

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Doktori disszertáció tézisei

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

Rádi Feríz

Témavezetők:

Prof. Dr. Dudits Dénes

Dr. Ayaydin Ferhan



2021

Kutatási előzmények, 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 termesztendő haszonnövények közt meg kell felelnie az egyre szélsőséesebb 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 az alkalmazkodás nem evolúciós méretekben zajlik, hanem a nemesítők hosszú és kitartó munkájának eredménye. Jelen értekezés a hazai kukorica vonalak legmodernebb, precíziós nemesítési technikákkal történő továbbfejlesztésével foglalkozik, kezdeményezve a jövőbe mutató és versenyképes technológiák kidolgozását. A nemesítés egyik sarok köve 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 genotípustól független

örökítése. Ezek a módszerek megoldást nyújthatnak a kiemelkedő beltartalmi értékek, a többszörös vegyszerrezisztencia, a hímsterilitás és a szárazságtűrés hatékony kialakítására. A haploid növények birtokában célunk a recesszív, albínó mutációs marker felhasználásával az oligonukleotid-irányított mutagenézis (ONIM) *in planta* módszerének kidolgozása volt. Az oligonukleotidok sejtmagba juttatásával, célzott helyen lehetséges pont mutációt előidézni, 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 nevelési módszerek során a genetikai történések véletlen események és a nevelő csak a fenotípus értékelésére támaszkodhat. A precíziós nevelési módszerek megoldást nyújthatnak a genom szintű folyamatok célzott irányíthatóságára. Nagyon fontos kiemelni, hogy az általunk használt és kifejlesztett technológiák genotípustól függetlenek és nem igénylik idegen gén beépítését. Ennek a két faktornak a kiküszöbölése kiemelt cél, amelyek eddig a legnagyobb gátat szabták a kukorica molekuláris nevelése során. A javasolt kísérleti fejlesztések eredményei hozzájárulhatnak ahhoz, hogy versenyképes magyar kukorica hibridek kerüljenek piaci bevezetésre.

Anyagok és módszerek

Haploid indukció

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.

Genomméret meghatározás flow-citometriával

Az antocián markerre alapozott előválogatásból kiszelektált csíranövények ploidi szintjét a gyökércsúcsból vett mintákból flow-citometriával határoztuk meg 532 nm-en (BD FACS Calibur), 30 mW-on.

DNS izolálás és genotipizálás

A genomi DNS-t extraháltuk a MasterPure™ Complete DNS és RNS Purification Kit (Epicenter, USA) felhasználásával. Az izolált DNS-t ploidi szintjét, UMC1152 SSR (szekvencia specifikus ismétlődés) markerrel jellemeztük. PCR segítségével amplifikált fragmenteket, majd agaróz gélelektroforézis segítségével kiértékeltek.

Csíranövények rediploidizálása

A kromoszómakészlet megduplázását Chase és Nanda (1965) módszere szerint néhány módosítással végeztük. A kicsírázott haploid magokat körülbelül 3–5 cm hosszú koleoptiljét vízszintesen felvágtuk és 0,1% kolchicint, 0,1% DMSO-ot és

0,1% Tween 20- t tartalmazó oldatba merítjük hat órán át, 22 C° hőmérsékleten.

Szintetikus egyszálú DNS molekulák injektálása a haploid csíranövények merisztéma régiójába

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 koleoptillal rendelkeztek 16 órás fény / 8 órás sötét, 24 ° C-os szobahőmérsékleten. Ebben a szakaszban vízszintesen bemetszést ejtünk a hajtáson, körülbelül 1 centiméterrel a koleoptil-mezokotil csatlakozás felett és a merisztéma régiót függőlegesen (a vágott oldalán) meglazítottuk egy 27 G-s tűvel. A fitoén deszaturáz (PDS) gén célszekvenciáját képviselő szintetikus oligonukleotidokat (SDO) nukleázmentes vízben feloldottuk 100 pM koncentrációban. Az egyes növények merisztéma régiójába 3 µl oligo oldatot injektáltunk.

Kukoricaszemek embrióiba történő DNS felvétel 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 sterilizés során először 1 percre 70%-os alkoholt használtunk, majd mosás következett desztillált vízzel. Ezután 30 percre 1,5%-os nátrium-hipoklorit oldatban áztattuk a szemeket, majd ismét mosás következett. Végző lépésként 0,2%-os HgCl₂ oldatot használtunk majd 4x

desztillált vizes mosást végeztünk. A sterilizéstől megduzzadt magok embriópajzs előtti maghátyáját eltávolítottuk, majd 48 órás deszikkálás következett. A következő lépésben az embrió körüli szöveteket eltávolítottuk szabaddá téve, feltárva, a száraz érett embriót. A szemeket Petri-csészében steril homokba ágyztuk, embrióval felfelé, hogy tökéletes vízszintes helyzetbe hozhassuk őket. A kukorica fitoén deszaturáz (PDS) gén kikapcsolása érdekében 6 különböző struktúrájú ZmPDS oligóval végeztük a kísérletet. Ebből 5 kombinációban 2mM-os szacharóz oldatban oldottuk az oligókat, míg 1 esetben vízben oldottuk fel ezeket a molekulákat 50 μ M-os koncentrációban. Az oligonukleotid oldatot 2 óra különbséggel 50 μ l-es dózisokban cseppentettük az embrió felületére 2 alkalommal. Miután a magok beszívták az oligó oldatot nedves szűrőpapír segítségével éjszakán át előcsíráztattuk, majd kiültettük a mintákat. A kezelt magokból növényt neveltünk, önporozásuk után az utód generáció növényeinek fenotípusait vizsgáltuk. A mutáns szövetekből izolált DNS felhasználásával a PDS gén érintett régióját szekvenálás céljából amplifikáltuk.

Pollentömlőn keresztüli DNS felvétel a beporzás során

A 80-100% bibevirágzásban lévő szigetelt beltenyészett 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-nek, ahol 10-13 centiméterrel H2 elnevezést kapták. A csövek átlagosan 20 cm hosszúak voltak. A vágás felületét antisznesz, vízben oldott 50 μ M töménységű ZmPDS oligóval kezeltük 300 μ l térfogatban. Az oligonukleotidokat

foszfotioáttal (PTO) védtük a degradáció ellen. Az oldat felszívódása után ismételten beporoztuk a csöveket, majd szigetelő tasakkal fedtük be őket. Az utód generációt a következő évben ismét elvetettük, majd önporzás után a harmadik generáció fenotípusait vizsgáltuk.

FAM-jelölt mutagén oligonukleotidok tervezése és szintézise

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 szintézise során annak szekvenciáját úgy terveztük, hogy az PDS gén kiindulási kodonjához a lehető legközelebbi régiót ismerje fel, a célzott mutációt pedig az oligonukleotid közepén helyezkedjen el. A CAG-TAG mutáció mellett a GCA-ACA marker mutációt is terveztünk az SDO-PDS-be azzal a céllal, hogy elősegítse a sikeres mutációknak az új generációs szekvenálással (NGS) 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 specifikását ellenőriztük a kukorica genomi szekvenciája alapján az NCBI adatbázisban.

A fitoen deszaturáz (PDS) gén PCR amplifikációja és szekvenálása

A kezeletlen kontroll növényekből származó genomi DNS-t és az SDO-val kezelt kukorica növények albínó fenotípust mutató

levél régióiból CTAB-alapú extrakciós módszerrel izoláltuk. (Doyle 1990). Az célzott nukleotidcsere elemzéséhez PCR-amplifikációkat hajtottunk végre a következő fitoén-deszaturáz gén-specifikus primerekkel: ZmPDS_Forward:5'CAGTAGTCTGCCTGTACCTATTG-3' ZmPDS_Reverse:5'-CGGTGTGTGATCTCC-3'.

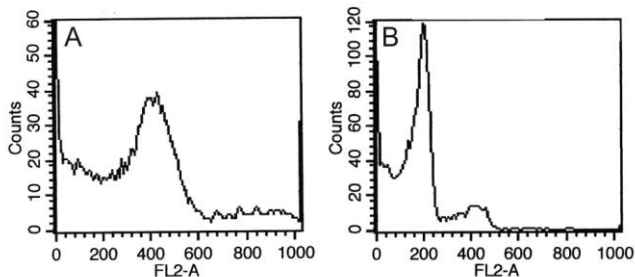
Mikroszkópia és képkalkotás

A fluoreszkáló oligonukleotiddal kezelt hat napos, kukorica csiranövények apikális merisztéma régióit Leica SP5 lézeres pásztázó konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk és mutattuk ki az SDO molekulák felvételét. Ehhez a cserepes növények levélét közvetlenül a tárgylemezhez rögzítettük egy fedőlemez segítségével. Másik lehetőségként Petri-csészébe (Fodor és Ayaydin 2018) a levél kimetszésével és 24 x 50 mm-es tárgylemezre történő rögzítéssel dolgoztunk.

Eredmények

Haploid indukálás és ploidia szint meghatározás

A kísérletek során a haploid indukáló beltenyésztett kukorica vonallal történő keresztezéssel sikeresen, de változó gyakorisággal alakultak ki haploid növények. Vizsgálatainkban a flow-citometriás genom méret meghatározással (lásd alábbi ábra) 10 %-os indukációs rátát állapítottunk meg a teljes szemszámot véve alapul. Ezzel a kolchicines rediploidizáció előtti előszűréssel időt, helyet, munkaerőt és költséget spórolhattunk meg.



A flow-citóméter által meghatározott DNS mennyiségi profilok a diploid (A) és a haploid (B) növények izolált sejtmag szuszpenziójában.

Haploid egyedek azonosítása mikroszatelit markerrel

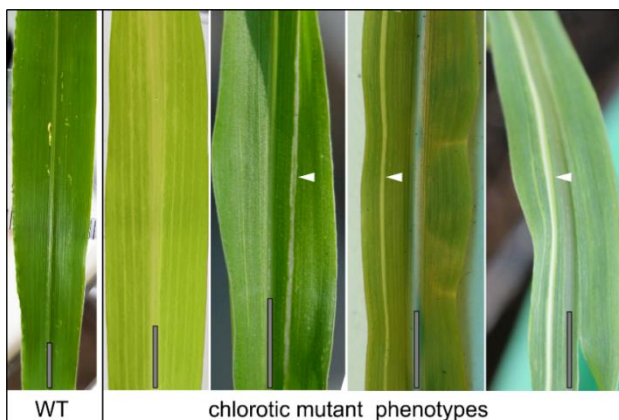
Az SSR markerrel történő genotípus meghatározás a flow-citometriás vizsgálat alternatívájaként írtuk le és optimalizáltuk, kukorica növényen. Az eredményeink azt mutatják, a nemesítő rendelkezésére álló laboratórium felszereltségtől függően, mindkét módszer alkalmazható a haploid egyedek előszűrésére.

Dihaploidizáció

Optimalizáltuk kukorica növényen a kolchicin kezelés folyamatát, a mortalitás minimalizálásával és a rediploidizált növények sikeres megtermékenyítésével.

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

Sikeresen detektáltuk a FAM-al jelölt oligonukleotid molekulák merisztéma régióban történő feldúsulását. Következő lépésként a fitoén deszaturáz gént editáló oligonukleotidot hasonlóan a FAM-os kísérlethez injektálással juttattuk be a merisztéma régióba. Mivel recesszív mutációs markert használtunk, haploid csiranövényeken végeztük az SDO kezeléseket, amelyeket az előzőekben leírt módszerrel állítottunk elő. Mint az alábbi ábra szemlélteti a csiranövények merisztéma régióiba jutatott SDO-kezelést követően a kifejlődő csiranövények leveleiben klorotikus elváltozások figyelhetők meg. Világoszöld levelek és levél csíkok, illetve az albinó csík is fotoszintetikus zavar jele lehet.



Kezeletlen és mutáns levelek

A fitoén deszaturáz (PDS) kukoricagén irányított mutagenézise érdekében 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 is tesztelni. A primed seed-es kezelések elő kísérlete képpen a merisztéma injektálásához hasonlóan itt is lemodelleztük a kezelésünket nem specifikus 5-FAM-al jelölt oligonukleotidok használatával. Az elő kísérletek során jelentős oligonukleotid felhalmozódást detektálhatunk az embrió minden területén. Így feltételezhető, hogy a mutációt hordozó oligonukleotidok beépülése esetén lesznek olyan mutáns sejtek, szövetek, amelyek szerepet játszhatnak az ivarsejtek kialakulásában. A kezelést követően a kiültetett szemekből három növényt tudtunk felnevelni, amelyeken önbeporzást lehetett végezni. Ezek utódai között egy esetben hasadtak ki albínó csiranövények az alábbi táblázatban megadott arányban.

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%



Albínó fenotípus az M2 utódgenerációban

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. Összesen 16 csövet kezeltünk ebben a kísérletben, amiből 15-öt le is tudunk 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 seed-es 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. Jelenleg folyamatban vannak a DNS szekvenálások, a mutációk igazolása érdekében.



Visszavágott kukoricacső pollentömlő kezelése

Összefoglalás és kitekintés

A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban és a Kiskun Kutatóközpontban végzett kísérletek elsődleges célja, hogy megteremtődjön a feltétele a precíziós nemesítési módszerek alkalmazásának a hazai kukoricánemesítésben. A flow-citometria segítségével megbízhatóbbá tudtuk tenni a haploid indukciós nemesítést. Az irányított mutagenézis igen fontos eszköze lesz a jövő nemesítési programjainak. A különböző módszerek közül a jelen kutatást az oligonukleotid irányított mutációk módszerének kidolgozására koncentráltuk. Ennek fontos indítéka, hogy az így keletkező genotípusok nem tartalmaznak idegen gént, így nem tekintendők GM szervezeteknek. Ugyanakkor céljaink között központi szerepe van a CRISPR-Cas9 editálásnak is, bízva abban, hogy az EU engedélyezni fogja az így nemesített fajtákat.

Publikációk

MTMT:10073610

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, T. 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)**

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Dudits Dénesnek és Dr. Ayaydin 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, aki tovább segítette tudományos munkámat. Végül de nem utolsó sorban szeretném kifejezni a hálámat Prof. Dr. Rády Samírnak és Dr. Rády Adelnak, 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