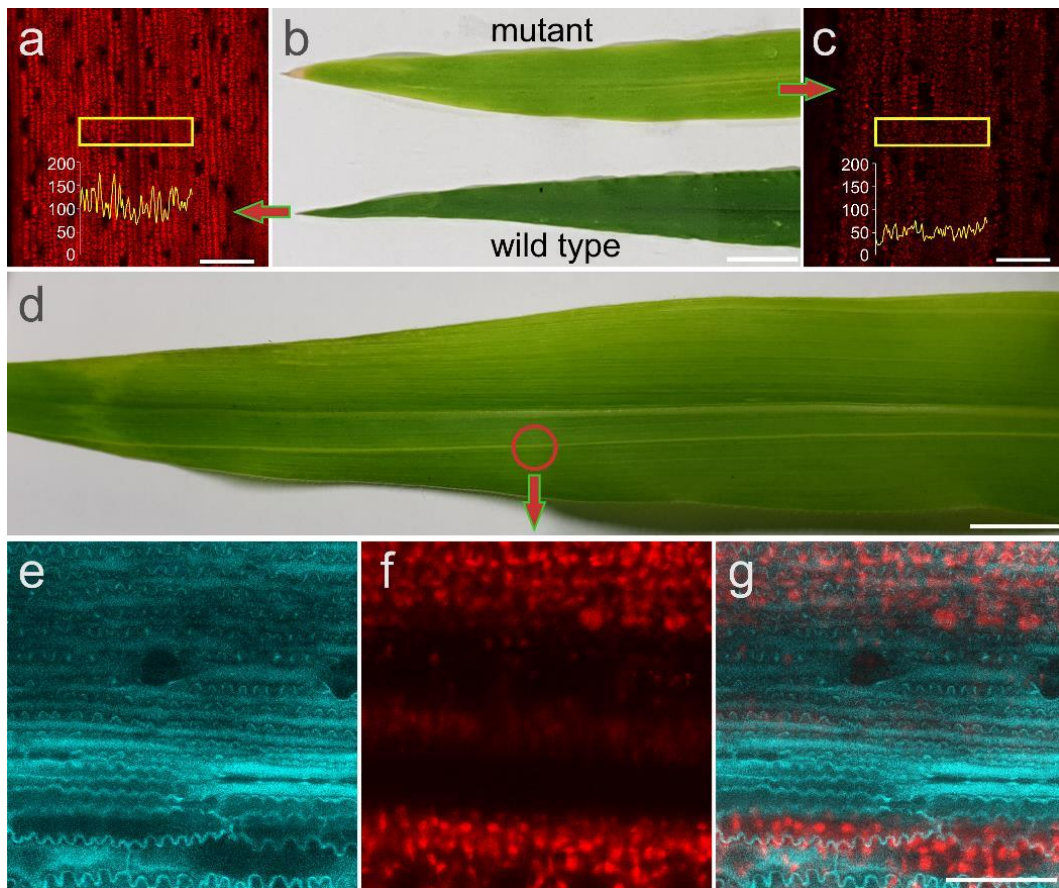
17. ábra - A fluoreszceinnel jelölt oligonukleotidok szöveti eloszlása a kukorica csíranövény hajtás merisztémájában az injektálást követően. Apikális hajtás merisztéma régió keresztmetszet (a) és (c), erős zöldfluoreszcencia-intenzitást mutató mintája az oligonukleotid befecskendezés után. Nyilak mutatják a hajtás apikális merisztéma hozzávetőleges helyzetét. (b) Vízzel injektált kontroll minta. (d) és (e) Nagyobb nagyítású, konfokális mikroszkóppal készített képek, amelyeket a (c) pontban bemutatott mintából készítettünk. Az 1. és 2. számot azok a régiók kapták, amelyekből a közeli képek készültek. A nyilak kiemelik az oligonukleotidot felhalmozó régiók szemléletes részét. A minták klorofill autofluoreszcenciája pirossal jelenik meg a paneleken (b-e). Méretarány: 500 μ m.

4.2.3. M1 haploid kukorica növények klorotikus fenotípusai

A szintetikus oligonukleotidokat steril desztillált vízben feloldottuk 100 μM koncentrációban, és 3–10 μL koncentrációt injektáltunk hét napos csíranövények merisztéma régiójába. A kezelt növényeket cserépben, üvegházi körülmények között neveltük. A 90 kezelt növény közül négy fejlődött ki a levelén megfigyelhető fehér csíkkal vagy halványzöld fenotípussal. Ezek a fenotípusos elváltozások alapot adtak arra, hogy levélmintákat gyűjtsünk be, a ZmPDS gén érintett szakaszát megszekvenáljuk. A Zmpds 2-4. számú növények leveleiben klorofill hibát detektáltunk (18. ábra: B, C, D, E).



18. ábra - A klorofillhiányos levélrégiók megjelenése, M1 mutáns haploid kukorica növényekben, a csíranövények hajtáscsúcs merisztéma régióját fitoén deszaturáz (PDS) gén specifikus mutagén oligonukleotidokkal történő kezelés után. Nem kezelt, vad típusú növény (A), klorotikus, halványzöld levelű növény N^o1 (B), míg a többi mutáns csíkozott fenotípust mutatott. A N^o2 (C) és N^o3 (D) növények világoszöld, míg a N^o4 (E) növény albínó csíkkal rendelkeztek. A nyilak a klorotikus fenotípusú csíkokat jelzik. A szürke téglalap alakú méretarány (1 cm) függőlegesen van elhelyezve, megjelölve a levelek főérének helyzetét. A fluoreszcencia jelintenzitások számszerűsítése egy téglalap alakú vizsgált szelekciós területen az átlagos pixelintenzitást mutatták. A fluoreszcens jelek 111,8, illetve 52,4 pixelintenzitási értékeket mutattak a vad típusú és a mutáns levél esetében (17-a. és 17-c. ábra).



19. ábra – A haploid csíranövény leveleinek csökkent klorofill-fluoreszcencia mintázata a fitoén deszaturáz (PDS) gén oligonukleotid-mediált mutagenézise után. A felső panelen bemutatott mutáns N^o1 (c), és vad típusú (a) levélminták parenchima klorofill fluoreszcenciájának konfokális mikroszkópos képe látható. A sárga téglalappal kijelölt terület intenzitási profilja képbeágyazott diagramként jelenik meg. Az Y tengely az intenzitás értékeit jelzi (tetszőleges egységek), az X tengely a kiválasztott téglalap szélességének felel meg. Az oligonukleotiddal kezelt (halványzöld) és a vad típusú levél makroszkopikus képe (b). A középső panelen klorotikus csík képződését láthatjuk az oligonukleotiddal kezelt minta levélében (d). Az alsó panelen (e,f,g). közeli konfokális mikroszkópos képalkotás eredményei láthatók a középső panelen bemutatott klorotikus csík autofluoreszcenciájáról (kék) és klorofill autofluoreszcenciájáról (piros). Méretarány: 150 μm (a, c), 1 cm (b, d), 50 μm (e-g).

A mutáns levélben is felismerhetjük a magas jelintenzitású sejteket. Ezek az eredmények a halványzöld levél kiméra természetére utalnak, vad típusú és mutáns sejtek keverékével. Amint azt a *Zmpds* mutáns levél konfokális képe mutatja, a klorotikus levélcsík régió nem

volt klorofill fluoreszcencia (19. ábra, d-g). Ebben a sötét régióban azonban felismerhetjük a nem-mutált fluoreszcens sejteket is. Az SDO-val kezelt csíranövények levél fenotípusai egy mutáns szomatikus sejt populáció kialakulását mutatják, rendellenes fotoszintetikus pigmentképződés mellett. A klorotikus csíkok megjelenése a zöld levélszövetekben feltételezhetően a bizonyos számú mutációs eseményből származnak, amelyeket a merisztematikus szövetekben az SDO-molekulákkal végzett kezelések eredményeztek. Az itt leírt mutáns fenotípusok szoros hasonlóságot mutatnak a CRISPR / Cas9 rendszer fitoénszintáz génben indukált mutációs fenotípusaihoz kukorica növényben (Zhu et al. 2016). Lusardi és munkatársai korai tanulmánya (Lusardi et al. 1994) segítheti a mutáns szöveti régiók megfigyelt mintázatának értelmezését. Ezekben a kísérletekben az L2 réteg öt egyedi sejtjét mikroinjektálták izolált kukoricahajtás merisztémába olyan transzformációs vektorokkal, amelyek az antocianin bioszintézisének Lc génjét expresszálják. Azok a sejtek, amelyekben sikeres transzformáció történt, és az antocianin felhalmozódott, a regenerált növények leveleiben, a levél főere mentén elhelyezkedő, 0,5–1,5 cm hosszú csíkok formájában jelentek meg. A Zmpds No1 mutáns számos teljesen kifejlett levelének teljes halványzöld fenotípusa eltérő mutációs mechanizmust jelezhet. Az antocianin felhalmozódását jelző sejtek a főér mentén elhelyezkedő csíkos fenotípust mutattak, hosszuk 0,5 és 1,5 cm között volt. Bizonyos esetekben egynél több csík volt látható ugyanazon a levélen az erek mentén párhuzamosan elhelyezkedve.

4.2.4. A klorofill hiányos szövetekből izolált DNS szekvencia analízise

A vad típusú és mutagenizált ZmPDS gén szelektív amplifikációját és szekvenálását alkalmaztuk a kukorica sikeres célzott génszerkesztésének igazolására (20. ábra). A genomi DNS mintákat egy kezeletlen növény zöld leveléből, a Zmpds mutáns N⁰1 növény halványzöld leveléből, és a mutáns (N⁰2, N⁰3, N⁰4) levelek klorotikus csíkjaiból izoláltuk. Amint a 2. táblázatban látható, kukoricában a vad típusú ZmPDS gén CAG GCA genotípussal rendelkezik. Oligonukleotid mediált mutagenezist (OTNE) használtunk a TAG stop kodon létrehozására a 236-os pozícióban C-ről T -re változtatva azt. Továbbá a következő tripletben szerkesztünk egy marker mutációt G-ből A változást előidézve mutagén SDO-molekulákkal. A Zmpds mutáns szövetekből származó amplifikált PCR termék Ion Torrent elemzése nagyobb számú célszekvenciát mutatott TAG-vel vagy ACA-val, mint a vad típusú ZmPDS génnél. A több száz kettős mutáció jelenléte a N⁰4 levél fehér csíkot tartalmazó szövetében az oligonukleotid mediált géncsendesítés tényére utalhat. Ugyanakkor, még ha figyelembe

vesszük, hogy a levélminta feltehetően kiméra jellegű, ezért mutáns és vad típusú sejteket egyaránt tartalmaz akkor is változási adatok gyakorisága igen alacsony, ha az egyértelmű fenotípus kiterjedését tekintjük.

a				
Mutagén oligonukleotid szekvencia	5'- G AAT ATT ACT GGA GCT AGC <u>TAG ACA</u> AGA TCT TTT GCG GGC C -3'			
<i>ZmPDS</i> vad típus	5'-... ATT ACT GGA GCT AGC <u>CAG GCA</u> AGA TCT TTT GCG ...- 3'			
Cél gén szekvencia TAG GCA	5'-... ATT ACT GGA GCT AGC <u>TAG GCA</u> AGA TCT TTT GCG ...- 3'			
Cél gén szekvencia CAG ACA	5'-... ATT ACT GGA GCT AGC <u>CAG ACA</u> AGA TCT TTT GCG ...-3'			
Kettős mutáció TAG ACA	5'-... ATT ACT GGA GCT AGC <u>TAG ACA</u> AGA TCT TTT GCG ...-3'			
b				
Genotípus	Cél gén szekvencia CAG	Cél gén szekvencia TAG GCA	Cél gén szekvencia CAG ACA	Kettős mutáció TAG ACA
<i>Vad típus</i>	14884	4	20	1
<i>Mutant N° 1</i>	29488	14	63	52
<i>Mutant N° 2</i>	15925	4	80	17
<i>Mutant N° 3</i>	13297	42	49	161
<i>Mutant N° 4</i>	30629	136	149	491

2. táblázat - Ion Torrent szekvenálással ellenőriztük a vad típusú gén szekvenciáját és a régióban indukált mutációk számát.

(a) A *ZmPDS* gén vad típusú és mutáns variánsainak, valamint a mutagén oligonukleotid bázis sorrendjének leolvasási keretei.

(b) A célszekvencia és mutációi teljes leolvasási keret gyakorisága.

Zombori Zoltán által végzett szekvencia elemzés (nem közölt adatok) feltárta, hogy a kukorica genomában mind az 1. kromoszómán (*Zea mays phytoene desaturase* (LOC542329)) mind a 7. kromoszómán (*Zea mays 15-cis-phytoene desaturase*, chloroplastic/chromoplastic-like (LOC103633372)) azonosítható PDS gén, de az utóbbi gén csonka. A 2. táblázatban

közölt szekvencia adatok olyan primer párral (zöld szakasz) végzett amplifikációból származnak, amelyek az SDO szekvenciát (sárga szakasz) is tartalmazó azonos terméket eredményeznek mindkét génvariáns esetében (20. ábra). Ezért a folyamatban lévő szekvenálások olyan primer párral végzik az amplifikációt (lila szakasz), amelyek lehetővé teszik a két PDS génvariáns megkülönböztetését.

chr1	ctttcctccatctttatcatcgcccacgtacacaccaattcctcgca--actgggctcc	58
chr7	ctcagc--ctagaatatcttcac--ggtatttaccatttactcacgatactctgaagc	56
	*** * * * * ** *	
chr1	ccgcctccacgacactgcccccgctcaagtccgcccgcctccattcttcagctctcct	118
chr7	gtatacatatgccatatgggaaatgacttcataagctgtgggtgtcttatggctccttga	116
	* ** *	
chr1	atcctccgtagtctgcctgtacctattggctgaagcagagctgacccccactttatcaag	178
chr7	attgacgtagtctgcctgtacctattggctgaagcagagctgacccccactttatcaag	176
	** * *****	
chr1	agttgtcaacaatggacactggctgcctgtcatctatgaatattactggagctagccag	238
chr7	agttgtcaacaatggacactggctgcctgtcatctatgaatattactggagctagccag	236

chr1	acaagatcttttgcgggcaacttcctcctcagagatgttttgcgagtagtcactataca	298
chr7	gcaagatcttttgcgggcaacttcctcctcagagatgttttgcgagtagtcactataca	296

chr1	agctttgccgtgaaaaaacttgtctcaaggaataaaggaaggagatcacaccgtagacat	358
chr7	agctttgccgtgaaaaaacttgtctcaaggaataaaggaaggagatcacaccgtagacat	356

chr1	cctgccttgacaggtgtctgcaaggattttccaagacctccactagaaagcacaataaac	418
chr7	cctgccttgacaggtgtctgcaaggattttccaagacctccactagaaagcacaataaac	416

20. ábra – A célszekvenciát (sárga régió) tartalmazó két kukorica PDS génszakasz nukleotid szekvenciájának összevetése. A *Zea mays* phytoene desaturase (LOC542329) gén az 1. kromoszómán *Zea mays* 15-cis-phytoene desaturase, chloroplastic/chromoplastic-like (LOC103633372) a 7. kromoszómán azonosítható (Zombori Zoltán, nem közölt adat)

Egyetlen nukleotid irányított átalakítása vagy egyetlen bázis SDO-molekulák általi helyreállítása egyre nagyobb jelentőséggel bír a genomszerkesztésben (Rivera-Torres and Kmiec 2016; Sauer et al. 2016). A C – T vagy G – A konverziót kimutattuk a nem kezelt kontroll növényekben is. Ezek az eredmények jelezhetik a spontán mutagén események előfordulását, hasonlóan ahhoz, ahogyan a szintetikus oligonukleotidok alkalmazása során

tapasztaltuk. Még a szekvenálás sem képes megkülönböztetni a spontán és az ONIM utáni oligonukleotid-mediált genetikai változásokat.

A kísérlet során alkalmazott *in planta* genomszerkesztési protokollban leírt módszer kiküszöböli a növényi szövettenyésztés alkalmazása során fellépő nehézségeket. A kalluszképzés indukcióját, és a növény regenerációját. Az *in vitro* körülmények spontán mutációkat indukálhatnak, amelyek szomaklonális eltéréseket eredményezhetnek (Evans 1989). A rizsnövényeken elvégzett nagyszabású teljes genom szekvenálása azt mutatta, hogy önmagában a növényi szövettenyésztés eredményezhet nagyszámú off-target mutációt (Tanget al. 2018). A szövettenyésztés és az *Agrobacterium*mal történő transzformáció által spontán előidézett nukleotidcserék gyakorisága megegyezik a CRISPR / Cas9 vagy a Cpf1 technológiák által indukált mutációk számával. Ezek a rizs adatok hangsúlyozzák a genomszerkesztési technikák kidolgozásának és továbbfejlesztésének szükségességét.

Összefoglalva, mind a bemutatott fenotípusok, mind az Ion Torrent szekvenálási adatok alátámasztják egy olyan genomszerkesztési protokoll lehetséges felhasználását, amely mutagén oligonukleotid molekulák injektálásán alapul a kukorica csíranövények merisztéma régiójába, elérve ezzel egy kiválasztott gén célzott mutációját. Ugyanakkor fontos figyelembe venni, hogy az apikális hajtásmerisztéma kezelésekkor csak néhány sejt veszi fel az oligonukleotidot, és csak korlátozott gyakorisággal történik a DNS replikációja, ami szükséges a mutációk kialakulásához. A kezelt merisztémák mindenképpen kiméráknak tekinthetők, és csak bizonyos esélye van annak, hogy a mutáns sejtek résztvesznek az ivarsejtek kialakulásában. Az itt bemutatott kísérleti eredmények valószínűsítik a mutációk bekövetkezését, de a klorofill marker nem alkalmas szelekciós nyomás alkalmazására, így a mutáns sejtek feldúsítására. Ezért a metodika további fejlesztése során ki kell dolgoznunk, miként érhető el a mutáns sejtek szelektív előnye. Ebben a törekvésben valószínűleg szükséges lesz egy *in vitro* lépés beiktatása.

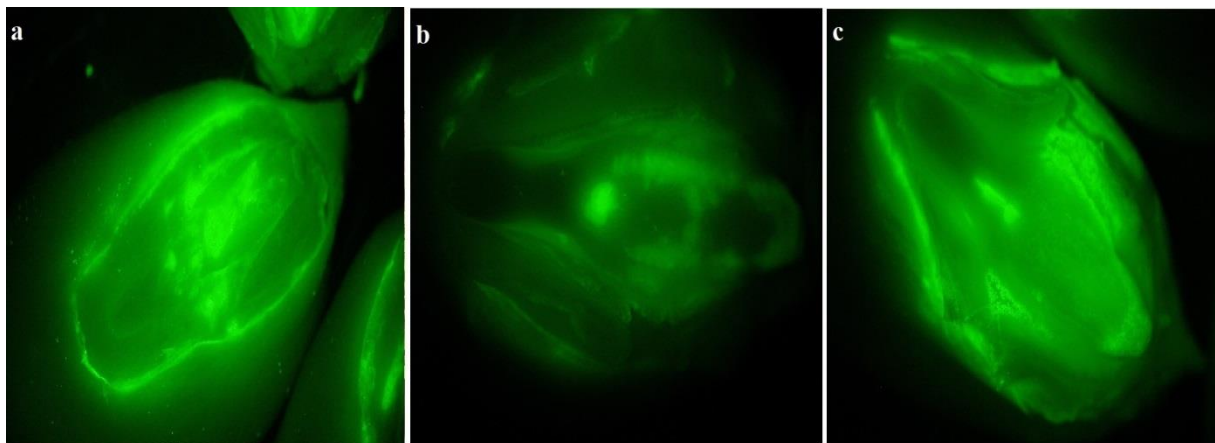
Ezt követően ennek a megközelítésnek a funkcionalitását megvizsgáljuk diploid genotípusokkal, majd megfigyeljük a tulajdonságok öntermékenyítés során történő öröklődését F1 generációkban.

4.3. A fitoén deszaturáz (PDS) kukoricagén irányított mutagenézise a csírázó (primed) kukoricaszemek embrióinak oligonukleotid molekulákkal történő kezelésével

Kiindulva egy amerikai szabadalomból (INTRODUCING DNA INTO PLANT CELLS US 8,975.470 B2, Mar. 10, 2015), amely igazolta, hogy idegen DNS felvetethető előcsíráztatott „primed” szemekkel, indokoltnak láttuk ezt a módszert az oligonukleotidfelvétel esetében tesztelni. Az Anyag és Módszer részben leírt protokollt követve több független kísérletet végeztünk.

4.3.1. 5- FAM-jelölt oligonukleotidok kimutatása nyugalmi állapotú embriókban

A primed seed-es kezelések előkísérlete képpen a merisztéma injektálásához hasonlóan itt is lemodelleztük a kezelésünket nem specifikus 5-FAM-al jelölt oligonukleotidok használatával. A folyamat végén arra voltunk kíváncsiak, felveszi-e az érett embrió az oligonukleotidokat olyan régiókba, amiből a későbbiekben akár generatív szövet is fejlődhet.



21. ábra - 5- FAM – jelölt oligonukleotidokkal kezelt, érett kukoricaszemek

A 21. ábrán jól látszik, hogy mind az (a), (b) és (c) esetben is jelentős oligonukleotid felhalmozódást detektálhattunk az embrió minden területén, így feltételezhető a mutációt hordozó oligonukleotidok beépülése esetén a generatív szövetben történő editálás.

4.3.2. Albínó szegregánsok megjelenése duzzasztott kukoricaszemek oligokezelését követő M2 generációban, a PDS gén szekvencia analízise

A Kiskun Kft. LP5 jelű beltenyésztett vonalának szemeit éjszakai duzzasztást követően 50 µl 50 µM vízben oldott szensz PDS szekvencia régiót képviselő oligonukleotiddal kezeltük, amelynek szintézisekor PTO védő kötés került kialakításra (P/I kísérlet). A kiültetett szemekből három növényt tudunk felnevelni, amelyeken önbeporzást lehetett végezni. Ezek utódai között egy esetben hasadtak ki albínó csíranövények (3. táblázat).

Kísérlet	Kezelt	Csírázott	Beporzott	Elvetett	Kikelt	
					Zöld	Fehér
P/I	12	10	3	93	86	-
				104	96	19
				105	102	-
Összesen				302	284	19
Veszteség		-17%	-70%			-2%

3. táblázat – A P/I-es kísérlet statisztikai analízise

A kísérletben felhasznált kezelt magszám 12. A csírázás során 2 db szem nem csírázott ki, ami a kevés mintára való tekintettel 17%-os veszteséget jelent. A kiültetett 10 növényből összesen 3-at sikerült beporoznunk, ami az állományunk 70%-os csökkenését jelentette. A learatott 3 növény összesen 302 db magot hozott utódgenerációként, melynek 98%-a ki is kelt az M2 generáció vizsgálata során. A kiindulási anyag és az albínó növények arányát tekintve a hatékonyság 8,3 százalék. Ez megfelelő érték lenne abban az esetben, ha azt vesszük figyelembe, hogy csupán egy mutáns növény is elég a nemesítési munka sikeres folytatásához a beltenyésztett vonal felszaporításához. Egyetlen egy generáció alatt a kiindulási génállomány, jelentős módosítása nélkül fixálnánk egy célzott pontmutációt a genomban.



22. ábra – Albínó fenotípus az M2 utódgenerációban

Az egyetlen mutációt hordozó növény utódait tekintve a tapasztalt fenotípus arány (19 albínó/96 vad, zöld növény) alacsonyabb, mint egy heterózígóta, recesszív mutáns, önbeporzott növény utódgenerációja esetében elvárható. Feltételezhető, hogy a kezelésből származó növény mozaikos szöveti állománnyal rendelkezhetett. Amit biztosra tudunk, hogy 19 darab hófehér növényt találtunk az utódgenerációban, ami tökéletesen megfelel a 100%-ban homozigóta ZmPDS mutáns kukorica növények fenotípusának. A hatékonyságot jelen esetben nem sejt szinten, hanem növény szinten kell vizsgálnunk.

Az albínó szegregánsokból izolált DNS-t használva a 4. táblázatban közölt szekvencia adatok adatai azt mutatják, hogy ezekben a mutáns növényekben nem azonosítható a PDS génben a tervezett stop kodon. Fontos annak hangsúlyozása, hogy olyan primer párral (zöld szakasz) végzett amplifikációból származnak, amelyek az SDO szekvenciát (sárga szakasz) is tartalmazó azonos terméket eredményeznek mindkét génvariáns esetében (20. ábra). Nyilvánvalóan lehetséges, hogy egy teljesen független spontán mutáció következett be, bármely a pigmentszintézisben szerepet játszó génben. Ejjthettünk hibát a szekvenálás során is, illetve okozhattunk off-target mutációt, amely elrontotta valamely klorofill szintézisben szerepet játszó gén működését. Tapasztalatainkból kiindulva rendkívül kicsi a valószínűsége, hogy a célzott fenotípus pont az M2 generációban alakuljon ki tekintettel arra, hogy szerteágazó egyéb kísérleteink során, amelyeket csíranövényekkel végeztünk sosem

eredményeztek hasonló fenotípust. Mivel az albínó jelenség kialakulásában számos gén játszik szerepet, amelyek inaktiválódhattak spontán vagy indukált módon, valamint a referencia genom és az általunk használt genotípus génállománya között jelentős eltérés lehet. Az albínó növények eredetének tisztázása érdekében további vizsgálatok vannak folyamatban.

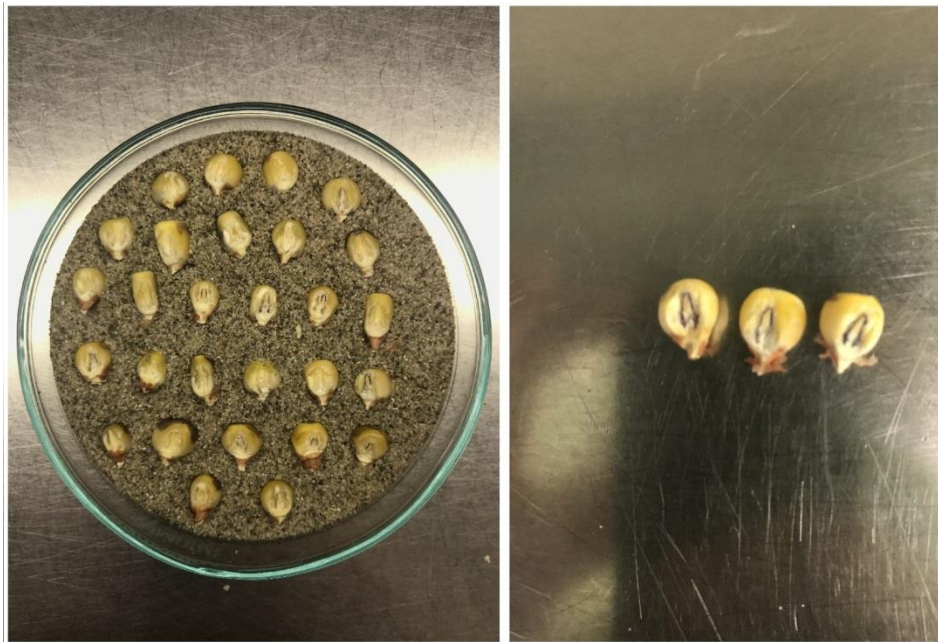
NGS jelölés	Minta jelölés	STOP mutáció helye	Total reads of 236. bp	GCA/ACA eltérés helye
BC_84	A 1	Reference: C. Reads: A (96), C (54833), G (12), T (16)	54957	Reference: A. Reads: - (1548), A (17074) , C (2), G (34655) , T (1730)
	fehér	TAG mutáció: 16	0,029%	Double mutations:
BC_85	A 2	Reference: C. Reads: A (109), C (60592), G (11), T (15)	60727	Reference: A. Reads: - (1618), A (17696) , C (4), G (39510) , T (1946)
	fehér	TAG mutáció: 15	0,025%	Double mutations:
BC_88	A 3	Reference: C. Reads: A (117), C (53253), G (15), T (9)	53394	Reference: A. Reads: - (1585), A (15030) , C (3), G (35005) , T (1823)
	fehér	TAG mutáció: 9	0,017%	Double mutations:

4. táblázat - A klorofill hiányos szegregánsokból izolált DNS-el végzett szekvencia analízis igen alacsony gyakorisággal igazolta a PDS génben a stop kodon kialakulását

4.3.3. A „primed seed” módszer további variációinak tesztelése nem vezetett a PDS gén irányított mutációjához

A minták előkészítése során nagyon fontos volt a feltárandó embriók fizikai sérüléstől való megóvása. Mivel a szárítás után a magok újra kemény, kompakt fizikai állapotot vettek fel, a 1.5-2 mm-es törékeny embriók körül nagy erő kifejtést kellett alkalmazni a szöveti állomány eltávolításához. A folyamatot szabad kézzel végeztük lándzsa segítségével. Az oldat felvitele

4 órát vett igénybe, mert a szemeknek 2 órára volt szüksége ahhoz, hogy beszívják az 50 µl oldatot. Összesen 100 embriót kezeltünk.



23. ábra – Preparált, érett embriók a cseppentés megkezdése előtt

100 preparált embriót öt részre osztottuk, és mind az öt ismétlést különböző kémiai tulajdonságú oligóval kezeltük. Egyik ismétlés sem egyezett meg 100%-ban a P/I- es kísérlet paramétereivel.

Az oligo szekvencia alap bázissorrendje:

5'- G AAT ATT ACT GGA GCT AGC TAG ACA AGA TCT TTT GCG GGC C -3'

Kísérlet	Minták száma	Szekvencia	Kötések	Oldat
P/II	12	szensz	natív	szacharóz
P/III	12	szensz	PTO	szacharóz
P/IV	12	antiszensz	natív	szacharóz
P/V	32	antiszensz	MOE	szacharóz
P/VI	32	szensz	MOE	szacharóz
P/I	12	szensz	PTO	víz

5. táblázat – A kísérletek során felhasznált oldatok tulajdonságainak összefoglalása

A kezelést követően a magokat éjszaka nedves szűrőpapíron csíráztattuk tovább majd másnap kiültettük azokat. A kísérlet során 100 kezelt embrióból 83 csírázott ki, ami 17 %-os veszteséget jelent, a kiültetett 83 növényből 72-öt tudunk sikeresen beporozni, ez további 14 %-os veszteségi mutató. Az M2 generációban összesen elvetett 9323 szem 90 %-a kelt ki, ami megfelelő csírázási aránynak tekinthető.

Kísérlet	Kezelt	Csírázott	Beporzott	Elvetett	Kikelt	
					Zöld	Fehér
P/II	12	8	7	111	103	-
				176	145	-
				286	261	-
				112	103	-
				102	99	-
				165	148	-
				112	105	-
P/III	12	12	10	306	254	-
				198	178	-
				79	66	-
				315	261	-
				96	83	-
				52	46	-
				172	169	-
				9	3	-
				84	79	-
P/IV	12	8	8	68	56	-
				46	42	-
				112	108	-
				142	131	-
				74	72	-
				66	61	-
				142	135	-
				26	21	-
P/V	32	27	24	63	52	-
				45	42	-
				26	24	-
				165	141	-
				383	336	-
				92	67	-
				126	104	-
				156	121	-
				427	365	-
176	165	-				

				234	196	-
				96	85	-
				154	143	-
				75	67	-
				79	71	-
				21	13	-
				312	256	-
				325	301	-
				52	46	-
				111	97	-
				32	23	-
				72	67	-
				129	124	-
				171	163	-
				52	44	-
				346	321	-
				64	56	-
				92	88	-
				85	74	-
				106	96	-
				36	32	-
				111	108	-
				70	69	-
				131	120	-
				82	76	-
				174	163	-
				49	46	-
				101	98	-
				91	82	-
				85	78	-
				79	65	-
				46	41	-
				73	67	-
				115	112	-
				261	234	-
				342	320	-
				123	113	-
Összesen	100	83	72	9323	8475	
Veszteség		-17%	-14%			-10%

6. táblázat – A sikertelen editálási kísérletek statisztikai analízise

A 6. összesítő táblázat adatai alapján ez a módszer nem vezetett klorotikus mutánsok megjelenéséhez az M2 generációban. Ez a megfigyelés nem igazolja a plazmid DNS -sel végzett kísérletek tapasztalatait. Az amerikai szabadalom (INTRODUCING DNA INTO PLANT

CELLS US 8,975.470 B2, Mar. 10, 2015) arról számol be, hogy „seed priming” során DNS vektor sejtekbe történő felvétele megtörténhet. A két rendszer közötti lényeges eltérés, hogy a mi kísérleteinkben SDO molekulák felvételét vizsgáltuk, míg a szabadalomban vírus-alapú vektort használtak.

4.4. A fitoén deszaturáz (PDS) kukoricagén irányított mutagenézise a pollentömlőn keresztül végzett szintetikus oligonukleotid felvétellel

Mint Song et al. (2007) és Ajsad et al. (2015) összefoglaló tanulmányaikban bemutatják, lehetséges a kukorica genetikai transzformációja a pollentömlő DNS kezelésével. Ezt a megfigyelést vettük alapul, amikor szintetikus oligonukleotid molekulákkal kezeltük a kukorica pollentömlőket.

4.4.1. Tenyészkerti növények csöveinek visszavágása a virágzást megelőzően és módosított, szintetikus oligonukleotidokkal történő kezelése

A 12 órája beporzott csöveket kétféle képpen metszettük vissza horizontálisan. H1 „felül” a cső végétől 3-4 centiméterre és H2 „alul” a cső végétől 10-13 centiméterre. Ezen variációkban az oligonukleotid pollentömlőn keresztül megtett útját próbáltuk csökkenteni. A 12 órával hamarabb bibére juttatott pollenszemek, a bibék szöveti állományában egészen az embriózsákig tömlőt hajtottak. Ezen járatok hivatottak az oligonukleotidok transzportjára a zigóta felé. 300 µl oldattal történő kezelés után ismét megporoztuk a csövet, feltételezve, hogy az új pollenszemek ismét letolhatják a bibék felszínére juttatott oligonukleotidokat.



24. ábra – Visszavágot kukoricacső pollentömlő kezelése

4.4.2. A learatott szemekből nevelt növények önbeporzása, és M2 nemzedékben a kukorica csiranövények fenotípusos értékelése

Összesen 16 csövet kezeltünk ebben a kísérletben, amiből 15-öt le is tudtunk aratni. A leszedett csövekből 2 946 magot vetettünk el. Az M2 generáció P/VIII/22 számú csövön 145 db szem volt, amelyből 1 db albínó fenotípust mutatott. Mivel az editálásnak korai embrió szakaszban meg kellett történnie, feltételezhetjük, hogy az editált növénynek jelentős mozaikosságot kellene mutatnia. A fehér növények száma mégis 1 db, amely hatékonyságban a kiindulási kezelt csövek és az albínó utódokat mutató csövek arányát tekintve 6,2 %-ot jelent. Mivel ez az egy növény is erősen degenerált, feltételezhetjük, hogy az editálás egy vitalitást befolyásoló régióban jött létre. Továbbá fontos megjegyezni, hogy ezen kísérletben a vetés után kikelt magok száma sokkal alacsonyabb, mint a primed seedes kísérletben. A vetés után a magok 75 %-a kelt ki. Ebből a jelenségből feltételezhetjük, hogy a pozitív sikeresen editált esetben az amúgy is csökkent vigorral rendelkező magok, ha voltak még a populációban, akkor a ki nem csírázott 25 %-hoz tartoztak.



25. ábra – Az M2 generációban a P/VIII/22-es csövön detektált albínó csíranövény

4.4.3. A klorofill hiányos szegregánsokból izolált DNS szekvencia analízise

A klorofill szintézisben közreműködő gének csoportja rendkívül szerteágazó. Előkísérleteink során feltérképeztük és összevetettük az oligonukleotid homológiáit a B73 referencia genommal, lényegi off-target mutációs lehetőségeket nem találtunk. A pollentömlőn keresztül végzett harmadik genomszerkesztési technika albínó fenotípussal rendelkező növényének genetikai állománya sem tartalmazta a kívánt mutációs párt a szekvenálási adatok alapján. A negatív szekvenálási adatoktól eltekintve az albínó fenotípus okozója mindenképpen genom eredetű változás, melynek felkutatása és jellemzése hosszú kutatómunka eredménye lehet. A B73-as referencia genom és a kísérletekhez használt Lp5-ös beltenyésztett vonal genom különbségeit a legpontosabban teljes genom szekvenálással tudjuk megállapítani. A művelet elvégzése után újra össze kell hasonlítanunk az általunk használt oligonukleotiddal homológ szekvenciákat a teljes genom szintjén, majd kiszűrni a fotoszintézisben szereplő összes génszakaszt. Szántóföldi növényeinkben a rohamosan fejlődő genetika tudományából adódóan az ismert fotoszintézist befolyásoló szekvenciák száma folyamatosan változik, bővül, ami szintén megnehezíti a kutatómunkát. További lehetőségként merül fel, hogy az általunk használt oligonukleotid a recipiens genom homológ

szekvenciájához történt teljes vagy részleges kapcsolódása után a környező, közeli genomi régiókban indukálhat mutációt. Az ilyen természetű mutációkat okozhatja genomi konformációváltozás vagy egyéb transzkripciós faktorok, esetleg repair mechanizmusok egyéni vagy összetett működése. Harmadik gondolat kísérletként számolnunk kell azzal a lehetőséggel is, hogy a kezeléshez használt oligó oldatunk, minden esetben tartalmazhat a teljes szekvencia darabjait képző, különböző hosszúságú töredékeket. A legkisebb lehetőség maga a kodon, melynek kevésbé génspecifikus mutációt indukáló képességei jelentősen befolyásolhatják a kísérletünk eredményeit. Ezeket a felmerülő kérdéseket egy kezeletlen Lp5-ös növény és egy albínó Lp5-ös növény teljes genomszekvenálást követő pontos összehasonlítása válaszolhatja meg. A tudomány teljes racionalitását zárojelbe téve kijelenthető, hogy a teljes genomszekvenálás sem kétséget kizáróan garantálja a klorofill mutációk genetikai hátterének tisztázását. A genom egy élő, mozgó, folyamatosan változó molekuláris halmaz, ami alól a kukorica genetikai állománya sem kivétel. A legfontosabb szántóföldi növényünk genetikai állománya 10 kromoszómán 32 000 gént, 2,3 milliárd bázispárt tartalmaz. Ezen tulajdonságai alapján a nagyobb, összetettebb genomok közé sorolandó. A kukorica genom átlagon fölüli autonóm változási képességének leírásáért Barbara McClintock 1983-ban Nobel-díjban részesült. Figyelembe véve a modell növényünk genetikai tulajdonságait, és visszatekintve arra a tényre, hogy jelen kutatásban egyetlen bázispár mutációját szeretnénk feltérképezni a genomban, kijelenthetjük, hogy hosszú, alapos és átfogó kutatások várnak még ránk a jövőben.

5. Összefoglalás

A dihaploid (DH) technológia alapvető eleme a beltenyésztett vonalak előállításának egy versenyképes nemesítési programban. Az R1-navajo (R1-nj) gén olyan fenotípusos markert kódol, amely csak változó hatékonysággal rendelkezik a színszelekció során történő haploid mag kiválasztásakor. Ezért a magyar genetikai állományon alapuló jelen tanulmányban a fenotípusos szűrést és a genom méretének meghatározását flow-citometriával kombináltuk. Három genotípussal végzett reprezentatív kísérletben a gyökércsúcsokból izolált sejtmagok flow-citometriás elemzésével megerősítették, hogy a fenotípusos marker alapján előszelektált magoknak csak 59% -a bizonyult haploidnak. Alternatív megközelítésként az R1-navajo markerrel előre kiválasztott csiranövényeket genotipizáltuk úgy, hogy az UMC1152 SSR marker polimorf volt a K405 haploid indukáló vonal, illetve a K4390 hibrid szülői vonalai között. A haploid jelöltek 83% -ában a K405 allélokot nem lehetett kimutatni ezzel a markerrel. Ezeket a növényeket 0,1% kolchicin-oldattal rediploidizáltuk. Ezt az eljárást 3%-os hatékonysággal végeztük el, a rediploidizáció eredményességét a virágzó növények mutatták. Az európai genotípusokon végzett kísérletek eredményét később összevetettük a trópusi genotípusokról publikált adatokkal.

A növényekben a szintetikus oligonukleotidokkal megvalósított célzott nukleotidcsere jelenleg alkalmazott módszerei az *in vitro* szövetenyésztési rendszerektől függenek. Ebben a tanulmányban bemutattunk egy alternatívát *in planta* technológia alkalmazásával, amelynek alapja oligonukleotid oldat injektálása a haploid kukorica csiranövények apikális merisztéma régiójába. Egy specifikus mutáció indukálása a klorofill bioszintézis fitoén deszaturáz génjébe fenotípusos markerként szolgált. További alternatív megközelítésként vizsgáltuk az előcsíráztatott embriók oligonukleotid felvételét. Az M2 generációban végzett fenotipizálás nem tárt fel klorotikus mutánsokat. A pollentömlőn keresztül történő transzformáció lehetőségét is tanulmányoztuk. Valamennyi tesztelt *in planta* módszer kis hatékonyságúnak bizonyult, ezért további intenzív kutatásra van szükség ahhoz, hogy ONIM módszer bekerüljön a kukoricanevelők eszköztárába. Miközben a célzott mutagenézissel történő precíziós nemesítés eredményei egyre meggyőzőbbek, és az új fajták termesztés közelben vannak, nincs egységes rendszere a szabályozás mikéntjének. Lényeges különbségek vannak a genomszerkesztési kutatások intenzitásában. A közlemények alapján az Egyesült Államok és Kína van vezető pozícióban.

Ami az engedélyezési szabályokat illeti, az USA és Japán a genomszerkesztésből származó szervezeteket hagyományos nemesítési termékeknek tekinti, tehát legfeljebb hatósági konzultáció szükséges. A kanadai rendszer „új tulajdonságú növényekként” definiálja az ilyen tenyésztéseket, és az engedélyezés során nem a nemesítés módszere szerint, hanem a tulajdonságokra tekintettel mérlegelnek. Szakmailag messze ez a megközelítés a legkorrektebb, ami a biztonságot is garantálja. Több országban, mint Argentína, Izrael, Chile, Brazília, Kolumbia, eseti értékelést végeznek. Nem tekintik GM szervezetnek, ha nem tartalmaz idegen DNS-t, illetve új kombinációját a genetikai anyagnak. A precíziós nemesítés térhódítása kitűnő lehetőséget kínál arra, hogy az EU-ban a termék minősítésére alapozzák a szabályozási rendszert, és ne az alkalmazott nemesítési módszer szerint történjen az egyes termékek engedélyezése. A magyar agráriumban először társadalmi konszenzusra van szükség a technológiát illetően. Jelenleg a magyar társadalom jelentős része nem rendelkezik megfelelő mennyiségű információval a precíziós nemesítésről. Ebből kifolyólag nincs lehetősége véleményt formálni. A jogalkotóknak, a környezetvédőknek és a nemesítőknek közös társadalmi felelősségük, hogy szilárd szakmai tényeken alapuló viták során feltárják a jövőbe mutató módszerek tulajdonságait. Biztosítani kell a biztonsággaranciákat, a fenntarthatóságot, és a magyar gazdák számára a XXI. századi növénytermesztés gazdaságosságát, versenyképességét és az innovatív technológiák alkalmazhatóságát. A Szegedi Biológiai Kutatóközpont és a Pannon Genetik Kft. elhivatott abban, hogy aktív szerepet vállaljon a technológiák fejlesztésében, és kizárólag laboratóriumi körülmények közötti értékelésében. Továbbá kidolgozza, és felvértezza a magyar nemesítő és biotechnológus társadalmat a XXI. század legversenyképesebb nemesítési módszereinek gyakorlati tudásával. Nemzeti érdekünk, hogy a célszerű és indokolt pozitív szabályozási feltételek lefektetése után, a magyar gazdák a lehető legrövidebb időn belül már kiforrott jól működő technológiák eredményét tesztelhesék a szántóföldön. A magyar vetőmagpiac 90%-át a külföldi vállalatok uralják kétségen kívül kiváló termékekkel. Ez az arány azonban hosszútávon végzetes lehet a hazai vetőmag szektor számára. Minden évben 100 milliárd forint nagyságrendű profit hagyja el az országot, amelynek csökkentése és a magyar agráriumba történő befektetése nemzeti érdek. Ennek a folyamatnak a pozitív irányba történő elmozdításához szakmai és társadalmi összefogásra van szükség. A hazai nemesítőházak kiváló hibridekkel és genetikai állománnyal rendelkeznek, ám a jelenleginél sokkal nagyobb és széleskörűbb szakmai összefogásra van szükség a valós potenciál kihasználásához.

Summary

Dihaploid (DH) technology is an essential element during the production of inbred lines in a competitive breeding program. The R1-navajo (R1-nj) gene encodes a phenotypic marker that has only variable efficiency in the selection of haploid nuclei during color selection. Therefore, in the present study based on the Hungarian genetic stocks, we combined phenotypic screening and genome size determination with flow cytometry. In a representative experiment with three genotypes, flow cytometric analysis of nuclei isolated from root tips confirmed that only 59% of the seeds preselected based on the phenotypic marker proved to be haploid. Alternatively, seedlings preselected with the R1-navajo marker were genotyped so that the UMC1152 SSR marker was polymorphic between the K405 haploid induction line and the K4390 hybrid parental lines. In 83% of haploid candidates, K405 alleles could not be detected with this marker. These plants were rediploidated with 0.1% colchicine solution. This procedure was performed with an efficiency of 3%, the effectiveness of rediploidization was shown by flowering plants. The results of experiments on European genotypes were later compared with published data on tropical genotypes.

The currently used methods for targeted nucleotide exchange with synthetic oligonucleotides in plants depend on *in vitro* tissue culture systems. In this study, we presented an alternative using *in planta* technology based on the injection of oligonucleotide solution into the apical meristem region of haploid maize seedlings. Induction of a specific mutation in the phytoene desaturase gene of chlorophyll biosynthesis served as a phenotypic marker. Sequencing confirmed the presence of low number mutant cells in addition to the wild-type cell populations in leaf tissues. As further alternatives we have tested the oligonucleotide treatment of primed seeds or pollen tubes. These approaches failed to give mutation in the PDS gene of maize. Further extensive research is required for integration of ODM technology into a practical breeding program.

While the results of precision breeding by targeted mutagenesis are becoming more convincing and new varieties are close to cultivation, there is no uniform system for how to regulate. There are significant differences in the intensity of genome editing research. According to reports, the United States and China are in a leading position. As far as licensing rules are concerned, the US and Japan consider genomic engineering organisms to be traditional breeding products, so no more than official consultation is required. The Canadian

system defines such breeding materials as “plants with new traits” and is considered in the licensing not on the basis of the breeding method but on the basis of traits. Professionally, this approach is by far the most correct, which also guarantees safety. In several countries, such as Argentina, Israel, Chile, Brazil, Colombia, ad hoc evaluations are carried out. They are not considered GM if they do not contain foreign DNA or a new combination of genetic material. The proliferation of precision breeding offers an excellent opportunity to base the regulatory system in the EU on product qualification and not on the authorization of individual products according to the breeding method used. For the first time in Hungarian agriculture, a social consensus is needed regarding technology. At present, a significant part of the Hungarian society does not have a sufficient amount of information about precision breeding. As a result, you do not have the opportunity to form an opinion. Legislators, environmentalists and breeders have a shared social responsibility to explore the properties of forward-looking methods in debates based on solid professional facts. Guarantees of safety, sustainability must be ensured, and for Hungarian farmers, the XXI. the economy, competitiveness and applicability of innovative technologies. The Szeged Biological Research Center and Pannon Genetik Kft. Are committed to taking an active role in the development of technologies and in their evaluation exclusively under laboratory conditions. Furthermore, it develops and equips the Hungarian breeding and biotechnology society in the 21st century. practical knowledge of the most competitive breeding methods of the 20th century. It is in our national interest that, after laying down the appropriate and justified positive regulatory conditions, Hungarian farmers can test the results of well-functioning technologies that have already matured in the field as soon as possible. 90% of the Hungarian seed market is undoubtedly dominated by foreign companies with their excellent products. However, this ratio could be fatal in the long run for the domestic seed sector. Every year, a profit of HUF 100 billion leaves the country, the reduction of which and its investment in Hungarian agriculture is in the national interest. Professional and social cooperation is needed to move this process in a positive direction. Domestic breeding houses have excellent hybrids and genetic stock, but much larger and more extensive professional collaboration is needed than at present to exploit the real potential.

Irodalomjegyzék

Asjad A, Sun W. B., Sang-Min C, Jack E. S. (2015) Plant Transformation via Pollen Tube-Mediated Gene Transfer. *Plant Mol Biol Rep* 33:742–747

Armstrong CL, Green CE, Phillips RL (1991) Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genet Coop Newsl*, vol 65.

Baskaran P, Dasgupta I (2012) Gene delivery using microinjection of agrobacterium to embryonic shoot apical meristem of elite indica rice cultivars. *J Plant Biochem Biot* 21 (2):268-274. doi:10.1007/s13562-011-0078-x

Baskaran P, Soos V, Balazs E, Van Staden J (2016) Shoot apical meristem injection: A novel and efficient method to obtain transformed cucumber plants. *S Afr J Bot* 103:210-215. doi:10.1016/j.sajb.2015.09.006

Battistelli G. M., R.G. Von Pinho, A. Justus, E.G.O. Couto and M. Balestre (2013), Production and identification of doubled haploids in tropical maize. *Genetics and Molecular Research* 12 (4): 4230-4242.

Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD (1999) A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *P Natl Acad Sci USA* 96 (15):8774-8778. doi: DOI 10.1073/pnas.96.15.8774

Belicuas P.R., C. T. Guimarães, L. V. Paiva, J. M. Duarte, W. R. Maluf and E. Paiva (2007) Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids *Euphytica* 156: 95–102. DOI 10.1007/s10681-007-9356-z

Chaikam V. and G. Mahuku, (2012) Chromosome doubling of maternal haploids In: B.M. Prasanna, Chaikam V and Mahuku G (eds) *Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice*. CIMMYT, Mexico, DF, pp 24–29.

Chaikam V., and B. M. Prasanna (2012) Maternal haploid detection using anthocyanin markers. In: Prasanna BM, Chaikam V, and Mahuku G (eds) *Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice*. CIMMYT, Mexico, DF, 20–23.

Chaikam V., L. A. Lopez, L. Martinez, J. Burgueno and P. M. Boddupalli (2017) Identification of in vivo induced maternal haploids in maize using seedling traits *Euphytica*.177. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1968-3>.

Chaikam V., S.K. Nair, R. Babu, L. Martinez, J. Tejomurtula and P.M. Boddupalli (2015) Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. *Theor Appl Genet* 128: 159–171

Chaikam V., W. Molenaar, A.E. Melchinger, and P.M. Boddupalli, (2019) Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theor. Appl. Genet.*132(12) 3227-3243. doi: 10.1007/s00122-019-03433.

Chase S. S and D. K. Nanda (1956) Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 5: 275-276.

Chen C, Zijian X, Junwen Z, Wei L, Jinlong L, Chenxu L * and Shaojiang C * (2020) Development of In Vivo Haploid Inducer Lines for Screening Haploid Immature Embryos in Maize Plants 2020, 9, 739; doi:10.3390/plants9060739

Choe E., C.H. Carbonero, K. Mulvaney, A. L. Rayburn and R. H. Mumm (2012) Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. *Plant Breed* 131: 399–401.

Coe E.H. (1959) A line of maize with high haploid frequency, *Am Nat* 93: 381–382.

Dang N.C., M. Munsch, I. Aulinger, W. Renlai and P. Stamp (2012) Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 183: 9 153-160.

De Oliveira Couto E.G., E.V. Resende Von Pinho, R.G. Von Pinho, A.D. Veiga, M.R. de Carvalho, F. de Oliveira Bustamante and M.S. Nascimento (2015) Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize *Genetics and molecular research* 14(2): 6999-7007.

- Dinc E, Toth SZ, Schansker G, Ayaydin F, Kovacs L, Dudits D, Garab G, Bottka S (2011) Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides to Transiently Suppress Different Nucleus- and Chloroplast-Encoded Proteins of Higher Plant Chloroplasts. *Plant Physiol* 157 (4):1628-1641. doi:10.1104/pp.111.185462
- Dong C, Beetham P, Vincent K, Sharp P (2006) Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Rep* 25 (5):457-465. doi:10.1007/s00299-005-0098-x
- Doyle JJ (1990) Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus* 12:13-15
- Dudits D., K. Török, A. Cseri, K. Paul, A. V.Nagy, B. Nagy, L. Sass, Gy. Ferenc, R. Vankova and P. Dobrev et al. (2016) Response of organ structure and physiology to autotetraploidization in early development of energy willow. *Plant Physiology*, 170. 1504–1523 DOI:10.1104/pp.15.01679
- Dwivedi SL₁, Britt AB₂, Tripathi L₃, Sharma S₁, Upadhyaya HD₄, Ortiz R₅. (2015) Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol Adv.* 2015 Nov 1;33(6 Pt 1):812-29. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001. Epub 2015 Jul 9.
- Evans DA (1989) Somaclonal Variation - Genetic-Basis and Breeding Applications. *Trends Genet* 5 (2):46-50. doi:Doi 10.1016/0168-9525(89)90021-8
- Fodor E, Ayaydin F (2018) Fluorescent Probes and Live Imaging of Plant Cells. In: Sánchez-Moreiras AM, Reigosa MJ (eds) *Advances in Plant Ecophysiology Techniques*. Springer International Publishing, Cham, pp 241-251. doi:10.1007/978-3-319-93233-0_14
- Gocal GF (2015) Non-Transgenic Trait Development in Crop Plants Using Oligo-Directed Mutagenesis: Cibus ' Rapid Trait Development System. In: NABC Report 26 New DNA-Editing Approaches Methods, Applications and Policy for Agriculture. North American Agricultural Biotechnology Council Report, pp 97-105
- Grimsley NH, Ramos C, Hein T, Hohn B (1988) Meristematic Tissues of Maize Plants Are Most Susceptible to Agroinfection with Maize Streak Virus. *Bio-Technol* 6 (2):185-189. doi:DOI 10.1038/nbt0288-185

Guo T₁, Li H, Yan J, Tang J, Li J, Zhang Z, Zhang L, Wang J. (2013) Performance prediction of F1 hybrids between recombinant inbred lines derived from two elite maize inbred lines. *Theor Appl Genet.* 2013 Jan;126(1):189-201. doi: 10.1007/s00122-012-1973-9. Epub 2012 Sep 13.

Hu H., T. A. Schrag, R. Peis, S. Unterseer, W. Schipprack, S. Chen, J. Lai, J. Yan, B. M. Prasanna and S. K. Nair et al. (2016), The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. *Genetics* 202, 1267–1276.

Jaganathan D, Ramasamy K, Sellamuthu G, Jayabalan S, Venkataraman G (2018) CRISPR for Crop Improvement: An Update Review. *Front Plant Sci* 9:985. doi:10.3389/fpls.2018.00985

Jia HG, Wang N (2014) Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA. *Plos One* 9 (4). doi: ARTN e9380610.1371/journal.pone.0093806

Kim H, Kim JS (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 15 (5):321-334. doi:10.1038/nrg3686

Kochevenko A, Willmitzer L (2003) Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiol* 132 (1):174-184. doi:10.1104/pp.102.016857

Liao FL, Wang L, Yang LB, Zhang LY, Peng XB, Sun MX (2013) Antisense Oligodeoxynucleotide Inhibition as an Alternative and Convenient Method for Gene Function Analysis in Pollen Tubes. *Plos One* 8 (3). doi: ARTN e5911210.1371/journal.pone.0059112

Lusardi MC, Neuhausurl G, Potrykus I, Neuhaus G (1994) An Approach Towards Genetically-Engineered Cell Fate Mapping in Maize Using the Lc Gene as a Visible Marker - Transactivation Capacity of Lc Vectors in Differentiated Maize Cells and Microinjection of Lc Vectors into Somatic Embryos and Shoot Apical Meristems. *Plant J* 5 (4):571-582

Melchinger A. E., W. Schipprack, T. Würschum, S. Chen and F. Technow (2013) Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. *Sci Rep* 3: 2129.

Melchinger A.E., W. Schipprack, X. Mi and V. Mirdita (2015) Oil Content is Superior to Oil Mass for Identification of Haploid Seeds in Maize Produced with High-Oil Inducers, *Crop Science*, vol. 55, 188-195.

Milani K.F., A. G. Baleroni, H. A. Silva, A. B. Mendes-Bonato, R. J. B. Pinto and C. A. Scapim (2016) Effectiveness of the *RI-navajo* embryo marker on sorting haploids in tropical maize germplasm *Maydica* electronic publication – 61 ~ M34.

Mizuta Y, Higashiyama T (2014) Antisense gene inhibition by phosphorothioate antisense oligonucleotide in *Arabidopsis* pollen tubes. *Plant J* 78 (3):516-526. doi:10.1111/tpj.12461

Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K, Yamamoto T, Osakabe Y (2016) Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep-Uk* 6. doi: ARTN 3148110.1038/srep31481

Odipio J, Alicai T, Ingelbrecht I, Nusinow DA, Bart R, Taylor NJ (2017) Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing of Phytoene desaturase in Cassava. *Frontiers in Plant Science* 8. doi: ARTN 178010.3389/fpls.2017.01780

Okuzaki A, Toriyama K (2004) Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep* 22 (7):509-512. doi:10.1007/s00299-003-0698-2

Prigge V., X. Xu, L. Li, R. Babu, S. Chen, G. N. Atlin and A. E. Melchinger (2012) New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics* 190: 781–793.

Qin GJ, Gu HY, Ma LG, Peng YB, Deng XW, Chen ZL, Qu LJ (2007) Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res* 17 (5):471-482. doi:10.1038/cr.2007.40

Rivera-Torres N, Kmiec EB (2016) Genetic spell-checking: gene editing using single-stranded DNA oligonucleotides. *Plant Biotechnol J* 14 (2):463-470. doi:10.1111/pbi.12473

Rotarenco V. A., I. H. Kirtoca and A. G. Jacota (2007) Possibility to identifying kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genet Coop Newsletter* 81: 11.

Röber F.K., G. A. Gordillo and H. H. Geiger (2005) In vivo haploid induction in maize — Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica* 50(3):275–283.

Ruiter R, van den Brande I, Stals E, Delaure S, Cornelissen M, D'Halluin K (2003) Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimeraplasty. *Plant Mol Biol* 53 (5):675-689. doi:10.1023/B:PLAN.0000019111.96107.01

Sant'A, R.R.A., Caprestano CA., Nodari RO, Agapito-Tenfen SZ, (2020) PEG-Delivered CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins System for Gene-Editing Screening of Maize Protoplasts. *Genes* 2020, 11, 1029.

Sauer NJ, Mozoruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Walker KA, Beetham PR, Schopke CR, Gocal GFW (2016) Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnol J* 14 (2):496-502. doi:10.1111/pbi.12496

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9 (7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019

Senior M.L., J.P. Murphy, M.M. Goodman and C.W. Stuber (1998) Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci.* 38. 1088– 1098.

Shehata AI H.A., Al-Ghethar and A. A. Al-Homaidan, (2009) Application of simple sequence repeat (SSR) markers for molecular diversity and heterozygosity analysis in maize inbred lines. *Saudi J Biol Sci* 16: 57-62.

Sticklen MB, Oraby HF (2005) Invited review: Shoot apical meristem: A sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cell Dev-Pl* 41 (3):187-200. doi:10.1079/Ivp2004616

Sun CX, Hoglund AS, Olsson H, Mangelsen E, Jansson C (2005) Antisense oligodeoxynucleotide inhibition as a potent strategy in plant biology: identification of SUSIBA2 as a transcriptional activator in plant sugar signalling. *Plant J* 44 (1):128-138. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02515.x

Sun CX, Ridderstrale K, Høglund AS, Larsson LG, Jansson C (2007) Sweet delivery - sugar translocators as ports of entry for antisense oligodeoxynucleotides in plant cells. *Plant J* 52 (6):1192-1198. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03287.x

Svitashev S, Young JK, Schwartz C, Gao H, Falco SC, Cigan AM (2015) Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiol* 169 (2):931-945. doi:10.1104/pp.15.00793

Tang X, Liu GQ, Zhou JP, Ren QR, You Q, Tian L, Xin XH, Zhong ZH, Liu BL, Zheng XL, Zhang DW, Malzahn A, Gong ZY, Qi YP, Zhang T, Zhang Y (2018) A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice. *Genome Biol* 19. doi:ARTN 8410.1186/s13059-018-1458-5

Timothy K, Dakota S, Xiujuan S, Guozhu T, Zhongying C, Jared C, Peter E. W, Shujie D, Julie G, Erin B, Jamie McC, Weining G, Yuejin S, Tim S, James R, Nic J. B and Qiudeng Q (2019) One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nature Biotechnology* | VOL 37 | MARCH 2019 | 287– 292 |

Tircz H, Nagy B, Ferenc G, Torok K, Nagy I, Dudits D, Ayaydin F (2018) Relaxed chromatin induced by histone deacetylase inhibitors improves the oligonucleotide-directed gene editing in plant cells. *J Plant Res* 131 (1):179-189. doi:10.1007/s10265-017-0975-8

Van Vu T_{1,2}, Sung YW₁, Kim J₁, Doan DTH₁, Tran MT₁, Kim JY_{3,4} (2019) Challenges and Perspectives in Homology-Directed Gene Targeting in Monocot Plants. *Rice (N Y)*. 2019 Dec 19;12(1):95. doi: 10.1186/s12284-019-0355-1.

Wang SH, Zhang SB, Wang WX, Xiong XY, Meng FR, Cui X (2015) Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep* 34 (9):1473-1476. doi:10.1007/s00299-015-1816-7

Waquar A. Ansari 1, Sonali U. Chandanshive 1, Vacha Bhatt 1, Altafhusain B. Nadaf 1,*, Sanskriti Vats 2, Jawahar L. Katara 3, Humira Sonah 2 and Rupesh Deshmukh 2,(2020) Genome Editing in Cereals: Approaches, Applications and Challenges *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 4040; doi:10.3390/ijms21114040

Wojtasik W, Kulma A, Boba A, Szopa J (2014) Oligonucleotide treatment causes flax beta-glucanase up-regulation via changes in gene-body methylation. *Bmc Plant Biol* 14. doi:ARTN 26110.1186/s12870-014-0261-z

Xiaoming S., Yunhong G., Guangyong Q. (2007) Application of a transformation method via the pollen-tube pathway in agriculture molecular breeding *Life Science]ournal*. 2007;4(1):77-79

Xie ZP., Sundstrom JF., Jin YK., Liu CL., Jansson C., Sun CX. (2014) A selection strategy in plant transformation based on antisense oligodeoxynucleotide inhibition. *Plant J* 77 (6):954-961. doi:10.1111/tpj.12433

Yu W. and J.A. Birchler (2016) A green fluorescent protein-engineered haploid inducer line facilitates haploid mutant screens and doubled haploid breeding in maize *Mol Breeding* 36: 1-12..doi:10.1007/s11032-015-0428-9.

Zhang Z., F. Qiu, Y. Liu, K. Ma, Z. Li and S. Xu (2008) Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* 27: 1851–1860.

Zhao X., X. Xu, H. Xie, S. Chen and W. Jin (2013) Fertilization and uniparental hromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. *Plant Physiol*. 163: 721–731.

Zhu JJ, Song N, Sun SL, Yang WL, Zhao HM, Song WB, Lai JS (2016) Efficiency and Inheritance of Targeted Mutagenesis in Maize Using CRISPR-Cas9. *J Genet Genomics* 43 (1):25-36. doi:10.1016/j.jgg.2015.10.006

Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczynski CL (2000) Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 18 (5):555-558

Zhu T, Peterson DJ, Tagliani L, St Clair G, Baszczynski CL, Bowen B (1999) Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (15):8768-8773

Rövidítések listája

C1:	colour 1 – szín 1 gén allél
C1-I:	colour 1 inhibitor - szín 1 inhibitor gén allél
CTAB:	cetil-trimetilammónium-bromid
DH:	doubled haploid – megduplázott haploid
DNS:	deoxiribonukleinsav
EU:	Európai Unió
F1:	első hibrid utódgeneráció
FAM:	Fluorescens
GFP:	green fluorescent protein – zöld fluoreszkáló fehérje
GM:	genetikailag módosított
GMO:	genetikailag módosított organizmus
gRNS:	segéd ribonukleinsav
GWAS:	genom összehasonlítási tanulmány
HDR:	homológ régiókon alapuló javítás
HIR:	haploid indukciós ráta
HPLC:	magas nyomású kromatográfia
KEMS:	Krasnodar Embryo Marker Synthetic
M1:	mutáns 1 generáció
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NGS:	új generációs szekvenálás
NHEJ:	nem homológ végeken alapuló javítás
ONIM:	oligonukleotid indukált mutagenézis
PCR:	polimeráz láncreakció

PDS:	fitoén deszaturáz
PEG:	polietilén-glükól
R1-nj:	red 1 – navajó gén allél
SAM:	hajtás apikális merisztéma
SDO:	kémiaailag szintetizált oligonukleotid
SSR:	egyszerű szekvencia ismétlések
tDNS:	transzfer dezoxiribonukleinsav
UMC1152:	rövid ismétlődő génszekvencia kukoricában
USA:	Amerikai Egyesült Államok
WTO:	Kereskedelmi Világszervezet
ZmPDS:	kukorica fitoén deszaturáz

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani, Prof. Dr. Dudits Dénesnek és Dr. Ayaydín Ferhannak, akik konzulensként segítettek, felügyelték és koordinálták a PhD képzésben eltöltött időmet, kutatási tevékenységemet. Valamint kiemelt köszönetet szeretnék mondani a legjobb laboránsnak, akivel valaha találkoztam, Török Katalinnak. Továbbá szeretném megköszönni a Szegedi Biológiai Kutatóközpont kutatócsoportjának, név szerint Ferenc Györgyinek, Nagy Bettinának és Zombori Zoltánnak, hogy munkatársukként dolgozhattam a kísérleteken. Köszönet illeti Dr. Kereszt Attilát az M.Sc. diploma dolgozatom konzulensét és a Sequomics Kft-t, akik tovább segítettek tudományos munkámat. Végül de nem utolsó sorban, szeretném kifejezni a hálámat Prof. Dr. Rády Samírnak és Dr. Rády Adélnak, amiért kisgyermek korom óta tanítottak a nemesítési szakma fortélyaira, átadva szakmai tudásukat és tapasztalataikat.

A disszertáció kísérleti munkájának elvégzése a Nemzeti Kutatás-Fejlesztési és Innovációs Hivatal GINOP-2.3.2-15-2016-00001 pályázatának támogatásával valósult meg.

Társszerzői nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Rádi Feríz Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikációk létrehozásához, és tézisében közölt eredményeit más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Feríz Rádi, Katalin Török, Marianna Nagymihály, Attila Kereszt, Dénes Dudits (2020)

Improved reliability in production of maize inbred lines by the combination of the R1-navajo marker with flow cytometry or microsatellite genotyping. Cereal Research

Communications DOI 10.1007/s42976-020-00054-9



Prof. Dr. Dudits Dénes

A. Cseri, P. Borbély, P. Poór, A. Fehér, L. Sass, M. Jancsó, A. Penczi, F. Rádi, Cs. Gyuricza, Tamás Digruber and D. Dudits (2020) **Increased adaptation of an energy willow cultivar to soil salinity by duplication of its genome size.** Biomass and Bioenergy <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105655> Reference: JBB_105655



Dr. Cseri András



Prof. Dr. Dudits Dénes

Feríz Rádi, Katalin Török, Marianna Nagymihály, Attila Kereszt, Dénes Dudits (2020) **Improved reliability in production of maize inbred lines by the combination of the R1-navajo marker with flow cytometry or microsatellite genotyping.** Cereal Research Communications DOI 10.1007/s42976-020-00054-9

A. Cseri, P. Borbély, P. Poór, A. Fehér, L. Sass, M. Jancsó, A. Penczi, F. Rádi, Cs. Gyuricza, Tamás Digruber and D. Dudits (2020) **Increased adaptation of an energy willow cultivar to soil salinity by duplication of its genome size.** Biomass and Bioenergy <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105655> Reference: JBB_105655

Feríz Rádi, Bettina Nagy, Györgyi Ferenc, Katalin Török, István Nagy, Zoltán Zombori, Dénes Dudits, Ferhan Ayaydin (2020) **Targeted mutagenesis in maize somatic cells by injection of synthetic oligonucleotides into the apical meristem region of seedlings.** (Kézirat)