dc_1953_21

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS tézisek

Az idegenfajú génátvitelt segítő stuktúrális genomikai kutatások *Aegilops* fajokban

Molnár István

ATK Mezőgazdasági Intézet

2021

1. Bevezetés és kutatási cél

A búza (*Triticum aestivum* L.) az egyik legfontosabb gabonanövényünk, melynek magyarországi vetésterülete 2019-ben elérte az 1 millió 37 ezer ha-t. Egyes előrejelzések szerint az emberi népesség 2050-re eléri a 9 milliárd főt, melynek élelmezéséhez évi 2%-os termésnövekedést kellene produkálni a változó klimatikus feltételek mellett. Ezen kihívásokra adott válaszok biológiai alapját a jól termő, megfelelő minőségi paraméterekkel és jó stressztűrő képességgel rendelkező búzafajták előállítása képezi. A búzanemesítők számára ugyanakkor az egyik legnagyobb nehézséget az jelenti, hogy megtalálják a fenti tulajdonságokat meghatározó gének leghatékonyabb allélváltozatait.

A búza rokonsági köréhez tartozó vad kecskebúza- (*Aegilops*) fajokat az ember sohasem nemesítette. Nagymértékű genetikai diverzitásuk révén olyan allélváltozatokat hordoznak melyek által jól tudtak adaptálódni a legkülönbözőbb ökogeográfiai élőhelyekhez. Így kiváló forrásai a biotikus (különböző rozsda, lisztharmat és egyéb növénybetegségek) és abiotikus (szárazság-, só- és magas hőmérséklet) stressztoleranciát és beltartalmi tulajdonságokat (a szemtermés mikroelem, étkezési rost és sütőipari minőségét) meghatározó gének búzától eltérő változatainak.

A *Triticum* és *Aegilops* fajok filogenetikailag közeli rokonságban állnak egymással, ezért a búza és az *Aegilops* fajok nagy része egymással ivarosan keresztezhető, melynek révén interspecifikus hibridek állíthatók elő. Tradícionálisan az idegen fajú keresztezések célja, hogy hasznos agronómiai tulajdonságokat hordozó idegen kromoszómaszegmentumokat tartalmazó búzagenotípusokat állítson elő, melyek felhasználhatóak a nemesítési programokban.

Az első búza x *Aegilops* keresztezések még az 1860-as évekre vezethetőek vissza, de a búza x *Aegilops* hibridek nagyobb arányú előállítása késett egészen a kolchicinkezelés bevezetéséig (1930-as évek), mely segítségével - a kromoszómaszám megkettőzésével - az egyébként steril F₁ hibridekből fertilis amfiploidok állíthatók elő. A XX. század második felétől a citogenetikai módszerek fejlődésével (Feulgen, C-sávozás) lehetővé vált a búza és az egyes *Aegilops* fajok, valamint ezek hibrid származékainak kromoszómaszámának meghatározása, később pedig az egyes kromoszómák azonosítása is. Mindez az első búza-*Aegilops* addíciós és szubsztitúciós sorozatok, valamint transzlokációs vonalak előállítását eredményezte.

További lökést adott az idegenfajú keresztezési programoknak a fluoreszcens *in situ* hibridizáción alapuló molekuláris citogenetikai módszerek megjelenése az 1980-as évek második felében, melyek az 1990-es és 2000-es években mind általánosabbá váltak. A repetitív DNS-próbák jól definiált szekvenciái segítségével elkészültek az első fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) kariotípusok a búza és rokon fajai esetében, míg a jelölt genomi DNS-próbák segítségével (GISH) megkülönböztethetővé váltak az allopoliploid fajok egyes genomjai, valamint lehetségessé vált a búzába átvitt idegen kromoszómák és kromoszómaszegmentumok mind precízebb azonosítása is. Mindezek eredményeként a molekuláris citogenetikai módszerekre alapozott szelekció általánossá vált a fajkeresztezéses génátviteli programokban.

Ugyanakkor a citogenetikai módszerek nem alkalmasak nagyobb populációk tesztelésére, ami korlátozza a búza-*Aegilops* kromoszómaátépülések kiválogatását. Az idegenfajú transzlokációk előállítását tovább korlátozza, hogy bizonyos kromoszómák a meiózis során nem párosodnak és nem rekombinálódnak egymással még a homeológ kromoszómapárosodást elősegítő, *Ph1* lókuszt nélkülöző genetikai háttér (*ph1b* mutáció, 5B kromoszóma hiánya stb.) esetén sem. Számos esetben a kívánatos tulajdonságok mellett nemkívánatos agronómiai jellegek is megjelennek a létrehozott transzlokációs vonalakban, ami részben visszavezethető a vad fajok genomjában történt evolúciós átrendeződésekre, mely a búza és a rokon fajok kromoszómái közti hasonlóság (génkolinearitás, szinténia) sérülését eredményezi. A búza és *Aegilops* genomok közti, ma még csak részben ismert homeológiaviszonyok feltérképezése ezért jelentősen segítené a fajkeresztezéses génátviteli programok tervezését, az alkalmazott stratégiák kiválasztását.

Molekuláris markerek segítségével nagyobb populáció tesztelhető, így jelentősen növelhető a szelekció hatékonysága. Különösen hatékony lehetne olyan génspecifikus markerek alkalmazása, melyek

specifikusak az *Aegilops* kromoszómák meghatározott régióira. Ugyanakkoraz ilyen típusú markerek fejlesztéséhez szükséges a vad fajok teljes genomjának kromoszómaszintű szekvenciaismerete. Összességében elmondható, hogy a vad fajokban rejlő genetikai potenciál eddigi kismértékű felhasználása a búzanemesítési programokban jelentősen növelhető lenne a genomszerveződésük részletes megismerésével, specifikus molekuláris markerek fejlesztésével és a markerekre alapozott szelekciós rendszer alkalmazásával.

A 2000-es évek második felétől a következő (-next) generációs szekvenálási eljárások megszületése és azóta is tartó robbanászerű fejlődése megteremtette az alapját a nagy genomszekvenálási projektek költséghatékony kivitelezésének. Ezzel párhuzamosan az 1990-es években a növényi gyökércsúcsmerisztémasejtek sejtciklusának szinkronizálása és a jó minőségű mitotikus kromoszómaszuszpenziók előállítása lehetővé tette az egyedi növényi kromoszómák méret alapján történő izolálását áramlásos citometria segítségével. Ezen a téren különösen nagy jelentőségre tettek szert azok a citogenetikai vonalak (főként diteloszómás sorozatok), melyekből izolálni lehetett az egyes kromoszómakarokat. A gabonafélék nagy és komplex genomjai ugyanis rendkívül nagy arányban tartalmaznak repetitív szekvenciákat, ami (a poliploid fajok esetén) az egynél több homeológ genom jelenlétével együtt szinte megoldhatatlanná teszi a rövidszekvencia-leolvasások összeillesztését nagyobb kontigokká, majd szkaffoldokká. - A kromoszómák illetve kromoszómakarok szubgenomi DNS mintái, melyek már csak a genom néhány százalékát (búza esetében 1,3 – 3,4%) reprezentálják, lehetővé tették a legkülönbözőbb genomikai módszerek (szekvenálás, BAC könyvtárak létrehozása, optikai térképezés, citogenetikai térképezés, molekuláris markerek előállítása) kromoszómaszintű alkalmazását. Ezek jelentősen hozzájárultak a legfontosabb kalászosaink, a búza, az árpa és a rozs referenciaként szolgáló genomszekvenciáinak elkészítéséhez. A legutóbbi évek során lehetővé vált a növényi kromoszómák fluoreszcens jelölése in situ hibridizáció segítségével szuszpenzióban, ami megteremtette az alapját a kétparaméteres áramlási citometria alkalmazásának. A módszer segítségével - a mérettel, valamint a GAA mikroszatellitek eloszlásával arányos fluoreszcencia-intenzitások detektálásával - az egyes kromoszómák sokkal nagyobb mértékben különíthetők el egymástól, ami lehetővé tette a genomot alkotó legtöbb kromoszóma nagy tisztaságú (>80-90%) izolálását a hexaploid és tetraploid búza, valamint az árpa esetében. Mindezek eredményeként napjainkban az áramlási citometria segítségével történő kromoszómaizolálás és a hozzá kapcsolódó szekvenálási módszerek az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárássá váltak a különböző génklónozási projektek esetében.

A 2000-res évek végétől, a PhD értekezés elkészítését követően, munkám jelentős részét arra öszpontosítottam, hogy a markerkapcsolt szelekciós rendszer létrehozásával hatékonyabbá tegyem az *Aegilops* fajokból a búzába történő fajidegen génátvitel folyamatát. Ehhez kapcsolódóan igyekeztem a kromoszómaalapú genomikai megközelítést alkalmazva az *Aegilops* fajok Ués M genomjának szerveződéséről, a búzagenommal alkotott homológiaviszonyairól minél több szekvenciaszintű ismeretre szert tenni a következő kutatási célok megvalósításával:

- Az áramlásos citometria különböző módszereinek alkalmazásával egyedi kromoszómák izolálása az U, M, S, S^{sh} és D genommal rendelkező vad *Aegilops* fajokból
- Az izolált kromoszómák DNS mintáinak felhasználása a búza és *Aegilops* genomok közti homeológ kapcsolatok feltárása érdekében:
 - o Konzervált ortológgén-alapú (COS) markerek azonosítása Aegilops kromoszómákon
 - Az allotetraploid Aegilops biuncialis szegregáló genetikai térképének előállítása
 - A diploid *Ae. umbellulata* (UU) és *Ae. comosa* (MM) kromoszómáinak szekvenálásával az U és M genom vázlatos szekvenciaillesztéseinek elkészítése
- A szekvenciaadatok felhasználásával új génalapú markerek fejlesztése és az Aegilops kromoszómák nyomon követésére alkalmas markerkapcsolt szelekciós rendszer alapjainak lefektetése
- Új búza-*Aegilops biuncialis* genetikai alapanyagok előállítása citogenetikai és markerkapcsolt szelekció segítségével

Akadémiai doktori disszertációmban mindezen célok megvalósítása érdekében tett erőfeszítéseimet és eredményeimet igyekeztem a Tisztelt Tudós Társadalom elé tárni.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Növényi anyagok

Az értekezés különböző fejezeteiben (kromoszómaszeparáció, COS-markeranalízis, *Ae. biuncialis* genetikai térkép előállítása, *Aegilops* kromoszómák szekvenálása, markerfejlesztés és búza-*Aegilops* introgressziós vonalak előállítása) a következő növényi anyagokat alkalmaztuk:

Aegilops fajok

Aegilops umbellulata (UU) AE740/03 és JIC2010001, Ae. comosa (MM) MvGB1039 és JIC2110001, Triticum urartu (A^uA^u) MvGB115, Aegilops speltoides (SS) MvGB905, Ae. tauschii (DD) MvGB605, Aegilops markgrafii (CC) MvGB428 és MvGB607, Ae. sharonensis (S^{sh}S^{sh}) Sr1644, Ae. biuncialis (U^bU^bM^bM^b) MvGB382, MvGB642, MvGB1112 és MvGB470, Ae. geniculata (U^gU^gM^gM^g) AE1311/00 és TA2899, Ae. cylindrica (D^cD^cC^cC^c) MvGB1719, Ae. triuncialis (U^tU^tC^t) MvGB585.

Hexaploid búza- (Triticum aestivum) genotípusok

GK Öthalom, Chinese Spring (kínai tavaszi búzafajta), Mv9kr1(Molnár-Láng és mtsai, 1996), 'Mv25'.

Búza-Aegilops addíciós vonalak

Chinese Spring – *Ae. umbellulata* (JIC2010001) 1U, 2U, 4U, 5U, 6U, 7U (Kimber 1967). Chinese Spring – *Ae. comosa* (JIC2110001) 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M (John Innes Centre germplasm collection, Norwich, UK)

 $Mv9kr1 - Ae. \ biuncialis (MvGB642) 1U^{b}, 1U^{b}/6U^{b}, 3U^{b}, 2M^{b}, 3M^{b}, 7M^{b} (Schneider et al. 2005)$ Chinese Spring – Ae. geniculata (TA2899) 1U^g, 2U^g, 3U^g, 4U^g, 5U^g, 6U^g, 7U^g, 1M^g, 2M^g, 3M^g, 5M^g, 6M^g, 7M^g (Friebe és mtsai 1999)

Chinese Spring – Ae. umbellulata (U2010001) Diteloszómás addíciós vonalak 2US, 2UL, 7UL (Friebe és mtsai, 1995)

Búza-Aegilops szubsztitúciós vonalak

Chinese Spring – Ae. comosa (JIC2110001) 6M(6A) (John Innes Centre germplasm collection, Norwich, UK)

Mv9kr1 – Ae. biuncialis (MvGB642) 3M^b(4B) (Farkas és mtsai 2014)

Mv9kr1-Ae. biuncialis (MvGB642) centrikus fúzió 3Mb.4BS (Farkas és mtsai 2014)

A különböző *in situ* hibridizációs kísérletekhez a próba-DNS felszaporításához, illetve a blokkoló DNS előállításához a következő fajok genotípusait alkalmaztuk:

Secale cereale cv. 'Lovászpatonai', Oryza sativa cv. 'Bioriza', Triticum turgidum subsp. durum cv. 'Mv Makaróni'.

2.2. Növénynevelés, megporzások.

A kísérleti növényeket szántóföldi, üvegházi, vagy ritkán fitotroni körülmények között neveltük. Az esetek többségében a növényneveléssel párhuzamosan citogenetikai vizsgálatok is történtek. A citogenetikai vizsgálatokhoz az azonosító számmal ellátott szemeket laboratóriumi körülmények között szűrőpapíron Petri csészékben. nedves csíráztattuk és а gyökereket felhasználtuk kromoszómapreparátumok készítéséhez (lásd később). A csíranövényeket 6 hetes vernalizációt (4 °C-, 200 µmol/m²/s⁻ fényintenzitás) követően fitotroni (Conviron PGR-15 kamra) (Tischner és mtsai. 1997) vagy üvegházi körülmények (Global Glasshouse Venlo) között felneveltük felszaporítás, vagy keresztezés céljából.

A tenyészkerti (Martonvásár, Tükrös) növénynevelés célja a genetikai anyagok szaporítása, a búza szülői partnerrel (Mv9kr1) történő visszakeresztezése, illetve megfigyelések (morfológiai

tulajdonságok, levélrozsda, lisztharmat megjelenése, kalászolási idő) végzése volt. A szántóföldi keresztezések május 5. és 20. között történtek. A fitotronban, illetve üvegházban történt keresztezéseket általában 20-25 °C között végeztük, melyek során az anyai szülők portokjait még éretlen állapotban eltávolítottuk, majd a kalászokat izoláltuk és 2-4 nap múlva pörgetéses módszerrel beporoztuk.

2.3. Molekuláris citogenetikai vizsgálatok

Kromoszómapreparátumok előállítása és próbajelölés

A búza és az *Aegilops* fajok valamint a búza-*Aegilops* hibridszármazékok molekuláris citogenetikai vizsgálata során a mitotikus kromoszómapreparátumok gyökércsúcs-merisztémasejtekből történő előállítását Lukaszewski *és munkatársai* (2004) módszerével végeztük.

A növények kariotípusának jellemzésére genomi *in situ* hibridizációt (GISH) és fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) alkalmaztunk, melyek részletes leírása minden esetben megtalálható az adott fejezet alapjául szolgáló publikációban. A GISH során a genomspecifikus hibridizációs próbák előállításához az adott faj DNS-ét digoxigenin-11-dUTP-vel vagy biotin-16-dUTP-vel jelöltük random priming vagy nick-transzláció segítségével. A digoxigenin és biotin által jelzett hibridizációs jeleket fluorokrómokkal konjugált antitestekkel (jellemzően anti-digoxigenin-rodaminnal és streptavidin-FITC-cel) detektáltuk. Blokkoló DNS-ként jellemzően a durum vagy hexaploid búza jelöletlen és fragmentált DNS-ét használtuk. A FISH során az esetek túlnyomó részében a pSc119.2 (Bedbrook és mtsai 1980), az Afa family (Nagaki és mtsai 1995) és a 45S rDNS repetitív DNS-próbát (Gerlach és Bedbrook, 1979), időnként pedig a (GAA)_n mikroszatellit-ismétlődést (Vrána és mtsai 2000) alkalmaztuk a búza és *Aegilops* kromoszómák azonosításához.

In situ hibridizáció

A GISH- és FISH-kísérletek részletei, az alkalmazott előkezelések és poszthibridizációs mosási lépések a Molnár és munkatársai (2011ab, 2016) által leírtak alapján történtek. Röviden összefoglalva, a GISH során a hibridizációs keverék (tárgylemezenként 30 μl) 50% formamidot, 2xSSC-t, 10% dextran szulfátot, valamint 70 ng U, M vagy egyéb típusú genomi próbát, illetve blokkoló DNS-t tartalmazott (A próba- és blokkoló DNS aránya 1:30-1:60 volt). A hibridizációs keveréket 90 °C-on 10 percig denaturáltuk, majd a kromoszóma-DNS-t a hibridizációs keverék jelenlétében 2 percig 80 °C-on denaturáltuk és 42 °C-on hibridizáltuk egy éjszakán át. A poszthibridizációs mosási és a hibridizációsjeldetektálási lépéseket követően, a preparátumok DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindole, Amersham) történt kontrasztfestése után, a hibridizáció eredményét egy megfelelő szűrőkészlettel és CCD kamerával ellátott Zeiss fluoreszcens mikroszkóp segítségével (korábban Zeiss Axioskop-2, később Zeiss AxioImager M2) vizsgáltuk. A FISH során a preparátum készítése és hibridizációs lépések a GISH esetében leírtak szerint történtek, kivéve, hogy a hibridizációt 37 °C-on végeztük, ahol a hibridizációs keverék (tárgylemezenként 30 μl) 20 ng pTa71 és 70 ng pSc119.2 illetve Afa family próbát tartalmazott lazacsperma-DNS jelenlétében.

2.4. Áramlási citometriás vizsgálatok és kromoszóma-szeparáció

Kromoszómaszuszpenziók előállítása áramlásos citometriához

Az intakt mitotikus kromoszómákat tartalmazó szuszpenziók előállítása fiatal csíranövények szinkronizált gyökércsúcs-merisztémasejtjeiből történt a Vrána és mtsai. (2000) által leírt protokol szerint, melynek főbb lépései a következők voltak. A csíranövények gyökércsúcs-merisztémasejtjeinek sejtciklusát 1.25 mM hidroxiureát (HU) tartalmazó Hoagland (Gamborg és Wetter 1975) tápoldatban történt 18 órás inkubáció segítségével szinkronizáltuk, majd 2,5 μM amiprofosz-metilt tartalmazó Hoagland oldatban 5 órán keresztül inkubáltuk a metafázisban történő akkumuláció érdekében. Ezután 50 db, jeges vízben tartott csíranövény gyökerének gyökércsúcstól számított 1 cm-es darabját Tris pufferben oldott 2% (v/v) formaldehid-ben fixáltuk 20 percen keresztül 5 °C-on, majd a gyökércsúcsokat (~1 mm) 1 ml LB01 pufferben (pH:9,0) (Doležel és mtsai 1989) homogenizáltuk egy Polytron PT1300 homogenizátor (Kinematica AG, Littau, Switzerland) segítségével (20000 rpm, 13 mp) a metafázisos kromoszómák kinyerése érdekében. A mintákat egy 50 μm pórusátmérőjű nylon szűrőn történt szűrést követően jégen tároltuk felhasználásig.

Egy- és kétparaméteres áramlási citometriás vizsgálatok

A kromoszómaminták egyparaméteres áramlási citometriás vizsgálatait egy argon-ion-lézerrel rendelkező FACSVantage SE áramlási citométer (Becton Dickinson, San Jose, CA) segítségével végeztük a Molnár és munkatársai (2011a) által leírtak szerint. A DAPI-val festett (2 µg/mL) kromoszómaszuszpenzjót 200–400 részecske/mp sebességel áramoltattuk át a készülék detektorán, ami a DAPI fluoreszcenciáját 424/44 sávszűrőn keresztül detektálja. Mintánként ~30000 kromoszómát vizsgáltunk, melynek során a Cell Quest szoftver (Becton Dickinson) segítségével történt adatgyűjtés eredményeit a kromoszómák relatív fluoreszcencia-intenzitásainak hisztogramja (áramlási kariotípus) formájában közöltük. Az áramlásikariotípus-csúcsok kromoszómaösszetételének meghatározásához minden csúcsból 2000 kromoszómát szeparáltunk egy mikroszkóptárgylemezen lévő 15-µl 5% szacharózzal kiegészített PRINS puffercseppbe (Kubaláková és mtsai 1997). Kiszárítás után a kromoszómákat repetitív DNS-próbákkal (pSc119.2, Afa family, pTa71) végzett FISH segítségével azonosítottuk. A mikroszkópos analízis során általában ≥100 kromoszómát azonosítottunk mintánként, majd az egyes kromoszómák gyakoriságát, illetve a minta tisztaságát az azonosított kromoszómák %ában adtuk meg. Az egyes izolálási kísérleteket 2-3 alkalommal megismételtük az ármalási kariotípusokon kijelölt szeparációs ablak pozíciójának kisebb módosításaival annak érdekében, hogy a legnagyobb tisztaságot érjük el az egyes kromoszómák esetében. Dolgozatomban az optimalizált beállításokkal elért legjobb eredményeket mutattam be.

Kromoszómák jelölése szuszpenzióban FISH segítségével

A kétparaméteres áramlási citometria alkalmazásakor a szuszpenzióban lévő kromoszómákat a DAPI festés mellett egy FITC fluorokrómmal konjugált GAA oligonukleotid próbával történő *in situ* hibridizáció segítségével is jelöltük, melyhez Giorgi és mtsai (2013) módszerét használtuk kisebb módosításokkal (Molnár és mtsai 2016). A FISHIS során a jégen tárolt 300 µl kromoszómaszuszpenzió kémhatását 10 M NaOH adagolásával (1-10 µl) pH:13,1-re állítottuk be és 15 percig 25 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a pH-t 9,1-re (~90-150 µl 1M Tris-HCl adagolásával) állítottuk vissza, majd a kromoszómaszuszpenzióhoz hozzáadtuk a jelölt GAA próbát (1ng/µl FITC-5'-(GAA)₇-3'-FITC 2xSC-ben oldva), melynek mennyiségét a következő tapasztalati képlet alapján számoltuk ki:

Próbamennyiség (µl) =
$$\frac{(s+N+T)\times 0.18}{0.82}$$

ahol 's' a kromoszómaszuszpenzió, 'N' a NaOH oldat, míg 'T' a Tris-HCl puffer mennyiségét jelenti µl-ben megadva. Néhány kísérletben a GAA oligonukleotid-próba mellett ACG próbát (1ng/µl FITC-5'-(ACG)₇-3'-FITC 2xSSC-ben oldva) is alkalmaztunk. Ezekben az esetekben a kiszámolt próbamennyiség 50-50%-a volt GAA és ACG oligonukleotidpróba. A jelölt próba hozzáadását követően a kromoszómaszuszpenziót 1 órán át sötétben tartottuk 25 °C-on, majd jégen tároltuk az áramlási citometriás vizsgálatokig.

A kétparaméteres áramlási citometriás vizsgálatokat kisebb módosításokkal az egyparaméteres vizsgálatokhoz hasonlóan végeztük. A kétparaméters áramlási kariotípusok meghatározása és az ez alapján történő kromoszómaszeparáció egy FACSAria II SORP áramlási citométer és szorter (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, USA) segítségével történt, mely rendelkezett a DAPI (ex. 358nm / em. 461nm) és a FITC (ex. 495nm / em. 519nm) fluoreszcenciájának gerjesztéséhez szükséges lézerfényforrásokkal (DAPI: Genesis: λ =355 nm; FITC SapphireHP: λ =488 nm). A jelölt kromoszómaszuszpenzióra jellemző FITC vs. DAPI 'dot plot' áramlási kariotípusát 1500–2000 részecske/mp áramlási sebesség mellett határoztuk meg. Az áramlási kariotípuson definiált részecskepopulációk kromoszómatartalmát a szeparációs ablakok beállításával 15-20 részecske/mp rátával izoláltuk. Az izolált frakciók kromoszómális összetételét az egyparaméteres vizsgálatokhoz hasonlóan FISH segítségével határoztuk meg. Téziseimben a sorozatos optimalizáció után elért legjobb eredményeket mutatom be.

2.5. Áramlási citometriával szétválsztott kromoszómák szekvenálása és bioinformatikai analízise

A szekvenálásához az *Ae. umbellulata* (AE740/03) és *Ae. comosa* (MvGB1039) áramlási citomertiával szeparált kromoszómáinak DNS-ét Šimková és munkatárs (2008) módszerével tisztítottuk. Az *Ae.*

umbellulata esetében a kromoszóma-DNS-t felszaporítottuk (Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom) (Molnár és mtsai 2016), míg az *Ae. comosa* esetében néhány évvel később ezt a lépést kihagytuk. Az *Ae. umbellulata* kromoszómáinak 2µg amplifikált és fragmentált DNS-ét használtuk a szekvenálási könyvtárak elkészítéséhez (TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit; Illumina, Inc., San Diego, USA), melyeket Illumina HiSeq 2000 platformon szekvenáltunk. Minden kromoszómát külön 'lane'-en szekvenáltunk annak érdekében, hogy ~130 millió 'paired-end' leolvasást (~26 Gbp) kapjunk kromoszómánként. A 2x100 bp 'pairedend' leolvasások *de novo* összeillesztéseit a MaSuRCA assembler (Zimin és mtsai 2013) segítségével végeztük. A kapott kontigok közül a 200bp-nál kisebb kontigokat kizártuk a további vizsgálatokból.

Az *Ae. comosa* esetében az egyes kromoszómák 20 ng nem amplifikált DNS-ét fragmentáltuk, majd a ~1000 bp fragmenteket használtuk a szekvenálási könyvtárak előállításához (NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®), melyeket NovaSeq 6000 (Illumina) platformon szekvenáltunk és 2x150 bp 'paired-end' leolvasást kaptunk eredményül. A nyers adatokból eltávolítottuk a nem megbízható bázisokat (Trimmomatic, Bolger és mtsai, 2014), majd az összeillesztéseket 111 bp k-merek felhasználásával a Meraculous v2.0.5 (Chapman és mtsai, 2011) szoftver segítségével végeztük. Az 1 kb-nál kisebb szkaffoldokat kihagytuk a további analízisből.

Az *Aegilops* kromoszómák genomösszeillesztései szabadon hozzáférhetők és letölthetők a DRYAD repozitórium weboldaláról (<u>https://datadryad.org/stash</u>) az "Assembly of *Aegilops comosa* chromosomes" (<u>https://doi.org/10.5061/dryad.wpzgmsbk9</u>) és "Assembly of *Aegilops umbellulata* chromosomes" (<u>https://doi.org/10.5061/dryad.70rxwdbwc</u>) adatkészleten keresztül.

A búza-*Aegilops* ortológ kapcsolatok feltérképezéséhez az *Aegilops umbellulata* kromoszómákat reprezentáló kontigokat kérdező szekvenciaként használtuk a hexaploid búzagenom (Chinese Spring) (IWGSC 2014) annotált génjeinek fehérjeszekvenciáin végzett BLASTx keresések során. A beállított kritériumok (minimális illeszkedési hossz: 30 aminosav, az illeszkedő szekvenciák minimális hasonlósága 90%) alapján kapott legjobb találatokat használtuk fel a búzakromoszómákon azonosított *Aegilops* génhomológok denzitásának kiszámolásához, melyhez 'sliding window' módszert alkalmaztunk (500 kb ablakméret 100 kb eltolásokkal) és a kapott adatokat hőtérkép formájában ábrázoltuk.

2.6. Génalapú markerek fejlesztése Aegilops kromoszómaszekvenciák segítségével

Az *Aegilops* kromoszómák szekvenciaillesztéseinek segítségével prediktált gének alapján génalapú molekuláris markereket fejlesztettünk. A markerfejlesztéshez alkalmazott három megközelítés segítségével EST-alapú, IT- (Intron-targeting) és cDNS-alapú markereket hoztunk létre.

Az EST-alapú markerek esetében a hexaploid búza D kromoszómáin térképezett 4452db EST szekvenciát (1D: 634; 2D: 742; 3D: 719; 4D: 587; 5D: 558; 6D: 485; 7D: 727) (Qi és mtsai 2004) a GrainGenes adatbázisból (http://wheat.pw.usda.gov/) töltöttük le, majd kérdező szekvenciaként használtuk az *Ae. umbellulata* genomillesztéseken történő BLASTn keresésekhez, melyeket a Ragged Genes Genome Explorer (v.2.2.24) grafikus felületén futtatott NCBI 'BLAST command line' alkalmazása (Zhang és mtsai 2000) segítségével végeztük. A legjobb találatok (kritériumok: illesztési hossz > 100bp, ID% \geq 70) szekvenciáin páronkénti illesztéssel (UGENE szoftver v.1.27.0; http://ugene.net/) meghatároztuk a búza és *Aegilops* szekvenciák közti InDel polimorfizmusok helyzetét, majd az *Aegilops* szekvenciák alapján primereket terveztünk az InDel régiókra a Primer3 alkalmazás segítségével.

Az IT markerek fejlesztése az R szoftver csomag (v. 3.4.0) bedtools (v.2.26.0) és primer3 (v.2.3.6) alkalmazásait használó R script segítségével történt. A markertervezés főbb lépéseiként BLASTn segítségével megkerestük az *Ae. umbellulata* gének búzahomológjait (az *Aegilops* géneket mint kereső szekvenciákat használtuk a búza referencia-genomszekvenciáján [RefSeq v1.0, IWGSC 2018] végzett BLASTn keresésekhez), majd meghatároztuk az intronok pozícióit. A búza-*Aegilops* találatok esetén megvizsgáltuk a gének első exonjának utolsó 100 bp és első intronjának első 500 bp hosszúságú szakaszát. A továbbiakban csak azokat a géneket használtuk fel, melyek a fenti 600 bp méretű szakaszban polimorfizmust mutattak a búza és az *Ae. umbellulata* között, majd erre a szakaszra primerpárokat terveztünk úgy, hogy az egyik primer az exon régióra, míg a másik primer az azt követő intron régióra essen. A tervezett markerekből véletlenszerűen kiválasztottunk 84 primerpárt (12

marker/kromoszóma), melyek oligonukleotid-szekvenciáit szintén az Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA) segítségével szintetizáltattuk meg.

Harmadik markerfejlesztési stratégiánk során búza ortológ gének fluoreszcensen jelölt és próbaként használt cDNS-szekvenciáinakfizikai helyzetét határoztuk meg az Ae. umbellulata és Ae. comosa kromoszómáin 'single-gene FISH' segítségével, így az Aegilops kromoszómák adott pozíciójára tervezhettünk molekuláris markereket. A gének fizikai térképezésére és a markerfejlesztésre vonatkozó részletek megtalálhatók a dolgozat alapjául szolgáló publikációban (Said és mtasi. 2021). A búza-cDNS-szekvenciát kísérletekhez használt 44 publikus adatbázisokból (https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/) letöltöttük, majd kereső szekvenciaként használtuk a búzareferenciaszekvenciákon (RefSeq v1.0, IWGSC 2018), valamint az Ae. umbellulata és Ae. comosa kromoszómák szekvenciáin az előzőekben leírt módon végzett BLASTn keresésekhez. Az adott génekre vonatkozó legjobb búza és Aegilops találatok szekvenciáit páronkénti illesztéssel (UGENE szoftver, v. 1.23) elemezve meghatároztuk a gének polimorf régióit, majd az exon-intron határokra, illetve intron régiókra specifikus primereket terveztünk.

Az EST-, IT- és cDNS-alapú markerek megszintetizált primereit első lépésben a fajkeresztezéshez használt búza (Mv9kr1) és *Ae. biuncialis* MvGB642 szülői genotípusokon teszteltük PCR segítségével. A búza és az *Ae. biuncialis* között polimorfizmust mutató markerek (mely polimorfizmus lehet igen/nem választ adó ún. 'presence-absence variation', vagy PAV, illetve méretbeli polimorfizmus) egy részének kromoszómális helyzetét az U és M kromoszómákat hordozó búza-*Aegilops* addíciós vonalakon (esetenként Chinese Spring-*Ae. umbellulata* 1U, 2U, 4U, 5U, 6U, 7U és Mv9kr1-*Ae. biuncialis* MvGB642 3U, valamint CS-*Ae. geniculata* 1M-7M addíciós vonalak) valamint kontrol búza (Chinese Spring), *Aegilops (Ae. biuncialis* MvGB642) és Mv9kr1-*Ae. biuncialis* MvGB642 amfiploid vonalakon is ellenőriztük PCR segítségével. A PCR reakciók kivitelezése (a reakcióelegy összetétele, az alkalmazott hőmérsékleti profilok), valamint az azt követő fragmentanalízis a COS markeranalízisek esetében leírtak, illetve Said és mtsai. (2021) szerint történtek.

2.7. COS marker analízis

A búza és az *Aegilops* genomok COS (Conserved Orthologous Set) markerek segítségével történt összehasonlító elemzéséhez az izolált *Aegilops* kromoszómák DNS-mintáit, a szeparációhoz használt *Aegilops* fajok genotípusainak teljes genomi DNS-ét, valamint különböző búza-*Aegilops* addíciós vonalak DNS-ét alkalmaztuk. Kísérleteinket az izolált *Aegilops* kromoszómák jellege (egyparaméteres, vagy kétparaméteres áramlási citometria segítségével előállított minta) alapján két részletben végeztük, melyek részletei megtalálhatók a Molnár és mtsai. (2013 és 2016) publikációkban.

Első kísérletünkhöz az Ae. umbellulata MvGB470, Ae. comosa MvGB1039, Ae. biuncialis MvGB382 és Ae. geniculata AE1311/00 egyparaméteres áramlásos citometriával izolált kromoszómafrakcióinak DNS-e mellett templátként használtuk a következő búza/Aegilops diszómás addíciós vonalakat: Chinese Spring/Ae. umbellulata (JIC2010001) 1U, 2U, 4U, 5U, 6U és 7U, Chinese Spring/Ae. comosa (JIC2110001) 2M, 3M, 4M, 5M, 6M és 7M, Mv9kr1/Ae. biuncialis (MvGB642) 1U^b, 1U^b6U^b, 3U^b, 2M^b, 3M^b és 7M^b, valamint Chinese Spring-Ae. geniculata (TA2899) 1U^g, 2U^g, 3U^g, 4U^g, 5U^g, 6U^g, 7U^g, 1M^g, 2M^g, 3M^g, 5M^g, 6M^g és 7M^g, ezek szülői genotípusait, illetve a kromoszómaszeparáláshoz alkalmazott Aegilops genotípusok teljes genomi DNS-ét. Összesen 140 olyan markert választottunk ki szabadon hozzáférhető COS markergyűjteményekből (Wheat Genetic Improvement Network, WGIN: http://www.wgin.org.uk/resources/Markers/TAmarkers.php), melyek potenciálisan lefedik a búza 1-7 homeológ csoportjait. A fluoreszcensen (6-FAM) jelölt primerekkel előállított PCR reakciók (10 ng templát DNS/10 µl reakciótérfogat) termékeit egy 3730xl DNS Analizátor (Applied Biosystems, USA) segítségével választottuk el és GeneMapper v4.0 szoftver segítségével értékeltük ki. A COS markerek különböző templát DNS-mintákon adott PCR amplikonjainak adatai megtalálhatók a Molnár és munkatársai (2013) publikációban. A búza referenciaszekvenciáinak (IWGSC 2018) hiányában a COS markerek által a búza D genomján és az Aegilops U és M genomján definiált ortológ régiók összehasonlításához a Brachypodium distachyonmint egyszikű modellfaj genomját használtuk referenciaként (Brachypodium distachyon v1.0 [IBI 2010]). Ennek során a markerfejlesztéshez használt EST-szekvenciák helyzetét hasonlósági (BLASTn) kereséssel határoztuk meg a Brachypodium genomján, majd a legjobb találatok alapján a COS markerek fizikai helyzetét grafikusan ábrázoltuk a

Brachypodium kromoszómákon (pseudomolekulákon) (Molnár és mtsai 2013). Az egyes *Brachypodium* kromoszómákon azonosított COS markerek lokuszait színkódokkal láttuk el az egyes búza és *Aegilops* genomok esetében kapott kromoszómális lokalizáció ábrázolása érdekében.

Második kísérletünk során COS markerekkel vizsgáltuk az *Ae. umbellulata* AE740/03, *Ae. comosa* MvGB1039, *Ae. speltoides* MvGB905 és *Ae. markgrafii* MvGB428 és MvGB607 kétparaméteres áramlási citometriával izolált kromoszómáinak DNS-mintáit, a genotípusok teljes genomi DNS-ét, valamint a GK Öthalom hexaploid búza DNS-ét annak érdekében, hogy információt kapjunk az egyes *Aegilops* genomok (U, M, S, C) és a búza közt fennálló homeológ kapcsolatokról (a kísérlet részletei megtalálhatók a Molnár és munkatársai (2016) publikációban). A búza 1-7 homeológ csoportját reprezentáló primerekkel történt PCR-reakciókat (0.4 µM primer/12µl reakciótérfogat) egy Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) PCR-készülék segítségével hajtottuk végre (Molnár és mtsai 2014). Az alkalmazott 123 COS marker (Quraishi és mtsai, 2009), azok annealing hőmérsékletei (Ta) valamint a kapott PCR-amplikonok megtalálhatók a Molnár és munkatársai (2016) publikációban. Az Eppendorf Mastercycler készülék segítségével kivitelezett PCR-reakciók termékeit egy 96 csatornás fragmentanalizátorral (Fragment Analyzer Automated CE System, Advanced Analytical Technologies, Ames, USA) választottuk szét és PROsize v2.0 szoftver segítségével elemeztük.

A búza-*Aegilops* homeológiakapcsolatok grafikus ábrázolása érdekében a COS markerek deléciós térképadatai (Quraishi és mtsai, 2009) és a búza-kromoszómakarok sorba rendezett szekvenciagyűjteményein (GenomeZipper v.5, https://urgi.versailles.inra.fr/download/iwgsc/zipper/; IWGSC 2014) BLASTn segítségével meghatározott markersorrend és genetikaitávolság-adatok (Molnár és mtsai. 2016) alapján elkészítettük a búzakromoszómák genetikai és fizikai térképét, melyeken feltüntettük a térképezett markerek helyzetét. A búza A, B és D genomja alapján elkészített fizikai térképek (Molnár és mtsai 2016) közül a disszertációban csak a B genom alapján készült térképet mutatom be. Az U, M, S, és C genomokra vonatkozó búza-*Aegilops* homeológiakapcsolatokat külön-külön térképek segítségével ábrázoltuk. Az egyes térképeken a markerspecifikus deléciós régiókat színkódokkal jelöltük annak megfelelően, hogy az adott marker mely homeológ csoporthoz tartozó kromoszómán volt lokalizált az adott *Aegilops* genomban.

2.8. Ae. biuncialis kétszülős genetikai térkép előállítása

Az *Ae. biuncialis* (2n=4x=28; U^bU^bM^bM^b) MvGB642 és MvGB382 genotípusait öntermékenyítéssel több, mint 20 éve tartjuk fenn és használjuk keresztezési partnerként a búza-előnemesítési programokban. A két genotípus keresztezéséből származó F₁ hibrideket öntermékenyítve 262 F₂ genotípust állítottunk elő. Az F₂ genotípusok allélösszetételének meghatározása a belőlük izolált DNS-mintákon DArTseq 'genotyping-by-sequencing' technológia (Diversity Arrays Technologies Pty. Ltd., Australia; https://www.diversityarrays.com/) segítségével történt DArTseqTM 1.0' platformon. Annak érdekében, hogy az egyes kapcsoltsági csoportokat az *Aegilops* U és M kromoszómákhoz tudjuk kötni, az *Ae. biuncialis* diploid genomdonorfajainak, az *Ae. umbellulata* (AE740/03) és *Ae. comosa* (MvGB1039) teljes genomi DNS-ét és áramlási citometriával szeparált kromoszómáik (1U-7U, 1M-7M) DNS--mintáit (*Molnár és mtsai. 2016*) szintén genotipizáltuk, a fajkeresztezésekhez használt búzagenotípusokkal (Mv9kr1, Chinese Spring) együtt. A genotipizálás két markertípust eredményezett: a Silico-DArT markerek dominánsak és a szekvenált genomi fragment adott mintában való jelenlétét/hiányát reprezentálják, míg az SNP-DArT markerek kodominánsak és a genomi fragmenten belüli szekvenciapolimorfizmust tükrözik az egyes minták között.

A generált markerek közül kiszűrtük azokat, melyek túl sok értékelhetetlen eredményt produkáltak az egyes genotípusokon (<0,95 Call Rate) vagy kicsi reprodukálhatósággal rendelkeztek (<0,95 Reproducibility). Szintén kizártuk a szülői *Ae. biuncialis* genotípusok közt nem polimorf markereket, az egyik szülőn heterozigóta eredményt adó markereket, illetve azokat, melyek nem megfelelő hasadási arányt mutattak (kodomináns SNP-DArT markerek: 1:2:1, domináns Silico-DArT markerek: 1:3) az F₂ generációban. Az F₂ genotípusok közül kizártuk azokat, melyek több, mint 10%-ban tartalmaztak hiányzó markeradatokat. A MultiPoint szoftver (www.multigtl.com) segítségével történt térképszerkesztéshez végül 224 F2 genotípust, 5893 SNP-DArT és 22180 Silico-DArT markert használtunk fel.

Első lépésben egy váztérképet hoztunk létre a kodomináns SNP-DArT markerek felhasználásával, melynek során 0,25 maximum rekombinációs gyakorisági határértéket (rf_s) alkalmazva meghatároztuk

a kapcsoltsági csoportokat. Ezt követően az egyes csoportok váz (vagy 'skeleton') markereinek sorrendjét 'jackknife' módszerrel történt újra-mintavételezéssel (≥ 90% határérték mellett) (Mester és mtsai 2003) tovább optimalizáltuk. Második lépésben a váztérkép legoptimálisabb intervallumaihoz illesztettük a kezdetben kizárt domináns Silico-DArT markereket (külön-külön az anyai és apai genotípusokra specifikus domináns markereket), melyeket 'csatolt' ('attached') markerekként jelöltünk. A végső teljes térkép a redundáns markereket is tartalmazza 'küldött' ('delegate') markerekként említve. A centimorgan (cM) értékeket a Kosambi térképfüggvény szerint (Kosambi 1944) határoztuk meg.

A kapcsoltsági csoportok kromoszómákhoz való hozzárendelése során felhasználtuk az egyes markercsoportoknak a diploid Ae. umbellulata-n (UU) és Ae. comosa-n (MM), valamint izolált kromoszómáikon adott eredményeit és figyelembe vettük az Ae. umbellulata szegregáló genetikai térképének segítségével (Zhang és mtsai 1998, Edae és mtsai 2017), valamint az Ae. comosa és Ae. umbellulata génalapú citogenetikai (single-gene FISH) térképének elkészítésével kapott (Said és mtsai. 2021) búza-Aegilops homeológiaviszonyokat.

A térképezett markerek segítségével vizsgáltuk a búza és Ae. biuncialis kromoszómák közt fennálló kolinearitást, melynek során az Ae. biuncialis kapcsoltsági csoportjait alkotó markerek szekvenciáit BLASTn segítségével illesztettük a hexaploid búza (Chinese Spring) A, B, illetve D genomjának referenciaszekvenciáihoz (v1.0) (IWGSC 2018) a Blast Command Line Application 2.9.0 (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/) szoftvercsomag segítségével (paraméterbeállítások: -task 'blastn'; -evalue 1e-5; -max_target_seqs 1; -max_hsps 1). A búza egyes genomjainak kromoszómáin kapott legjobb találatok startpozícióit alkalmazva az Aegilops és a búza D genomjának kromoszómái közti kolinearitást vizsgáltuk a Strudel szoftver (https://ics.hutton.ac.uk/strudel/) segítségével. Végül a kapcsoltsági csoportokat az Ae.biuncialis kromoszómák jelenleg alkalmazott nómenklatúrája (Badaeva és mtsai 2004) alapján rendeltük hozzá az 1U^b-7U^b és az 1M^b-7M^b kromoszómákhoz.

2.9. Statisztikai analízis

Az Mv9kr1- Ae. biuncialis MvGB642 4U addíciós vonal, valamint a 4M(4D) és 5M(5D) szubsztitúciós vonal morfológiai tulajdonságait egytényezős varianciaanalízis segítségével hasonlítottuk össze a búzaszülővel (Mv9kr1) P<0,05 és P<0,01 megbízhatósági szinten.

3. Eredmények

3.1. Vad fajok kromoszómáinak izolálása áramlási citometria segítségével 3.1.1. Kromoszómaizolálás méret alapján (egyparaméteres izolálás)

U- és M kromoszómák izolálása Aegilops fajokból

A diploid Ae. umbellulata (UU) MvGB470 és Ae. comosa (MM) MvGB1039, valamint a tetrapoid Ae. biuncialis (U^bU^bM^bM^b) MvGB382 és Ae. geniculata (U^gU^gM^gM^g) AE1311/00 genotípus DAPI-val festett kromoszómaszuszpenzióinak vizsgálata során megállapítottuk, hogy mind a négy faj áramlási kariotípusa négy csúcsból áll, azaz a kromoszómák méret alapján négy fő csoportra oszthatók (Molnár és mtsai. 2011b).

A csúcsokból izolált kromoszómákon végzett FISH segítségével kimutattuk, hogy az Ae. umbellulata első három csúcsa (I-III) megfelelt az 1U, 6U és 3U kromoszómának, melyeket 95%-, 74,1%- és 86,4%os tisztaságban tudtunk izolálni. Az összetett negyedik csúcs a 2U, 4U, 5U és 7U kromoszómát tartalmazta.

Az Ae. comosa esetében a jól elkülönült első csúcsra az 1M és 4M kromoszóma volt jellemző, míg a rosszul elkülöníthető második és harmadik csúcs főként a 6M és 2M kromoszómát tartalmazta, az 5M kromoszóma mindkét csúcsra jellemző volt. Végül a jól megkülönböztethető 4. kariotípuscsúcsban a 3M és 7M kromoszóma volt meghatározható. Szintén megállapítható volt, hogy egyik M kromoszómát sem lehetett méret alapján nagy tisztaságban (>80%) izolálni.

Az Ae. biuncialis 1. kariotípuscsúcsából az 1U^b kromoszóma nagy tisztaságban (>95%) volt izolálható. A további három összetett csúcs közül a 2. csúcs az 5M^b, 3M^b, 4M^b, 6M^b, 3U^b, és 6U^b kromoszómát reprezentálta, míg a 3. csúcsra az 1M^b, 3M^b, 2M^b, 2U^b, 4U^b, 5U^b és 7U^b kromoszóma volta jellemző. A 3M^b kromoszóma hasonló gyakoriságban volt kimutatható e két csúcsban. A 4. csúcs főként a 7M^b kromoszómát tartalmazta, melyet 80%-ot meghaladó tisztaságban tudtuk izolálni.

Végül az *Ae. geniculata* 1. csúcsa az 1U^g és 6M^g kromoszómát, míg a 2. csúcsa a 3U^g, 4U^g és 6U^g kromoszómát tartalmazta. A 2M^g, 4M^g, 5M^g, 2U^g, 5U^g és 7U^g kromoszóma a harmadik csúcsban helyezkedett el, míg a legnagyobb 1M^g, 3M^g és 7M^g kromoszóma a nagyobb fluoreszcenciaintenzitásoknál megjelenő 4. csúcsban volt található.

Összegzésképpen elmondható, hogy méret (azaz DAPI fluoreszcencia) alapján csak az *Ae. umbellulata* 1U, 6U és 3U, valamint az *Ae biuncialis* 1U^b és 7M^b kromoszómája izolálható nagyobb tisztaságban. Megfigyelhető volt az is, hogy egyes kromoszómák (pl. 4U, 2M, 3M, 4M, 6M) eltérő kariotípuscsúcsokban jelentek meg a diploid (*Ae. umbellulata* és *Ae. comosa*) és tetrapolid (*Ae. biuncialis* és az *Ae. geniculata*) fajokban, ami a kromoszómák méretének eltérő változásaira utal az egyes fajok képződése során.

Kromoszómák izolálása a kenyérbúza diploid őseiből

A hexaploid búza diploid őseinek (*T. urartu, Ae. speltoides* és *Ae. tauschii*) izolált kromoszómákra alapozott genomikai vizsgálata jelentősen segítheti az agronómiai szempontból fontos gének különböző vad változatainak azonosítását és fajkeresztezések révén történő hasznosítását a nemesítésben.

A *T. urartu* MvGB115 (AA), *Ae. speltoides* MvGB905 (SS ~ BB) és *Ae. tauschii* MvGB605 (DD) méret alapján, egyparaméteres áramlási citometriás vizsgálatai során megállapítható volt, hogy a diploid genomdonorfajok áramlási kariotípusa három csúcsal rendelkezik (I-III), melyek kromoszómális összetétele hasonló (Molnár és mtsai 2014). Az első csúcs az 1-es, 4-es és 6-os homeológ csoport kromoszómáit reprezentálta. A II. csúcs az 5-ös homeológ csoporthoz tartozó kromoszómákra volt jellemző, melyből a *T. urartu* esetében az 5A^u kromoszómát 78%-os, az *Ae. speltoides* 5S kromoszómáját 89%-os, míg az *Ae. tauschii* 5D kromoszómáját 87,3%-os tisztaságban izoláltuk. A III. csúcs a 2-es, 3-as és 7-es homeológ csoport kromoszómáit tartalmazta.

Kromoszómák izolálása a C genommal rendelkező Aegilops fajokból

Szintén megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy lehet-e tiszta kromoszómafrakciókat izolálni méret alapján a C genom diploid donor fajából, az *Ae. markgrafii*-ból (2n=2x=14, CC), illetve ennek természetes allotetraploid hibridjeiből, az *Ae. triuncialis*-ból (2n=4x=28, U^tU^tC^tC^t), illetve az *Ae. cylindrica*-ból (2n=4x=28, D^cD^cC^cC^c) (Molnár és mtsai 2015).

Az Ae. markgrafii MvGB428, az Ae. triuncialis MvGB585 és Ae. cylindrica MvGB1719 kariotípusának FISH-sel (Afa family, pSc119.2 és 45S rDNS próbával) és esetenként GISH-sel történt meghatározása lehetővé tette a három faj kromoszómáinak egyértelműazonosítását, valamint egy U^t/C^t reciprok transzlokáció kimutatását az Ae. triuncialis MvGB585 genotípusban, melyet T1: 6U^tS.6U^tL-5C^tL és T2: 5C^tS.5C^tL-6U^tL transzlokációként azonosítottunk (Molnár és mtsai 2015).

A DAPI-val festett kromoszómaszuszpenziók áramlási citométeres vizsgálataival kimutattuk, hogy az *Ae. markgrafii* áramlási kariotípusa négy jól elkülöníthető csúcsból áll. Az összetett I. és II. csúcsokban az 1C, 6C, 7C, illetve a 2C és 3C kromoszóma voltkimutatható. A III. és IV. csúcs megfelelt az 5C, illetve 4C kromoszómának, melyeket 66.2% és 91.3%-os tisztaságban tudtuk izolálni (Molnár és mtsai 2015).

Az *Ae. triuncialis* esetében az I. és II. csúcs jól elkülöníthető volt, ami megfelelt a 6U'S.6U'L-5C'L transzlokációnak, illetve a 7C^t kromoszómának. A két kromoszómát 90,1%, illetve 70%-os tisztaságban lehetett izolálni. A csak részlegesen megkülönböztethető III. és IV. csúcs a 3C^t, 6C^t, 1U^t és 3U^t, valamint az 1C^t, 4C^t és 4U^t kromoszómacsoportot tartalmazta. Végül az V. csúcsra a 2C^t, 2U^t, 5U^t, 7U^t kromoszóma és a T2:5C^tS.5C^tL-6U^tL transzlokációs kromoszóma volt jellemző.

Az Ae. cylindrica hat csúcsa közül négy jól elkülönült (I., II., V. és VI. csúcsok), míg a III. és IV. csúcs nem volt teljesen megkülönböztethető. A II. és V. csúcs specifikus volt az $1C^c$ és $5D^c$ kromoszómára, melyeket 67.5% és 84.9% tisztaságban izoláltunk. Az összetett I. és III. csúcs által reprezentált kromoszómacsoportokban a $6C^c$ és $7C^c$, valamint $3C^c$, $1D^c$ és $6D^c$, míg a IV. és VI. csúcsban a $2C^c$, $4C^c$, $5C^c$ és $4D^c$, valamint a $2D^c$, $3D^c$ és $7D^c$ kromoszómát mutattuk ki.

3.1.2. Kromoszómaizolálás méret és a mikroszatellit ismétlődések gyakorisága alapján (kétparaméteres áramlási citometriás szétválasztás)

A GAA és ACG ismétlődések kromoszómális elhelyezkedését az Aegilops umbellulata (AE740/03), Ae. comosa (MvGB1039), Ae. speltoides (MvGB905) és Ae. markgrafii (MvGB428) kromoszómáin

mikroszatellit próbákkal, valamint az U, M, S és C kromoszómákon ismert hibridizációs mintázattal rendelkező pSc119.2, Afa family és 45S rDNS próbakeverékkel (Badaeva és mtsai, 1996ab; Molnár és mtsai 2011a) egymást követően végzett FISH segítségével határoztuk meg (Molnár és mtsai. 2016). A gyökércsúcs-merisztémasejteken végzett *in situ* hibridizációs vizsgálataink igazolták, hogy a GAA és ACG mikroszatellit motívum nagyon gyakori az U, M, S és C genomban, így elméletileg képes változó mennyiségű és intenzitású FISH hibridizációs jeleket generálni az egyes kromoszómákon, ami a DNS mennyiségétől (azaz a kromoszóma méretétől) függő DAPI kék fluoreszcenciával együtt lehetőséget adhat a kromoszómák kétparaméteres áramlási citometriás analízisére.

Kísérleteinkben az *Ae. umbellulata, Ae. comosa, Ae. speltoides, Ae. markgraafii* (MvGB428) és később az *Ae. sharonensis* (S^{sh}S^{sh}) (Sr1644) kromoszómáit szuszpenzióban FISH segítségével (FISHIS, Giorgi és mtsai 2013) FITC-cel konjugált GAA oligonukleotid-próbával (néhány esetben az ACG próbával kiegészítve) illetve DAPI festés segítségével jelöltük. A jelölés eredményeként kapott kétparaméteres (DAPI-FITC fluoreszcencia) 'dot plot' áramlási kariotípus mind az öt diploid faj esetében hét többé-kevésbé elkülöníthető, az egyes kromoszómáknak megfelelő kromoszómapopulációt tartalmazott.

Az *Ae. umbellulata* esetében míg az egyparaméteres izolálással csupán 3 kromoszóma és egy kevert frakció volt megkülönböztethető (Molnár és mtsai, 2011b), addig a kétparaméteres módszerrel mind a 7 U kromoszóma elkülöníthetővé és a korábbinál lényegesen nagyobb (88-98%) tisztaságban izolálhatóvá vált (Molnár és mtsai 2016).

Az Ae. comosa (MM) esetében, ahol az egyparaméteres áramlási citometriás analízissel egyetlen kromoszóma nagy tisztaságú (>80%) szeparációja sem volt lehetséges, addig a kétparaméteres analízis három jól elkülöníthető kromoszómapopulációt azonosított, melyekből a 6M, 3M és 7M kromoszóma nagy tisztaságban (>93-96%) volt izolálható. A későbbiekben, a GAA és ACG próba keverékét használva a FISHIS jelöléshez, a fennmaradó 1M, 2M, 4M és 5M kromoszóma izolálása is lehetővé vált 79,6%, 73,6%, 78,4%, illetve 90,2%-os tisztaságban, miközben a 3M, 6M és 7M frakció tisztasága is tovább nőtt (96-99%).

A továbbiakban a GAA- ACG próbakeveréket alkalmazva az *Ae. speltoides* és *Ae. markgrafii* áramlási citometriás analíziséhez szintén sikerrel tudtuk egyedi kromoszómafrakciókra bontani az S és a C genom teljes kromoszómaszerelvényét, melyek tisztasága meghaladta a 80%-ot (S: 84,4%-99,2%; C: 80,1%-97,9%).

Egy másik S genommal rendelkező értékes génforrás, az *Ae. sharonensis* (Sr1644) kromoszómáinak kétparaméteres módszerrel történő izolálása során a DAPI-FITC ármalási kariotípus öt jól elkülönült és egy kevert kromoszómapopulációból állt. A populációk FISH-sel történt mikroszkópos vizsgálata (pSc119.2 és GAA microsatellitpróba segítségével) során megállapítottuk, hogy a jól elkülönült populációk a 2S^{sh}, a 3S^{sh}, a 4S^{sh}, az 5S^{sh}, illetve a 7S^{sh} kromoszómának feleltek meg, melyeket 91% - 97%-os tisztaságban tudtunk izolálni, míg a kevert populációban az 1S^{sh} és a 6S^{sh} kromoszóma fordult elő közel azonos arányban.

Mindezen eredményekből kitűnik, hogy búza rokonsági körébe tartozó diploid *Aegilops* fajok kromoszómái áramlásos citometriai módszerekkel izolálhatók. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a keresztezésekhez használt tetraploid *Ae. biuncialis* kromoszómáinak izolása javítható-e kétparaméteres áramlásos citometriás módszerrel.

Az Ae. biuncialis MvGB382 (U^bU^bM^bM^b) kromoszómáinak DAPI-FITC áramlási citometriás kariotípusán kilenc populáció volt elkülöníthető, melyek kromoszómaösszetételét mikroszkóppal meghatározva világossá vált, hogy a 9 populációból továbbra is csak 2 kromoszóma, az 1U és a 7M izolálható hasonló vagy kissé nagyobb tisztaságban (92-98%), mint azt az egyparaméteres módszer esetében tapasztaltuk.

Alternatívaként megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy lehetséges-e további *Ae. biuncialis* kromoszómákat izolálni a hexaploid búza (Mv9kr1)-*Ae. biuncialis* 1U/6U, 3U, 2M, 3M és 7M addíciós vonalból. A FITC-DAPI 'dot blot' áramlási kariotípusokban az addíciós vonalak *Aegilops* kromoszómái a kisebb, A és D búzakromoszómákra jellemző DAPI fluoreszcencia-intenzitásoknál jelentek meg. Ugyanakkor az *Aegilops* U és M kromoszómák a rajtuk található jelentős mennyiségű GAA klaszternek köszönhetően intenzív GAA-FITC fluoreszcenciával rendelkeztek, mely alapján egyértelműen elkülönültek a GAA hibridizációs szignálokat nem, vagy csak kismértékben tartalmazó A és D kromoszómáktól. Mindezeknek a tulajdonságoknak köszönhetően az *Aegilops* kromoszómák (a 7M

kivételével) nagy tisztaságban (90% - 96%) voltak izolálhatók az addíciós vonalakból. Hasonló eredményeket kaptunk a kromoszómáknál kisebb kromatinegységek, pl. kromoszómakarok esetében is búza (Chinese Spring)-*Ae. umbellulata* diteloszómás addíciós vonalakat használva a kísérletekhez. Kimutattuk, hogy a 2US, 2UL és 7UL kromoszómakaregyértelműen elkülönül a búzakromoszómáktól, ezáltal belőlük is tiszta frakciókat (2US: 94,9%; 2UL: 90,3%; 7UL: 88,3%) tudtunk előállítani (Molnár és mtsai. 2016).

Összességében elmondható, hogy a búza rokonsági köréhez tartozó legtöbb diploid (többségében *Aegilops*) fajból egy- és kétparaméteres áramlásos citometriával lehetséges volt az összes kromoszómát izolálni, míg a tetraploid fajokból csak egy-két kromoszóma izolálása vált lehetségessé. A probléma azonban kiküszöbölhető volt, ha a tetraploid fajokkal létrehozott introgressziós (addíciós és diteloszómás) vonalakat használtuk fel a kromoszómaizoláláshoz (Molnár és mtsai 2016). Ugyanakkor a diploid és tetraploid fajokon végzett vizsgálatok rámutattak arra is, hogy az egyes diploid fajok és az allopoliploidizáció során kialakult tetraploid fajok kromoszómáinak méreteeltér, ami a kromoszómák evolúciós átalakulását reprezentálhatja.

3.2. Áramlási citometriával izolált kromoszómák genomikai alkalmazása 3.2.1. Molekuláris markerek azonosítása Aegilops kromoszómákon

Ezekben a kísérletekben megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy a búza ortológ génjeinek alapján fejlesztett COS markerek alkalmasak lehetnek-e az *Aegilops* fajok U és M kromoszómáinak kimutatására búza genetikai háttérben. Arra is választ kerestünk, hogy az egyes *Aegilops* fajok egyparaméteres áramlási citometria segítségével, méret alapján izolált kromoszómapopulációi segíthetik-e a markerek kromoszómális helyzetének meghatározását. Munkánk során 140 COS markert teszteltünk búza-*Aegilops* (Chinese Spring/*Ae. umbellulata*, Chinese Spring/*Ae. comosa*, Chinese Spring/*Ae. geniculata* és Mv9kr1/*Ae. biuncialis*) addíciós vonalakon, melyek a diploid (*Ae. umbellulata* és *Ae. comosa*), illetve allotetraploid *Aegilops* fajok (*Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata*) U és M kromoszómáit hordozzák, illetve ugyanezen *Aegilops* fajok ármalásikariotípus-csúcsaiból izolált kromoszómafrakcióinak szubgenomi DNS-mintáin.

A vizsgálatok során kapott PCR-termékek adatai megtalálhatók az eredmények publikációjának (Molnár és mtsai. 2013) kiegészítő adatai közt (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070844.s006). A vizsgált 140 COS markerből 133 volt működőképes, melyek a négy *Aegilops* faj 8 genotípusán öszességében 822 PCR-terméket produkáltak. A 822 PCR-termék közül 492 (59.85%) mutatott hosszpolimorfizmust az addíciós vonalak búzaszülői genotípusaihoz (Chinese Spring, Mv9kr1 és Mv25) képest, melyek közül 197 (40.04%) polimorf termék kromoszómális elhelyezkedését sikerült meghatározni a búza-*Aegilops* addíciós vonalak és az áramlási citometriával izolált kromoszómák DNS-mintái segítségével. 35 nem-polimorf PCR-termék elhelyezkedését szintén az izolált kromoszómák DNS-mintái segítségével határoztunk meg. A 100 COS marker 232 (197 polimorf és 35 nem-polimorf) PCR-termékeinek kromoszómális és áramlási kariotípusos pozíciója szintén megtalálható Molnár és mtsai. (2013) kiegészítő adatai közt.

A diploid és tetraploid *Aegilops* fajok közt nem-polimorf termékek aránya az U genom esetében magasabb volt (az *Ae. biuncialis* esetében 80,5%, míg az *Ae. geniculata* esetében 77,7% az *Ae. umbellulata*-hoz képest), mint az M genom esetében (55,5% az *Ae. biuncialis* és 65,7% az *Ae. geniculata* esetében az *Ae. comosa*-hoz képest).

Mivel néhány PCR-termék több *Aegilops* kromoszómán is kimutatható volt, 156 lokuszt egyértelműen tudtunk az U kromoszómákon azonosítani: 30-at (19,23%) az 1U, 8-at (5,12%) a 2U, 44-et (28,20%) a 3U, 21-et (13,46%) a 4U, 10-et (6,41%) az 5U, 28-at (17,94%) a 6U és 15-öt (9,61%) a 7U kromoszómán. Az M kromoszómákhoz kötött 132 lókusz közül négyet (3,03%) azonosítottunk az 1M, 27-et (20,45%) a 2M, 47-et (35,60%) a 3M, 3-at (2,27%) a 4M, 8-at (6,06%) az 5M, 19-et (14,39%) a 6M és 24-et (18,18%) a 7M kromoszómán. A búzaszülői genotípushoz képest legalább 2 bp méretű polimorfizmust mutató kromoszóma-specifikus lokuszokat tekintettük alkalmasnak új búza-*Aegilops* introgressziós vonalak szelekciójára, mely kritériumnak 51 marker 169 PCR-amplikonja felelt meg.

Annak érdekében, hogy a búza- és *Aegilops* genomok közti homeológia-összefüggéseket tanulmányozni tudjuk, pontosan definiálnunk kell azt a genomi régiót, amit az adott COS markerek reprezentálnak. Ugyanakkor, az alkalmazott COS markerek helyzetéről csak kromoszómaszintű információk álltak rendelkezésre mind a búza, mind az *Aegilops* fajok esetében, a szubkromoszómális

pozícióra vonatkozó információink nem voltak. Ezért a COS markerek fejlesztéséhez használt ESTszekvenciák helyzetét először a jó minőségű referencia-genomszekvenciával rendelkező *Brachypodium distachyon* kromoszómáin határoztuk meg, majd azt vizsgáltuk, hogy az adott marker által reprezentát *Brachypodium* kromoszómarégió mely kromoszómákon található a búza- és az *Aegilops* genomokban. A COS markerek EST-szekvenciáinak helyzetét BLASTn segítségével határoztuk meg a *Brachypodium* kromoszómákon (a markerek EST azonosítói és a BLAST találatok paraméterei megtalálhatók Molnár és mtsai. (2013) kiegészítő adatai közt).

Az *Aegilops* és búzakromoszómákon azonosított COS markerek helyzetét grafikusan ábrázolva a *Brachypodium* kromoszómákon hasonló strukturális kapcsolatokat mutattunk ki a *Brachypodium* és a búza D genomja között, amint arról korábban már beszámoltak (Luo és mtsai 2009, The International Brachypodium Initiative 2010). Például az 1D kromoszóma homológiát mutatott a 2-es és 3-as *Brachypodium* (Br) kromoszómák bizonyos régióival, a 2D az 1Br és 5Br kromoszómával, a 3D a 2Br-vel, a 4D és 5D az 1Br, illetve 4Br kromoszómával, a 6D a 3Br, míg a 7D az 1Br és 3Br kromoszómával.

A diloid és tetraploid *Aegilops* fajok U és M kromoszómáinak jelentős része a búzáéhoz hasonló homológiát mutatott a *Brachypodium* kromoszómákkal. Azaz a 3-as homeológ csoportba tartozó *Aegilops* kromoszómák főként a 2Br kromoszómával, míg az 1-es homeológ csoport kromoszómái a 2Br és 3Br kromoszómával mutattak homológiát. Ugyanakkor öt nagyobb méretű kromoszómaátrendeződés (I – V) volt kimutatható az *Aegilops* genomok és a búza D genomja közt, valamint az U genom és az M genom közt. Ezek az átrendeződések arra utaltak, hogy az *Aegilops* fajok U genomja átrendeződéseken ment keresztül az evolúció során a búzához és az *Aegilops* M genomhoz képest. Ezek az átrendeződések érinthették a 2U, 3U, 4U, 6U és 7U kromoszómát.

Eredményeink alapján elmondható, hogy búzán kifejlesztett COS markerek jelentős része felhasználható az U és M genommal rendelkező *Aegilops* fajok kromoszómáinak azonosítására. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az áramlási citometriával izolált kromoszómák DNS-mintái alkalmas templátként szolgálhatnak a PCR-alapú markerek kimutatásához, ugyanakkor azt is jelezték, hogy csak akkor használható az adott kromoszómaminta, ha annak tisztasága eléri a 70-80%-ot, amint az látható volt az 1U, 3U és 6U *Ae. umbellulata* kromoszóma esetében.

COS markerek azonosítása Aegilops kromoszómákon, kétparaméteres áramlási citometriával izolált Aegilops kromoszómák DNS mintáinak segítségével

Az Aegilops U, M, S és C genomok teljes kromoszómaszerelvényének nagy tisztaságban történő izolálása lehetőséget adott a COS markerek kromoszómális helyzetének pontosabb meghatározására az Aegilops fajokban. A 2014-2015-ös időszakban már rendelkezésre állt a hexaploid búza kromoszómaalapú vázlatos genomösszeillesztése és virtuális génsorrendje (GenomeZipper) (IWGSC 2014) is, mely lehetővé tette a búza-Aegilops homeológiakapcsolatok közvetlen vizsgálatát.

Ezekben a kísérletekben olyan COS markereket alkalmaztunk, melyekkifejlesztéséhez használt ESTszekvenciákat előzetesen deléciós sorozat segítségével fizikailag térképeztek a búzakromoszómákon (Quraishi és mtsai, 2009). A 123 tesztelt marker közül 100 volt képes összesen 544 specifikus terméket produkálni legalább az egyik *Aegilops* faj teljes genomi DNS-mintáján (*Ae. umbellulata:* 137, *Ae. comosa:* 131, *Ae. speltoides:* 127 és *Ae. markgrafii:* 142) (A PCR-termékekre vonatkozó információk megtalálhatók az eredmények publikációjának kiegészítő adatai közt, Molnár és mtsai 2016).

Összesen 100 db marker 466 (a búzához képest 225 polimorf és 241 nem-polimorf) PCR-termékének helyzetét sikerült meghatározni az *Aegilops* kromoszómákon. (Data S1, Molnár és mtsai 2016).

Az *Ae. umbellulata* U kromoszómáin meghatározott 118 lokusz közül 63 (53,38%) bizonyult polimorfnak a hexaploid búza genotípushoz (GK Öthalom) képest, míg az *Ae. comosa* M kromoszómáin azonosított 114 lokusz közül 53 (46,49%), az *Ae. speltoides* S kromoszómáin azonosított 120 lokusz közül 56 (46,66%) volt polimorf. Az *Ae. markgrafii* esetében 53 termék (46,49%) bizonyult polimorfnak a C genom kromoszómáin lokalizált 114 termék közül.

A búza-*Aegilops* homológiavizsgálata érdekében elkészítettük a búza A, B és D genomjának fizikai térképét, melyen feltüntettük a 100 db COS marker helyzetét, ahol az egyes lokuszokat színkódokkal láttuk el az *Aegilops* kromoszómákon elfoglalt helyzetüknek megfelelően. A térképszerkesztéshez felhasználtuk a markerfejlesztéshez használt EST-k deléciós régiókban elfoglalt helyzetét, sorrendjüket pedig hasonlósági kereséssel (BLASTn) határoztuk meg a búzakromoszómák sorbarendezett vázlatos

genomösszeillesztésein (GENOMEZIPPER v.5; IWGSC 2014). Ezek az eredmények szintén hozzáférhetők a dolgozat alapjául szolgáló publikációban (Data S2, Molnár és mtsai 2016).

Az egyes homeológ csoportok kromoszómáinak markerösszetételét a Jaccard hasonlósági együttható (Kosman és Leonard 2005) segítségével vizsgálva kimutattuk, hogy az *Ae. speltoides* S és az *Ae. comosa* M kromoszómáinak struktúrája mutatta a legnagyobb hasonlóságot a búza kromoszómáihoz. Ugyanakkor jelentős átrendeződéseket mutatott az *Ae. umbellulata* U genomja, míg a legnagyobb struktúrális különbségek az *Ae. markgrafii* C genomja esetében volt tapasztalható (Molnár és mtsai 2016). Megállapítottuk, hogy az *Aegilops* fajok 1. és 5. homeológ csoporthoz tartozó kromoszómái általában nagyobb makroszinténiát mutattak a hasonló homeológ csoportba tartozó búzakromoszómákkal.

Az *Ae. umbellulata* esetében az 1U, 3U és 5U kromoszóma mutatta a legnagyobb homológiát a búza (w) kromoszómákkal. Ugyanakkor a 6U kromoszóma több olyan genomi régiót tartalmazott, mely a búzában a w2 vagy w4 kromoszómákon volt megtalálható.

Ezzel ellentétben az *Ae. comosa* kromoszómái jelentős hasonlóságot mutattak az azonos homeológ csoportba tartozó búzakromoszómákkal, bár néhány átrendeződés valószínűsíthető volt.

Az *Ae. speltoides* S genomja szintén közeli hasonlóságot mutatott a búzához, ugyanakkor két marker alapján nem zárható ki, hogy egy w2 kromoszómákkal homológ régió átépülhetett a 3S kromoszómára. Több marker pozíciója azt mutaja, hogy lokális homológia van a w4 kromoszómák és a 6S, valamint a w6 kromoszómák és a 4S illetve 3S kromoszóma között.

Az *Ae. markgrafii* esetében az 1C és 5C kromoszóma mutatta a legnagyobb hasonlóságot a megfelelő (1B illetve 5B) búzakromoszómákkal, bár 3 marker alapján valószínűsíthető egy w5-specifikus régió jelenléte a 2C kromoszómán. Kimutatható volt, hogy a 2B és a 3B kromoszóma hosszú karjának, valamint a 4B kromoszóma rövid karjának bizonyos régiói és a 7C kromoszóma között homológia állhat fenn. További genomátrendeződésekre utalhat, hogy 5 darab 4B-specifikus markert és 4 db 2B-specifikus markert a 4C kromoszómán mutattunk ki, valamint a 11 marker alapján detektált homológia a 7B és a 3C kromoszóma között.

Összefoglalásaként elmondható, hogy a hexaploid búza B genomjának feltételezett őseként az *Ae. speltoides*, illetve az *Ae. comosa* M genomjának kromoszómái mutatták a legnagyobb homológiát a megfelelő búzakromoszómákkal. Ugyanakkor az *Ae. umbellulata* kromoszómái, csakúgy mint az *Ae. markgrafii* kromoszómái jelentősen átrendeződtek az evolúció során.

3.2.2. Az Ae. biuncialis genomszerveződésének vizsgálata F₂ szegregáló genetikai térkép létrehozásával

A génforrásként használt *Ae. biuncialis* kétszülős szegregáló genetikai térképe számos ponton segítheti a fajkeresztezéses génátvitel folyamatát. A kromoszómákon térképezett markerek alapjául szolgálhatnak az *Aegilops* kromatin nyomonkövetését biztosító markerkapcsolt szelekciós rendszernek. Az agronómiai jelentőséggel bíró gének és kvantitatív tulajdonságokért felelős genomi régiók (QTL-ek) térképezése már a vad fajban megtörténhet, így az introgressziós folyamat a kapcsolt markerek segítségével célzottan történhet. A genetikai térkép segítségével vizsgálhatóvá válnak az egyes *Aegilops* kromoszómákon belül esetlegesen bekövetkezett átrendeződések, inverziók, melyre a COS markerekkel végzett vizsgálataink nem adtak lehetőséget. Hosszabb távon a szegregáló genetikai térkép vázként szolgálhat a genomi szekvenciák összeillesztéséhez, sorba rendezéséhez is.

A térképezési populáció létrehozásához szülői genotípusokként az MvGB382 és az MvGB642 génbanki tételt választottuk, melyeket évek óta keresztezési partnerként alkalmazunk a búzaelőnemesítési programokban. A két szülő igen eltérő ökogeográfiai élőhelyről származik (MvGB382: Irán, 320 m tengerszint feletti magasság és 500 mm/év csapadék; MvGB642: Szíria, 1160 m tengerszint feletti magasság és 1143 mm/év csapadék). Köztük számos tulajdonságban jelentős különbséget tapasztaltunk. Így, az MvGB382 genotípus jó szárazság- és sótűréssel, valamint szemtermése nagyobb β -glükán tartalommal rendelkezik, illetve 1-1,5 héttel korábban virágzik, mint az MvGB642 genotípus (Molnár és mtsai 2004, Ivanizs és mtsai 2019). Az MvGB642 viszont hatékony levélrozsdarezisztenciát mutat.

A két genotípust keresztezve 91 F_1 egyedet, majd ezek öntermékenyítésével 262 MvGB642 x MvGB382 F_2 genotípust állítottunk elő. A térképszerkesztéshez végül 224 F_2 genotípust használtunk fel, melyek allélösszetételét 5893 SNP-DArT és 22180 Silico-DArT marker segítségével jellemeztük.

A genetikai térképnek a disszertáció megírásakor elkészített legfrissebb verziója 16 kapcsoltsági csoportot tartalmazott, melynek a teljes térképtávolsága 2618,26 cM volt. A térkép 975 egyedi lokuszt tartalmaz, a lokuszok közti átlagos távolság 2.72 cM, míg a legnagyobb távolság két lokusz között 23.94 cM. A térkép összesen 11317 markert tartalmaz. A kapcsoltsági csoportok (LG: Linkage Group) kromoszómákhoz való hozzárendelése a legmegbízhatóbb kodomináns SNP DArT markerekből álló váztérkép alapján történt, melyek kapcsoltsági csoportjait alkotó markereinek eredményeit összehasonlítottuk a diploid genomdonorfajok, az Ae. umbellulata (UU) és Ae. comosa (MM) izolált kromoszómáin és teljes genomi DNS-én adott eredményeivel. Megállapítottuk, hogy 7 kapcsoltsági csoport (LG16, LG7, LG4, LG1, LG14, LG2, LG8) markerei az M genommal rendelkező Ae. comosa allélváltozatait mutatta, míg 9 db kapcsoltsági csoport (LG13, LG5, LG6, LG9, LG10, LG11, LG12, LG15, LG3) esetében a markerek allélváltozata megegyezett az Ae. umbellulata estében kapott eredményekkel (2. On-line melléklet). A kapcsoltsági csoportok azonosítása során szintén figyelembe vettük a diploid Ae. umbellulata U kromoszómái és a búzakromoszómák közti kolinearitásra vonatkozó információkat (Zhang és mtsai 1998, Edae és mtsai 2017), valamint az Ae. comosa kromoszómákra vonatkozó 'single-gene FISH' térképpel kapott búza-Aegilops homeológia- összefüggéseket (Said és mtsai 2021). Szintén megvizsgáltuk a tetraploid Ae. biuncialis kapcsoltsági csoportjai és a búzakromoszómák közt fennálló szinténikus kapcsolatokat (kolinearitást), melynek során hasonlósági (BLASTn) keresést végeztünk a váztérképet alkotó markerek szekvenciái és a búza pszeudomolekulái (IWGSC 2018) között (2. On-line melléklet). A markerek búzakromoszómákon adott legjobb találatainak bp-ban megadott pozícióit összehasonlítottuk az Aegilops kromoszómákon cM-ban megadott genetikai pozícióival, melyek segítségével meghatároztuk az egyes Aegilops és búzakromoszómák közt mutatkozó homológiát, illetve kolinearitást. Mindezek alapján a kapcsoltsági csoportokat hozzárendeltük az Ae. biuncialis 1Ub-7Ub és 1Mb-7Mb kromoszómáihoz.

Eredményeink megerősítették a COS markerekkel korábban feltárt búza-Aegilops homeológiakapcsolatokat, miszerint az M genom kromoszómái nagyobb mértékű kolinearitást mutatnak az azonos homeológ csoportba tartozó búzakromoszómákkal, mint az U genom kromoszómái.

Az M genommal ellentétben az U genom nagymértékű átrendeződéseken ment keresztül a búzához képest. Megerősítve a diploid *Ae. umbellulata*-n kapott COS markeres eredményeinketjelentős mértékű kolinearitást mutattunk ki a tetraploid *Ae. biuncialis* 1U, 2U, és 3U, valamint kisebb mértékben az 5U kromoszómája és a búza hasonló homeológ csoportokba tartozó kromoszómái között. Kimutattuk továbbá, hogy a 4U, 6U és 7U kromoszóma esetében diploid szinten tapasztalt átrendeződések megtalálhatók voltak az allotetraploid *Ae. biuncialis* esetében is. Továbbá kimutatható volt, hogy ezek a genomátrendeződések gyakran együtt jártak a transzlokálódott szegmentumok inverziójával, amint az megfigyelhető volt a 4U kromoszómá kimutatott 6DL homológ régió esetében. A nagymértékben átrendeződött 6U kromoszóma egyes régiói homológiát mutattak a 4DS, 6DS, 7DL, 2DL és 1DL búza-kromoszómakarral, ahol a 4DS, valamint a 6DS és 2DS karral homológ régiók egy része szintén invertálódott a búzához képest. Végül a 7U kromoszómán, melynek nagyrésze fordítottan kolineáris a búza 7D rövid karjával, szintén kimutatható volt egy disztálisan elhelyezkedő, ugyancsak invertálódott, 3DS karral homológ régió.

A későbbiek során megkezdtük az *Ae. biuncialis* MvGB382 x MvGB642 F₂ populáció egyedeiből történő F₆ RIL (Recombinant Inbreed Line) populáció létrehozását, melynek 166 F₆ öntermékenyített vonala jelenleg felszaporítás alatt áll. Az F₆ RIL populáció segítségével a szülői genotípusok közt jelentősen eltérő tulajdonságokért felelős gének és QTL régiók térképezhetők lesznek már az *Ae. biuncialis*-ban, majd a térképezett kromoszómarégiók ismeretében, azok nyomon követésével, az adott tulajdonságokért felelős gének célzottan átvihetők a búzába. Mindezekhez azonban szekvenciaszintű információkkal kell rendelkeznünk az egyes *Aegilops* kromoszómák génösszetételéről, a gének allélváltozatairól, melyek segítségével speciális markereket fejleszthetünk a génátviteli folyamat elősegítése érdekében. A következő fejezetekben az *Aegilops* U és M kromoszómák génösszetételének feltérképezése és szekvenciáik segítségével történt markerfejlesztés terén történt eredményekről adok áttekintést.

3.2.3. Az Aegilops kromoszómák szekvenálása

Az Ae. comosa és Ae. umbellulata kromoszómák izolálása utat nyitott e génforrásként használt fajok U és M genomjának shot-gun szekvenálásához, kromoszómaszintű genomösszeillesztések elkészítéséhez, majd ezen keresztül a kromoszómák génösszetételének feltérképezéséhez. Az *Ae. umbellulata* kromoszómáinak szekvenálásakor (2013-14-ben) a standard protokol szerint az áramlálsi citometriával szeparált kromoszómák 20-60 ng tisztított DNS-ét MDA (Multiple Displacement Amplification) segítségével 1-3 µg mennyiségekre szaporítottuk fel, majd használtuk a szekvenálási könyvtárak előállításához. Az *Ae. comosa* esetében (2018-19-ben) a szekvenálási könyvtárak előállításához már 20-30 ng tisztított kromoszómális DNS is elegendőnek bizonyult. Mindez azt eredményezte, hogy az *Ae. comosa* kromoszóma-specifikus genomösszeillesztései jobb minőségűek, kevésbé fragmentáltak, amit a genomösszeillesztések jobb statisztikai mutatói (pl. kisebb szkaffoldszám, nagyobb teljes 'assembly' méret, stb.) is jeleznek.

Mivel az *Ae. umbellulata* kromoszómák szekvenálása korábban történt meg, a gének annotációja és a génmodellek meghatározása először ezeken a kromoszómákon készült el, míg az *Ae. comosa* kromoszómaszekvenciáin ezek az analízisek még folyamatban vannak. Az *Ae. umbellulata* génstruktúráinak meghatározása hasonlósági keresés (BLASTx) segítségével történt, melynek során hat jó minőségű genomösszeillesztésekkel rendelkező növényfaj [*B. distachyon* (v1.2, IBI 2010), *S. bicolor* (v1.4, Paterson és mtsai 2009), *O. sativa* (MSU7, Kawahara és mtsai 2013), *H. vulgare* (IBGSC 2012), *T. urartu* (Ling és mtsai 2013), *Ae. tauschii* (Jia és mtsai 2013)] protein szekvenciáit használtuk templátként. Mindezek eredményeként 25225 nagy megbízhatósággal rendelkező gént azonosítottunk az *Ae. umbellulata* kromoszómáin: 1U=2880, 2U=4722, 3U=3198, 4U=2814, 5U=2982, 6U=4196, 7U=4433. Az azonosított gének szekvenciái megtalálhatók az értekezés 3. On-line mellékleteként.

A prediktált gének helyzetét a búza D genomjának kromoszómáin meghatározva összehasonlíthattuk az *Ae. umbellulata* és a búzakromoszómák közti homeológiakapcsolatokat. Kimutatható volt, hogy az 1U, 2U és 3U kromoszóma többé-kevésbé homológ a megfelelő búzakromoszómákkal. Mindazonáltal, a 4U kromoszóma homeológ régiókat tartalmaz a búza 4D, 5D és 6D kromoszómáival, az 5U kromoszóma az 5D-n kívül tartalmaz egy a 4D kromoszóma hosszú karjának disztális régiójának megfelelő genomi fragmentet. A legnagyobb átrendeződésen a 6U kromoszóma ment keresztül az evolúció során, melynek eredményeként homeológ régiókat tartalmaz az 1D, 2D, 4D, 6D és 7D kromoszómával. Végül a 7U kromoszómán szintén kimutatható volt egy a 3D kromoszóma rövid karjával homeológ régió.

Fontosnak tartom megjegyezni, hogy a fenti, génösszetétel alapján kapott kromoszómaszintű búza-*Ae. umbellulata* homeológiaösszefüggések jó egyezést mutatnak az *Ae. biuncialis* U kromoszómáin térképezett DArT markerek által kimutatott összefüggésekkel. Ezáltal a szekvenálási adatok mintegy validálják a kapcsoltsági térkép adatait. Az *Ae. comosa* kromoszómaszekvenciáin ezek az analízisek még folyamatban vannak.

3.3. Kromoszómaalapú genomikával támogatott fajidegen génátvitel az Ae. biuncialis-ból a hexaploid búzába

3.3.1. Molekulárismarker-fejlesztés

Az Ae. umbellulata és Ae. comosa kromoszómáinak szekvenciaillesztései lehetőséget adtak új génspecifikus markerek létrehozására, melyekkel a génátviteli folyamat során az Aegilops kromoszómaszegmentumok nyomon követhetővé válnak. Munkánk során három markerfejlesztési stratégiát alkalmaztunk.

Az első (1) esetben ("EST-alapú" markerek fejlesztése) megkerestük a hexaploid búza I-VII homeológ csoportjain térképezett EST- (Expressed Sequence Tag) szekvenciák *Aegilops* homológjait az *Ae. umbellulata* kromoszómaszekvenciákon végzett BLASTn keresés segítségével (Összes illesztett EST-szekvencia: 4456; átlagos EST/kromoszóma: 636,5), majd páronkénti illesztés segítségével 399 olyan találatot azonosítottunk az *Ae. umbellulata* kromoszómáin (1U:48, 2U:90, 3U:56, 4U:44, 5U:32, 6U:82, 7U:47), melyek több, mint 5 bp INDEL polimorfizmust mutattak a búza- és az *Aegilops* szekvenciák közt. Primerpárt tervezve a polimorf régiókra 124 markert teszteltünk PCR segítségével a keresztezési partnerként használt búza (Mv9kr1), *Ae. biuncialis* (MvGB642, MvGB382, MvGB1112, MvGB470) és *Ae. umbellulata* (AE740/03) genotípusokon. A búza és az *Aegilops* genotípusok közt polimorfizmust mutató markereket (50 marker, 40,3%) búza-*Aegilops* 1U-7U és 1M-7M addíciós vonalakon teszteltük, melyek révén a következő számú markert sikerült azonosítani az egyes kromoszómákon: 1U: 10, 2U:1, 3U: 2, 4U:4, 5U:7, 6U:4, 7U:8, 1M:2, 5M:2, 7M:2 (három markert az U és az M genomon is azonosítottunk; 1U/1M: BE497808, 7U/7M: BF483072, BE423703). Az *Aegilops*

kromoszómákon azonosított markerek primerszekvenciái, valamint a szülői genotípusokon és addíciós vonalakon adott PCR-amplikonjaik adatai megtalálhatók az értekezés 4. On-line mellékletében (http://real.mtak.hu/id/eprint/127766). E markerek egy részét sikerrel alkalmaztuk az *Aegilops* kromoszómákat hordozó búzavonalak szelekciójára az előnemesítési programok során (lásd később).

Az "IT" (Intron-targeting) markerek fejlesztése során először az *Ae. umbellulata* prediktált génjeit (génmodelleket) térképeztük a hexaploid búza referenciaszekvenciájára (RefSeq v1.0, IWGSC 2018), majd összehasonlítottuk a búza- és *Aegilops* gének első exonjának utolsó 100 bp méretű és első intronjának első 500 bp méretű szakaszát, majd megfelelő (>10bp) polimorfizmus esetén primereket terveztünk az exon és intron szakaszokra. Összesen 3095 *Ae. umbellulata* kontigot felhasználva 15475 primerpárt terveztünk (5 primerpár/kontig) (5. On-line melléklet; http://real.mtak.hu/id/eprint/129506). A PCR-tesztek során a 84 véletlenszerűen kiválasztott primerpárból (12 marker/kromoszóma) 29 (34.5%) mutatott jelentős polimorfizmust az *Aegilops* és a búzaszülő között (21 produkált igen/nem eredményt; míg 8 marker mutatott hosszpolimorfizmust), melyekből 24-et tesztelve Chinese Spring-*Ae. umbellulata* és Chinese Spring-*Ae. comosa* addíciósvonal-sorozatokon 20 marker helyzetét sikerült igazolni az egyes kromoszómákon (1U:2, 2U:2, 3U:3, 4U:4, 5U:3, 6U:2, 7U:3, 1M:1, 2M: 2, 4M:1, 7M: 1) (4. On-line melléklet).

Végül azért, hogy az *Aegilops* U és M kromoszómák egy meghatározott citogenetikai pozíciójára fejlesszünk specifikus cDNS-alapú markereket, kidolgoztunk egy új markerfejlesztési stratégiát (3), melynek érdekében először alkalmaztuk kombináltan az egyedi gének vizuális kimutatására használt 'single-gene FISH' technikát és az áramlási citometriával izolált kromoszómák szekvenciaillesztéseit (Said és mtsai, 2021).

A markerfejlesztés első lépéseként 44 búza ortológ gén cDNS-szekvenciáit hibridizációs próbaként alkalmazva (4-8 cDNS-próba/kromoszóma) FISH segítségével meghatároztuk a gének citogenetikai pozícióját a kromoszómákon és elkészítettük az *Ae. comosa* és *Ae. umbellulata* kromoszómáinak 'single-gene FISH' térképét (Said és mtsai, 2021). Az *Ae. comosa* esetében 43 cDNS-próba pozícióját 47 lokuszon határoztuk meg, míg az *Ae. umbellulata* esetében 43 próba 52 lokuszon mutatott hibridizációs jelet (Said és mtsai, 2021). Az *Ae. comosa* kromoszómáin FISH segítségével meghatározott 47 génpozícióból 44-et (93,6%-ot) sikerült BLASTn segítségével validálnunk ugyanazon kromoszómák szekvenciáin, mint amelyeket az *in situ* hibridizációs kísérletek eredményeként kaptunk. Az *Ae. umbellulata* esetében az 52 'single-gene FISH' pozícióból 40-et (76,9%) sikerült *in silico* megerősíteni. (A BLASTn keresések részletei megtalálhatók Said és mtsai. 2021 publikációjában.)

Végül a búza cDNS-szekvenciák és a BLASTn keresések eredményeként kapott *Ae. comosa*, illetve *Ae. umbellulata* kromoszómaszekvenciák páronkénti illesztésével meghatároztuk a polimorfizmust (>2 bp INDEL) mutató régiókat, melyek ismeretében PCR-primereket terveztünk. A tervezett primereket azután PCR segítségével validáltuk búzán (Mv9kr1), *Ae. biuncialis*-on (MvGB642) és Mv9kr1-*Ae. biuncialis* MvGB642 amfiploidokon, valamint az egyes M és U kromoszómákat hordozó Chinese Spring-*Ae. comosa*, Chinese Spring-*Ae. umbellulata* és Chinese Spring-*Ae. geniculata* addícós vonalakon (4. On-line melléklet). A tervezett primerek szekvenciái, az alkalmazott PCR-reakciók eredményeként kapott termékméretek szintén megtalálhatók az értekezés alapjául szolgáló publikáció (Said és mtasi. 2021) mellékleteként. Összesen 274 primerpárt terveztünk (136 primerpárt az M és 138 primerpárt az U kromoszómaszekvenciák alapján). A búza-*Aegilops* polimorfizmust mutató markerek közül 62-t teszteltünk az addíciós vonalakon, melyek közül 39 marker helyzetét sikerült azonosítani az *Aegilops* kromoszómákon (4. On-line melléklet, 8. táblázat).

Öszefoglalva a markerfejlesztés terén kapott eredményeket elmondható, hogy az *Aegilops* kromoszómák genomösszeillesztéseinek segítségével mintegy 16062 primerpárt terveztünk a három markerfejlesztési stratégia eredményeként. A keresztezési partnerként szolgáló búza- és *Aegilops* genotípusokon tesztelt 482 marker közül 217 mutatott polimorfizmust, melyből 109 marker esetében tudtuk búza-*Aegilops* addíciós vonalakon végzett PCR segítségével meghatározni a markerek kromoszómális lokalizációját. Ezen markerek egy részét (37 markert) a későbbiekben részletezett módon felhasználtuk az *Aegilops* U és M kromoszómáinak nyomon követésére alkalmas markerkapcsolt szelekciós rendszer kialakításához.

3.3.2. Génátvitel az Aegilops biuncialis-ból a búzába

Az ATK MGI Génmegőrzési Osztályán a búza (*T. aestivum*) x *Ae. biuncialis* keresztezések 1995ben kezdődtek Dr. Lángné Molnár Márta irányításával. A későbbiekben az *Ae. biuncialis* MvGB642, MvGB382, MvGB1112 és MvGB470-es génbanki számú genotípusával sikeresen hoztak létre amfiploidokat, majd az MvGB642-es genotípussal addíciós vonalakat (1U, 2U, 3U, 1U/6U, 2M, 3M, 7M) (Schneider és mtsai., 2005; Schneider és Molnár-Láng, 2012). Az *Ae. biuncialis*-ból történő fajidegen génátviteli kísérletekbe 2001-ben kapcsolódtam be. A PhD fokozat megszerzését (2009) követően célom elsődlegesen olyan búza-*Aegilops* rekombinánsok, transzlokációk előállítása volt, melyek az *Ae. biuncialis* különböző genotípusainak már csak egy kromoszómaszakaszát hordozzák. Célunk volt további búza (Mv9kr1) x *Ae. biuncialis* addíciós vonalak előállítása is. Az új addíciós és transzlokációs vonalak létrehozásával az *Ae. biuncialis* MvGB642-es genotípusának levélrozsdarezisztenciáját, valamint magas mikroelem- és étkezésirost-tartalmát (Farkas és mtsai, 2014; Rakszegi és mtsai, 2017), az MvGB382-es genotípus só- és szárazságtűrését (Molnár és mtsai, 2004), míg az MvGB1112 és MvGB470 genotípus szárazságtűrését (Dulai és mtsai, 2014) szeretnénk a nemesítők számára felhasználhatóvá tenni.

Az 1995-ös keresztezésekből előállított Mv9kr1 x *Ae. biuncialis* MvGB642 amfiploidokat nem sikerült fenntartani, a keresztezési populációban pedig további *Aegilops* kromoszómákat nem tudtunk kimutatni, ezért az MvGB642-es, valamint az MvGB382-es génbanki tétellel újra előállítjuk az Mv9kr1 x *Ae. biuncialis* F₁ hibrideket, majd amfiploidokat. 2012-ben az Mv9kr1 x *Ae. biuncialis* MvGB642, x MvGB382-es és a már meglévő x MvGB1112-es amfiploidokat visszakereszteztük az Mv9kr1 szülői búzagenotípussal, majd a későbbi években előállított BC₂ és BC₃ nemzedékeket U és M genomi DNS-próbát alkalmazva multikolor genomi *in situ* hibridizációval (mcGISH), valamint fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) vizsgáltuk (Afa family, pSc119.2 és 45S rDNS próba segítségével) annak érdekében, hogy azonosítsuk és nyomon kövessük az átvitt *Aegilops* kromoszómákat.

Az új BC populációkban további Aegilops kromoszómák jelenlétét igazoltuk. Az MvGB642-es genotípus 4U, 5U, és 6M; az MvGB382-es genotípus 1U-4U, valamint 2M-4M, 6M és 7M kromoszómáit, végül az MvGB1112-es genotípus 5U, 7U valamint 1M-7M kromoszómáit BC populációkban А korábbiaktól eltérően az új а azonosítottuk. búza-Aegilops kromoszómaátrendeződések nagy számban, de többnyire monoszómás formában jelentek meg. Az MvGB1112-es BC populációban azonosítottunk egy monoszómás 3DS.3DL-M terminális transzlokációt. Az MvGB642-es BC populációban kimutattunk egy monoszómás 5DS.5DL-M transzlokációt, valamint egy másik genotípusban azonosítottunk egy 3DS.3DL-M diszómás transzlokáció mellett egy monoszómás 4DS.4DL-M transzlokációt is. Végül kimutattunk egy monoszómás 1DL.1DS-U transzlokációt, melynek öntermékenyített utódjaiban (154107 sz. BC3F1 vonalban) a transzlokáció diszómás formáját sikerült a későbbi években is fenntartani. Ezen kezdeti, 2015-ig kapott eredmények részét képezték Farkas András 2018-ban irányításommal elkészített PhD dolgozatának.

2015 után számos korábbi monoszómás, ezáltal genetikailag instabil Mv9kr1-*Ae. biuncialis* MvGB642 transzlokációt sikerült diszómás (genetikailag stabilabb) formában előállítani. Ennek megfelelően diszómás formában állítottuk elő a 4DS.4DL-M és 5DS.5DL-M transzlokációt.

A korábban talált transzlokációk mellett új búza-*Aegilops* kromoszómaátrendeződéseket is detektálnunk. Azonosítottunk egy diszómás 2DS.2DL-U transzlokációt. Ez a BC₃F₂ növény szintén tartalmazott egy 4U kromoszómát monoszómás formában, ami lehetővé tette, hogy az utódokban sikerrel izoláljuk a már csak a diszómás transzlokációt hordozó vonalat, valamint a 4U kromoszómát szintén diszómás formában hordozó genotípust.

Egy másik BC₃F₂ genotípusban a diszómás 2DS.2DL-U transzlokáció mellett egy monoszómás 5M kromoszómát mutattunk ki, mely lehetővé tette a későbbiekben az 5M kromoszómát diszómás formában hordozó vonalak előállítását (lásd később).

Egy további BC_3F_2 genotípusban egy monoszómás 4DL.4DS-M és egy 5MS.5ML-D transzlokációt mutattunk ki. Egy másik BC_3F_3 genotípusban 2 db nem azonosítható M kromoszóma mellett kimutattunk két, a búza- és az U kromoszómák közt létrejött centrikus fúziót. A 45S rDNS-próba hibridizációs jele és a szatellit jelenléte alapján arra következtettünk, hogy az egyik centrikus fúzió az 1US és a 2BL kromoszómakarközt alakult ki, míg a másik valószínűleg az 1U kromoszóma hosszú karját és egy A kromoszómakart tartalmazó centrikus fúzió lehet.

Végül azonosítottunk a 6B búzakromoszóma és egy nem azonosítható M kromoszóma közt kialakult reciprok terminális transzlokációt, ahol a transzlokációs töréspont a 6B hosszú karján található két

diagnosztikus pSc119.2 sáv között volt található, így egy T6BS.6BL-MS és egy TML.MS-6BL kromoszóma jött létre.

Általánosságban is kijelenthető, hogy a vizsgált Mv9kr1-Ae. biuncialis MvGB642 BC populációban gyakran volt megfigyelhető a búzakromoszómákat érintő kromoszómaátrendeződések és egyéb strukturális aberrációk (pl. teloszómák, deléciók) képződése.

3.3.3. Az Aegilops kromoszómák nyomon követése markerkapcsolt szelekcióval

A markerfejlesztés terén elért eredményeinket igyekeztünk a gyakorlatban is alkalmazni annak érdekében, hogy hatékonyabbá és gyorsabbá tegyük a búza (Mv9kr1) x *Ae. biuncialis* (MvGB642) előnemesítési populációk vizsgálatát és az egyes *Aegilops* kromoszómák nyomon követését.

Összesen 37 markert (3 EST-, 10 IT- és 24 cDNS-alapú markert) teszteltünk egy olyan populáción, mely 44 BC₃ öntermékenyített utódvonalat, valamint a búza (Mv9kr1) és Ae. biuncialis (MvGB642) keresztezési partnert, illetve ezek amfiploidját tartalmazta. A BC3 populáció összeállításakor igyekeztünk a vonalakat úgy kiválogatni, hogy a lehető legjobban reprezentálják a populációban jelenlévő Ae. biuncialis kromoszómákat, illetve búza-Aegilops transzlokációkat. A PCR-reakciók eredményeként az egyes markerek hasonló méretű amplikonokat generáltak az Mv9kr1-Ae. biuncialis MvGB642 BC3 öntermékenyített populáción, mint azt korábban a búza- és Aegilops szülőkön, illetve a búza-Aegilops addíciós vonalakon történt PCR-tesztek során tapasztaltuk. A tesztelt markerek primerszekvenciáira, valamint a szülőkön és addíciós vonalakon kapott PCR-termékek méreteire vonatkozó információkat a Doktori értekezéshez csatolt 4. on-line mellékletben adtam meg, illetve megtalálhatók az értekezés alapjául szolgáló publikációban (Said és mtsai. 2021). A populáció markerekkel történő tesztelését kiegészítettük U és M genomi próbával végzett in situ hibridizációval is. A tesztek eredményeként végül 32 markert találtunk alkalmasnak az egyes Aegilops kromoszómák nyomon követésére. Megállapítható volt, hogy a lehetséges 14 Aegilops kromoszómából 6 volt kimutatható a vizsgált populációban. Kis gyakorisággal volt jelen az 1U (1 vonal), a 2U (3 vonal) és a 4U (8 vonal) kromoszóma, míg jelentősen nagyobb gyakorisággal fordult elő a 4M (20 vonal) és az 5M (19 vonal) kromoszóma. A GISH segítségével 7 vonalban kimutatható volt egy szatellittel rendelkező M kromoszóma is, melyet korábban 6M kromoszómaként azonosítottunk, ugyanakkor a 6M kromoszómára specifikus molekuláris markerek nem erősítették meg a citogenetikai megfigyeléseket. Ez összefüggésben állhat a 6M kromoszómát esetlegesen érintő, a populáció korábbi generációiban más kromoszómákon gyakran megfigyelt szerkezeti változásokkal.

A GISH, FISH és a 4U-specifikus molekuláris markerek (*Ae4U11426.3*, *Ae4U20523.1*, *Ae4U15448.1*) segítségével igazoltuk, hogy a 8 darab 4U kromatint tartalmazó vonal közül 2 genotípus diszómás 4U addíciós vonal.

GISH és a $4S-4_M_4$ marker segítségével kimutattuk, hogy az egyik 4M kromoszómát diszómás állapotban tartalmazó vonal (201027) kromoszómaszáma 42 volt. A repetitív DNS-próbákkal (Afa family, pSc119.1 és 45S rDNS) történt újrahibridizáció után kiderült, hogy a 4D búza-kromoszómapár hiányzik ebből a vonalból, így ez a genotípus egy 4M(4D) diszómás szubsztitúciós vonalnak bizonyult.

Az 5M kromoszómára specifikus *BE499071* marker segítségével további két genotípust (201195, 201196) válogattunk ki, melyek a GISH alapján 2db 5M kromoszómát hordoztak, de szintén 42 kromoszómával rendelkeztek. FISH segítségével igazoltuk, hogy ezekben a vonalakban az 5M kromoszóma diszómás formában van jelen, viszont hiányzik az 5D kromoszóma, így a vonalat 5M(5D) diszómás szubsztitúciós vonalként azonosítottuk (41. ábra). Meg kell jegyeznünk, hogy ezen vonalakban a 7B kromoszóma helyett csak egy 7BL teloszóma volt jelen.

A populációban számos, az előző években már azonosított búza-*Ae. biuncialis* transzlokációt mutattunk ki diszómás vagy monoszómás formában úgy, hogy egyéb idegen kromoszómát már nem tartalmazott az adott egyed. Diszómás formában sikerült kimutatnunk a T5DS.5DL-M transzlokációt 4 vonalban, az T1DL.1DS-U transzlokációt 1 vonalban, a T2DS.2DL-U transzlokációt 1 vonalban, valamint monoszómás formában a T4DL.4DS-M transzlokációt 1 vonalban.

Néhány transzlokáció esetében a molekuláris markerek segítségével lehetővé vált az Aegilops kromoszóma-szegmentum azonosítása is. Például a 2U és 2M kromoszómára specifikus Ae2U14996 marker segítségével kimutattuk, hogy a T2DS.2DL-U transzlokációs kromoszómán lévő Aegilops

fragment a 2U kromoszómából származott (T2DS.2DL-2U). Két 4U kromoszómára specifikus marker (*Ae4U15443* és *Ae4U20523*) segítségével a T1DL.1DS-U transzlokációt T1DL.1DS-4U-ként azonosítottuk. Érdemes megemlíteni, hogy ezt a transzlokációt előzőleg 4 vonalban mutattuk ki GISH segítségével, a markerek további két vonalban is (201087, 201088) jelezték a transzlokáció jelenlétét. Mindez jelezi, hogy a molekuláris citogenetikai módszereket molekuláris markerekkel kombinálva növelhető a szelekció hatékonysága és megbízhatósága. Ugyanakkor az eddigi eredményeink arra is rámutatnak, hogy további markerek bevonására van szükség pl. az 5DS.5DL-M transzlokációk, illetve az eddig még nem azonosított búza-U (201151 sz. vonalban) és búza-M (201164 sz. vonalban) transzlokációk azonosításához.

A búza-*Ae. biuncialis* MvGB642 BC₃ öntermékenyített utódpopuláció egyedeit 2020-21-ben kontrollált körülmények közt üvegházban neveltük fel a búzaszülői partner egyedeivel együtt. A citogenetikai analízis eredményeként a 4U addíciós vonalból és az 5M(5D) szubsztitúciós vonalból 3-3 egyed, míg az Mv9kr1 búzaszülőből és a 4M(4D) szubsztitúcióból 5-5 egyed állt rendelkezésre, ami lehetővé tette e vonalak morfológiai tulajdonságainak előzetes összehasonlítását. A többi transzlokációs vonalból 1-1 egyed állt rendelkezésre, így ezek morfológiai tulajdonságait csak leíró jelleggel közlöm, a búzaszülővel történt statisztikai összehasonlítás nélkül.

A 4U addíciós vonalak kalászai tömör szerkezetűek, de szignifikánsan rövidebbek a búzaszülői partner (Mv9kr1) kalászainál. A rövid kalászok kevesebb kalászkával rendelkeznek, melynek következtében a kalászonkénti és a növényenkénti szemszám szignifikánsan kisebb, mint az Mv9kr1 esetében.

A 4M(4D) szubsztitúciós vonalak szignifikánsan alacsonyabbak, mint a búzaszülő. Kalászai valamelyest kisebbek, de szignifikáns eltérés csak a kalászonkénti kalászkaszámban volt tapasztalható a búzához képest. Ugyanakkor az Mv9kr1 szülőhöz hasonló kalászonkénti és növényenkénti szemszám jó termékenyülőképességet jelez.

Az 5M(5D) szubsztitúciós vonal morfológiai paraméterei és terméselemei tükröztek bizonyos pozitív tendenciákat a búzaszülőhöz képest, az alacsony mintaszám (3 növény) miatt ezek nem érték el a statisztikai szignifikancia szintjét. Az adatok alapján mégis úgy tűnik, hogy a szubsztitúciós vonal alacsonyabb, mint a búzaszülő. Tömör, kissé hosszabb tar kalászai hasonló vagy jobb fertilitást mutatnak, mint a búzakalászok, ami ennek a genotípusnak a kalászonkénti és növényenkénti szemszámban kifejeződő jó termékenyülőképességét jelzi.

A transzlokációs vonalak esetében csak egy-egy növény állt rendelkezésre, ezért a közölt morfológiai adatok csak tájékoztató jellegűek lehetnek. A búza (Mv9kr1)-*Ae. biuncialis* MvGB642 transzlokációk közül két genotípust emelnék ki. Az T1US.2BL centrikus fúzió a búzánál alacsonyabb. Rövidebb kalászaiban kevesebb kalászka foglal helyet, melyek a búzához hasonló fertilitást és szemkötést mutatnak. A T2DS.2DL-2U transzlokáció szintén alacsonyabb a búzaszülőnél. Kalászai kissé rövidebbek, felfelé keskenyedők, bennük kevesebb kalászka található. Ennek ellenére fertilitása jelentősen meghaladja a búzánál hasonló körülmények közt tapasztalt értéket, ami mind a főkalász, mind a teljes növény szintjén mért kiemelkedő szemkötésben is megnyilvánul.

A többi transzlokációs vonallal kapcsolatban általánosan elmondható, hogy morfológiai paramétereik és terméselemeik tekintetében (a T4DS.4DL-M és T5MS.5ML-2DL transzlokáció jó bokrosodási képességét leszámítva) nem érik el a búza esetében tapasztaltakat. Ugyanakkor fertilitásuk elég utódszemet biztosít ahhoz, hogy ezeket a transzlokációkat a jövőben fenntartsuk és visszakeresztezésekkel a búza genetikai hátteret stabilizáljuk.

Az addíciós, szubsztitúciós és transzlokációs vonalak üvegházi és tenyészkerti felszaporítását követően részletesen vizsgálható lesz az átvitt *Aegilops* kromoszómák és kromoszóma-szegmentumok hatása a búza abiotikus és biotikus stressztűrésére és agronómiai tulajdonságaira.

4. Új tudományos eredmények

1. Egyparaméteres áramlási citometria alkalmazásával meghatároztuk az U és M genom donorfajainak, az *Ae. umbellulata*-nak és *Ae. comosa*-nak, valamint ezek allotetraploid rokonainak, az *Ae. biuncialis*-nak és *Ae. geniculata*-nak a DAPI fluoreszencia-intenzitás alapján adott áramlási kariotípusát és a kariotípuscsúcsok kromoszómális összetételét. Kimutattuk, hogy méret alapján nagy tisztaságban izolálható az *Ae. umbellulata* 1U, 3U és 6U, valamint az *Ae. biuncialis* 1U kromoszómája.

2. Meghatároztuk a hexaploid búza diploid őseinek, a *T. urartu*-nak, *Ae. speltoides*-nek és *Ae. tauschii*-nak áramlási kariotípusát. Méret alapján sikerrel izoláltunk tiszta frakciókat e fajok 5A, 5S és 5D kromoszómája esetében.

3. Meghatároztuk a C genommal rendelkező *Aegilops* fajok, a diploid *Ae. markgrafii*, valamint az allotetraploid *Ae. cylindrica* (C^cC^cD^cD^c) és *Ae. triuncialis* (C^tC^tU^tU^t) kromoszómáinak DAPI áramlási kariotípusát és a kariotípuscsúcsok kromoszómális összetételét. Kimutattuk, hogy az *Ae. markgrafii* 4C és 5C kromoszómájából, az *Ae. triuncialis* MvGB585 genotípusban jelenlévő 6U^tS.6U^tL-5C^tL transzlokációból és a 7C^t kromoszómából, valamint az *Ae. cylindrica* 1C^c és 5D^c kromoszómájából tiszta frakciók izolálhatók.

4. Kettős lézervezérlésű áramlási citometria segítségével meghatároztuk az *Ae. umbellulata*, *Ae. comosa*, *Ae. speltoides*, *Ae. markgrafii*, *Ae. sharonensis* és *Ae. biuncialis* DAPI-FITC 'dot plot' áramlási kariotípusát és azonosítottuk a kariotípusokat alkotó részecskepopulációk kromoszómális összetételét. Kimutattuk, hogy az U, M, C, S genomok összes egyedi kromoszómája, valamint az S^{sh} kromoszómák többsége nagy tisztaságban izolálható a diploid *Aegilops* fajokból.

5. Kétparaméteres áramlási citometriával nagy tisztaságban izoláltuk az *Ae. biuncialis* 1U, 6U, 3U, 2M, 3M és 7M kromoszómáját búza (Mv9kr1)-*Ae. biuncialis* (MvGB642) addíciós vonalakból, valamint az *Ae. umbellulata* 2U kromoszómájának rövid és hosszú karját, illetve a 7U kromoszóma hosszú karját búza (Chinese Spring)- *Ae. umbellulata* diteloszómás addíciós vonalakból.

6. A DAPI áramlásikariotípus-csúcsok által reprezentált kromoszómák DNS-mintáinak és búza-*Aegilops* addíciós vonalak segítségével 51 búzaspecifikus COS marker 169 lokuszát azonosítottuk az U és M genom diploid őseinek, illetve az allotetraploid *Ae. biuncialis és Ae. geniculata* faj kromoszómáin.

7. Az Ae. umbellulata, Ae. comosa, Ae. speltoides és Ae. markgrafii egyedi kromoszómáinak DNSmintáin végzett PCR segítségével 100 db búza COS markert azonosítottunk. A búza és az Aegilops U, M, S és C genomok közti homeológiakapcsolatok COS markerekkel történt vizsgálatával kimutattuk, hogy az M genom kromoszómái szoros homológiát mutatnak a búza D kromoszómáival, valamint az U genomban a búzához képest számos átrendeződés történt az evolúció során. Szintén kimutattuk, hogy az Ae. speltoides (mint a hexaploid búza B genomjának feltételezett őse) kromoszómái mutatták a legnagyobb homológiát a búzakromoszómákkal. Az Ae. markgrafii esetében az 1C, 5C, 6C és 7C kromoszóma jelentős homológiát mutatott a megfelelő búza homeológ kromoszómákkal, míg a genomátrendeződések következtében a 2C homológ régiókat tartalmaz a búza 2-es, 3-as és 4-es kromoszómáival, a 3C a 3-as és 7-es kromoszómákkal, míg a 4C homológ a 4-es és 2-es kromoszómákkal.

8. Az allotetraploid *Ae. biuncialis* MvGB642 és MvGB382 genotípusának keresztezésével létrehoztunk egy 224 egyedből álló F_2 szegregáló populációt, melynek segítségével 975 egyedi lokuszon 11317 DArTseq markert térképezve elsőként állítottuk elő az *Ae. biuncialis* genetikai térképét. A térképezett vázmarkerek hasonlósági keresésével kimutattuk, hogy az M genom kromoszómái nagymértékben kolineárisak a megfelelő homeológ csoportba tartozó búzakromoszómákkal, míg az U genom inter- és intrakromoszómális transzlokációk és inverziók következtében jelentős mértékben átrendeződött a búzagenomokhoz képest.

9. Az *Ae. umbellulata* és *Ae. comosa* kromoszóma-specifikus DNS-mintáinak szekvenálásával elkészítettük az U és M genom kromoszómáinak *de novo* vázlatos genomösszeillesztéseit. Az *Ae. umbellulata* kromoszómáin hasonlósági keresés segítségével 25225 nagy megbízhatósággal rendelkező gént azonosítottunk. A jelzett gének helyzete alapján megvizsgálva az *Ae. umbellulata* és a búza D genomjának kromoszómái közti homeológiakapcsolatokat, kimutattuk, hogy az 1U, 2U és 3U kromoszóma nagymértékben homológ a megfelelő búzakromoszómákkal, a 4U kromoszóma egyes régiói homológiát mutatnak a búza 4D, 5D és 6D kromoszómájával, valamint a búza 5D kromoszómájával homológ 5U kromoszóma a 4D kromoszóma hosszú karjával homeológ genomi

fragmentet tartalmaz. A jelentősen átrendeződött 6U kromoszóma homeológ régiókat tartalmaz az 1D, 2D, 4D, 6D és 7D kromoszómával. Végül a 7U kromoszómán szintén kimutatható volt egy 3D kromoszómával homológ régió.

10. Az *Ae. umbellulata* és *Ae. comosa* kromoszómáinak genomösszeillesztéseit felhasználva 217, PCR segítségével validált polimorf génalapú molekuláris markert fejlesztettünk, melyek közül 109 marker kromoszómális pozícióját búza-*Aegilops* addíciós vonalak segítségével is meghatároztuk. Egy új markerkapcsolt szelekciós rendszer alapjaként harminckét markert használtunk fel az U és M kromoszómák nyomon követésére az *Ae. biuncialis*-ból történő fajkeresztezéses génátviteli programokban.

11. Az Mv9kr1 × *Ae. biuncialis* MvGB642 amfiploidok búzával végzett visszakeresztezésével, majd öntermékenyítésével egy 4U kromoszómát hordozó búza/*Ae. biuncialis* diszómás addíciós vonalat, valamint egy 4M(4D) és 5M(5D) diszómás szubsztitúciós vonalat állítottunk elő, melyekben a kromoszómákat FISH-sel, GISH-sel és molekuláris markerekkel azonosítottuk.

12. A létrehozott Mv9kr1 × *Ae. biuncialis* MvGB642 amfiploidok Mv9kr1 búzatörzzsel végzett visszakeresztezéséből 10 búza-*Ae. biuncialis* transzlokációt mutattunk ki, melyek közül 6 transzlokációt diszómás állapotban is sikerült előállítani. A transzlokációs kromoszómákat (T4DS.4DL-M, T5DS.5DL-M, T5MS.5ML-2DL, T1US.2BL, T2DS.2DL-2U és T1DL.1DS-4U) egymást követő GISH és FISH technikával, és esetenként molekuláris markerekkel azonosítottuk.

5. A tézisekben szereplő hivatkozások

- Badaeva, E. D., Friebe, B., and Gill, B. S. (1996a). Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome* 39, 293–306. doi: 10.1139/g96-040
- Badaeva, E. D., Friebe, B., and Gill, B. S. (1996b). Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. *Genome* 39, 1150– 1158. doi: 10.1139/g96-145
- Badaeva, E. D., Amosova, A. V., Samatadze, T. E., Zoshchuk, S. A., Shostak, N. G., Chikida, N. N., et al. (2004). Genome differentiation in *Aegilops* . 4. Evolution of the U-genome cluster. *Plant Syst. Evol.* 246, 45–76. doi: 10.1007/s00606-003-0072-4
- Bedbrook, J. R., Jones, J., O'Dell, M., Thompson, R. D., and Flavell, R. B. (1980). A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* 19, 545–560. doi: 10.1016/0092-8674(80)90529-2
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Chapman, J. A., Ho, I., Sunkara, S., Luo, S., Schroth, G. P., and Rokhsar, D. S. (2011). Meraculous: de novo genome assembly with short paired-end reads. *PLoS ONE* 6, e23501. doi: 10.1371/journal.pone.0023501
- Doležel, J., Binarová, P., and Lcretti, S. (1989). Analysis of Nuclear DNA content in plant cells by Flow cytometry. *Biol Plant* 31, 113–120. doi: 10.1007/BF02907241
- Dulai, S., Molnár, I., Szopkó, D., Darkó, É., Vojtkó, A., Sass-Gyarmati, A., et al. (2014). Wheat-Aegilops biuncialis amphiploids have efficient photosynthesis and biomass production during osmotic stress. J. Plant Physiol. 171, 509–517. doi: 10.1016/j.jplph.2013.11.015
- Edae, E. A., Olivera, P. D., Jin, Y., and Rouse, M. N. (2017). Genotyping-by-sequencing facilitates a high-density consensus linkage map for *Aegilops umbellulata*, a wild relative of cultivated wheat. *G3: Genes, Genomes, Genet.* 7, 1551–1561. doi: 10.1534/g3.117.039966
- Farkas, A., Molnár, I., Dulai, S., Rapi, S., Oldal, V., Cseh, A., et al. (2014). Increased micronutrient content (Zn, Mn) in the 3M^b(4B) wheat-Aegilops biuncialis substitution and 3M^b.4BS translocation identified by GISH and FISH. *Genome* 57, 61–67. doi: 10.1139/gen-2013-0204
- Friebe, B., Jiang, J., Tuleen, N., and Gill, B. S. (1995). Standard karyotype of *Triticum umbellulatum* and the characterization of derived chromosome addition and translocation lines in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 90, 150–156. doi: 10.1007/BF00221010

- Friebe, B. R., Tuleen, N. A., and Gill, B. S. (1999). Development and identification of a complete set of *Triticum aestivum-Aegilops geniculata* chromosome addition lines. *Genome* 42, 374–380. doi: 10.1139/g99-011
- Gamborg, O., and Wetter, L. R. (1975). *Plant Tissue Culture Methods*. National Research Council of Canada, Saskatoon.
- Gerlach, W. L., and Bedbrook, J. R. (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7, 1869–1885. doi: 10.1093/nar/7.7.1869
- Giorgi, D., Farina, A., Grosso, V., Gennaro, A., Ceoloni, C., and Lucretti, S. (2013). FISHIS: fluorescence in situ hybridization in suspension and chromosome flow sorting made easy. *PLoS ONE* 8, e57994. doi: 10.1371/journal.pone.0057994
- IBGSC, International Barley Genome Sequencing Consortium (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491, 711–716. doi: 10.1038/nature11543
- IBI, The International Brachypodium Initiative (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463, 763–768. doi: 10.1038/nature08747
- Ivanizs, L., Monostori, I., Farkas, A., Megyeri, M., Mikó, P., Türkösi, E., et al. (2019). Unlocking the genetic diversity and population structure of a wild gene source of wheat, *Aegilops biuncialis* Vis., and its relationship with the heading time. *Front. Plant Sci.* 10, 1531. doi: 10.3389/fpls.2019.01531
- IWGSC, International Wheat Genome Sequencing Consortium (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345, 1251788. doi:10.1126/science.1251788pmid:25035500
- IWGSC, The International Wheat Genome Sequencing Consortium (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361, eaar7191 DOI: 10.1126/science.aar7191
- Jia, J., Zhao, S., Kong, X., Li, Y., Zhao, G., He, W., et al. (2013). *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* 496, 91–95. doi: 10.1038/nature12028
- Kawahara, Y., La Bastide, M. de, Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., et al. (2013). Improvement of the Oryza sativa Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice (N Y)* 6, 4. doi: 10.1186/1939-8433-6-4
- Kimber, G. (1967). The addition of the chromosomes of *Aegilops umbellulata* to *Triticum aestivum* (var. Chinese Spring). *Genet. Res.* 9, 111–114. doi: 10.1017/S0016672300010351
- Kosambi, D. D. (1943). The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenic.* 12, 172–175. doi: 10.1111/j.1469-1809.1943.tb02321.x
- Kosman, E., and Leonard, K. J. (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Mol Ecol* 14, 415–424. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02416.x
- Kubaláková, M., Macas, J., and Doležel, J. (1997). Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. *Theor Appl Genet* 94, 758–763. doi: 10.1007/s001220050475
- Ling, H.-Q., Zhao, S., Liu, D., Wang, J., Sun, H., Zhang, C., et al. (2013). Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature* 496, 87–90. doi: 10.1038/nature11997
- Lukaszewski, A. J., Rybka, K., Korzun, V., Malyshev, S. V., Lapinski, B., and Whitkus, R. (2004). Genetic and physical mapping of homoeologous recombination points involving wheat chromosome 2B and rye chromosome 2R. *Genome* 47, 36–45. doi: 10.1139/g03-089
- Luo, M. C., Deal, K. R., Akhunov, E. D., Akhunova, A. R., Anderson, O. D., Anderson, J. A., et al. (2009). Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in Triticeae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15780– 15785. doi: 10.1073/pnas.0908195106
- Mester, D. I., Ronin, Y. I., Hu, Y., Peng, J., Nevo, E., and Korol, A. B. (2003). Efficient multipoint mapping: making use of dominant repulsion-phase markers. *Theor. Appl. Genet.* 107, 1102–1112. doi: 10.1007/s00122-003-1305-1
- Molnár, I., Gáspár, L., Sárvári, É., Dulai, S., Hoffmann, B., Molnár-Láng, M., et al. (2004). Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Funct. Plant Biol.* 31, 1149–1159. doi: 10.1071/FP03143

- Molnár, I., Cifuentes, M., Schneider, A., Benavente, E., and Molnár-Láng, M. (2011a). Association between simple sequence repeat-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. Ann. Bot. 107, 65–76. doi: 10.1093/aob/mcq215
- Molnár, I., Kubaláková, M., Šimková, H., Cseh, A., Molnár-Láng, M., and Doležel, J. (2011b). Chromosome isolation by flow sorting in *Aegilops umbellulata* and *Ae. comosa* and their allotetraploid hybrids *Ae. biuncialis* and *Ae. geniculata. PLoS ONE* 6, e27708. doi: 10.1371/journal.pone.0027708
- Molnár, I., Šimková, H., Leverington-Waite, M., Goram, R., Cseh, A., Vrána, J., et al. (2013). Syntenic relationships between the U and M genomes of *Aegilops*, wheat and the model species *Brachypodium* and rice as revealed by COS markers. *PLoS ONE* 8, e70844. doi: 10.1371/journal.pone.0070844
- Molnár, I., Kubaláková, M., Šimková, H., Farkas, A., Cseh, A., Megyeri, M., et al. (2014). Flow cytometric chromosome sorting from diploid progenitors of bread wheat, *T. urartu, Ae. speltoides* and *Ae. tauschii. Theor. Appl. Genet.* 127, 1091–1104. doi: 10.1007/s00122-014-2282-2
- Molnár, I., Vrána, J., Farkas, A., Kubaláková, M., Cseh, A., Molnár-Láng, M., et al. (2015). Flow sorting of C-genome chromosomes from wild relatives of wheat *Aegilops markgrafii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. cylindrica*, and their molecular organization. *Ann. Bot.* 116, 189–200. doi: 10.1093/aob/mcv073
- Molnár, I., Vrána, J., Burešová, V., Cápal, P., Farkas, A., Darkó, É., et al. (2016). Dissecting the U, M, S and C genomes of wild relatives of bread wheat (*Aegilops* spp.) into chromosomes and exploring their synteny with wheat. *Plant J.* 88, 452–467. doi: 10.1111/tpj.13266
- Molnár-Láng, M., Linc, G., and Sutka, J. (1996). Transfer of the recessive crossability allele *kr1* from Chinese Spring into the winter wheat variety Martonvásári 9. Euphytica 90, 301–305. doi: 10.1007/BF00027480
- Nagaki, K., Tsujimoto, H., Isono, K., and Sasakuma, T. (1995). Molecular characterization of a tandem repeat, Afa family, and its distribution among Triticeae. *Genome* 38, 479–486. doi: 10.1139/g95-063
- Paterson, A. H., Bowers, J. E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., et al. (2009). *The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses*. Nature Publishing Group.
- Rakszegi, M., Molnár, I., Lovegrove, A., Darkó, É., Farkas, A., Láng, L., et al. (2017). Addition of *Aegilops* U and M chromosomes affects protein and dietary fiber content of wholemeal wheat flour. *Front. Plant Sci.* 8, 1529. doi: 10.3389/fpls.2017.01529
- Qi, L. L., Echalier, B., Chao, S., Lazo, G. R., Butler, G. E., Anderson, O. D., et al. (2004). A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics* 168, 701–712. doi: 10.1534/genetics.104.034868
- Quraishi, U.M., Abrouk, M., Bolot, S., Pont, C., Throude, M., Guilhot, N., et al. (2009). Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. *Funct. Integr. Genomics* 9, 473–484. doi: 10.1007/s10142-009-0129-8
- Said M., Holušová K., Farkas A., Ivanizs L., Gaál E., Cápal P., Abrouk M., Martis-Thiele M.M., Kalapos B., Bartoš J., Friebe B., Doležel J., Molnár I. (2021) Development of DNA markers from physically mapped loci in *Aegilops comosa* and *Ae. umbellulata* using single-gene FISH and chromosome sequences. *Front. Plant Sci.* 12: 689031, doi: 10.3389/fpls.2021.689031
- Schneider, A., Linc, G., Molnár, I., and Molnár-Láng, M. (2005). Molecular cytogenetic characterization of *Aegilops biuncialis* and its use for the identification of 5 derived wheat-*Aegilops biuncialis* disomic addition lines. Genome 48, 1070–1082. doi: 10.1139/g05-062
- Schneider, A., and Molnár-Láng, M. (2012). Detection of various U and M chromosomes in wheat-Aegilops biuncialis hybrids and derivatives using fluorescence in situ hybridisation and molecular markers. Czech J. Genet. Plant Breed. 48, 169–177. doi: 10.17221/45/2012-CJGPB
- Šimková, H., Svensson, J. T., Condamine, P., Hribová, E., Suchánková, P., Bhat, P. R., et al. (2008). Coupling amplified DNA from flow-sorted chromosomes to high-density SNP mapping in barley. *BMC Genomics* 9, 294. doi: 10.1186/1471-2164-9-294
- Tischner, T., Kőszegi, B., and Veisz, O. (1997). Climatic programmes used in Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron. Hung.* 45, 85-104.
- Vrána, J., Kubaláková, M., Simková, H., Cíhalíková, J., Lysák, M. A., and Dolezel, J. (2000). Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 156, 2033–2041.
- Zhang, H., Jia, J., Gale, M. D., and Devos, K. M. (1998). Relationships between the chromosomes of *Aegilops umbellulata* and wheat. *Theor. Appl. Genet.* 96, 69–75. doi: 10.1007/s001220050710

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7, 203–214. doi: 10.1089/10665270050081478

Zimin, A. V., Marçais, G., Puiu, D., Roberts, M., Salzberg, S. L., and Yorke, J. A. (2013). The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics* 29, 2669–2677. doi: 10.1093/bioinformatics/btt476

6. A Doktori Értekezés alapjául szolgáló referált folyóiratokban megjelent publikációk (csillaggal jelölve a levelező szerzősség)

- Said M., Holušová K., Farkas A., Ivanizs L., Gaál E., Cápal P., Abrouk M., Martis-Thiele M.M., Kalapos B., Bartoš J., Friebe B., Doležel J., Molnár I. (2021) Development of DNA markers from physically mapped loci in *Aegilops comosa* and *Ae. umbellulata* using single-gene FISH and chromosome sequences. *Front. Plant Sci.* 12: 689031, doi: 10.3389/fpls.2021.689031
- Doležel J., Lucretti S., Molnár I., Cápal P., Giorgi D. (2021) Chromosome Analysis and Sorting. *Cytometry: Part A*, 99:328-342. DOI: 10.1002/cyto.a.24324
- Bansal M., Adamski N.M., Inder Toor P., Kaur S., Molnár I., Holušová K., Vrána J., Doležel J., Valárik M., Uauy C., Chhuneja P. (2020). *Aegilops umbellulata* introgression carrying leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr76* and *Yr70* located to 9.47-Mb region on 5DS telomeric end through a combination of chromosome sorting and sequencing. *Theor. Appl. Genet.* 33, 903–915 <u>https://doi.org/10.1007/s00122-019-03514-x</u>
- Ivanizs L., Monostori I., Farkas A., Megyeri M., Mikó P., Türkösi E., Gaál E., Lenykó-Thegze A., Szőke-Pázsi K., Szakács É., Darkó É., Kiss T., Kilian A.and Molnár I.* (2019) Unlocking the genetic diversity and population structure of a wild gene source of wheat, Aegilops biuncialis Vis., and its relationship with the heading time. *Front. Plant Sci.* 10:1531. doi: 10.3389/fpls.2019.01531
- Molnár I.*, Vrána J., Burešová V., Cápal P., Farkas A., Darkó É., Cseh A., Kubaláková M., Molnár-Láng M., Doležel J. (2016) Dissecting the U, M, S and C genomes of wild relatives of bread wheat (*Aegilops* spp.) into chromosomes and exploring their synteny with wheat. *Plant J.*, 88(3): 452–467.
- Molnár I.*, Vrána J., Farkas A., Kubaláková M., Cseh A., Molnár-Láng M., Doležel J. (2014) Flow sorting of C-genome chromosomes from wild relatives of wheat *Aegilops markgrafii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. cylindrica*, and their molecular organization. *Ann, Bot.*, 116: 189-200.
- Molnár I*, Kubaláková M, Šimková H, Farkas A, Cseh A, Megyeri M, Vrána J, Molnár-Láng M, Doležel J (2014) Flow cytometric chromosome sorting from diploid progenitors of bread wheat, *T. urartu, Ae. speltoides* and *Ae. tauschii. Theor. Appl. Genet.*, 127(5): 1091-1104.
- Farkas A, **Molnár I***, Dulai S, Rapi S, Oldal V, Cseh A, Kruppa K, Molnár-Láng M (2014) Increased micronutrient content (Zn, Mn) in the 3M^b(4B) wheat-*Aegilops biuncialis* substitution and 3M^b.4BS translocation identified by GISH and FISH. *Genome*, 57(2): 61-67.
- Dulai S, **Molnár I**, Szopkó D, Darkó É, Vojtkó A, Sass-Gyarmati A, Molnár-Láng M (2014) Wheat-*Aegilops biuncialis* amphiploids have efficient photosynthesis and biomass production during osmotic stress. *J, Plant Physiol.*, 171(7): 509-517.
- Molnár I.*, Šimková H., Leverington-Waite M., Goram R., Cseh A., Vrána J., Farkas A., Doležel J., Molnár-Láng M., Griffiths S. (2013) Syntenic relationships between the U and M genomes of *Aegilops*, wheat and the model species *Brachypodium* and rice as revealed by COS markers. *PLoS ONE* 8(8): e70844.
- Molnár I, Cifuentes M, Schneider A, Benavente E, Molnár-Láng M. (2011a) Association between SSRrich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. *Ann. Bot.* 107(1): 65-76.
- Molnár I, Kubaláková M, Šimková H, Cseh A, Molnár-Láng M and Doležel J (2011b) Chromosome isolation by flow sorting in *Aegilops umbellulata* and *Ae. comosa* and their allotetraploid hybrids *Ae. biuncialis* and *Ae. geniculata. PLoS ONE* 6(11): e27708. doi:10.1371/journal.pone.0027708

7. A Doktori Értekezéshez nem kapcsolódó, referált folyóiratokban megjelent publikációk (csillaggal jelölve a levelező szerzősség)

- Galbraith D, Loureiro J, Antoniadi I, Bainard J, Bureš P, Cápal P, Castro M, Castro S, Čertner M, Čertnerová D, Chumová Z, Doležel J, Giorgi D, Husband BC., Kolář F, Koutecký P, Kron P, Leitch I J., Ljung K, Lopes S, Lučanová M, Lucretti S, Ma W, Melzer S, Molnár I, Novák O, Poulton N, Skalický V, Sliwinska E, Šmarda P, Smith T W., Sun G, Talhinhas P, Tárnok A, Temsch E M, Trávníček P, Urfus T (2021) Best practices in plant cytometry. *Cytometry part A*. 99: 311-317. DOI: 10.1002/cyto.a.24295
- Hewitt T., Mueller M.C., Molnár I., Mascher M., Holušová K., Šimková H., Kunz L., Zhang J., Li J., Bhatt D., Sharma R., Schudel S., Yu G., Steuernagel B., Periyannan S., Wulff B., Ayliffe M., McIntosh R., Keller B., Lagudah E., and Zhang P. (2021) A highly differentiated region of wheat chromosome 7AL encodes a *Pm1a* immune receptor that recognises its corresponding *AvrPm1a* effector from *Blumeria graminis*. *New Phytol.* 229: 2812–2826. <u>https://doi.org/10.1111/nph.17075</u>
- Hua L., Gupta A., Lin G., **Molnár I.**, Dolezel J., Liu S., Li W. (2021) Multiple origins of Indian dwarf wheat by targeting the TREE domain of a GSK3-like kinase for phosphate uptake, drought tolerance, and grain quality. *Theor. Appl. Genet.* 134:633-645. doi: 10.1007/s00122-020-03719-5.
- Darkó É., Khalil R., Dobi Zs., Kovács V., Szalai G., Janda T. and Molnár I. (2020) Addition of Aegilops biuncialis chromosomes 2M or 3M improves the salt tolerance of wheat in different way. Sci. Rep. 10, 22327. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-020-79372-1</u>
- Rakszegi M, Molnár I, Darkó É, Tiwari VK and Shewry P (2020) Editorial: *Aegilops*: Promising genesources to improve agronomical and quality traits of wheat. *Front. Plant Sci.* 11:1060. doi: 10.3389/fpls.2020.01060.
- Szakács É., Szőke-Pázsi K., Kalapos B., Schneider A., Ivanizs L., Rakszegi M., Vida Gy., Molnár I.* and Molnár-Láng M. (2020) 1RS arm of *Secale cereanum* 'Kriszta' confers resistance to stripe rust, improved yield components and high arabinoxylan content in wheat. *Sci. Rep.* 10:1792, https://doi.org/10.1038/s41598-020-58419-3
- Mahmoud Said, Alejandro Copete Parada, Eszter Gaál, István Molnár, Adoración Cabrera, Jaroslav Doležel, Jan Vrána (2019) Uncovering homeologous relationships between tetraploid Agropyron cristatum and bread wheat genomes using COS markers. Theor. Appl. Genet., https://doi.org/10.1007/s00122-019-03394-1,
- Said, M., M. Kubaláková, M. Karafiátová, I. Molnár, J. Doležel, and J. Vrána. 2019. Dissecting the complex genome of crested wheatgrass by chromosome flow sorting. *Plant Genome* 12(2). doi: 10.3835/plantgenome2018.12.0096.
- Rakszegi M, Darkó É, Lovegrove A, Molnár I, Láng L, Bedő Z, Molnár-Láng M, Peter Shewry (2019) Drought stress affects the proteinand dietary fiber content of wholemeal wheat flour in wheat/Aegilops addition lines. *PLoS ONE* 14(2): e0211892.https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0211892
- Ivanizs L., Farkas A., Linc G., Molnár-Láng M., Molnár I.* (2018) Molecular cytogenetic and morphological characterization of two wheat-barley translocation lines. *PLoS ONE* 13(6): e0198758. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198758</u>
- Türkösi E., Darkó É., Rakszegi M., **Molnár I.**, Molnár-Láng M., Cseh A. (2018) Development of a new 7BS.7HL winter wheat-winter barley Robertsonian translocation line confering increased salt tolerance and (1,3;1,4)- β-D-glucan content. *PLoS ONE* 13(11): e0206248..
- Gaál E., Valárik M., **Molnár I.***, Farkas A., Linc G. (2018) Identification of COS markers specific for Thinopyrum elongatum chromosomes preliminary revealed high level of macrosyntenic relationship between the wheat and Th. elongatum genomes. *PLoS ONE* 13(12): e0208840. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208840</u>.
- Rakszegi M.*, Molnár I., Lovegrove A., Darkó É., Farkas A., Láng L., Bedő Z., Doležel J., Molnár-Láng M., Shewry P. (2017) Addition of Aegilops U and M chromosomes affects protein and dietary fiber content of wholemeal wheat flour. *Front. Plant Sci.* 8:1529. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01529
- Darkó É., Gierczik K., Hudák O., Forgó P., Pál M., Türkösi E., Kovács V., Dulai S., Majláth I., Molnár I., Janda T., Molnár-Láng M. (2017) Differing metabolic responses to salt stress in wheat-barley addition lines containing different 7H chromosomal fragments. *PLOS ONE* 12:(3) Paper e0174170. 20 p. IF: 2.806, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174170,

- Linc G., Gaal E., **Molnar I.**, Icso D., Badaeva E., Molnar-Lang M. (2017) Molecular cytogenetic (FISH) and genome analysis of diploid wheatgrasses and their phylogenetic relationship. *PLOS ONE* 12:(3) Paper e0173623.
- Mária Megyeri, Péter Mikó, András Farkas, Márta Molnár-Láng, **István Molnár** (2017) Cytomolecular discrimination of the A^m chromosomes of *Triticum monococcum* and the A chromosomes of Triticum aestivum using microsatellite DNA repeats. *J. Appl, Genet.* 58:67-70. doi: 10.1007/s13353-016-0361-6
- Szopkó D., Darkó É., **Molnár I.**, Kruppa K., Háló B., Vojtkó A., Molnár-Láng M., Dulai S. (2016) Photosynthetic responses of a wheat (Asakaze)–barley (Manas) 7H addition line to salt stress. *Photosynthetica*, 23:(1): 1-13., doi:10.1007/s11099-016-0241-7
- Gell Gy., Kovács K., Molnár I., Bugyi ZS., Tömösközi S. and Juhász A. (2015) Celiac Disease-specific Prolamin Peptide Content of Wheat Relatives and Wild Species Determined by ELISA Assays and Bioinformatics Analyses. *Cereal Res. Commun.* 43(1), pp. 133–143, DOI: 10.1556/CRC.43.2015.1.13
- Darko E., Janda T., Majláth I., Szopkó D., Dulai S., **Molnár I.** and Molnár-Láng M. (2015) Salt stress response of wheat/barley addition lines carrying chromosomes from the winter barley "Manas". *Euphytica* 203: 491-504
- Mikó P, Megyeri M, Farkas A, **Molnár I**, Molnár-Láng M (2015) Molecular cytogenetic identification and phenotypic description of a new synthetic amphiploid, *Triticum timococcum* (A^tA^tGGA^mA^m). *Genet. Res.* . *Crop Evol.*, 62:55–66
- Megyeri M, Molnár-Láng M and **Molnár I.** (2013) Cytomolecular identification of individual wheatwheat chromosome arm associations in wheat-rye hybrids. *CytogenetGenome Res.* 139:128-136.
- Farkas A., Molnár I., Kiss T., Karsai I., Molnár-Láng M. (2014) Effect of added barley chromosomes on the flowering time of new wheat/winter barley addition lines in various environments. *Euphytica* 2014, 195(1):45-55
- Landjeva S, Kocheva K, Kartseva T, Sepsi A, **Molnár I**, Schneider A, Georgiev G, Molnár-Láng M (2012) Molecular cytogenetic identification of a wheat-Aegilops geniculata Roth spontaneous chromosome substitution and its effects on the growth and physiological responses of seedlings to osmotic stress. *Plant Breeding* 131: 81-87.
- Megyeri M, Farkas A, Varga M, Kovács G, Molnár-Láng M and *Molnár I*. (2012) Karyotypic analysis of *Triticum monococcum* using standard repetitive DNA probes and simple sequence repeats. *Acta Agron. Hun.*, 60: 87–95.
- Cseh A, Kruppa K, **Molnár I**, Rakszegi M, Doležel J, Molnár-Láng M (2011) Characterization of a new 4BS.7HL wheat/barley translocation line using GISH, FISH and SSR markers and its effect on the β-glucan content of wheat. *Genome* 54: 795-804.
- Molnár-Láng M, Cseh A, Szakács É and **Molnár I** (2010) Development of a wheat genotype combining the recessive crossability alleles kr1kr1kr2kr2 and the 1BL.1RS translocation, for the rapid enrichment of 1RS with new allelic variation. *Theor. Appl. Genet.* 120: 1535–1545.
- Schneider A, **Molnár I**, Molnár-Láng M (2010) Selection of U and M genome-specific wheat SSR markers using wheat–*Aegilops biuncialis* and wheat–*Ae. geniculata* addition lines. *Euphytica* 175(3): 357-364.

8. Köszönetnyilvánítás

Hálás vagyok korábbi témavezetőmnek és mesteremnek, Dr. Lángné Molnár Márta professzornak, aki megtisztelt bizalmával, és akitől a martonvásári molekuláris citogenetikai iskola tagjaként a fajkeresztezések, a citogenetika, valamint a biotechnológia elméletét és különböző módszereit megtanulhattam. Munkámat a korábbi Génmegőrzési osztályon belül mindig támogatta és nemzetközi kapcsolatai révén hatékonyan segítette.

Szintén hálával tartozom Dr. Jaroslav Doležel professzornak évtizedes barátságáért és támogatásáért, aki felhívta a figyelmem a kromoszómaalapú genomika jelentőségére, akitől az áramlási citometria elméletét és gyakorlati módszereit megtanulhattam, és aki a Kísérleti Botanikai Intézet Olmützi Strukturális és Funkcionális Genomikai Laboratóriumában hozzáférést biztosított az *Aegilops* kromoszómák szeparációjához szükséges tudományos infrastruktúrához.

Köszönöm a Génmegőrzési Csoport kutatóinak, Dr. Szakács Évának, Dr. Farkas Andrásnak, Dr. Gaál Eszternek, Ivanizs Lászlónak, Pázsi Kittinek, Dr. Türkösi Edinának, valamint a Mezőgazdasági Intézetben dolgozó korábbi és jelenlegi kollégáknak, Kalapos Balázsnak, Dr. Rakszegi Mariannak, Dr. Vida Gyulának és Dr. Cseh Andrásnak az egyes kutatási témákban végzett munkájukat és segítségüket.

Hálás vagyok Dr. Dulai Sándornak (Eszterházy Károly Egyetem, Eger) az *Aegilops* génbanki tételek és búza-*Aegilops* genetikai alapanyagok agronómiai tulajdonságainak vizsgálatához nyújtott évtizedes segítségéért.

Köszönettel tartozom csehországi kollégáimnak, a Kísérleti Botanikai Intézet Olmützi Strukturális és Funkcionális Genomikai Laboratóriumának kutatóinak, Dr. Hana Simkovának, Dr. Miroslav Valáriknak, Dr. Mahmoud Saidnak, Dr. Petr Cápálnak, Dr. Jan Vránanak és Dr. Jan Bartošnak. Hasonló köszönettel tartozom Dr. Simon Griffith-nek (John Innes Center, Norwich) a COS markeres vizsgálatokhoz nyújtott segítségéért és Dr. Mihaela Martis-nak (PGSB, Helmholtz Center, Munich) az *Aegilops* kromoszómaszekvenciák bioinformatikai analízisében nyújtott segítségéért.

Köszönetem fejezem ki Dr. Könyvesné Lakner Ildikó és Tóth Fanni technikusoknak, valamint a Génmegőrzési Osztály korábbi technikusainak, Bucsi Istvánnénak és Havasi Józsefnének, akik a disszertációban részletezett *Aegilops* génbanki tételek és búza x *Aegilops* genetikai anyagok fennatrtásában, előállításában, citológiai elemzésében, felnevelésében, feldolgozásában aktívan közreműködtek.

Köszönöm az Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézete korábbi és jelenlegi vezetésének a kutatási feltételek biztosítását.

Hálával tartozom Szüleimnek áldozatvállalásukért, melyel iskoláztattak és támogatták a tudományos pályán való elindulásomat.

Köszönöm végül feleségem és kollégám, Dr. Darkó Éva biztatását, segítő kritikáját és VÉGTELEN türelmét.