



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2023. november 22.

A kenyérbúza meiotikus rekombinációjának vizsgálata modern immunocitokémiai módszerekkel

Immunocytology methods to analyse meiotic recombination in bread wheat

Készítette: Tóth Gréta Zsófia
FB1P5K
Kertészmérnöki alapképzés
Nappali tagozat
MATE Budai Campus

Témavezető: Benyóné Dr. György Zsuzsanna, MATE GBI,
Növénybiotechnológia tanszék, Kertészeti Növénygenetika csoport

Témavezető: Sepsi Adél, PhD, ATK, MGI, HUN-REN

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

2023. Budapest

Tartalom

1	Bevezetés	3
2	Célkitűzés	4
3	Irodalmi áttekintés	5
3.1	A kenyérbúza jelentősége	5
3.2	A kenyérbúza termesztésének kihívásai a XXI. században	5
3.2.1	Klímaváltozás	5
3.2.2	A búza kialakulása és a házasítás hatásai	6
3.3	A meiotikus sejtosztódás.....	7
3.4	A meiózis profázisa és a rekombináció	8
3.5	A szinaptonémás komplex kialakulása a profázis I során.....	9
3.6	A rekombináció kimutatására alkalmas citológiai módszerek	11
3.7	Fixálási módok az immuncitokémiai vizsgálatokhoz	11
4	Anyag és módszer	13
4.1	Növény anyag.....	13
4.2	Meiotikus mintavétel	13
4.3	Portokok fixálása PFA-val és preparátum készítés.....	15
4.4	Portokok fixálása Carnoy I-el és preparátum készítés	16
		16
4.5	Ellenanyag előállítás.....	17
4.6	Immunjelölés.....	17
4.7	Konfokális lézerpasztázó mikroszkópia	18
5	Eredmények és értékelésük	19
5.1	A HEI10 ellenanyag előállítása és tesztelése	19
5.2	A HEI10 ellenanyag tesztelése a szinaptonémás komplex függvényében	22
5.3	HEI10+ZYP1 denaturáló fixálás.....	25
5.4	A nem-denaturáló és denaturáló fixálási mód hatásának összehasonlító vizsgálata a HEI10 immunjel minőségére	27
6	Összefoglalás	31
7	Köszönetnyilvánítás.....	33
12	Irodalomjegyzék.....	34

1 Bevezetés

A TDK munka a kenyérbúza genetikai sokféleségét és fertilitását nagyban meghatározó meiotikus rekombináció vizsgálatát kívánta segíteni modern immuncitokémiai eljárások tesztelésével, fejlesztésével. Míg a Föld népességének robbanásszerű emelkedése megköveteli a kenyérbúza termőképességének jelentős növelését (az előrejelzések szerint 2050-re el kell érnie a mai termelés 160%-át), ezen égető feladat a mai nemesítési módszerekkel nehezen megoldható. Olyan új megoldásokra van szükség, amelyek az eddiginél hatékonyabban használják ki a búza és a rokon fajokban rejlő genetikai sokféleséget. A búza és a rokonsági körébe tartozó fajok ivaros keresztezésével, majd az eltérő genomok rekombinációjával egy széleskörű genetikai tartalék képezhető, amely számos visszakeresztezést és szelekciót követően a búza előnemesítési programokban bevonható. Azonban magában a búza genomban rejlő sokféleség kiaknázása jelentős nehézségekbe ütközik. A gabonafélék, így a búza meiózis során is, az apai és anyai homológ kromoszómákon elhelyezkedő gének rekombinációja a kromoszómák végeihez közel eső régiókra, a szubtelomérákra koncentrálódik. Az így kialakult rekombinációs forrópontok mellett fennmaradó 'hideg' kromoszóma régiókban levő gének, változatosság nélkül, kapcsoltnak öröklődnek. Új, előnyös gén kombinációk e régiókban nem, vagy alig állíthatók elő. A szélesebb genetikai variabilitás további gátja, hogy egy kromoszómán belül a rekombinációk száma is szigorú korlátozás alatt van, kromoszómánként nem meghaladva a 2-3 genetikai átkereszteződést (crossing over-t). A mai modellnövényekre és gabonafélékre irányuló nemzetközi kutatások jelentős része törekszik arra, hogy a rekombináció térbeli és számbeli szabályozottságát megismerje, feloldja. A jelen kutatómunka a rekombináció folyamatának nyomon követéséhez és a kromoszómális átkereszteződések számának meghatározásához egy a korábbinál pontosabb vizsgálati módszert kíván kidolgozni. A legmodernebb sejtbiológiai módszereket ötvöztük nagy felbontású mikroszkópiával és 3D képalkotással, hogy a kenyérbúza DNS hibajavításban és a kromoszómális átkereszteződések éréseben kulcsfontosságú HEI10 fehérje sejttagon belüli jelölését elvégezhesük. A módszer lehetővé teszi a rekombináció korai stádiumban történő vizsgálatát és a befejezett crossing overek számbeli és térbeli meghatározását. Az előállított adatsorok segítségével a különböző genotípusok rekombinációs folyamatai statisztikai módszerekkel összehasonlíthatók, amely a jövőben megnyithatja az utat olyan nemesítési vonalak kiválogatása előtt, amelyek alkalmasak a búza genetikai sokféleségének hatékony kiaknázására.

2 Célkitűzés

A jelen kutatómunka során célunk egy olyan modern immunocitokémiai módszer optimalizálása, amelynek segítségével a meiózis során kialakuló crossing overek és a kialakulásukat lehetővé tevő hibajavító mechanizmusok dinamikája megbízhatóan nyomon követhető egyik legfontosabb gabonaféléinkben, a kenyérbúzában. Ehhez a meiotikus rekombináció hibajavító folyamataiban és a befejezett kromoszómális átkereszteződések kialakításában kulcsfontosságú fehérje, a HEI10 fehérje immunocitokémiai módszerekkel történő kimutatását tűztük ki célul. Célunk egy olyan új poliklonális ellenanyag előállítása, amely képes a HEI10 fehérje pontos lokalizációjára a meiotikus sejtmagokon belül. A megfelelő osztódási fázisban levő sejtmagokon alkalmazott immunjelölés majd az azt detektáló nagy felbontású lézerpásztázó mikroszkópia segítségével a crossing overek száma így pontosan meghatározhatóvá válik. Az ellenanyag alkalmazása lehetőséget biztosítana a kromoszómális átkereszteződések kialakulását megelőző repair mechanizmusok mikroszkópos vizsgálatára is. Célunk két egymástól alapvetően különböző szövetfixálási és sejtpreparálási módszer hatékonyságának felmérése a HEI10 fehérje sejtmagi kimutatásában.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A kenyérbúza jelentősége

A kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) az egyik legelterjedtebb haszonnövényünk, amely a perjefélék családjához (*Poaceae*) tartozó *Triticum* nemzetség tagja (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>). Több mint hárommilliárd ember napi alapvető élelmiszerforrását biztosítja. Étkezési célú fogyasztása világszerte eléri az évi 800 millió tonnát (Statiszta, <https://www.statista.com/statistics/1094056/total-global-rice-consumption>). Rendkívül értékes tápanyagforrás mind finomított, mind teljes kiőrlésű formában. Jelentős mennyiségben tartalmaz az emberi táplálkozás számára fontos rostokat, tápanyagokat és vitaminokat. Példaként említendő magas vas, cink, mangán, B6-vitamin, foszfor és szelén tartalma (Adom et al., 2003). Amellett, hogy fontos étkezési alapanyag, gyógyászati célokra is használják, például a táplálkozással összefüggő betegségek kezelésére, illetve kutatások irányulnak rákellenes hatásának vizsgálatára (Tandon and Arora, 2011).

3.2 A kenyérbúza termesztésének kihívásai a XXI. században

3.2.1 Klímaváltozás

Míg a kenyérbúza élelmiszerbiztonságra gyakorolt hatása felbecsülhetetlen, addig annak jövőbeli termesztése számos kihívás előtt áll. A Föld egyre növekvő népessége 2050-re megköveteli a jelenleg világszerte termelt búza mennyiségének jelentős növelését.

Mindemellett, az éghajlati változás eredményeként gyakoribbá vált az egyre melegebb felszíni hőmérsékletek előfordulása, amely gyakran szélsőséges időjárási viszonyokat von maga után. 2023 júliusában a legmagasabb szárazföldi és óceán felszíni hőmérsékletek ismét rekordot döntöttek (<https://climate.copernicus.eu/july-2023-global-air-and-ocean-temperatures-reach-new-record-highs>). Az új környezeti nehézségeket jól mutatja, hogy világszerte a három legmelegebb év a globális felszíni hőmérsékletek első rögzítése óta (1880-as évek) 2015 és 2023 közé esik (<https://www.ncei.noaa.gov/access/monitoring/monthly-report/global/202213>).

A kenyérbúza a szántóföldön folyamatosan ki van téve az időjárási szélsőségeknek. A rendkívüli hőmérsékletek már tavasszal is előfordulnak (<https://climate.copernicus.eu/dry-and-warm-spring-and-summer>), ami fokozottan károsítja a növény és a kalászkok fejlődését és csökkenti a termőképességet (Asseng et al., 2015; Barber et al., 2017; Jacott and Boden, 2020; Trnka et al., 2014).

Az optimális környezeti viszonyok hiányában csökken a termésmennyiség és -minőség. A magas hőmérsékletek hatására megváltoznak a sejtek biológiai folyamatai, az anyagcsere és például a fehérjék foszforilációja (Kumar et al., 2015). A szárazságstressz csökkenti a búzanövény tápanyagfelvételét, amelynek során a nitrogén, foszfor és káliumfelvétel majdhogynem felére esik vissza miközben a szemtermés tömege radikálisan csökken (Nawaz et al., 2012).

Az éghajlatváltozás azonban nem csak közvetlen módon hat a növényekre. A kártevők és kórokozók biológiájára, illetve a velük szembeni védekezésre is jelentős hatással van. Elősegíti például a legsúlyosabb búzakártevők szaporulatát, elterjedését és fennmaradását. A felmelegedés következtében földrajzilag új helyeken jelennek meg kórokozók, illetve új kórokozófajták tűnnek fel. Szintén fontos, hogy a klímaváltozás a növényvédőszerekre is hatással van: csökkentheti a hatékonyságukat, ami megnöveli a kórokozók rezisztenciáját és túlélési arányát (Bajwa et al., 2020).

3.2.2 A búza kialakulása és a házasítás hatásai

A kenyérbúza allopoliploid faj ($2n=6X=42$), amely három egymáshoz nagyon hasonló ún. homológ genomot hordoz, ennek összetétele AA BB DD. Egy homológ genom hét pár kromoszómát foglal magába, így a búza összesen 42 kromoszómával rendelkezik. A mai kenyérbúza kialakulásához több evolúciós esemény vezetett. Homeológ genomjai három ősi diploid faj genomjából származnak, amelyek természetes hibridizációja és az azt követő domesztikáció tette lehetővé a mai kenyérbúza kialakulását (Zimin et al., 2017). Első lépésben a diploid *Triticum urartu* (AA genom) és a diploid *Aegilops speltoides* egy ősi formájának (a búza BB-genomjához leginkább hasonló SS genom hordozója) hibridizációja létrehozta a tetraploid *Triticum turgidum*-ot (AA BB genomot hordozó faj). A *T. turgidum* mintegy 10 000 éve történt kereszteződése a diploid *Aegilops tauschii*-vel (DD genom) végül kialakította a ma termesztett búza őseit (Haider, 2013; Cox, 1998; Huang et al., 2002; Petersen et al., 2006).

A kenyérbúza házasítása közel egyidős az emberiséggel. Már az első földművesek válogattak ki olyan növényeket, amelyek jobb termést hoztak és magasabb ellenállósággal rendelkeztek a korábban használt társaiknál. Az azóta eltelt több ezer év nemesítése során azonban a sokféleséget nyújtó ősi jellegek jelentős része elveszett a szigorú mezőgazdasági szelekció miatt (Charmet, 2011). A modern búzanemesítés egyik fontos korszaka az 1950-es 60-as években kezdődött, amikor világossá vált, hogy az akkor aktuális gabonafélék termesztése nem elegendő a robbanásszerűen megnőtt népesség ellátására. Norman Ernest Borlaug, a „Zöld

forradalom atyja” olyan új búzafajtákkal kísérletezett, amelyeknek kimagasló volt a terméshozama (Khush, 2001; Lumpkin, 2015). Sikeresen nemesített jó termőképességű, rövidszalmás, betegségeknek ellenálló búzát (Norman Borlaug - Biographical (nobelprize.org) amelyek elterjesztése több mint egy milliárd embert mentettek meg az éhezéstől. Többek között ezen erőfeszítések hatására azonban, a ma termesztett búza genetikai sokfélesége beszűkült, csökkentve a búza alkalmazkodóképességét. Több tanulmány bizonyítja, hogy a korábban termesztett tájfajtákhoz képest a ma termesztett búzafajok genetikai sokfélesége beszűkült (Cseh et al., 2021b; Rufo et al., 2019b; Winfield et al., 2018b). A közeljövő nemesítőinek a megváltozott, szélsőséges környezeti viszonyok között számottevően magasabb termést elérő búza fajtákat kell nemesíteniük. Ehhez mezőgazdasági innovációra, a kutatási eredmények gyors és hatékony felhasználására van szükség.

A búza genetikai tartalékainak hatékonyabb kihasználására jó lehetőség az ivarsejteket kialakító meiózis során a szülői jellegek rekombinációjának (genetikai átkereszteződésének) hatékonyabbá tétele. A rekombináció gyakoriságának növelésével nagyobb számú génkombináció állítható elő, így az utódok közül hatékonyabban válogathatók ki az előnyös tulajdonságokat halmozó egyedek. A rekombináció folyamata mind térben mind időben mind számban rendkívül szabályozott. A térbeli szabályozottság eredményeként a kromoszómális átkereszteződések búzában és árpában a kromoszóma végekre összpontosulnak. A kromoszómák központi régiói, pl. a centromérák és pericentromérák környékén elhelyezkedő gének így egy egységként ('linkage drag'), a szülői jellegek kölcsönös cseréje nélkül adódnak tovább. A kromoszóma végeken kívül eső régiókban található előnyös tulajdonságok rekombinációja tehát gátolva van, kizárva a legelőnyösebb allélok egy fajtában történő felhalmozását. A meiotikus rekombináció fokozásával, illetve annak új régiók felé történő kiterjesztésével olyan új genotípusok hozhatók létre, amelyek ellenállhatnak a klímaváltozás kihívásainak.

3.3 A meiotikus sejtosztódás

Az ivarsejtek kialakításában részt vevő meiotikus vagy számfelező sejtosztódás két osztódási lépésből áll, amelyek közül az első osztódás (meiózis I.) metafázisában az apai és anyai homológ kromoszómapárok elválnak egymástól és a sejt két pólusa felé vándorolnak (Harrison et al., 2010b; Page and Hawley, 2003a). Meiózis II. metafázisában (mitózishoz hasonlóan) a replikálódott kromoszómákat alkotó két-két kromatida válik szét egymástól, amelynek eredményeként a meiózis végén négy haploid utódsejt (tetrád) alakul ki. A meiózis első metafázisa során a homológ kromoszómák megfelelő szétválásának előfeltétele, hogy a

profázis I (a meiózis I. első szakasza) során a homológok legalább egy crossing overt alakítsanak ki egymással, amely metafázisban fizikailag összekapcsolja őket. Ezen fizikai kapcsolat hiányában a kromoszómák random szegregálnak, nagy eséllyel eliminálódnak a sejtéből, ami funkcióképtelen ivarsejt kialakuláshoz és fertilitásvesztéshez vezet. A krosszóverek a profázis I. során meiotikus rekombinációval alakulnak ki, amelyet végig követ a homológ kromoszómák kölcsönös felismerése és szinapszisa. A meiózis első profázisát a kromoszómák morfológiája és a szinapszis előrehaladásának megfelelően négy alfázisra oszthatjuk, ezek időrendi sorrendje a következő: leptotén, zigotén, pachitén, diplotén.

3.4 A meiózis profázisa és a rekombináció

A rekombináció a profázis kezdetén a Spo11 fehérje által katalizált kettősszálú DNS törések (double strand breaks, DSBs) genom szerte történő kialakulásával indul be (Da Ines et al., 2020; Grelon et al., 2001; Keeney et al., 1997). A kettősszálú DNS törések létrejötte után elindulnak a rekombinációs hibajavító (repair) mechanizmusok (1. ábra). Ennek során a kettősszálú törések egyik DNS szála visszavágódik, míg a túlnyúló DNS szál 3'-végéhez kapcsolódó RAD51 és DMC1 fehérjék irányításával megkezdődik az egyvégű szálinvázio (single end invasions, SEIs). A szálinvázio során a RAD51 és DMC1 fehérjékbe csomagolt egyszálú DNS (ún. nukleofilament, (1. ábra) a homológ kromoszómán található sértetlen homológ DNS duplexek felé hajlik, annak szekvenciáját használva a hibajavításhoz (da Ines et al., 2012; Hunter and Kleckner, 2001; MacQueen, 2015; Pradillo et al., 2014). Ezen rekombinációs események egy része kromoszómális átkereszteződésként (crossover, CO) míg a többi része kromoszómális átkereszteződés nélkül (non crossover, NCO) javítódik ki.

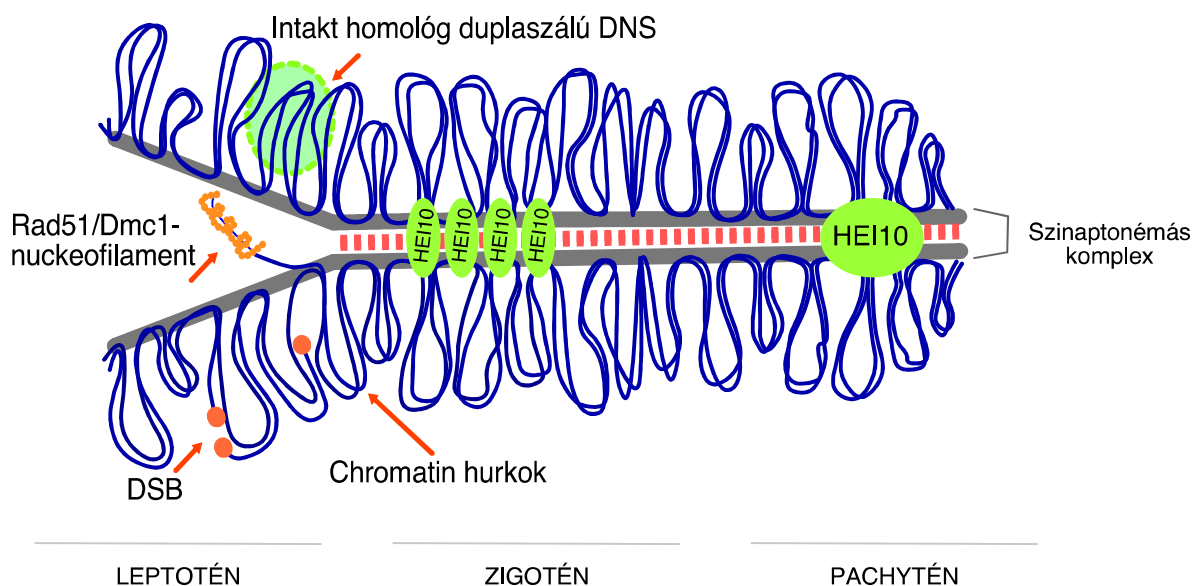
A megfelelő osztódáshoz minden kromoszómapárnak, mérettől függetlenül legalább egy kötelező kromoszómális átkereszteződésre van szüksége (obligát crossing over)(Martini et al., 2006). Amennyiben egy kromoszómapár között több mint egy CO van jelen, akkor azok egymástól nagyobb távolságra helyezkednek el, mint ahogy az a véletlenszerű eloszlás szerint elvárható. Ezt a jelenséget pozitív interferenciának nevezzük (Chen et al., 2008; Durand et al., 2022; Mézard et al., 2007). Számos organizmusban (*Saccharomyces cerevisiae*-ben, emlősökben és növényekben is) bizonyították, hogy legalább kétféle crossing over típus alakulhat ki a meiózis során (Mercier et al., 2005). Az I. osztályú crossing overek (class I CO) követik a pozitív interferencia szabályait, és kialakulásuk függ a ZMM-fehérjéktől (ZYP1, Msh4, Msh5 és Mer3) és más meiotikus fehérjéktől (pl. ZYP2, ZYP3 és Spo16) (Chelysheva et al., 2007; Higgins et al., 2008a; Voelkel-Meiman et al., 2015). A II. osztályú crossing overek (class II CO) azonban nem érzékenyek az interferenciára, eloszlásuk véletlenszerű a

kromoszómák mentén. *S. cerevisiae* és *Arabidopsis thaliana*-ban végzett vizsgálatok szerint kialakulásuk függ a Mus81 és Mms4 fehérjéktől (De los Santos et al., 2003; Higgins et al., 2008b; Lukaszewicz et al., 2013).

A DNS hibajavítás során az egyik kulcsfontosságú ZMM fehérje a HEI10 fehérje, amely elengedhetetlen a class I. kromoszómális átkereszteződések létrejöttéhez (Chelysheva et al., 2012; Durand et al., 2022). A HEI10 a szinaptonémás komplex korai megjelenésekor nagy számban megfigyelhető a meiotikus sejtmagokban, majd a meiózis előrehaladtával csak a class I crossing overek helyén lelhető fel (1. ábra). A HEI10 fehérjét kódoló gén funkcióképtelen mutációja drasztikusan csökkenti a class I. crossing overek számát (Chelysheva et al., 2012), mutatva a fehérje jelentőségét a kromoszómális átkereszteződések kijelölésében.

3.5 A szinaptonémás komplex kialakulása a profázis I során

A ZMM fehérjéknek jelentős szerepe van a meiózusra jellemző fehérje komplex, a szinaptonémás komplex (synaptonemal complex, SC) felépülésében, amely a profázis során fokozatosan összekapcsolja az apai és anyai homológ kromoszómákat, amíg azok teljes hosszukban összetapadnak (párosodnak) (Page and Hawley, 2004). A meiózis első profázisának alfázisai a kromoszómák aktuális morfológiája és a szinaptonémás komplex felépülésének üteme szerint lettek meghatározva. Leptoténben a párosodás előtt álló kromoszómák mentén egy fehérje tengely, az ún. axiális elem épül fel (1. ábra), amelynek egyik fontos fehérje komponense az ASY1 fehérje (Armstrong et al., 2002). A leptotén egyik fontos eseménye, a kettősszálú DNS törések kialakulása, amelyek sejtenkénti száma búzában elérheti az 1000-et (Cseh et al., 2023). A zigotén kezdetén a homológ kromoszómák szorosan egymás mellé fekszenek és a szinaptonémás komplex centrális eleme segítségével fizikailag összekapcsolódnak, szinapszist alkotnak (1. ábra). A centrális régió egyik kulcs fehérjeje a ZYP1 fehérje (Barakate et al., 2014; Higgins et al., 2005a).



1. ábra A szinaptonémás komplex felépülése és a rekombináció lépései a meiózis első profázisa során

A meiózis első profázisának kezdeti szakaszában (leptotén) a homológ kromoszómák mentén kialakul egy fehérje tengely. Az 1. ábrán a fehérje tengely leptotén fázisban szürke vonalként van megjelenítve, ehhez kapcsolódnak a késsel jelölt kromatin hurkok. A két homológ kromoszóma tengelye egymástól különálló ebben a fázisban és ekkor indul meg a meiotikus rekombináció a kettősszálú DNS törések kialakulásával. A szálinvázió is megkezdődik, ennek során a kettősszálú törések egyik szálához Rad51 és Dmc1 fehérjék kapcsolódva nukleofilamentet alakítanak ki, amely megkezdí invázióját a homológ kromoszómán fekvő intakt, homológ szekvencia felé. Zigoténben megkezdődik a homológ kromoszómák szinapszisa, ennek során a két homológ kromoszóma között felépül a szinaptonémás komplex (a képen narancssárga színnel jelölve), amely a két kromoszóma tengelyt szorosan összekapcsolja. Ebben a fázisban zajlanak a rekombinációs hibajavító mechanizmusok, amelyekben a HEI10 fehérje jelentős szerepet játszik. Pachiténben a kromoszómák tökéletes szinapszisa vannak és a HEI10 fehérje már csak a krosszóverek pontjain fellelhető.

Búzában és más gabonafélékben a homológ kromoszómák szinapszisa mindig a kromoszóma végek, a telomérák felől indul és a zigotén végén az egyik legkésőbb szinapszisba lépő régiók, a centromérák is összekapcsolódnak (Higgins et al., 2012; Lenykó-Thegze et al., 2021). Zigoténben már beindulnak a kettősszálú törések hibajavító mechanizmusai is. Pachiténben a szinapszis teljesen végigfut a két homológ kromoszóma között, így azok bivalenseket alkotnak, míg a kromoszómális átkereszteződések érése megtörténik. Diploténben a szinapszis fokozatosan felbomlik a homológ kromoszómák között és a profázist követő diakinézis végére a bivalensek már csak a kromoszómális átkereszteződések pontjain kapcsolódnak össze (Osman et al., 2006). A szinapszis folyamata ma már immuncitokémiai módszerekkel, az ASY1 és ZYP1 fehérjék megjelölésével jól követhető (Sepsi et al., 2018). Az immuncitokémiai vizsgálat során az ASY1 fehérje leptotén fázisban hosszanti jelet mutat a párosodás előtt álló kromoszómák mentén. Korai zigoténben a szinapszis beindulását a kromoszóma végekről

feltisztuló ASY1 jel és a helyén megjelenő ZYP1 jel jelenlétéből azonosíthatjuk. A zigotén végére az ASY1 jel helyét szinte teljesen átveszi a ZYP1 mutatva a szinapszis előrehaladását. Pachiténben az ASY1 jel teljesen eltűnik, majd diploténben a kromoszómák kondenzációját is mutató spirálban futó jelként újra megjelenik, jelezve a szinapszis fokozatos felbomlását (Sepsi et al., 2017). Ezen fehérjék immunjelölése rendkívül fontos a meiózis pontos előre haladásának megállapításához.

3.6 A rekombináció kimutatására alkalmas citológiai módszerek

A meiózis első metafázisban a homológ kromoszómapárok a crossing over pontjain fizikai kapcsolatot alkotnak egymással, amelyeket fénymikroszkópos vizsgálat során kiazmaként, azonosíthatunk. Meiózis metafázisban a kiazmák hozzávetőlegesen számszerűsíthetők, így a kromoszómális átkereszteződések becsléséhez használhatóak. A módszer hátránya, hogy az egymáshoz közel eső rekombinációs pontok nem azonosíthatók, így gyakran a kromoszómális átkereszteződések számának alul becsléséhez vezet. A rekombinációk számának fokozására, elhelyezkedésük módosítására irányuló kutatási programok esetében így önmagukban nem megbízhatóak, különösen olyan mutánsok esetében, ahol a bivalensek helyett bonyolult szerkezetű multivalens (több mint két kromoszóma összekapcsolódása) szerkezetek azonosíthatók. Rendkívül fontos tehát olyan megbízható, egyszerűen kivitelezhető vizsgálati módszer fejlesztése, amely lehetővé teszi a kromoszómális átkereszteződések pontos azonosítását. A modern citokémiai módszerek összekapcsolása nagy felbontású mikroszkópiával utat nyitnak egy vagy több egyedi fehérje sejten belüli megjelöléséhez (Lenykó-Thegze et al., 2021). A módszer alkalmazása a kutatócsoporton belül a szinaptonémás komplex fehérjéinek nyomon követésére megtörtént. Ezen fehérjék megbízhatóan jelölik a meiózis időrendjét a különböző növényi mintákban. A módszer ötvözése a rekombinációban részt vevő kulcsfontosságú fehérje kimutatásával megengedi a rekombinációs hibajavító mechanizmusok és a befejezett crossing overek részletes összehasonlító vizsgálatát különböző növényi vonalakban. Így hatékonyan kiválogathatók azon növények, amelyekben a szülői tulajdonságok új kombinációi alakulnak ki, lehetővé téve több agronómiailag előnyös tulajdonság ötvözését és a genetikai sokféleség fenntartását a nemesítési alapanyagokban.

3.7 Fixálási módok az immuncitokémiai vizsgálatokhoz

Az immunocitokémiai technikák leggyakrabban a nem denaturáló paraformaldehid oldattal történő szövet fixálást részesítik előnyben (Kiernan, 2000). Ennek előnye, hogy jól megőrzi a fixált sejtek eredeti alakját, a kromatin morfológiáját és a keresztkötéseknek (crosslinking) köszönhetően rendkívül jól tartósítja a fehérjéket natív állapotukban, így az antigén-antitest

kapcsolódás megbízhatóan végbemegy. Bizonyos nehezen kimutatható, kis mennyiségben előforduló fehérjék kimutatását azonban ez a módszer megnehezítheti. Itt a fehérjék kicsapására, az antigén epitópjának drasztikusabb feltárására van szükség. Ebben az esetben alkalmazható az ún. denaturáló fixálási módszer, amikor ecetsavas oldat segítségével eltávolítjuk a sejtfehérjék egy részét (pl. citoplazma fehérjéit) és a jelenlevő fehérjék epitópjait feltárjuk (Desjardins et al., 2022). A megfelelő fixálási mód kiválasztása és optimalizálása azonban nagyban függ a vizsgálandó genotípustól és az alkalmazandó további citológiai technikáktól ezért egy fixálási, preparálási módszert gyakran ezeknek megfelelően is optimalizálni kell.

4 Anyag és módszer

4.1 Növény anyag

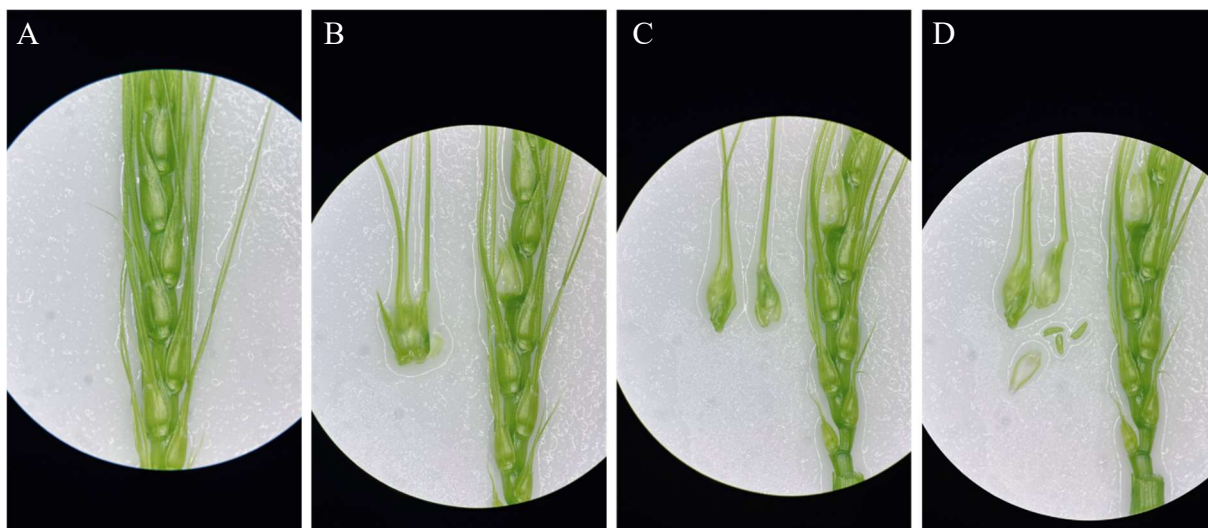
A búza csíráztatásához ‘Apogee’ és ‘Chinese Spring’ búzafajták (2. ábra) szemeit Petri-csészébe helyeztem, majd felöntöttem 50% desztillált vízzel és 50% csapvízzel. 24 órás áztatást követően a fölösleges vizet leöntöttem a szemekről, vékony filmszerű réteget hagyva rajtuk. Ebben az állapotban hidegszobába helyeztem őket további 48 órára, ahonnan 26°C-os csíráztatószekrénybe kerültek a szemek 24 órára. Ezt követően a laboratóriumi asztalon szobahőmérsékleten hagytam a Petri-csészéket, míg a szemek 2-3 cm hosszú gyökeret növesztettek. A gyökerek végeit szükség szerint rövidebbre vágtam majd hidratált Jiffy tőzegpogácsába ültettem a növényeket. Amint a növények elérték a 10 cm-es magasságot 20 cm átmérőjű cserepekbe ültettem át őket. 15-15 növényt tavasszal a szabad ég alatt neveltem, míg később egy másik kísérlet keretében fitotron kamrában, kontrollált körülmények között is neveltem 15-15 növényt.



2. ábra A, ‘Chinese Spring’ (bal o.) és ‘Apogee’ (jobb o.) növények egymás mellett. B, ‘Apogee’ búza kalásza, C, ‘Chinese Spring’ búza kalásza.

4.2 Meiotikus mintavétel

A meiotikus sejtosztódás követi a cirkadián ciklust, ezért ahhoz, hogy a szükséges korai fázisokat fixálni lehessen, napfelkelte után 1-2 órával kell begyűjteni a meiotikus mintákat. A búzakaralásokban zajló meiotikus stádiumokra a zászlós levél hosszából, illetve a levélhüvelybe



3. ábra A meiotikus mintavétel folyamata 'Apogee' kalászáon.

A, Az 'Apogee' búza fiatal kalásza. B, A fiatal kalász egy kimetszett kalászkával a bal oldalon. C A kalászka virágokra bontása. A kimetszett kalászka virágai. D, A kalászka egyik virágjából kimetszett három portok látható.

zárt, óvatosan kitapintott kalász hosszából tudunk következtetni. A nádusz felett finoman összenyomva tapintható a kalász kezdete és vége, amit lemérve hozzávetőlegesen meghatározható a meiotikus fázis.

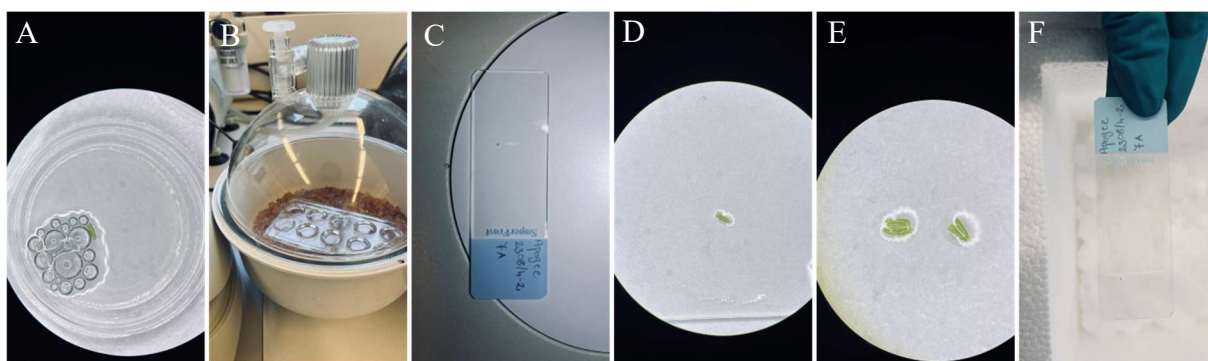
A fixálásra kiválasztott kalászokat a levélhüvelyből óvatosan kifejtettem majd Petricsészében nedves szűrőpapírra helyeztem a kiszáradás elkerülése végett.

A kalászban a kalászkák két sorban váltakozva helyezkednek el (3. ábra), amelyeket a legalsótól kezdve felfele haladva megszámozunk. Minden kalászkában három, különböző fejlettségű virág van, amiket „A”, „B” és „C” jelöléssel azonosítottam. A kísérletek során minden esetben az „A”, illetve „B” virágokból vettem a mintát, mivel ezek a fejlettebbek. Egy kalászon belül a legfejlettebb kalászkák általában a kalász közepén helyezkednek el, attól felfelé és lefelé korábbi sejtosztódási fázisok találhatók.

A meiózis fázisának pontos meghatározásához kiemeltem a legfejlettebb virágot, és a benne található portokat tárgylemezre helyeztem, ecetsavas kármin festéket (Sigma, C1022) cseppentettem rá, kinyomtam a sejteket, majd fáziskontrasztal ellátott fénymikroszkóp alatt azonosítottam a fázist.

4.3 Portokok fixálása PFA-val és preparátum készítés

Amennyiben az osztódási fázis besorolható volt a meiózis I. valamely fázisába, az adott virágon belül fennmaradó két portokot üveg plate-re helyeztem és 1xPBS (phosphate buffered saline, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH7.4) +0,5%-os Igepal (IGEPAL CA-630, Sigma I8896) oldatot cseppentettem rájuk, miközben az üveg plate-et jégre helyeztem (4. ábra).



4. ábra Búza portok fixálása 4%-os paraformaldehid oldattal (nem denaturáló fixáló) és a preparátum készítésének folyamata A, Búza portok kezelése paraformaldehid fixálóban. B, Portok vákumkamrában a fixálás elősegítése érdekében. C, A fixált portok tárgylemezre helyezése. D, Közele kép a tárgylemezre helyezett, pufferben úszó portokról. E, A preparálás első lépéseként a portokot merőlegesen kettévágjuk, majd a benne levő sejteket kiperéseljük. F, A portok falától megszabadulunk, majd a kész preparátumot fedőlemezzel lefedjük és szárazjégre helyezzük.

Izotóniás mikroszűrt, jéghideg paraformaldehid (PFA) (Agar Scientific, Stansted, United Kingdom; No. R1026, 16%) oldatot 4%-osra hígítottunk 1xPBS-ben. Pasteur pipettával leszívtam a PBS-Igepal-DAPI puffer oldatot a portokokról, majd a felesleget szűrőpapírral felitattam, és egy gyors mozdulattal rácseppentettem a 4%-os PFA (3 ml 16% Formaldehyde Solution (w/v) + 7,8 ml MQ víz + 1,2 ml 10xPBS + 60 µL Igepal, Thermo Scientific, 28908) oldatot. Vákumkamrában öt percig vákum alatt inkubáltam a portokokat a fixáló oldatban, majd az üveg plate-et újra jégre helyeztem, ahol további 6 perc 30 másodpercig fixáltam a portokokat. Pasteur pipettával leszívtam a paraformaldehidet, amit a megfelelő veszélyeshulladék gyűjtőbe pipettáztam. A portokok mosásához 1xPBS+0,5%-os igepal+DAPI oldatot használtam 5 percig. Ezt kétszer ismételtam az alapos lemosás érdekében (4. ábra).

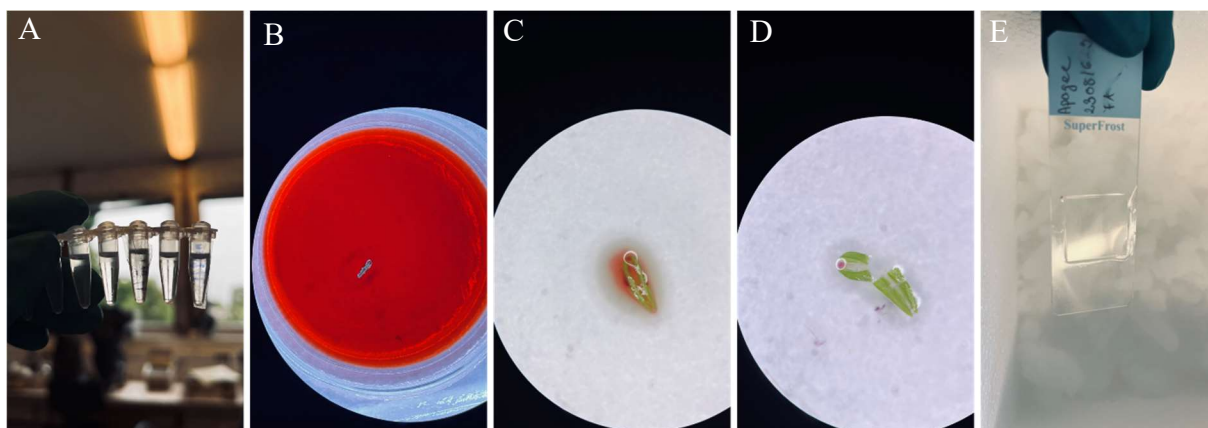
A tárgylemezeken a növények azonosító száma mellett feltüntettem a kalászkák és a virágok azonosításához használt fentebb ismertetett jelölést. A feliratozott tárgylemezre 8 µL 1 X PBS-0,5% Igepál+ 4' 6'-Diamino-2-Phenylindole dihydrochlorid 1µg/ml-es oldatát (DAPI) mértem majd behelyeztem a portokot. Merőleges pengevágással kettévágtam a portokot és két tüvel kiperéseltem a sejteket tartalmazó oszlopokat. A bent maradt portokokat kiszedtem és 18x18 cm-es fedőlemezzel lefedtem a mintát, szükség esetén pótoltam a PBS-Igepal oldatot. Egy

preparálólándzsa segítségével finoman megkocogtattam a fedőlemezt, hogy a sejtek minél jobban eltávolodjanak egymástól. Mikroszkóppal ellenőriztem a preparátum minőségét, szükség esetén pótoltam a PBS-Igepal oldatot és borszeszégővel melegítettem, majd megnyomtam a fedőlemezt, ezzel is azt a célt szolgálva, hogy a sejtek eltávolodjanak egymástól és minél laposabbak legyenek (4. ábra).

A kész preparátumot szárazjégre helyeztem ($-78,5^{\circ}\text{C}$, 4. ábra) majd 10 perc eltelte után egy penge segítségével határozott mozdulattal lepattintottam a fedőlemezt és gyémántceruzával jelöltem a minta helyét. Ekkor a preparátum készen állt az immunjelölésre. Addig is -80°C fokon tároltam az elkészült preparátumokat.

4.4 Portokok fixálása Carnoy I-el és preparátum készítés

Ennél a fixálási módnál a portokokat abszolút alkohol-jégecet 3:1 arányú keverékből készült fixáló (Carnoy I) oldatba helyeztem (5. ábra). Az így fixált portokok 4°C -on tárolva pár hét után is alkalmasak voltak preparátum készítésre.



5. ábra Portok fixálása Carnoy I-el (denaturáló fixálás) és a preparátumkészítés folyamata
A, Portokok kezelése Carnoy I fixáló oldatban. B, Portok áztatása ecetsavas kármin oldatban. C, Portok áztatása ecetsavban. D, A tárgylemezre helyezett portok merőlegesen kettévágva. E, Kész sejtmag preparátum szárazjégen.

Preparátum készítéshez a portokot ecetsavas kármin festőoldatban áztattam 2 percig, majd feliratozott tárgylemezre helyeztem. 60%-os ecetsavat cseppentettem a portokra és pengével keresztben kettévágtam, majd másfél percig áztattam a festőoldatban. Két preparáló wolframtű segítségével kipréseltem a meiotikus sejtoszlopokat a portokból, majd a portok falát eltávolítottam a tárgylemez felületéről. A wolframtűvel elkevertem a sejtoldatot, majd üveg fedőlemezzel lefedtem a mintát és szükség szerint utánpótoltam a 60%-os ecetsavból. A mintát mikroszkóppal ellenőriztem és borszeszégővel melegítettem, majd hüvelykujjammal segítségével

egy közepesen erős nyomást helyeztem a fedőlemezre, ami után a mintát szárazjégre helyeztem (5. ábra). Az így készült preparátumok szintén alkalmasak a tárolásra -80°C-on.

4.5 Ellenanyag előállítás

A rizs (*Oryza sativa*) HEI10 fehérje (Wang et al., 2012b) Uniprot, I6PL68, HEI10_ORYSJ) szekvenciája alapján megkerestük a kenyérbúza és az árpa genomok által kódolt HEI10 fehérjék szekvenciáját (a búza 6B kromoszómán kódolt gén által előállított fehérje azonosítója: A0A3B6PMS7; a búza 6D kromoszómán kódolt fehérje azonosítója: A0A3B6QH05; az árpa genom által kódolt HEI10 fehérje szekvencia: F2D7A7). Célunk két olyan rövid aminosav szekvencia kiválasztása volt, amely a vizsgált genomok között nagyfokú homológiát mutat, ezáltal az ellene termelt ellenanyag mindhárom fajban nagy valószínűséggel alkalmazható a HEI10 fehérje kimutatására. További szempontként azt vettük figyelembe, hogy a fehérje 3D szerkezetmodelljének egy könnyen hozzáférhető pontján helyezkedjenek el, így immunjelölés során megfelelő epitópként viselkedhetnek majd. A fehérjeszerkezet vizsgálata után az N-terminális véghez közeli szekvenciákat jelöltünk ki, amelyek a következők voltak: KFAEKSQRKRKLDEMY és ALRNMIISPVKRPQ.

4.6 Immunjelölés

Az immunjelölés során az előkészített sejtmagpreparátumokra egy elsődleges ellenanyag oldatot pipettáztam, ami az inkubációs idő során a sejtmagokba jutva felismeri a megfelelő fehérjék epitópjait és hozzájuk kötődik. Ezt követően egy fluorokrómmal jelölt másodlagos ellenanyagot juttattam a sejtekhez, amely az elsődleges ellenanyaghoz specifikusan kapcsolódva fluoreszcensen megjelölte a kimutatni kívánt fehérjét. A fluoreszcens jelet konfokális mikroszkóp segítségével detektáltam.

Első lépésként összeállítottam az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatot, amiből az 1 tárgylemezhez szükséges mennyiségek a következők voltak: 0,25 µl (1:200) tengerimalacban előállított HEI10 fehérje elleni ellenanyag (GP 121 jelű cső, Eurogentec, Belgium), 0,25 µl (1:200) patkányban termelt ZYP1 fehérje elleni ellenanyag (Higgins et al., 2005a), 50 µl TNB Glicin 0,2 % Triton X-100, 0,2 % Igepal. A TNB oldat készítését az alábbi módon végeztem: összemértem 2 ml 1M Tris HCl (pH 7,5), 1 ml 3M NaCl és 2 ml 5%-os blokkoló reagenst (Blocking reagent 11096176001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) tartalmazó oldatot majd ehhez 20 ml steril desztillált vizet adtam. A TNB Glicin oldat elkészítése a következőképpen történt: 10 ml TNB oldathoz hozzámértem 0,225 g Glicin-t. Ebből készítettem a TNB Glicin 0,2 % Triton X-100, 0,2 % Igepal oldatot, amelyhez 100 µl TNB

Glicin oldatba 0,2 µl Triton X-100 (SLCJ6163, Sigma) és 0,2 µl Igepal (CA-630, Sigma I8896) detergenst mértem ki.

Az összemért oldatot 1,5 ml-es Eppendorf csőben 30 másodpercig kevertettem (Vortex). Pipettával rámértem 50 µl oldatot a szobahőmérsékleten felmelegített meiotikus preparátumra és puha, műanyag fedőfóliával lefedtem. Műanyag dobozban, megfelelő páratartalom mellett +4°C-on inkubáltam a tárgylemezeket 36 órán keresztül.

Az immunjelölés második szakaszának első lépéseként összemértem a másodlagos antitesteket tartalmazó oldatot, amiket az elsődleges ellenanyagot termelő állatfajoknak megfelelően választottam ki. Az egy tárgylemezhez használt mennyiségek a következők voltak: 0,16 µl (1:300) poliklonális, tengerimalac antitestet felismerő másodlagos ellenanyag (Goat anti-Guinea Pig IgG, Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, A11073, Invitrogen, Waltham, MA, USA), 0,16 µl (1:300) poliklonális, patkány antitestet felismerő másodlagos ellenanyag (Goat anti-Rat IgG, Cross-Adsorbed Secondary Antibody, DyLight 594, Invitrogen), amelyeket 50 µl TNB Glicin 0,2 % Triton X-100, 0,2 % Igepal oldatba mértem. A 1,5 ml-es Eppendorf csőbe mért oldatot 30 másodpercig kevertettem (Vortex) és jégen tartottam. Az eddig +4°C-on tartott sejtmag preparátumokról eltávolítottam a műanyag fedőfóliát és 2x5 percen keresztül 1xPBS pufferben lemostam, majd visszahelyeztem a műanyagdobozba és pipettával rámértem a másodlagos ellenanyagot. Műanyag fedőfólia ráhelyezését követően 45 percig 37°C-on inkubáltam a preparátumokat. Újabb 2x5 perces 1xPBS-es lemosás után 24x32 cm-es üveg fedőlemezre rámértem 14 µl 4',6-Diamidino-2-Fenilindol-t (DAPI) tartalmazó Vectashield (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI, H-1200, Vector Laboratories, USA) kontrasztfestő és fakulásgátló (antifade) oldatot, majd felülről óvatosan rányomtam a mintát hordozó tárgylemezre és megnyomtam. Az így elkészült, lefedett preparátumokat +4°C-on tároltam és konfokális mikroszkóppal vizsgáltam.

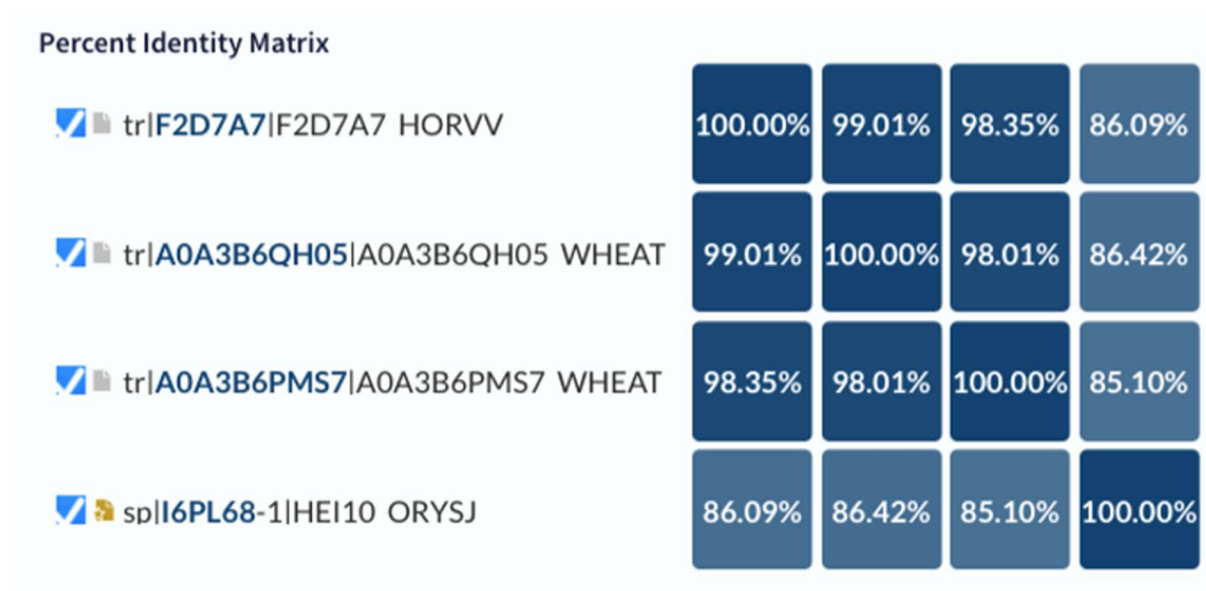
4.7 Konfokális lézerpásztázó mikroszkópia

A fluoreszcens jeleket Leica TCS SP8 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal detektáltam (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). A konfokális képeket egy HC PL APO CS2 63×/1.40 olaj immerziós objektív segítségével készítettem. A DAPI kontrasztfesték jelét 405 nm-en gerjesztettem majd 410 és 470 nm között detektáltam. Az immunjelöléshez használt másodlagos ellenanyagok jelét a következő beállítások mellett vizsgáltam: az Alexa Fluor 488-jelét 488 nm-en gerjesztettem és 490-től 560 nm-ig detektáltam; a DyLight 594 fluorokrómot 561 nm-en gerjesztettem és 600-tól 660 nm-ig detektáltam.

5 Eredmények és értékelésük

5.1 A HEI10 ellenanyag előállítása és tesztelése

Annak érdekében, hogy búzában (és később más gabonafélékben) a meiotikus rekombináció által kialakított kromoszómális átkereszteződések pozícióit immunocitokémiai módszerekkel kimutathassuk és pontosan számszerűsíthessük egy olyan ellenanyag előállítására volt szükség, amely a kromoszómális átkereszteződések hibajavító mechanizmusaiban,érésében alapvető szerepet játszó fehérjét képes megbízhatóan kimutatni. A választás a HEI10 fehérjére esett, mivel a meiózis korai szakaszában már megjelenik és a későbbi fázisokban jól mutatja az érett krosszóverek helyeit. Az ellenanyag előállításhoz szükségünk volt a fehérje szekvenciájára, amelyből két rövidebb szakasznak megfelelően két rövidebb peptidet kívántunk szintetizáltatni, majd ezeket egy immunizációs program keretében tengerimalac állatokba injektálva ellenanyag előállításra használni.



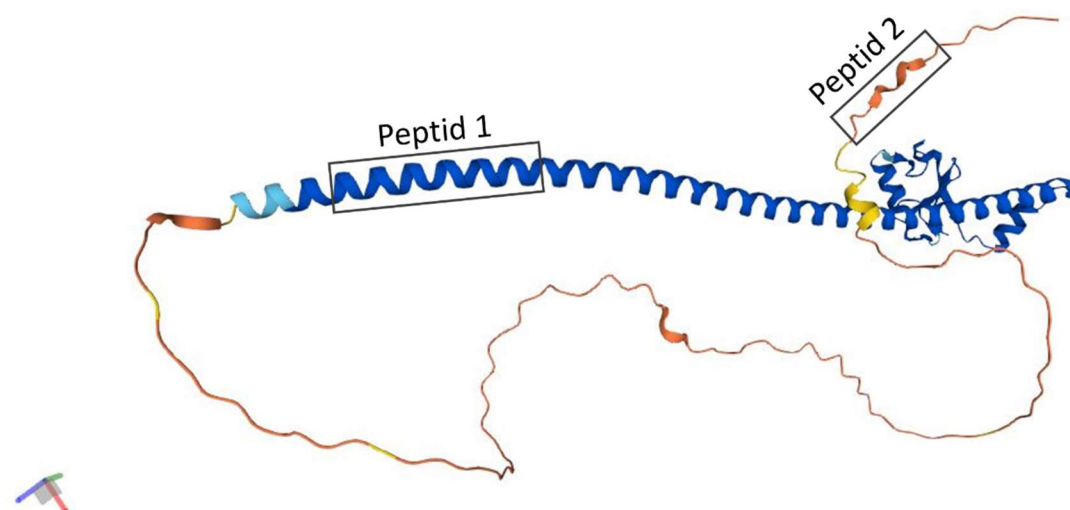
6. ábra A rizs, a Búza B, D genomja és az árpa genomja által kódolt HEI10 fehérjék aminosav szekvenciájának identitás mátrixa. Felső sor/első oszlop: árpa HEI10 fehérje szekvencia; második sor/oszlop: a búza B genom HEI10 fehérje; harmadik sor/oszlop: búza D genom HEI10 fehérje szekvencia; negyedik sor/oszlop: rizs HEI10 fehérje szekvencia. A mátrix a különböző fajok/genomok által termelt HEI10 fehérjék szekvenciái közötti homológiát szemlélteti.

A HEI10 fehérje és az azt kódoló gén rizsből közölt szekvenciája alapján megkerestük a búza és az árpa HEI10 DNS és aminosav szekvenciáit az EnsemblPlants DNS szekvencia (<https://plants.ensembl.org/index.html>) és az Uniprot fehérje adatbázisban (<https://www.uniprot.org>). A búza három homológ genomja közül csak kettőben a B és a D genomban sikerült beazonosítani a HEI10 fehérjét kódoló géneket majd az előállított fehérjék

szekvenciáját. A beazonosított gének a búza 6B és 6D kromoszómáin helyezkednek el. Az árpa szekvenciájára azért volt szükségünk, mert az ellenanyag tervezésekor fontos szempont volt, hogy a kész ellenanyag más rokon fajon is alkalmazható legyen. Az árpa HEI10 génje az árpa 6H kromoszómáján található. A rizs genomja, a búza B és D genomjai és az árpa genomja által kódolt HEI10 fehérjék aminosav szekvenciáinak százalékban kifejezett identitás mátrixa (percent identity matrix) megmutatta, hogy a négy fehérje szekvencia nagy százalékban homológ egymással (6.-7a. ábra).

Ennek köszönhetően a fehérje nagyrésze alkalmasnak bizonyult a peptid szekvenciák esetleges azonosítására. Mivel az immunizációs program idő és költségigényes, fontos volt olyan pozíciókat választani, amelyek nagy biztonsággal a fehérje egy könnyen hozzáférhető régióján helyezkednek el. Ehhez az AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk>) fehérjemodellező adatbázist használtuk, amely segítségével a fehérje C-terminusához közel egy túlnyúló régiót azonosítottunk (7b. ábra). Ezen belül két rövid aminosav szekvenciát választottunk, majd a fent leírt módon, ellenanyag előállításra használtuk.

Consensus sp I6PL68 HEI10 tr A0A3B6PMS7 A tr F2D7A7 F2D7A	MKCNACWRELEGQAITTTTCGHLCTEDAKKILSNDGACPICDQVLSKSHMKPTDINPSDEWTNMSMTGVSPQILMKSAYR MKCNACWRELEGQAVSTTCGHLCTEDAKKILSNDGACPICDQVLSKSHMRPVDNPNDDWTNMSAGVSPQILMKSAYR 80 MKCNACWRELEGQAITTTTCGHLCTEDAKKILSNDGACPICDQVLSKSHMKPTDINPSDEWTNMSMTGVSPHILMKSAYR 80 MKCNACWRELEGQAITTTTCGHLCTEDAKKILSNDGACPICDQVLSKSHMKPTDINPSDEWTNMSMTGVSPQILMKSAYR 80 MKCNACWRELEGQAITTTTCGHLCTEDAKKILSNDGACPICDQVLSKSHMKPTDINPSDEWTNMSMTGVSPQILMKSAYR 80
Consensus sp I6PL68 HEI10 tr A0A3B6PMS7 A tr F2D7A7 F2D7A	SVMFYIGQKDEMAYKMNRIVGQCRQKCEVMQAKFTEKLEEVHAAAYQMAKRCQLMEQEIEENLTRDKQELQEKFAEKSRQ SVMFYIGQKDEMAYKMNRIVGQCRQKCEVMQAKFTEKLEEVHAAAYQMAKRCQLMEQEIEENLTRDKQELQEKFAEKSRQ 160 SVMFYIGQKDEMAYKMNRIVGQCRQKCEVMQAKFTEKLEEVHAAAYQMAKRCQLMEQEIEENLTRDKQELQEKFAEKSRQ 160 SVMFYIGQKDEMAYKMNRIVGQCRQKCEVMQAKFTEKLEEVHAAAYQMAKRCQLMEQEIEENLTRDKQELQEKFAEKSRQ 160 SVMFYIGQKDEMAYKMNRIVGQCRQKCEVMQAKFTEKLEEVHAAAYQMAKRCQLMEQEIEENLTRDKQELQEKFAEKSRQ 160
Consensus sp I6PL68 HEI10 tr A0A3B6PMS7 A tr A0A3B6QH05 A tr F2D7A7 F2D7A	KRKLDENYDQLRNEYESVKRSIQPANNYFPRAQPDLSFGMPNILDSDGDLRQGSIDPPETPGRRDEGWAPQPRQRRENS KRKLDENYDQLRSEYESAKRSIQPANNYFPRAQPDLSFGVPNIMDSDDLRLQGLAGLPETPGRRDEGWAPQPRQRRENS 240 KRKLDENYDQLRSEYESAKRSIQPANNYFPRAQPDLSFGVPNIMDSDDLRLQGLAGLPETPGRRDEGWAPQPRQRRENS 240 KRKLDENYDQLRSEYESAKRSIQPANNYFPRAQPDLSFGVPNIMDSDDLRLQGLAGLPETPGRRDEGWAPQPRQRRENS 240 KRKLDENYDQLRSEYESAKRSIQPANNYFPRAQPDLSFGVPNIMDSDDLRLQGLAGLPETPGRRDEGWAPQPRQRRENS 240
Consensus sp I6PL68 HEI10 tr A0A3B6PMS7 A tr A0A3B6QH05 A tr F2D7A7 F2D7A	GPFEISGGSPGHTAAPPMDMRPRQXPRSVFGANMNSSTALRNMIISPVKRPQP-RNRPQMFT GPFEISAGSPAHNAAAPPVDIRPRQPARPVFGTAMNNTSAAALRNMIISPVKRPQLSRNRPQMFT- 303 GPFEISGGSPGHTAAPPMDMRPRQLPRSVFGANMNSSTALRNMIISPVKRPQP-RNRPQMFTL 303 GPFEISGGSPGHTAAPPMDMRPRQPPRSVFGANMNSSTALRNMIISPVKRPQP-RNRPQMFT- 302 GPFEISGGSPGHTAAPPMDMRPRQLPRSVFGANMNSSTALRNMIISPVKRPQP-RNRPQMFTL 303



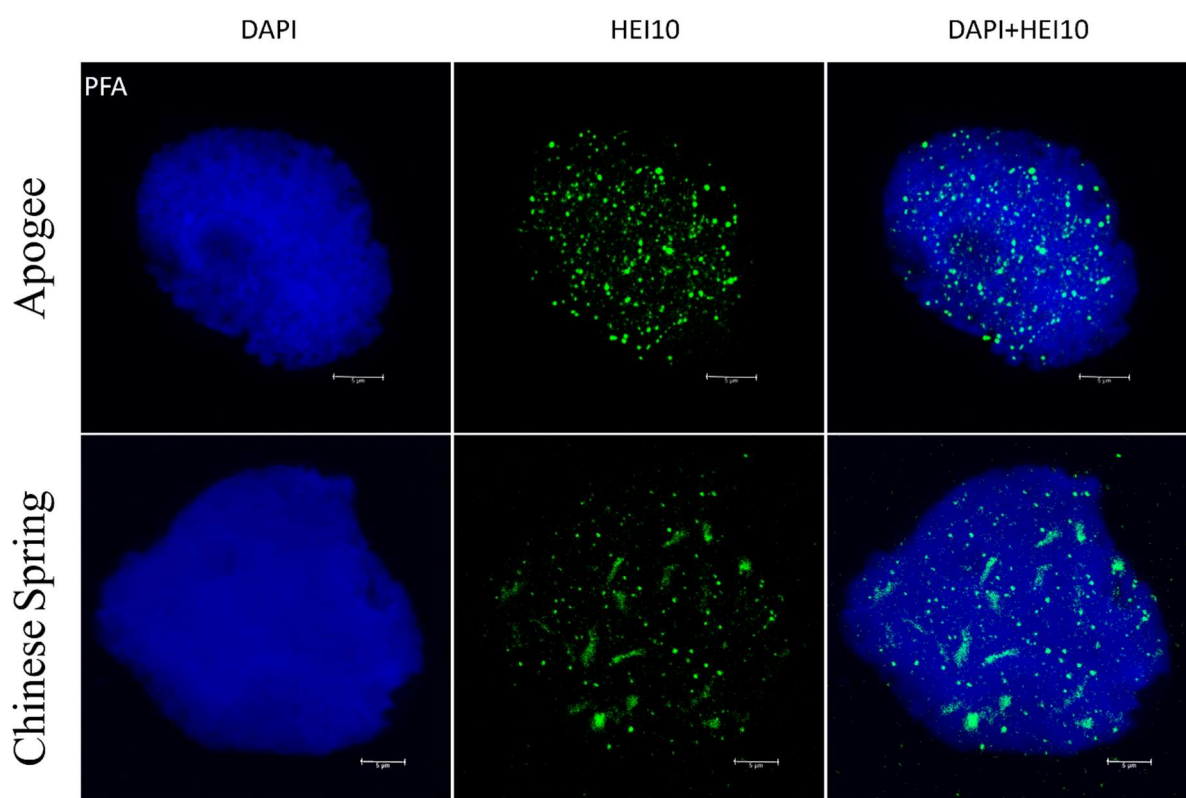
7. ábra

7a, A rizs (felső sor)-, a búza B, D genomja (második, harmadik sor) és az árpa (negyedik sor) genomja által kódolt HEI10 fehérjék aminosav szekvenciájának összehasonlító vizsgálata. A szürke mezővel jelölt részek a fajok közötti homológiát mutatják. 1. peptid: KFAEKSRQKRKLDENY; 2. peptid: ALRNMIISPVKRPQP.

7B, ábra A kenyérbúza B genomja által termelt HEI10 fehérje szerkezetmodellje (forrás: AlphaFold). A szürke kerettel jelölt részek az ellenanyag által felismert peptid szekvenciákat mutatják.

A kapott ellenanyag HEI10 fehérjére való specifitását (arra való alkalmasságát, hogy kimutassa a HEI10 fehérjét) immunjelöléssel ellenőriztük. A vizsgálatot a nagyobb megbízhatóság kedvéért, két búzafajta meiotikus sejtmag preparátumain végeztük el. A preparátumokat nem denaturáló fixálással készítettük elő, amely megőrizte a sejtmagban található fehérjék natív szerkezetét, ezáltal biztosítva azok kimutatását.

Immunjelöléssel kimutattuk a meiotikus rekombináció hibajavító folyamataiban és a befejezett kromoszómális átkereszteződések kialakításában kulcsfontosságú HEI10 fehérjét (8. ábra). Az immunjelölés során másodlagos ellenanyaghoz kötött Dylight 594 (HEI10, zöld) fluorokrómot használtam, illetve a sejtmag jobb nyomonkövetéséhez DAPI kontrasztfestést (kék) végeztem. A kísérlet igazolta, hogy az ellenanyag az elvárásnak megfelelően pontszerű jeleket ad, amely kolokalizál a DAPI által jelölt kromatinnal.



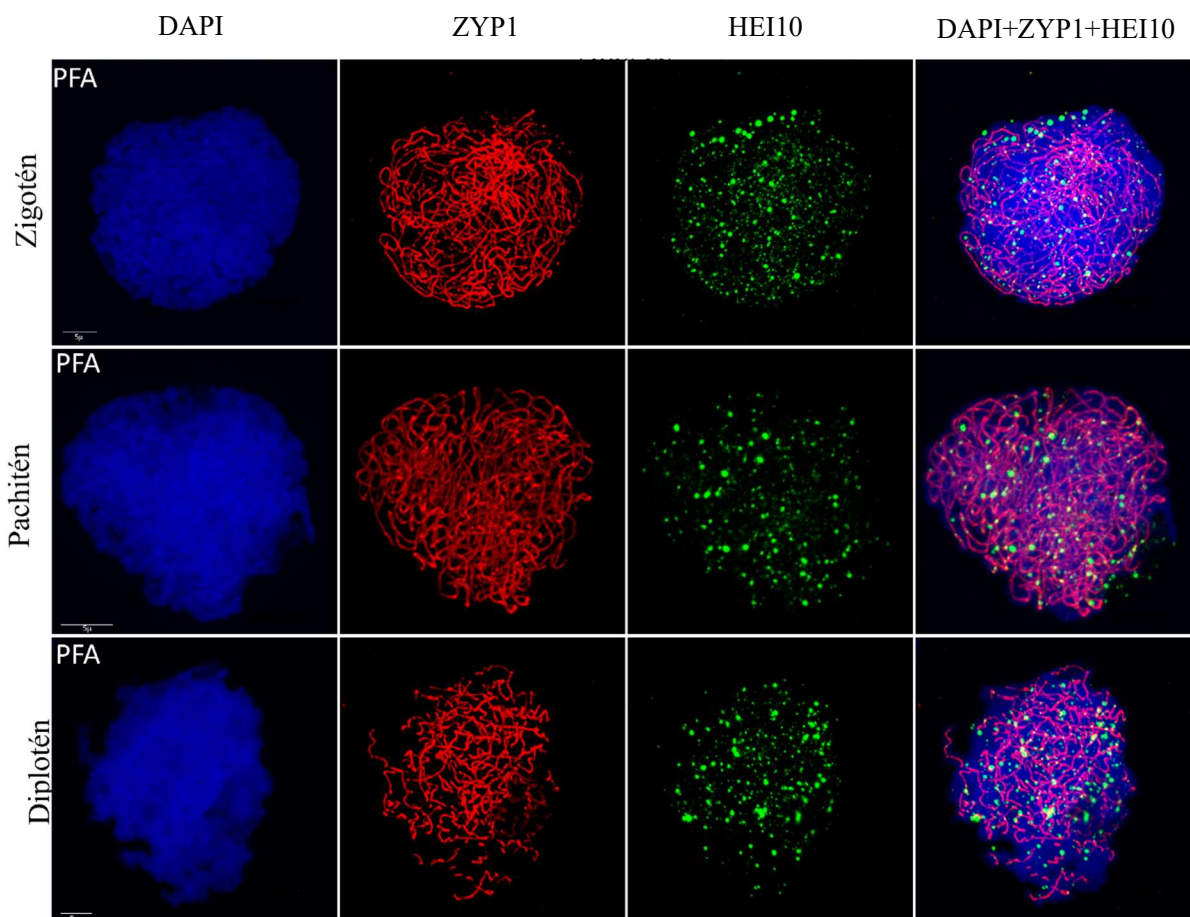
8. ábra Az 'Apogee' és 'Chinese Spring' búzafajták mikroszkópos képe DAPI kontrasztfestés és az anti-HEI10 ellenanyag immunjelölést követően. DAPI (kék) kontrasztfestés mutatja a kromatint, míg a HEI10 (zöld) ellenanyag jele a rekombinációs pontokat. A HEI10 kolokalizál a kromatinnal, nukleáris jelet ad.

Annak érdekében, hogy direkt bizonyítékot találjunk arra, hogy a HEI10 ellenanyag valóban a meiotikus kromoszómákkal alkotnak közös pontokat, szükség volt egy új fehérje marker bevezetésére.

5.2 A HEI10 ellenanyag tesztelése a szinaptonémás komplex függvényében

A szinaptonémás komplex a meiózis korai fázisaiban, a meiotikus rekombináció eseményeivel egyidőben felépül a homológ kromoszómák között, azokat fokozatosan összekapcsolja (1. ábra). A szinaptonémás komplex felépülésének stádiuma, időben pontosan mutatja a meiózis korai fázisának, a profázisnak az előrehaladását és kolokalizál a rekombinációs folyamatokkal.

A szinaptonémás komplex felépülése jól követhető a ZYP1 fehérje immunjelölésével, amely a munkám megkezdésekor már rutinszerűen működött a kutatócsoporton belül. Ennek megfelelően a következő lépésben nem denaturáló fixálással előkészített preparátumokon co-immunolabelling technikával, a HEI10 ellenanyagot együttesen alkalmaztam a ZYP1 fehérje elleni ellenanyaggal. A két fehérjét eltérő fluorokrómokkal kívántam detektálni (9.ábra).

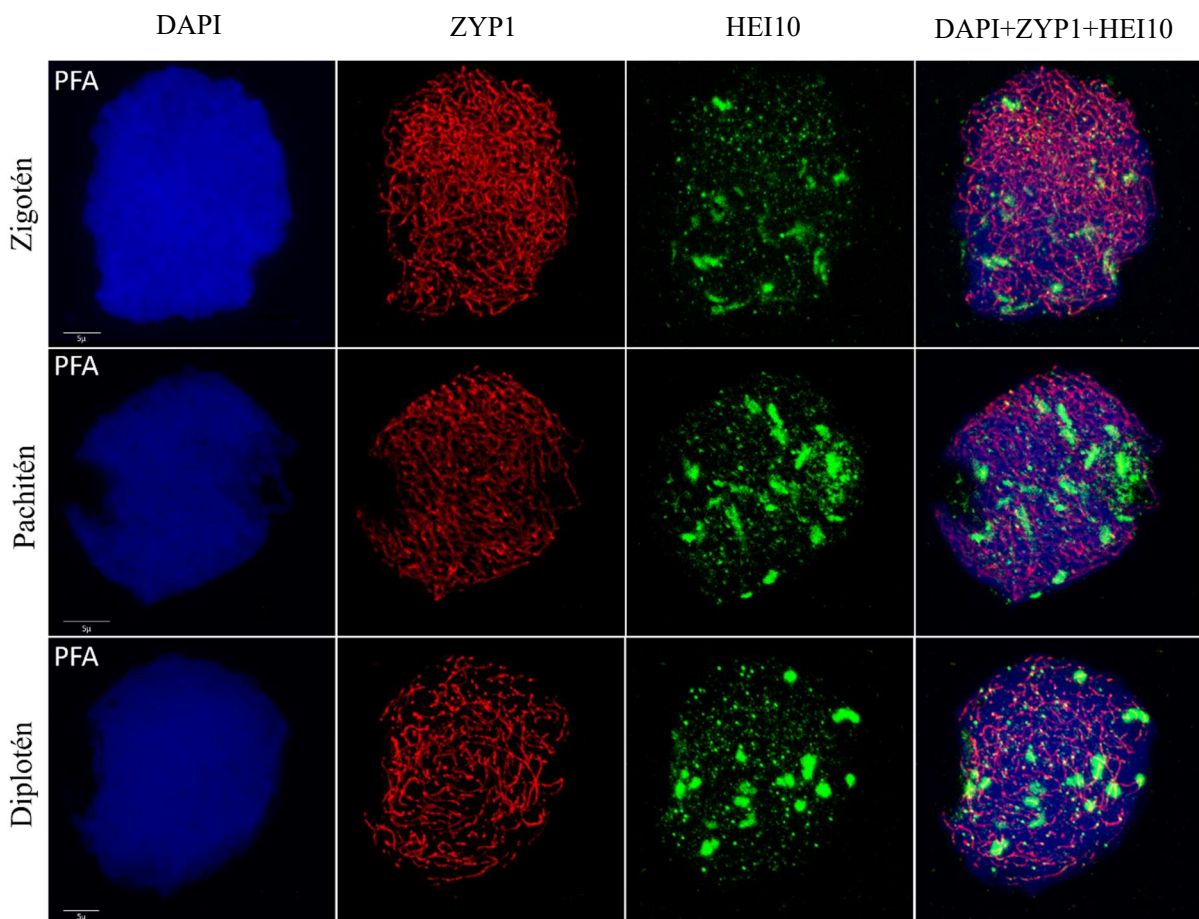


9. ábra Az 'Apogee' búzafajta mikroszkópos képe DAPI kontrasztfestés, anti-ZYP1 és anti-HEI10 ellenanyag immunjelölést követően. DAPI (kék)kontrasztfestés mutatja a kromatint, az anti-ZYP1 (piros) a szinapszist alkotó homológ kromoszómákat, míg az anti-HEI10 (zöld) a rekombinációs pontokat. A HEI10 ellenanyag jele kolokalizál az anti-ZYP1 jellel és a kromatinnal. A profázis I. alfázisait (zigotén, pachitén, diplotén) a ZYP1 jel alapján azonosítottuk. Zigoténben nem fut végig a sejtmagon a ZYP1 jel, pachiténben a ZYP1 által mutatott fonalszerű jel kitölti a sejtmagot, diploténban újra felszakadozik és spirálszerű jelet ad.

A szinaptonémás komplex fehérje immunjelölésével (ZYP1, Alexa 488 fluorokróm) a profázis következő szakaszait azonosítottam: 1.) zigotén fázisban a homológ kromoszómák elkezdnek összekapcsolódni a szinaptonémás komplex centrális eleme segítségével, ezért ez a fázis a ZYP1 jel megjelenésével azonosítható, azonban ez itt még nem teljesen folytonos, először rövidebb, majd hosszabb fonalszerű szakaszokként jelennek meg. 2.) Pachitén fázisban már a szinapszis teljes hosszban végigfut a két homológ kromoszóma között, ezért itt a ZYP1 jel már

teljesen összefüggő a két homológ kromoszóma mentén. 3.) Diploténben a szinapszis elkezd felbomlani a homológok között, tehát a ZYP1 jele ilyenkor fokozatosan felszakadozik.

A co-immunolabelling módszer segítségével így azonosítani tudtam a meiotikus sejtmagok fejlettségi állapotát és vizsgáltam, hogy a HEI10 pontszerű jelei egybeesnek-e a kimutatott ZYP1 fehérje fonalszerű jelével (9. ábra).



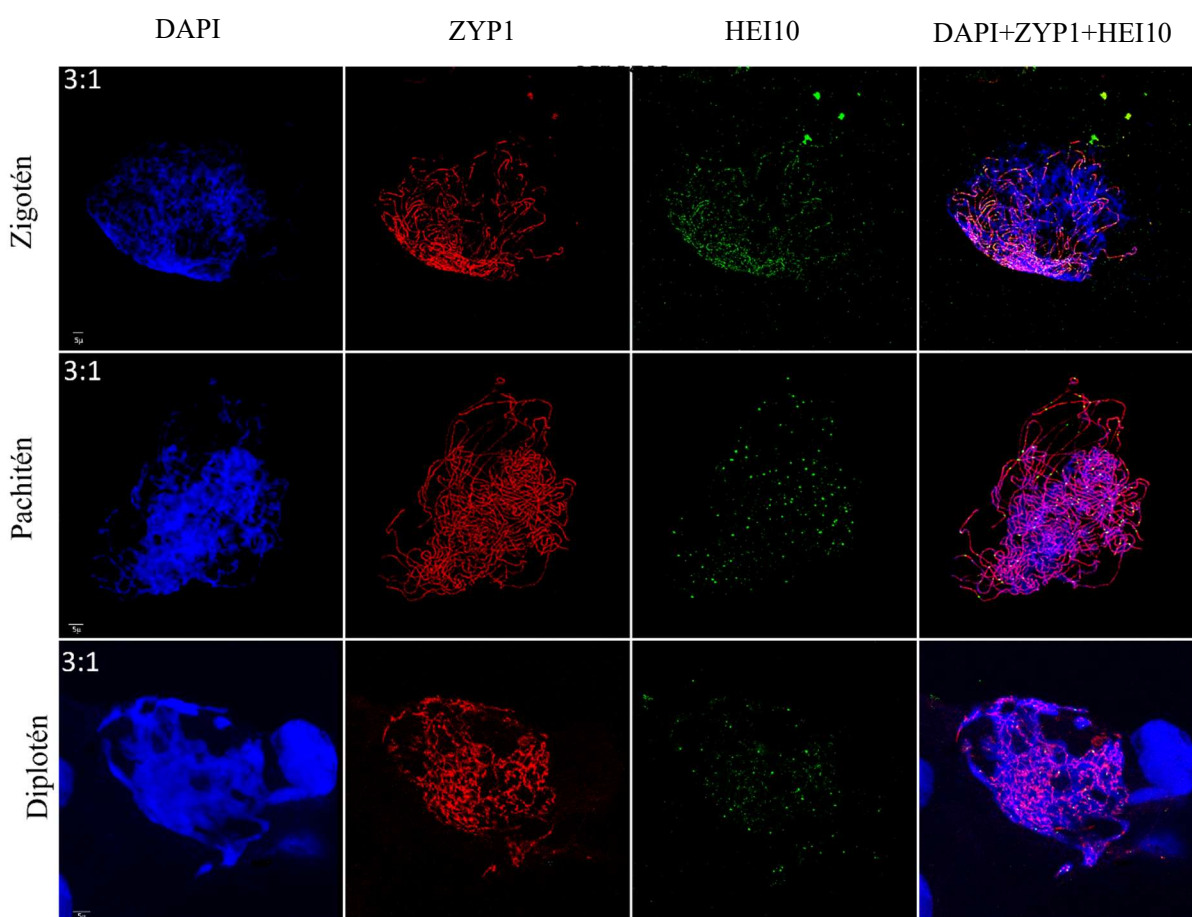
10. ábra a 'Chinese Spring' búzafajta mikroszkópos képe anti-ZYP1 és anti-HEI10 ellenanyag immunjelölést követően. DAPI (kék)kontrasztfestés mutatja a kromatint, az anti-ZYP1 (piros) a szinapszist alkotó homológ kromoszómákat, míg az anti-HEI10 (zöld) a rekombinációs pontokat. A HEI10 ellenanyag jele kolokalizál az anti-ZYP1 jellel és a kromatinnal. A profázis I. alfázisait (zigotén, pachitén, diplotén) a ZYP1 jel alapján azonosítottuk. Zigoténben nem fut végig a sejtmagon a ZYP1 jel, pachiténben a ZYP1 által mutatott fonalszerű jel kitölti a sejtmagot, diploténben újra felszakadozik és spirálszerű jelet ad.

Mindkét genotípus esetében a HEI10 jel egy jelentős része egybeesett a ZYP1 fehérjéével mind zigotén, pachitén és diplotén fázisokban, azonban a zigoténben látható HEI10 jelek száma több volt, mint a későbbi fázisokban (10. ábra).

Az imént bemutatott kísérlet során a meiotikus sejteket nem denaturáló fixálással preparáltam. A specifikus jelek beazonosítását nehezítette, hogy a HEI10 jelölése erős háttérzajt mutatott a felvételeken, ezért kipróbáltunk egy másik fajta fixálási módot annak érdekében, hogy ezt a problémát kiküszöböljük.

5.3 HEI10+ZYP1 denaturáló fixálás

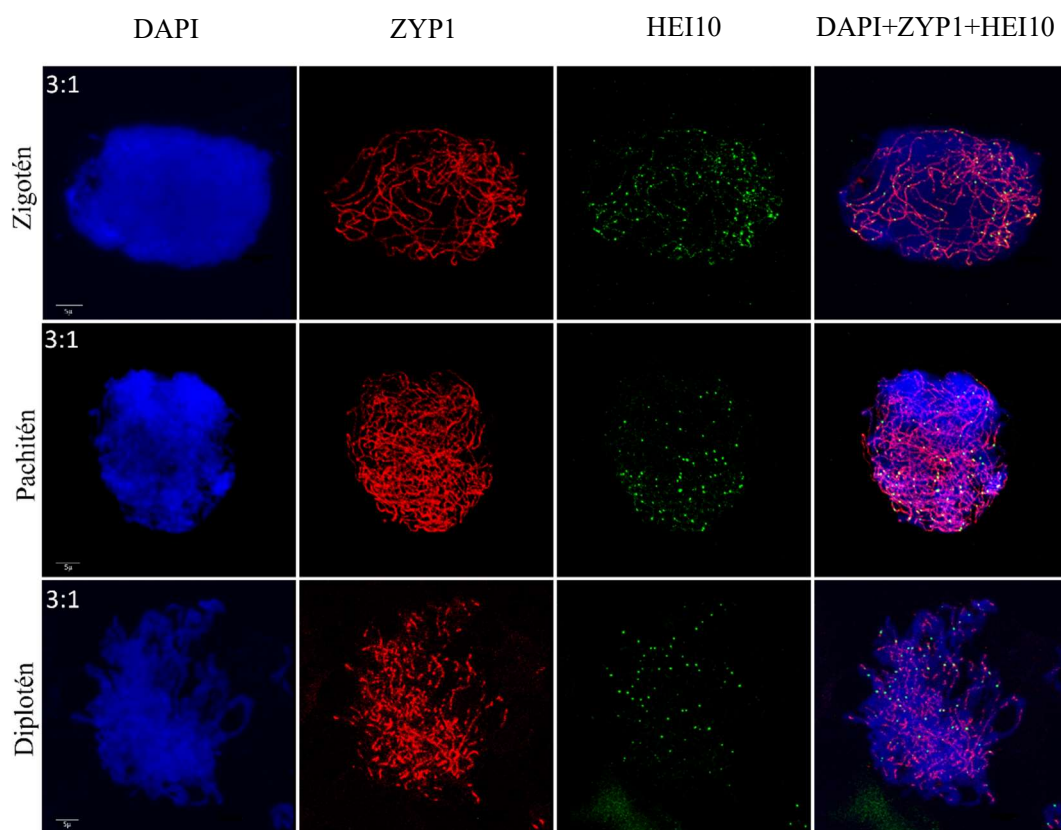
A denaturáló fixálás során a tartósításhoz jégcet és abszolút alkohol keverékével kezeljük a mintákat, ami a sejtmagon belül található fehérjék nagy részét kicsapja és a sejtmagok eredeti, háromdimenziós szerkezete is eltűnik. Fehérjekárosító hatásuk ellenére, a denaturáló fixálók feltárhatják egyes, nehezen hozzáférhető fehérjék epitópjait, míg a citoplazma hatékony kicsapása és eltávolítása révén a nem specifikus háttérjelölés csökkenhet. A következő kísérletekhez a korábban használt két búzafajta az ‘Apogee’ és a ‘Chinese Spring’ fiatal portokaiból ismételt mintát gyűjtöttem, ezúttal denaturáló módon fixálva a sejteket. A fixálást követően, a meiotikus preparátumok készítésekor is magas koncentrációjú ecetsavat és magas hőmérsékletet (lángolás) alkalmaztam a citoplazma eltávolítása érdekében. A co-immunojelölés módszerét az előzőekben leírt módon használtam. Az ‘Apogee’ búzafajta jelölését követően azt tapasztaltam, hogy a ZYP1 fehérje a nem-denaturáló fixáláshoz hasonlóan határozott fonalas jelet adott a DAPI-val jelölt kromatin mentén.



11. ábra ‘Apogee’ búzafajta mikroszkópos képe denaturáló fixálást követően. DAPI kontrasztfestés (kék), anti ZYP1 (piros) és anti HEI10 (zöld) ellenanyag jelölését követően. A DAPI mutatja a kromatint, az anti ZYP1 a homológ kromoszómákat, míg az anti HEI10 a rekombinációs pontokat. A HEI10 jel kolokalizál a kromatinnal és az anti ZYP1 jellel, nukleáris jelet ad. Az

alfázisokat a ZYP1 jel alapján azonosítottuk. Zigoténben nem fut végig a sejtmagon a ZYP1 jel, pachiténben kitölti a fehérje a sejtmagot, diploténban újra felszakadozik és spirálszerű jelet ad.

Zigoténben részben kitöltve a sejtmag határait, míg pachiténben teljesen végigfutott a kromatinszálak mentén. Diploténben szaggatott, kissé spirálszerű jelet adott. A ZYP1 immunjelöléssel kapott jele azt mutatta, hogy a denaturáló fixálási és preparálási módszer alkalmas a ZYP1 fehérje immunjelölésére. A HEI10 fehérje jele hasonlóan a nem-denaturáló fixálásnál kapott képhez, pontszerű volt, azonban a ZYP1 jelöléssel nem egybeeső, háttér jel jelentősen csökkent (11; 12. ábra).

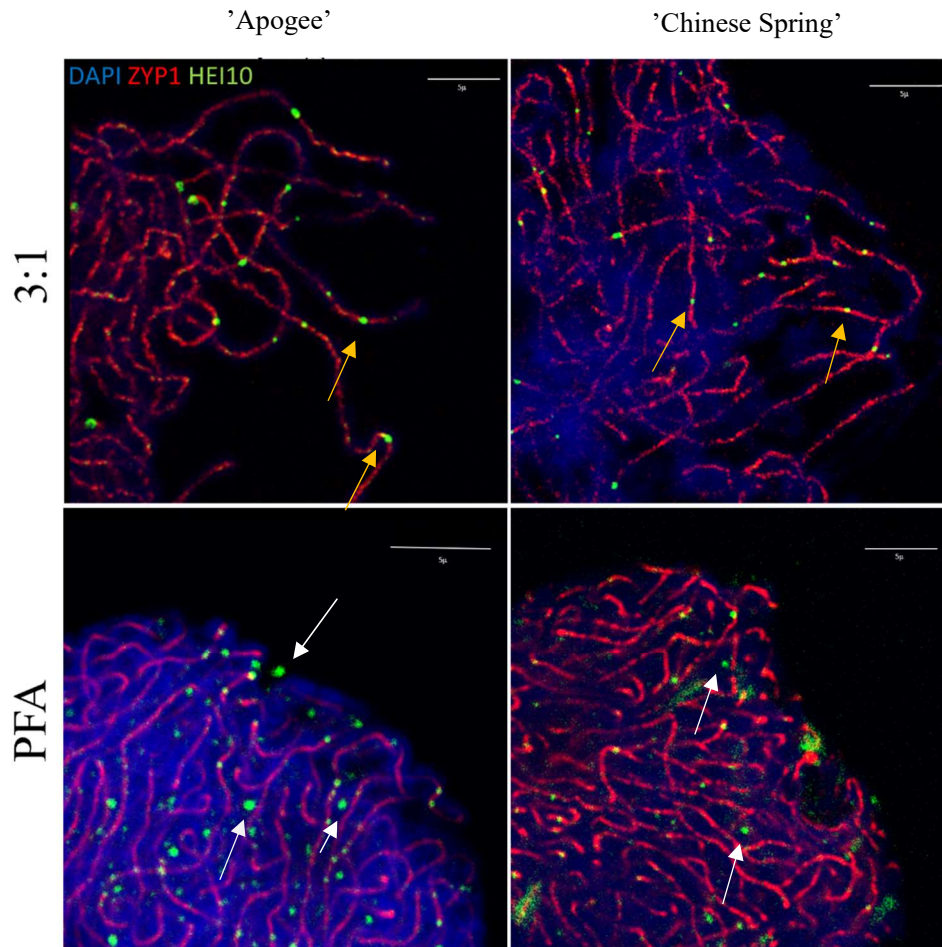


12. ábra 'Chinese Spring' búzafajta mikroszkópos képe denaturáló fixálást követően. DAPI kontrasztfestés (kék), anti ZYP1 (piros) és anti HEI10 (zöld) ellenanyag jelölését követően. A DAPI mutatja a kromatint, az anti ZYP1 a homológ kromoszómákat, míg az anti HEI10 a rekombinációs pontokat. A HEI10 jel kolokalizál a kromatinnal és az anti ZYP1 jellel, nukleáris jelet ad. Az alfázisokat a ZYP1 jel alapján azonosítottuk. Zigoténben nem fut végig a sejtmagon a ZYP1 jel, pachiténben kitölti a fehérje a sejtmagot, diploténban újra felszakadozik és spirálszerű jelet ad.

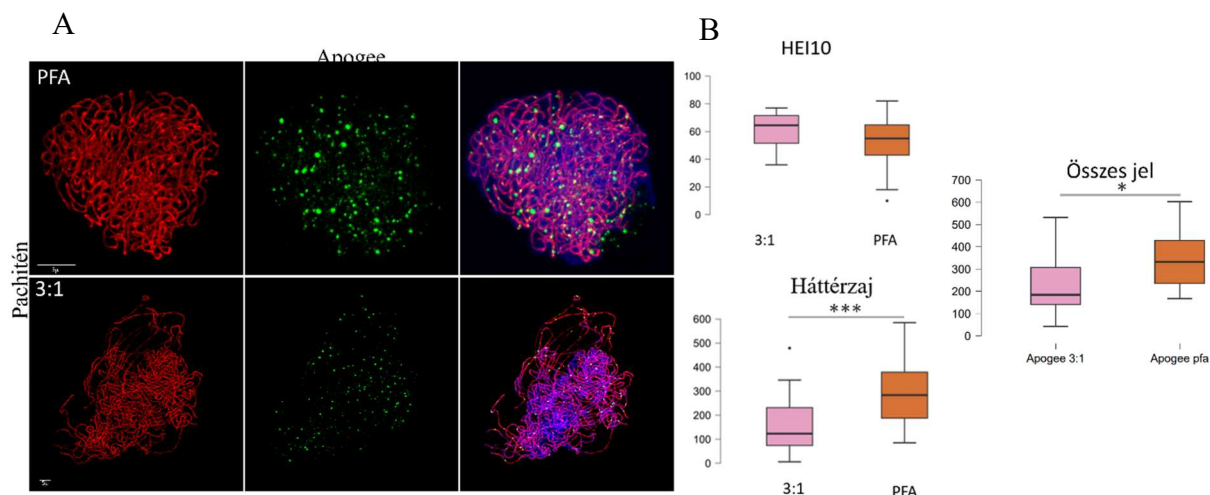
Denaturáló fixálással sikerült elérni, hogy a HEI10 jel kevesebb háttérrel hozzon, vagy egyáltalán ne hozzon háttérrel. Ezzel a módszerrel sokkal pontosabban meg lehetett határozni a specifikus jeleket.

5.4 A nem-denaturáló és denaturáló fixálási mód hatásának összehasonlító vizsgálata a HEI10 immunjel minőségére

A vizsgálatok során fontos volt, hogy a denaturációs fixálás kedvezőbb eredményét ne csak szemre tudjuk meghatározni, hanem statisztikailag, számszerűleg is szeretnénk volna megítélni, a specifikus jelek és a háttér zaj változásait.



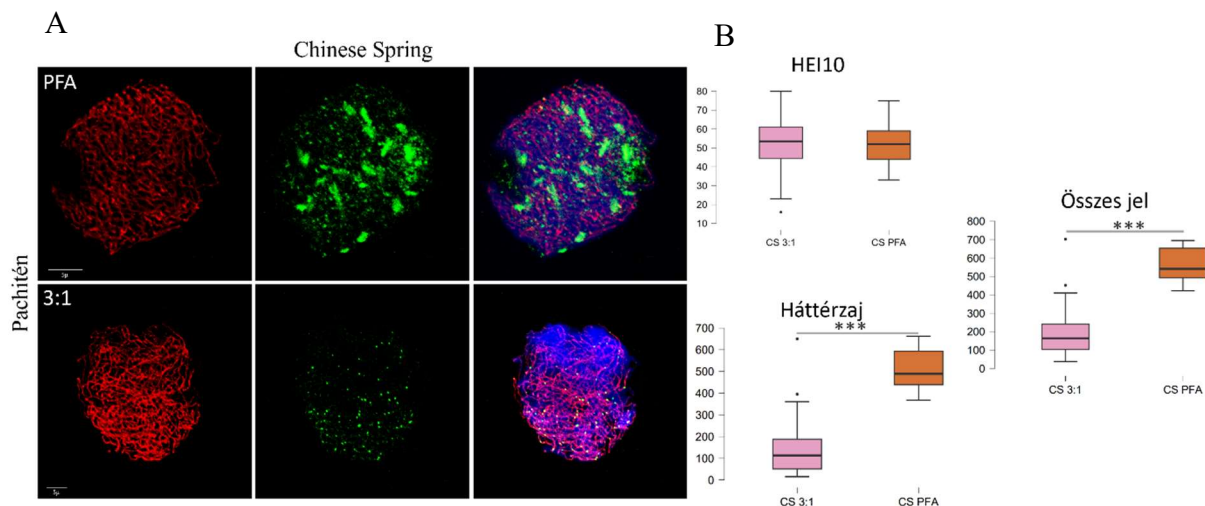
13. ábra 'Apogee' és 'Chinese Spring' búza meiotikus sejtmagok közelített mikroszkópós felvétele, összehasonlítva a denaturáló és nem denaturáló fixálási módokat. DAPI (kék)kontrasztfestés mutatja a kromatint, az anti-ZYP1 (piros) a szinapszist alkotó homológ kromoszómákat, míg az anti-HEI10 (zöld) a rekombinációs pontokat. A denaturáló fixálást követően a HEI10 fehérje által adott jel specifikus (lásd pl. sárga nyilak), egybeesik a ZYP1 által mutatott szinaptonémás komplex jelével, lehetővé teszi a rekombinációs pontok pontos leszámolását. A nem denaturáló fixálást követően a HEI10 ellenanyag által adott jelek egy része nem specifikus (lásd pl. fehér nyilak), közel esnek ugyan a kromatinhoz, de nem minden esetben kolokalizál a szinaptonémás komplex immunjével, ezáltal megnehezíti a rekombinációs események leszámolását.



14. ábra A, 'Apogee' mikroszkópos felvétele, összehasonlítva a denaturáló és nem denaturáló fixálási módokat anti-ZYP1 és anti-HEI10 ellenanyag immunjelölést követően. DAPI (kék)kontrasztfestés mutatja a kromatint, az anti-ZYP1 (piros) a szinapszist alkotó homológ kromoszómákat, míg az anti-HEI10 (zöld) a rekombinációs pontokat. A HEI10 ellenanyag jele kolokalizál az anti-ZYP1 jellel és a kromatinnal. A profázis I. alfázisait (zigotén, pachitén, diplotén) a ZYP1 jel alapján azonosítottuk. Zigoténben nem fut végig a sejtmagon a ZYP1 jel, pachiténben a ZYP1 által mutatott fonalszerű jel kitölti a sejtmagot, diploténban újra felszakadozik és spirálszerű jelet ad. B, Bal oldali felső panel: a HEI10 számolt jelének statisztikai összehasonlítását mutatja nem denaturáló (3:1) és denaturáló (PFA) fixálási módokat követően. A HEI10 specifikus jel nem változott szignifikánsan a két fixálási mód között. Bal oldali alsó panel: a nem denaturáló (3:1) és denaturáló (PFA) fixálási módokat követően számolt háttérzaj jelének statisztikai vizsgálatát mutatja. A háttérzaj mennyisége szignifikánsan alacsonyabb denaturáló fixálást követően. Jobb oldali panel: a nem denaturáló (3:1) és denaturáló (PFA) fixálási módokat követően számolt összes jel statisztikai vizsgálatát mutatja. A denaturáló fixálást követően szignifikánsan alacsonyabb az összesen számolt jel mennyisége.

Az irodalmi adatok alapján a HEI10 jelek száma zigoténben a legtöbb és sejtenként rendkívül változó, ezért ez a fázis nem alkalmas a HEI10 összehasonlító vizsgálatára. Mivel a HEI10 pachitén fázisban már a crossing overekérését segíti, így az itt előforduló jelek száma megközelíti a végleges crossing overekét. Búzában kromoszómánként átlagosan két-három krosszóver várható, amely sejtenként kisebb eltérést mutat zigoténhez képest. A méréseim során három adatot határoztam meg: 1.) A specifikus HEI10 jeleket Pachitén fázisban levő sejtmagokon (13; 14. ábra) LasX (Leica Microsystems GmbH.) szoftver 'counting' funkciója segítségével manuálisan számoltam. Specifikus jelnek ítélt meg a ZYP1 fonalon elhelyezkedő, minimum 0,4 μm X 0,4 nagyságú pontszerű jelet. 2.) A mintán levő összes jelet, amely a HEI10 specifikus jelét és a háttér által adott nem specifikus jeleket is magába foglalta, az Imaris (Bitplane) szoftver 'spots' funkciójával határoztam meg. A sejtmagokat háromdimenziós rekonstrukciót követően térben pontosan körül határoltam 'Region of interest' funkcióval annak érdekében, hogy a citoplazma által adott esetleges jel ne jelenjen meg az összes jel számolásakor. 3.) A háttérzajt sejtenként határoztam meg az Imaris által számolt összes jel és a HEI10 specifikus jelek számának különbségeként. Az 'Apogee' búzafajta nem denaturáló fixálásnál sejtenként átlagosan 51,3 HEI10 jelet számoltam (n = számolt sejtek

száma = 33, SD = szórás = 16, 8), az összes jel átlaga 365,1 (SD = 187) míg háttérzajként átlagosan 317,8 (SD = 191,5) jelet azonosítottam. Denaturáló fixálás esetén a HEI10 jelek száma átlagosan 60,8571 (n = 14, SD = 12,8) volt, az összes jel átlaga 232,1 (SD = 134,8), míg a háttérzaj átlagosan 171,2 volt (SD = 134,3). Az adatok statisztikai összehasonlítása (kétmintás t-próba) megmutatta, hogy az 'Apogee' búzafajta esetében a számolt HEI10 jelek száma nem változott szignifikánsan a két fixálási módszer között ($t(30) = 1.598$, $p = 0.121$). A háttérzajként meghatározott jelek száma azonban szignifikánsan csökkent a denaturáló kezelés hatására ($t(30) = -2,542$, $p = 0,016$). Az összes jelek száma szintén szignifikánsan csökkent a denaturáló kezelés hatására ($t(30) = -2,447$, $p = 0,020$) (14.ábra).



15. ábra A, 'Chinese Spring' mikroszkópos felvétele, összehasonlítva a denaturáló és nem denaturáló fixálási módokat anti-ZYP1 és anti-HEI10 ellenanyag immunjelölést követően. DAPI (kék)kontrasztfestés mutatja a kromatint, az anti-ZYP1 (piros) a szinapszist alkotó homológ kromoszómákat, míg az anti-HEI10 (zöld) a rekombinációs pontokat. A HEI10 ellenanyag jele kolokalizál az anti-ZYP1 jellel és a kromatinnal. A profázis I. alfázisait (zigotén, pachitén, diplotén) a ZYP1 jel alapján azonosítottuk. Zigoténben nem fut végig a sejtmagon a ZYP1 jel, pachiténben a ZYP1 által mutatott fonalszerű jel kitölti a sejtmagot, diploténben újra felszakadozik és spirálszerű jelet ad. B, Bal oldali felső panel: a HEI10 számolt jelének statisztikai összehasonlítását mutatja nem denaturáló (3:1) és denaturáló (PFA) fixálási módokat követően. A HEI10 specifikus jel nem változott szignifikánsan a két fixálási mód között. Bal oldali alsó panel: a nem denaturáló (3:1) és denaturáló (PFA) fixálási módokat követően számolt háttérzaj jelének statisztikai vizsgálatát mutatja. A háttérzaj mennyisége szignifikánsan alacsonyabb denaturáló fixálást követően. Jobb oldali panel: a nem denaturáló (3:1) és denaturáló (PFA) fixálási módokat követően számolt összes jel statisztikai vizsgálatát mutatja. A denaturáló fixálást követően szignifikánsan alacsonyabb az összesen számolt jel mennyisége.

A 'Chinese Spring' búzavonal nem denaturáló fixálásánál átlagosan 52,3 (n = 7, SD = 13,4) manuálisan számolható (specifikus) HEI10 jelet azonosítottunk, az összes jel átlaga Imaris programmal számolva 564 (SD = 100,6) volt, míg a háttérzaj átlaga 511,7 (SD = 105,5). Az adatok statisztikai összehasonlítása megmutatta, hogy a 'Chinese Spring' búzafajta esetében a számolt HEI10 jelek száma nem változott szignifikánsan a két fixálási módszer között ($t(35) = -0,073$, $p = 0,020$). A denaturáló kezelés hatására a háttérzajként detektált jelek száma ennél a

genotípusnál is szignifikánsan csökkent ($t(35)=-6,612$, $p<0,001$). Az összes jelek számában is szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a denaturáló kezelés hatására ($t(35)=-6,641$, $p<0,001$) (15.ábra). Eredményeink megmutatták, hogy a vizsgált búzagenotípusok esetében megbízhatóbban alkalmazható a denaturáló fixálási technika a HEI10 fehérje kimutatására, hiszen annak alkalmazása jelentősen csökkentette az értékelést zavaró háttérzaj arányát.

6 Összefoglalás

A rekombináció az egyik legfontosabb biológiai folyamat a meiózis során. Alapvető szerepe van a genetikai sokféleség kialakításában és elősegíti a homológ kromoszómák szegregációját, ami kulcsfontosságú a megfelelő fertilitás eléréséhez. A ma termesztett kenyérbúza genetikai sokfélesége a több ezeréves domesztikáció hatására beszűkült, ami megnehezíti a klímaváltozás hatásaival szembeni védekezést (új betegségek, hőstressz, szárazság). A nagyobb genetikai diverzitás kialakítása érdekében olyan új módszerek fejlesztésére van szükség, amelyek hozzájárulnak a búza genetikai hátterének kiszélesítéséhez, vagy a jelenlegi genetikai háttér hatékonyabb kiaknázásához, új előnyös tulajdonság kombinációk megjelenéséhez vezetve. A jelen vizsgálat a homológ rekombináció folyamatának hatékonyabb vizsgálatát kívánta szolgálni, amely hosszútávon elősegítheti a rekombináció gyakoribbá tételét és helyzetének eltolását a jelenlegi rekombinációs forrópontokról, ezáltal növelve a búza sokféleségét.

A rekombináció eredményeként létrejött genetikai átkeresztezések (crossing over, CO) száma a kromoszómapárok (bivalensek) konformációjából megbecsülhető, azonban ez gyakran a CO-ek alulbecsléséhez vezet. A jelen munkában bemutatott módszer a DNS hibajavításban részt vevő HEI10 rekombinációs fehérje sejten belüli kimutatását végezte el kenyérbúzában. A HEI10 immunjelölés kombinálása a szinaptonémás komplex ZYP1 fehérjéjének immunjelölésével lehetővé tette a rekombináció pontosabb vizsgálatát a meiózis profázisa során. Két egymástól alapvetően különböző sejt fixálási és preparálási technikát hasonlítottunk össze, amelyek közül az első nem denaturáló módon, keresztkötések kialakításával fixálta a sejteket és a bennük található fehérjéket. A második módszer alkalmazásakor denaturáló módon, a fehérjék kicsapásával és az antigének epitópjainak feltárásával készítettük elő a sejteket az immunjelölésre. Vizsgálataink során az immunjelölést összekapcsoltuk nagy felbontású mikroszkópiával, 3D képalkotással majd a kapott adatokat statisztikai módszerekkel összevetettük. Eredményeink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált búzafajtákban a denaturáló fixálási mód könnyebben kiértékelhető eredményt nyújt, hiszen itt szignifikánsan csökkent a háttérzaj aránya, megkönnyítve a specifikus jel leszámlolását.

Kísérleteink igazolták a HEI10 ellenanyag által nyújtott immunjel specifikusságát, amely az elvárásnak megfelelően kolokalizált a szinaptonémás komplexet jelölő ZYP1 fehérje jelével. A kialakított módszer alkalmas a rekombinációs gyakoriság pontos számbeli és térbeli meghatározására és hozzájárulhat a rekombináció változásainak összehasonlító vizsgálatához pl. mutáns- vagy különböző stresszfaktoroknak kitett növények elemzésekor. Az előállított

adatsorok lehetővé teszik a különböző genotípusok rekombinációs folyamatainak statisztikai összehasonlítását és a jövőben olyan nemesítési vonalak kiválogatását, amelyekben a rekombinációs események száma megemelkedett.

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni Szabados Fanni PhD hallgatónak segítségéért és türelméért a martonvásári kutatólaborral való megismerkedésben. Köszönöm Makai Diána PhD hallgatónak a rengeteg segítséget és tanácsot. Külön köszönet Petkes Csengének és Bucsi Istvánné, Jutkának a növénynevelésben nyújtott értékes segítségükért, szaktudásukért. A legnagyobb hálámat pedig Sepsi Adélnak szeretném kifejezni, aki kézen fogott és a legnagyobb türelemmel és kitartással végigvezetett a molekuláris citogenetika rejtelmein.

12 Irodalomjegyzék

- Adom, K. K., Sorrells, M. E. and Liu, R. H.** (2003). Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Wheat Varieties. *J Agric Food Chem* **51**,.
- Armstrong, S. J., Caryl, A. P., Jones, G. H. and Franklin, F. C. H.** (2002). Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in Arabidopsis and Brassica. *J Cell Sci* **115**, 3645–3655.
- Asseng, S., Ewert, F., Martre, P., Rötter, R. P., Lobell, D. B., Cammarano, D., Kimball, B. A., Ottman, M. J., Wall, G. W., White, J. W., et al.** (2015). Rising temperatures reduce global wheat production. *Nat Clim Chang* **5**, 143–147.
- Bajwa, A. A., Farooq, M., Al-Sadi, A. M., Nawaz, A., Jabran, K. and Siddique, K. H. M.** (2020). Impact of climate change on biology and management of wheat pests. *Crop Protection* **137**,.
- Barakate, A., Higgins, J. D., Vivera, S., Stephens, J., Perry, R. M., Ramsay, L., Colas, I., Oakey, H., Waugh, R., Franklin, F. C. H., et al.** (2014). The synaptonemal complex protein ZYP1 is required for imposition of meiotic crossovers in barley. *Plant Cell* **26**, 729–740.
- Barber, H. M., Lukac, M., Simmonds, J., Semenov, M. A. and Gooding, M. J.** (2017). Temporally and Genetically Discrete Periods of Wheat Sensitivity to High Temperature. *Front Plant Sci* **8**,.
- Charmet, G.** (2011). Wheat domestication: Lessons for the future. *C R Biol* **334**, 212–220.
- Chelysheva, L., Gendrot, G., Vezon, D., Doutriaux, M.-P., Mercier, R. and Grelon, M.** (2007). Zip4/Spo22 Is Required for Class I CO Formation but Not for Synapsis Completion in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **3**, e83.
- Chelysheva, L., Vezon, D., Chambon, A., Gendrot, G., Pereira, L., Lemhemdi, A., Vrielynck, N., Le Guin, S., Novatchkova, M. and Grelon, M.** (2012). The Arabidopsis HEI10 Is a New ZMM Protein Related to Zip3. *PLoS Genet* **8**, e1002799.
- Chen, S. Y., Tsubouchi, T., Rockmill, B., Sandler, J. S., Richards, D. R., Vader, G., Hochwagen, A., Roeder, G. S. and Fung, J. C.** (2008). Global Analysis of the Meiotic Crossover Landscape. *Dev Cell* **15**, 401–415.
- Cseh, A., Poczai, P., Kiss, T., Balla, K., Berki, Z., Horváth, Á., Kuti, C. and Karsai, I.** (2021b). Exploring the legacy of Central European historical winter wheat landraces. *Sci Rep* **11**, 23915.
- Cseh, A., Lenykó-Thegze, A., Makai, D., Szabados, F., Hamow, K. Á., Gulyás, Z., Kiss, T., Karsai, I., Moncsek, B., Mihók, E., et al.** (2023). Meiotic instability and irregular chromosome pairing underpin heat-induced infertility in bread wheat carrying the Rht-B1b or Rht-D1b Green Revolution genes. *New Phytologist*.
- da Ines, O., Abe, K., Goubely, C., Gallego, M. E. and White, C. I.** (2012). Differing requirements for RAD51 and DMC1 in meiotic pairing of centromeres and chromosome arms in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **8**,.

- Da Ines, O., Michard, R., Fayos, I., Bastianelli, G., Nicolas, A., Guiderdoni, E., White, C. and Sourdille, P.** (2020). Bread wheat TaSPO11-1 exhibits evolutionarily conserved function in meiotic recombination across distant plant species. *The Plant Journal* **103**, 2052–2068.
- De los Santos, T., Hunter, N., Lee, C., Larkin, B., Loidl, J. and Hollingsworth, N. M.** (2003). The MUS81/MMS4 endonuclease acts independently of double-holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* **164**, 81–94.
- Desjardins, S. D., Simmonds, J., Guterman, I., Kanyuka, K., BurrIDGE, A. J., Tock, A. J., Sanchez-Moran, E., Franklin, F. C. H., Henderson, I. R., Edwards, K. J., et al.** (2022). FANCM promotes class I interfering crossovers and suppresses class II non-interfering crossovers in wheat meiosis. *Nature Communications* 2022 13:1 **13**, 1–12.
- Durand, S., Lian, Q., Jing, J., Ernst, M., Grelon, M., Zwicker, D. and Mercier, R.** (2022). Joint control of meiotic crossover patterning by the synaptonemal complex and HEI10 dosage. *Nat Commun* **13**, 5999.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G. and Pelletier, G.** (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO Journal* **20**, 589–600.
- Harrison, C. J., Alvey, E. and Henderson, I. R.** (2010b). Meiosis in flowering plants and other green organisms. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2863–2875.
- Higgins, J. D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S. J., Jones, G. H. and Franklin, F. C. H.** (2005a). The Arabidopsis synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev* **19**, 2488–2500.
- Higgins, J. D., Vignard, J., Mercier, R., Pugh, A. G., Franklin, F. C. H. and Jones, G. H.** (2008a). AtMSH5 partners AtMSH4 in the class I meiotic crossover pathway in Arabidopsis thaliana, but is not required for synapsis. *Plant Journal* **55**, 28–39.
- Higgins, J. D., Buckling, E. F., Franklin, F. C. H. and Jones, G. H.** (2008b). Expression and functional analysis of AtMUS81 in Arabidopsis meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant Journal* **54**, 152–162.
- Higgins, J. D., Perry, R. M., Barakate, A., Ramsay, L., Waugh, R., Halpin, C., Armstrong, S. J. and Franklin, F. C. H.** (2012). Spatiotemporal asymmetry of the meiotic program underlies the predominantly distal distribution of meiotic crossovers in barley. *Plant Cell* **24**, 4096–109.
- Hunter, N. and Kleckner, N.** (2001). The Single-End Invasion. *Cell* **106**, 59–70.
- Jacott, C. N. and Boden, S. A.** (2020). Feeling the heat: developmental and molecular responses of wheat and barley to high ambient temperatures. *J Exp Bot* **71**, 5740–5751.
- Keeney, S., Giroux, C. N. and Kleckner, N.** (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**, 375–384.
- Khush, G. S.** (2001). Green revolution: the way forward. *Nat Rev Genet* **2**, 815–22.

- Kiernan, J. A.** (2000). Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. *Micros Today* **8**, 8–13.
- Kumar, R. R., Goswami, S., Sharma, S. K., Kala, Y. K., Rai, G. K., Mishra, D. C., Grover, M., Singh, G. P., Pathak, H., Rai, A., et al.** (2015). Harnessing next generation sequencing in climate change: RNA-Seq analysis of Heat stress-responsive Genes in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *OMICS* **19**,.
- Lenyková-Thegze, A., Fábíán, A., Mihók, E., Makai, D., Cseh, A. and Sepsi, A.** (2021). Pericentromeric chromatin reorganisation follows the initiation of recombination and coincides with early events of synapsis in cereals. *The Plant Journal* **107**, 1585–1602.
- Lukaszewicz, A., Howard-Till, R. A. and Loidl, J.** (2013). Mus81 nuclease and Sgs1 helicase are essential for meiotic recombination in a protist lacking a synaptonemal complex. *Nucleic Acids Res* **41**, 9296–9309.
- Lumpkin, T. A.** (2015). How a Gene from Japan Revolutionized the World of Wheat: CIMMYT's Quest for Combining Genes to Mitigate Threats to Global Food Security. In *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field* (ed. Ogihara, Y.), Takumi, S.), and Handa, H.), pp. 13–20. Tokyo: Springer Japan.
- MacQueen, A. J.** (2015). Catching a (Double-Strand) Break: The Rad51 and Dmc1 Strand Exchange Proteins Can Co-occupy Both Ends of a Meiotic DNA Double-Strand Break. *PLoS Genet* **11**, 1–4.
- Martini, E., Diaz, R. L., Hunter, N. and Keeney, S.** (2006). Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* **126**, 285–95.
- Mercier, R., Jolivet, S., Vezon, D., Huppe, E., Chelysheva, L., Giovanni, M., Nogué, F., Doutriaux, M. P., Horlow, C., Grelon, M., et al.** (2005). Two meiotic crossover classes cohabit in Arabidopsis: One is dependent on MER3, whereas the other one is not. *Current Biology* **15**, 692–701.
- Mézard, C., Vignard, J., Drouaud, J. and Mercier, R.** (2007). The road to crossovers: plants have their say. *Trends in Genetics* **23**, 91–99.
- Nawaz, F., Ahmad, R., Waraich, E. A., Naeem, M. S. and Shabbir, R. N.** (2012). Nutrient uptake, physiological responses, and yield attributes of wheat (*triticum aestivum* L.) exposed to early and late drought stress. *J Plant Nutr* **35**,.
- Osman, K., Sanchez-Moran, E., Higgins, J. D., Jones, G. H. and Franklin, F. C. H.** (2006). Chromosome synapsis in Arabidopsis: analysis of the transverse filament protein ZYP1 reveals novel functions for the synaptonemal complex. *Chromosoma* **115**, 212–9.
- Page, S. L. and Hawley, R. S.** (2003a). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 785–789.
- Page, S. L. and Hawley, R. S.** (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 525–58.
- Pradillo, M., Varas, J., Oliver, C. and Santos, J. L.** (2014). On the role of AtDMC1, AtRAD51 and its paralogs during Arabidopsis meiosis. *Front Plant Sci* **5**,.

- Rufo, R., Alvaro, F., Royo, C. and Soriano, J. M.** (2019b). From landraces to improved cultivars: Assessment of genetic diversity and population structure of Mediterranean wheat using SNP markers. *PLOS ONE* **14**, e0219867.
- Sepsi, A., Higgins, J. D., Heslop-Harrison, J. S. P. and Schwarzacher, T.** (2017). CENH3 morphogenesis reveals dynamic centromere associations during synaptonemal complex formation and the progression through male meiosis in hexaploid wheat. *Plant J* **89**, 235–249.
- Sepsi, A., Fábíán, A., Jäger, K., Heslop-Harrison, J. S. and Schwarzacher, T.** (2018). ImmunoFISH: Simultaneous Visualisation of Proteins and DNA Sequences Gives Insight Into Meiotic Processes in Nuclei of Grasses. *Front Plant Sci* **9**, 1193.
- Storlazzi, A., Tesse, S., Ruprich-Robert, G., Gargano, S., Pöggeler, S., Kleckner, N. and Zickler, D.** (2008). Coupling meiotic chromosome axis integrity to recombination. *Genes Dev* **22**,.
- Tandon, S. and Arora, a** (2011). Antioxidant Profiling of *Triticum aestivum* (wheatgrass) and its Antiproliferative Activity In MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Journal of Pharmacy ...* **4**,.
- Trnka, M., Rötter, R. P., Ruiz-Ramos, M., Kersebaum, K. C., Olesen, J. E., Žalud, Z. and Semenov, M. A.** (2014). Adverse weather conditions for European wheat production will become more frequent with climate change. *Nat Clim Chang* **4**, 637–643.
- Voelkel-Meiman, K., Johnston, C., Thappeta, Y., Subramanian, V. V., Hochwagen, A. and MacQueen, A. J.** (2015). Separable Crossover-Promoting and Crossover-Constraining Aspects of Zip1 Activity during Budding Yeast Meiosis. *PLoS Genet* **11**, 1–39.
- Wang, K., Wang, M., Tang, D., Shen, Y., Miao, C., Hu, Q., Lu, T. and Cheng, Z.** (2012b). The Role of Rice HEI10 in the Formation of Meiotic Crossovers. *PLoS Genetics* **8**, e1002809.
- Winfield, M. O., Allen, A. M., Wilkinson, P. A., BurrIDGE, A. J., Barker, G. L. A., Coghill, J., Waterfall, C., Wingen, L. U., Griffiths, S. and Edwards, K. J.** (2018b). High-density genotyping of the A.E. Watkins Collection of hexaploid landraces identifies a large molecular diversity compared to elite bread wheat. *Plant Biotechnology Journal* **16**, 165–175.