



Szent István Egyetem

**Tarackbúzafajok kromoszómáinak jellemzése molekuláris
citogenetikai technikák és molekuláris markerek alkalmazásával**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Gaál Eszter

Gödöllő

2020

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

vezetője: Dr. Helyes Lajos
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezető: Dr. Molnár István
tudományos főmunkatárs
Agrártudományi Kutatóközpont
Mezőgazdasági Intézet

.....
Dr. Helyes Lajos
iskolavezető

.....
Dr. Molnár István
témavezető

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A kenyérbúza (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$; BBAADD) a világ egyik legfontosabb gabonanövénye, a rizs után a második legfontosabb élelmiszerünk. Becslések szerint a Föld népessége 2050-re elérheti a 9 milliárd főt (FAO, 2009). Ennek megfelelően az átlagos éves termésmennyiség növekedését 1%-ról legalább 1,6%-ra szükséges növelni (Giraldo et al., 2019). A csökkenő fajlagos szántóterület mellett az egyre gyakoribb és erőteljesebb abiotikus és biotikus stresszek is nehezíthetik a termésmennyiség növekedésének fenntartását. Ennek egyik lehetséges módja új, abiotikus és/vagy biotikus stresszekkel szemben álló fajták előállítása. A búzanemesítés feladata olyan búzafajták előállítása, melyek nem csak a magasabb terméshozamot tudják biztosítani, de kiemelkedő abiotikus és biotikus stresszrezisztenciával is rendelkeznek. Az ellenálló-képesség növelésének egyik lehetséges módja a rokon vad fajok felhasználása a nemesítési folyamat során. E rokon vad fajok széles genetikai diverzitást képviselnek számos agronómiailag hasznos tulajdonság esetében, melyek háttérben álló génváltozatok hagyományos faj- és nemzetségkeresztezések révén átvihetőek a búza genomjába (Hoffmann, 2011).

A különböző tarackbúzafajok (*Thinopyrum*, *Agropyron*, *Pseudoroegneria* nemzetségbe tartozó fajok) rendkívül ellenállóak a környezeti viszonyokkal (szárazság, hő, hideg, só), és a betegségekkel (levél-, szárrozsa, lisztharmat) szemben (Wang, 2011). Az irányított génátvitel hatékonysága nagyban függ a két faj közötti genetikai távolságtól, illetve a búza és az idegen kromoszóma homeológiai viszonyától. Napjainkig számos genetikai alapanyagot állítottak már elő, melynek során hasznos géneket sikerült átépíteni a kenyérbúza genomjába, azonban a génátvitel folyamata még hatékonyabbá tehető a tarackbúzafajok kromoszómáinak azonosítását lehetővé tevő FISH kariotípusok és kromoszóma specifikus molekuláris markerek létrehozásával.

Az idegenfajú keresztezésekkel történő génátvitel végső célja olyan introgressziós vonalak előállítása, melyek stabilan öröklődnek, és amelyek a vad faj agronómiailag hasznos génjeit hordozó lehető legkisebb kromoszóma szegmentumát tartalmazzák. A keresztezési programok hatékonyabbá tételéhez fontos a keresztezni kívánt fajok genomjának részletes ismerete, és a búzába átvitt idegenfajú kromatin pontos azonosítása. A genomi *in situ* hibridizáció (GISH) esetében a teljes szülői genomi DNS-t felhasználva az idegen kromatin kimutatható az adott egyedben, míg az egyedi kromoszóma azonosításra alkalmas repetitív DNS próbákkal végzett fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) lehetőséget ad az idegen kromoszómák és azok

szegmentumainak azonosítására. Molekuláris markerek alkalmazásával a búzanemesítés folyamata gyorsítható, mivel a klasszikus citogenetikai módszerekhez képest nagyobb populációk vizsgálata kivitelezhető, másrészt a megfelelő kromoszóma-, kromoszómaszakasz specifikus markerek alkalmazásával az utódok szelekciója gyorsítható, egyszerűsíthető.

Mind ezek tükrében kutatásaink során az alábbi célokat tűztük ki:

- Molekuláris citogenetikai módszerek optimalizálása a tarackbúzafajok genomjai esetében. A búza genomban történő azonosításhoz szükséges GISH, illetve a tarackbúza kromoszómák egyedi azonosításához szükséges FISH módszerek optimalizálása, a megfelelő hibridizációs próbák kiválasztása.
- Három diploid faj (*A. cristatum*, *Th. bessarabicum*, *Ps. spicata*,) részletes FISH alapú kariotípusának elkészítése, illetve az említett fajok eltérő földrajzi származású vonalainak FISH polimorfizmusának vizsgálata.
- Az *A. cristatum*, a *Th. bessarabicum*, a *Th. elongatum*, és a *Ps. spicata* fajok eltérő földrajzi származású vonalainak és a búza rokonsági viszonyainak vizsgálata molekuláris markerek alkalmazásával, illetve genomspecifikus markerek azonosítása.
- Egyedi kromoszóma-specifikus molekuláris markerek azonosítása a *Th. elongatum* esetében, amelyhez a *Th. elongatum* diszómás ill. diteloszómás addíciós vonalait vizsgáltuk COS markerek alkalmazásával. E markerek használata nagymértékben elősegítheti a nemesítési alapanyagok vizsgálatát.
- A búza és a *Th. elongatum* kromoszómáinak homeológia viszonyainak vizsgálata
- Új búza-előnemesítési alapanyagok előállítása, amelyek az *A. cristatum* vagy a *Th. elongatum* tarackbúzafaj agronómiaileg hasznos tulajdonságát hordozzák.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Növényi anyag

Az *in situ* hibridizációs módszerek tarackbúzafajokra történő optimalizálásához és a kariotípusok meghatározásához szükséges vizsgálatokhoz a következő diploid tarackbúzafajokat vizsgáltuk citogenetikai és molekuláris markerek alkalmazásával: *Agropyron cristatum* (MvGB 1521, MvGB 1509), *Thinopyrum bessarabicum* (MvGB 1705, MvGB 1703,

MvGB 1706), *Pseudoroegneria spicata* (MvGB 1607, MvGB 1617, MvGB 1615), *Thinopyrum elongatum* (MvGB 1708).

A *Thinopyrum elongatum* kromoszómáira specifikus molekuláris markerek azonosításához a teljes Chinese Spring- *Th. elongatum* diszómás addíciós sorozatot, és 12 diteloszómás addíciós vonalat, illetve a CS- *Th. elongatum* amfiploid vonalat vizsgáltuk.

Keresztezési kísérleteink során a CS- *A. cristatum* diszómás addíciós vonalakat, a már említett CS- *Th. elongatum* addíciós vonalakat, a CS- *A. cristatum* 5P diszómás és 2C monoszómás, illetve a CS- *A. cristatum* 6P diszómás és 2C monoszómás addíciós vonalakat használtuk fel.

2.2. Molekuláris citogenetikai vizsgálatok

2.2.1. Citológiai preparátum készítése

A vizsgált növényi anyagokból származó szemeket nedves szűrőpapíron csíráztattuk, majd az 1-1,5 cm-es gyökércsúcsokat leszedtük, 1 napig jeges vízben, ezután abszolút etanol és jégcet 3:1 arányú keverékében 5 napig 37°C-on fixáltuk, ezzel leállítva a sejtek osztódását. A szemeket a gyökércsúcsok eltávolítása után egyedi citológiai számmal ellátott tápkockákba helyeztük a növények felnevelése céljából. A gyökereket ezután felhasználásig -20°C-on tároltuk. A preparátumkészítéshez a gyökércsúcsokat 1%-os kárminecetsav oldatba helyeztük 15-30 percre, ezzel festve és puhítva a sejteket. A gyökércsúcsokat tárgylemezre helyezve 45%-os ecetsav oldatban nyomtuk szét. A tárgylemezeket fénymikroszkóp alatt fáziskontraszt feltét alatt vizsgáltuk, az *in situ* hibridizációhoz megfelelő tárgylemezekről a fedőlemezt folyékony N₂-ben történő fagyasztás után eltávolítottuk, majd etanol sorozatban (70%, 90% és 100% etanol oldat) történő dehidratálás után -20°C-on tároltuk a lemezeket.

2.2.2. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

A különböző tarackbúzafajok kariotípusainak elkészítéséhez, illetve a búza kromoszómák azonosításához a búzafélék körében gyakran alkalmazott repetitív DNS próbákat (pTa71, pSc119.1, Afa-family, HT100.3, pAs1) és mikroszatellit próbákat ((GAA)_n, (CAC)_n, (AGG)_n, (ACT)_n, (ACG)_n, (AAC)_n, (CAG)_n) alkalmaztuk. A pTa71 egy a búza riboszomális génjeit hordozó 9.05 kb hosszú DNS klón (Gerlach and Bedbrook, 1979), amelyet rizs genomi DNS-ből szaporítottunk fel Chang és mtsai (2010) módszere alapján. A pSc119.1 egy 120 bp hosszúságú rozból izolált repetitív DNS szakasz (Bedbrook et al., 1980), amelyet rozs genomi DNS-ből állítottunk elő Contento és mtsai (2005) módszere alapján. A pAs1 egy 1 kb hosszúságú *Ae. tauschii* genomi DNS-ből izolált repetitív szekvencia (Rayburn és Gill, 1986),

az Afa-family próba egy 260 bp hosszúságú repetitív DNS szakasz, amelyet a pAs1 próba restrikciós endonukleázzal történő emésztésével állították elő, mintázata szinte megegyezik a pAs1 próba mintázatával, felszaporítását az *Ae. tauschii* teljes genomi DNS-ből Nagaki és mtsai. (1995) módszere alapján végeztük. A HT100.3 egy *Arabidopsis thaliana* DNS-ből izolált telomér repetitív szekvencia, amely 30 kópiában tartalmazza a (TTTAGGG) szekvenciát, és a legtöbb faj esetén a kromoszómák telomér régióján mutat mintázatot (Juchimiuk-Kwasniewska et al., 2011). Az alkalmazott mikroszatellit próbákat (GAA)_n, (CAC)_n, (AGG)_n, (ACT)_n, (ACG)_n, (AAC)_n, (CAG)_n búza genomi DNS-ből állítottuk elő Molnár és mtsai. (2011) módszere alapján. Az alkalmazott fluoreszcens *in situ* hibridizációs vizsgálatokhoz használt Afa-family, pSc119.2, pTa71, pAs1, HT100.3 illetve a mikroszatellit próbákat biotin-16-dUTP-vel, illetve digoxigenin-11-dUTP-vel jelöltük Nick-transzlációval. A pSc119.2, a pTa71, a HT100.3, és a mikroszatellit próbák esetén a Biotin-Nick Translation Mix-et (Roche), az Afa-family, pAs1, a pTa71 és a mikroszatellit próbák esetén a Dig-Nick Translation Mix-et (Roche) alkalmaztuk a gyártó utasításai szerint. A pre-hibridizációs mosásokat és a próbák detektálását Molnár és mtsai. (2011) által leírt módon végeztük.

2.2.3. Genomi *in situ* hibridizáció (GISH)

A genomi *in situ* hibridizációs vizsgálatokhoz az alábbi fajok jelölt, teljes genomi DNS-ét használtuk: *A. cristatum*, *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*, *Ps. spicata*. A teljes genomi DNS szekvenciákat indirekten, random priming módszerrel jelöltük biotin-14-dCTP-vel az InVitrogen által forgalmazott BioPrime Random Labeling Kit-tel a gyártó utasításai szerint. A pre-hibridizációs mosásokat és a próbák detektálását Molnár és mtsai. (2011) által leírt módon végeztük.

2.3. COS markerekkel végzett vizsgálatok

A különböző tarackbúzafajok genomjainak összehasonlításához, illetve az E genom kromoszómáira specifikus markerek azonosítása során, összesen 114 COS markert alkalmaztunk. Ezeket a markereket két publikus COS marker adatbázisból (Wheat Genetic Improvement Network (WGIN) (<http://www.wgin.org.uk/resources/Markers/TAMarkers.php>), illetve a Tools and Resources (TR) collections (http://www.modelcrop.org/cos_markers)), úgy választottuk ki, hogy azok lefedjék a búza 1-7 homeológ csoportjainak kromoszómáit. A PCR reakciók eredményeként kapott amplikonokat és a megfelelő (500 bp vagy 1500 bp) DNS létrát egy kapilláris elektroforézis elven működő 96 csatornás fragment analízátor segítségével

(Advanced Analytical Technologies, Ames, USA) választottuk szét. Az elkészült 'mesterséges' géleképeket ProSize 2.0 szoftver alkalmazásával értékeltük ki.

2.4. Szekvencia analízis

A genomok összehasonlításához a COS markerekkel végzett vizsgálatok alapján készített fizikai térképet használtuk fel. Ennek során a COS markerek EST szekvenciáját vetettük össze a búza szekvenciájával BLAST algoritmus segítségével történt hasonlósági keresés alapján (<https://urgi.versailles.inra.fr/blast/>). A búza-*Thinopyrum* homológia viszonyok ábrázolásához elkészítettük az *Thinopyrum* méretarányos kromoszómáit, és ezeken elhelyeztük a térképezett COS markereket. A megfelelő szekvenciák kezdőpozícióit (bp) használtuk fel a COS markerek fizikai elhelyezkedésének ábrázolásához. A búza pszeudomolekulák és a megfelelő szekvenciák hosszát és kezdőpontjait (bp) pixelekké konvertáltuk és ezen adatokból egy erre egyedileg készített szoftver (<http://geneticmap.herokuapp.com>) alkalmazásával elkészítettük a búza COS marker alapú fizikai térképét. A búza és a *Th. elongatum* genomjai közötti homológia viszonyok ábrázolásához a markereket színekkel láttuk el a búza fizikai térképen az E genomon lévő elhelyezkedésük alapján.

2.5. Mesterséges levélrozsda-fertőzés

Üvegházi körülmények között vizsgáltuk CS-*A. cristatum*, illetve CS-*Th. elongatum* diszómás és diteloszómás addíciós vonalak levélrozsda- ellenállóságát mesterséges fertőzés során. A növényeket a vetést követő nyolcadik napon fertőztük az uredospórák vizes szuszpenziójával, még egylevelű állapotban, majd a fertőzést követő tizedik napon értékeltük. A növények fertőzöttségét Stakman és mtsai. (1962) által kidolgozott skála alapján értékeltük ki.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Kariotipizálási vizsgálatok

Elkészítettük az *Agropyron cristatum* két különböző földrajzi helyről származó vonal (MvGB 1509, MvGB 1521), a *Thinopyrum bessarabicum* három eltérő földrajzi helyről származó vonal (MvGB 1703, MvGB 1705, MvGB 1706), és a *Pseudoroegneria spicata* két eltérő földrajzi helyről származó vonal (MvGB 1615, MvGB 1607) kariotípusait és vizsgáltuk a hibridizációs mintázatban bekövetkező polimorfizmust az egyes fajok különböző vonalai

között. A pSc119.2, Afa-family és a pTa71 próbákat alkalmazva megállapíthattuk, hogy a próbák kromoszómákon megjelenő hibridizációs mintázata alapján az egyes kromoszómák megkülönböztethetők egymástól és pontosan azonosíthatók. A mikroszatellit próbák azonban, ellentétben más *Triticeae* fajokkal (kenyérbúza, *Aegilops*, *T. monococcum*, *Secale*) a vizsgált tarackbúzafajokon nem mutattak specifikus hibridizációs mintázatot. Tarackbúzafajok esetén ez nem egyedülálló, *Th. elongatum* esetén sem volt tapasztalható hibridizációs mintázat (Linc et al., 2012), *Th. ponticum* esetében egyedül a 7-es kromoszómán volt tapasztalható GAA jel a centroméra közelében (Sepsi et al., 2008). A legösszetettebb mintázatot a *Ps. spicata* kromoszómáin tapasztaltuk, míg az *A. cristatum* esetében volt a mintázat a legegyszerűbb, ám mégis használható egyedi azonosításra. Vizsgáltuk e fajok eltérő földrajzi származású vonalai közötti polimorfizmust a FISH mintázatban, amely során a *Th. bessarabicum* 3 vonala között nem tapasztaltunk lényegi különbségeket, míg az *A. cristatum* és a *Ps. spicata* esetében számottevő különbségeket tapasztaltunk.

3.2. COS markerekkel végzett vizsgálatok

3.2.1. Tarackbúzafajok genetikai kapcsolatának vizsgálata molekuláris markerekkel

A részletes genom analízis során a hexaploid búza (GK Öthalom), a *Th. elongatum*, a *Th. bessarabicum*, az *A. cristatum* 2 vonalának, és a *Ps. spicata* 3 vonalának genomját hasonlítottuk össze COS markerekkel. A *Th. elongatum* vizsgálata során 82 marker (112 lókuszt) esetében tapasztaltunk terméket, amiből 43 (53 lókuszt) bizonyult polimorfnek (>5bp különbség). A *Th. bessarabicum* esetében 82 marker (109 lókuszt) eredményezett PCR terméket, ebből 44 (52 lókuszt) bizonyult polimorfnek. A *Ps. spicata* esetében három eltérő vonalat vizsgáltunk. Az MvGB 1617-es vonal vizsgálata során 81 marker (113 lókuszt), az MvGB 1607-es vonal esetében 82 marker (118 lókuszt), míg az MvGB 1615-ös vonal esetében 90 marker (135 lókuszt) eredményezett PCR terméket. Ezek közül 56 marker (71 lókuszt), 57 marker (76 lókuszt), 62 marker (87 lókuszt) bizonyult polimorf markernek. Az *A. cristatum* két vonalát vizsgáltuk, az MvGB 1521-es vonal esetében 89 marker (117 lókuszt), míg az MvGB 1509-es vonal esetében 89 marker (129 lókuszt) eredményezett PCR terméket, amelyekből 57 marker (73 lókuszt), illetve 62 marker (82 lókuszt) bizonyult polimorfnek. A vizsgált tarackbúzafajok rokonsági viszonyait Jaccard-féle hasonlósági koefficiensek alapján dendrogramon ábrázoltuk. A dendrogram alapján a 8 genom 3 nagyobb csoportra osztható. Az első csoportban az egymáshoz közeli rokonsági viszonyban álló *Th. elongatum* és *Th. bessarabicum*, illetve a GK Öthalom

búza fajta található. A második csoportban a két *A. cristatum* faj, a harmadik csoportban a három *Ps. spicata* faj található.

3.2.2. Kromoszóma-specifikus markerek azonosítása a *Thinopyrum elongatum* (EE) vizsgálata során

Kromoszóma-specifikus markerek azonosításához a teljes CS-*Th. elongatum* diszómás addíciós, illetve 12 diteloszómás addíciós vonalat vizsgáltunk. A vizsgálatok során 114 COS markert teszteltünk, amelyek közül 108 (94.7%) marker esetében keletkezett PCR termék, legalább egy genotípus esetében, amelyek közül 50 marker bizonyult polimorfnak, azaz ≥ 4 bp különbség jelentkezett a termékben a búza genotípushoz viszonyítva. Az 50 marker közül 31 (62%) volt specifikus csak egy *Th. elongatum* kromoszómára, és 9 (18%) marker adott polimorf terméket csak az amfiploid vonal vizsgálata során. Ebből arra következtethetünk, hogy ez a 9 marker nagy valószínűséggel a hiányzó 3E kromoszómára specifikus. Összesen 40 kromoszóma specifikus markert azonosítottunk: 4 db 1E, 3 db 2E, 9 db 3E, 8db 4E, 5 db 5E, 5 db 6E és 6 db 7E specifikus markert.

3.2.3. Szekvencia analízis

A *Th. elongatum* E genomja és a búza A, B, és D genomja közötti hasonlóságok és eltérések vizsgálatához az 50 polimorf COS marker EST szekvenciáit kereső szekvenciaként használva végeztünk BLASTn keresést a búza referencia IWGSC v1.0 szekvencián a homológia viszonyok feltárása érdekében. A BLASTn keresés eredményei közül (E-érték $< 2.8e^{-08}$, Identity (azonosság) $> 82\%$ és szekvencia hossz > 100 bp) a legjobb találatok esetében az EST-k illeszkedésének a búza pszeudomolekulán meghatározott kezdőpozícióit (bp) használtuk fel a COS markerek fizikai elhelyezkedésének grafikus ábrázolásához. A búza pszeudomolekulák bp-ban kifejezett hosszát és az EST-k illeszkedésének szintén bp-ban kifejezett kezdőpontjait pixel adatokká konvertáltuk és ezen adatokból egy erre egyedileg készített szoftver (<http://geneticmap.herokuapp.com>) alkalmazásával elkészítettük a búza kromoszómák COS marker alapú fizikai térképét. A markerek többsége ugyanazon a homeológ csoporton helyezkedett el az E genom esetében, mint a búza genom kromoszómáin, négy marker helyezkedett el más homeológ csoporton. Számos intragenomikus duplikációt is azonosítottunk az E genomon belül. A 2E és a 6E kromoszómák között hat búza 2-es homeológ csoportra specifikus marker alapján feltételezhetünk kromoszóma-átrendeződést, ezzel egy nagyobb mértékű duplikációt mutatva. A *TR636* marker megtalálható volt mind a 6ES, mind a 6EL régióban is, amely egy kromoszómán belüli átrendeződésre utal. Továbbá azonosítottunk néhány kisebb méretű, 1-1 marker által meghatározott átrendeződést is: egy 4ES/5EL, illetve

egy 5EL/7ES duplikációt. A *Th. elongatum* és a búza makroszinténikus viszonya a COS markerek alkalmazásával jól vizsgálható. Az 1-es és 2-es homeológ csoport, a 6-os homeológ csoport kromoszómáinak rövid karja, illetve részben a 7-es homeológ csoport esetében a búza és az E genom nagymértékű szinténiát mutat, míg a 4-es homeológ csoport, az 5-ös homeológ csoport kromoszómáinak hosszú karja és részben a 7-es homeológ csoport esetében több intrakromoszómális átrendeződést tapasztaltunk.

3.3. Fiatalkori levélrozsa-rezisztenciavizsgálat

Chinese Spring búzafajtán, CS-*A. cristatum*, illetve CS-*Th. elongatum* diszómás (DA) és diteloszómás (DtA) addíciós vonalain csíranövénykorban mesterséges üvegházi levélrozsa-fertőzési kísérletet hajtottunk végre. A CS-*Th. elongatum* összes addíciós vonala fogékonyak bizonyult, (Stakman-skála: 4-es érték). A CS-*A. cristatum* addíciós vonalak esetében többféle eredményt is tapasztaltunk. A 2PL diteloszómás addíciós vonal nagyon rezisztensnek (;), a 2PS diteloszómás addíciós vonal fogékonyak (4), míg a 2P diszómás addíciós vonal mérsékelten fogékonyak (3) bizonyult. Az 1PS DtA vonal esetében nem volt egyértelmű, hogy rezisztens (1) vagy mérsékelten rezisztens (2) volt-e az eredmény, azonban az 1P DA mérsékelten rezisztens (2) volt, 1PL DtA vonalat nem vizsgáltuk, mert nem volt a birtokunkban. A 6PS DtA vonal mérsékelten fogékonyak (3), a 6PL DtA fogékonyak (4), míg a 6P DtA mérsékelten rezisztensnek (2) bizonyult. A többi vonal (DA: 3P, 5P; DtA: 4PS, 5PL) fogékony (4) volt. A 3PS DtA vonal esetében kevés szem csírázott, amelyből gyenge növények lettek, hamar el is pusztultak, a 4P DA vonal a fertőzés után pár nappal szintén kipusztult.

3.4. Új előnemesítési anyagok előállítása

Keresztezési programjaink első részében CS- *Th. elongatum* diszómás, illetve monoszómás addíciós vonalakat kereszteztünk a megfelelő CS- *A. cristatum* diszómás, ill. monoszómás addíciós vonalakkal. Az 1E és az 1P kromoszómák kísérletünkben stabilan öröklődtek, minden utód tartalmazta az adott kromoszómákat. A 3E kromoszóma nagyobb arányban öröklődött át az utódokba, mint a 3P, ami gyakran eliminálódott vagy tört. A CS-*A. cristatum* 2P diszómás addíciós vonallal nem sikerült kereszteznünk, a 2P kromoszóma instabilitása miatt. Egy transzlokációt tartalmazó vonalat tudtunk azonosítani.

Keresztezési programjaink másik részében a CS- *A. cristatum* diszómás addíciós vonalak és a gametocid géneket hordozó CS- *Ae. cylindrica* 2C diszómás addíciós vonal keresztezéséből származó F₂BC₁ generációt vizsgáltuk, ezekben már várható a gametocid gének okozta

kromoszóma átrendeződések megjelenése, ill. öntermékenyítettük ezeket a növényeket, további átrendeződések kialakulása érdekében. Összesen 2 db 6P és 6 db 5P kromoszóma transzlokációt tartalmazó vonalat azonosítottunk. Minden vonal esetén kaptunk utódszemeket, melyek felhasználhatók az adott transzlokáció diszómás állapotának stabilizálására, illetve többszöri visszakeresztezéssel a búza genom visszaállítására.

3.5. Új tudományos eredmények

1. Elkészítettük az *A. cristatum* 2 vonalának (MvGB1509, MvGB1521), a *Th. bessarabicum* 3 vonalának (MvGB1705, MvGB1703, MvGB1706) és a *Ps. spicata* 2 vonalának (MvGB1615, MvGB1607) fluoreszcens *in situ* hibridizációs kariotípusát Afa-family, pSc119.2 és pTa71 repetitív DNS próbákkal. E kariotípusok felhasználásával a *Th. bessarabicum* faj kromoszómái egyértelműen azonosíthatók, és pontosan nyomon követhetők az előnemesítési folyamatokban.
2. Az elkészített kariotípusok és COS markerek segítségével megerősítettük, hogy a *Th. elongatum* és a *Th. bessarabicum* E ill. J genomja különböző.
3. A *Th. elongatum*, az *A. cristatum*, a *Ps. spicata* és a *Th. elongatum* fajok eltérő földrajzi származású vonalainak COS markeres vizsgálatával kimutattuk, hogy genetikailag a *Ps. spicata* fajok állnak legtávolabb a búzához, majd az *A. cristatum* fajok, és legközelebb a *Th. elongatum* áll legközelebb a termesztett búzához. Ezzel összefüggésben kimutattuk, hogy a fajidegen génátvitel során a *Th. elongatum* kromoszómái nagyobb valószínűséggel adódnak át a következő generációkba, mint az *A. cristatum* kromoszómái.
4. A *Th. elongatum* diszómás és diteloszómás addíciós vonalainak segítségével kromoszómaspecifikus COS markereket azonosítottunk, melyek segítségével feltártuk a búza és *Thinopyrum* kromoszómák közti homológia viszonyokat. A markerek szintén alkalmasak lehetnek a jövőben búza-*Th. elongatum* introgressziós vonalak szelekciójára.
5. Tetraploid eredetű *A. cristatum* addíciós vonalak vizsgálatával kimutattuk, hogy az *Agropyron cristatum* 2P kromoszómájának hosszú karján egy hatékony levélrozsdarezisztenciagén van.

6. CS- *A. cristatum* diszómás addíciós vonalak CS-*Ae. cylindrica* 2C diszómás addíciós vonallal történő keresztezéséből, majd az utódok visszakeresztezéséből sikeresen azonosítottunk 2 db 6P, és 6 db 5P kromoszómaszakaszt tartalmazó transzlokációs vonalat. Minden vonal esetén kaptunk utódszemeket is, melyek öntermékenyítve diszómás állapotban hasznos előnemesítési alapanyagként szolgálhatnak.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. Tarackbúzafajok kariotipizálása

A gabonafélék esetén általánosan használt FISH próbákkal (Afa-family, pSc119.2, pTa71) sikerült az általunk vizsgált három tarackbúzafaj (*Th. bessarabicum*, *A. cristatum*, *Ps. spicata*) kromoszómáit megkülönböztetnünk, illetve különböző mértékű polimorfizmust is felfedeztünk a fajok különböző földrajzi származású vonalai között. Az elkészített kariotípusok alkalmazásával lehetőségünk nyílik további nemesítési alapanyagok szelekciójára. Kisebb méretű kromoszóma átrendeződések azonosítása érdekében azonban célszerű lehet további repetitív DNS próbák azonosítása, esetleg egyedi single-gene FISH próbák tervezése, ezzel növelve a diagnosztikus sávok számát, és lehetővé téve részletesebb kariotípusok elkészítését.

4.2. COS markerekkel végzett vizsgálatok

COS markerekkel végzett vizsgálataink két részből álltak. Először több, mint 100 COS marker alkalmazásával vizsgáltuk négy tarackbúzafaj (*A. cristatum*, *Ps. spicata*, *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*) több változatának (kétféle P, háromféle St, E és J) genomját. Ennek során feltérképeztük e fajok rokonsági viszonyait egymáshoz, illetve a hexaploid búzához képest. Vizsgálataink másik részében számos kromoszóma specifikus markert sikerült azonosítanunk az E genom esetében, melyek alkalmasak lehetnek a különböző nemesítési alapanyagok, addíciók és transzlokációk gyorsabb ellenőrzésére, szelekciójára, de alkalmazhatók agronómiaailag fontos gének térképezését célzó kutatási projektekben is. Terveink között szerepel más tarackbúzafajok esetén is egyedi kromoszóma specifikus markerek azonosítása.

4.3. Fiatalkori levélrozsda-rezisztenciavizsgálat

A CS-*A. cristatum* diteloszómás és diszómás addíciós vonalainak fiatalkori mesterséges levélrozsda-fertőzés eredménye alapján a 2P kromoszóma hosszú karját tartalmazó vonalak

rezisztensnek bizonyultak. Erre a kromoszómára már térképeztek egy levélrozsdarezisztenciagént, illetve lisztharmat-rezisztenciagént is. Ezen eredmények alapján *ph1b* mutáns búza vonalak segítségével érdemes lenne keresztezési programot indítani, olyan rekombinánsok létrehozása érdekében, melyek hordozzák a 2P kromoszóma hosszú karján található levélrozsdarezisztenciagént. Sikeres rezisztens transzlokációs vonal előállításánál esetén lehetséges lenne az adott rezisztenciagén azonosítása MutChromSeq módszer alkalmazásával.

4.4. Keresztezési vizsgálatok

Keresztezési programjaink során búza háttérben lévő *A. cristatum*, illetve *Th. elongatum* diszómás addíciós vonalakat kereszteztünk egymással. Az F₁ generációban több növényt is azonosítottunk, amely egyszerre hordozta a két faj genomjából származó 1-1 kromoszómát, illetve találtunk egy transzlokációt tartalmazó vonalat is, azonban ez a növény steril volt. A továbbiakban folytatjuk a vizsgálatot az F₂ generációban, újabb transzlokációkat keresve, illetve bővítjük a keresztezési vizsgálatot további addíciós vonalak felhasználásával. Keresztezési programunk másik részében az *Ae. cylindrica* 2C kromoszómájának gametocid tulajdonságát használtuk fel transzlokációk előállítására búza-*A. cristatum* 5P, illetve 6P és búza-*Ae. cylindrica* 2C diszómás addíciós vonalak keresztezése során. Az BC₁F₂ utódok között több növényt is azonosítottunk, amelyek 42 kromoszómát és transzlokációt hordoznak, illetve olyan utódokat is, amelyek még mind az 5P vagy 6P, illetve a 2C kromoszómát hordozták, ezek utódai között még várhatóak transzlokációk. Célunk a transzlokációs vonalak vizsgálata, további transzlokációk azonosítása, és a többi addíciós vonal bevonása a keresztezési programba.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- 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(2), 545–560. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90529-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90529-2)
- Chang, K. D., Fang, S. A., Chang, F. C., and Chung, M. C. (2010). Chromosomal conservation and sequence diversity of ribosomal RNA genes of two distant *Oryza* species. *Genomics*, 96(3), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.05.005>
- Contento, A., Heslop-Harrison, J. S., and Schwarzacher, T. (2005). Diversity of a major repetitive DNA sequence in diploid and polyploid *Triticeae*. *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1–3), 34–42. <https://doi.org/10.1159/000082379>

- FAO. (2009). *How to feed the world in 2050. High Level Expert Forum. Rome, Italy.*
- Gerlach, W. L., and Bedbrook, J. R. (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acid Research*, 7(7), 1869–1885.
- Giraldo, P., Benavente, E., Manzano-Agugliaro, F., and Gimenez, E. (2019). Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. *Agronomy*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy9070352>
- Hoffmann, B. (2011). *Növénygenetika.*
- Juchimiuk-Kwasniewska, J., Brodziak, L., and Maluszynska, J. (2011). FISH in analysis of gamma ray-induced micronuclei formation in barley. *Journal of Applied Genetics*, 52(1), 23–29. <https://doi.org/10.1007/s13353-010-0017-x>
- Linc, G., Sepsi, A., and Molnár-Láng, M. (2012). A FISH karyotype to study chromosome polymorphisms for the *Elytrigia elongata* E genome. *Cytogenetic and Genome Research*, 136(2), 138–144. <https://doi.org/10.1159/000334835>
- Molnár, I., Cifuentes, M., Schneider, A., Benavente, E., and Molnár-Láng, M. (2011). Association between simple sequence repeat-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. *Annals of Botany*, 107(1), 65–76. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq215>
- 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(3), 479–486. <https://doi.org/10.1139/g95-063>
- Rayburn, A. L., and Gill, B. S. (1986). Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 4(2), 102–109. <https://doi.org/10.1007/BF02732107>
- Sepsi, A., Molnár, I., Szalay, D., and Molnár-Láng, M. (2008). Characterization of a leaf rust-resistant wheat–*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1, using sequential multicolor GISH and FISH. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(6), 825–834. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0716-4>
- Stakman, E. C., Stewart, D. M., and Loegering, W. Q. (1962). *Identification of physiologic races of Puccinia graminis var. tritici.*
- Wang, R. R. C. (2011). *Agropyron and Psathyrostachys*. In K. Chittaranjan (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic Breeding Resources* (pp. 77–108). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14228-4_2

6. A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉGE

Tudományos cikkek:

Impakt faktoralal rendelkező nemzetközi tudományos lapokban megjelent publikációk

1. Ivanizs, László; Monostori, István; Farkas, András; Megyeri, Mária; Mikó, Péter; Türkösi, Edina; **Gaál, Eszter**; Lenyó-Thegze, Andrea; Szőke-Pázsai, Kitti; Szakács, Éva, Éva Darkó, Tibor Kiss, Andrzej Kilian and István Molnár: Unlocking the Genetic Diversity and Population Structure of a Wild Gene Source of Wheat, *Aegilops biuncialis* Vis., and Its Relationship With the Heading Time. FRONTIERS IN PLANT SCIENCE 10 Paper: 1531 (2019) **IF: 4.404**
2. Mahmoud Said; Alejandro Copete Parada; **Eszter Gaal**; Istvan Molnar; Adoración Cabrera; Jaroslav Doležel; Jan Vrána: Uncovering macrosyntenic relationships between tetraploid *Agropyron cristatum* and bread wheat genomes using COS markers. Theoretical and Applied Genetics 132: 10 pp. 2881-2898., 18 p. (2019) **IF: 4.439**
3. Katerina Pernickova, Gabriella Linc, **Eszter Gaal**, David Kopecky, Olga Samajova, Adam J. Lukaszewski: Out-of-position telomeres in meiotic leptotene appear responsible for chiasmate pairing in an inversion heterozygote in wheat (*Triticum aestivum* L.). Chromosoma 128: 1 pp. 31-39., 9 p. (2019) **IF: 3.530**
4. **Gaal E**, Miroslav Valárik, Molnar I, Farkas A, Linc G: 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 Paper: e0208840 (2018), **IF: 2.766**
5. Linc G, **Gaal E**, Molnar I, Icsó D, Badaeva E, Molnar-Lang M: Molecular cytogenetic (FISH) and genome analysis of diploid wheatgrasses and their phylogenetic relationship. PLOS ONE 12:(3) Paper e0173623. 18 p. (2017), **IF: 2.806**

Konferencia kiadványok:

Proceeding:

1. Szakács, Éva; Cseh, András; Farkas, András; Gaál, Eszter; Ivanizs, László; Kovács, Géza; Kruppa, Klaudia; Lenyó-Thegze, Andrea; Linc, Gabriella; Makai, Diána et al.: Búzával rokon fajok genetikai diverzitásának kiaknázása a nemesítés számára. In: Veisz, Ottó (szerk.) A martonvásári agrárkutatások hetedik évtizede. Martonvásár, Magyarország: Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet, (2019) pp. 82-98., 17 p.
2. Linc G, **Gaál E**, Türkösi E, Molnár I, Molnár-Láng M: Molecular cytogenetic tools in characterization of pre-breeding materials produced with *Thinopyrum* species In: *H Buerstmayr , C Lang-Mladek , B Steiner , S Michel , M Buerstmayr , M Lemmens , J Vollmann , H Grausgruber (szerk.)* Proceedings of the 13th International Wheat

Absztrakt:

1. **Gaál, Eszter**; Said, Mahmoud; Thegze, Andrea Lenykó; Cséplő, Mónika; Vida, Gyula; Dolezel, Jaroslav; Molnár, István: Molecular cytogenetic analysis of wheat pre-breeding materials containing chromosomes from the wheatgrass species. In: Centre, of the Region Haná for Biotechnological Agricultural Research Plant Biotechnology: Green for Good V. Olomouc, Csehország: European Federation of Biotechnology, (2019) p. 137
2. Ivanizs, László; Monostori, István; Farkas, András; Megyeri, Mária; Mikó, Péter; Szakács, Éva; Szőkéné, Pázi Kitti; Türkösi, Edina; **Gaál, Eszter**; Lenykó-Thegze, Andrea et al.: Különböző ökológiai élőhelyekről származó *Aegilops biuncialis* vonalak genetikai diverzitásának vizsgálata. In: Karsai, Ildikó (szerk.) Növénynevelés a 21. század elején: kihívások és válaszok: XXV. Növénynevelési Tudományos Nap 2019. Budapest, Magyarország: Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Tudományos Bizottsága, (2019) pp. 338-341., 4 p.
3. **Eszter Gaál**, István Molnár, Gabriella Linc: Analysis of the diploid *Thinopyrum elongatum* using molecular markers. In: Abstract Book for the Plant Biology Europe Conference in Copenhagen, p. 311. 2018. 06. 18-06. 21. ISBN 978-87-996274-1-7
4. Lenykó-Thegze A, **Gaál E**, Molnár-Láng M, Linc G: Production of wheat/barley translocation lines In: Tamás László, Zelenyánszki Helga (szerk.) *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018"*: Abstract Book Budapest, Magyarország, 2018.03.28 -2018.03.29. Szeged: JATEPress Kiadó, 2018. p. 41.
5. **Gaál Eszter**, Lenykó-Thegze Andrea, Molnár István, Linc Gabriella: Évelő *Thinopyrum* (tarackbúza) fajok molekuláris vizsgálata In: *Karsai Ildikó, Polgár Zsolt (szerk.) XXIV. Növénynevelési Tudományos Nap: Összefoglalók.* 139 p. Budapest, Magyarország, 2018.03.06 Magyar Tudományos Akadémia, 2018. p. 83.
6. **Gaál E**, Molnár I, Linc G: A tarackbúzafajok taxonómiai háttere és vizsgálata molekuláris markerekkel In: *Veisz Ottó (szerk.) XXIII. Növénynevelési Tudományos Nap: összefoglalók.* 161 p. Budapest, Magyarország, 2017.03.07 Budapest: Magyar Tudományos Akadémia, 2017. p. 101.
7. **Gaál E**, Molnár-Láng M, Icsó D, Linc G: Molecular cytogenetic analysis of diploid *Thinopyrum* species with molecular markers In: *Albrechtova J, Santrucek J (szerk.) Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress: Abstracts.* Prague, Csehország, 2016.06.26 -2016.06.30. Paper ID 491
8. **Gaál E**, Molnár-Láng M, Icsó D, Linc G: Molecular cytogenetic analysis of diploid *Thinopyrum* species with molecular markers. In: *Gócza Elen, Kiss Erzsébet, Maráz Anna, Várallyay Éva (szerk.) Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2016"*: Program és összefoglalók. Gödöllő, Magyarország, 2016.03.21 -2016.03.22. p. 86.

9. **Gaál E**, Lángné Molnár M, Icsó D, Linc G: Évelő *Thinopyrum* fajok, mint a kenyérbúza harmadlagos génállományának FISH kariotipizálása *In: Veisz Ottó (szerk.) XXI. Növénynevelési Tudományos Napok: Összefoglalók.* 155 p. Martonvásár, Magyarország, 2015.03.11 -2015.03.12. Martonvásár: MTA ATK, 2015. p. 78.

Előadás:

1. **Gaál E**, Lángné Molnár M, Icsó D, Linc G: Évelő *Thinopyrum* (tarackbúza) fajok molekuláris vizsgálata. *In: Veisz Ottó, Polgár Zsolt (szerk.) XXII. Növénynevelési Tudományos Nap.* Budapest, Magyarország, 2016.03.10 Budapest: Magyar Tudományos Akadémia, 2016. p. 39.
2. **Gaál Eszter**, Icsó Diána, Lángné Molnár Márta, Linc Gabriella: Diploid *Thinopyrum* fajok molekuláris vizsgálata *In: Georgikon Napok.* Keszthely, Magyarország, 2016.09.29 -2016.09.30. p. 65.