Válasz Dr. Hegedűs Attila, egyetemi tanár, az MTA doktora bírálatára

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni opponensemnek a bírálat elkészítéséért, méltató szavaiért. Javaslataival, gondolatébresztő kérdéseivel segítette számomra egy-egy probléma mélyebb átgondolását, újszerű megközelítését, mely a dolgozat kritikai értelmezésén túl jelentősen hozzájárult jövőbeli szakmai fejlődésemhez is.

Az értekezés szakmai, tudományos értékére vonatkozó észrevételekkel kapcsolatos válaszaim a következők.

Köszönöm, és elfogadom Bírálóm felvetését a fajnevek, pontosabban az *Ae. markgrafii,* másnéven *Ae. caudata* konzekvens névhasználatára vonatkozóan. Valóban a C genom diploid ősének esetében nem mindenütt használtam egységesen az *Ae. markgrafii* nevet. Ennek hátterében az állhat, hogy munkám során igyekeztem a taxonómusok által elfogadottnak tekintett Van Slageren 1994-ben kiadott 'Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig.' című monográfiáját alapul venni, az abban szereplő nómenklatúrát követni. E szerint az *Aegilops caudata* L. az elfogadott fajnév, míg az *Aegilops markgrafii* (Greuter) Hammer a szinoním név. Eredményeim publikálásakor azonban a bírálók kérték az Ae. *markgrafii* név használatát. A doktori mű elkészítésekor ezért az a dilemma munkált bennem, hogy ragaszkodjam-e az eredeti koncepcióhoz és kövessem-e a Van Slageren-féle nevezéktant vagy igyekezzem azokat a fajneveket használni, amelyek a pályázat alapjául szolgáló tudományos publikációkban is szerepelnek. Ezért történhetett meg az, hogy igyekezetem ellenére mindkét fajnév szerepel a dolgozatban a nélkül, hogy jeleztem volna, hogy ezek a fajnevek egymás szinoním elnevezései. A jövőben igyekezni fogok elkerülni a hasonló hibákat.
Az *Ae. markgrafii* valóban kimaradt az Irodalmi áttekintés *Aegilops* fajok és azok nemesítési szempontból releváns tulajdonságainak bemutatásáról szóló 2.1.2. fejezetből. Ennek oka az, hogy ebben a fejezetben igyekeztem azokra a fajokra fókuszálni, melyeket munkám során az idegenfajú keresztezési programokban génforrásként alkalmaztunk. Így ez a fejezet főként az U és M genommal rendelkező fajokat, leginkább az *Ae. biuncialis* bemutatását tartalmazza.

Egyetértek Bírálóm felvetésével, miszerint célszerű lett volna a búza és az *Aegilops* fajok evolúcióját összefoglaló 2.1.1 fejezetben megemlíteni, hogy a poliploidizáció révén paralóg génkópiák keletkeznek. A paralóg gének (azaz a homológ gének azon csoportjának, melyek génduplikáció révén jöttek létre és hasonló funkcióval rendelkeznek), illetve a paralógia fogalmának bevezetésével valóban teljesebb képet adhattam volna a genetikai diploidizáció hátterében álló, a génfunkciók megváltozását érintő molekuláris folyamatokról. Különösen indokoltnak érzem a paralóg gének megemlítését az autopoliploid fajképződés esetében, ahol a kettőnél több homológ genomot tartalmazó sejtekben, pl. az *Agropyron cristatum* diploid (PP), tetraploid (PPPP) és hexaploid (PPPPPP) változataiban a kromoszómák többszörös szerelvénye ugyanabból a fajból származik. Megjegyzem, hogy a *Triticum/Aegilops* fajokra jellemző allopoliploid fajképződés során különböző eredetű genomok vannak jelen az új fajban (lásd a hexaploid búza, vagy a tetraploid *Ae. biuncialis* genomösszetételét), így esetükben a valóban paralóg gének részarányát nehéz megítélni. Mentségemre szolgáljon, hogy citogenetikusként a gabonafélék evolúciójának leírásakor, a később tárgyalt búza-*Aegilops* homeológgenom-összefüggések terén elért eredményeim felvezetéseként, többnyire a genom- és kromoszómaszintű változásokról igyekeztem képet adni, amelyek a meiotikus kromoszómapárosodásra, illetve ezen keresztül a homeológ rekombinációra gyakorolt hatásukon keresztül elsődlegesen befolyásolják a keresztezési programok során az idegen kromoszómaszegmentumok átvitelét a búzába.

Nagyon köszönöm Bírálómnak, amiért rámutatott arra, hogy az őszi kikerics esetében hagymagumóról és nem hagymáról beszélünk, amint azt 2.1.3 fejezet hibásan tartalmazta. Igyekszem ezt a tényt munkám során a jövőben helyesen említeni.

Hálás vagyok a homológia fogalom használatával kapcsolatos kiegészítéséért is. Valóban célszerű lett volna a „homológ" és „homeológ" kifejezések jelentését még a dolgozat elején tisztázni, hiszen a búza- és *Aegilops* kromoszómák homeológ kapcsolatának kérdése végig vonul a disszertáción.
A „homeológia" fogalmát az allopoliploid fajok genomjának vizsgálatával kapcsolatban vezették be (Huskins 1931). Az allopoliploid fajokban egy adott genomon belül a homológ kromoszómapár tagjaiban a génösszetétel és génsorrend azonos, a meiózis során egymással szabályszerűen párosodva (általában gyűrű alakú) bivalenseket képeznek. Az allopoliploid fajok szubgenomjai olyan diploid fajokból származnak, melyek filogenetikailag egy közös ősre vezethetők vissza. A közös őstől származó diploid fajok genomjai az evolúció során differenciálódnak, melynek részeként bizonyos esetekben genomátrendeződések (inter- és intrakromoszómális transzlokációk, para- és pericentrikus inverziók stb.) révén megváltozhat a kromoszómák génösszetétele és -sorrendje. Például az *Ae. umbellulata* U genomjában számos kromoszóma (pl. 4U, 6U, 7U) átrendeződött a búzához képest, míg az *Ae. comosa* M genomjában ilyen mértékű átrendeződések nem történtek. Ezért az allotetraploid fajok különböző genomjainak homeológ kromoszómáiban a génösszetétel és a génsorrend lehet nagyrészt azonos vagy az egyes régiókban különböző, a meiózis során azonban általában nem párosodnak egymással. Valószínűleg ennek köszönhető, hogy a disszertációban a „homológia" és a „homeológia" fogalmát a „hasonlóság" kifejezéssel szinoním fogalomként használtam olyan kromoszómák, illetve kromoszómaszakaszok esetében, ahol a génösszetétel és génsorrend azonos. Opponensemmel egyetértve a „nagyfokú homológia", a „legnagyobb homológia" stb. kifejezés valóban helytelen és hasonló szövegkörnyezetben a jövőben a „nagyfokú hasonlóság", a „legnagyobb hasonóság" stb. kifejezést fogom használni.

Szintén el kell ismernem, hogy a Növényi kromoszómák áramlási citometria segítségével történő izolálását és genomikai alkalmazásait összefoglaló 2.3 fejezetben szereplő, saját olmützi eredményeim alapján készült 2. ábra forrása nincs világosan feltüntetve. A 29. oldalon található ábra két jelentős gazdasági növényfajunk, az árpa (*Hordeum vulgare* cv. HOR2442) és a hexaploid búza (*T. aestivum* cv. Thatcher) kétparaméteres áramlási kariotípusait mutatja be. A búza áramlási kariotípusán az egyes kromoszómák kariotípuson belül elfoglalt pozíciójának bemutatásával az volt a célom, hogy már az irodalmi áttekintésben részletes háttérinformációkat adjak az olvasónak, hogy a búza-*Aegilops* addíciós vonalakon kapott áramlási citometriás eredményeimet a későbbiekben könnyebben értelmezhesse.

A dolgozat írásakor az egyik legnagyobb kihívást az angol nyelvű szakirodalomban általánosan használt kifejezések és fogalmak magyar nyelvű megfelelőjét megtalálni, elősegítve ezzel a magyarnyelvű tudományos szaknyelv fejlődését is. Ezért különösen hálás vagyok Bírálómnak javaslatáért, hogy a BLASTx analízis során a „kérdező" szekvencia helyett a sokkal helyesebb „kereső" szekvencia kifejezést használjam, melyet a jövőben e szerint fogok alkalmazni.

Szintén elfogadom kritikai megjegyzését és magam is úgy gondolom, hogy az olyan megállapítások esetén, amelyek nem szerepelnek táblázatban vagy ábrán szerencsésebb lett volna jelezni, hogy az adatok nem kerültek bemutatásra az értekezésben. Néhány esetben, pl.

az *Ae. markgrafii* MvGB428 és MvGB607 genotípus FISH-mintázata közti különbség hiányára vonatkozóan ez a jelzés sajnálatosan elmaradt.

„Az *Aegilops* kromoszómák nyomon követésére tervezett, EST-alapú markerekkel kapcsolatban a 4.3.1 fejezetben az szerepel, hogy Jelölt 124 PCR primerpárt tesztelt, melyek közül 50 bizonyult polimorfnak. Itt hivatkozza az értekezés a 4. online mellékletet, ahol viszont 37 primerpár adatai és az általuk felszaporított amplikonok méretei találhatók meg. Kérdésem, hogy a maradék 13 primerpár adatait miért nem közölte?"

Válasz: A 124 tesztelt EST-marker esetében valóban 50 bizonyult polimorfnak a búza- és az *Aegilops* genotípusok között. Az értekezés 4. On-line mellékletének „PCR_validálás_szülők_EST" oldalán mutattam be az 50 polimorf EST-primerpár adatait és a keresztezési programok búza (Mv9kr1) és *Ae. biuncialis* MvGB642 szülői genotípusain adott eredményeit. A markerek *Aegilops* kromoszómákon PCR segítségével történő azonosításához a búza-*Ae. geniculata* addíciós sorozatot használtuk, mert ott a teljes U és M genom esetében rendelkezésre álltak kromoszómaaddíciós-vonalak. Ugyanakkor a búza és az *Ae. geniculata* között már csak 39 marker mutatott polimorfizmust, így csak ezen markerek esetében tudtuk meghatározni a kromoszómális helyzetet, amit a 4. On-line melléklet „Markerek" és „PCR_validálás_addíciók_EST" oldalain mutattam be. Sajnálatos módon a fenti eltérésekre félreérthető módon utaltam dolgozatomban.

Az értekezés formai hibáival kapcsolatos észrevételek.

Válasz: Egyetértek bírálóm észrevételeivel, javaslataival. A jövőben igyekszem munkám során hasonló hibákat nem elkövetni.

Kisebb jelentőségű hibák.

Válasz: Szintén elfogadom Opponensem kritikáját és köszönöm javaslatait a kisebb jelentőségű hibákra vonatkozóan.

Új tudományos eredmények.

Válasz: Az új tudományos eredmények tézispontokba történt összefoglalására vonatkozóan elfogadom Opponensem megjegyzését és javaslatait a tézispontok lerövidítésére és átfogalmazására vonatkozóan. Tekintettel arra, hogy ez a kérdés Pauk János bírálatában is felmerült, mindkét bírálóm javaslatát figyelembe véve, Új tudományos eredményeimet lerövidítve és átfogalmazva az alábbi tézispontokban javaslom elfogadni:

1. Egyparaméteres áramlási citometria alkalmazásával - intakt mitotikus kromoszómákon - meghatározták az U, M és C genommal rendelkező *Aegilops* fajok, valamint a kenyérbúza diploid őseinek áramlási kariotípusát.

2. Kétparaméteres áramlási citometria segítségével izolálták az U, M, C és S genom összes egyedi kromoszómáját.

3. Kimutatták, hogy az M genom nagymértékű hasonlóságot mutat a búzakromoszómákkal.

4. Elsőként állították elő az allotetraploid *Ae. biuncialis* nagy felbontású genetikai térképét.

5. Az *Ae. umbellulata* és *Ae. comosa* kromoszómáinak szekvenálással kapott eredményeit felhasználva markerkapcsolt szelekciós rendszert hoztak létre fajidegen génátviteli programok számára.

6. Új hexaploid búza × *Ae. biuncialis* 4U diszómás addíciós, valamint 4M(4D) és 5M(5D) diszómás szubsztitúciós vonalat állítottak elő.

A kérdésekre adott válaszaim a következők:

1. kérdés: „A 15. oldalon az szerepel, hogy „Áramlási citometriával az idegen kromoszómát nagy mennyiségben izolálni lehet, mely számos további genomikai és proteomikai vizsgálat alapjául szolgálhat." Kérdésem, hogy pontosan milyen proteomikai vizsgálatok elvégzése lehet érdekes izolált kromoszómák esetében, milyen kérdésekre remélhetünk választ ezzel a megközelítéssel?"

Válasz:
A sejtmagban lokalizált eukarióta genom DNS-állománya számos fehérjével képez szoros kapcsolatot, melynek révén kialakul a kromatinnak nevezett nukleoprotein komplex. A kromatinnak egyrészt fontos strukturális szerepe van a nagy méretű DNS relatíve kis nukleáris térfogatban történő elhelyezkedésében, másrészt fontos szabályozó szerepet játszik a DNS működésével kapcsolatos folyamatokban, mint például a génexpresszió, a DNS repair folyamatok, vagy a replikáció.
A mitotikus kromoszómák proteomikai vizsgálata azokra a fehérjékre irányulhat, melyek szerepet játszanak a kromatin kondenzációjában, a metafázisos kromoszómák magasabb szintű struktúrájának kialakításában, másrészt azokra a szabályozó fehérjékre, melyek a mitózis során is aktív gének expresszióját befolyásolják. A továbbiakban ezekre a területekre említek néhány példát.
A mitózis és a meiózis kezdetén az interfázisos kromatin strukturális változások sorozatán megy keresztül, mely végül a kondenzálódott kromoszómák kialakulását eredményezi. A kondenzálódott (metafázisos) kromoszómák szerkezete és funkciója számos fehérjecsalád segítségével alakul ki. Ezek közül a legfontosabbak a struktúra fenntartásáért felelős, az angol elnevezés (Structural Maintenance of Chromosome) rövidítéséből származó SMC fehérjék, mint amilyenek például a condenzinek, cohezinek, és SMC5/6 fehérjék. Ezek szerepe a kondenzációval kialakuló egyre összetettebb szerkezet kialakításában van. A kohezin például a replikálódott testvérkromatidákat köti össze. A profázisban a kondenzin II a DNS-hez való kötődéssel a nagy kezdeti hurkok kialakulását segíti, míg a prometafázis során, a sejtmagmembrán lebontása után, a kondenzin I kötődik a kromatinhoz és a kondenzin II által képzett nagy hurkokba ágyazódva kisebb hurkok kialakítását végzi, ezzel elősegítve a kromatin további tömörödését, kondenzációját. Ezen kívül ismeretesek még további kondenzációs faktorok is, mint például a topoizomeráz II vagy a kromoszómákhoz kapcsolt KIF4 (kinezin) motorfehérje.

Mivel a kromoszóma kondenzáció során a szabályozó fehérjék kromatinhoz való hozzáférése nem változik lényegesen (Hsiung et al., 2015; Blythe and Wieschaus, 2016), sok gén képes a mitózis során is kifejeződni (Palozola et al., 2017). Mindez arra utal, hogy különböző szabályozó fehérjék és RNS-ek asszociálódhatnak a kromatinnal a kondenzált mitotikus kromoszómákban. Ezek megismerése hozzájárulhat a mitózis folyamatának részletesebb megismeréséhez. Különösen érdekes lehet e kérdések tanulmányozása olyan növényi kísérleti rendszerekben, ahol fajkeresztezésekkel különböző aneuploid vonalak, addíciós sorozatok hozhatók létre. Például a diploid *Ae. umbellulata*-ból, az allotetraploid *Ae. biuncialis*-ból, valamint a búza-*Ae. biuncialis* 1U addíciós vonalból izolált 1U kromoszómaminták proteomikai vizsgálata értékes adalékul szolgálhatna az 1U kromoszómák fehérjeösszetételében bekövetkezett esetleges evolúciós léptékű változásokról.

Főként emlős modellrendszereken végzett kutatások alapján ismeretes, hogy a kromoszómák kondenzációjával párhuzamosan létrejön egy perikromoszómális réteg, egy fehérjeburok, mely a kinetokór-komplexek kialakulásában szerepet játszó centroméra-régiókat kivéve körbeveszi a teljes kromoszóma felületét (Booth et al. 2016). A perikromoszómális rétegnek többféle szerepet is tulajdonítanak, melyek közül a legfontosabbak közt említhető a kromoszómaarchitektúra létrehozása és fenntartása (Takagi et al., 2016), a kromoszómák összetapadásának megakadályozása (Cuylen et al., 2016), a citoplazma-komponensek szabályozott elmozdulásának elősegítése a sejtmagmembrán kialakulását megelőzően (Cuylen-Haering et al., 2020), valamint a fehérje- és RNS-összetevők szabályozott átvitelének biztosítása az utódsejtekbe (Sirri et al., 2016). Szinte alig vannak információink a perikromoszómális burok kialakulásáról és szerepéről a növények esetében, mely helyzet jelentősen javulhat az izolált mitotikus növényi kromoszómák proteomikai vizsgálatával.

A mitotikus kromoszómák esetében szintén meg kell említenünk még a centroméra-régiót, mely a kinetokór-komplex felépülésének színhelye. Mint ismeretes, a kinetokór-komplex biztosítja a kapcsolatot a kromoszómák és a magorsófonalak között. Gerincesek esetében a kinetokór több, mint 100 fehérjéből áll, melyek több fő hálózatba szerveződnek (Pesenti et al., 2018). Az ún. konstitutív centromer-asszociált hálózat (CCAN) 16 alegységből áll és a sejtciklus folyamán végig kapcsolódik a centroméra kromatinjához (Hara and Fukagawa, 2020). A Knl1, Mis12, és Ndc80 10-10 alegységből álló szuperkomplexek, melyek a CCAN-hez kapcsolódnak a korai profázisban és a teljes mitózis folyamán kapcsolódva maradnak. Meglehetősen keveset tudunk a kinetokór felépítéséről a növényi szervezetek esetében. A növényi mitotikus kromoszómákon végzett kisszámú proteomikai vizsgálat oka abban kereshető, hogy nehéz feladatot jelent a mitózisban nagymértékben szinkronizált növényi sejtpopulációkat előállítani. Az áramlási citometria segítségével izolált kromoszómák ideális objektumai lehetnek ezeknek a vizsgálatoknak, mivel az eljárás segíthet megkülönböztetni a valódi és funkcionális jelentőséggel bíró kromoszómális fehérjéket az interfázisos sejmagokból izolált, a szinkronizálást elkerülő citoplazmatikus fehérjéktől.

2. kérdés „Az *Aegilops speltoides* kromoszómák közül a FISH-analízis során a 4S kromoszóma mutatta a legerősebb jelölődést GAA-hibridizáció esetén (10. ábra). Egy másik S genommal rendelkező faj, az *Ae. sharonensis* FISHIS segítségével történő, GAA-próbával végzett jelölését követően a 4S kromoszómákat tartalmazó populáció ugyanakkor kisebb FITC fluoreszcenciával volt jellemezhető, mint pl. a 2S és 7S kromoszómákat tartalmazó frakciók (14. ábra). Mi lehet a különbség oka?"

Válasz:
Véleményem szerint az *Aegilops speltoides* és *Ae. sharonensis* 4S kromoszómáinak GAA-próbával történő különböző mértékű jelölődésének okait a két faj evolúciójának eltérései okozzák.
Összehasonlító szekvenciaanalízis alapján végzett filogenomikai vizsgálatok szerint az S genommal rendelkező *Aegilops* fajok közül az *Ae. speltoides* különülhetett el leghamarabb, mintegy 7– 2,7 a feltételezett *Triticeae* őstől (Marcussen et al. 2014), míg az *Emarginata* alcsoporthoz tartozó *Ae. sharonensis* tekinthető a legfiatalabb fajnak, amely kb. 0,4 millió évvel ezelőtt jöhetett létre.
A kromoszómák különböző repetitív DNS-frakciói eltérő evolúciós változásokat mutatnak az *Ae. speltoides* és az *Emarginata* fajok, különösen az *Ae. sharonensis* esetében, amint arra Ruban és Badaeva (2018) összehasonlító citogentikai elemzése rávilágít. Egyéb citogenetikai változások mellett az *Ae. speltoides*-re jellemző a GTT mikroszatellit-ismétlődések gyakorisága, ami nem jellemző az *Emarginata* fajokra. Az *Ae. sharonensis* genomjában

jellemző a nagy kópiaszámú DNS-frakció növekedése, főként a CTT (másnéven GAA), valamint a Spelt-52 ismétlődések amplifikációja, illetve a C-sávok, a CTT, GTT és pAesp_SAT86 klaszterek átrendeződése, valamint a D-genomra jellemző ismétlődések (pAs1, pTa-535 és pTa-s53) fokozatos eliminációja (Ruban és Badaeva 2018). Mindezek a változások megnyilvánulhattak az *Ae. speltoides* és *Ae. sharonensis* nukleáris DNS-tartalma közti különbségekben is. Az S genommal rendelkező diploid fajok közül az *Ae. speltoides* rendelkezik a legkisebb genommérettel (1C = 5.81 ± 0,123 pg), míg az *Ae. sharonensis*-é a legnagyobb (1C = 7,52 ± 1,000 pg) (Eilam et al., 2007).
A kromoszómák szintjén tehát valószínűsíthető, hogy az *Ae. speltoides* esetében, a hosszabb evolúciós múlt és az eltérő környezeti hatások révén más genomi változások (pl. eltérő transzpozonok aktivációja) következtében a 4S kromoszómán halmozódtak fel legnagyobb mértékben a GAA mikroszatellit-motívumok. A Közel-Keleten, a „termékeny félhold" területén az *Aegilops* és *Triticum* fajok evolúciója még ma is tart (Belyayev and Raskina, 2013). Az egyes fajok alpopulációiban a különböző ökológiai környezethez való alkalmazkodás részeként különböző transzpozonok aktiválódhatnak, ami előidézheti nagyobb mikroszatellit-klaszterek kialakulását (McMurray 1995). Ennek révén az egyes fajok eltérő alpopulációiban különböző összetételű repetitív frakciók alakulhatnak ki a genomban, ami további citogenetikai változások révén hozzájárulhat az egyes alpopulációk közti reproduktív izoláció kialakulásához és új fajok képződéséhez (Pollak et al. 2018). Valószínűleg ezen folyamatok eredménye lehet a sokkal fiatalabb *Ae. sharonensis* kialakulása is, ahol a GAA-motívumok felszaporodása inkább a 2S és 7S kromoszómát érintette.

3. kérdés „A búza génszekvenciák alapján tervezett COS markerek az *Aegilops* fajoknál is jól használhatónak bizonyultak, mellyel kapcsolatban Jelölt megjegyezte, hogy a tervezés alapjául használt ortológ gének kevésbé tűnnek variábilisnak, mint az SSR régiókat közrefogó genomi szekvenciák. Kérdésem, hogy milyen konkrét kísérleti adatok igazolják ezt a szekvencia-variabilitásbeli különbséget, illetve milyen szakirodalmi adatok támasztják ezt alá, hiszen a mikroszatellit ismétlődéseket határoló szekvenciákat is általánosan konzerváltnak ismerjük (különös tekintettel az EST-SSR szekvenciákra)?"

Válasz:
A „tervezés alapjául használt ortológ gének kevésbé tűnnek variábilisnak, mint az SSR régiókat közrefogó genomi szekvenciák„ - kijelentés alapjául olyan PCR-reakciók eredményei szolgáltak, ahol búza COS markereket alkalmaztunk az *Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata*, valamint diploid őseik U és M kromoszómáinak jellemzésére (Molnár et al. 2013). A PCR-reakciók szerint 140 markerből 132 adott PCR-terméket a búza és legalább az egyik *Aegilops* faj valamely genotípusán. Ez azt jelenti, hogy a markerek 94.28%-a (kerekítve: 94,3%-a) esetében a búza pimer-szekvenciák képesek voltak hibridizálni az *Aegilops* templát DNS-hez és kimutatható PCR-terméket amplifikálni. Ugyanakkor csoportunk korábbi eredményei (Schneider et al. 2010; Molnár et al. 2011) és tőlünk független szakirodalmi adatok (Zaharieva et al. 2003) arra utaltak, hogy búza SSR markerek esetében ez az arány kisebb volt, pl. 24 búza SSR markerből csak 13 marker (54.16%) tudott PCR terméket amplifikálni a vizsgált *Ae. umbellulata*, *Ae. comosa*, *Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata* genotípusok valamelyikén (Molnár et al. 2011). E PCR-reakciók eredményei alapján következtettünk indirekt módon arra, hogy az ortológ gének kevésbé tűnnek variábilisnak, mint az SSR régiókat közrefogó genomi szekvenciák.
E jelenség hátterében az állhat, hogy a COS markerek fejlesztése olyan ortológ génekből indul ki, melyek szekvencia és kópiaszám tekintetében eleve konzerváltak a búza és valamely modell faj (pl. *Brachypodium distachion*) esetében (Quraishi et al. 2009). Mivel a markerek primerei specifikusak a gén egy exon régiójára, illetve az azt követő intron régióra, a COS

markerek fajok közti alkalmazhatósága összefüggheet a kódoló szekvenciáik nagymértékű konzerváltságával.
A mikroszatellit, másnéven SSR markerek fejlesztésénél szintén szükség van a mikroszatellit-ismétlődéseket határoló régiók ismeretére, ahol a primer oligonukleotid szekvenciájának egyik fele a határoló régióra, más fele pedig a mikroszatellit-motívumra specifikus. Tekintettel arra, hogy a határoló régió nem minden esetben bizonyul kódoló szekvenciának, ezen régiók fajok közötti változatossága nagyobb lehet, ami magyarázhatja az SSR markerek fajok közti csökkent alkalmazhatóságát a COS markerekhez képest. Az EST-SSR markerek esetében a mikroszatellit-ismétlődések a gének átíródó részén találhatók, így ezek a markerek génspecifitásuk és genomi pozíciójuk pontosabb meghatározottsága miatt nagyobb népszerűségre tettek szert, a funkcionális és filogenomikai kutatásokban. Különösen a transzkriptóma-szekvenálást lehetővé tevő újgenerációs szekvenálási eljárások elterjedését követően.
Ugyanakkor konkrét, szekvenáláson alapuló kísérleti bizonyítékot (azaz DNS-szekvenciák összehasonlításán alapuló variabilitás adatokat) arra vonatkozóan, hogy ugyanazon faj(ok) genotípusain a COS markerek primer-szekvenciái vagy a genomi-, illetve EST-SSR markerek határoló régiói mutatnak-e nagyobb variabilitást, nem találtam.

4. kérdés „Az új tudományos eredmények közül gyakorlati szempontból kiemelkedik a búza-*Aegilops* szubsztitúciós és transzlokációs vonalak előállítása. Kérdésem, hogy Jelölt véleménye szerint mi az a legkorábbi időpont, amikor a piacra kerülhet egy új martonvásári búzafajta, melynek genetikai hátterének kialakításához hozzájárulhatnak ezek a vonalak valamely hasznos agronómiai tulajdonság donor genotípusaként?"

Válasz:
Az az időtartam, ami ahhoz szükséges, hogy e tulajdonságokat meghatározó *Aegilops* gének megjelenjenek a martonvásári búzafajtákban két fő innovációs folyamattól függ. Az első egy előnemesítési, ún. pre-breeding (előnemesítési) folyamat, ami ahhoz szükséges, hogy a rendelkezésre álló addíciós vonalakból olyan transzlokációs vonalakat hozzunk létre, melyek lehetőség szerint minél kisebb *Aegilops* kromoszómaszegmentum formájában hordozzák a minőségi paramétereket befolyásoló géneket. E búza-*Aegilops* transzlokációs vonalakban ugyanakkor a kieső búzagéneket kompenzálniuk kell az *Aegilops* géneknek, amire nagy esély van akkor, ha homeológ rekombinációt indukálunk a búza és az idegen kromoszómák közt. Ennek érdekében olyan búzavonallal keresztezzük az addíciós vonalakat, amelyekben egy deléció következtében hiányzik az a *Ph1* lókusz az 5B kromoszóma hosszú karjáról, ami biztosítja a normál kariotípussal rendelkező búzákban, hogy csak a homológ kromoszómák párosodjanak és rekombinálódjanak a meiózis során, a homeológ, így búza-*Aegilops*, kromoszómák pedig szinte sohasem. E keresztezések 2. vagy 3. utódnemzedékében számíthatunk búza-*Aegilops* rekombinációk kialakulására. A későbbiekben szükséges a kialakult rekombináns kromoszómák homozigóta formába hozása és a *ph1b* mutáns 5B kromoszómák eltávolítása a genomból, ami további keresztezési lépéseket és szigorú citogenetikai kontrolt igényel. Ez a folyamat kb. 5-6 évre becsülhető, ami az *Aegilops* kromoszómákra specifikus molekuláris markerekkel gyorsítható. Ekkor kerülhet át az anyag a második fázisba, mely a fajtaelőállító nemesítést célozza.
A fajtaelőállító búzanemesítés folyamata átlagosan 10 évet vesz igénybe. Ennek során nagy terméshozamú, jó agronómiai tulajdonságokkal és/vagy jó sütőipari minőséggel rendelkező fajtákat keresztezünk a speciális *Aegilops* kromatint tartalmazó előnemesítési vonalakkal üvegházi vagy szántóföldi körülmények között. Az így létrejött F_1 hibridek felnevelése és aratása után az F_2 szegregáló generációban történik meg az egyedszelekció. Ennek során változatos morfológiai tulajdonságokkal rendelkező, de egészséges kalászok kerülnek

begyűjtésre, melyeket kalászutódsorokban vetünk el az F_3 generációban. A kalászutódsorokból szelektált törzseket az F_4 generációban már parcellákban vetjük el. Az egyöntetű parcellák a következő években többparcellás, majd többismétléses, végül többtermőhelyes kísérletekbe kerülnek évről évre. A törzsek minőségvizsgálata az F_4 generációban kezdődik, míg a termésösszehasonlítás és értékelés a többismétléses kísérletekben indul. A szelektált törzsek az F_7-F_9 generációban kerülnek először állami fajtakísérletekbe, ahol három évi sikeres tesztelés után engedélyezik a fajtaoltalom megadását. A szelekció során fontos lehet a nemesítés célját képező kémiai komponens mennyiségének mérése és/vagy genetikai hátterének igazolása molekuláris markerekkel. A tulajdonság stabilitásának igazolására ezeket az analíziseket fontos generációról generációra megismételni.
Összefoglalva tehát kb. 15 évet vehet igénybe az ilyen típusú munka. Bár ez az időtartam soknak tűnik nem hiábavaló, mert az eredményeink arra utalnak, hogy a hexaploid búza genomjához addícionált 5-ös (5U és 5M) és 7-es (7U és 7M) homeológ csoporthoz tartozó *Aegilops* kromoszómák szignifikánsan növelhetik a búza szemtermésének néhány minőségi paraméterét (pl. a β-glükán tartalmát), míg a 2M és 3M kromoszóma a sótűrési tulajdonságait.

Végezetül ismételten szeretném megköszönni opponensemnek a dolgozatom részletes elemzését és a bírálat elkészítését.

Molnár István
tudományos főmunkatárs

Martonvásár, 2022. 11. 02.

Irodalom

Belyayev A, Raskina O. (2013) Chromosome evolution in marginal populations of *Aegilops speltoides*: causes and consequences. *Ann Bot.* 111(4):531-8. doi: 10.1093/aob/mct023.

Blythe SA and Wieschaus EF (2016). Establishment and maintenance of heritable chromatin structure during early drosophila embryogenesis. *eLife* 5:e20148. doi: 10.7554/eLife.20148

Booth DG, Beckett AJ, Molina O, Samejima I, Masumoto H, et al. (2016). 3D-CLEM reveals that a major portion of mitotic chromosomes is not chromatin. *Mol Cell.* 64:790–802. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.009

Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, et al. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 535:308–312. doi: 10.1038/nature18610

Cuylen-Haering S, Petrovic M, Hernandez-Armendariz A, Schneider MW, Samwer M, et al. (2020). Chromosome clustering by Ki-67 excludes cytoplasm during nuclear assembly. *Nature* 587:285–290. doi: 10.1038/s41586-020-2672-3

Eilam T, Anikster Y, Millet E, Manisterski J, Sagi-Assif O, et al. (2007). Genome size and genome evolution in diploid Triticeae species. *Genome* 50:1029–1037. doi: 10.1139/G07-083

Giorgi D, Farina A, Grosso V, Gennaro A, Ceoloni C, et al. (2013). FISHIS: fluorescence *in situ* hybridization in suspension and chromosome flow sorting made easy. *PLoS ONE* 8:e57994. doi: 10.1371/journal.pone.0057994

Hancock JM. (1996) Simple sequences and the expanding genome. *Bioessays* 8:421-5. doi: 10.1002/bies.950180512.

Hara M and Fukagawa T. (2020). Dynamics of kinetochore structure and its regulations during mitotic progression. *Cell Mol Life Sci.* 77:1–15. doi: 10.1007/s00018-020-03472-4

Hsiung CCS, Morrissey CS, Udugama M, Frank CL, Keller CA, et al. (2015). Genome accessibility is widely preserved and locally modulated during mitosis. *Genome Res.* 25:213–225. doi: 10.1101/gr.180646.114

Huskins CL. (1931) A cytological study of Vilmorin's unfixable dwarf wheat. *J Genet.* 25:113–124.

Kilian B, Ozkan H, Deusch O, Effgen S, Brandolini A, et al. (2007) Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Mol Biol Evol.* 24:217-27. doi: 10.1093/molbev/msl151.

Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M; et al. (2014) Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science* 345(6194):1250092. doi: 10.1126/science.1250092.

McMurray CT. (1995) Mechanisms of DNA expansion. *Chromosoma* 104:2-13. doi: 10.1007/BF00352220.

Molnár I, Kubaláková M, Šimková H, Cseh A, Molnár-Láng M et al. (2011) 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, 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

Palozola KC, Donahue G, Liu H, Grant GR, Becker JS, et al. (2017). Mitotic transcription and waves of gene reactivation during mitotic exit. *Science* 358:119–122. doi: 10.1126/science.aal4671.

Pesenti ME, Prumbaum D, Auckland P, Smith CM, Faesen et al. (2018). Reconstitution of a 26-subunit human kinetochore reveals cooperative microtubule binding by CENP-OPQUR and NDC80. *Mol Cell.* 71:923–939. doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.038

Pollak Y, Zelinger E, Raskina O. (2018) Repetitive DNA in the architecture, repatterning, and diversification of the genome of *Aegilops speltoides* Tausch (Poaceae, Triticeae). *Front Plant Sci.* 9:1779. doi:10.3389/fpls.2018.01779.

Quraishi UM, Abrouk M, Bolot S, Pont C, Throude M, 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

Ruban AS, Badaeva ED. (2018) Evolution of the S-genomes in *Triticum-Aegilops* alliance: evidences from chromosome analysis. *Front Plant Sci.* 9:1756. doi: 10.3389/fpls.2018.01756.

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* 175:357–364. https://doi.org/10.1007/s10681-010-0180-5

Sirri V, Jourdan N, Hernandez-Verdun D and Roussel P. (2016). Sharing of mitotic pre-ribosomal particles between daughter cells. *J Cell Sci.* 129:1592–1604. doi: 10.1242/jcs.180521

Takagi M, Natsume T, Kanemaki MT and Imamoto N. (2016). Perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture. *Genes Cells.* 21:1113–1124. doi: 10.1111/gtc.12420

Van Slageren MW. (1994). Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae). Wageningen Agricultural University, the Netherlands, Papers 94-7.

Wang GZ, Miyashita NT, Tsunewaki K. (1997) Plasmon analyses of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*: PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses of organellar DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:14570-7. doi: 10.1073/pnas.94.26.14570.

Zaharieva M, Suenaga K, William HM, Mujeeb-Kazi A. (2003): Microsatellite markers for identification of Aegilops geniculata Roth. M- and U-genome chromosomes in wheat background. *Annu Wheat Newsletter.* 49:75–78