



Szent István Egyetem

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

DOI: 10.54598/000400

Doktori (PhD) értekezés

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

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1. Célkitűzések.....	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1. A termesztett búza evolúciója és génforrásai	10
2.2. A kenyérbúza genetikai diverzitásának növelése idegenfajú keresztezések segítségével.	13
2.3. A tarackbúzafajok általános ismertetése és felhasználása a búzanemesítésben	16
2.3.1. Az <i>Agropyron cristatum</i> jellemzése	19
2.3.2. A <i>Thinopyrum elongatum</i> és a <i>Th. bessarabicum</i> jellemzése.....	21
2.3.3. A <i>Pseudoroegneria spicata</i> jellemzése	23
2.4. Idegen kromoszómák kimutatása és azonosítása	24
2.4.1. Molekuláris citogenetikai módszerek.....	24
2.4.2. Molekuláris markerek.....	32
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	37
3.1. Növényi anyag	37
3.2. Alkalmazott módszerek	41
3.2.1. Citológiai preparátum készítése	41
3.2.2. Növénynevelés és keresztezés fitotroni kamrákban.....	41
3.2.3. Növénynevelés évelőkertben	42
3.2.4. DNS izolálás	42
3.2.5. Próba jelölés	43
3.2.6. <i>In situ</i> hibridizáció.....	44
3.2.7. COS markerekkel végzett vizsgálatok.....	45
3.2.8. Szekvencia analízis.....	46
3.2.9. Mesterséges levélrozsda-fertőzés	47
3.2.10. Statisztikai elemzés.....	48
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	49
4.1. Kariotipizálási vizsgálatok.....	49
4.1.1. Az <i>Agropyron cristatum</i> kromoszómáinak azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel.....	49

4.1.2.	A <i>Pseudoroegneria spicata</i> kromoszómáinak azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel.....	51
4.1.3.	A <i>Thinopyrum bessarabicum</i> kromoszómáinak azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel.....	52
4.1.4.	A kariotipizálási vizsgálatok eredményeinek megvitatása	54
4.2.	COS markerekkel végzett vizsgálatok	59
4.2.1.	Tarackbúzfajok genetikai kapcsolatának vizsgálata molekuláris markerekkel.....	59
4.2.2.	Kromoszóma-specifikus markerek azonosítása a <i>Thinopyrum elongatum</i> (EE) vizsgálatán	61
4.2.3.	Szekvencia analízis.....	66
4.2.4.	A COS markerekkel végzett vizsgálatok eredményeinek megvitatása	70
4.3.	Fiatalkori levélrozsa-rezisztenciavizsgálat	73
4.3.1.	A fiatalkori levélrozsa-rezisztenciavizsgálatok eredményeinek megvitatása.....	74
4.4.	Új előnemesítési anyagok előállítása	74
4.4.1.	Új előnemesítési alapanyagok előállításával elért eredmények megvitatása.....	81
4.5.	Új tudományos eredmények	82
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	83
5.1.	Tarackbúzfajok kariotipizálása.....	83
5.2.	COS markerekkel végzett vizsgálatok	83
5.3.	Fiatalkori levélrozsa-rezisztenciavizsgálat	83
5.4.	Keresztezési vizsgálatok.....	84
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	85
6.1.	Summary.....	86
7.	MELLÉKLETEK	88
M1.	Irodalomjegyzék	88
M2.	8. táblázat A kariotipizálási munkák során felhasznált primerek neve, szekvenciái, olvadáspontjuk és a felszaporított termékek mérete.....	114
M3.	Az <i>in situ</i> hibridizációs vizsgálatokhoz alkalmazott törzs és munkaoldatok összetétele	115
M4.	9. táblázat A molekuláris markeres munkák során felhasznált primerek neve, szekvenciái és olvadáspontjuk	116
M5.	A COS markeres vizsgálatokhoz felhasznált CS- <i>Th. elongatum</i> diszómás és diteloszómás addíciós vonalak ellenőrzése molekuláris citogenetikai módszerekkel	121
M6.	A BLASTn keresőprogrammal végzett keresés eredményei.....	125
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	132

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- AFLP: (Amplified Fragment Length Polymorphism) amplifikált fragmenthossz polimorfizmus
bp: bázispár
- BLAST: (Basic Local Alignment Search Tool) szekvencia-összehasonlításra használható algoritmus
- CAPS: (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences): amplifikált termékek restrikciós hasításával nyert polimorfizmus
- CS: Chinese Spring hexaploid búzafajta
- CS*ph1b*: a Chinese Spring hexaploid búzafajta *ph1b* mutáns genotípusa
- COS: (Conserved Ortholog Set) konzervált ortológ gének gyűjteménye
- DA: (Disomic Addition) diszómás addíció
- DAPI: (4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole) 4',6'-diamidino-2-fenilindol
- DS: (Dextran Sulfate) dextranszulfát (25%-os)
- DtA: (Ditelosomic Addition) diteloszómás addíció
- EST: (Expressed Sequence Tags) expresszálódó szekvencia részlet
- FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció
- FITC: fluoreszcein-5-izotiocianát
- GISH: genomi *in situ* hibridizáció
- kbp: kilobázispár
- Lr*: levélrozsdá-rezisztenciagén
- MAS: (Marker Assisted Selection) marker alapú szelekció
- MvGB: Martonvásári Gabona Génbank
- NOR: (Nucleolus Organizer Region) nukleólusz-organizáló régió
- PCR: (Polymerase Chain Reaction) polimeráz láncreakció
- Pm*: lisztharmat-rezisztenciagén
- QTL: (Quantitative Trait Loci) mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lokuszok
- RAPD: (Randomly Amplified Polymorphic DNA) véletlenszerűen felszaporított DNS polimorfizmus
- RFLP: (Restriction Fragment Length Polymorphism) restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
- SDS: (Sodium Dodecil Sulfate) nátrium-dodecil-szulfát (10%-os)
- SF50: (Solution Formamide) formamid 50%-os oldata
- SNP: (Single Nucleotide Polymorphism) egyszerű nukleotid polimorfizmus
- Sr*: szárrozsdá-rezisztenciagén

SSC: (Saline-Sodium Citrate) trinátrium-citrát és nátrium-klorid oldat keveréke

SSR: (Simple Sequence Repeats) egyszerű szekvencia ismétlődés

TNB: (Tris-Na-Blocking buffer) trisz-NaCl blokkoló puffer

Tween: polioxietilén-szorbitán-monolaurát

Yr: sárgarozsda-rezisztenciagén

1. BEVEZETÉS

A kenyérbúza (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$; BBAADD) a világ egyik legfontosabb gabonanövénye, a rizs után a második legfontosabb élelmiszernövényünk (Giraldo et al., 2019). Termőterülete világszinten mintegy 220 millió hektár, melyről több, mint 700 millió tonna termést takarítanak be évente (FAOSTAT, 2020). Magyarországon közel 1,1 millió hektáron termesztik, és átlagosan évi 5 millió tonna termést aratnak le (KSH, 2018). Tápanyag szempontjából a napi fehérje-, és kalóriefogyasztásunk kb. 20%-át fedezi. 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). Míg az 1900-1960-as évek között ez a növekedés megoldható volt a termőterület növelésével, az 1960-as évektől a termésátlag növekedését kell fokoznunk, jobb termőképességű búzafajták előállításával (Pepó és Sárvári, 2011). A csökkenő fajlagos (egy főre eső) szántóterület mellett az egyre gyakoribb és erőteljesebb abiotikus és biotikus stresszek is nehezíthetik a termésmennyiség növekedésének fenntartását. Ennek megfelelően a búzanemesítés feladata olyan búzafajták előállítása, melyek nem csak a magasabb terméshozamot tudják biztosítani, de kiemelkedő abiotikus és biotikus stressz-toleranciával, és -rezisztenciával rendelkeznek. Az ellenálló képesség növelésének egyik lehetséges módja a rokon vad fajok genetikai potenciáljának felhasználása a nemesítési folyamat során. E rokon fajok számos agronómiailag hasznos tulajdonság esetében új alléleket, génváltozatokat hordozhatnak, melyek faj- és nemzetségkeresztezők révén átvihetők a termesztett 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 is (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 beépíteni a kenyérbúza genomjába, azonban a fajidegen génátvitel folyamata még hatékonyabbá tehető a tarackbúzafajok kromoszómáinak azonosítására alkalmas fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) kariotípusok kidolgozásával valamint a nagyobb populációk vizsgálatára is alkalmas kromoszóma specifikus molekuláris markerek előállításával.

Az idegenfajú keresztezésekkel történő génátvitel végső célja olyan introgressziós vonalak előállítása, melyek stabilan öröklődnek, és amelyek a vad fajtól azt a lehető legkisebb kromoszóma szegmentumot tartalmazzák, melyek az agronómiailag hasznos géneket hordozzák.

A keresztezési folyamat első lépésében egy F₁ hibrid növény keletkezik, amely egy példányban tartalmazza az összes anyai és apai kromoszómát. A meiózis során a nem homológ kromoszómák párosodása kis valószínűséggel következik be, ami az univalensek törését, vagy a kromoszómák egyenlőtlen megoszlását eredményezi a létrejövő ivarsejtekben, így az F₁ hibrid növények általában sterilek. Az F₁ hibridek kolhicin kezelésével a kromoszómaszámuk megduplázható, melynek révén amfiploid növény hozható létre, amelyben mindkét faj kromoszómái 2-2 kópiában van jelen, ami a fertilitás részleges helyreállítását eredményezi. Az amfiploidok fenntarthatók, a bennük lévő idegen genom agronómiai tulajdonságai jól vizsgálhatók, és felhasználhatók addíciós, szubsztitúciós vagy transzlokációs vonalak létrehozására (Belea, 1986). A keresztezési lépések során fontos az idegen kromatin kimutatása az egyes generációkban, amely molekuláris citogenetikai módszerekkel, ill. molekuláris genetikai markerek alkalmazásával valósítható meg. A genomi *in situ* hibridizáció (GISH) esetében a teljes szülői genomi DNS-t próbaként felhasználva vizuálisan kimutatható az idegen kromatin jelenléte az adott növényegyedben, míg a repetitív DNS próbákkal végzett fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) eredményeként az egyedi kromoszómákon specifikus hibridizációs mintázat jelenik meg, ami alkalmas lehet az idegen kromoszómák, illetve a transzlokációban résztvevő búza és idegen kromoszóma szegmentumok azonosításra. Molekuláris markerek alkalmazásával a búzanemesítés folyamata gyorsítható, mivel a citogenetikai módszerekhez képest nagyobb számú vonal vizsgálata kivitelezhető, másrészt a megfelelő kromoszóma-, kromoszómaszakasz specifikus markerek alkalmazásával az utódok szelekciója gyorsítható, egyszerűsíthető.

1.1. Célkitűzések

A tarackbúzafajok a búza harmadlagos génforrásaként számos agronómiailag előnyös tulajdonságot hordoznak, amelyek felhasználása a búzanemesítésben a kutatásaink távlati célja. Ennek érdekében a következő célokat tűztük ki:

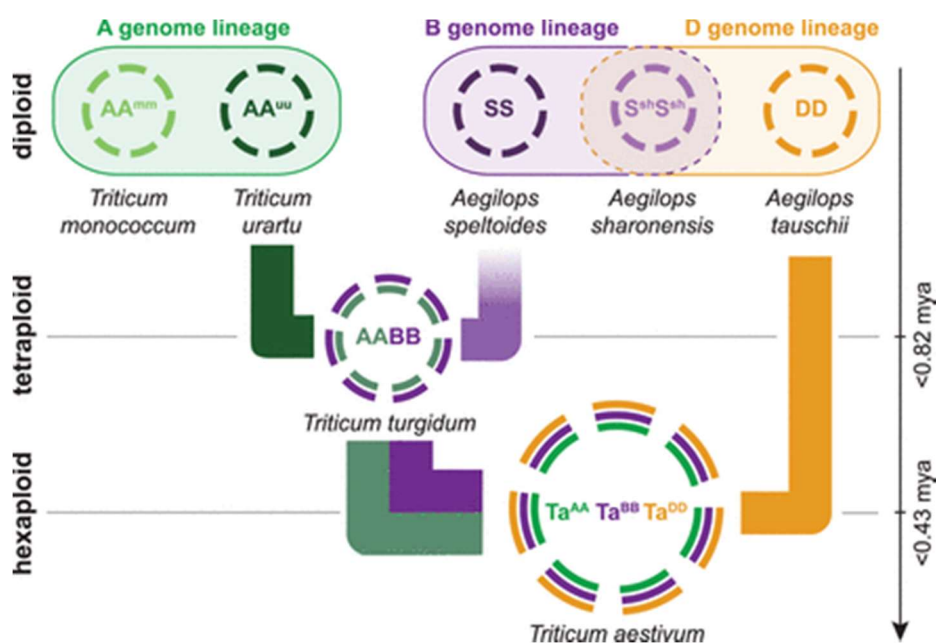
- Molekuláris citogenetikai módszerek optimalizálása a tarackbúzafajokra. A búza genomban történő azonosításhoz szükséges GISH, illetve a tarackbúza kromoszómák egyedi azonosításához szükséges FISH módszerek optimalizálása, megfelelő hibridizációs próbák azonosítása.
- Három diploid faj (*A. cristatum*, *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.
- A *Th. elongatum* egyedi kromoszómáinak kimutatására alkalmas molekuláris markerek azonosítása búza-*Th. elongatum* diszómás, illetve diteloszómás addíciós vonalak COS markerekkel történő vizsgálatával. E markerek használata nagymértékben elősegítheti a nemesítési alapanyagok vizsgálatát.
- A búza és a *Th. elongatum* kromoszómá közt fennálló homeológ kapcsolatok feltérképezése.
- Új agronómiailag hasznos tulajdonságokkal rendelkező búza-előnemesítési alapanyagok előállítás, amelyek az *A. cristatum* vagy a *Th. elongatum* tarackbúzafajok kromoszómáit, vagy kromoszóma szegmentumait hordozzák.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A termesztett búza evolúciója és génforrásai

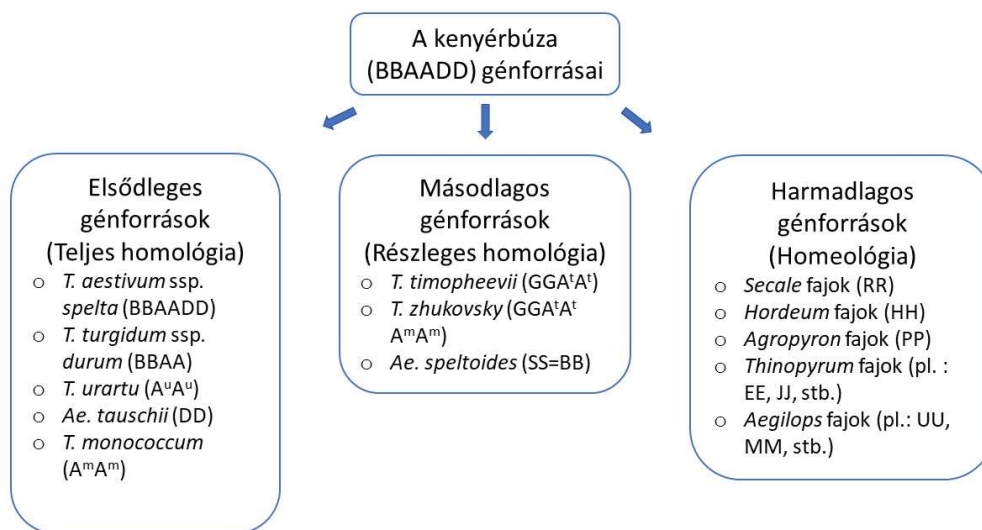
A *Triticeae* nemzetségcsoportba tartozó fajok alapkromoszóma-száma $n=x=7$ (Sakamura, 1918), amelyek ploidszintjük alapján lehetnek diploidok ($2n=2x=14$), tetraploidok ($2n=4x=28$), hexaploidok ($2n=6x=42$), oktaploidok ($2n=8x=56$), vagy akár dekaploidok ($2n=10x=70$). Az ebbe a nemzetségbe sorolható fajok 1-3 millió évvel ezelőtt egy közös ősből alakultak ki. A hexaploid búza (*Triticum aestivum* L.) három pár homeológ kromoszómaszerelvénye (BBAADD) a *Triticum* és az *Aegilops* nemzetség diploid fajai közti spontán hibridizáció eredménye (Kihara, 1924). A 'B' genom vad őse valószínűleg az *Aegilops speltoides* Tausch. ($2n=2x=14$, SS) lehetett, míg az 'A' genomé a vad, diploid *Triticum urartu* Tumanian ex Gandilyan ($2n=2x=14$, A^uA^u). Az így létrejött tetraploid vad tönke *T. turgidum* subsp. *dicoccoides* Körn. ex Asch & Graebn ($2n=4x=28$, BBA^uA^u), melynek domesztikált változata a későbbiekben egy újabb spontán hibridizációval az *Aegilops tauschii* Coss. ($2n=2x=14$, DD) fajjal kereszteződhetett, amelynek eredményeképpen alakult ki a hexaploid búza (1. ábra).



1. ábra A hexaploid búza kialakulása ((IWGSC), 2014)

A termesztett búza terméshozamának növelése érdekében kiemelkedő abiotikus és biotikus stresszrezisztenciával rendelkező búzafajtákat célszerű nemesíteni. A rokon vad fajok számos agronómiailag hasznos gént tartalmaznak, amelyeket faj-, és nemzetségkeresztezés révén lehet a búza genomjába átvinni. A génátvitel hatékonysága nagyban függ a két faj közötti genetikai

távolságtól. A búza rokon fajait genomösszetételük alapján elsődleges, másodlagos, illetve harmadlagos génforrások közé sorolhatjuk (2. ábra), (Friebe et al., 1996).



2. ábra A hexaploid búza génforrásainak csoportosítása, illetve néhány példa az adott csoportokra (Friebe et al., 1996)

Az elsődleges génforrások a búzával homológ genomot tartalmazó fajok, ide sorolandók a búza tájfajták, termesztett és vad alfajai (pl.: *T. aestivum* subsp. *spelta*, *T. turgidum* subsp. *durum*, *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*), illetve a búza A és D genomjának donorjai, a *T. urartu* és az *Ae. tauschii*. A hexaploid fajokkal történő keresztezés során fertilis utódok keletkeznek, a tetraploid és diploid fajokkal történő keresztezés során bizonyos esetekben szükséges a keresztezés utáni embriómentés F₁ hibrid előállítására céljából. A génátvitel a homológ kromoszómapárosodás során kialakuló rekombinációkon keresztül történhet. Az így létrejött utód genomja sorozatos visszakereszteзések és szelekciók által stabilizálható.

Sárgarozsdával szemben ellenálló tetraploid durumbúza és fogékony hexaploid búza keresztezése során sikerrel vitték át a 2B hosszú karjára térképezett, rezisztenciát okozó *Yr53* gént (Xu et al., 2013). A diploid génforrásokkal való keresztezés során szükség lehet különböző biotechnológiai módszerek alkalmazására, mint pl. az endospermium nem megfelelő fejlődése miatti embriómentésre és N6D vagy B5 táptalajon történő növény regenerációra (Dudits és Heszky, 2014).

Az *Ae. tauschii* (syn.: *Ae. squarrosa*, DD) és a *T. aestivum* D genomja teljes homológiát mutatnak egymással, mégis Gill és Raupp (1987) keresztezéseik során csak minimál táptalajra történő embriómentés alkalmazásával kaptak F₁ szemeket. A keresztezés irányát tekintve, amennyiben az *Ae. squarrosa* volt az anya, kb. 90%-os szemkötést tapasztaltak, ám nagyon magas

volt a későbbi abortálódás mértéke, ezért már 10-12 nappal a keresztezés után szükséges volt az embriómentés. Ha a *T. aestivum* volt az anya, alacsony volt ugyan a szemkötés, de kisebb volt az abortálódás mértéke, és elegendő volt a 20. napon elvégezni az embriómentést.

Innes és Kerber (1994) *Ae. tauschii* szár-, és levélrozsda- rezisztenciagének búzába történő átvitele során hasonlítottak össze három módszert. A közvetlen keresztezést a hexaploid búzával jóval idő-, és munkaigényesebbnek tapasztalták - és szükséges volt az embriómentés -, szemben a szintetikus búza, illetve a közvetett szintetikus búza előállításával.

A másodlagos génforrások közé azok a fajok tartoznak, amelyeknek legalább egy genomja homológ a búzáéval (2. ábra). Ide tartoznak egyes poliploid *Triticum* fajok, amelyek A genomot, vagy a B genommal közel homológ genomot tartalmaznak, mint pl. *T. timopheevii* (GGA^tA^t), és a *T. zhukovsky* (GGA^tA^tA^mA^m). Ezenkívül ebbe a csoportba tartoznak a hexaploid búza B genomjával hasonlóságot mutató, S genommal rendelkező *Aegilops* fajok (pl. *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. longissima*). E fajok esetében a génátvitel homológ rekombinációval mehet végbe, amennyiben a célgén homológ kromoszómán helyezkedik el. Interspecifikus keresztezések után az endospermium nem megfelelő kialakulása miatt szükség lehet embriómentésre. Farshadfar et al. (1994) *T. timopheevii*, illetve *T. araraticum* hexaploid búzával történő keresztezések során összehasonlították a sikeres szemképződést embriómentéssel és embriómentés nélküli esetekben. Az embriómentéssel több szemet kaptak, de a különbség nem volt szignifikáns.

Számos rezisztenciagént sikeresen vittek át búzába a *T. timopheevii* (pl. *Sr36*, *Pm6*, *Lr18*), illetve az *Ae. speltoides* (pl. *Lr28*, *Sr32*, *Pm12*) fajokból (Friebe et al., 1996). Meiózisban végzett kromoszómapárosodások vizsgálata során kiderült, hogy a búza A genomja a *T. timopheevii* A^t genomjával kb. 70%-os, míg a búza B genomja a *T. timopheevii* G genomjával kb. 30%-os arányban képez bivalenseket (Feldman, 1966a). Másodlagos génforrásokkal való keresztezésekben gyakran tapasztalható, hogy a sikeresen fejlődött F₁ szemekből származó hibridek általában hímsterilek. A fertilitás visszaállítása történhet az F₁ hibridekből kolhicinkezeléssel amphiploid növényeket létrehozva, vagy az F₁ utódok szülői búzavonallal történő visszakeresztezésével. A másodlagos génforrást a *ph1b* mutáns búzavonallal keresztezve magasabb számú bivalens képződés tapasztalható, és nagyobb arányban lesznek az utódok fertilisek (Bai et al., 1998; Brwon-Guedira et al., 2006).

A harmadlagos génforrások közé a búzával homeológ genomot tartalmazó, távolabbi rokonságban álló fajok tartoznak, mint pl. különböző *Agropyron*, *Secale*, *Hordeum* és *Aegilops* fajok (2. ábra). Ezekkel a fajokkal történő génátvitel csak speciális technikák (pl.: ionizáló sugárzás, kémiai mutagének, szövettenyésztés) alkalmazásával lehetséges. A létrehozott embriók mesterséges felnevelésére szinte minden esetben szükség van, mivel a hibrid szemekben általában

nem fejlődik táplálószövet, azaz endospermium. A nagy valószínűséggel steril hibridnövények fertilitásának helyreállításához sok esetben szükség lehet a növények kolhicinkezelésére. A termesztett búza harmadlagos génforrásai közé tartozó fajok számos rezisztenciagént hordozhatnak, így a búzanemesítésbe történő bevonásuk és sikeres felhasználásuk egyre nagyobb szerepet kap (Jiang et al., 1994).

2.2. A kenyérbúza genetikai diverzitásának növelése idegenfajú keresztezések segítségével

A kenyérbúza rokon fajai számos hasznos gént tartalmaznak, amelyek a búzanemesítés számára fontosak lehetnek. E kedvező tulajdonságokért felelős gének átvitele a búza genomjába idegenfajú keresztezések révén faj- és nemzetséghibridek létrehozásával történhet. Az idegenfajú génátvitel első lépése a búza és egy idegen faj keresztezéséből keletkező F₁ hibrid. A búzával rokon fajok nagy része keresztezhető ivaros úton a búzával, az F₁ hibrid előállításának sikeressége a keresztezéshez használt búza genotípusától nagymértékben függ (Belea, 1986). Az első ilyen céllal végzett keresztezéseket búza-*Agropyron* és búza-rozs között Wilson hajtotta végre 1876-ban (Molnár-Láng, 2006). A búza-rozs közötti keresztezések egyik nagy eredménye a tritikálé, amely az egyik első szintetikus növényfaj, melyet Magyarországon is már több mint 100000 hektáron termesztenek (Kiss, 1968).

Szintén a rozssal végzett keresztezésekből származik az 1RS.1BL búza-rozs transzlokáció, mely több rezisztenciagént is hordoz (*Sr31*, *Lr26*, *Yr9*, *Pm8*), és kimutatható a világ több száz búzafajtájában (Bedő et al., 1993; Kőszegi et al., 2000; Purnhauser et al., 2011). A búza-*Agropyron* keresztezések egyik kiemelkedő eredménye az *Lr19* levélrozsdá-rezisztenciagén átvitele az *Agropyron elongatum*ból ($2n=10x=70$, mai nevén *Th. ponticum*) a búzába (Friebe et al., 1996; Molnár-Láng, 2006). Az idegenfajú keresztezések során a cél az idegen kromoszóma lehető legkisebb, már csak a hasznos tulajdonságért felelős kromoszómaszakasz átvitele a búzába. Ennek érdekében leggyakrabban a szülői fajok hagyományos keresztezése után amfiploidot állítanak elő, amelyből addíciós, szubsztitúciós illetve transzlokációs vonalakat válogathatnak ki. E folyamat minél hatékonyabbá tételéhez szükséges a vad fajok genomjának részletes ismerete (Jiang et al., 1994).

A fajok közötti keresztezhetőséget a környezeti tényezők (páratartalom, hőmérséklet, megvilágítás) és a fajok genotípusa is nagyban befolyásolja (Belea, 1986). A környezeti tényezők klímakamrák használatával jól szabályozhatók. A partnerek keresztezhetősége nagy genetikai változatosságot mutat, búzában legalább négy keresztezhetőségért felelős gént (*Kr* gének) azonosítottak (Farshadfar et al., 1994). Legnagyobb hatása az 5B kromoszóma hosszú karjára

térképezett *Kr1* génnek van, melynek domináns allélja csökkenti a keresztezhetőséget (Riley és Chapman, 1967). A Chinese Spring fajtában azonosított *kr1* recesszív gént sikeresen átvitték az Mv9 martonvásári őszibúza-fajtába, így létrehozva az Mv9kr1 búzavonalat, mely agronómiai tulajdonságait tekintve a búzanemesítés szempontjából előnyösebb genotípus (Molnár-Láng et al., 1996).

Az F₁ hibridek meiózisa során az anyai és apai eredetű kromoszómák nem párosodnak, univalensként jelennek meg, így az F₁ hibridek általában sterilek lesznek, a fertilitás visszaállítására a leggyakrabban alkalmazott módszer a kolhicinkezelés (Belea, 1986). A kolhicin az őszi kikericsből izolált alkaloid vegyület, amely a tubulin monomerekhez kapcsolódva gátolja a magorsók és mikrotubulusok kialakulását (Blakeslee és Avery, 1937). A kolhicin hatására a mitózis metafázisában leáll a sejtosztódás, így a növények kromoszómaszáma megkettőzhető, aminek hatására a meiózisban a homológ kromoszómák képesek bivalenseket alkotni és fertilisek lesznek. Az így kapott ún. amfiploidok agronómiai értéke alacsony, azonban génátviteli munkákban és szintetikus hexaploid búzafajták előállításában rendkívül hasznosak (Mujeeb-Kazi és Rajaram, 2002).

A búza allohexaploid jellege miatt jól tűri a kromoszóma szerkezeti változásokat, így az idegen kromoszómák sikeresen átvihetők a genomjába. Az amfiploidok búzával történő sorozatos visszakeresztezése során az idegen kromoszómák eliminálódnak és néhány generáció után kiválogathatóak a csak egy idegen kromoszómát tartalmazó monoszómás addíciós vonalak, amelyek öntermékenyítésével stabil diszómás addíciós vonalak állíthatók elő. Ezzel a módszerrel az összes idegen kromoszómát képviselő addíciós sorozatot elő lehet állítani (O'mara, 1940). Az addíciós vonalak segítségével egyrészt hasznos gének is bevihetők a búza genomjába, másrészt a bevitt idegen kromoszóma hatása részletesen tanulmányozható, a génjeinek kifejeződése jól vizsgálható (Dvorak és Sosulski, 1974; Molnár et al., 2007). Martonvásáron számos addíciós vonalat állítottak elő búza háttérben pl. *Aegilops* (Schneider et al., 2005), rozs (Molnár-Láng, 2006) és árpa (Linc és Molnár-Láng, 2003) kromoszómák beépítésével.

A búza-idegenfajú szubsztitúciós vonalak esetében a búza kromoszómái közül egy (monoszómás) vagy egy pár (diszómás) idegen fajból származó kromoszómával van helyettesítve. Előállításuk egy monoszómás búza és egy diszómás addíciós vonal keresztezésével, majd az utódok szelekciójával történik. A szubsztitúciós vonalaknak euploid (2n=42) kromoszómaszámuk van, így genetikailag általában stabilak, fenntartásuk és nagyléptékű felszaporításuk is könnyebben megvalósítható, mint az addíciós vonalak esetében. A szubsztitúciós vonalak segítségével jól vizsgálhatóak az idegen és a búza kromoszómák közötti homeológiai viszonyok (Islam és Shepherd, 1992). Az idegen kromoszóma hatása mind az addíciós, mind a szubsztitúciós

vonalakban jól vizsgálható különböző agronómiai és fenotípusos paraméterekben (Dvorak és Sosulski, 1974; Molnár et al., 2007). Az addíciós és szubsztitúciós vonalak ezenkívül felhasználhatók a hasznos gének kromoszómális térképezésére (Jones et al., 1991), illetve célzott génátvitelre, transzlokációs vonalak előállítására (Molnár-Láng, 2006; Sutka, 2004). Az addíciós és szubsztitúciós vonalak előnemesítési növényanyagnak számítanak, melyek felhasználásával állítanak elő transzlokációs vonalakat, amit később a nemesítés is tud alkalmazni.

A transzlokációs vonalak előállításának módszerei közül a homeológ párosodás, illetve a random kromoszómatorések indukálása a leggyakrabban alkalmazott módszer (Gale és Miller, 1987; Sears, 1972). A homeológ kromoszómák közötti rekombináció eredményeként kompenzáló transzlokációk jöhetnek létre, hiszen az idegen kromoszómaszegmentum kompenzálni tudja a kieső búzakromoszómát, mivel a homeológ kromoszómák génsorrendje általában hasonló. A búza A, B és D kromoszómák között egy genetikai rendszer hatására mégsem jöhet létre homeológ párosodás, a búza esetén a meiózis diploidszerű (amfidiploid) marad. E rendszerben a legnagyobb hatása az 5B kromoszóma hosszú karjára térképezett *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*) lókusznak van, ez gátolja a legerősebben a homeológ párosodást (Riley és Chapman, 1958). Ezenkívül térképeztek egy közepes erősségű szupresszor hatású lókuszt, a *Ph2*-t a 3D kromoszóma rövid karjára (Mello-Sampayo, 1971), illetve több kisebb hatású lókuszt a 3A és a 4D kromoszómára is (Sears, 1976). A *Ph1* gén hiányában nagyobb mértékű búza-rozs kromoszómárpárosodást tapasztaltak, mint a *Ph2* hiányában (Benavente et al., 1998). A *Ph* rendszer gátlása elősegítheti az idegenfajú transzlokációk létrehozását. A homeológ párosodás indukálása érdekében az idegenfajú keresztezések esetén egyrészt használhatók *ph1b* mutáns vonalak (Wall et al., 1971), illetve 5B kromoszómára nulliszóm vagy monoszóm vonalak (Feldman, 1966b).

A deléciós mutánsok alkalmazása, amelyek csak a *Ph1* lókuszt nem tartalmazzák általában előnyösebbek, mint az 5B nulliszómás vonalak. A legelterjedtebb ilyen mutáns búzavonal a *CSph1b* mutáns (Sears, 1977). Kibirige-Sebunya és Knott (1983) szárrozsdá-rezisztencia átvitele során összehasonlították a *ph1b* mutáns vonal és 5B nulliszóm vonal hatását *Agropyron elongatum*mal történő keresztezésben. A kromoszómák párosodását tekintve hasonló eredményeket kaptak, azonban a *ph1b* mutáns vonallal történő keresztezések esetében kisebb mértékű sterilitást tapasztaltak. Egyes fajok pl. *Ae. speltooides* esetében a *Ph* gének jelenléte mellett is sikeres lehet a homeológ párosodás a búza és az idegen kromoszómák között (Chen et al., 1994; King et al., 2017), mert ezek a fajok a búza *Ph* génjeivel episztatikus ún. *Ph^I* (*Ph inhibitor*) géneket hordoznak.

A homeológ transzlokációk kompenzáló tulajdonságával szemben a mesterségesen indukált kromoszómatorések (sugárzás, kémiai mutagén, szövettenyésztés) random jönnek létre a

genomban, ezért nem kompenzáló típusúak. Nagy előnyük azonban, hogy kis kromoszómaszakaszok is átvihetők a búzába, kromoszómán belüli (intersticiális) transzlokációk is létrehozhatók, és a transzlokációk létrejöttét nem befolyásolja a búza és az idegen faj kromoszómái közötti párosodási gyakoriság (Molnár-Láng, 2006; Sears, 1956). A random kromoszómatörések során a nem kompenzáló típusú transzlokációk sok esetben életképtelen szemeket eredményeznek (Wulff és Moscou, 2014). Sugárzással sikerült azonban többek között az *Sr26* szárrozda és az *Lr19* levélrozda génjét is átvinni *Agropyron elongatum*-ból a búza genomjába (Friebe et al., 1994; Knott, 1987; Sharma és Knott, 1966).

A random kromoszómatörés egy speciális esete az ún. gametocid kromoszómákkal történő keresztezés. Endo (1990) *Aegilops* fajokkal történő keresztezések során tapasztalta bizonyos *Aegilops* kromoszómák mutagenizáló hatását. Ezeket a kromoszómákat tartalmazó gaméták az interspecifikus keresztezések során nagyobb valószínűséggel jutnak át a következő generációkba, mint a többi. Az ilyen kromoszómák ún. gametocid (Gc) gén(ek)e)t hordoznak, amelyeket több *Aegilops* fajban is azonosítottak már (Endo, 1990, 2007), illetve egyes *Agropyron* fajok is tartalmazhatnak (Kibirige-Sebunya és Knott, 1983). A Gc gének a gametogenezis során mutációt, kromoszómatöréseket okoznak azokban a gamétákban, amelyek nem tartalmazzák a Gc géneket. A Gc gének közül az *Aegilops cylindrica* 2C és 3C gametocid kromoszómáját széles körben használják transzlokációk előállítására, pl. búza-árpa (Endo és Gill, 1996; Shi és Endo, 1999), valamint búza-rozs (Friebe et al., 2000) között.

A transzlokációs vonalak előállítása történhet addíciós vonalaktól indukált kromoszómatöréssel vagy szubsztitúciós vonalaktól hagyományos keresztezéssel homeológ rekombinációval. Mindkét folyamat akár évtizedekig is eltarthat (Hoffmann, 2011), ezzel szemben bizonyos módszerekkel rövidíthető ez a folyamat. King et al. (2017) a *Ph1* gént szupresszázó *Amblyopyrum muticum* (*Ae. mutica*) növényt használták keresztezéseik során. Az *Am. muticum* búzával történő keresztezése eredményeként kapott F₁ hibridet búzával visszakeresztezve már a BC₁ generációban tudtak azonosítani rekombinációkat. Nagyszámú keresztezés és nagy átteresztőképességű SNP array módszerrel vizsgálva a BC₃ generációig összesen 218 introgressziót azonosítottak.

2.3. A tarackbúzafajok általános ismertetése és felhasználása a búzanemesítésben

A tarackbúzafajok a termesztett búza harmadlagos génforrásai közé tartoznak (2. ábra), morfológiailag és genetikailag is nagyon változatosak, több mint kétszáz fajt sorolhatunk ebbe a csoportba. A fajok nagy része Eurázsia területén őshonos, de megtalálhatóak Észak-Amerikában is, néhány faj elterjedt Dél-Amerikában, Új-Zélandon, Ausztráliában és Afrikában is (Wang,

2011). Agronómiailag igen hasznos növények, számos abiotikus és biotikus stresszel szemben ellenálló. Hideg-, só- és szárazságtűrésük kiemelkedő (Colmer et al., 2006; Fedak, 1985; Omielan et al., 1991; Schulz-Schaeffer és Haller, 1987), ellenálló a sárga-, levél-, és szárrozsdaival, illetve több vírussal (pl.: kalászfuzárium, búza csíkos mozaik vírus, árpa sárga törpeség vírus) szemben is (Fedak, és Han, 2005; Friebe et al., 1996; Jiang, et al., 1993). Takarmánynövénynek is gyakran felhasználják, illetve évelő életformájuk miatt talajfogó, vízvásztó növényeknek is alkalmasak (Wang, 2011).

A tarackbúzafajok taxonómiai rendszerezése és felosztása a mai napig nem egységes. Ennek egyik lehetséges oka a molekuláris biológia folyamatos fejlődése és különböző módszereinek alkalmazása, amelyekkel sokkal pontosabban vizsgálhatók az egyes fajok között fennálló genetikai kapcsolatok. Ez korábban pusztán csak morfológiai vizsgálatok alapján történt. Az első megjelent rendszertani besorolások alapján minden évelő fűféle, amelynek minden virágzatán nóduszonként 1 kalászka található, az *Agropyron* genust alkotta, azonban ez egy meglehetősen nagy és polimorf csoportot alkotott (Gaertner, 1770). Bentham (1881) osztotta fel elsőnek az *Agropyron* genust morfológiai vizsgálatok alapján két nagyobb csoportra, majd Nevski (1933) citológiai vizsgálatok alapján a genust 4 alcsoportra tagolta: *Agropyron*, *Roegneria*, *Antosachne* és *Eremopyrum*. Az *Agropyron* genuson belül két alcsoportot különböztetett meg: a nagyobb *Elytrigia* és a kisebb *Eu-Agropyrum* csoportokat (Schulz-Schaeffer és Jurasits, 1962).

Dewey (1984) javaslatára, az egyes fajok közötti genetikai viszonyok, illetve a fajok morfológiai tulajdonságai alapján már csak szigorúan a P genomot tartalmazó „taréjos búzafű” - fajok tartoznak az *Agropyron* genusba. A korábban *Agropyron spicatum* (Pursch) Schribner & Smith elnevezésű, és az ehhez hasonló fajok (bluebunch vagyis „kékcsumós” tarackbúzá), amelyek St genomot tartalmaznak, a *Pseudoroegneria* genusba sorolták. A magas és közepes tarackbúzafajok a *Thinopyrum* genust alkotják. Ezek a fajok J, E, illetve egyes esetekben St genomot tartalmaznak. A „karcsú tarackbúzá”, korábban *A. trachycaulum* (Link) Malte ex. H.F. Lewis, és rokonai, más vad rozsokkal együtt az *Elymus* genust alkotják, amely főleg St genomot és egy-két H, Y, W vagy P genomot tartalmaznak. A tarackbúzafajok genomjai között több alloplodizáció ment végbe, melynek következtében újabb fajok alakultak ki. A *Th. intermedium* allohexaploid faj egy nagyon jó példa erre, amely a *Ps. spicata* ($2n=2x=14$, StSt), és egy J^r és J^{vs} genomból álló szegmentális tetraploid hibridizációjával alakult ki. A J^r illetve a J^{vs} genomok a mai *Th. bessarabicum* J^b , és a *Th. elongatum* J^c genomok egy módosult változatának tekinthetők. A J^{vs} a *Dasypyrum villosum* V genomjának egy repetitív szekvenciáját, míg a J^r egy hosszú terminális ismétlődő (LTR) szekvenciát tartalmaz a *Secale cereale* R genomjából (Cseh et al., 2019).

A folyamatosan változó rendszertani besorolás következtében a legtöbb faj több szinonim névvel is rendelkezik, megnehezítve ezzel a fajokkal végzett keresztezési munkákat. Az 1. táblázatban összefoglalva láthatók a nemesítési programokban gyakrabban alkalmazott tarackbúzafajok szinonim elnevezései, kromoszómaszámuk, valamint haploid genomjelölésük. E fajok felhasználásával (*kivétel *Ps. spicata*) már korábban sikerrel hajtottak végre keresztezéseket a termesztett búzával (Jiang et al., 1994; Wang, 2011).

1. táblázat Fontosabb tarackbúzafajok, azok szinonim nevei, kromoszómaszámuk és haploid genomjelölésük

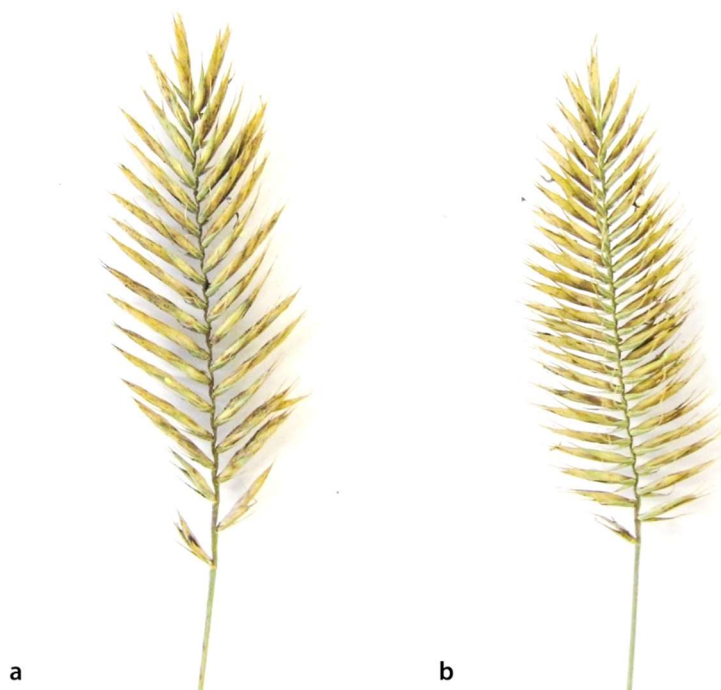
Fajnév (Wang, 2011)	Szinonim név	2n	Genom
<i>Agropyron cristatum</i> (L.) Gaertn.	<i>Bromus cristatus</i> L., <i>Triticum pumilum</i> L.	14	P
<i>Agropyron desertorum</i> (Fischer ex Link) Schultes	<i>Triticum desertorum</i> Fischer ex Link	28	PP
<i>Dasyphyrum villosum</i> (L.) Candargy	<i>Agropyron villosum</i> (L.) Link, <i>Haynaldia villosa</i> (L.) Schur	14	V
<i>Elymus caninus</i> (L.) L.	<i>Agropyron caninum</i> (L.) P. Beauv	28	StH
<i>Elymus tsukushiensis</i> Honda	<i>Agropyron tsukushiensis</i> (Honda) Ohwi	42	StHY
<i>Leymus racemosus</i> (Lam.) Tzvelev	<i>Elymus giganteus</i> Vahl	28	NsXm
<i>Pseudoroegneria geniculata</i> (Trin.) A. Löve	<i>Agropyron geniculatum</i> (Trin.) C. Koch	28	StSt
<i>Pseudoroegneria spicata</i> (Pursh) A. Löve*	<i>Agropyron spicatum</i> (Pursh) Scribner & Smith; <i>A. divergens</i> (nees) Vasey	14	St
<i>Pseudoregneria stipifolia</i> (Czern. Ex Nevski) A. Löve	<i>Agropyron stipifolium</i> Czern. Ex Nevski	14	St
<i>Thinopyrum bessarabicum</i> (Savul. & Rayss) A. Löve	<i>Agropyron bessarabicum</i> Savul. & Rayss	14	J (=E ^b =J ^b)
<i>Thinopyrum elongatum</i> (Host) D.R. Dewey	<i>Agropyron elongatum</i> (Host) P. Beauv; <i>Triticum elongatum</i> Host; <i>Lophopyrum elongatum</i> (Host) A. Löve	14	E (=E ^c =J ^c)
<i>Thinopyrum intermedium</i> (Host) Barkworth & D.R. Dewey	<i>Agropyron intermedium</i> (Host) P. Beauv.; <i>Elytrigia intermedia</i> (Host) Nevski	42	EE St St, StJ ^J vs
<i>Thinopyrum junceiforme</i> (A. Löve & D. Löve) A. Löve	<i>Agropyron junceum</i> Simonet & Guinochet	28	JE (=E ^b E ^c)
<i>Thinopyrum junceum</i> (L.) A. Löve	<i>Agropyron junceum</i> (L.) P. Beauv.	42	JJE (=E ^b E ^b E ^c)
<i>Thinopyrum ponticum</i> (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey	<i>Agropyron elongatum</i> (Host) P. Beauv; <i>Elytrigia pontica</i> (Podp.) Holub; <i>Lophopyrum ponticum</i> (Podp.) A. Löve	70	EEEE St St, JJJ St J St EEEE St E St E ^b E ^c E ^x StSt

Búzával történő keresztezéssel előállítottak többek között a teljes *Th. elongatum* (Dvorak és Knott, 1974; Dvorak és Sosulski, 1974) és *Th. intermedium* (Sharma, et al., 1999) addíciós és szubsztitúciós vonal sorozatot, valamint az *A. cristatum* (Chen, et al., 1992) és *Th. bessarabicum* (Mujeeb-Kazi, 1995) addíciós vonalakat. Kémiai mutagének, röntgensugárzás, indukált homeológ párosodás alkalmazásával több transzlokációs vonalat is sikerrel hoztak létre, melyek a tarackbúzák egy-egy agronómiailag hasznos génjét hordozták, mint pl. a *Th. elongatum Lr19*,

Sr25, Lr24, Sr24, Sr26, Cmc2, WSMVR génjei, vagy a *Th. intermedium Lr38, Sr44, BYDVR* génjei (Friebe et al., 1996).

2.3.1. Az *Agropyron cristatum* jellemzése

Az *A. cristatum* (L.) Gaertn. vagy taréjos tarackbúza (taréjos búzafű) szárazságtűrő, és sűrű gyökérszettel rendelkező évelő fűféle. E tulajdonságai miatt elsősorban takarmány-, és talajmegkötő növényként használják, ám az utóbbi évtizedekben a búzanemesítők is felfigyeltek rá. P genomot tartalmaz, diploid ($2n = 2x = 14$, PP), tetraploid ($2n = 4x = 28$, PPPP) és hexaploid ($2n = 6x = 42$) változata ismert, melyek közül a tetraploid előfordulása a leggyakoribb. Elterjedését tekintve Közép-Európában, Közel-Keleten, Közép-Ázsiában, Szibériában és Kínában is megtalálható. A legritkábban előforduló hexaploid *A. cristatum* faj elsősorban Törökországban és Iránban található meg (Dewey és Asay, 1975).



3. ábra Az *Agropyron cristatum* a) MvGB 1521 és b) MvGB 1509 vonalainak kalászfotói (Fotó: Gaál Eszter, 2019)

A növény magassága 30-90 cm, a kalász 3-10 cm hosszú, a szálkás kalászkák laposan, tömören helyezkednek el (3. ábra). A növénynek több hajtása, több kalászkája és több virága van, mint a búzának. E tulajdonságai mellett kedvező abiotikus, illetve biotikus stresszrezisztenciával rendelkezik, ezért keresztezésekhez gyakran használják a búzanemesítésben. Kiemelkedő a szárazság-, és hidegtűrésük (Asay és Johnson, 1990; Limin és Fowler, 1987), rossz minőségű talajon is megélnek (Dewey, 1984), ezenkívül ellenállnak a lisztharmanak, sárgatorpeség mozaik

vírusnak (YDMV), levél-, és sárgarozsdának (Ochoa et al., 2015; Sharma et al., 1984; Zhang et al., 2017).

Li et al., (1998; 1995) keresztezéssel és embriómentéssel előállították a Fukuhokomugi hexaploid búza és a Z559 elnevezésű tetraploid *A. cristatum* hibrid vonalait. E vonalakat számos öntermékenyítéssel és visszakeresztezéssel többféle addíciós vonalként stabilizálták, melyeken később több vizsgálatot is végeztek. Az utódok közül Wu et al. (2006) 15 vonalat szelektáltak ki, amelyek kiemelkedő kalászká-, virág-, és szemszámmal rendelkeztek. Az utódok GISH, FISH és mikroszatellit vizsgálata alapján megállapították, hogy a hasznos tulajdonságok génjeit egy vagy két, a 6D kromoszómával homológ, feltételezhetően 6P kromoszóma hordozza. További vizsgálatokkal deléciós és transzlokációs vonalak létrehozásával a megnövekedett szemszámért – amely kalásonként akár 10 szemet is jelenthet- felelős gént, a 6P rövid karjára térképezték (Zhang et al., 2019).

Li et al. (2016) diszómás addíciós vonalakon végzett lisztharmat-rezisztencia vizsgálataik során megállapították, hogy az *A. cristatum* 2P kromoszóma jelenlétében az utódok rezisztenssé válnak a lisztharmatra. STS markeres vizsgálatokkal a rezisztenciáért felelős gént a 2P hosszú karjára térképezték (Li et al., 2017). Az említett diszómás addíciós vonalak, illetve ⁶⁰Co- γ sugárzással létrehozott transzlokációs vonalak vizsgálatával szintén a 2P kromoszóma hosszú karjára térképezték a levélrozda rezisztenciáért felelős gént vagy géneket, melyek hatására a növények széles spektrumú és hosszú távú, felnőttkorban is érvényesülő immunitást szereztek a levélrozdával szemben (Jiang et al., 2018). Levélrozda-rezisztenciagéneket a 6P rövid karjára is térképeztek deléciós vonalak vizsgálatával (Song et al., 2016). E gének elsősorban az ún. felnőttkori rezisztenciáért (APR, adult plant resistance) felelősek, azaz általában nem rassz specifikus és tartósabb rezisztenciát nyújt, mint a csíranövénykorban érvényesülő rassz specifikus rezisztencia. Pan et al., (2017) egy kétéves periódusban vizsgáltak búza- *A. cristatum* 1P addíciós és szubsztitúciós vonalakat számos agronómiai tulajdonság szempontjából. Ennek során azt tapasztalták, hogy az 1P hatására a növények szignifikánsan alacsonyabbak voltak és kevesebb kalászkájuk volt, azonban az átlag kalászhozuk szignifikánsan nagyobb volt, illetve több hajtást is hoztak. A 7P addíciós vonalak vizsgálata során magasabb ezerszemtömeget, megnövekedett szárazságtűrést, és kisebb zászlóslevél méretet mértek a kontroll búza vonalhoz képest (Lu et al., 2016). Copete és Cabrera (2017) diszómás addíciós vonalak vizsgálata során a 2P és a 6P addíciós vonal esetében is rezisztenciát tapasztaltak a lisztharmattal szemben, mindkét kromoszóma esetén a hosszú karra térképezték a rezisztenciáért felelős gént.

2.3.2. A *Thinopyrum elongatum* és a *Th. bessarabicum* jellemzése



4. ábra A *Th. bessarabicum* a) MvGB 1706, b) MvGB 1705, c) MvGB 1703 és a *Th. elongatum* d) MvGB 1965 vonalainak kalászfotói (Fotó: Gaál Eszter, 2019)

A *Th. elongatum* (Host) D. R. Dewey (*Agropyron elongatum*, *Elytrigia elongata*, *Lophopyrum elongatum*), vagy magas búzafű, illetve a *Th. bessarabicum* (Savul. & Rayss) A. Love (4. ábra) az *A. cristatum*-hoz hasonlóan évelő, elsősorban szalma-, és takarmánynövényként, illetve talajfogó növényként használt fűfélék. Ezenkívül a cellulóz alapú bioetanol gyártásban is felhasználják (Blunk et al., 2005). Magasságuk 1-3 m között változik, kékeszöld leveleik 2-8 mm szélesek, melyek gyakran enyhén szőrözöttek. Kalászaik akár a 40 cm-t is elérhetik, 10-25 mm-es szálkátlan kalászkáik 5-18 virágot tartalmaznak. Eredetileg Törökországból és Kis-Ázsiából származnak, majd elterjedtek az Egyesült Államok, Kanada és Európa területén is. A két faj olyannyira hasonló, hogy sokáig egy növényként is tekintettek rá, és nem volt egyetértés a két fajt illetően (Jauhar, 1990).

Genomösszetételét tekintve a *Th. elongatum* E (=E^c = J^c) genomot tartalmaz, mely nagyon hasonló a *Th. bessarabicum* J (=E^b = J^b) genomjához. Számos betegséggel szemben ellenállóak, mint a kalászfuzárium, cefalospóriumos levélfoltosság, levélrozsa, illetve kimagasló a sótűrésiük is, ezek miatt gyakran használt búzanemesítési alapanyagok (Fu et al., 2012; Jauhar et al., 2009; Knott, 1989; Mujeeb-Kazi, 1995; Zheng et al., 2014). A *Th. bessarabicum* kifejezetten ismert nagy sótűrési képességeiről (King et al., 1997). Búzával képzett amfiploidján, majd addíciós vonalain végzett vizsgálatok alapján e tulajdonságot elsősorban az 5J kromoszómahoz kötötték, illetve kismértékben a 2J kromoszóma is növeli a sótűrési képességet (Forster et al., 1987, 1988). Az addíciós, illetve szubsztitúciós vonalak kismértékű fertilitása és magas genetikai instabilitása miatt nem alkalmasak közvetlenül mezőgazdasági termesztésre, így a cél olyan vonalak előállítása, amelyek a lehető legkisebb idegen kromoszómaszakaszt hordozzák (King et al., 1993).

Számos transzlokációs vonalat hoztak létre búza *Th. bessarabicum* amfiploid visszakeresztezésével *Ph1* lókuszt nem tartalmazó *CSph1b* mutáns vonallal és jellemezték őket citológiai (Patokar et al., 2015). Grewal et al. (2018) *Th. bessarabicum* és *ph1* mutáns durumbúza keresztezéséből származó utódok kolhicinkezelésével, majd azt követően *Ph1* mutáns fajtaival történő visszakeresztezéssel állítottak elő több transzlokációs vonalat is. A *Th. bessarabicum* 2-es kromoszómájának egy kisebb részét tartalmazó, 2JS-2BS.2BL transzlokációs vonal vizsgálata során hozamnövelő tulajdonságokat - több fertilis kalász, hosszabb kalász, kalázonkénti több szem - fedeztek fel (Qi et al., 2010). A növényekben előforduló kékes színért különböző antociánok felelősek, ezek egyrészt felhasználhatók élelmiszerszínezékként, másrészt egészségvédő hatásuk is van. Több gabonafélében is fedeztek már fel antocián tartalomért felelős géneket, a *Th. bessarabicum* esetén a 4J hosszú karjára térképezték a kék szemszínért felelős *BaThb* gént (Pu et al., 2015; Shen et al., 2013). A 6JS.6DL transzlokációt tartalmazó búzavonal esetén magasabb vas és cink tartalmat tapasztaltak, mely tulajdonság igen hasznos lenne az élelmiszeriparban (Ardalani et al., 2016).

Különböző búzavonalakon végzett cefalospórium rezisztenciavizsgálat során a rezisztensnek bizonyult vonalakban kimutattak egy pár *Th. elongatum* kromoszómát, mely homeológ volt a búza 6A kromoszómájával, így *Agropyron elongatum* (azóta már *Th. elongatum*) eredete miatt a 6Ae elnevezést kapta (Cai et al., 1996). Sótűrési vizsgálatok alapján a 3E kromoszómának van a legjelentősebb hatása, azonban a 2E, 4E és 7E kromoszóma is növelte a Chinese Spring (CS) fajta sótűrését (Omielan et al., 1991). Szedimentációs index alapján az 1AS.1EL transzlokációt hordozó búzából készült liszt előnyös lehet kenyérfőzés szempontjából (Tanaka et al., 2017). A *Thinopyrum* genusban, többek között a *Th. elongatum* genomjában is azonosítottak egy *Fhb7 Fusarium* elleni rezisztenciagént, amely a szemidomináns, és a többi

rezisztenciagénnel szemben monogénes, így könnyebb nyomon követni a nemesítés számára. Ez a gén feltehetőleg egy horizontális géntranszfer következtében került egy gombafajból a *Thinopyrum* fajok genomjába, kb. 5 millió évvel ezelőtt (Wang et al., 2020; Wulff és Jones, 2020).

2.3.3. A *Pseudoroegneria spicata* jellemzése

A *Pseudoroegneria spicata* (Pursh) A. Love (*Agropyron spicatum*) szintén egy évelő, meglehetősen szárazságtűrő, főleg takarmánynövény. Elsősorban Észak-Amerikában őshonos, ahol szarvasmarhák, bárányok és lovak etetésére használják. A növény magassága 40-120 cm között változik, szálkás kalászaik 7-20 cm hosszúak lehetnek. 4-6 mm széles levelei enyhén kékeszöld színűek, néha szőrözöttek (5. ábra).



5. ábra A *Pseudoroegneria spicata* a) MvGB 1607 és b) MvGB 1615 vonalainak kalászfotói
(Fotó: Gaál Eszter, 2019)

Diploid változata ismert, mely St genomot tartalmaz ($2n = 2x = 14$, StSt), előfordulhat autotetraploid változatban is, illetve a két ploidszint együttes megjelenési helyén, akár triploid változatban (Carlson, 1986). A *Ps. spicata* jól alkalmazkodik különböző éghajlati változásokhoz, mely adaptációs képesség hasznos lehet a búzanesímés szempontjából (Bradley St. Clair et al.,

2013; Fraser et al., 2009). Több új, alacsony molekulatömegű glutenin alegységet (LMW-GS) azonosítottak a *Ps. spicata* és a hasonló *Ps. strigosa* fajokban, melyek további vizsgálatok után előnyösek lehetnek a nemesítési munkákban (Qin et al., 2014).

2.4. Idegen kromoszómák kimutatása és azonosítása

Az idegenfajú addíciók, szubsztitúciók és transzlokációk búza genetikai háttérben való kimutatására számos biokémiai (pl. izoenzimek), citogenetikai és molekuláris genetikai módszer áll rendelkezésre. A klasszikus citogenetikai módszerekkel (pl.: C-, N-sávozás, Giemsa-festés) a kromoszómák kimutathatóak, morfológiailag jellemezhetőek, azonban a kisebb méretű kromoszómaszakaszok kimutatása korlátozott. Az *in situ* hibridizáción alapuló technikákkal már igen kisméretű idegen kromoszómaszakaszok is kimutathatók, illetve a kromoszómák egyedileg is megbízhatóan és gyorsan azonosíthatók (Hoffmann, 2011). A molekuláris biológia fejlődésével már több DNS szekvencia alapú marker rendszer is elérhető, melyek a kromoszómák még pontosabb és gyorsabb azonosítását teszik lehetővé (Novák, 1999). Tekintettel arra, hogy dolgozatomban a tarackbúza fajok kromoszómáinak molekuláris citogenetikai és molekuláris markerekkel történő jellemzésével foglalkozom, ezért a továbbiakban e módszereket ismertetem részletesebben.

2.4.1. Molekuláris citogenetikai módszerek

A kromoszóma felfedezése, azaz a 20. század eleje óta készítene a kutatók kromoszómapreparátumokat, melyeken kezdetben klasszikus kromoszóma-morfológiai vizsgálatokat (méret, kararány, szatellit megléte) végeztek. Ezekkel a módszerekkel a kromoszómákat jól lehet jellemezni, és esetenként azonosítani is. Schulz-Schaeffer és Jurasits (1962) 25 *Agropyron* faj kariotípusát készítették el, több faj esetében is tapasztalták a szatellites kromoszómák hiányát és nehéz kimutathatóságát. Hsiao et al., (1986) 24 diploid *Triticeae* faj kariotípusát vizsgálták meg, és részletesen jellemezték az adott fajok kromoszómáit. A vizsgált 24 faj nyolc genomot fedett le, a fajok az adott genomokon belül igen hasonló kariotípussal rendelkeztek, mind kromoszómaméret, mind kararány tekintetében. A különböző fajok kromoszóma hossza 61.29 - 39.39 μm között változott, a nyolc genom esetében átlagban az alábbi csökkenő sorrendet állapították meg: *Secale* (R), *Hordeum* (I), *Agropyron* (P), *Psathyrostachys* (N), *Thinopyrum* (J), *Pseudoroegneria* (S), *Critesion* (H) és *Australopyrum* (W). Azonban a kromoszómák nagy része csak morfológiai alapon nehezen különböztethető meg, emiatt különböző festési eljárások kidolgozására is szükség volt.

A Q-sávós technika felfedezése tekinthető a sávozási módszerek alapjának (Caspersson et al., 1967). A módszer során kinakrinnal és kinakrin mustárral történő festés során jellegzetes fluoreszcens mintázat jelentkezik a kromoszómákon, hátránya a fluoreszcens jel intenzitásának nagyon gyors lecsökkenése. Pardue és Gall (1970) egér kromoszómákon végzett *in situ* hibridizációs vizsgálataik során tapasztalták a Giemsa-festés hatására kialakuló sötétebben festődő sávokat. A sötétebben festődő sávok a heterokromatin, míg a halványabban festődő sávok az eukromatin régiókra jellemzők. Ez alapján dolgozták ki a szerzők növényi kromoszómák azonosítására is használható módszereket, mint a Giemsa festést, vagy G-sávozási technikát, illetve a C-sávozási technikát, mely elsősorban a konstitutív heterokromatin régiókat festi.

A reverz Giemsa-festés, vagy R-sávozási technika elsősorban a kromoszómák telomérikus részeit festi, így lehetőség van ezek a régiók alaposabb vizsgálatára is. A hexaploid búza első kariotípusa N-, C-, és módosított C-sávozással készült el (Gill et al., 1991). *Pseudoroegneria spicata* három különböző diploid vonalán és az *Elymus wawawaiensis* tetraploid növény C-sávozással festett mitotikus kromoszómapreparátumait vizsgálta Murphy et al. (2007). A fajok között, de fajon belül is tapasztaltak különbségeket a kariotípusok között, melyet az eltérő származási hellyel, és így az eltérő adaptációs képességekkel magyaráztak. A különböző sávozási technikák kivitelezése ugyan egyszerű és olcsó, azonban nagy gyakorlatot igényel, illetve a kiértékelés pontossága függ a festék minőségétől is, emiatt további módszerek kifejlesztése vált szükségessé.

Napjainkban a legelterjedtebben alkalmazott módszer az *in situ* hibridizáció. A módszer során a kettősszálú DNS azon tulajdonságát használják ki, hogy hő, illetve lúgos kezelés hatására a DNS-ben található hidrogénkötések felbomlanak, azaz denaturálódnak, majd megfelelő kezeléssel újra kialakíthatóak ezek a kötések, renaturálódhat a DNS, miközben egy megfelelő komplementer szállal hibridizálódik. A DNS-nek ezt a tulajdonságát felhasználva lehetőség van jelölt DNS vagy RNS, mint próba hibridizálásához a denaturált kromoszóma DNS-hez, amellyel jól vizsgálható mintázat alakul ki a kromoszómákon (Gall és Pardue, 1969; John et al., 1969). Kezdetben radioaktívan jelölték a nukleinsav próbákat, ám a módszer veszélyessége és időigényessége miatt áttértek a fluoreszcens próbák használatára (Jiang és Gill, 1994). A próbák fluorokrómmal történő jelölése történhet direkt vagy indirekt módon.

Direkt jelölés esetén a fluorokróm közvetlenül a próbához van kötve, míg az indirekt jelölés esetén két lépésben történik a fluorokróm próbához kötése. Indirekt jelölés esetén a próbába digoxigenint vagy biotint építenek be, és a fluorokrómmal jelölt ellenanyagokkal (anti-digoxigenin, streptavidin) detektálják a hibridizáció után. Az indirekt jelölés alkalmazása esetén az *in situ* hibridizáció több lépésből áll, és lassabb, azonban jóval érzékenyebb, mint a direkt jelölés

(Leitch et al., 1994). A jelölés során a jelölt nukleotid több módon építhető be a DNS vagy RNS próbába, leggyakrabban alkalmazott módszerek a Nick-transzláció, a random priming technika, és a PCR technika (Schwarzacher, 2003, 2009). A Nick-transzláció során a DNáz I enzim random elhasít egy foszfodiészter kötést, amely következtében a DNS-szálakon apró megszakítások – nick-ek – jönnek létre. Az így kialakult 3' hidroxil végeket a DNS-polimeráz I enzim primerként fel tudja használni, és a komplementaritás elvén új szálakat szintetizál az 5'→3' polimeráz aktivitása révén, miközben az 5'→3' exonukleáz aktivitása révén eltávolítja a nukleotidokat a szintetizálás irányában. Ennek megfelelően a szintetizálás során a reakcióelegyben lévő jelölt nukleotidok beépíthetők a DNS szálba.

Az ún. random priming módszer során a DNS polimeráz I nagyobb egységét a Klenow fragmentumot használják fel. A jelöléshez a jelölni kívánt DNS-t denaturálni kell, majd a reakcióelegybe random hexanukleotidokat, az enzimet, és jelölt dNTP-eket tesznek. A hexanukleotidok a denaturált DNS szálhoz hibridizálnak és primerként szolgálnak az enzimnek, amely felhasználva a jelölt nukleotidokat megsintetizálja a DNS szálakat. A módszer előnye, hogy kis mennyiségű, akár 25 ng DNS is elegendő, és nem érzékeny a DNS tisztaságára. A PCR módszerrel történő jelölés megegyezik egy hagyományos PCR reakcióval, azzal a különbséggel, hogy a reakcióelegy jelölt dNTP-eket (általában biotin-11dUTP, vagy digoxigenin-11-dUTP) is tartalmaz.

Az *in situ* hibridizációk eredményességét és pontosságát befolyásolja a DNS próba mérete, a próba és a blokkoló DNS aránya, így ezeket szinte minden faj esetén optimalizálni szükséges. A próba/blokkoló DNS arányának elég magasnak kell lennie, hogy megakadályozza a próba hibridizációját a homológ DNS szakaszokhoz. Általában minél közelebbi a vizsgálni kívánt genom a próbához, annál nagyobb arányban kell a blokkoló DNS-t alkalmazni (Silva és Souza, 2013). Az *in situ* hibridizációs módszereket két nagy csoportra oszthatjuk a próba DNS jellege alapján, a fluoreszcens (FISH), illetve a genomi (GISH) *in situ* hibridizációra. A FISH során repetitív DNS szekvenciákat, míg a GISH során genomi DNS-t hibridizálunk a kromoszómapreparátumra.

2.4.1.1. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

A FISH (fluoreszcens *in situ* hibridizáció) során jelölt repetitív DNS/RNS-szekvenciákat hibridizáltatnak a vizsgálandó kromoszómapreparátumra, amelyek különböző mintázatokat adnak a kromoszómák bizonyos régióiban (telomér, centromer, intersticiális régiók), ami specifikus lehet az adott kromoszómára, így egyedileg azonosíthatóvá válik a kromoszóma. A módszerrel megfelelő próbák alkalmazásával a kromoszómák egyedileg azonosíthatók, a kromoszómákon

történő szerkezeti változások nyomon követhetők, a kromoszómákon adott DNS szekvenciák lokalizálhatók. A módszer alkalmazásában nagy előrelépést jelentett a radioaktív próbák lecserélése. Langer et al. (1981) alkalmazott először biotinilált nukleotidokat Nick-transzlációval történő jelölés során, vizsgálataiban során a dTTP nukleotidot megfelelő biotinilált analóggal (dUTP) helyettesítette. A hibridizációt fluoreszcensen jelölt avidinnel vagy streptavidinnel mutatta ki, mely két vegyület nagy affinitással kapcsolódik a biotinhoz. E módszer kifejlesztésének köszönhető a FISH rutinszerű alkalmazása (Jiang and Gill, 1994).

Triticeae fajok esetén a leggyakrabban alkalmazott próbák a pSc119.2, pAs1, Afa-family, pTa71, pTa794, ill. különböző mikroszatellit szekvenciák. A pSc119.2 próba 120 bp hosszúságú rozból izolált tandem repetitív szekvencia (Bedbrook et al., 1980), használatával a 21 búza kromoszóma közül 11 kromoszómát (1-7B, 2D, 3D, 5D, és 4A) sikeresen azonosítottak (Rayburn és Gill, 1985). A riboszomális RNS-ek evolúcionálisan nagyon konzervatív gének, ezekből azonosított szekvencia a 9.05 kbp hosszúságú pTa71 próba (18S, 5.8S és 25S rRNS), illetve a 410 bp hosszúságú pTa794 próba (5S rRNS) (Gerlach és Bedbrook, 1979; Gerlach és Dyer, 1980). A pAs1 próba 1 kb hosszúságú *Ae. squarrosá*-ból izolált repetitív szekvencia (Rayburn és Gill, 1986), Afa1 restrikciós enzimmel történő emésztéssel izolálták belőle az Afa-familynek nevezett próbát (Nagaki et al., 1995). Mindkét próba elsősorban D genomra specifikus.

Az egyedi gének kimutatására szolgáló ún. single-gene FISH módszer alkalmazásával lehetőség van a kromoszómák fizikai térképezésére, illetve különböző fajok közötti evolúciós kapcsolatainak vizsgálatára. 3 kbp méretnél nagyobb gének már jól azonosíthatóak single-gene FISH módszerrel búza, kukorica és árpa esetén is (Danilova et al., 2012, 2014). Single-gene FISH próbák alkalmazásával fajok közötti filogenetikai kapcsolatok, és különböző kromoszóma-átrendeződések is kimutathatók (Danilova et al., 2012), illetve egyedi kromoszóma specifikus próbák is tervezhetők (Said et al., 2018). A FISH felbontása, érzékenysége növelhető, akár 1-3 kbp méretű géneket is ki lehet mutatni az ún. Tyr-FISH technikával. E módszer során a mintához elsődleges és másodlagos antitestet is kötnek, a másodlagos antitesthez pedig torma-peroxidáz enzimet adnak, amely katalizálja a jelölt tiramid (Tyr: Tyramide) egy reaktív formává való átalakulását. Ez a reaktív forma kötődik a közeli különböző tirozin származékokhoz, ezzel egy nagyon erős jelet előállítva (Khrustaleva és Kik, 2001). E módszer felhasználásával egy 2 kbp méretű próba alkalmazásával sikerült azonosítaniuk a *Rad50* gén helyét a búza 5A, 5B és 5D rövid karjain (Pérez et al., 2009). A módszer hátránya, hogy a kimutatandó jel erősítése mellett, a háttérzajokat is erősíti, így nagyon pontos optimalizálásra van szükség. Egyedi szekvenciák kimutatásában és a fizikai térképezésben nagy előrelépést jelentett a kinyújtott DNS szálaikon végzett ún. Fiber-FISH módszer, mellyel akár egy 700 bp méretű próba is kimutatható (Fransz et

al., 1996). A módszer hátránya, hogy a kromoszómák integritása elvész, és a hibridizációs jel kromoszómális elhelyezkedése nem állapítható meg, így a módszer nem terjedt el nagymértékben. A rozs *Sec-1* lókuszának kópiaszámát is Fiber-FISH módszerrel azonosították (Yamamoto és Mukai, 2005). Nagy felbontású citogenetikai térképek készíthetők növényi kromoszómákon a meiózis pachitén fázisában, ekkor ugyanis a kromoszómák 7-50-szer nyújtottabbak, mint a mitotikus metafázisában, azonban még kellően felismerhető a kromoszóma morfológiája (Linc és Molnár-Láng, 2012). Áramlási citométerrel szétválogatott metafázisban lévő kromoszómák egy enyhe proteináz-K enzimes emésztés hatására akár 100-szorossá is hosszabbíthatók, megnyújtott, ún. „superstretched” kromoszómákká alakíthatók. Ennek eredményeként erősebb FISH jelek tapasztalhatóak, amelynek oka feltehetőleg a DNS-hez való könnyebb hozzáférhetőség a próba számára, a módszer érzékenysége akár 1 kbp is lehet (Valárik et al., 2004). Ezzel a módszerrel lehetőség van a kromoszómák térképezésére, azokban az esetekben is, ahol a meiotikus pachitén FISH nem kivitelezhető. Az *in situ* hibridizációs technikák egy viszonylag újabb és izgalmas területe a 3D-FISH, amely során a vizsgált DNS szekvencia térbeli elhelyezkedése vizsgálható a sejtmagban lévő kromoszómákon (Jiang és Gill, 2006). Új generációs konfokális mikroszkópok alkalmazásával egy időben legalább 5 különböző fluorokrómot is lehet alkalmazni (Walter et al., 2006).

Különböző fluorokrómok együttes használatával több próba is vizsgálható egyszerre, melynek eredménye egy többszínű mintázat. Ilyen kétszínű FISH alkalmazásával azonosították először a búza összes kromoszómáját (Pedersen és Langridge, 1997). A pSc119.2, Afa-family és pTa71 próba együttes alkalmazásával sikeresen azonosíthatók a búza (Fedak és Kim, 2008), illetve rokon fajainak, mint pl. *T. monococcum* (Megyeri et al., 2012), vagy különböző *Aegilops* fajok (Badaeva et al., 1996) kromoszómái. A pSc119.2 próba alkalmazásával több évelő tarackbúza esetén, többek között a *P. spicata*, *Th. elongatum* és *Th. bessarabicum* faj kromoszómáin tapasztaltak FISH mintázatot, melyek felhasználhatóak azonosításra (Lapitan et al., 1987). Részletes FISH alapú kariotípus napjainkig nem sok tarackbúza faj esetén készült.

Linc et al. (2012) CS - *Th. elongatum* addíciós vonalak vizsgálatával készítette el a *Th. elongatum* FISH alapú kariotípusát, míg Grewal et al. (2018) a *Th. bessarabicum*-ét. Said et al., (2018) standard repetitív próbák és egyedi géneken alapuló próbákkal készítették el az *A. cristatum* kariotípusát és komolyabb kromoszóma átrendeződéseket tapasztaltak a búzához viszonyítva. Egyedi gének kimutatásához min. 2.5 kbp méret szükséges, de a megbízhatóan reprodukálható eredményhez a min. 40 kbp ajánlott (Danilova et al., 2014). Repetitív DNS próbák (pTa71, pTa794, pAs1, pSc119.2) alkalmazásával a *Th. ponticum* kromoszómái is elkülöníthetők

egymástól, így ezek a próbák felhasználhatóak a búza-*Th. ponticum* utódok azonosításában (Brasileiro-Vidal et al., 2003).

A tarackbúzafajok, mint igen gazdag génforrások, gyakran alkalmazott keresztezési partnerek a búzanemesítésben. A legtöbb fajnak még nincs azonosított kariotípusa, de az utódok vizsgálatában sokszor alkalmazzák a FISH technikát (Patokar et al., 2015; Qi et al., 2010; Sepsi et al., 2008a, Cseh et al. 2019). A FISH során alkalmazott repetitív DNS próbák mellett gyakran használják a mikroszatellit, ún. SSR (Simple Sequence Repeats) próbákat, amelyek 1-10 (Vieira et al., 2016), vagy 1-6 (Gupta et al., 1996) nukleotid tandem ismétlődéséből álló kb. 100 bp hosszúságú, gyakori szekvenciák az eukarióta genomban. A növényi genomban leggyakoribb motívum az (AT)_n, (GA)_n, illetve az (AAG)_n, és az (AAT)_n. Biotinnal jelölt (GAA)₇ próba alkalmazásával az árpa kromoszómák a C-sávozással szinte megegyező mintázatot adnak, amely alapján a kromoszómák egyértelműen azonosíthatók (Pedersen és Linde-Laursen, 1994). A hexaploid búza teljes kromoszómakészletét sikerült azonosítani a pAs1 és a GAA próbák segítségével (Pedersen és Langridge, 1997). Az A genom egy változatát (A^m) tartalmazó *T. monococcum* esetén mégis kevésbé komplex mintázatot adott a GAA próba (Megyeri et al., 2012). Nyolc különböző, az A genom változatait tartalmazó diploid, tetraploid és hexaploid fajokon végzett vizsgálat során eltérő mintázatokat tapasztaltak, a *T. monococcum* esetén ez esetben is minimális GAA jelet tapasztaltak, amely különböző evolúciós változásokra utal (Adonina et al., 2015).

Aegilops fajok esetén igen komplex mintázatokat mutatnak a mikroszatellit markerek (Abdolmalaki et al., 2019; Molnár et al., 2005, 2016). Pedersen et al. (1996) 27 *Triticeae* faj GAA-mintázatát készítették el, melynek során az I, Y, X és H genomok esetén tapasztaltak GAA jeleket, míg a diploid N, G genomok esetén gyenge, és a P, J és S genomok esetén egyáltalán nem tapasztaltak jeleket. Tarackbúzafajok esetén a mikroszatellit markerek FISH próbaként alkalmazva az esetek többségében nem adnak hibridizációs mintázatot (Linc et al., 2012; Sepsi et al., 2008a).

2.4.1.2. Genomi *in situ* hibridizáció (GISH)

Az *in situ* hibridizáció másik változata, a GISH (genomi *in situ* hibridizáció) során genomi DNS-t jelölnek, amelyet hibridizáltatnak a kromoszómapreparátumra. A GISH során a kimutatni kívánt genommal azonos jelölt genomi DNS mellett a vizsgálandó másik genommal azonos jelöletlen DNS-ét szintén célszerű hibridizáltatni, mint blokkoló DNS-t, annak érdekében, hogy a jelölt DNS ne hibridizáljon más hasonló szekvenciákhoz. Ugyanakkor találunk példát arra is,

amikor a két genomot két eltérően jelölt próba DNS segítségével különböztették meg (Molnár et al., 2011). Minél közelebbi rokonsági viszonyban van a két genom egymáshoz, annál több blokkoló DNS-re van szükség egy kísérlet során (Silva és Souza, 2013). Szintén a fals pozitív hibridizációs mintázat elkerülése miatt a kimutatni kívánt genomi DNS-t a GISH kísérlethez restriktációs enzimekkel, autoklávozással vagy szonikálással fragmentálni szükséges, az optimális szekvencia méret 200-500 bp elérése érdekében (Schwarzacher és Heslop-Harrison, 2000). A módszer jól alkalmazható genomok és kromoszómák vizsgálatára hibrid, illetve allopoloid növények esetében, fajok közötti genetikai kapcsolatok feltárására. Ezenkívül keresztezési programokban alkalmazzák gyakran a technikát az idegen kromoszómák kimutatására a különböző addíciós, szubsztitúciós, és transzlokációs vonalak vizsgálata és azonosítása során.

A GISH alkalmazásával a kromoszómák viselkedését és szerkezetét a mitózis és a meiózis különböző fázisaiban is jól lehet vizsgálni (Heslop-Harrison et al., 1990; King et al., 1994; Leitch et al., 1991). Mukai et al. (1993) multikolor GISH (mcGISH) során a *T. urartu* biotinnal jelölt A genomjával, *Ae. squarrosa* digoxigeninnel jelölt D genomjával, illetve *Ae. speltoides* jelöletlen B genomjával a *T. aestivum* A, B és D genomjait sikeresen azonosították, illetve egy A és B genom közötti transzlokációt is felfedeztek, amely a 4A kromoszómát érintette. *T. timopheevii* (A¹A¹GG) GISH vizsgálata során az 1G, 4G és 6A¹ kromoszómát érintő intergenomikus transzlokációkat fedeztek fel (Jiang és Gill, 1994). Rozs és árpa keresztezéséből származó hibrid növény kromoszómáinak interfázisban és profázisban történő GISH vizsgálata során mutatták ki, hogy a két genomból származó kromoszómák nem keverednek, hanem külön csoportban helyezkednek el. A rozs és az árpa genetikai különbözősége miatt nem volt szükség blokkoló DNS használatára (Schwarzacher et al., 1989).

Genetikailag jobban hasonlító fajok keresztezése esetén, mint pl. a *Hordeum vulgare* és *Hordeum bulbosum*, szükség van megfelelő blokkoló DNS használatára a GISH során. Ezzel a módszerrel bizonyították, hogy hasonlóságuk ellenére a két genom térben szintén szeparáltan helyezkedik el a két faj hibridjében (Schwarzacher et al., 1992). Tritikálé GISH vizsgálata során mitózisban és meiózisban is megfelelően azonosíthatók a rozs kromoszómák, jelölt rozs DNS-sel és jelöletlen búza DNS 1:1 arányú keverékével (Le et al., 1989; Le és Armstrong, 1991). Búza-árpa addíciós vonalak vizsgálata során a jelöletlen búza és biotinnal jelölt árpa DNS próbák 1:2 arányú keverékét találták a legjobbnak az árpa kromoszómák kimutatására (Mukai és Gill, 1991).

Ph1 mutáns *T. durum* és *Th. bessarabicum* keresztezésekor keletkező kiazmák gyakoriságát vizsgálta King et al. (1993). A kiazmák gyakoriságával következtetni lehet az adott fajok genetikai közelségére. A búza előnemesítési kísérletek célja lehet különböző hasznos gének bevitele a búza genomjába más fajokból, minél közelebb van genetikailag a két genom, annál

könnyebb a kívánt gént átvinni. A búza és a *Th. bessarabicum* között 13.6 % arányban képződtek kiazmák, amely nem zárja ki a hasznos gének átvitelét. Qin et al. (1995) az ismeretlen eredetű, számos betegségre rezisztens *Agrotana* amfiploid eredetét vizsgálták. Jelölt *Th. elongatum* (EE), *Th. bessarabicum* (JJ), *Th. ponticum* (J₁, J₁, J₁, J₂, J₂) és *Haynaldia villosa* (VV) genomjának felhasználásával azonosították az *Agrotana* szülői genomjait. Vizsgálataik alapján az *Agrotana* 56 kromoszómájából 40 kromoszóma búza eredetű (ABD), míg 16 kromoszóma *Th. ponticum* (JJ) eredetű.

McGISH-t alkalmazva hasonló eredményt tapasztalt Sepsi et al. (2008) a BE-1 elnevezésű részleges amfiploid vizsgálata során. Jelölt A, E és J genomot használva 40 búza és 16 J kromoszómát azonosítottak, FISH vizsgálattal állapították meg a két 7D kromoszóma hiányát. *Th. bessarabicum* és *Ps. spicata* jelölt genomi DNS-ét felhasználva szintén mcGISH-t alkalmazva vizsgálták és azonosították a *Th. intermedium* (*A. glaucum*) és *Th. ponticum* (*A. elongatum*) szintetikus hibridjének, az ún. *Agropyron glael*-nek a genomösszetételét. Ennek során a szülői, és hibrid vonalban a J és St genomok mellett tapasztaltak egy harmadik JSt-nek nevezett genomot, amely a centroméra körüli régióban St genomi, egyébként pedig J genomi mintázatot mutatott (Kruppa és Molnár-Láng, 2016). Magasabb Fe és Zn tartalmú búza- *Th. bessarabicum* transzlokációs vonal előállítására és vizsgálatára során egy 6E^bS.6DL Robertsoni-transzlokációt azonosítottak (Ardalani et al., 2016).

Különböző búza-*Th. elongatum* addíciós, szubsztitúciós és transzlokációs vonalak GISH, ill. mMcGISH vizsgálatával azonosítottak négy fuzárium rezisztens vonalat (Fu et al., 2012). Levélrozsda rezisztenciát hordozó, illetve magasabb ezerszemtömegű *A. cristatum* transzlokációs vonalakat azonosítottak GISH alkalmazásával (Ochoa et al., 2015; Zhang et al., 2015). Jelölt St és E genommal, blokkoló DNS használata nélkül Liu et al. (2007) végzett GISH során vizsgálta a búza A, B és D genomja és az E és az St genomok közötti genetikai hasonlóságot. Vizsgálataik alapján az E, és az St genom is közelebbi rokonsági viszonyban áll a D genommal, mint az A, vagy B genommal. Mind az St, mind az E genomi próbát használva 14 búza kromoszómán tapasztaltak hibridizációs jeleket, mely kromoszómák FISH azonosítás során a D genomhoz tartoztak. E, J és St genomokat felhasználva Chen et al. (1998) a hexaploid *Th. intermedium* és a dekaploid *Th. ponticum* fajok vizsgálatánál igen összetett genomot és több intragenomikus átrendeződéseket tapasztaltak. A búzanemesítéshez több búza-tarackbúza vonalat állítottak már elő, ám a legtöbb anyag részletes vizsgálata még nem történt meg, ehhez és újabb vonalak előállításához nyújthat segítséget a tarackbúzafajok részletes GISH és FISH vizsgálata.

2.4.2. Molekuláris markerek

A növénynemesítésben alkalmazott markereknek három csoportját különböztethetjük meg: morfológiai, biokémiai és molekuláris markerek. A morfológiai és a biokémiai markerek száma korlátozott, a környezeti hatások könnyen befolyásolják megjelenésüket, a génkifejeződésük függ a növény fejlődési stádiumától. A molekuláris markerek a genom DNS szintű variációján alapszanak, a kódoló és a nem-kódoló szekvenciákon egyaránt. Ezáltal számuk korlátlan, környezeti hatások nem befolyásolják megjelenésüket. Az ideális molekuláris marker jellemzői a nagyfokú polimorfizmus, kodomináns öröklődés, reprodukálhatóság, könnyű és gyors vizsgálat (Kiss, 2005). A molekuláris markereket két nagyobb csoportra oszthatjuk: hibridizáción, és a PCR technikán alapuló markerek (Semagn et al., 2006).

A restrikciós fragmentum hosszpolimorfizmus (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) az egyik legelső hibridizáción alapuló molekuláris marker. RFLP vizsgálat során a DNS szekvenciát restrikciós endonukleázokkal emésztik, majd a keletkezett fragmenteket elektroforetikus elválasztják, végül jelölt próbákkal hibridizálják a fragmenteket (Botstein et al., 1980). A keletkezett hosszpolimorfizmust az enzimek hasítóhelyeiben, vagy a hasítóhelyek közötti szekvenciában bekövetkezett pontmutációk, illetve transzlokációk okozzák. Liu et al. (1990; 1991) részletesen térképezték a búza genomját RFLP markerekkel és elkészítették a kapcsoltsági térképét e markereknek. Aneuploid vonalak felhasználásával elkészítették a hexaploid búza RFLP térképét kromoszómakarok szintjén is (Anderson et al., 1992). Chen et al. (1994) 14 búza kromoszómakar-specifikus RFLP markert azonosítottak, amelyek felhasználásával sikeresen mutattak ki *A. cristatum* – búza monoszómás addíciós vonalakat. RFLP markeres vizsgálatot FISH és C-sávozás technikával kiegészítve vizsgálták a *Th. distichum* kromoszómáit tetraploid búzával létrehozott szintetikus amfiploidok felhasználásával (Fominaya et al., 1997). Az RFLP módszer reprodukálhatósága nagyon jó, nem igényel előzetes szekvencia információkat, a markerek kodomináns öröklődésűek, azonban a vizsgálatnak számos hátránya is van. A vizsgálatához nagy mennyiségű, tiszta DNS szükséges, a kivitelezés nem automatizálható, alacsony szintű polimorfizmust mutatnak a markerek, általában radioaktív próba használható, drága, és meglehetősen idő-, és munkaigényes a kísérlet.

Ezzel szemben a PCR technikán alapuló módszerek esetén kis mennyiségű DNS is elegendő a kísérlet kivitelezéséhez, a markerek nagyfokú polimorfizmust mutatnak, és elkerülhető a veszélyes és speciális laboratóriumi feltételeket igénylő radioaktív próbák használata (Semagn et al., 2006). Megkülönböztethetjük a szekvencia ismerete nélküli PCR alapú módszereket (pl.: RAPD, AFLP), és a célzott, szekvencia ismerethez kötött módszereket (pl.: EST, SSR, CAPS).

A véletlenszerűen felszaporított DNS-polimorfizmus (RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA) módszer alapja, hogy a PCR reakció során egy 10 bp hosszúságú véletlenszerű primert alkalmaznak (Williams et al., 1990), majd a keletkezett fragmenteket gélelektroforézissel lehet elválasztani. RAPD markerek alkalmazásával azonosíthatók idegenfajú addíciók, például *H. vulgare*, *Th. bessarabicum*, *H. chilense* fajokban (Devos és Gale, 1992; King et al., 1993); nyomon követhetők a búzanemesítésben fontos, hasznos gének, mint például a liztharmat-rezisztencia (Hu et al., 1997), illetve alkalmasak a genetikai variabilitás vizsgálatára is (Aliyev et al., 2007; D'Ovidio et al., 1990; Weining and Langridge, 1991). Részletes, 22 fajt magában foglaló, összesen 8 genomot (E, H, I, P, R, St, W és Ns) érintő RAPD analízis során vizsgálták e genomok filogenetikai kapcsolatát, illetve azonosítottak számos genomspecifikus markert (Wei és Wang, 1995). A RAPD markeres vizsgálatok kivitelezése gyors és egyszerű, könnyen értékelhető, ám nem megbízható reprodukálhatósága, illetve domináns öröklődése miatt ma már egyre inkább háttérbe szorul.

Az amplifikált fragmenthossz polimorfizmus (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) technika során a vizsgálni kívánt DNS-t először restrikciós endonukleázokkal hasítják, majd az így keletkezett ragadós végekhez speciális duplaszálú adaptermolekulákat kapcsolnak, amelyek segítségével szelektív PCR reakciót lehet végrehajtani. A módszer jól reprodukálható, megbízható, nem igényel előzetes DNS szekvencia ismeretet, egyszerre sok polimorf lókuszt lehet vizsgálni, így sok információt ad. Hátránya a többlépcsős kivitelezés, és az ebből adódó hosszabb kivitelezési idő, a restrikciós és ligáz enzimek használatából adódó magasabb költségek, illetve a domináns öröklődés (Garcia et al., 2004). A búzanemesíthetőségének növelése érdekében számos búzafajta genetikai variabilitási vizsgálatát RFLP, AFLP és SSR markerekkel is elvégezve Bohn et al. (1999) az AFLP markereket találták a leghasznosabbnak.

A mikroszatellit markerek (SSR, Simple Sequence Repeats) a DNS-ben 1-10 (Vieira et al., 2016), vagy 1-6 (Gupta et al., 1996) nukleotid tandem ismétlődéséből álló kb. 100 bp hosszúságú, gyakori szekvenciák az eukarióta genomban, amelyek határszekvenciái meglehetősen konzerváltak, így specifikus primerek tervezhetők e régiókra (Litt és Luty, 1989). A PCR reakció során keletkezett fragmentek hosszpolimorfizmusa alapján lehet a vizsgált szekvenciákban hasonlóságokat, ill. különbségeket tenni. A replikáció során véletlenszerűen bekövetkező „csúszások” (slipped mispairing) következményeként kialakuló deléciók vagy addíciók okozzák a fragmentekben található hosszpolimorfizmusokat (Levinson és Gutman, 1987). A módszerhez szükséges primerek tervezése és kiválasztása egy többlépcsős folyamat, amely meglehetősen idő-, és pénzigényes, illetve előzetes szekvencia ismeret szükséges hozzá (Gupta et al., 1996).

Ebben nagy segítséget jelentett az expresszáldó szekvencia részlet (EST, Expressed Sequence Tags) markerek megjelenése, melyek felhasználhatók SSR markerek tervezésére is, így a primertervezési folyamat nagymértékben gyorsítható és költséghatékonyabb (Gupta et al., 2003). Az expresszáldó szekvencia részlet (EST, Expressed Sequence Tags) markereket elsősorban a genom kódoló szekvenciájára tervezték, az expresszált gén 3' vagy 5' végi szekvenciájának szekvenálásával (Semagn et al., 2006). Az EST markerek fejlesztése cDNS könyvtárak létrehozásával kezdődik, amely a különböző számítógépes programoknak köszönhetően nagyon gyorsan fejlődik. Kezdetben az EST markereket gén transzkriptomok azonosítására tervezték, azonban mára génexpressziós, génszabályozással kapcsolatos kutatások, illetve számos molekuláris marker fejlesztésének egyik alapvető technikája lett. EST alapú RFLP, SSR, SNP és CAPS markerek tervezéséhez használják fel, illetve számos DNS microarray vizsgálathoz. Nagyfokú polimorfizmust mutatnak, kis mennyiségű DNS elegendő a vizsgálathoz, könnyen automatizálható, többségében kodominánsan öröklődnek (Powell et al., 1996). E tulajdonságok miatt gyakran alkalmazzák populációgenetikában és genom vizsgálatok esetén (Röder et al., 1998; Roussel et al., 2005).

Az egyszerű nukleotid polimorfizmus (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) egy nukleotid cseréjét jelentik, melyek nagy számban és szétszórtan helyezkednek el a genomban. A SNP kimutatására alkalmazható módszerek négy nagy csoportra oszthatók: allélspecifikus hibridizáció, primer hosszabbítás, oligonukleotid ligálás, invazív hasítás. A módszerek alapja, hogy az egy nukleotid különbség miatt az alkalmazott próbák, primerek, enzimek nem tudják hatásukat kifejteni. Gyakran alkalmazzák térképezéshez, marker szelekcióhoz (MAS) és térkép-alapú klónozáshoz. Az amplifikált termékek restrikciós hasításával nyert polimorfizmus (CAPS, Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), vagy más néven PCR-RFLP, az RFLP technika egy továbbfejlesztett változata. A megfelelő EST alapú primerekkel felszaporított fragmentek restrikciós enzimekkel történő hasítása során eltérő hasítási mintázatot mutatnak. A módszerrel egy nukleotid változást is ki lehet mutatni, ám fontos a DNS megfelelő tisztasága, a PCR jó kivitelezése. A CAPS markerek kodomináns öröklődést mutatnak, a módszer a PCR amplifikáció következtében egyszerűbb és kevésbé időigényes, mint a hibridizáción alapuló RFLP. A markerek EST alapúak, így összehasonlító vizsgálatokban hasznosabbak, mint a nem-kódoló szekvenciákra tervezett markerek.

Fulton et al. (2002) az *Arabidopsis* genomi szekvenciáját összehasonlították paradicsom EST markerekkel, és számos egyedi, vagy alacsony kópiaszámú, konzervált géneket azonosítottak. Ezek az ún. COS (Conserved Ortholog Set) markerek két vagy több faj esetében evolúcionálisan meglehetősen konzervált gének, amelyek közös őstől származnak. A COS markerek primereit az

azonosított egyedi szekvenciák intron és exon régióinak határára tervezik, azaz az egyik primert az exon határára tervezik, ezáltal biztosítva a markerek fajon belüli, illetve fajok közötti átvihetőségét, míg a másik primert az intron szekvencia egy részére tervezik, amely által a markerek nagymértékben polimorfak lesznek, jól használhatók filogenetikai kutatásokra, illetve térképezésre. Az elérhető markerek száma szinte végtelen, a módszer áteresztőképessége közepes, hátránya, hogy részleges szekvencia ismeret szükséges, illetve a markerek fejlesztése költséges (Paux et al., 2012). Számos növényfajban azonosítottak már COS markereket, mint pl. burgonyafélék (Wu et al., 2006), őszirozsfélék (Chapman et al., 2007), káposztafélék (Jeong et al., 2014), rózsfélék (Cabrera et al., 2009), fenyőfélék (Liewlaksaneeyanawin et al., 2009) esetében. Gabonafélékben többek között búza (Quraishi et al., 2009), rozs (Hackauf et al., 2012), *Aegilops* (Molnár et al., 2013), és egyes *Agropyron* (Linc et al., 2017; Said et al., 2019b) fajokon azonosítottak COS markereket. COS markerek alkalmazásával sikerült a búzából készült tézta viszkozitásáért felelős poligéneket (QTL, Quantitative Trait Loci) a 7A kromoszómára térképezni és a méretét pontosítani (Quraishi et al., 2009). *Aegilops* fajok esetén több vizsgálatot is végeztek már COS markerekkel (Burt és Nicholson, 2011; Howard et al., 2011; Molnár et al., 2013, 2014). Tarackbúzafajok esetén azonban eddig kevés kutatást végeztek. Said et al. (2019b) a tetraploid *A. cristatum* és a búza közötti makroszinténiát vizsgálta COS markerekkel, melynek során néhány intragenomikus duplikációt, és kevés kromoszóma átrendeződést tapasztaltak, azonban a markerek helyzete és sorrendje a két genom között nagymértékben egyezett. E szerzők azonosítottak 69 db kromoszóma-specifikus markert is.

Egyre terjednek a nagy áteresztőképességű (high-throughput) módszerek, amelyeknek alapvetően két csoportja van, a meghatározott összetételű SNP-ket tartalmazó chippek és a *de novo* genotyping-by-sequencing módszerek. Ezen módszerek különböző QTL és asszociációs vizsgálatokra alkalmazhatók, illetve nagy felbontású genetikai térképek készítésére alkalmasak (Lateef, 2015; Paux et al., 2012; Semagn et al., 2006). A korábban kifejlesztett Illumina iSelect 9K és 90K fix SNP chippek esetén az SNP-k azonosítása főként búza genotípusok szekvencia adatainak felhasználásával történt (Cavanagh et al., 2013; Wang, S. et al., 2014), így az idegen fajú génátvitel során csak korlátozottan alkalmazhatóak a rokon fajokból származó kromoszómák kimutatására. Mivel ezek a genotipizáló platformok az SNP-k relatíve kis hányadát tudják felhasználni a különböző búza rokon, és vad fajok esetén, így nem feltétlen költség- és időhatékony módszerek. A korábbi SNP chippek hátrányait igyekezett kiküszöbölni a Winfield et al. (2016) által készített Axiom 820K chip, illetve az abból kifejlesztett 35K breeder chip, melynek fejlesztéséhez 23 hexaploid búza genomja mellett további 20 db rokon faj, pl. *T. monococcum*, *Ae. tauschii*, *Th. bessarabicum*, *S. cereale* genomjait is felhasználták, így hatékonyabban

azonosíthatóak vele akár a búza másodlagos és harmadlagos génforrásai közül származó introgressziók is. E fix multiplex SNP array módszerek nagy előnye az ismételhetőség. Akár több generáción át ugyanazon markerekkel vizsgálhatjuk velük a nemesítési alapanyagokat. Ugyanakkor alkalmazásukat még mindig korlátozza a módszer magas ára.

A *de novo* genotyping-by-sequencing (GBS) módszerek esetén nincs szükség előzetes szekvencia ismeretre, így potenciálisan bármely növény faj esetében azonnal alkalmazható. A GBS technológia alkalmazása során a genomi DNS-t egy gyakran és egy ritkán vágó restrikciós endonukleázzal emésztik (búza és rokon fajai esetén ez gyakran *PstI/TaqI*) majd a genomi fragmenteket egy *PstI* adapterhez történő ligálás után PCR segítségével felamplifikálják és szekvenálják. A genotipizálás két markertípust eredményez. A domináns markerek igen/nem választ adnak és a genomi fragment jelenlétét vagy hiányát tükrözik az adott genotípusban. A kodomináns markerek az adott genomi fragmentek szekvenálásával meghatározott egyedi nukleotid polimorfizmusokat tükrözik a különböző genotípusok között. A GBS rendszerek egyik változata a DArTseq technológia (<https://www.diversityarrays.com/>), mely széles körben elterjedt a gabonafélék strukturális és funkcionális genomikai kutatásában, valamint a nemesítésben. A GBS platformok segítségével nagyobb valószínűséggel lehet új SNP-eket kimutatni, ezáltal jobban alkalmazható a rokon és vad fajokból származó introgressziók kimutatására is. Azonban a reprodukálhatósága nem ugyanolyan állandó, mint a fix SNP chip-ek esetén.

A fenti high-throughput módszerek még mindig elég drágák, ezért a mindennapi gyakorlatban érdemes kevesebb, néhány gondosan kiválasztott, a genom meghatározott régióira (pl. az egyes kromoszómák terminális illetve centroméra-közeli régióira) specifikus SNP-t kiválasztani, és ezeket valamilyen uniplex SNP detektálási technológia (pl KASP) segítségével alkalmazni az adott előnemesítési populációk szelekciójára (He et al., 2014).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növényi anyag

Kísérleteinkhez eltérő földrajzi helyekről származó diploid tarackbúzafajokat (6. ábra), és különböző addíciós vonalakat vizsgáltunk citogenetikai és molekuláris markerek alkalmazásával, e növények részletes adatai a 2. táblázatban láthatók.

2. táblázat A vizsgált tarackbúzafajok bemutatása

Név	Kromoszómaszám, genomösszetétel	Azonosító	Származás	Vizsgálat
Tarackbúzafajok				
<i>Agropyron cristatum</i>	2n=2x=14, PP	PI 639814 MvGB 1521	Mongólia	FISH, GISH, COS marker
		PI 636511 MvGB 1509	Bulgária	FISH, GISH, COS marker
<i>Pseudoroegneria spicata</i>	2n=2x=14, S ^t S ^t	PI 610973 MvGB 1607	Ismeretlen	FISH, GISH, COS marker
		PI 619445 MvGB 1617	Egyesült Államok	COS marker
		PI 618736 MvGB 1615	Ismeretlen	FISH, GISH, COS marker
<i>Thinopyrum bessarabicum</i>	2n=2x=14, JJ	PI 531711 MvGB 1705	Észtország	FISH, GISH
		W6 10232 MvGB 1703	Oroszország	FISH, GISH
		PI 531712 MvGB 1706	Ukrajna	FISH, GISH, COS marker
<i>Thinopyrum elongatum</i>	2n=2x=14, EE	PI 571718 MvGB 1965	Tunézia	FISH, GISH, COS marker
<i>Triticum aestivum</i> L. subsp. <i>aestivum</i>				
Chinese Spring (CS) búzafajta	2n=6x=42, AABBDD		Kína	COS marker
GK Öthalom	2n=6x=42, AABBDD		GKI	COS marker
CS-<i>Th.elongatum</i> diszómás addíciós vonalak				
1E-7E	2n=6x=44, 21 búza ^{II} +1 ^{II} E		Dvorak & Knott, 1974	FISH, GISH, COS marker, keresztkezés

2. táblázat folytatása A vizsgált tarackbúzafajok bemutatása

CS-<i>Th. elongatum</i> diteloszómás addíciós vonalak				
1ES, 1EL, 2ES, 2EL, 3ES, 3EL, 4ES, 5ES, 5EL, 6ES, 7ES, 7EL	$2n=6x=43$, 21 búza ^{II} +1 ^I E S/L		Dvorak & Knott, 1974	FISH, GISH COS marker
CS-<i>Th. elongatum</i> amfiploid	$2n=8x=56$, AABBDDEE		Dvorak & Knott, 1974	FISH, GISH COS marker
CS-<i>A. cristatum</i> diszómás addíciós vonalak				
1P-6P	$2n=6x=44$, 21 búza ^{II} +1 ^{II} P		Institute of Experimental Botany*	FISH, GISH COS marker, keresztetés
5P+2C	$2n=6x=45$, 21 búza ^{II} +1 ^{II} P+1 ^I C		Institute of Experimental Botany**	COS marker, keresztetés
6P+2C	$2n=6x=45$, 21 búza ^{II} +1 ^{II} P+1 ^I C		Institute of Experimental Botany**	COS marker, keresztetés

MvGB: Martonvásári Gabona Génbank

*A vizsgálatok során felhasznált szemeket Mahmoud Said (Institute of Experimental Botany, Center of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Olomouc, Czech Republic) biztosította számunkra.

** A vizsgálatok során felhasznált szemeket Mahmoud Said és T. R. Endo (Institute of Experimental, Botany Center of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Olomouc, Czech Republic) biztosította számunkra.

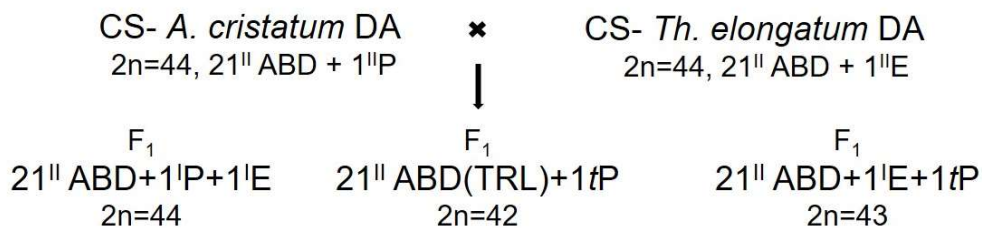


6. ábra A vizsgált tarackbúzafajok kalásza. A: *Th. bessarabicum*, B: *Ps. spicata*, C: *A. cristatum*, D: *Th. elongatum* (Fotók: Gaál Eszter, 2019)

Keresztezési programjaink célja olyan előnemesítési alapanyagok előállítása, amelyek rendelkeznek a tarackbúzák hasznos tulajdonságaival. Ennek érdekében kétféle keresztezési programot indítottunk. Az egyik keresztezési program során CS-*A. cristatum* és CS-*Th. elongatum* megfelelő diszómás (DA), illetve monoszómás (MA) addíciós vonalait kereszteztük. A keresztezési program során mindegyik vonal esetén két irányban végeztük a keresztezéseket, vizsgálva az anyai ill., apai genotípusok hatását a szemkötésre. Vizsgálataink során a 3. táblázat szerinti kombinációkban végeztük el a keresztezéseket a 7. ábra keresztezési séma alapján. A 7. ábrán látható keresztezési séma csak a gyakrabban előforduló F₁ utódokat mutatja. A keresztezések során célunk minél több transzlokációt hordozó utód előállítása.

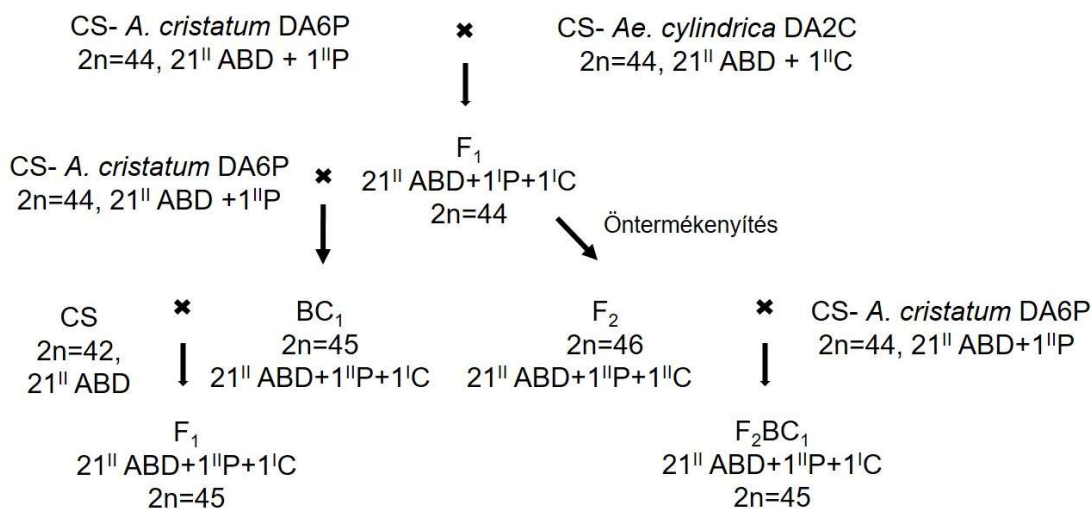
3. táblázat Chinese Spring (CS)- *Agropyron cristatum* és CS-*Thinopyrum elongatum* diszómás (DA) és monoszómás (MA) addíciós vonalainak keresztezési kombinációi.

Anya	DA1E	DA1P	DA3E	DA3E	DA3P	MA3P	DA4E	DA4P	DA5E	DA5P
Apa	DA1P	DA1E	DA3P	MA3P	DA3E	DA3E	DA4P	DA4E	DA5P	DA5E



7. ábra Búza-tarackbúza addíciós és transzlokációs vonalak előállításának menete az 1-es homeológ csoport példáján bemutatva. DA: diszómás addíció, TRL: transzlokáció, *t*: teloszómás addíció. A képen a gyakrabban előforduló F₁ utódok szerepelnek.

Keresztezési programunk másik részében a CS- *A. cristatum* diszómás addíciós vonalak és a gametocid géneket hordozó CS- *Ae. cylindrica* 2C diszómás addíciós vonal 8. ábra szerinti keresztezéséből származó F₂BC₁, illetve a BC₁ x CS keresztezéséből származó F₁ generáció egyedeit vizsgáltuk, mivel ezekben már várható a gametocid gének okozta kromoszóma átrendeződések megjelenése. A növényeket öntermékenyítettük további átrendeződések kialakulásához.



8. ábra Chinese Spring- *Agropyron cristatum* és CS- *Aegilops cylindrica* addíciós vonalak keresztezési sémája. Az ábrán csak a számunkra hasznos genotípusok vannak feltüntetve.

3.2. Alkalmazott módszerek

3.2.1. Citológiai preparátum készítése

A vizsgált növényi anyagokból származó szemeket nedves szűrőpapíron csíráztattuk, majd a csírázásnak indult szemeket 48-72 órán át 2-5°C-on tároltuk, így szinkronizálva a sejtek osztódását. Ezt követően 26°C-os termosztátba helyeztük 26 órára a Petri-csészéket. Az 1-1,5 cm-re nőtt gyökércsúcsokat leszedtük, majd 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 kromoszóma-preparátumokat (Lángné Molnár, 2006).

3.2.2. Növénynevelés és keresztezés fitotroni kamrákban

A vizsgálandó szemeket csíráztatás és gyökérszedés után tápkockákba ültettük, majd 1 hét szobahőmérsékleten történő növénynevelés után 6-8 hétig (a tarackbúzafajok esetén 8 hét, a búza és az addíciós vonalak esetében 6 hét) 4 °C-on vernalizáltuk. A vernalizációs idő letelte után a növényeket tápkockával együtt cserepekbe ültettük, és Conviron PGR-15 (Conviron, Winnipeg, Canada) típusú növénynevelő kamrákban helyeztük el. A növénynevelés a Tischner et al. (1997) által kidolgozott protokoll szerint történt. A növények a bokrosodásig 12 óra nappali megvilágítás mellett (200 μmol/s/m²), valamint 15 °C nappali és 10 °C éjszakai hőmérsékleten fejlődtek, ezután a hőmérsékletet 2-2 °C-kal, a megvilágítás idejét 2 órával növeltük szárba induláskor, virágzáskor, illetve a szemfejlődés kezdetén. Üvegházban (Global Glasshouse Venlo) történő növénynevelés esetén a kezdeti hőmérséklet nappal 11 °C, éjszaka 7 °C volt, amelyet 23/17 °C-ra növeltünk, a kezdeti megvilágítás 13 óra volt, amelyet 16 órára növeltünk a növények beéréséig (12 hét). A keresztezések a fitotroni kamrákban történtek 20-25 °C között. Kasztrálás (kalászkák csúcsi felének levágása, középső virág eltávolítása, a két szélső virág 3-3 portokjának eltávolítása) után az anyanövényeket izoláltuk, majd 2-4 nap múlva a pollenadónak használt levágott kalászokkal pörgetéssel juttattuk a pollent a kasztrált kalászokra, majd újra izoláltuk őket.

3.2.3. Növénynevelés évelőkertben

A szántóföldi növénynevelés Martonvásáron, az ún. évelőkertben történt (GPS koordináták: É47° 18' 40.2", K18° 46' 48.3", 9. ábra) történt. A szemeket a már említett módon csíráztattuk, vernalizációs kezelésnek tettük ki, majd fitotroni kamrákban bokrosodásig neveltük, ezután pedig kiültettük őket a tenyészkertbe. Jelenleg 76 évelő növényt nevelünk kint, melyek között számos *A. cristatum*, *Th. bessarabicum*, *Th. elongatum*, *Th. intermedium*, *A. fragile*, *Ps. spicata*, illetve több *Secale*, és *Hordeum* faj megtalálható.



9. ábra A szántóföldi növénynevelés helyszíne Martonvásáron, az ún. évelőkert. (Fotó: Gaál Eszter, 2018)

3.2.4. DNS izolálás

Az alkalmazott *in situ* hibridizációs módszerekhez és a molekuláris markerek segítségével végzett vizsgálatokhoz szükséges genomi DNS-t 3-4 hetes növények leveléből izoláltuk QuickGene Mini80 (FujiFilm, Japan) készülék alkalmazásával a hozzá tartozó kittel (QuickGene DNA Tissue kit S, Kurabo Industries Ltd., Japán) a gyártó utasításai szerint.

3.2.5. Próba jelölés

A GISH vizsgálatok során az alábbi fajok teljes genomi DNS-ét használtuk fel: *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*, *A. cristatum*, *Ps. spicata*, *T. aestivum* (Mv9kr1, Chinese Spring). A FISH vizsgálatok során a búzafélék körében leggyakrabban alkalmazott repetitív próbákat (pTa71, pSc119.1, Afa-family, HT100.3, pAs1), és különböző mikroszatellit próbákat: (GAA)_n, (CAC)_n, (AGG)_n, (ACT)_n, (ACG)_n, (AAC)_n, (CAG)_n alkalmaztuk. A pTa71 egy a búza riboszomális (18S-5.8S-25S rDNS) génjeit hordozó 9.05 kb hosszú DNS klón (Gerlach és Bedbrook, 1979), amelyet rizs genomi DNS-ből szaporítottunk fel Chang et al. (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 et al. (2005) módszere alapján.

A pSc119.2 próba elsősorban a búza B genomjához, illetve néhány A genomhoz tartozó kromoszómákon mutat erőteljesebb mintázatot, alkalmazásával az összes B kromoszóma azonosítható. A pAs1 egy 1 kb hosszúságú *Ae. tauschii* genomi DNS-ből izolált repetitív szekvencia (Rayburn és Gill, 1986), amely elsősorban a búza D genomjához, illetve elszórtan néhány A genomhoz tartozó kromoszómán mutat mintázatot. Az Afa-family próba egy 260 bp hosszúságú repetitív DNS szakasz, amelyet a pAs1 próba restriktív endonukleázzal történő emésztésével állították elő, mintázata szinte megegyezik a pAs1 próba mintázatával (Nagaki et al., 1995).

Az Afa-family próbát *Ae. tauschii* teljes genomi DNS-ből Nagaki et al. (1995) módszere alapján szaporítottuk fel. A pSc119.2 és az Afa-family (vagy pAs1) próba egyidejű alkalmazásakor a 21 búza kromoszómából 17 beazonosítható (Mukai et al., 1993). 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 et al. (2011) módszere alapján. A munka során alkalmazott primerek neve, szekvenciái, a PCR reakciók profilja, és a keletkezett termékek hossza a dolgozat végén lévő M2. mellékletben található.

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 genomi *in situ* hibridizációs vizsgálatokhoz az alábbi fajok jelölt, teljes genomi DNS-ét használtuk: *A. cristatum*, *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*, *Ps. spicata*. A DNS izolálást a 3.2.4 fejezetben említett módszerrel végeztük. 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.

3.2.6. *In situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizációs vizsgálatokat megelőzően a tárgylemezeket sorrendben a következő előkezeléseknek tettük ki, melynek célja az RNS, a felesleges citoplazma és egyéb fehérjék eltávolítása, illetve a DNS fixálása volt:

1. RNáz kezelés: 37°C-os vízfürdőben végrehajtott 45 perces 10 mg/ml RNáz enzimmel végzett (Sigma-Aldrich) kezelés 2×SSC oldatban
2. Mosás: 2 × 2 perc, 2×SSC oldatban 37°C-on
3. Pepszinkezelés: 1 perc, 1 mg/ml pepszin 10 mM HCl-ban oldva, 37°C-on
4. Mosás: 2 × 2 perc, 2×SSC oldatban 37°C-on
5. Utófixálás: 10 perc, 4%-os paraformaldehid oldatban végezve, szobahőmérsékleten
6. Mosás: 3 × 2 perc, 2×SSC oldatban, szobahőmérsékleten
7. Dehidratálás -20°C-os alkoholsorozatban: 3 perc 70%, 3 perc 90%, 5 perc abszolút etanol, ezután szobahőmérsékleten hagyjuk megszáradni a lemezeket.

Az *in situ* hibridizációs vizsgálatok során használt oldatok összetétele az M3. mellékletben található.

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció és a genomi *in situ* hibridizáció lépései nagymértékben megegyeznek. A hibridizációs keverék 50 v/v% formamidot, 39 v/v% 25%-os dextrán-szulfátot, 10 v/v% 20×SSC-t és 1 v/v% 10%-os SDS-t tartalmazott. GISH esetében 15 µl hibridizációs keverékhez 50-80 ng jelölt genom specifikus próbát, illetve blokkoló DNS-ként a jelölt próba mennyiségéhez viszonyítva 40-80-szoros búza genomi DNS-t adtunk, steril vízzel 20 µl-re kiegészítve. FISH esetében a 15 µl hibridizációs keverékhez az alkalmazott jelölt repetitív DNS szekvenciák, illetve mikroszatellit alapú próbák hármas kombinációban összesen 10-20 ng DNS-t, míg blokkoló DNS-ként 5 ng lazac sperma DNS-t adtunk, steril vízzel 20 µl-re kiegészítve. Az összemért hibridizációs keverék és DNS-ek elegyét FISH alkalmazása során 83°C-on 7 percig, GISH vizsgálat során 85°C-on 9 percig PCR készülékben denaturáltuk, majd a preparátumokra

mérve a kromoszómákat is denaturáltuk FISH alkalmazása során 73°C-on 6 percig, míg GISH vizsgálat során 78°C-on 3 percig.

A denaturációt követően a preparátumokat egy éjszakán át inkubáltuk; FISH során 37°C-on, GISH alkalmazásánál 42°C-on. A nem specifikusan hibridizált szekvenciák poszthibridizációs lemosása 3 × 5 perc 4×SSC Tween oldattal és 1 × 5 perc 1×PBS oldattal történt 42°C-on. A jelölt próbák detektálásához TNB-ben oldott, antitesthez kötött fluoreszcens festéket alkalmaztunk egy 45 perces, 37°C-os inkubáció során. A digoxigeninnel jelölt próbák esetében antidigoxigenin-rhodamine-Fab (vörös) jelölt antitestet (Roche), míg a biotinnal jelölt próbák esetében Alexa Fluor-488-Streptavidine (zöld) jelölt antitestet (InVitrogen) alkalmaztunk. Az inkubációs idő letelte után egy 3 × 5 perces 4×SSC Tween-20 oldattal, majd egy 1 × 5 perces 1×PBS oldattal történt mosás következett szobahőmérsékleten. A kromoszómák kontrasztfestése 1µg/ml DAPI-val történt. A tárgylemezeket a hibridizációs mintázatok rögzítéséig 4°C-on sötétben tároltuk. A hibridizációs mintázatok vizsgálata DAPI (Zeiss Filter Set 49), FITC (Zeiss Filter Set 38) és Rhodamine (Zeiss Filter Set 20) szűrőkkel ellátott Zeiss AxioImager M2 epifluoreszcens mikroszkóppal, míg a jelek rögzítése Zeiss AxioCam MRm CCD kamerával történt. A fotók kiértékeléséhez az AxioVision 4.8.2 szoftvert használtuk. Az idiogramokat minden vizsgált vonal esetében legalább 20 metafázisban lévő sejt kromoszómáinak hibridizációs mintázata és a mért kararányok alapján készítettük el.

3.2.7. COS markerekkel végzett vizsgálatok

A COS markerekkel történt vizsgálatokhoz a már korábban (3.2.4 pontban) ismertetett módszerrel izoláltuk genomi DNS-t, amelyeket 50 ng/µl koncentrációban vittük fel egy 96-lyukú PCR plate-re. Összesen 114 COS markert alkalmaztunk a vizsgálataink során, ezeknek a részletes adatait (primer szekvencia, PCR kondíciók) a dolgozat végén található M4. melléklet tartalmazza. E markereket két publikus COS marker adatbázisból (Wheat Genetic Improvement Network (WGIN), illetve a Tools and Resources (TR) collections) úgy választottuk ki, hogy azok lefedjék a búza 1-7 homeológ csoportjainak kromoszómáit (Howard et al., 2011; Quraishi et al., 2009). A PCR reakciókat egy Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) készülékben végeztük.

A 15 µl reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta:

- 0,075 µl Taq-polimeráz (0,315 U, 5Prime GmbH, Hamburg, Germany)
- 1,5 µl 10 × PerfectTaq Plus PCR puffer (5Prime GmbH, Hamburg, Germany)
- 0,5-0,5 µl forward illetve reverse primer (0,4 -0,4 µM)
- 1,5 µl genomi DNS (75 ng)

- 0,3 µl 10 mM dNTP mix.
- 10,625 µl MQ víz

Az alkalmazott touchdown PCR protokoll (Molnár et al., 2014) a következő volt:

- 94 °C – 2 perc
- 10 ciklus:
 - 94 °C – 0,5 perc
 - $T_a + 5$ °C – 0,5 perc (minden ciklusban 0,5°C csökkentéssel)
 - 72 °C – 1 perc
- 30 ciklus:
 - 94 °C – 0,5 perc
 - $T_a - 0,5$ perc
 - 72 °C – 1 perc
- 72 °C – 2 perc
- 4 °C

A PCR reakciók eredményeként kapott amplikonokat és a megfelelő (500 bp vagy 1500 bp) DNS létrát egy kapilláris elektroforézis elven működő 96 csatornás fragment analizátor segítségével (Advanced Analytical Technologies, Ames, USA) választottuk szét. A PCR termékeket a dsDNA 905, ill. 910 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies, Ames, USA) alkalmazásával választottuk szét a gyártó által megadott módszertani leírásnak megfelelően. A géleképeket ProSize 2.0 szoftver alkalmazásával értékeltük ki.

3.2.8. 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 (IWGSC, 2018) BLAST algoritmus segítségével történt hasonlósági keresés alapján (<https://urgi.versailles.inra.fr/blast/>). A BLASTn keresés eredményei közül a megfelelő (E-érték $< 2,8 \cdot 10^{-8}$, azonosság $> 82\%$ és az illesztési hossz > 100 bp alapján) találatokat választottuk ki. A markerek relatív sorrendjét és a genetikai távolságukat (cM) az EST contigok alapján határoztuk meg, amelyeket a GenomeZipper (v.5) adatbázisból (IWGSC, 2014) kerestünk ki.

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.

3.2.9. 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 vizsgálatokat a Kalászos Gabona Nemesítési Osztály munkatársaival együtt végeztük. A fertőzés során használt levélrozsda uredospórákat a kontrollként is használt, fogékony 'Alcedo' búzafajtán szaporítottuk fel. Az így kapott fertőző anyag pontos rászöszetetele nem ismert, azonban közel-izogén vonalak több éves vizsgálati eredményei alapján az *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29* és *Lr35* rezisztenciagének hatásosak ellene (Vida et al., 2011). A növényeket a vetést követő nyolcadik napon egyleveles állapotban fertőztük az uredospórák vizes szuszpenziójával, majd a fertőzést követő tizedik napon értékeltük. A növények fertőzöttségét a Stakman et al. (1962) által kidolgozott skála alapján értékeltük ki (10. ábra):

0: immunis (nincs tünet),

∴: nagyon rezisztens (hiperszenzitív foltok megjelenése),

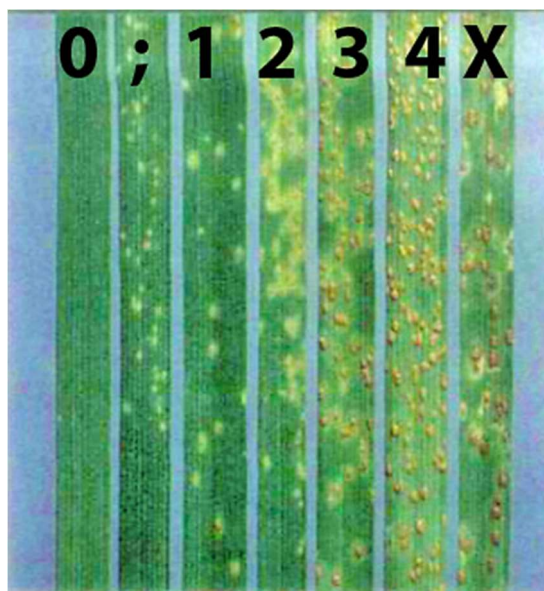
1: rezisztens (apró uredotelepek, hiperszenzitív foltok megjelenése),

2: mérsékelten rezisztens (apró/közepes uredotelepek megjelenése, zöld levélszigetek körül nekrotikus foltok megjelenése),

3: mérsékelten fogékony (közepes uredotelepek, nekrotikus foltok nélkül),

4: fogékony (nagy uredotelepek, nincsenek nekrotikus foltok),

X: heterogén reakció (több reakciótípus egyszerre).



10. ábra Búza levélrozsda-fertőzöttségének Stakman-skála szerinti osztályozása (Mcintosh et al., 1995; Stakman et al., 1962)

3.2.10. Statisztikai elemzés

A tarackbúzafajok COS markerekkel végzett vizsgálatok szerinti rokonsági viszonyait dendrogramon ábrázoltuk. A dendrogram elkészítéséhez a markeres vizsgálatok eredményeként keletkezett PCR termékeket binárisan kódoltuk (1: adott fragmentum jelen van; 0: adott fragmentum nincs jelen), majd az adatokból kiszámoltuk a genomokra vonatkozó Jaccard-féle hasonlósági koefficiens (Kosman és Leonard, 2005):

$$J(i_1, i_2) = \frac{a}{a+b+c}, \text{ ahol}$$

a: azoknak a termékeknek a száma, amelyek mindkét minta (i_1 , és i_2) esetében keletkeztek

b: azoknak a termékeknek a száma, amelyek i_1 esetében képződtek, de i_2 esetében nem

c: azoknak a termékeknek a száma, amelyek i_2 esetében képződtek, de i_1 esetében nem

Minél közelebb van két genom közötti koefficiens az 1-hez, annál hasonlóbb a két genom.

A dendrogram elkészítését a RaxmlGUI2.0 beta 14 szoftverrel (Silvestro és Michalak, 2012), míg a dendrogramok ábrázolását a MEGA-X szoftverrel végeztük (Kumar et al., 2018).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. Kariotipizálási vizsgálatok

Az *Agropyron cristatum*, *Thinopyrum bessarabicum* és *Pseudoroegneria spicata* fajok kromoszómáinak azonosításához az egyes *Triticeae* fajok molekuláris citogenetikai vizsgálata során korábban alkalmazott repetitív DNS próbákat (pSc119.2, pTa71, Afa-family, pAs1, HT100.3) illetve mikroszatellit ismétlődéseket ((GAA)_n, (CAC)_n, (AGG)_n, (ACT)_n, (ACG)_n, (AAC)_n, (CAG)_n) használtuk. Az alkalmazott fluorokrómok három szín használatát tették lehetővé a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) során, ezért a próbákat hármascsoportokban teszteltük. A vizsgált fajok kromoszómáinak homeológ csoportokba sorolása nem történt meg az adott fajok addíciós vonalainak hiányában. Addíciós vonalakat a *Ps. spicata* esetében információink szerint nem sikerült előállítani. Az *A. cristatum* kariotípusának elkészítéséhez figyelembe vettük Said et al. (2018) által készített single-gene FISH alapú kariotípust, amelyhez 45 ortológ gén cDNS szekvenciáinak segítségével kromoszóma szinten vizsgálták a búza és az *Agropyron* P kromoszómái közti homeológ kapcsolatokat. A tarackbúzákban fennálló fajon belüli genetikai diverzitás miatt azonban csak részlegesen sikerült a kariotípusokat egymásnak megfeleltetni. Ezek alapján e két faj kromoszómáit betűkkel különböztettük meg a kariotípusok esetén. A *Th. bessarabicum* kromoszómáit SNP-Array módszerrel Grewal et al. (2018) homeológ csoportokba sorolták, illetve pSc119.2 és pAs1 próbával készítették kariotípust, ezt felhasználva a *Th. bessarabicum* kromoszómáit számszerűen azonosítottuk.

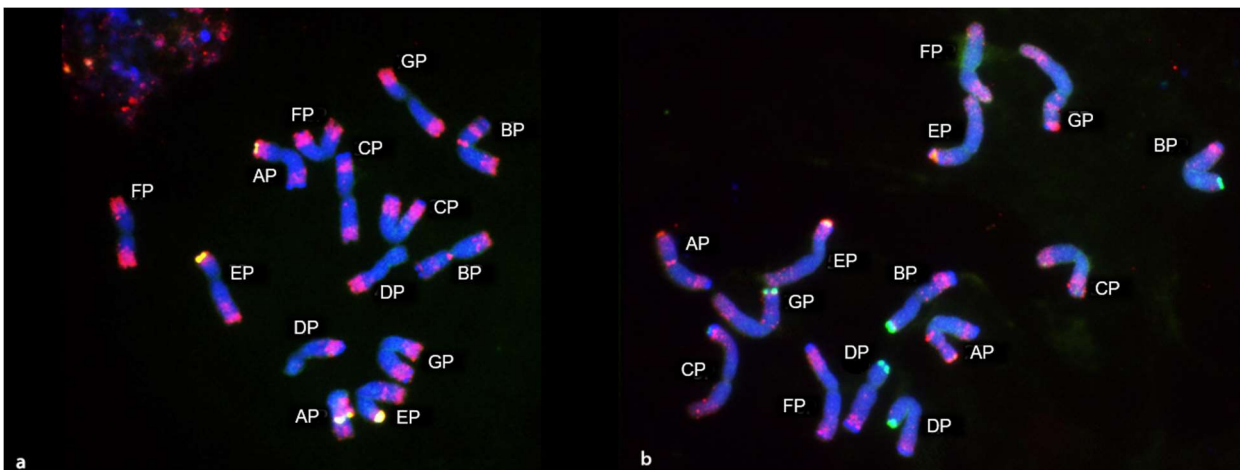
4.1.1. Az *Agropyron cristatum* kromoszómáinak azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel

Az *Agropyron cristatum* esetében két különböző földrajzi helyről származó vonal (MvGB 1509, MvGB 1521) idiogramját készítettük el és vizsgáltuk a hibridizációs mintázatban jelentkező hasonlóságot és különbözőséget (polimorfizmust) a két vonal közt (11. és 12. ábrák).

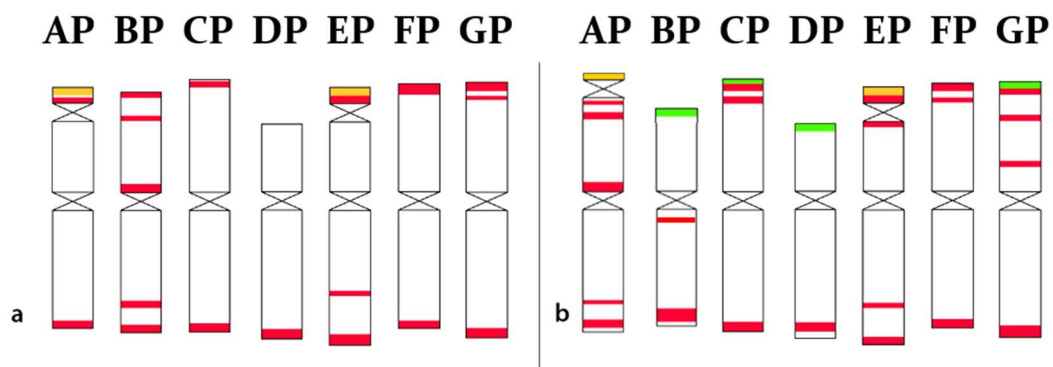
A kapott hibridizációs mintázat alapján minden kromoszóma jól megkülönböztethető egymástól. A diploid *Agropyron cristatum* kromoszómái a szubmetacentrikus DP kromoszóma kivételével metacentrikusnak tekinthetőek. Erős intenzitású Afa-family jeleket figyeltünk meg a legtöbb kromoszóma telomér régióiban, illetve néhány interkaláris régióban, valamint az AP kromoszóma centroméra régiójában.

Két kromoszómán (AP, EP) megfigyelhető volt a nukleólusz organizáló régió (NOR-régió). Az MvGB 1521-es vonal mindkét kromoszómáján jól látható a NOR-régió, míg az MvGB 1509-es genotípus AP kromoszómáján lévő NOR-régió nem minden sejtben volt látható. A két genotípus

mintázata között számos eltérést tapasztaltunk. Az MvGB 1521-es vonal esetében nem tudtuk megfigyelni azokat a pSc119.2 hibridizációs jeleket, melyeket az MvGB 1509-es vonal BP, CP, DP és GP kromoszómáinak rövid karján detektáltunk. Az MvGB 1521-es vonal kromoszómáin az Afa-family hibridizációs jelek minden esetben a kromoszómák disztális részén voltak kimutathatóak, míg az MvGB 1509-es genotípusnál ugyanezen jelek inkább proximálisabb régiókra voltak jellemzőek. A GP kromoszóma rövid karjának disztális részén található egy pSc119.2 jel, míg az interkaláris részben 2 db Afa-family jel található az MvGB 1509-es vonalnál, míg az MvGB 1521-es vonalnál ezek a jelek hiányoztak.



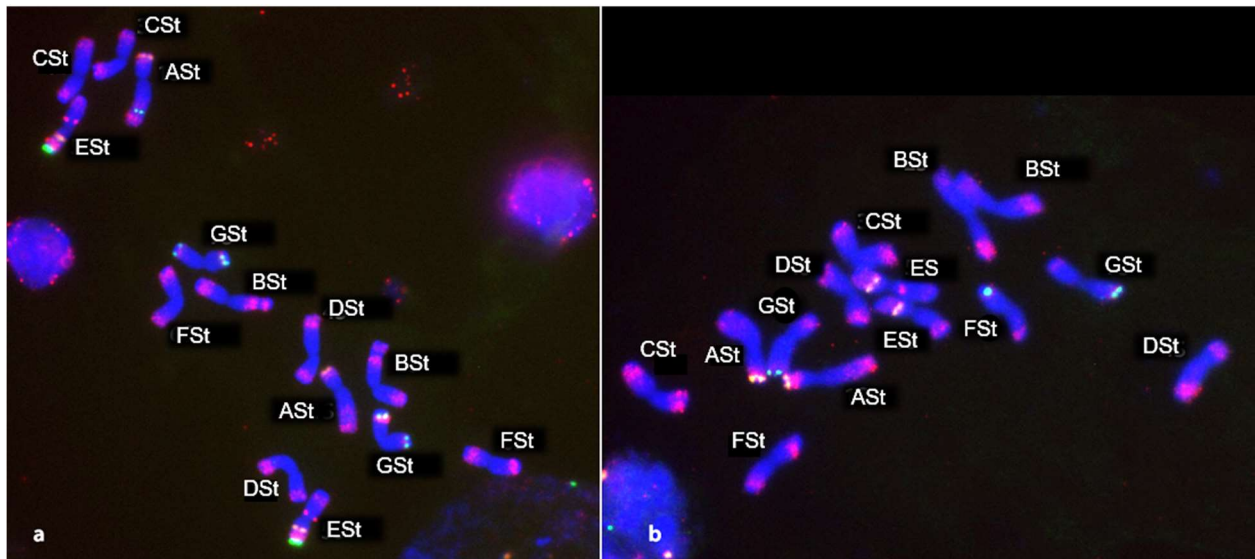
11. ábra Az *Agropyron cristatum* eltérő vonalainak (a, MvGB 1521; b, MvGB 1509) mitotikus kromoszómáinak azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). Az azonosításhoz az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) próbákat használtuk, a kromoszómák háttérfestése DAPI-val (kék) történt. A skála 10 μ m-nek felel meg.



12. ábra Az *Agropyron cristatum* a) MvGB 1521 és b) MvGB 1509 vonalának idiogramja. A színek az alkalmazott próbáknak megfelelően: Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga).

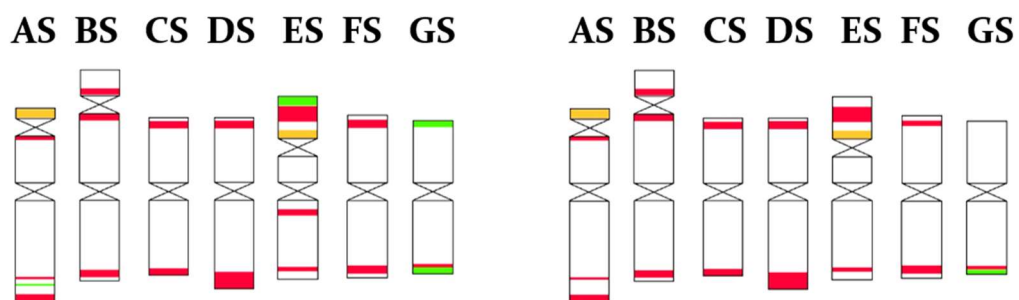
4.1.2. A *Pseudoroegneria spicata* kromoszómáinak azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel

A *Pseudoroegneria spicata* faj kromoszómáinak vizsgálata során két eltérő földrajzi helyről származó vonal (MvGB 1615, MvGB 1607) idiogramját készítettük el és vizsgáltuk a hibridizációs mintázatban bekövetkező polimorfizmust a két vonal között. (13. és 14. ábrák).



13. ábra A *Pseudoroegneria spicata* eltérő vonalainak (a, MvGB 1615; b, MvGB 1607 mitotikus kromoszómáinak azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). Az azonosításhoz az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) próbákat használtuk, a kromoszómák háttérfestése DAPI-val (kék) történt. A skála 10 μ m-nek felel meg.

A vonalak között azonosított, hibridizációs mintázatban jelentkező polimorfizmus nagymértékű volt, hasonlóan az *A. cristatum*-hoz. A három alkalmazott DNS próba segítségével minden kromoszóma megkülönböztethető volt (13. ábra).



14. ábra A *Pseudoroegneria spicata* 2 vonalának idiogramja, bal oldalon az MvGB1615, jobb oldalon az MvGB1607 vonal. A színek az alkalmazott próbáknak megfelelően: Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga).

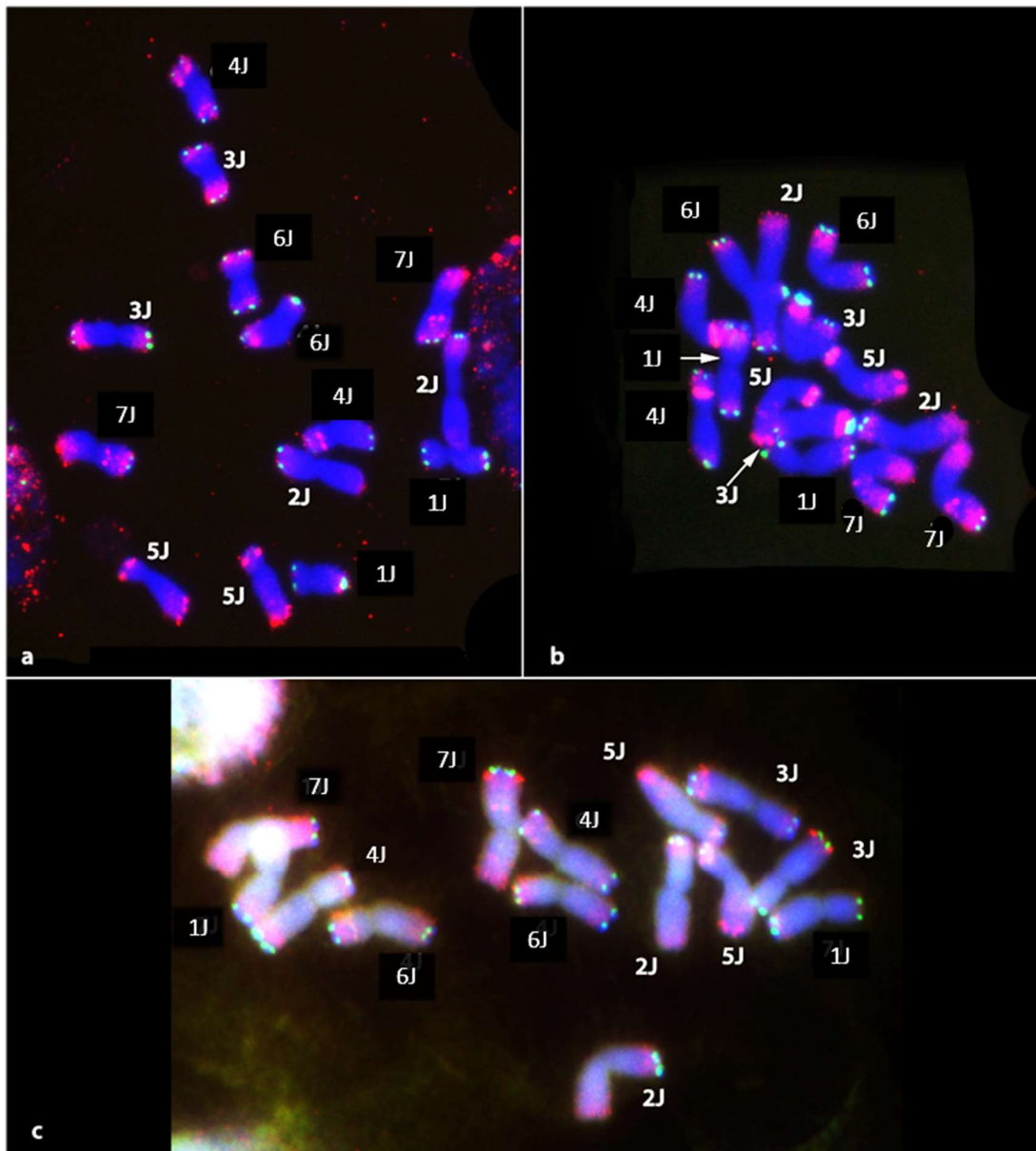
Az AS szubmetacentrikus kromoszómán egy keskeny szatellit található, intenzív pTa71 jellel. A kromoszóma mindkét karjának telomér régiójában Afa-family jeleket tapasztaltunk, a hosszú kar szubterminális régiójában szintén Afa-family jelet, illetve a két Afa-family jel között az MvGB 1615 vonal kromoszómáján egy határozott pSc119.2 jel is megfigyelhető volt, de csak az egyik kromoszómán.

A BS kromoszómán szintén felfedezhető volt egy másodlagos befűződés, de a pTa71 jelet nem tudtuk kimutatni. A kromoszómán telomérikus pozícióban Afa-family jeleket mutattunk ki. A CS, DS és FS kromoszómák hasonló hibridizációs mintázatuk ellenére megkülönböztethetők voltak egymástól. Mindhárom kromoszómán, az egyes karok teloméráján Afa-family jeleket detektáltunk. A CS és a FS kromoszóma metacentrikus, míg a DS kromoszóma szubmetacentrikus. A FS kromoszómán elhelyezkedő Afa-family jelek halványabbak voltak, mint a CS kromoszóma karokon, illetve a centromérához közelebb, szubtelomér régióban helyezkedtek el. A DS kromoszóma hosszú karján intenzívebb jeleket tapasztaltunk, mint a rövid karon.

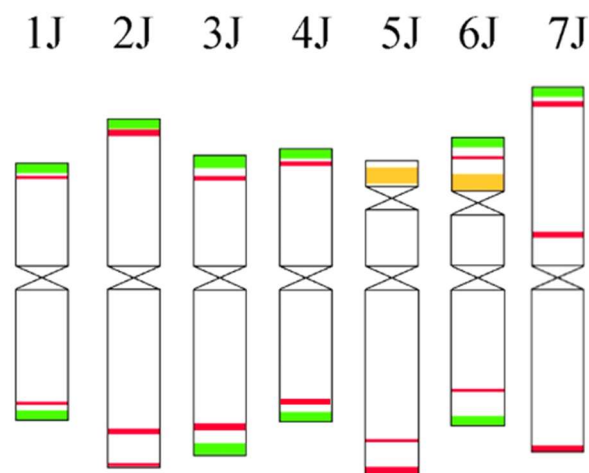
Az ES kromoszóma rövid karján egy széles szatellit helyezkedik el, pTa71 jel jelenlétében. A szatellit telomér régiójában intenzív pSc119.2 jelet mutattunk ki az MvGB 1615-ös vonal kromoszómáján. Mindkét vonal ES kromoszómáján elhelyezkedő szatellit interkaláris részében egy Afa-family sáv is látható volt, ami az MvGB1607-es vonal kromoszómáján jóval gyengébbnek bizonyult. A hosszú kar telomér régiójában mindkét vonal ES kromoszómáján megfigyelhető volt egy Afa-family jel, illetve az MvGB1615-ös vonal kromoszómáján egy határozott interkaláris Afa-family jel is megjelent. A GS metacentrikus kromoszóma hosszú karjának telomér régiójában egy pSc119.2 jelet, szubtelomér régióban egy Afa-family jelet tapasztaltunk, mindkét vonal esetében. Az MvGB1615-ös vonal GS kromoszóma rövid karjának telomér régiójában egy pSc119.2 jelet tapasztaltunk, amely hibridizációs jel az MvGB1607-es vonal esetében hiányzott.

4.1.3. A *Thinopyrum bessarabicum* kromoszómáinak azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel

A *Thinopyrum bessarabicum* faj kromoszómáinak vizsgálata során három eltérő földrajzi helyről származó vonal (MvGB 1703, MvGB 1705, MvGB 1706) idiogramját készítettük el és vizsgáltuk a hibridizációs mintázatban jelentkező polimorfizmust a három vonal közt (15. és 16. ábrák). A *Th. bessarabicum* kromoszómáinak morfológiája igen változatos, az 1J, és a 2J metacentrikus, a 3J, 4J és 7J szubmetacentrikus, míg az 5J és 6J akrocentrikus kromoszómák. A kapott hibridizációs mintázat alapján a kromoszómák jól elkülöníthetők és egyedileg azonosíthatók voltak. A három vonal között nem tapasztaltunk polimorfizmust a hibridizációs mintázatban, ellentétben a korábban tárgyalt *A. cristatum* faj kromoszómáinak vizsgálatával.



15. ábra A *Thinopyrum bessarabicum* eltérő vonalainak (a, MvGB 1703; b, MvGB 1706; c, MvGB 1705) mitotikus kromoszómáinak azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). Az azonosításhoz az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) próbákat használtuk, a kromoszómák háttérfestése DAPI-val (kék) történt. A skála 10 μ m-nek felel meg.



16. ábra A *Thinopyrum bessarabicum* idiogramja. A színek az alkalmazott próbáknak megfelelően: Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga).

A többi tarackbúzafajtól eltérően a *Th. bessarabicum* kromoszómáin a pSc119.2 próba jól elkülöníthető jelet adott az egyik (1J, 2J, 5J) vagy mindkét (3J, 4J, 6J, 7J) kar telomér régiójában. Az 1J kromoszóma hosszú karján egy telomér pozícióban elhelyezkedő pSc119.2 jel, egy szubtelomér, illetve egy interkaláris Afa-family jel, a rövid kar telomér régiójában egy Afa-family jelet figyeltünk meg. A 2J kromoszóma rövid karjának telomér régiójában pSc119.2 jelet, szubtelomér régiójában Afa-family jelet, míg a hosszú karjának telomér és szubtelomér régiójában Afa-family jelet tapasztaltunk. A 3J és a 7J kromoszóma karok telomér régiójában pSc119.2 jelet, míg a szubtelomér régióban Afa-family jelet azonosítottunk. A 4J kromoszóma mindkét karjának telomér régiójában egy-egy pSc119.2 jel, illetve a rövid karjának szubtelomér régiójában Afa-family jel volt megfigyelhető.

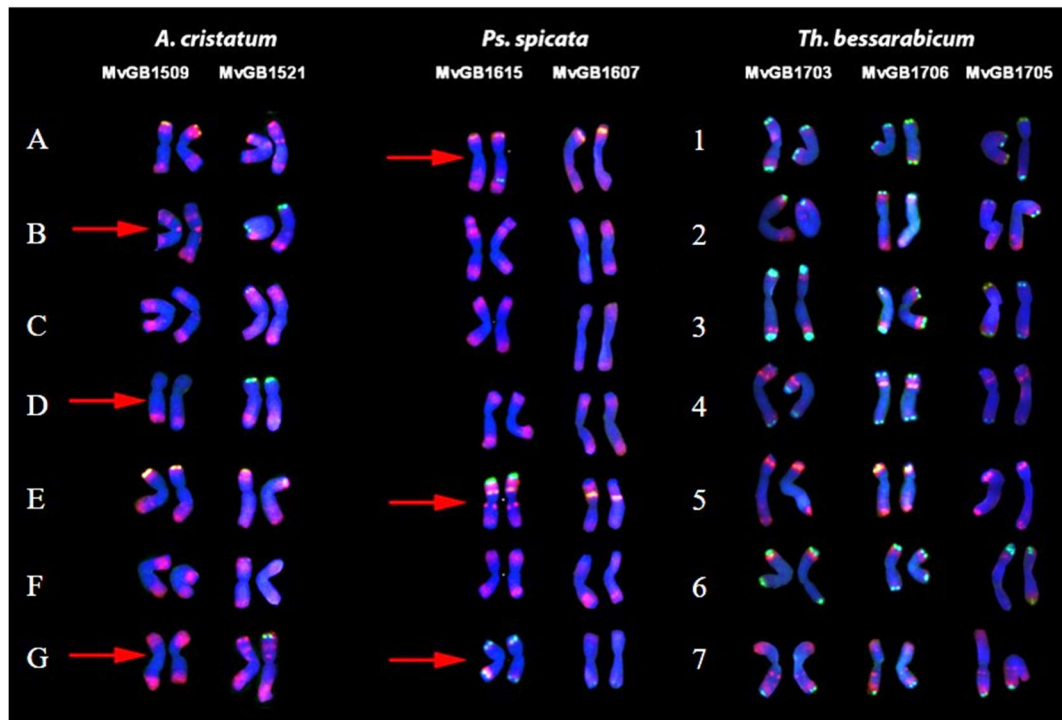
A *Th. bessarabicum* genomja két NOR régióval rendelkezik, a kisebb az 5J, míg a nagyobb a 6J kromoszómán helyezkedik el. Mindkét kromoszómán megtalálható a 45S rDNS lókuszt is. Az 5J kromoszóma hosszú karján egy intenzív telomér, és egy szubtelomér régióban elhelyezkedő Afa-family jel volt azonosítható. A 6J kromoszómán a pSc119.2 DNS próba a szatellit régióban és a hosszú kar telomér régiójában, míg az Afa-family mindkét kar interkaláris részén mutatott hibridizációs mintázatot.

4.1.4. A kariotipizálási vizsgálatok eredményeinek megvitatása

A búza harmadlagos génforrásaihoz tartozó tarackbúzafajok számos agronómiailag hasznos gént hordoznak, amelyek felhasználhatók a búza nemesítési programjaiban. A minél hatékonyabb keresztezési programokhoz fontos a búzába átvitt idegenfajú kromatin azonosítása. Az idegen kromoszóma, ill. kromoszómaszakaszok azonosítására a leggyakoribb módszer a

fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH), amellyel különböző repetitív DNS próbákat alkalmazva specifikus mintázatokat kapunk a kromoszómákon (Pedersen és Langridge, 1997; Rayburn és Gill, 1987). A tarackbúzafajok esetében igen kevés fajnak készült el eddig a kariotípusa (Grewal et al., 2018; Linc et al., 2012), ezért is tűztük ki célul 3 tarackbúzafaj (*A. cristatum*, *Th. bessarabicum*, *Ps. spicata*) kariotipizálását. Az *A. cristatum* kariotípusának elkészítéséhez figyelembe vettük a Said et al. (2018) által készített single-gene FISH alapú kariotípust. A kariotípus elkészítéséhez 45 ortológ gén cDNS szekvenciáinak segítségével kromoszóma szinten vizsgálták a búza és az *Agropyron* P kromoszómái közti homeológ kapcsolatokat. A cDNS hibridizációs jelek kromoszómákon történő azonosításához a szerzők alkalmazták az általunk is használt pSc119.2 és 45S rDNS próbákat alkalmazták. Eredményeikkel összehasonlítottuk az általunk készített kariotípusokat. Azonban a tarackbúzában fennálló fajon belüli genetikai diverzitás miatt ez csak részlegesen sikerült. Az MvGB1509-es vonal esetén a két kariotípus relatíve jól megfeleltethető egymásnak, a 3P kromoszóma kivételével, aminél a pSc119.2 jel, a mi esetünkben a rövid karon található, míg Said et al. (2018) publikációja esetén a hosszú karon. Az általunk vizsgált másik vonal, az MvGB1521 esetén azonban ez az egyezés nem volt tapasztalható, ugyanis e vonal kromoszómái nem hordoztak pSc119.2 jeleket.

A búza rokonsági körében a leggyakrabban alkalmazott repetitív DNS próbák a citológiai vizsgálatok során a pSc119.2, Afa-family és a pTa71. Ezt a három próbát alkalmazva megállapíthattuk, hogy a próbák kromoszómákon megjelenő hibridizációs mintázata alapján az egyes kromoszómák megkülönböztethetők egymástól. A mikroszatellit próbák azonban, ellentétben más *Triticeae* fajokkal (kenyérbúza, *Aegilops*, *T. monococcum*, *Secale*) a tarackbúzákon nem mutattak specifikus hibridizációs mintázatot. A legösszetettebb mintázatot a *Ps. spicata* kromoszómáin tapasztaltuk, míg az *A. cristatum* esetében volt a mintázat a legegyszerűbb, ám mégis elegendő a kromoszómák megkülönböztetésére. Vizsgáltuk e fajok eltérő földrajzi származású vonaljai 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 (17. ábra).



17. ábra A vizsgált fajok FISH alapú kariotípusai és a kariotípusok közti különbségek. A kromoszómák jelölése Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) próbával történt. A kromoszómák háttérfestése DAPI-val (kék) történt. A piros nyilak a polimorfizmusokat jelölik az egyes fajokon belül.

A mikroszatellit próbákkal újrahibridizálva a tárgylemezeket, a vizsgált tarackbúzafajokon nem tapasztaltunk hibridizációs jeleket. 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., 2008a). Más *Triticeae* fajokon (*Aegilops*, *T. monococcum*, rozs, búza) azonban sikeresen alkalmaztak már SSR próbákat (Cuadrado et al., 2008; Cuadrado és Schwarzacher, 1998; Megyeri et al., 2012; Molnár et al., 2011; Pedersen és Langridge, 1997; Schneider et al., 2010). Ez a különbség valószínűleg filogenetikai okokra vezethető vissza. A *Triticeae* fajok kb. 25 millió évvel ezelőtt váltak szét a többi fűféléktől, és nem sokkal később az *Agropyron* fajok már egy önálló csoportot képviseltek (Feldman és Levy, 2015). Ezenkívül a fajok különböző klimatikus viszonyú helyekhez való adaptációjából is adódhat e különbség. A *Triticum/Aegilops* fajok többsége a Termékeny Félhold változó klímájú területén alakult ki, amely az egyéves egyedfejlődési ciklusnak kedvezett. Ezen fajok környezeti adaptációja a genom szintjén együtt járhatott a mikroszatellit ismétlődések felszaporodásával a DNS polimeráz „csúszása” (slippage) következtében (Levinson és Gutman, 1987), melyek további genombeli elterjedését elősegíthette a transzpozabilis elemek fokozott aktivitása is, melyek képesek gén-, és kromoszóma szintű kromoszóma átrendeződések kiváltására is.

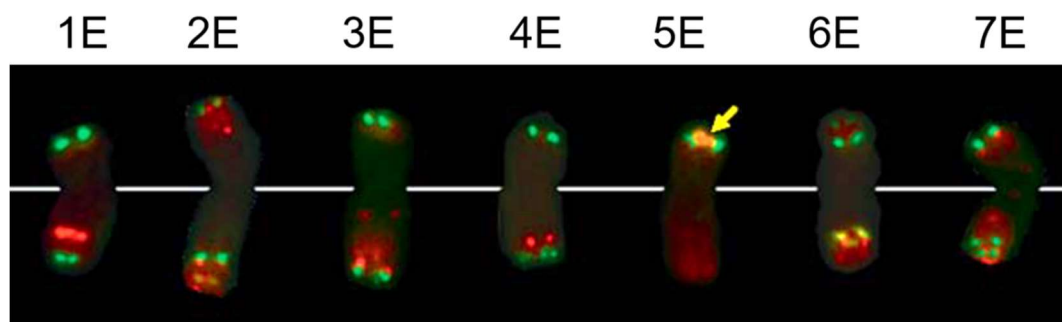
Nagy valószínűséggel egy stabil klimatikus viszonyokkal rendelkező élőhelyhez adaptálódott fajban, ahol az évelő jelleg és a vegetatív szaporodás dominálhat, mint amilyenek a tarackbúzák, a fentiekhez hasonló genommodosulások nem játszódhattak le.

A 45S rDNS lókuszt a 18S-5.5S-25S rRNS gének, míg az 5S rDNS lókuszt pedig az 5S rRNS gének ismétlődő szekvenciáit tartalmazza. Ezek a gének nagyszámban ismétlődnek és igen konzerváltak, így jól alkalmazhatók rokoni viszonyok vizsgálatára és kromoszóma azonosításra is (Jiang és Gill, 1994; Lapitan, 1992). A 45S rDNS lókusztok a legtöbb növény esetében a kromoszómák másodlagos befűződéseiben (NOR régió) helyezkednek el (Roa és Guerra, 2012), míg az 5S rDNS lókusztok sok esetben a 45S rDNS-t tartalmazó kromoszómán találhatóak, azonban más kromoszómákon is előfordulnak. A két gén *in situ* hibridizációval is kimutatható a pTa71 próbával a 45S, és a pTa794 próbával az 5S esetében (Badaeva et al., 2015). A *Triticeae* fajok többségében az 1-es, 5-ös vagy 6-os homeológ csoportba tartozó kromoszómán helyezkedik el a NOR régió, a kenyérbúza esetében az 1B és 6B rövid karján, illetve az 5D rövid karján és az 1A kromoszómán található NOR régió (Badaeva et al., 1996; Dvorak et al., 1984). Appels et al. (1980) az 1B, 6B és 5D kromoszómákon talált NOR régiót a Chinese Spring búzafajta esetében, illetve a rozs 1R, az árpa 5H és 6H kromoszómáján. *Aegilops* fajok esetén például az 1U és az 5U kromoszómára (Castilho és Heslop-Harrison, 1995), illetve az 1M és 6M kromoszómára (Badaeva et al., 1996) térképezték a 45S rDNS lókusztokat. *Th. distichum* esetén 45S rDNS lókuszt az 5-ös és 6-os, míg 5S rDNS lókuszt az 5-ös homeológ csoportra térképezték (Fominaya et al., 1997). A *Th. elongatum* esetében két NOR régió található, az 5E és 6E kromoszómákon, bár a 6E kromoszómán nem volt tapasztalható pTa71 jel (Sepsi et al., 2008b), míg az 1E és 5E kromoszómára 5S rDNS lókuszt térképezték (Dvorak et al., 1989).

Vizsgálataink során a *Th. elongatum*-hoz nagyon közeli genetikai viszonyban álló *Th. bessarabicum* esetén is az 5-ös és 6-os homeológ csoporton tapasztaltuk a NOR régiót, mindkét helyen pozitív pTa71 jellel, illetve a 2-es homeológ csoporton találtunk egy határozott másodlagos befűződést pTa71 jel hiányában. A *Ps. spicata* esetében három homeológ csoporton (AS, BS, ES) mutattuk ki a NOR régiókat, az AS és ES esetében tapasztaltunk pTa71 jelet is, míg a BS esetén nem. Murphy (2007) vizsgálatai során három *Ps. spicata* vonal közül kettő esetében tapasztalt két pár kromoszómán is másodlagos befűződést, a harmadik vonal esetében csak egyet, és azt sem minden sejt esetében. Az *A. cristatum* AP és EP kromoszómáin helyezkedik el a két NOR régió, az MvGB1509-es vonal esetében mindkét kromoszómán tapasztaltunk pTa71 jelet, míg az MvGB1521-es vonalnál csak az 5P esetén volt pTa71 jel. Vizsgálataink során nem minden esetben tapasztaltunk NOR régiót, ami összhangban van korábbi vizsgálatok során tapasztaltakkal (Badaeva et al., 2015; Said et al., 2014; Schulz-Schaeffer és Jurasits, 1962; Yang et al., 2014).

Az E és J genom hasonlósága több évtizede foglalkoztatja a kutatókat, számos vizsgálat született már e két genom rokonsági kapcsolatáról. Míg Dvorak (1981) és Dewey (1984) a két genom összevonása mellett érveltek, addig más kutatások az ellenkezőjét támasztották alá. Jauhar (1988) diploid (JE), triploid (JJE) és amfiploid (JEE) hibrid növények esetében alacsony százalékban tapasztalt a két genom kromoszómái közötti párosodást, illetve a diploid hibrid teljes sterilitása miatt a két genom különbözőségét állapította meg. Búza-*Th. bessarabicum* (AABBDDJJ), illetve búza-*Th. elongatum* (AABBDDDEE) amfiploid növények keresztezéséből származó hibrid növény (AABBDDJE) esetében nem tapasztaltak meiózis vizsgálata során párosodást a J és az E kromoszómák között (Forster és Miller, 1989). Ebben és más hasonló keresztezési vizsgálatok során is tapasztalták a *Ph1* gén erőteljes kromoszómapárosodás gátló hatását az E és J kromoszómák között, amely alapján e két genom is legfeljebb homeológ lehet (Jauhar, 1990). Az 5S rDNS-t érintő vizsgálatok alapján is a két genom különbözőségét állapították meg (Kellogg et al., 1996).

Vizsgálataink során 3 eltérő *Th. bessarabicum* vonal FISH kariotípusát készítettük el. Bár találtunk a három vonal között kisebb különbségeket, lényeges eltérést nem tapasztaltunk (15. és 16. ábrák), A *Th. elongatum* elkészült kariotípusával összehasonlítva azonban számos eltérést tapasztaltunk (18. ábra). Legszembetűnőbb különbség az 5-ös és 6-os homeológ csoportot érinti. Mindkét genomban e két kromoszóma tartalmazza a NOR régiót, ám a 6E esetében nem tapasztalható pTa71 jel (Linc et al., 2012), míg a *Th. bessarabicum* esetében mindkét kromoszóma határozott NOR régióval és pTa71 jellel rendelkezett. Ezek alapján is valószínűsíthető az E és J genom különbözősége.



18. ábra A *Th. elongatum* kariotípusa fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). Az azonosítás az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) próbákkal történt. (Linc et al., 2012)

Vizsgálataink során számos fajon belüli FISH polimorfizmust tapasztaltunk a tarackbúzafajok genomjában, amely a diploid fajok eltérő földrajzi származásának következménye lehet. A legtöbb

fajon belüli polimorfizmust az *A. cristatum* esetében találtuk (AP, DP, GP), a legkevesebbet a *Th. bessarabicum* esetén tapasztaltuk (6J) (17. ábra).

4.2. COS markerekkel végzett vizsgálatok

4.2.1. 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* két vonalának, és a *Ps. spicata* három vonalának genomját hasonlítottuk össze COS markerekkel. A felhasznált COS markereket két nyilvánosan elérhető forrás alapján választottuk ki, úgy hogy a búza minden homeológ csoportját lefedjék. Ez alapján 112 markert választottunk ki (M4. melléklet), amelyek közül 97 marker esetében kaptunk PCR terméket a 8 vizsgált faj genomjának legalább egyikében, 15 marker esetében nem volt termék. A 97 marker összesen 357 amplikont eredményezett (1-10 termék/marker).

A *Th. elongatum* vizsgálata során 82 marker (112 lókuszt) esetében tapasztaltunk terméket, amiből 43 (53 lókuszt) bizonyult polimorfának a búzához viszonyítva (>5bp különbség). A *Th. bessarabicum* esetében 82 marker (109 lókuszt) eredményezett PCR terméket, ebből 44 (52 lókuszt) bizonyult polimorfának. 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 az MvGB 1617-es vonal esetében 56 marker (71 lókuszt), az MvGB 1607-es vonalban 57 marker (76 lókuszt), míg az MvGB 1615-ös vonalnál 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 polimorfának a búzához képest.

A vizsgált tarackbúzafajok rokonsági viszonyait dendrogramon ábrázoltuk (19. ábra) a 3.2.10 fejezetben bemutatottak szerint számolt Jaccard-féle koeficiensek alapján (4. táblázat). Minél közelebb van két genom közötti Jaccard-féle koeficiens az 1-hez, annál hasonlóbb a két genom.

4. táblázat A 8 vizsgált génbanki tételre számított Jaccard-féle hasonlósági koefficiensek.

	GK Öthalom	E genom (MvGB 1708)	J genom (MvGB 1706)	S genom (MvGB 1617)	S genom (MvGB 1607)	S genom (MvGB 1615)	P genom (MvGB 1521)	P genom (MvGB 1509)
GK Öthalom	1.00	0.32	0.32	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22
E genom (MvGB 1708)		1.00	0.43	0.25	0.26	0.27	0.29	0.26
J genom (MvGB 1706)			1.00	0.24	0.24	0.22	0.26	0.22
S genom (MvGB 1617)				1.00	0.65	0.72	0.24	0.28
S genom (MvGB 1607)					1.00	0.62	0.21	0.24
S genom (MvGB 1615)						1.00	0.25	0.30
P genom (MvGB 1521)							1.00	0.45
P genom (MvGB 1509)								1.00

Az így kapott adatok alapján a raxml GUI szoftverrel elkészítettünk egy maximum-likelihood alapú fát, amelyet a MEGA-X szoftver alkalmazásával grafikusán ábrázoltunk is.



19. ábra A 8 vizsgált génbanki tétel genomjának genetikai távolsága dendrogramon gyökér nélküli fa (a) és kör mentén kifizített gyökeres fa (b) módon ábrázolva.

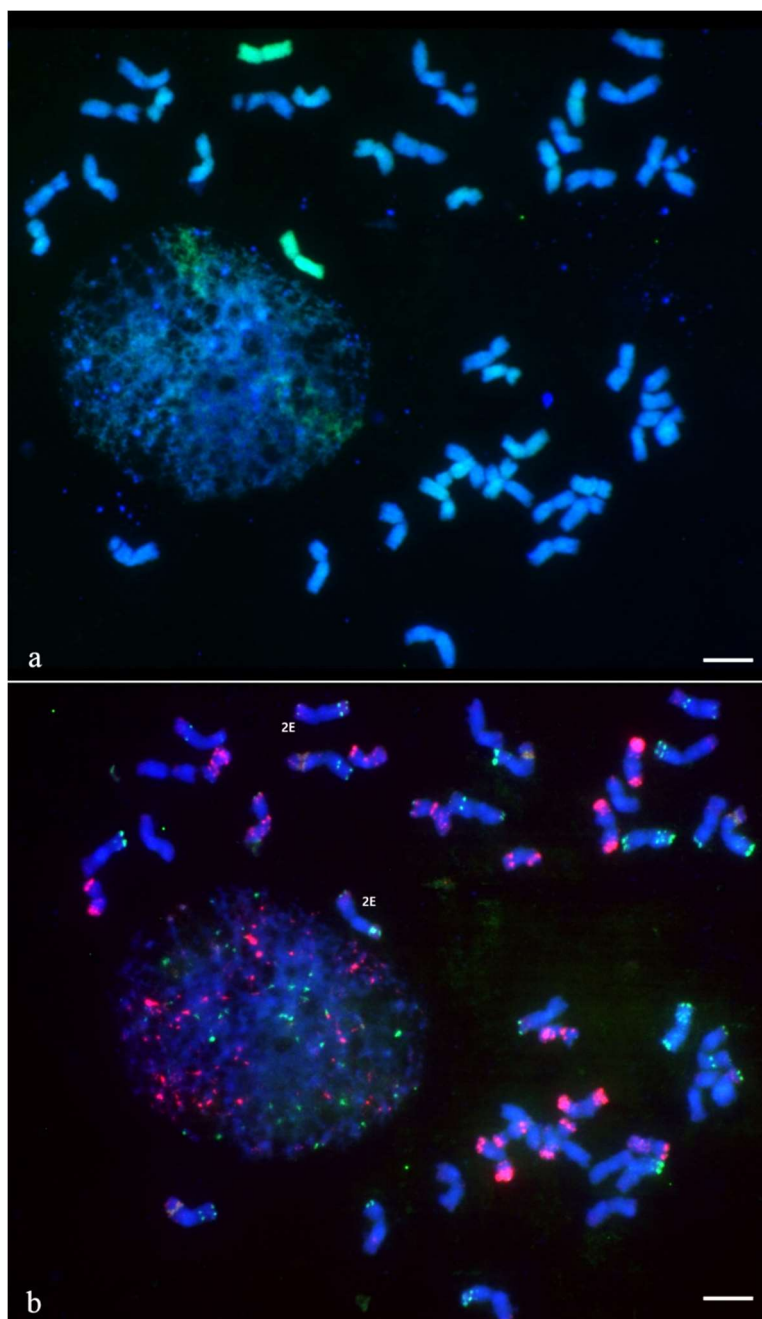
A dendrogram alapján a 8 génbanki tétel 3 nagyobb csoportra osztható. Az első csoportban az egymáshoz közeli rokonsági viszonyban álló *Th. elongatum* és *Th. bessarabicum*, illetve a GK Öthalom búzafajta található. A második csoportban a három *Ps. spicata* faj található. Jól megfigyelhető, hogy az MvGB1607 és az MvGB 1615 vonal közelebbi rokonsági viszonyban van egymással. A harmadik csoportban a két *A. cristatum* található. Az adatok alapján a *Th. elongatum* és a *Th. bessarabicum* áll legközelebbi rokonsági viszonyban a búzával, míg a *Ps. spicata* fajok a legtávolabb.

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

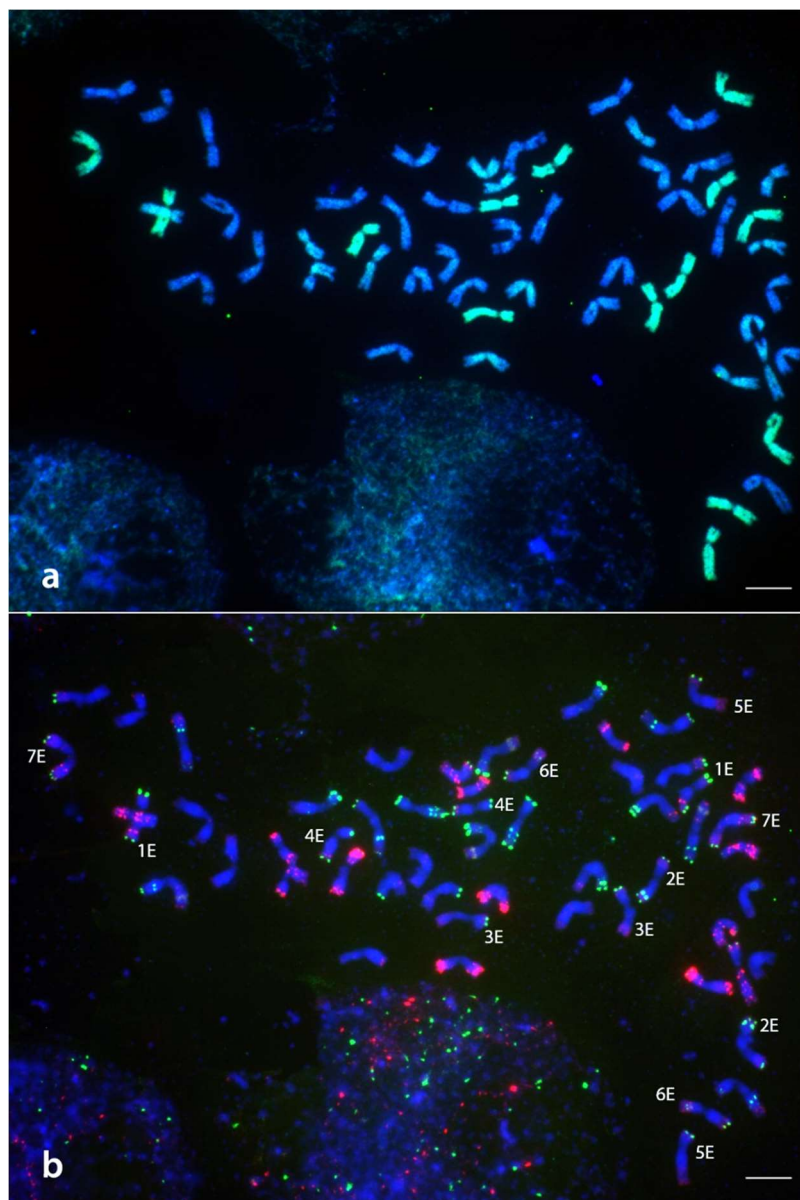
Kromoszóma-specifikus markerek azonosításához az alábbi Chinese Spring (CS) -*Th. elongatum* addíciós vonalakat használtuk:

- teljes diszómás addíciós sorozat: DA 1E, DA 2E, DA 3E, DA 4E, DA 5E, DA 6E és DA 7E;
- 12 diteloszómás addíciós vonal: DtA1ES, DtA1EL, DtA2ES, DtA2EL, DtA3ES, DtA3EL, DtA4ES, DtA5ES, DtA5EL, DtA6ES, DtA7ES, DtA7EL;
- illetve CS-*Thinopyrum elongatum* amfiploid vonal (BBAADDEE); és
- Chinese Spring (CS) búzafajta

A vizsgálat első részében az addíciós vonalakat ellenőriztük *in situ* hibridizációval (20. ábra) annak érdekében, hogy csak a megfelelő addíciókat tartalmazó vonalakat elemezzük molekuláris markerekkel. Minden vonalból a korábban bemutatott módszer szerint gyökérpreparátumot készítettünk, és GISH-t, illetve az Afa-family, pSc119.2 és a pTa71 próbák segítségével FISH vizsgálatot végeztünk az egyes kromoszómák kimutatásához és azonosításához. A diszómás és diteloszómás addíciós vonalak kromoszómális összetételének ellenőrzésének GISH és FISH fotói a 2E diszómás addíciós vonal esetében a 20. ábrán látható, míg a többi vonal az M5. mellékletben láthatók.



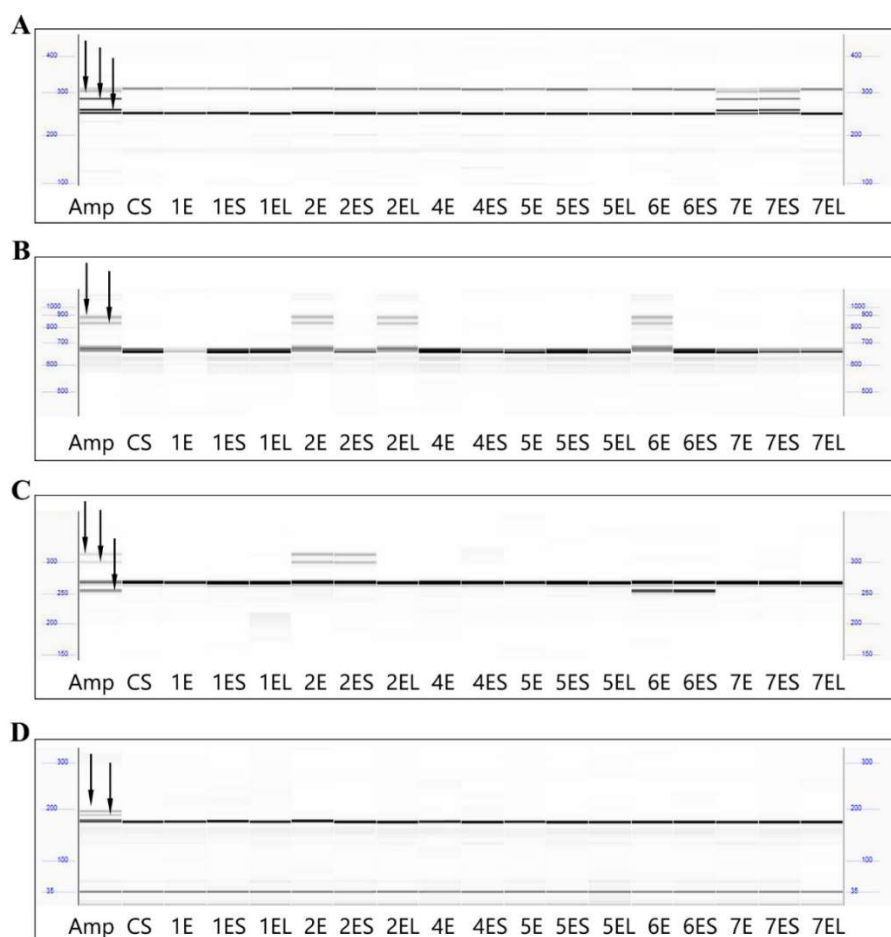
20. ábra A Chinese Spring-*Th. elongatum* 2E addíciós vonal kromoszómális összetételének ellenőrzése GISH (a) és FISH (b) segítségével. A GISH során a *Th. elongatum* kromoszómák zölden jelöltek (a). FISH során a 2E kromoszómákat az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata alapján azonosítottuk (b). A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt (a, b). A skála 10 μm -nek felel meg.



21. ábra Az E kromoszómák azonosítása a Chinese Spring-*Th. elongatum* amfiploidban GISH (a) és FISH (b) segítségével. A GISH során a *Th. elongatum* kromoszómák zölden jelölődtek (a). A FISH során a *Thinopyrum elongatum* kromoszómákat az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) repetitív DNS próbák mintázata alapján azonosítottuk (b). A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt (a, b). A skála 10 μ m-nek felel meg.

Megállapítottuk, hogy a 3E, 3ES és 3EL addíciós vonalak kivételével minden addíciós vonal tartalmazta a megfelelő *Th. elongatum* kromoszómákat. Ellenőriztük az amfiploid vonalat is, amely tartalmazta az összes E genom kromoszómát (21. ábra). A 3E, 3ES, és 3EL *Th. elongatum* kromoszómákat nem tartalmazó vonalakat kihagytuk a markerekkel végzett vizsgálatokból, ennek következtében 3E specifikus markereket csak kizárásos alapon, és a kromoszómakarokat figyelmen kívül hagyva, az amfiploid vonal elemzésével tudtuk azonosítani.

A vizsgálatok során 114 COS markert teszteltünk, amelyek közül 108 (94.7%) marker esetében szaporodott fel PCR termék, legalább egy genotípus esetében, míg 6 (5.3%) marker vizsgálata során nem kaptunk PCR terméket. A 108 marker összesen 304 PCR terméket eredményezett (1-7 PCR termék/marker/genotípus; átlag 2,81 termék/marker), amelyekből 111 (36.5%) marker bizonyult polimorfnak - azaz ≥ 4 bp különbséget detektáltunk a termékben a búza genotípushoz viszonyítva-, míg 193 (63.5%) termék nem volt polimorf. Ez a 111 termék összesen 50 markertől származott. Az 50 marker közül 31 (62%) volt specifikus csak egy *Th. elongatum* kromoszómára (22. ábra A), és 9 (18%) marker adott polimorf terméket az amfiploid vonal vizsgálata során. Ebből arra következtethetünk, hogy ezek a a búza 3-as homeológ csoportjára tervezett markerek nagy valószínűséggel a hiányzó 3E kromoszómára specifikusak (22. ábra D). Az 50 marker közül 10-nél (20%) figyeltük meg, hogy egyszerre több kromoszómára specifikusak, amelyek közül 7 marker esetében ugyanazok a termékek jelentek meg különböző kromoszómák esetén (22. ábra B), míg 3 marker esetében különböző termékek szaporodtak fel a különböző kromoszómákon (22. ábra C). Így utóbbi termékek kromoszóma-specifikusak, és egyedi kromoszómák azonosításra is alkalmasak.

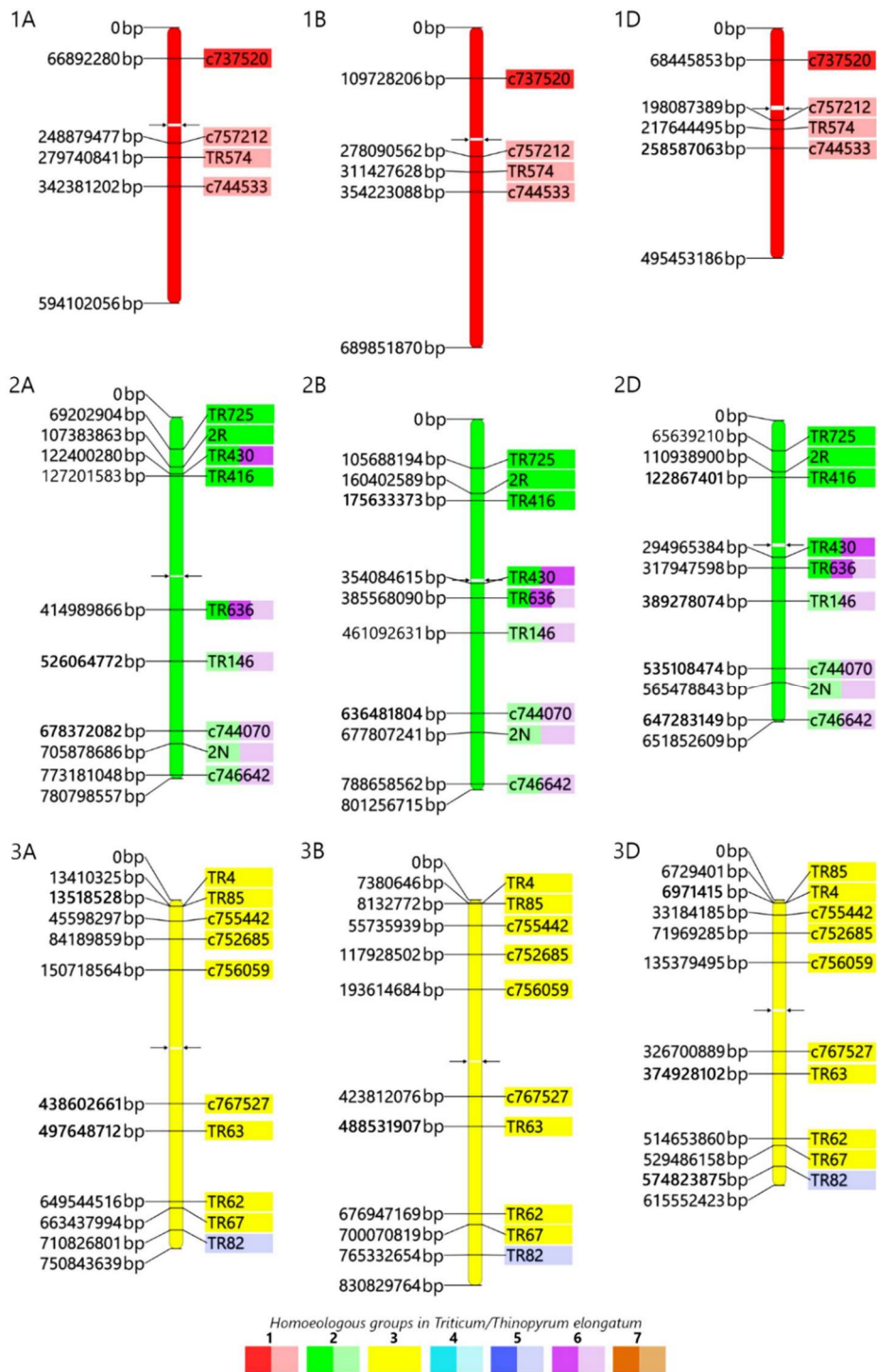


22. ábra A vizsgált Chinese Spring- *Th. elongatum* addíciós vonalak gélelektroforézis mintázata egy-egy példán keresztül bemutatva a különböző markereket. Egy kromoszómára specifikus marker (TR335) esetén (A), több kromoszómára specifikus marker (c746642) esetén (B), több kromoszómára, de eltérő termékkel specifikus marker (TR430) esetén (C), kizárásos alapon a 3E kromoszómára specifikus marker (TR62) esetén (D). A digitális gélkép fragment analízatoron végzett gélelektroforézis után a PROSize 2.0 szoftverrel készült. (Amp: amfiploid, CS: Chinese Spring).

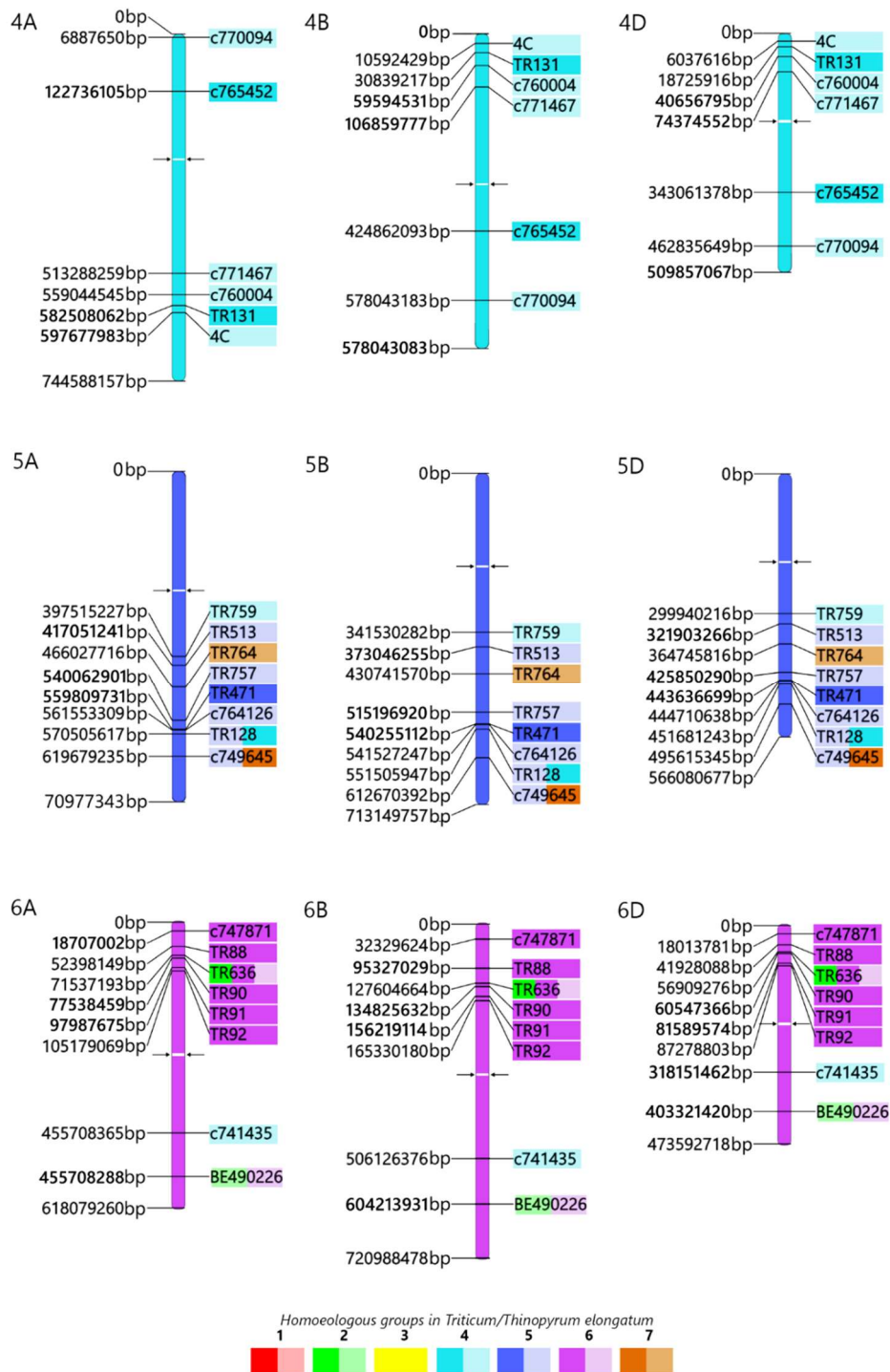
Vizsgálataink során összesen 40 kromoszóma specifikus markert azonosítottunk: 4 db 1E, 3 db 2E, 9 db 3E, 8db 4E, 5 db 5E, 5 db 6E és 6 db 7E specifikus markert. A 3E kromoszómára specifikusságot kizárásos alapon határoztuk meg, mivel az addíciós vonalak közül egynél sem tapasztaltunk specifikus terméket, csak az amfiploid elemzésénél. Az 1E, 4E, 5E és 7E kromoszómák mind a rövid, mind a hosszú karjára sikerrel azonosítottunk specifikus markereket. A 2E és 6E kromoszómák esetében csak a rövid karra tudtunk biztosan specifikus markert meghatározni, a hosszú kar esetében csak közös markereket találtunk. Ez az eredmény egy kromoszóma duplikációra enged következtetni a 2-es és 6-os kromoszóma között.

4.2.3. Szekvencia analízis

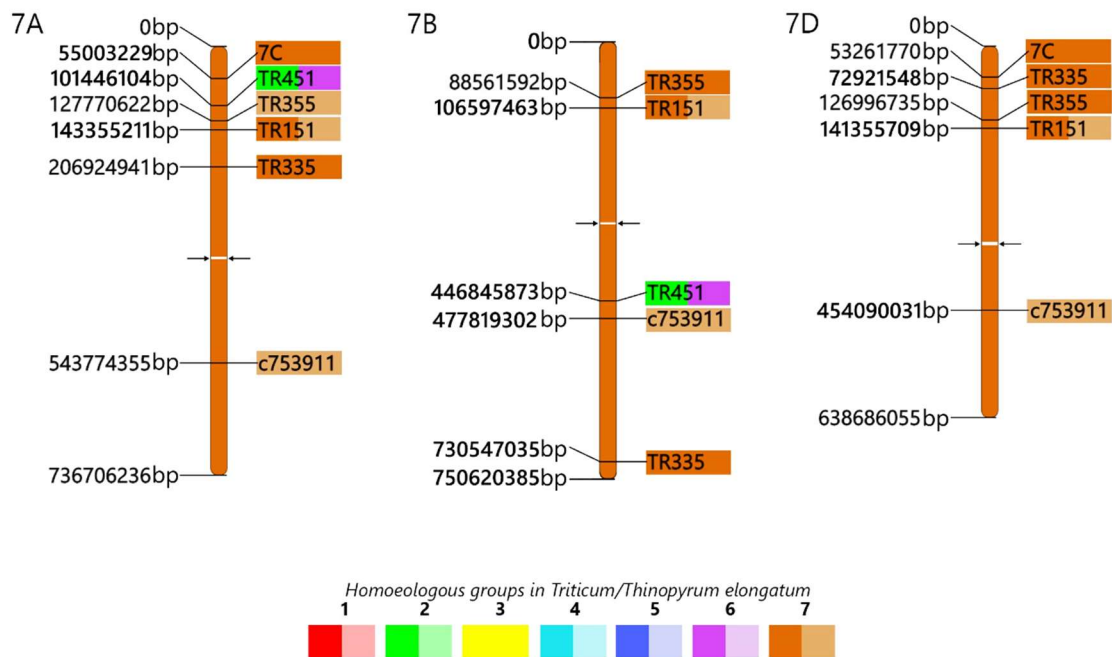
A *Th. elongatum* E genomja és a búza A, B, és D genomja közötti hasonlóságok és eltérések vizsgálatához az 50 polimorf COS marker alapjául szolgáló EST szekvenciákat összehasonlítottuk a búza referencia szekvenciájával ((IWGSC, 2018), www.wheatgenome.org). Az összehasonlításhoz a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, (Altschul et al., 1990)) alkalmazást használtuk (<https://urgi.versailles.inra.fr/Tools/BLAST>). A polimorf markerek EST szekvenciáit kereső szekvenciaként használva végeztük a 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 $> 100\text{bp}$, M6. melléklet) 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 búza és a *Th. elongatum* genomok közötti homológia viszonyok vizuális ábrázolásához a markereket színkóddal láttuk el a búza fizikai térképen az E genomon lévő elhelyezkedésük alapján (23., 24. és 25. ábrák).



23. ábra A búza pseudomolekulák fizika térképe a vizsgált COS markerek alapján az 1-3 homeológ csoport esetében. A búza kromoszómák bal oldalán a COS markerek bp-ban megadott pozíciója látható, a jobb oldalon a markerek *Th. elongatum* kromoszómákon való elhelyezkedését a marker nevek háttérszíne jelzi. A COS markerek *Th. elongatum* kromoszómális elhelyezkedését a markerek nevének színkódolásával jeleztük, a sötét szín a rövid karon, míg a halvány szín a hosszú karon lévő pozíciót jelenti. A 3-as kromoszóma esetében kar szerinti megkülönböztetés nem volt lehetséges. Többszínű markerek duplikációt jelentenek. A nyílak a búza kromoszómák centroméra régióját jelzik.



24. ábra A búza pszeudomolekulák fizika térképe a vizsgált COS markerek alapján az 4-6 homeológ csoport esetében. A búza kromoszómák bal oldalán a COS markerek bp-ban megadott pozíciója látható, a jobb oldalon a markerek *Th. elongatum* kromoszómákon való elhelyezkedését a marker nevek háttérszíne jelzi. A COS markerek *Th. elongatum* kromoszómális elhelyezkedését a markerek nevének szinkódolásával jeleztük, a sötét szín a rövid karon, míg a halvány szín a hosszú karon lévő pozíciót jelenti. A 3-as kromoszóma esetében kar szerinti megkülönböztetés nem volt lehetséges. Többszínű markerek duplikációt jelentenek. A nyilak a búza kromoszómák centroméra régióját jelzik.



25. ábra A búza pszeudomolekulák fizika térképe a vizsgált COS markerek alapján a 7-es homeológ csoport esetében. A búza kromoszómák bal oldalán a COS markerek bp-ban megadott pozíciója látható, a jobb oldalon a markerek *Th. elongatum* kromoszómákon való elhelyezkedését a marker nevek háttérszíne jelzi. A COS markerek *Th. elongatum* kromoszómális elhelyezkedését a markerek nevének színekódolásával jeleztük, a sötét szín a rövid karon, míg a halvány szín a hosszú karon lévő pozíciót jelenti. A 3-as kromoszóma esetében kar szerinti megkülönböztetés nem volt lehetséges. Többszínű markerek duplikációt jelentenek. A nyilak a búza kromoszómák centroméra régióját jelzik.

A búza A, B és D genomja illetve a *Th. elongatum* E genomja közötti szinténikus kapcsolatokat – az azonos gének, azonos sorrendben történő elhelyezkedése különböző genomok azonos homeológ csoportba tartozó kromoszómái között – e három ábra jól szemlélteti kromoszómaszinten. A kromoszómák markerekkel történő lefedettsége eltérő volt, az I, IV és VII-es kromoszómák esetében kevesebb (4, 6 és 5 marker/kromoszóma), míg a II, III, V, és VI kromoszómák esetében magasabb (9, 10, 8 és 8 marker/kromoszóma) volt. A markerek többsége (46) ugyanazon a homeológ csoporton helyezkedett el az E genom esetében, mint a búza genom kromoszómáin. Négy marker helyezkedett el más homeológ csoporton, a *TR82* búza 3. homeológ csoportra specifikus marker az E genom 5-ös kromoszómáján, a *TR759* búza 5. homeológ csoportra specifikus marker, az E genom 4-es kromoszómáján, a *TR764* búza 5. homeológ csoportra specifikus marker az E genom 7-es kromoszómáján, míg a *c741435* búza 6. homeológ csoportra specifikus marker az E genom 4-os kromoszómáján helyezkedett el.

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 (23. ábra). A búza 2-es kromoszómájának intersticiális és disztális részeire specifikus *TR146*, *c744070*, *2N* és *c746642* markerek, mind a 2E, mind a 6E megfelelő részeire egyaránt térképeződtek, ezzel egy nagyobb mértékű duplikációt mutatva. A búza 2-es homeológ csoport pericentrikus régiójára specifikus *TR430* és *TR636* markerek alapján egy duplikáció helyezkedik el a 2E és a 6E rövid karján. A *TR430* marker alapján egy búzán belüli átrendeződést is megfigyeltünk, míg a 2BS és 2DS kromoszómák esetén a marker a kromoszómák pericentrikus részén helyezkedik el, addig a 2AS kromoszómakaron a disztális részen található. A *TR636* marker megtalálható volt mind a 6ES, mind a 6EL régióban is, amely egy kromoszómán belüli átrendeződésre utal (24. ábra).

Továbbá sikerrel azonosítottunk néhány kisebb méretű, 1-1 marker által meghatározott átrendeződést is. A *TR128* és *c749645* búza 5-ös homeológ csoport kromoszómáinak hosszú karjára specifikus markerek alapján egy 4ES/5EL, illetve egy 5EL/7ES duplikáció történt nagy valószínűséggel a genom evolúciója során. A búza 6-os homeológ csoportjának kromoszómáinak hosszú karjának szubterminális részére specifikus *BE490226* marker alapján a 2EL és 6EL karok között is kialakult egy duplikáció (24. ábra). 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 (23., 24. és 25. brák).

4.2.4. A COS markerekkel végzett vizsgálatok eredményeinek megvitatása

A tarackbúzafajokon COS markerek alkalmazásával végzett kísérleteink első részében egy általánosabb, több fajt érintő vizsgálatot végeztünk. További vizsgálatunk célja a *Th. elongatum* részletes genom-analízise volt és eredményeink felhasználásával faj-, és kromoszóma specifikus markereket határoztunk meg.

A genomok összehasonlítása során a búza, a *Th. elongatum*, a *Th. bessarabicum*, a *Ps. spicata* és az *A. cristatum* eltérő származási helyű, összesen 8 vonalát vizsgáltuk 112 COS marker felhasználásával. A fajok genetikai viszonyát ábrázolva dendrogramon, jól elkülönülő csoportokat alkotnak a hasonló genomok, azaz a három *Ps. spicata*, a két *A. cristatum*, illetve a *Th. bessarabicum* és *Th. elongatum*, valamint a hozzájuk nagyon hasonló búza (GK Öthalom)

genotípus (19. ábra). A búza genomtól genetikailag legtávolabb helyezkedik el a három *Ps. spicata* vonal. Közöttük jól megfigyelhető, hogy az MvGB1615 és az MvGB1617-es vonal közelebbi rokonsági viszonyban van egymással, mint a harmadik, MvGB1607-es vonal. Ezek az eredményeink összhangban vannak Mahelka et al. (2011) keményítő szintetáz I (GBSSI) szekvencia analízis vizsgálatait során kapott eredményeivel.

Az E és J genomok genetikailag egymáshoz nagyon közeli viszonyban állnak, ám az eredmények itt is alátámasztották az E és J genom különbözőségét, hasonlóan a FISH polimorfizmus vizsgálatainkhoz. A tarackbúzafajok elemzése során a COS markerek nagymértékű transzferabilitását (átvihetőségét) tapasztaltuk, hasonlóan más fajok esetében végzett vizsgálatok során (Cabrera et al., 2009; Liewlaksaneeyanawin et al., 2009; Molnár et al., 2013; Wu et al., 2009). A keletkezett PCR termékek 31-50%-a polimorfnak bizonyult a búzához viszonyítva, ami arra utal, hogy ezen vad fajok genetikai diverzitása megnyilvánul az intron régiók nagymértékű variabilitásában is. Ezeket a markereket felhasználva különböző *Aegilops* fajokat összehasonlítva a búzával, korábban hasonló arányban (46-53%) találtak polimorf ampliconokat (Molnár et al., 2013).

A *Th. elongatum* kromoszómáira specifikus markerek azonosítása során 114 COS markert vizsgáltunk, amelyből 108 marker esetében keletkezett PCR termék. Ebből 50 marker bizonyult polimorfnak a búza és a *Th. elongatum* között. A polimorf markerek közül 31 marker egyetlen kromoszómákra specifikus, 7 marker egyszerre több kromoszómára is specifikus, 3 marker szintén több kromoszómára specifikus, de különböző méretű terméket mutatott, így alkalmasak egyedi kromoszóma azonosításra. Kilenc markert a 3E, 3ES, 3EL addíciós vonalak hiányában csak feltételezhetően tudtunk 3E specifikus markerként azonosítani. Az azonosított markerek önállóan, illetve *in situ* hibridizációs módszerekkel kombinálva ideális eszközök az idegen fajú génátvitel hatékonyságának növelésére a búza nemesítési programokban.

Az 58 nem-polimorf markerből 21 marker esetében keletkezett PCR termék, így összesen a 108 markerből 71 marker esetében keletkezett PCR termék a *Th. elongatum* genomon, ami 65.7% transzferabilitást jelent. Hasonló értékeket – 71,7% és 64,1% a 2-es, illetve a 6-os homeológ csoport esetén – tapasztalt Copete és Cabrera (2017) az *A. cristatum* P genomja esetében. *Aegilops* fajok genomjainál magasabb (94,3%) átvihetőséget tapasztalt Molnár et al. (2013), e magasabb érték háttérben valószínűsíthetően az *Aegilops* fajok és a búza közelebbi rokonsági viszonya lehet (Marcussen et al., 2014).

Számos agronómiailag hasznos tulajdonságot azonosítottak már korábban az E genom kromoszómáin. A 3E, 4E és 7E kromoszómán több sötűrésért is felelős lókuszt határoztak meg (Dvorak et al., 1988; Monneveux et al., 2003). Az 1EL kromoszómakaron a búza csíkos mozaik

vírus (WSMV) elleni rezisztenciagént (Sharma et al., 1984), míg több levél- és szárrozsda-rezisztenciagént azonosítottak a 3E (*Lr24/Sr24*), 6E (*Lr29/Sr26*) és a 7E (*Lr19/Sr25*) kromoszómákon (Friebe et al., 1996). Kalászfuzárium elleni rezisztenciagént is térképeztek a 7E kromoszómára (Chen et al., 2013; Shen és Ohm, 2006). E hasznos tulajdonságok azonosítására és nyomon követésére már számos marker ismert, ám nagyrésztük alkalmazása labormunka-, és időigényes. A COS markerek felhasználása ezekre a problémákra nyújtana megfelelő lehetőséget.

A COS markerek szorosan kötöttek az adott génekhez, így marker alapú szelekcióhoz is használhatók. Burt és Nicholson (2011) kísérleteikben a búza és a vad rokon fajok közti hasonlóságot vették alapul a szártörő rozsda (*Pch1*) elleni rezisztenciagénre specifikus markerfejlesztésük során. A búza és a *Th. elongatum* makroszinténikus kapcsolatának feltárása érdekében a polimorf COS markerek EST szekvenciáit a búza referencia szekvenciájára térképeztük. Az így kapott térképen jól elemezhető a búza és a *Th. elongatum* homológia viszonya kromoszómakarok szintjén. A búza és a *Th. elongatum* genomjai között nagyfokú homológiát tapasztaltunk COS markerekkel. A búza 3-as homeológ csoport kromoszómák hosszú karjai részleges homológiát mutatnak az 5EL kromoszómával egy marker alapján, a búza 5-ös homeológ csoport kromoszómák hosszú karjai a 4EL és a 7EL kromoszómával 2 marker alapján, míg a búza 6-os homeológ csoport kromoszómák a 4EL kromoszómával mutatnak homológiát egy marker alapján. SNP markerekkel történt vizsgálatok szintén nagymértékű homológiát mutattak ki az *A. cristatum* P genomja és a búza genomjai között, néhány kisebb mértékű átrendeződéstől eltekintve (Zhou et al., 2018).

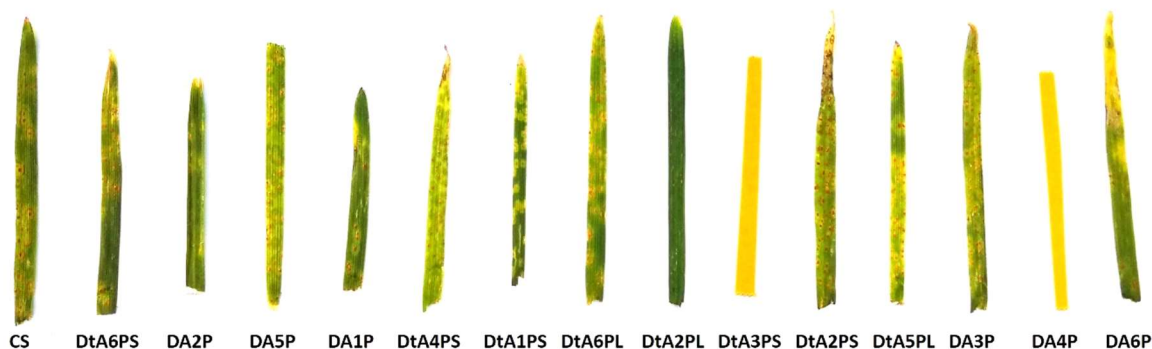
Vizsgálataink során számos duplikációt figyeltünk meg az E genomban. A 2EL és 6EL kromoszóma karok között nagyobb mértékű, míg a 2ES és 6ES között kisebb mértékű duplikációt tapasztaltunk. Továbbá az 5-ös, 6-os és 7-es homeológ csoportok kromoszómái esetében is kimutattunk 1-1 marker által jelzett duplikációt. Kiseb mértékű duplikációkat Hu et al. (2012) is tapasztaltak a *Th. elongatum* genomjában EST-SSR markerekkel végzett kutatásaik során. Jelentős mértékű duplikáció fordul elő a búza, árpa, rizs, szója és kukorica genomjában is, illetve a búza vad rokon fajai közül különböző *Aegilops* fajokban is azonosítottak már korábban több duplikációt is (Anderson et al., 1992; Mayer et al., 2011; Molnár et al., 2013; Salse et al., 2009). Egy újabb evolúciós elmélet alapján a genomok teljes vagy részleges duplikációjának, kromoszómák egyesülésének, transzlokációk kialakulásának sorozata nagymértékben járult hozzá a fűfélék genomjának kialakulásához (Salse et al., 2009). Génduplikációk kialakulása háttérben többféle mechanizmus is állhat, pl. transzpozabilis elemek jelenléte, nem homológ kromoszómák közti rekombináció kialakulása, és az ezeket javító mechanizmusok (Flagel és Wendel, 2009; Panchy et al., 2016).

Mind a FISH alapú kromoszóma kariotípusok, mind az azonosított kromoszóma-specifikus markerek jelentősen gyorsíthatják a nemesítés folyamatát, a búza genomjába beépült idegen kromatin megfelelő azonosításával. A részletes genom-analízis alapján pedig a nemesítési programok megtervezését lehet hatékonyabbá tenni a még sikereesebb génátvitel javításával.

4.3. Fiatalkori levélrozsdá-rezisztenciavizsgálat

Az évelő tarackbúzafajok számos biotikus rezisztenciagénnel rendelkeznek, így igen fontos génforrások a hexaploid búza nemesítése során. Már több agronómiailag hasznos gént is sikeresen építettek át a búza genomjába, mint pl. az *Lr19*, *Lr29*, *Sr25*, *Sr43* gének (Friebe et al., 1996), ám még mindig vannak kiaknázatlan lehetőségek.

Chinese Spring búzafajtán, CS-*A. cristatum*, illetve CS-*Th. elongatum* diszómás (DA) és diteloszómás (DtA) addíciós vonalain csíranövénykorban mesterséges üvegházi levélrozsdafertőzési kísérletet hajtottunk végre. A CS-*Th. elongatum* összes addíciós vonala fogékonyak bizonyult, (Stakman-skála: 4-es érték), kivéve a 6E diszómás addíciós vonalat, amely mérsékelten fogékony volt (Stakman-skála: 3-as érték). A CS-*A. cristatum* addíciós vonalak esetében többféle eredményt tapasztaltunk (26. ábra). 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.



26. ábra A CS-*A. cristatum* diteloszómás és diszómás addíciós vonalainak csíranövénykori mesterséges levélrozsdafertőzés eredménye. (Fertőzés: Károlyiné Dr. Cséplő Mónika, Fotó: Gaál Eszter, 2018)

4.3.1. A fiatalkori levélrozsdarezisztenciavizsgálatok eredményeinek megvitatása

Eredményeink összhangban állnak a Jiang et al. (2018) által publikált adatokkal, aki az *A. cristatum* 2P kromoszómájának eltérő méretű szegmentumait hordozó búza-*A. cristatum* transzlokációs vonalak levélrozsdarezisztencia vizsgálata során a 2P kromoszóma hosszú karjának FL 0.66-0.86 régiójára térképeztek egy hatékony levélrozsdarezisztenciagént. Ezenkívül liztharmat-rezisztenciagént is térképeztek a 2P kromoszómára (Li et al., 2017). Mindezen eredmények alapján a jövőben tervezzük a *ph1b* mutáns búza vonalak felhasználásával homeológ rekombinációk létrehozását a búza és az *A. cristatum* 2P kromoszómája között. A 2P rekombináns vonalak kiválogatását elősegíthetik azok a polimorf COS markerek (c746642, TR636), melyeket korábban a 2P kromoszóma hosszú karján lokalizáltunk (Said et al., 2019b).

Agronómiai jelentőségén túl, a levélrozsdarezisztenciát hordozó 2P transzlokációkat fel lehetne használni a rezisztenciagén azonosítására is, knock-out mutánsok előállításával. A MutChromSeq eljárás (Sánchez-Martín et al., 2016) során a rezisztens vad típusból illetve az érzékeny mutáns genotípusokból áramlások citometria segítségével izolálják az idegen kromoszóma szegmentumot hordozó transzlokációs kromoszómát, melyeket megszekvenálnak, és az adott kromoszóma régió génjeinek mutációiból és a fenotípusos változásokból következtetnek a rezisztenciagénre. Az *A. cristatum* kromoszómái, többek között a 2P, és a 2PL is nagy tisztaságban izolálható, így lehetséges a kromoszóma szekvenálása is (Said et al., 2019a).

4.4. Új előnemesítési anyagok előállítása

Keresztezési kísérleteink első részében CS- *Th. elongatum* diszómás, illetve monoszómás addíciós vonalakat kereszteztünk a megfelelő CS- *A. cristatum* diszómás, ill. monoszómás

addíciós vonalakkal. Munkánk célja, olyan introgressziós vonalak előállítását, amelyek hordozzák egyik vagy lehetőleg mindkét tarackbúzafaj hasznos tulajdonságait, és felhasználhatók búza előnemesítési programokban. További célunk volt, hogy a P- és E-genom kromoszómák egy-egy szegmentumát hordozó vonalak előállításával olyan sorozatot állítsunk elő, mely a jövőben alkalmazható lesz az egyes kromoszómák fizikai térképezésére.

A keresztezések megkezdése előtt GISH segítségével ellenőriztük, hogy a keresztezésre használt genotípusok tartalmazzák-e az idegen kromoszómát. Ennek során a CS- *A. cristatum* 2P addíciót igen instabilnak tapasztaltuk, hiszen a 66 csíráztatott szem közül mindössze 1 tartalmazta diszómás formában az addíciót. A két monoszómás 2P addíciónak bizonyult növény korai fázisban kihalt, így nem tudtunk velük keresztezést végrehajtani. A CS- *A. cristatum* 3P addíciós vonal esetében is több esetben tapasztaltuk, hogy az adott növény csak monoszómás, teloszómás, vagy monoszómás és teloszómás formában tartalmazta a 3P kromoszómát. Az elvégzett keresztezések részletei az 5. táblázatban láthatók.

5. táblázat Chinese Spring háttérben *Th. elongatum* (E) ill. *A. cristatum* (P) addíciók keresztezéseinek adatai. A keresztezési kombinációkban első helyen az anyai, második helyen az apai genom szerepel. (DA: diszómás, MA: monoszómás addíció)

Kombináció	1E x 1P	1P x 1E	3E x 3P		3P x 3E		4Ex4P	4Px4E	5Ex5P	5Px5E
	DAxDA	DAxDA	DAx DA	DAx MA	DAx DA	MAx DA	DAxDA	DAxDA	DAxDA	DAxDA
Keresztezett kalászek száma	13	13	7	4	9	7	11	9	13	13
Virág	308	294	136	68	198	214	234	192	266	268
Szem	19	12	40	17	76	40	0	23	5	2
Szemkötés (%)	6	4	29	25	38	19	0	12	1.9	0.7

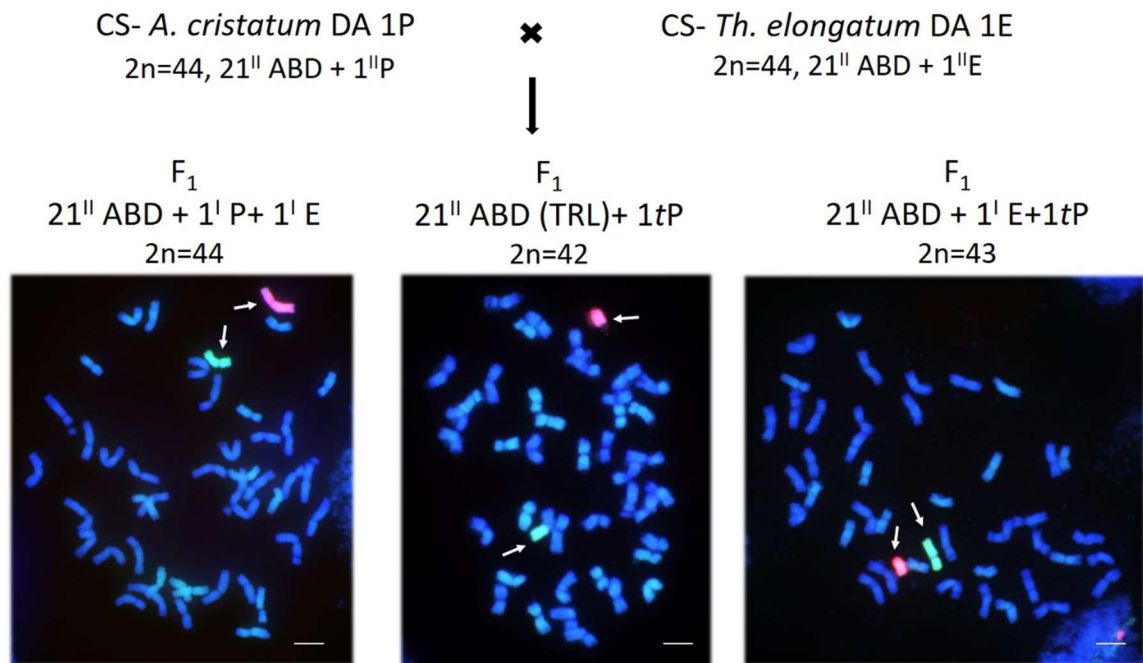
Legmagasabb szemkötést (38%) a 3P diszómás addíciós anyai vonal és 3E diszómás addíciós apai vonal keresztezésénél tapasztaltuk, de kiugróan magas volt a szemkötés a többi 3-as homeológ csoportba tartozó kombináció esetén is. A 4E x 4P keresztezés esetén nem tapasztaltunk szemkötést. A keresztezésből származó F₁ utódok vizsgálatának eredményei a 6. táblázatban és a 27. ábrán látható, a 4-es és az 5-ös addíciós vonalak vizsgálata még folyamatban van.

6. táblázat A *CS-A. cristatum* és *CS-Th. elongatum* addíciós vonalak keresztezéséből származó F₁ utódok vizsgálatának eredménye (DA: diszómás addíció, MA: monoszómás addíció, *t*: teloszómás addíció, TRL: transzlokáció)

Kombináció	F ₁ utódok száma, genetikai összetétele							
	Vizsgált szemszám	MA E, MA P	MA E, <i>t</i> P	MA E	<i>t</i> P	<i>t</i> E, <i>t</i> P	TRL E, <i>t</i> P	Ø
DA1E x DA1P	9	9 (100%)	-	-	-	-	-	-
DA1P x DA1E	7	7 (100%)	-	-	-	-	-	-
DA3E x DA3P	19	1 (5%)	10 (53%)	1 (5%)	4 (21 %)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
DA3E x MA3P	10	1 (10%)	1 (10%)	7 (70%)	-	-	-	1(10%)
DA3P x DA3E	26	2 (8%)	22 (85%)	-	2 (8%)	-	-	-
MA3P x DA3E	12	4 (33%)	1 (8%)	6 (50%)	1 (8%)	-	-	-

Annak ellenére, az 1E és 1P addíciós vonalak kombinációi jóval kisebb arányú szemkötést produkáltak a 3E-t és 3P-t tartalmazó kombinációkhoz képest (5. táblázat), az utódnemzedékben mindkét keresztezési irány esetén stabilan megjelent mindkét (1E és 1P) idegen kromoszóma (6. táblázat). A 3E és 3P kromoszómák esetében mindkét kromoszóma nagyobb arányban esett ki az utódokból. Amennyiben a 3E diszómás addíciós vonal volt az anya, a 19 vizsgált utód esetén 12 (63%) utód tartalmazott 3E kromoszómát, míg 3P kromoszómát csak 1 (5%) utód tartalmazott, 16 (84%) utód tartalmazott teloszóma formájában 3P-t, és összesen 1 (5%) utód tartalmazott egyszerre 3E és 3P kromoszómát. Amennyiben a 3P diszómás addíciós vonal volt az anya, a 26 vizsgált utód esetén 24 (92%) utód tartalmazott 3E kromoszómát, míg 2 (8%) utód tartalmazott 3P kromoszómát, teloszóma formájában pedig 24 (92%) utódban volt megtalálható. Összesen 2 utód (8%) tartalmazott egyszerre 3E és 3P kromoszómát is, kicsivel magasabb arányban, mint az előző esetben. Azonban ha az egyik szülő monoszómás 3P addíciós vonal volt ezek az arányok nőttek.

Amennyiben az apa volt a monoszómás vonal 10-ből 9 utód (90%) tartalmazott 3E addíciót, 1 utód (10%) 3P addíciót, mindkét addíciót egyszerre 1 utód (10%). Amennyiben az anyai vonal volt a monoszómás addíció 12 utódból 11 (92%) tartalmazott 3E addíciót, míg 4 utód (33%) tartalmazott 3P addíciót, egyszerre mindkét addíciót 4 utód (33%) tartalmazott. Érdekes, hogy olyan vonalat nem találtunk, amelyben csak 3P addíció lett volna, míg csak 3E addíciót tartalmazó vonal több is volt, illetve látható, hogy a 3E kromoszóma esetén jóval kisebb arányban tapasztaltunk teloszómás addíciót, míg a 3P kromoszóma könnyebben tört.



27. ábra A CS-*A. cristatum* és CS-*Th. elongatum* addíciós vonalak keresztezéséből származó utódok GISH mintázata. A GISH során a *Th. elongatum* kromoszómák zölden, míg az *A. cristatum* kromoszómák pirosan jelöltek, a búza kromoszómák háttérfestése DAPI-val történt. A skála 10 µm-nek felel meg.



28. ábra 3E transzlokációt és 3P teloszómás addíciós növény kalászfotója (Fotó: Gaál Eszter, 2019)

A vizsgált növények között azonosított 3E transzlokációt hordozó növény sajnos steril lett (28. ábra). Sok esetben tapasztaltunk sűrű, tömött kalászsokat. A 29. ábrán lévő 3E monoszómás és 3P teloszómás addíciót tartalmazó növény, sűrű, „emeletes” virágú kalásza 91 szemet tartalmazott. Ebben a kalászban láthatóan megnőtt a fertilis virágok száma, morfológiájában igen hasonló az *A. cristatum* kalászához.



29. ábra 3E monoszómás és 3P teloszómás addíciót tartalmazó növény kalászfotója (Fotó: Gaál Eszter, 2019).

Ennek ellenkezőjére is volt példa, viszonylag kevés szemet – 6 szemet – tartalmazott az 1E és 1P monoszómás addíciót tartalmazó növény igen tömött kalásza (30. ábra).



30. ábra 1E és 1P monoszómás addíciót tartalmazó növény kalászfotója (Fotó: Gaál Eszter, 2019).

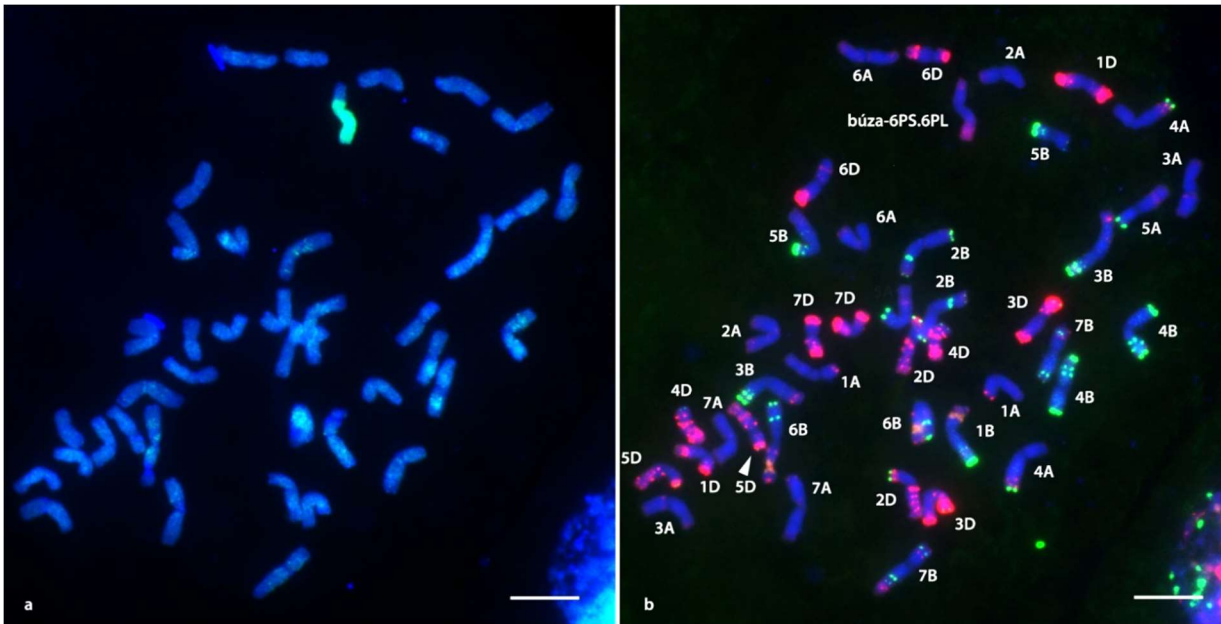
Keresztezési kísérleteink másik részében a CS- *A. cristatum* diszómás addíciós vonalak és a gametocid géneket hordozó CS- *Ae. cylindrica* 2C diszómás addíciós vonal 8. ábra szerinti keresztezéséből származó F₂BC₁ generációt vizsgáltuk, ezekben már várható a gametocid gének

okozta kromoszóma átrendeződések megjelenése, ill. öntermékenyítettük ezeket a növényeket, további átrendeződések kialakulása érdekében. A CS- *A. cristatum* 5P, illetve 6P diszómás addíciós vonal és a CS- *Ae. cylindrica* 2C diszómás addíciós vonal keresztezéséből származó F₂BC₁ utódok vizsgálatának eredménye a 7. táblázatban látható.

7. táblázat A CS- *A. cristatum* 5P, illetve 6P diszómás addíciós vonal és a CS- *Ae. cylindrica* 2C diszómás addíciós vonal keresztezéséből származó utódok vizsgálati eredménye (DA: diszómás addíció, MA: monoszómás addíció, TRL: transzlokáció, *t*: teloszómás addíció)

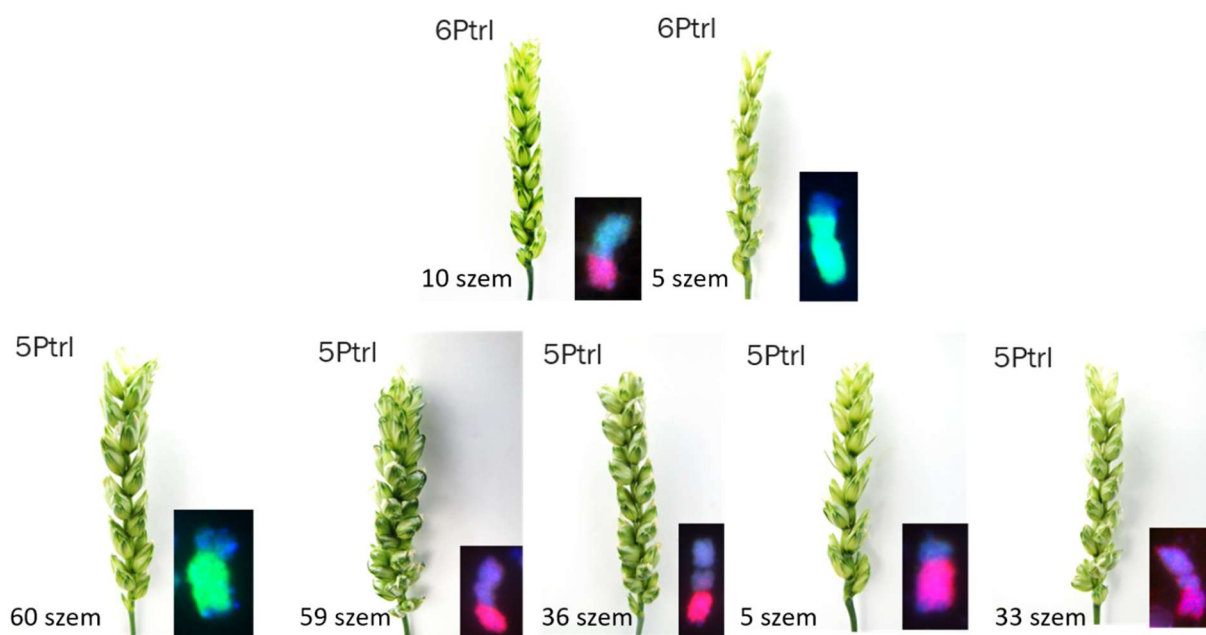
CS-DA5P x CS-DA2C keresztezésből származó utódok		CS-DA6P x CS-DA2C keresztezésből származó utódok	
Összes vizsgált szem:	77	Összes vizsgált szem:	89
Transzlokáció:	6 (8%)	Transzlokáció:	2 (2.2%)
MA 5P, MA 2C:	0 (0%)	MA 6P, MA 2C:	3 (3.4%)
MA 5P:	5 (6.5%)	MA 6P:	55 (61.9%)
MA 2C:	10 (13%)	MA 2C:	0 (0%)
<i>t</i> 5P:	5 (6.5%)	<i>t</i> 6P:	0 (0%)
Ø:	40 (52%)	Ø:	6 (6.7%)
Nem csírázott:	10 (13%)	Nem csírázott:	23 (25.8%)

A 7. táblázat alapján látható, hogy a keresztezések során az 5P kromoszóma igen nagy arányban esett ki az utódokból, azonban nagyobb arányban keletkeztek transzlokációk is, mint a 6P kromoszóma esetén. A transzlokációk azonosítása azonban nem minden esetben volt egyértelmű. A 31. ábrán látható búza-6PS.PL transzlokációs vonal esetén is látható, hogy a gametocid hatású gének nemcsak az *A. cristatum* eredetű kromoszómát törték, hanem sok esetben a búza kromoszómákat is.



31. ábra A CS-*A. cristatum* és CS-*Ae. cylindrica* 2C addíciós vonalak keresztezéséből származó búza-6PS.6PL transzlokációt tartalmazó utód kromoszómális összetételének ellenőrzése GISH (a) és FISH (b) segítségével. A GISH során az *A. cristatum* kromoszóma zölden jelölt (a). FISH során a kromoszómákat az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata alapján azonosítottuk (b). A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt (a, b). A skála 10 μ m-nek felel meg.

Összesen 2 db 6P és 6 db 5P kromoszóma transzlokációt tartalmazó vonalat azonosítottunk (32. ábra). Minden vonal esetén kaptunk utódszemeket, melyek felhasználhatók az adott transzlokáció diszómás állapotának stabilizálására, illetve többszöri visszakeresztezéssel a búza genom visszaállítására.



32. ábra Az azonosított transzlokációs vonalak transzlokációt hordozó kromoszómái, illetve a kalászfotóik. A transzlokációt tartalmazó utód kromoszómális összetételének ellenőrzése GISH segítségével. A GISH során az *A. cristatum* kromoszóma zölden vagy pirosan jelölt. A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt.

4.4.1. Új előnemesítési alapanyagok előállításával elért eredmények megvitatása

A CS-*A. cristatum* és a CS-*Th. elongatum* diszómás, illetve monoszómás addíciós vonalak közti keresztezési kísérleteink alapján elmondható, hogy az E genom jobban átadódik a keresztezések során, mint a P genom. Ez összhangban áll a COS markeres vizsgálatokkal kapott genetikai hasonlósággal, amely szerint a *Th. elongatum* E genomja közelebb áll a búzához, mint az *A. cristatum* P genomja (19. ábra). A CS-*A. cristatum* 2P diszómás addíciós vonallal nem sikerült kereszteznünk, a 2P kromoszóma instabilitása miatt, amely összefüggésben lehet a 2P kromoszóma nagyobb méretével (Said et al., 2019a), illetve COS markerekkel végzett kísérletekben tapasztalt nagyobb mértékű búza és *A. cristatum* 2P közötti homológiai különbségekkel (Said et al., 2019b). 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. Ezek összefüggésben lehetnek a COS markeres vizsgálatok alapján megfigyelt homológia viszonyokkal. Az 1E és a búza 1A, 1B és 1D kromoszómái, illetve a 3E és a búza 3A, 3B és 3D kromoszómái között nagymértékű homológia tapasztalható (23. ábra). Az 1P és a búza 1A, 1B és 1D kromoszómái között nagymértékű homológia, míg a 3P és a 3A, 3B és 3D között több polimorfizmust is leírtak (Said et al., 2019b).

4.5. 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.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. 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.

5.2. 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 agronómiaileg fontos gének térképezését célzó kutatási projektekben is. Terveink között szerepel más tarackbúzafajok esetén is egyedi kromoszóma specifikus markerek azonosítása.

5.3. 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 levélrozsda-rezisztenciagént, 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 hosszúkarján található levélrozsda-rezisztenciagént. Sikeres rezisztens transzlokációs vonal előállításánál esetén lehetséges lenne az adott rezisztenciagén azonosítása MutChromSeq módszer alkalmazásával.

5.4. Keresztezési vizsgálatok

Keresztezési kísérleteink 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.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kenyérbúzának, mint az egyik legelterjedtebb gabonafélének, kiemelt szerepe van az emberiség élelmezésében. Emiatt a búzanemesítés elsődleges célja a különböző abiotikus, illetve biotikus stresszekkel szemben ellenálló búzafajták előállításával, a búza termésmennyiségének növelése. A búzával rokon vad fajok számos agronómiailag hasznos gént hordoznak, melyek faj-, és nemzetségkeresztezés során átvihetők a búzába. A tarackbúzafajok a búza harmadlagos génforrásai közé tartoznak, közös genomjuk nincs a búzával, azonban számos levél-, szár-, és sárgarozsdával, illetve liztharmattal szembeni rezisztenciagént hordoznak, hideg-, és szárazságtűrőek, jó adaptációs képességű fajok. Több rezisztenciagént is sikeresen vittek már át tarackbúzafajokból a búza genomjába, azonban e téren is még számos kiaknázatlan lehetőség van bennük.

A minél sikeresebb génátvitelhez fontos a donor és a recipiens faj genomjának alapos ismerete, és a különböző genomok pontos azonosítása. Munkánk célja három tarackbúzafaj részletes vizsgálata molekuláris citogenetikai és markeres módszerekkel, illetve hasznos tulajdonságaik génjeiknek a búzába való átvitele, különböző introgressziós vonalak előállításával.

Elkészítettük az *A. cristatum* (PP), *Ps. spicata* (StSt) és a *Th. bessarabicum* (JJ) részletes fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) alapú kariotípusait, amelyek alkalmazásával a különböző genomok kromoszómái megkülönböztethetők a búza genomjában. Vizsgáltuk e genomok eltérő földrajzi származású vonalai közötti polimorfizmusokat is. Az említett fajok és a *Th. elongatum* (EE) genomjait COS markerekkel vizsgálva megállapítottuk az egymáshoz és a búzához való rokonsági viszonyukat. Ennek során egyértelművé vált a *Th. elongatum* és a *Th. bessarabicum* genomjainak különbözősége, ugyanis e két genom egyezősége vagy különbözősége régóta vita tárgya a kutatók között. Búza-*Th. elongatum* diszómás és diteloszómás addíciós vonalak felhasználásával számos kromoszóma, illetve kromoszómakar specifikus COS markert azonosítottunk, amelyek felhasználhatók a búza előnemesítési alapanyagok vizsgálatára, és alkalmazásukkal gyorsítható a kedvező tulajdonságú vonalak szelektálása. Az azonosított COS markerek alapjául szolgáló EST szekvenciák és a búza referencia (IWGS ref. seq v1.0) szekvenciája alapján vizsgáltuk a *Th. elongatum* E genomja és a búza A, B, és D genomja közötti homológia viszonyokat és ábráztuk ezt egy direkt erre a célra készített szoftver alapján. Ennek során kisebb mértékű kromoszóma átrendeződéseket tapasztaltunk, illetve egy duplikációt a 2E és 6E kromoszóma hosszú karja között.

A búza-*A. cristatum*, és a búza-*Th. elongatum* diszómás és diteloszómás addíciós vonalain elvégzett mesterséges levélrozsdá fertőzés kimutatta, hogy a 2P kromoszóma hosszú kart tartalmazó vonal nagy hatású rezisztenciát hordoz.

Keresztezéseinket olyan transzlokációs vonalak előállítása érdekében indítottuk, amelyek egyszerre tartalmaznak hasznos géneket mind az E, mind a P genomból. Ennek megfelelően búza-*Th. elongatum* és búza-*A. cristatum* diszómás addíciós vonalakat kereszteztünk egymással, és vizsgáltuk a keletkezett F₁ utódokat. Egy transzlokációt tartalmazó növényt tudunk azonosítani. A gametocid hatású kromoszómákat gyakran alkalmazzák különböző transzlokációs vonalak előállítására sikeresen. Keresztezési munkáink során bekapcsolódtunk egy búza-*Ae. cylindrica* 2C és búza *A. cristatum* diszómás addíciós vonalak keresztezési programjába és az utódok vizsgálatába. 5 db 5P és 2 db 6P kromoszómát tartalmazó transzlokációs vonalat tudunk molekuláris citogenetikai módszerekkel (FISH, GISH) azonosítani. Az azonosított transzlokációs vonalak ígéretes búza előnemesítési alapanyagnak tűnnek, azonban a nemesítési programokba való alkalmazásuk még további vizsgálatokat igényel.

6.1. Summary

The wheat, as one of our most widespread cereals plays a significant role in the human diet. Therefore the main goal of the wheat breeding programs is to increase the wheat yield. For this reason, improving the resistance of wheat to biotic and abiotic stresses is necessary. The wild relatives of wheat provide rich sources of agronomically useful traits which can be transfer into wheat by interspecific or intergeneric hybridization. The wheatgrasses contain genomes that are non-homologous to those of the wheat, but these are important as tertiary gene pools for wheat improvement. They possess genes conferring resistance to various disease, such as leaf, stem, and yellow rust, and powdery mildew, and they show high tolerance against cold, salt and drought stresses. Many resistance genes have already been successfully transferred from wheatgrasses into wheat genotypes, but still they are of a great potential for wheat improvement.

For the successful gene transfer it is important to understand the organization of the genomes of wheatgrasses and to identify these genomes with a high molecular precision. The goal of our study was to analyse the genomes of three diploid wheatgrasses (*A. cristatum*, *Ps. spicata*, *Th. bessarabicum*) using molecular cytogenetic methods and molecular markers, and development of wheat-wheatgrass introgression lines.

We developed the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) karyotypes of *A. cristatum* (PP), *Ps. spicata* (StSt) and *Th. bessarabicum* (JJ), and these karyotypes could be used to identify the chromosomes of these genomes in a wheat background. We analysed the chromosome

polymorphism between lines from different geographical origins. Using COS markers we analysed the phylogenetic relationships between the previously mentioned species and the *Th. elongatum* and bread wheat. Our results support the theory that the genomes E and J are distinct, which is a significant result considering that the relationship of these two genomes has been a source of controversy for decades. Using wheat-*Th. elongatum* disomic and ditelosomic addition lines we identified specific markers for all seven E genome chromosomes and chromosome arms, which markers can be useful for marker assisted selection (MAS) in wheat pre-breeding programs. We investigated the macrosyntentic relationship between the wheat and *Th. elongatum* genomes using a sequence similarity between the source EST sequences of the assigned COS markers and the reference sequences of wheat chromosomes. We found some chromosome rearrangements and a duplication between the long arms of 2E and that of the 6E chromosomes.

We examined the leaf rust resistance of the wheat-*A. cristatum* and wheat-*Th. elongatum* addition lines, and found that the long arm of the 2P chromosome showed high level of resistance against leaf rust.

Our crossings were aimed to develop translocation lines which contains useful genes from both E and J genomes. We crossed wheat-*Th. elongatum* and wheat-*A. cristatum* disomic addition lines and analysed the F₁ generation. We were able to identify one plant containing translocation. We also completed a crossing program using gametocidal system, and analysed the progenies from the crossings of wheat-*Ae. cylindrica* 2C and wheat-*A. cristatum* disomic addition lines. We identified 7 translocation lines containing 5P and 6P chromosomes using molecular cytogenetic methods (FISH, GISH). The identified translocation lines are considered as promising pre-breeding materials which need further detailed analysis.

7. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- Abdolmalaki, Z., Mirzaghaderi, G., Mason, A. S., and Badaeva, E. D. (2019). Molecular cytogenetic analysis reveals evolutionary relationships between polyploid *Aegilops* species. *Plant Systematics and Evolution*, May. <https://doi.org/10.1007/s00606-019-01585-3>
- Adonina, I. G., Goncharov, N. P., Badaeva, E. D., Sergeeva, E. M., Petrash, N. V., and Salina, E. A. (2015). (GAA)_n microsatellite as an indicator of the A genome reorganization during wheat evolution and domestication. *Comparative Cytogenetics*, 9(4), 533–547. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i4.5120>
- Aliyev, R. T., Abbasov, M. A., and Mammadov, A. C. (2007). Genetic identification of diploid and tetraploid wheat species with RAPD markers. *Turkish Journal of Biology*, 31, 173–180. <http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-07-31-3/biy-31-3-8-0705-7.pdf>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, J. A., Ogihara, Y., Sorrells, M. E., and Tanksley, S. D. (1992). Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 83(8), 1035–1043. <https://doi.org/10.1007/BF00232969>
- Appels, R., Gerlach, W. L., Dennis, E. S., Swift, H., and Peacock, W. J. (1980). Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma*, 78(3), 293–311. <https://doi.org/10.1007/BF00327389>
- Ardalani, S., Mirzaghaderi, G., and Badakhshan, H. (2016). A Robertsonian translocation from *Thinopyrum bessarabicum* into bread wheat confers high iron and zinc contents. *Plant Breeding*, 135(3), 286–290. <https://doi.org/10.1111/pbr.12359>
- Asay, K. H., and Johnson, D. A. (1990). Genetic Variances for Forage Yield in Crested Wheatgrass at Six Levels of Irrigation. *Crop Science*, 30(1), 79–82. <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000010018x>
- Badaeva, E. D., Amosova, A. V., Goncharov, N. P., Macas, J., Ruban, A. S., Grechishnikova, I. V., Zoshchuk, S. A., and Houben, A. (2015). A Set of Cytogenetic Markers Allows the Precise Identification of All A-Genome Chromosomes in Diploid and Polyploid Wheat. *Cytogenetic and Genome Research*, 146(1), 71–79. <https://doi.org/10.1159/000433458>

- 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(2), 293–306. <https://doi.org/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(6), 1150–1158. <https://doi.org/10.1139/g96-145>
- Bai, D., Knott, D. R., and Zale, J. (1998). The transfer of leaf rust resistance from *Triticum timopheevii* to durum and bread wheat and the location of one gene on chromosome 1A. *Canadian Journal of Plant Science*, 78(4), 683–687. <https://doi.org/10.4141/P97-136>
- 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)
- Bedő, Z., Balla, L., Szunics, L., Láng, L., and Kramarikné Kissimon, J. (1993). A martonvásári 1B/1R transzlokációs búzafajták agronómiai tulajdonságai. *Növénytermelés*, 40, 79–87. p.
- Belea, A. (1986). *Faj- és nemzetségkeresztezések a növényvilágban*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 235 p.
- Benavente, E., Orellana, J., and Fernández-Calvín, B. (1998). Comparative analysis of the meiotic effects of wheat *ph1b* and *ph2b* mutations in wheat x rye hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(8), 1200–1204. <https://doi.org/10.1007/s001220050857>
- Bentham, G. (1881). Notes on Gramineae, Tribe XIII. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 19, 129–134.
- Blakeslee, F. A., and Avery, A. G. (1937). Methods of Inducing Doubling of. *The Journal of Heredity*, 28(12), 393–411.
- Blunk, S., Jenkins, B., Aldas, R., Zhang, R., Pan, Z., Yu, C., Sakr, N., and Zheng. (2005). Fuel Properties and Characteristics of Saline Biomass. *Fuel Properties and Characteristics of Saline Biomass. American Society of Agricultural Engineers Meetings Papers, No. 056132*, 1–19. <https://doi.org/10.13031/2013.19580>
- Bohn, M., Utz, H. F., and Melchinger, A. E. (1999). Genetic Similarities among Winter Wheat Cultivars Determined on the Basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and Their Use for Predicting Progeny Variance. *Crop*, 39(1), 228–237. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900010035x>
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32, 314–331.

- Bradley St. Clair, J., Kilkenny, F. F., Johnson, R. C., Shaw, N. L., and Weaver, G. (2013). Genetic variation in adaptive traits and seed transfer zones for *Pseudoroegneria spicata* (bluebunch wheatgrass) in the northwestern United States. *Evolutionary Applications*, 6(6), 933–948. <https://doi.org/10.1111/eva.12077>
- Brasileiro-Vidal, A. C., Cuadrado, A., Brammer, S. P., Zanatta, A. C. A., Prestes, A. M., Moraes-fernandes, M. I. B., and Guerra, M. (2003). Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (*Triticeae*, *Poaceae*) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4), 505–510. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572003000400014>
- Brwon-Guedira, G. L., Gill, B. S., Cox, T. S., and Leath, S. (2006). Transfer of disease resistance genes from *Triticum araraticum* to common wheat. *Plant Breeding*, 116(2), 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1997.tb02162.x>
- Burt, C., and Nicholson, P. (2011). Exploiting co-linearity among grass species to map the *Aegilops ventricosa*-derived *Pch1* eyespot resistance in wheat and establish its relationship to *Pch2*. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(8), 1387–1400. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1674-9>
- Cabrera, A., Kozik, A., Howad, W., Arus, P., Iezzoni, A. F., and van der Knaap, E. (2009). Development and bin mapping of a *Rosaceae* Conserved Ortholog Set (COS) of markers. *BMC Genomics*, 10, 562. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-562>
- Cai, X., Jones, S. S., and Murray, T. D. (1996). Characterization of an *Agropyron elongatum* chromosome conferring resistance to cephalosporium stripe in common wheat. *Genome*, 39(1), 56–62. <https://doi.org/10.1139/g96-008>
- Carlson, J. R. (1986). *A study on morphological variation within Pseudoroegneria spicata*. Oregon State University.
- Caspersson, T., Farber, S., Foley, G. E., Kudynowski, J., Modest, E. J., Simonsson, E., Wagh, U., and Zech, L. (1967). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research*, 49(1), 219–222. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90538-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90538-7)
- Castilho, A., and Heslop-Harrison, J. S. (1995). Physical mapping of 5S and 18S–25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome*, 38(1), 91–96. <https://doi.org/10.1139/g95-011>

- Cavanagh, C. R., Chao, S., Wang, S., Huang, B. E., Stephen, S., Kiani, S., Forrest, K., Saintenac, C., Brown-Guedira, G. L., Akhunova, A., See, D., Bai, G., Pumphrey, M., Tomar, L., Wong, D., Kong, S., Reynolds, M., Da Silva, M. L., Bockelman, H., Talbert, L., Anderson, J. A., Dreisigacker, S., Baenziger, S., Carter, A., Korzun, V., Morrell, P. L., Dubcovsky, J., Morell, M. K., Sorrells, M. E., Hayden, M. J., and Akhunov, E. (2013). Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(20), 8057–8062. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217133110>
- 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>
- Chapman, M. A., Chang, J. C., Weisman, D., Kesseli, R. V., and Burke, J. M. (2007). Universal markers for comparative mapping and phylogenetic analysis in the *Asteraceae* (*Compositae*). *Theoretical and Applied Genetics*, 115(6), 747–755. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0605-2>
- Chen, P. D., Tsujimoto, H., and Gill, B. S. (1994). Transfer of *Phl* genes promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(1), 97–101. <https://doi.org/10.1007/BF00222400>
- Chen Q., Conner, R. L., and Laroche, A. (1995). Identification of the parental chromosomes of the wheat-alien amphiploid Agrotana by genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 38(6), 1163–1169.
- Chen, Q., Conner, R. L., Laroche, A., and Thomas, J. B. (1998). Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 41(4), 580–586. <https://doi.org/10.1139/gen-41-4-580>
- Chen, Q., Jahier, J., and Cauderon, Y. (1992). Production and cytogenetic analysis of BC1, BC2 , and BC3 progenies of an intergeneric hybrid between *Triticum aestivum* (L.) Thell. and tetraploid *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn . *Theor. Appl. Genet.*, 84, 698–703.
- Chen, Q., Lu, Y. L., Jahier, J., and Bernard, M. (1994). Identification of wheat-*Agropyron cristatum* monosomic addition lines by RFLP analysis using a set of assigned wheat DNA probes. *Theoretical and Applied Genetics*, 89(1), 70–75. <https://doi.org/10.1007/BF00226985>

- Chen, S., Huang, Z., Dai, Y., Qin, S., Gao, Y., Zhang, L., Gao, Y., and Chen, J. (2013). The Development of 7E chromosome-specific molecular markers for *Thinopyrum elongatum* based on SLAF-seq technology. *PLoS ONE*, 8(6), e65122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065122>
- Colmer, T. D., Flowers, T. J., and Munns, R. (2006). Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1059–1078. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj124>
- 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>
- Copete, A., and Cabrera, A. (2017). Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in *Agropyron cristatum* and mapping of conserved orthologous set molecular markers. *Euphytica*, 213(8), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1981-6>
- Cseh, A., Yang, C., Hubbart-Edwards, S., Scholefield, D., Ashling, S. S., Burridge, A. J., Wilkinson, P. A., King, I. P., King, J., and Grewal, S. (2019). Development and validation of an exome-based SNP marker set for identification of the St, Jr and Jvs genomes of *Thinopyrum intermedium* in a wheat background. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(5), 1555–1570. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03300-9>
- Cuadrado, A., Cardoso, M., and Jouve, N. (2008). Physical organisation of simple sequence repeats (SSRs) in *Triticeae*: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3–4), 210–219. <https://doi.org/10.1159/000121069>
- Cuadrado, A., and Schwarzacher, T. (1998). The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma*, 107(8), 587–594. <https://doi.org/10.1007/s004120050345>
- D'Ovidio, R., Tanzarella, O. A., and Porceddu, E. (1990). Rapid and efficient detection of genetic polymorphism in wheat through amplification by polymerase chain reaction. *Plant Molecular Biology*, 15(1), 169–171. <https://doi.org/10.1007/bf00017737>
- Danilova, T. V., Friebe, B., and Gill, B. S. (2014). Development of a wheat single gene FISH map for analyzing homoeologous relationship and chromosomal rearrangements within the *Triticeae*. *Theor. Appl. Genet.*, 127, 715–730. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2253-z>
- Danilova, T. V., Friebe, B., and Gill, B. S. (2012). Single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and genome analysis: Acc-2 loci mark evolutionary chromosomal rearrangements in wheat. *Chromosoma*, 121(6), 597–611. <https://doi.org/10.1007/s00412-012-0384-7>

- Devos, K. M., and Gale, M. D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 84(5–6), 567–572. <https://doi.org/10.1007/BF00224153>
- Dewey, D. R. (1984). The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae*. *Gene Manipulation in Plant Improvement. Proc. 16th Stadler Genetic Symp., Columbia*, 209–279. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2429-4_9
- Dewey, D. R., and Asay, K. H. (1975). The Crested Wheatgrasses of Iran. *Crop Science*, 15, 844–849.
- Dudits, D., and Heszky, L. (2014). *Növényi biotechnológia és géntechnológia*.
- Dvorak, J. (1981). Genome relationships among *Elytrigia* (= *Agropyron*) *elongata*, *E. stipifolia*, "*E. elongata* 4x," *E. caespitosa*, *E. intermedia*, and "*E. elongata* 10x." *Canadian Journal of Genetics & Cytology*, 23(3), 481–492.
- Dvorak, J., Edge, M., and Ross, K. (1988). On the evolution of the adaptation of *Lophopyrum elongatum* to growth in saline environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(June), 3805–3809.
- Dvorak, J., and Knott, D. R. (1974). Disomic and ditelosomic additions of diploid *Agropyron elongatum* chromosomes to *Triticum aestivum*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 16(2), 399–417. <https://doi.org/10.1139/g74-043>
- Dvorak, J., Lassnek, M. W., Kota, R. S., and Chen, K. C. (1984). The distribution of the ribosomal RNA genes in the *Triticum speltoides* and *Elytrigia elongata* genomes. *Can. J. Genet. Cytol.*, 26(628–632), 1–5.
- Dvorak, J., and Sosulski, F. W. (1974). Effects of additions and substitutions of *Agropyron elongatum* chromosomes on quantitative characters in wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 16(3), 627–637.
- Dvorak, J., Zhang, H. B., Kota, R. S., and Lassner, M. (1989). Organization and evolution of the 5S ribosomal RNA gene family in wheat and related species. *Genome*, 32, 1003–1016.
- Endo, T. R. (1990). Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. In *Japanese Journal of Genetics* (Vol. 65, pp. 135–152). <https://doi.org/10.1266/jjg.65.135>
- Endo, T. R. (2007). The gametocidal chromosome as a tool for chromosome manipulation in wheat. *Chromosome Research*, 15(1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1100-3>
- Endo, T. R., and Gill, B. S. (1996). The Deletion Stocks of Common Wheat. *Journal of Heredity*, 87(4), 295–307. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023003>
- FAO. (2009). *How to feed the world in 2050. High Level Expert Forum. Rome, Italy*.

- FAOSTAT. (2020). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/> (accessed on 26 August 2020).
- Farshadfar, M., Molnár-Láng, M., and Sutka, J. (1994). The crossability of different wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes with *Triticum timopheevi* Zhuk. under two types of conditions Author(s): M. Farshadfar, M. Molnár-Láng and J. Sutka Published by: Akadémiai Kiadó. *Cereal Research Communications*, 22(1–2), 15–20.
- Fedak, G. (1985). Alien species as sources of physiological traits for wheat improvement. *Euphytica*, 34(3), 673–680. <https://doi.org/10.1007/BF00035403>
- Fedak, G., and Han, F. (2005). Characterization of derivatives from wheat-*Thinopyrum* wide crosses. *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1–3), 360–367. <https://doi.org/10.1159/000082420>
- Fedak, G., and Kim, N.-S. (2008). Tools and Methodologies for Cytogenetic Studies of Plant Chromosomes 1. *Cytology and Genetics*, 42(3), 189–203. <https://doi.org/10.3103/S0095452708030067>
- Feldman, M. (1966a). Identification of unpaired chromosomes in F1 hybrids involving *Triticum aestivum* and *T. timopheevii*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 8, 144–151.
- Feldman, M. (1966b). The effect of chromosomes 5B, 5D, and 5A on chromosomal pairing in *Triticum aestivum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(6), 1447–1453. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.6.1447>
- Feldman, M., and Levy, A. A. (2015). Origin and Evolution of Wheat and Related Triticeae Species. In *Alien Introgression in Wheat* (pp. 21–76). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6>
- Flagel, L. E., and Wendel, J. F. (2009). Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytologist*, 183(3), 557–564. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02923.x>
- Fominaya, A., Molnar, S., Fedak, G., Armstrong, K. C., Kim, N. S., and Chen, Q. (1997). Characterization of *Thinopyrum distichum* chromosomes using double fluorescence *in situ* hybridization, RFLP analysis of 5S and 26S rRNA, and C-banding of parents and addition lines. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil National de Recherches Canada*, 40(5), 689–696. <https://doi.org/10.1139/g97-791>
- Forster, B. P., Gorham, J., and Miller, T. E. (1987). Salt tolerance of an amphiploid between *Triticum aestivum* and *Agropyron junceum*. *Plant Breeding*, 98(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1987.tb01083.x>
- Forster, B. P., and Miller, T. E. (1989). Genome relationship between *Thinopyrum bessarabicum* and *Thinopyrum elongatum*. *Genome*, 32(5), 930–931. <https://doi.org/10.1139/g89-532>

- Forster, B. P., Miller, T. E., and Law, C. N. (1988). Salt tolerance of two wheat – *Agropyron junceum* disomic addition lines. *Genome*, 30(4), 559–564. <https://doi.org/10.1139/g88-094>
- Fransz, P. F., Alonso-Blanco, C., Liharska, T. B., Peeters, A. J. M., Zabel, P., and De Jong, J. H. (1996). High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres. In *Plant Journal* (Vol. 9, Issue 3, pp. 421–430). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09030421.x>
- Fraser, L. H., Greenall, A., Carlyle, C., Turkington, R., and Friedman, C. R. (2009). Adaptive phenotypic plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: Response of stomatal density, leaf area and biomass to changes in water supply and increased temperature. *Annals of Botany*, 103(5), 769–775. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn252>
- Friebe, B., Jiang, J., Knott, D. R., and Gill, B. S. (1994). Compensation indices of radiation-induced wheat-*Agropyron elongatum* translocations conferring resistance to leaf rust and stem rust. *Crop Science*, 34(2), 400–404. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400020018x>
- Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W. J., McIntosh, R. A., and Gill, B. S. (1996). Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*, 91(1), 59–87. <https://doi.org/10.1007/BF00035277>
- Friebe, B., Kynast, R. G., and Gill, B. S. (2000). Gametocidal factor-induced structural rearrangements in rye chromosomes added to common wheat. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 8(6), 501–511. <https://doi.org/10.1023/A:1009219722418>
- Fu, S., Lv, Z., Qi, B., Guo, X., Li, J., Liu, B., and Han, F. (2012). Molecular Cytogenetic Characterization of Wheat-*Thinopyrum elongatum* Addition, Substitution and Translocation Lines with a Novel Source of Resistance to Wheat Fusarium Head Blight. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.11.008>
- Fulton, T. M., Van der Hoeven, R., Eannetta, N. T., and Tanksley, S. D. (2002). Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *The Plant Cell*, 14(July), 1457–1467. <https://doi.org/10.1105/tpc.010479>
- Gaertner, J. (1770). Observationes et descriptiones botanicae. *Nov. Comm. Petrop*, 14, 531–547.
- Gale, M. D., and Miller, T. E. (1987). The introduction of alien genetic variation in wheat. *Wheat Breeding*, 173–210. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3131-2_7
- Gall, J. G., and Pardue, M. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 64(2), 600–604.

- Garcia, A. A. F., Benchimol, L. L., Barbosa, A. M. M., Geraldi, I. O., Souza, C. L., and de Souza, A. P. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, 27(4), 579–588. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000400019>
- 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.
- Gerlach, W. L., and Dyer, T. A. (1980). Sequence organization of the repeating units in the nucleolus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 8(21), 4851–4866.
- Gill, B. S., Friebe, B., and Endo, T. R. (1991). Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 34(5), 830–839. <https://doi.org/10.1139/g91-128>
- Gill, B. S., and Raupp, W. J. (1987). Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Science*, 27(3), 445–450. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700030004x>
- 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>
- Grewal, S., Yang, C., Edwards, S. H., Scholefield, D., Ashling, S., BurrIDGE, A. J., King, I. P., and King, J. (2018). Characterisation of *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes through genome-wide introgressions into wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(2), 389–406. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-3009-y>
- Gupta, P. K., Balyan, H. S., Sharma, P. C., and Ramesh, B. (1996). Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science*, 70(1), 45–54.
- Gupta, P. K., Rustgi, S., Sharma, S., Singh, R., Kumar, N., and Balyan, H. S. (2003). Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 270(4), 315–323. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0921-4>
- Hackauf, B., Korzun, V., Wortmann, H., Wilde, P., and Wehling, P. (2012). Development of conserved ortholog set markers linked to the restorer gene *Rfp1* in rye. *Molecular Breeding*, 30(3), 1507–1518. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9736-5>
- He, C., Holme, J., and Anthony, J. (2014). SNP Genotyping: The KASP Assay. In *Crop Breeding: Methods and Protocols* (pp. 75–86). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0446-4>

- Heslop-Harrison, J. S., Leitch, A. R., Schwarzacher, T., and Anamthawat-Jónsson, K. (1990). Detection and characterization of 1B/1R translocations in hexaploid wheat. *Heredity*, *65*, 385–392.
- Hoffmann, B. (2011). *Növénygenetika*.
- Howard, T., Rejab, N. A., Griffiths, S., Leigh, F., Leverington-Waite, M., Simmonds, J., Uauy, C., and Trafford, K. (2011). Identification of a major QTL controlling the content of B-type starch granules in *Aegilops*. *Journal of Experimental Botany*, *62*(6), 2217–2228. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq423>
- Hsiao, C., Wang, R. R. C., and Dewey, D. R. (1986). Karyotype analysis and genome relationships of 22 diploid species in the tribe *Triticeae*. *Canadian Journal of Genetics & Cytology*, *28*, 109–120.
- Hu, L.-J., Liu, C., Zeng, Z.-X., Li, G.-R., Song, X.-J., and Yang, Z.-J. (2012). Genomic rearrangement between wheat and *Thinopyrum elongatum* revealed by mapped functional molecular markers. *Genes & Genomics*, *34*(1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s13258-011-0153-7>
- Hu, X. Y., Ohm, H. W., and Dweikat, I. (1997). Identification of RAPD markers linked to the gene *PM1* for resistance to powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *94*(6–7), 832–840. <https://doi.org/10.1007/s001220050484>
- Innes, R. L., and Kerber, E. R. (1994). Resistance to wheat leaf rust and stem rust in *Triticum tauschii* and inheritance in hexaploid wheat of resistance transferred from *T. tauschii*. *Genome*, *37*, 813–822.
- Islam, A. K. M. R., and Shepherd, K. W. (1992). Substituting ability of individual barley chromosomes for wheat chromosomes. *Plant Breeding*, *109*(2), 141–150. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1992.tb00164.x>
- IWGSC. (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, *345*(6194), 1251788–1251788. <https://doi.org/10.1126/science.1251788>
- IWGSC. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, *361*(6403), eaar7191. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
- Jauhar, P. P. (1988). A reassessment of genome relationships between *Thinopyrum bessarabicum* and *T. elongatum* of the *Triticeae*. *Genome*, *30*(6), 903–914. <https://doi.org/10.1139/g88-146>
- Jauhar, P. P. (1990). Dilemma of genome relationship in the diploid species *Thinopyrum elongatum* (*Triticeae: Poaceae*). *Genome*, *33*(6), 944–946.

- Jauhar, P. P., Peterson, T. S., and Xu, S. S. (2009). Cytogenetic and molecular characterization of a durum alien disomic addition line with enhanced tolerance to *Fusarium* head blight. *Genome*, 52(5), 467–483. <https://doi.org/10.1139/G09-014>
- Jeong, Y. M., Chung, W. H., Chung, H., Kim, N., Park, B. S., Lim, K. B., Yu, H. J., and Mun, J. H. (2014). Comparative analysis of the radish genome based on a conserved ortholog set (COS) of *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(9), 1975–1989. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2354-3>
- Jiang, B., Liu, T., Li, H., Han, H., Li, L., Zhang, J., Yang, X., Zhou, S., Li, X., and Liu, W. (2018). Physical mapping of a novel locus conferring leaf rust resistance on the long arm of *Agropyron cristatum* chromosome 2P. *Frontiers in Plant Science*, 9(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00817>
- Jiang, J., Friebe, B., Dhaliwal, H. S., Martin, T. J., and Gill, B. S. (1993). Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron elongatum* chromatin in wheat germplasm specifying resistance to wheat streak mosaic virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(1), 41–48. <https://doi.org/10.1007/BF00223806>
- Jiang, J., Friebe, B., and Gill, B. S. (1994). Recent advances in alien gene-transfer in wheat. *Euphytica*, 73, 199–212. [https://doi.org/Doi 10.1007/Bf00036700](https://doi.org/Doi%2010.1007/Bf00036700)
- Jiang, J., and Gill, B. S. (1994a). Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Research*, 2(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/bf01539455>
- Jiang, J., and Gill, B. S. (1994b). Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome*, 37(5), 717–725.
- Jiang, J., and Gill, B. S. (1994c). New 18S.26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. *Chromosoma*, 103(3), 179–185. <https://doi.org/10.1007/BF00368010>
- Jiang, J., and Gill, B. S. (2006). Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, 49(9), 1057–1068. <https://doi.org/10.1139/g06-076>
- John, H. A., Birnstiel, M. L., and Jones, K. W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223(5206), 582–587. <https://doi.org/10.1038/223582a0>
- Jones, S. S., Dvořák, J., Knott, D. R., and Qualset, C. O. (1991). Use of double-ditelosomic and normal chromosome 1D recombinant substitution lines to map *Sr33* on chromosome arm 1DS in wheat. *Genome*, 34(4), 505–508. <https://doi.org/10.1139/g91-077>

- 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>
- Kellogg, E. A., Appels, R., and Mason-Gamer, R. J. (1996). When genes tell different stories: The diploid genera of *Triticeae* (*Gramineae*). *Systematic Botany*, 21(3), 321–347.
- Khrustaleva, L. I., and Kik, C. (2001). Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant Journal*, 25(6), 699–707. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.00995.x>
- Kibirige-Sebunya, I., and Knott, D. R. (1983). Transfer of stem rust resistance to wheat from an *Agropyron* chromosome having a gametocidal effect. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 25(3), 215–221. <https://doi.org/10.1139/g83-035>
- Kihara, H. (1924). Cytologische und genetische studien bei wichtigen getreidearten mit besonderer rücksicht auf das verhalten der chromosomen und die sterilitaet in den bastarden. *Kyoto Imperial University, Kyoto.*, 1–200.
- King, I. P., Forster, B. P., Law, C. C., Cant, K. A., Orford, S. E., Gorham, J., Reader, S., and Miller, T. E. (1997). Introgression of salt-tolerance genes from *Thinopyrum bessarabicum* into wheat. *New Phytologist*, 137(1), 75–81. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00828.x>
- King, I. P., Purdie, K. A., Orford, S. M., and Miller, T. E. (1993). Detection of homoeologous chiasma formation in *Triticum durum* x *Thinopyrum bessarabicum* hybrids using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*, 71, 369–372. <https://doi.org/10.1038/hdy.1993.151>
- King, I. P., Purdie, K. A., Rezanoor, H. N., Koebner, R. M. D., Miller, T. E., Reader, S. M., and Nicholson, P. (1993). Characterization of *Thinopyrum bessarabicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and genomic *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(8), 895–900. <https://doi.org/10.1007/BF00211038>
- King, I. P., Reader, S. M., Purdie, K. A., Orford, S. E., and Miller, T. E. (1994). A study of the effect of a homoeologous pairing promoter on chromosome pairing in wheat/rye hybrids using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*, 72(3), 318–321. <https://doi.org/10.1038/hdy.1994.42>
- King, J., Grewal, S., Yang, C. Y., Hubbart, S., Scholefield, D., Ashling, S., Edwards, K. J., Allen, A. M., Burridge, A., Bloor, C., Davassi, A., da Silva, G. J., Chalmers, K., and King, I. P. (2017). A step change in the transfer of interspecific variation into wheat from *Amblyopyrum muticum*. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 217–226. <https://doi.org/10.1111/pbi.12606>

- Kiss, Á. (1968). *Triticale, a homok új gabonája*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.
- Kiss E. (2005). Molekuláris növénynevelés. In L. Heszky, L. Fésüs, & L. Hornok (Eds.), *Mezőgazdasági Biotechnológia* (pp. 194-210 p). Budapest Agroiinform Kiadó.
- Knott, D. R. (1987). Transferring alien genes to wheat. In E. G. Heyne (Ed.), *Wheat and Wheat Improvement* (pp. 462–471). Madison, WI: American Society of America, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc.
- Knott, D. R. (1989). The effect of transfers of alien genes for leaf rust resistance on the agronomic and quality characteristics of wheat. *Euphytica*, 1986, 65–72.
- 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. *Molecular Ecology*, 14(2), 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02416.x>
- Kőszegi, B., Linc, G., Juhász, A., Láng, L., and Molnár-Láng, M. (2000). Occurrence of the 1RS/1BL wheat-rye translocation in Hungarian wheat varieties. *Acta Agronomica Hungarica*, 48(3), 227–236. <https://doi.org/10.1556/AAgr.48.2000.3.2>
- Kruppa, K., and Molnár-Láng, M. (2016). Simultaneous visualization of different genomes (J, JSt and St) in a *Thinopyrum intermedium* × *Thinopyrum ponticum* synthetic hybrid (*Poaceae*) and in its parental species by multicolour genomic *in situ* hybridization (mcGISH). *Comparative Cytogenetics*, 10(2), 283–293. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v10i2.7305>
- KSH. (2018). *Gyors tájékoztató, Gabonák*. Központi Statisztikai Hivatal. <https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/gyor/kal/kal18.html>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Langer, P. R., Waldrop, A. A., and Ward, D. C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes (nucleotide analog/DNA and RNA polymerase/avidin-Sepharose/antibiotin antibody/immunoprecipitation). *Biochemistry*, 78(11), 6633–6637. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6633>
- Lángné Molnár, M. (2006). *Fajidegen génátvitel klasszikus genetikai módszerekkel a búzába és az utódok molekuláris citogenetikai elemzése*.
- Lapitan, N. L. V. (1992). Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome*, 35(2), 171–181. <https://doi.org/10.1139/g92-028>

- Lapitan, N. L. V., Gill, B. S., and Sears, R. G. (1987). Genomic and phylogenetic relationships among rye and perennial species in the *Triticeae*. *Crop Science*, 27(4), 682. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700040014x>
- Lateef, D. D. (2015). DNA marker technologies in plants and applications for crop improvements. *Journal of Biosciences and Medicines*, 03(05), 7–18. <https://doi.org/10.4236/jbm.2015.35002>
- Le, H. T., and Armstrong, K. C. (1991). *In situ* hybridization as a rapid means to assess meiotic pairing and detection of alien DNA transfers in interphase cells of wide crosses involving wheat and rye. *Molecular Genetics and Genomics*, 225(1), 33–37. <https://doi.org/10.1007/bf00282639>
- Le, H. T., Armstrong, K. C., and Miki, B. (1989). Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Molecular Biology Reporter*, 7(2), 150–158.
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., and Bennett, W. M. M. D. (1991). Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. *Chromosoma*, 101, 206–213.
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D., and Lietch, I. J. (1994). *In situ hybridization: a practical guide*. Bios Scientific Publishers.
- Levinson, G., and Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution'. *Molecular Biology and Evolution*, 4(3), 203–221.
- Li, H., Jiang, B., Wang, J., Lu, Y., Zhang, J., Pan, C., Yang, X., Li, X., Liu, W., and Li, L. (2017). Mapping of novel powdery mildew resistance gene(s) from *Agropyron cristatum* chromosome 2P. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(1), 109–121. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2797-9>
- Li, L. H., Dong, Y. S., Zhou, R. H., Li, X. Q., and . P. L. (1995). Cytogenetics and self-fertility of hybrids between *Triticum aestivum* L. and *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.. *Acta Genetica Sinica.*, 22, 109–114.
- Li, L., Yang, X., Li, X., Dong, Y., and Chen, X. (1998). Introduction of desirable genes from *Agropyron cristatum* into common wheat by intergeneric hybridization. *Sci Agric Sin*, 31, 1–6.
- Li, Q., Lu, Y., Pan, C., Zhang, J., Liu, W., Yang, X., Li, X., Xi, Y., and Li, L. (2016). Characterization of a novel wheat-*Agropyron cristatum* 2P disomic addition line with powdery mildew resistance. *Crop Science*, 56(5), 2390–2400. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.10.0638>

- Liewlaksaneeyanawin, C., Zhuang, J., Tang, M., Farzaneh, N., Lueng, G., Cullis, C., Findlay, S., Ritland, C. E., Bohlmann, J., and Ritland, K. (2009). Identification of COS markers in the *Pinaceae*. *Tree Genetics & Genomes*, *5*(1), 247–255. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0189-2>
- Limin, A. E., and Fowler, D. B. (1987). Cold hardiness of forage grasses grown on the canadian prairies. *Can. J. Plant. Sci.*, *67*, 1111–1115.
- Linc, G., Gaál, E., Molnár, I., Icsó, D., Badaeva, E., and Molnár-Láng, M. (2017). Molecular cytogenetic (FISH) and genome analysis of diploid wheatgrasses and their phylogenetic relationship. *PLoS ONE*, *12*(3), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173623>
- Linc, G., and Molnár-Láng, M. (2003). Búza/árpa diszómás addíciók előállítása öszibúza-fajtákban kétféle módszerrel és azonosításuk molekuláris citogenetikai technikákkal. *Növénytermelés*, *52*, 3–13.
- Linc, G., and Molnár-Láng, M. (2012). High resolution molecular cytogenetic techniques in plants: Pachytene- and fibre-FISH. *Acta Agronomica Hungarica*, *60*(2), 157–165. <https://doi.org/10.1556/aagr.60.2012.2.7>
- 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>
- Litt, M., and Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*, *44*(3), 397–401.
- Liu, Y.-G., and Tsunewaki, K. (1991). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis in Wheat. II. Linkage Maps of the RFLP Sites in Common Wheat. *Jpn J Genet*, *66*(5), 617–633. <https://doi.org/10.1266/jjg.66.617>
- Liu, Y. G., Mori, N., and Tsunewaki, K. (1990). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. I. Genomic DNA library construction and RFLP analysis in common wheat. *Jpn J Genet*, *65*(5), 367–380. <https://doi.org/10.1266/jjg.65.367>
- Liu, Z., Li, D., and Zhang, X. (2007). Genetic relationships among five basic genomes St, E, A, B and D in *Triticeae* revealed by genomic Southern and *in situ* hybridization. *Journal of Integrative Plant Biology*, *49*(7), 1080–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00462.x>
- Lu, M., Lu, Y., Li, H., Pan, C., Guo, Y., Zhang, J., Yang, X., Li, X., Liu, W., and Li, L. (2016). Transferring desirable genes from *Agropyron cristatum* 7P chromosome into common wheat. *PLoS ONE*, *11*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159577>

- Mahelka, V., Kopecný, D., and Paštová, L. (2011). On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). *BMC Evolutionary Biology*, 11, 127. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-127>
- Marcussen, T., Sandve, S. R., Heier, L., Spannagl, M., Pfeifer, M., Jakobsen, K. S., Wulff, B. B., Steuernagel, B., Mayer, K. F., and Olsen, O. A. (2014). Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science*, 345(6194). <https://doi.org/10.1126/science.1250092>
- Mayer, K. F. X., Martis, M., Hedley, P. E., Simkova, H., Liu, H., Morris, J. A., Steuernagel, B., Taudien, S., Roessner, S., Gundlach, H., Kubalaková, M., Suchanková, P., Murat, F., Felder, M., Nussbaumer, T., Graner, A., Salse, J., Endo, T., Sakai, H., Tanaka, T., Itoh, T., Sato, K., Platzer, M., Matsumoto, T., Scholz, U., Doležel, J., Waugh, R., and Stein, N. (2011). Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *The Plant Cell*, 23(4), 1249–1263. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082537>
- McIntosh, R. A., Wellings, C. R., and Park, R. F. (1995). Wheat rusts: An atlas of resistance genes. *Melbourne: CSIRO Australia*, 205.
- 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 Agronomica Hungarica*, 60(2), 87–95. <https://doi.org/10.1556/AAgr.60.2012.2.1>
- Mello-Sampayo, T. (1971). Genetic regulation of meiotic chromosome pairing by chromosome 3D of *Triticum aestivum*. *Nature New Biology*, 230(9), 22–23.
- Molnár-Láng, M. (2006). Idegen fajú addíciók, szubsztitúciók és transzlokációk létrehozása a búzában. In *Dudits Dénes A búza nemesbítésének tudománya - A funkcionális genomikától a vetőmagig* (pp. 33–43).
- 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(3), 301–305.
- 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>

- Molnár, I., Kubaláková, M., Simková, H., Farkas, A., Cseh, A., Megyeri, M., Vrana, J., Molnár-Láng, M., and Doležel, J. (2014). Flow cytometric chromosome sorting from diploid progenitors of bread wheat, *T. urartu*, *Ae. speltooides* and *Ae. tauschii*. *Theor. Appl. Genet.*, *127*(5), 1091–1104. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2282-2>
- Molnár, I., Linc, G., Dulai, S., Nagy, E. D., and Molnár-Láng, M. (2007). Ability of chromosome 4H to compensate for 4D in response to drought stress in a newly developed and identified wheat-barley 4H(4D) disomic substitution line. *Plant Breeding*, *126*(4), 369–374. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01300.x>
- Molnár, I., Schneider, A., and Molnár-Láng, M. (2005). Demonstration of *Aegilops biuncialis* chromosomes in a wheat background by genomic *in situ* hybridization (GISH) and identification of U chromosomes by FISH using. In *Cereal Research Communications* (Vol. 33, Issue 4, p. 673). <http://www.akademiai.com/index/QX4428W79817J318.pdf>
- Molnár, I., Šimková, H., Leverington-Waite, M., Goram, R., Cseh, A., Vrána, J., Farkas, A., Doležel, J., Molnár-Láng, M., and 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070844>
- Molnár, I., Vrána, J., Burešová, V., Cápál, P., Farkas, A., Darkó, É., Cseh, A., Kubaláková, M., Molnár-Láng, M., and 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. *The Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.13266>
- Monneveux, P., Reynolds, M. P., González Aguilar, J., and Singh, R. P. (2003). Effects of the 7DL.7Ag translocation from *Lophopyrum elongatum* on wheat yield and related morphophysiological traits under different environments. *Plant Breeding*, *122*(5), 379–384. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00856.x>
- Mujeeb-Kazi, A. (1995). Utilizing wild grass biodiversity in wheat improvement: 15 years of wide cross research at CIMMYT. In *CIMMYT REPORT*.
- Mujeeb-Kazi, A., and Rajaram, S. (2002). Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement. *Bread Wheat Improvement and Production*, 199–215.
- Mukai, Y., and Gill, B. S. (1991). Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. *Genome*, *34*, 448–452.
- Mukai, Y., Nakahara, Y., and Yamamoto, M. (1993). Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, *36*, 489–494.

- Murphy, K. M., Carter, A., Zemetra, R. S., and Jones, S. S. (2007). Karyotype and ideogram analyses of four wheatgrass cultivars for use in perennial wheat breeding. *Journal of Sustainable Agriculture*, 31(1), 61–73. <https://doi.org/10.1300/J064v31n01>
- 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>
- Nevski. (1933). Agrostologische Studien. IV. Über das System der Tribe Hordeae Benth. *Trudy Bor. Inst. Akad. Nauk SSSR. Ser I, Fl S St Vyss Rast*, 9–32.
- Novák, H. (1999). *Molekuláris diagnosztika*.
- O'mara, J. G. (1940). Cytogenetic Studies on *Triticale*. I. a Method for Determining the Effects of Individual *Secale* Chromosomes on *Triticum*. *Genetics*, 25(4), 401–408.
- Ochoa, V., Madrid, E., Said, M., Rubiales, D., and Cabrera, A. (2015). Molecular and cytogenetic characterization of a common wheat-*Agropyron cristatum* chromosome translocation conferring resistance to leaf rust. *Euphytica*, 201(1), 89–95. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1190-5>
- Omielan, J. A., Epstein, E., and Dvorak, J. (1991). Salt tolerance and ionic relations of wheat as affected by individual chromosomes of salt-tolerant *Lophopyrum elongatum*. *Genome*, 34(6), 961–974.
- Pan, C., Li, Q., Lu, Y., Zhang, J., Yang, X., Li, X., Li, L., and Liu, W. (2017). Chromosomal localization of genes conferring desirable agronomic traits from *Agropyron cristatum* chromosome 1P. *PLoS ONE*, 12(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175265>
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M. D., and Shiu, S. (2016). Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiology*, 171(August), pp.00523.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00523>
- Pardue, M., and Gall, J. G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168(3937), 1356–1358. <https://doi.org/10.1126/science.168.3937.1356>
- Patokar, C., Sepsi, A., Schwarzacher, T., Kishii, M., and Heslop-Harrison, J. S. (2015). Molecular cytogenetic characterization of novel wheat-*Thinopyrum bessarabicum* recombinant lines carrying intercalary translocations. *Chromosoma*, 163–172. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0537-6>
- Paux, E., Sourdille, P., Mackay, I., and Feuillet, C. (2012). Sequence-based marker development in wheat: Advances and applications to breeding. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1071–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.015>
- Pedersen, C., and Langridge, P. (1997). Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome*, 40, 589–593.

- Pedersen, C., and Linde-Laursen, I. (1994). Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley. *Chromosome Research*, 2(1), 65–71. <https://doi.org/10.1007/bf01539456>
- Pedersen, C., Rasmussen, S. K., and Linde-Laursen, I. (1996). Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the *Triticeae* (*Poaceae*) by in situ hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome*, 39(1), 93–104. <https://doi.org/10.1139/g96-013>
- Pepó, P., and Sárvári, M. (2011). *Gabonanövények termesztése*. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem.
- Pérez, R., De Bustos, A., Jouve, N., and Cuadrado, Á. (2009). Localization of *rad50*, a single-copy gene, on group 5 chromosomes of wheat, using a FISH protocol employing tyramide for signal amplification (Tyr-FISH). *Cytogenetic and Genome Research*, 125(4), 321–328. <https://doi.org/10.1159/000235938>
- Powell, W., Machray, G. C., and Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1 IS-(7), 215–222. [https://doi.org/10.1016/1360-1385\(96\)86898-1](https://doi.org/10.1016/1360-1385(96)86898-1)
- Pu, J., Wang, Q., Shen, Y., Zhuang, L., Li, C., Tan, M., Bie, T., Chu, C., and Qi, Z. (2015). Physical mapping of chromosome 4J of *Thinopyrum bessarabicum* using gamma radiation-induced aberrations. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), 1319–1328. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2508-y>
- Purnhauser, L., Bóna, L., and Láng, L. (2011). Occurrence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation and of *Sr36/Pm6* resistance gene cluster in wheat cultivars registered in Hungary. *Euphytica*, 179(2), 287–295. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0312-y>
- Qi, Z., Du, P., Qian, B., Zhuang, L., Chen, H., Chen, T., Shen, J., Guo, J., Feng, Y., and Pei, Z. (2010). Characterization of a wheat – *Thinopyrum bessarabicum* (T2JS-2BS.2BL) translocation line. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(3), 589–597. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1332-7>
- Qin, L., Liang, Y., Yang, D., Xia, G., and Liu, S. (2014). Characterisation of low molecular weight glutenin subunit genes from *Pseudoroegneria spicata* and *Pd. strigosa*. *Journal of Applied Genetics*, 56(1), 27–35. <https://doi.org/10.1007/s13353-014-0229-6>

- Quraishi, U. M., Abrouk, M., Bolot, S., Pont, C., Throude, M., Guilhot, N., Confolent, C., Bortolini, F., Praud, S., Murigneux, A., Charmet, G., and Salse, J. (2009). Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. *Functional & Integrative Genomics*, 9(4), 473–484. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0129-8>
- Rayburn, A. L., and Gill, B. S. (1985). Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *Journal of Heredity*, 76(2), 78–81. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110049>
- 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>
- Rayburn, A. L., and Gill, B. S. (1987). Use of Repeated DNA Sequences as Cytological Markers. *American Journal of Botany*, 74(4), 574. <https://doi.org/10.2307/2443837>
- Riley, R., and Chapman, V. (1958). Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature*, 182, 713–715. <https://doi.org/10.1038/182713a0>
- Riley, R., and Chapman, V. (1967). The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genetical Research*, 9(3), 259–267. <https://doi.org/10.1017/S0016672300010569>
- Roa, F., and Guerra, M. (2012). Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 225. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-225>
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., and Ganal, M. W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4), 2007–2023. <https://doi.org/10.1007/bf00279889>
- Roussel, V., Leisova, L., Exbrayat, F., Stehno, Z., and Balfourier, F. (2005). SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theor. Appl. Genet.*, 111(1), 162–170. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2014-8>
- Said, M., Cabrera, A., Vrána, J., Číhalíková, J., and Doležel, J. (2014). Molecular and flow cytometric karyotype analysis in *Agropyron cristatum*. *Plant Molecular Cytogenetics in Genomic and Postgenomic Era*, September 23-24.
- Said, M., Hříbová, E., Danilova, T. V, Karafiátová, M., Čížková, J., Friebe, B., Doležel, J., Gill, B. S., and Vrána, J. (2018). The *Agropyron cristatum* karyotype, chromosome structure and cross-genome homoeology as revealed by fluorescence *in situ* hybridization with tandem repeats and wheat single- gene probes. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(10), 2213–2227. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3148-9>

- Said, M., Kubaláková, M., Karafiátová, M., Molnár, I., Doležel, J., and Vrána, J. (2019). Dissecting the Complex Genome of Crested Wheatgrass by Chromosome Flow Sorting. *The Plant Genome*, 12(2), 0. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.12.0096>
- Said, M., Parada, A. C., Gaál, E., Molnár, I., Cabrera, A., Doležel, J., and Vrána, J. (2019). Uncovering homeologous relationships between tetraploid *Agropyron cristatum* and bread wheat genomes using COS markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(10), 2881–2898. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03394-1>
- Sakamura, T. (1918). Kurze Mitteilung über die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der Triticum-Arten. *The Botanical Magazine*, 32(379), 150–153.
- Salse, J., Abrouk, M., Guilhot, N., Courcelle, E., Faraut, T., Waugh, R., Close, T. J., Messing, J., and Feuillet, C. (2009). Reconstruction of monocotyledonous proto-chromosomes reveals faster evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 14908–14913.
- Sánchez-Martín, J., Steuernagel, B., Ghosh, S., Herren, G., Hurni, S., Adamski, N., Vrána, J., Kubaláková, M., Krattinger, S. G., Wicker, T., Doležel, J., Keller, B., and Wulff, B. B. H. (2016). Rapid gene isolation in barley and wheat by mutant chromosome sequencing. *Genome Biology*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1082-1>
- 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(6), 1070–1082. <https://doi.org/10.1139/g05-062>
- Schneider, A., Molnár, I., and 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. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0180-5>
- Schulz-Schaeffer, J., and Haller S. E. (1987). Registration of Montana-2 perennial x *Agrotriticum intermedium* Khizhnyak. *Crop Science*, 27, 822–823.
- Schulz-Schaeffer, J., and Jurasits, P. (1962). Biosystematic investigations in the genus *Agropyron*. I. Cytological Studies of Species Karyotypes. *American Journal of Botany*, 49(9), 940–953. <https://doi.org/10.2307/2439206>
- Schwarzacher, T. (2003). DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome*, 46(6), 953–962. <https://doi.org/10.1139/G03-119>

- Schwarzacher, T. (2009). Fluorescent *In Situ* hybridization to detect transgene integration into plant genomes. In H. Jones & P. Shewry (Eds.), *Transgenic Wheat, Barley and Oats* (Vol. 478, Issue 1, pp. 227–246). <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0>
- Schwarzacher, T., Finch, R. A., and Bennett, M. D. (1992). Parental genome separation in reconstructions of somatic and premeiotic metaphases of *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*. *Journal of Cell Science*, *101*, 13–24.
- Schwarzacher, T., and Heslop-Harrison, J. S. (2000). *Practical in situ hybridisation*. (1st ed.). Oxford: Bios Scientific Publishers.
- Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D., and Heslop-Harrison, J. S. (1989). In Situ Localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*, *64*(3), 315–324. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087847>
- Sears, E. R. (1956). The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symp. Biol.*, *9*, 1–21.
- Sears, E. R. (1976). Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annual Review of Genetics*, *10*(1), 31–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.10.120176.000335>
- Sears, E. R. (1977). An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can J Genet Cytol*, *19*, 585–593.
- Sears, E. R. (1972). Chromosome engineering in wheat. *Stadler Symposia*, *4*, 23–38.
- Semagn, K., Bjornstad, A., and Ndjiondjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, *5*(25), 2540–2568. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01731.x>
- Sepsi, A., Molnár, I., Szalay, D., and Molnár-Láng, M. (2008a). 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>
- Sepsi, A., Molnár, I., Szalay, D., and Molnár-Láng, M. (2008b). Molecular cytogenetic analysis of the wheat-*Agropyron elongatum* partial amphiploid BE-1. *Acta Biologica Szegediensis*, *52*(1), 139–141. <http://tkde4.sci.u-szeged.hu/ABS/2008/Acta HP/52139.pdf>
- Sharma, D., and Knott, D. R. (1966). The transfer of leaf-rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. *Canadian Journal of Genetics & Cytology*, *8*, 137–143.
- Sharma, H. C., Francki, M., Crasta, O., Gyulai, G., Bucholtzl, D., Ohm, H., Anderson, J., Perry, K., and Patterson, F. (1999). Cytological and molecular characterization of wheat lines with *Thinopyrum intermedium* chromosome additions, substitutions and translocations resistant to barley yellow dwarf virus. *Cytologia*, *64*, 93–100.

- Sharma, H. C., Gill, B. S., and Uyemoto, J. K. (1984). High levels of resistance in *Agropyron* species to barley yellow dwarf and wheat streak mosaic viruses. *Phytopathology*, 110(84), 143–147.
- Shen, X., and Ohm, H. (2006). Fusarium head blight resistance derived from *Lophopyrum elongatum* chromosome 7E and its augmentation with *Fhb1* in wheat. *Plant Breeding*, 125(5), 424–429. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2006.01274.x>
- Shen, Y., Shen, J., Dawadondup, Zhuang, L., Wang, Y., Pu, J., Feng, Y., Chu, C., Wang, X., and Qi, Z. (2013). Physical localization of a novel blue-grained gene derived from *Thinopyrum bessarabicum*. *Molecular Breeding*, 31(1), 195–204. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9783-y>
- Shi, F., and Endo, T. R. (1999). Genetic induction of structural changes in barley chromosomes added to common wheat by a gametocidal chromosome derived from *Aegilops cylindrica*. *Genes & Genetic Systems*, 74(2), 49–54. <https://doi.org/10.1266/ggs.74.49>
- Silva, G. S., and Souza, M. M. (2013). Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 2953–2965.
- Silvestro, D., and Michalak, I. (2012). RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12(4), 335–337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>
- Song, L., Lu, Y., Zhang, J., Pan, C., Yang, X., Li, X., Liu, W., and Li, L. (2016). Physical mapping of *Agropyron cristatum* chromosome 6P using deletion lines in common wheat background. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(5), 1023–1034. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2680-8>
- Stakman, E. C., Stewart, D. M., and Loegering, W. Q. (1962). *Identification of physiologic races of Puccinia graminis var. tritici*.
- Sutka, J. (2004). *Növényi citogenetika Mezőgazda Kiadó* (Budapest).
- Tanaka, H., Nabeuchi, C., Kurogaki, M., Garg, M., Saito, M., Ishikawa, G., Nakamura, T., and Tsujimoto, H. (2017). A novel compensating wheat-*Thinopyrum elongatum* Robertsonian translocation line with a positive effect on flour quality. *Breeding Science*, 67(5), 509–517. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.17058>
- Tischner, T., Kőszegi, B., and Veisz, O. (1997). Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron. Hung*, 45, 85–104.
- Valárik, M., Bartoš, J., Kovářová, P., Kubaláková, M., De Jong, J. H., and Doležel, J. (2004). High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *Plant Journal*, 37(6), 940–950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.02010.x>

- Vida, G., Cseplo, M., Gulyas, G., and Agrosceiences, D. (2011). Effectiveness of major resistance genes and identification of new sources for disease resistance in wheat. *Acta Agronomica Hungarica*, 59(3), 241–248. <https://doi.org/10.1556/AAgr.59.2011.3.7>
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., and Munhoz, C. D. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312–328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
- Wall, A. M., Riley, R., and Chapman, V. (1971). Wheat mutants permitting homoeologous meiotic chromosome pairing. *Genetical Research*, 18(3), 311–328. <https://doi.org/10.1017/S0016672300012714>
- Walter, J., Joffe, B., Bolzer, A., Albiez, H., Benedetti, P. A., Müller, S., Speicher, M. R., Cremer, T., Cremer, M., and Solovei, I. (2006). Towards many colors in FISH on 30-preserved interphase nuclei. *Cytogenetic and Genome Research*, 114(3–4), 367–378. <https://doi.org/10.1159/000094227>
- Wang, H., Sun, S., Ge, W., Zhao, L., Hou, B., Wang, K., Lyu, Z., Chen, L., Xu, S., Guo, J., Li, M., Su, P., Li, X., Wang, G., Bo, C., Fang, X., Zhuang, W., Cheng, X., Wu, J., Dong, L., Chen, W., Li, W., Xiao, G., Zhao, J., Hao, Y., Xu, Y., Gao, Y., Liu, W., Liu, Y., Yin, H., Li, J., Li, X., Zhao, Y., Wang, X., Ni, F., Ma, X., Li, A., Xu, S. S., Bai, G., Nevo, E., Gao, C., Ohm, H., and Kong, L. (2020). Horizontal gene transfer of *Fhb7* from fungus underlies *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Science*, 5435, eaba5435. <https://doi.org/10.1126/science.aba5435>
- 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
- Wang, S., Wong, D., Forrest, K., Allen, A., Chao, S., Huang, B. E., Maccaferri, M., Salvi, S., Milner, S. G., Cattivelli, L., Mastrangelo, A. M., Whan, A., Stephen, S., Barker, G., Wieseke, R., Plieske, J., Lillemo, M., Mather, D., Appels, R., Dolferus, R., Brown-Guedira, G., Korol, A., Akhunova, A. R., Feuillet, C., Salse, J., Morgante, M., Pozniak, C., Luo, M. C., Dvorak, J., Morell, M., Dubcovsky, J., Ganal, M., Tuberosa, R., Lawley, C., Mikoulitch, I., Cavanagh, C., Edwards, K. J., Hayden, M., and Akhunov, E. (2014). Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 787–796. <https://doi.org/10.1111/pbi.12183>
- Wei, J., and Wang, R. R. (1995). Genome- and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in *Triticeae* based on RAPD analyses. *Genome*, 38, 1230–1236.

- Weining, S., and Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.*, 82(2), 209–216. <https://doi.org/10.1007/BF00226215>
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers are. *Nucleic Acid Research*, 18(22), 6531–6535.
- Winfield, M. O., Allen, A. M., BurrIDGE, A. J., Barker, G. L. A., Benbow, H. R., Wilkinson, P. A., Coghill, J., Waterfall, C., Davassi, A., Scopes, G., Pirani, A., Webster, T., Brew, F., Bloor, C., King, J., West, C., Griffiths, S., King, I., Bentley, A. R., and Edwards, K. J. (2016). High-density SNP genotyping array for hexaploid wheat and its secondary and tertiary gene pool. *Plant Biotechnology Journal*, 14(5), 1195–1206. <https://doi.org/10.1111/pbi.12485>
- Wu, F., Eannetta, N. T., Xu, Y., and Tanksley, S. D. (2009). A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(5), 927–935. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0950-9>
- Wu, F., Mueller, L. a., Crouzillat, D., Pétiard, V., and Tanksley, S. D. (2006). Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: A test case in the euasterid plant clade. *Genetics*, 174(2869), 1407–1420. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.062455>
- Wu, J., Yang, X., Wang, H., Li, H., Li, L., Li, X., and Liu, W. (2006). The introgression of chromosome 6P specifying for increased numbers of florets and kernels from *Agropyron cristatum* into wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0405-0>
- Wulff, B. B. H., and Jones, J. D. G. (2020). Breeding a fungal gene into wheat. *Science*, 368(6493), 1843b-1843b. <https://doi.org/10.1126/science.abb9991>
- Wulff, B. B. H., and Moscou, M. J. (2014). Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Frontiers in Plant Science*, 5(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00692>
- Xu, L. S., Wang, M. N., Cheng, P., Kang, Z. S., Hulbert, S. H., and Chen, X. M. (2013). Molecular mapping of *Yr53*, a new gene for stripe rust resistance in durum wheat accession PI 480148 and its transfer to common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 126, 523–533. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1998-0>
- Yamamoto, M., and Mukai, Y. (2005). High-resolution physical mapping of the secalin-1 locus of rye on extended DNA fibers. *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1–3), 79–82. <https://doi.org/10.1159/000082385>

- Yang, C.-T., Fan, X., Wang, X.-L., Gu, M.-X., Wang, Y., Sha, L.-N., Zhang, H.-Q., Kang, H.-Y., Xiao, X., and Zhou, Y.-H. (2014). Karyotype analysis of *Agropyron cristatum* (L.) Gaertner. *Caryologia*, 67(3), 234–237. <https://doi.org/10.1080/0144235X.2014.974351>
- Zhang, J., Zhang, J., Liu, W., Han, H., Lu, Y., Yang, X., Li, X., and Li, L. (2015). Introgression of *Agropyron cristatum* 6P chromosome segment into common wheat for enhanced thousand-grain weight and spike length. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(9), 1827–1837. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2550-9>
- Zhang, Z., Han, H., Liu, W., Song, L., Zhang, J., Zhou, S., and Yang, X. (2019). Deletion mapping and verification of an enhanced - grain number per spike locus from the 6PL chromosome arm of *Agropyron cristatum* in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(10), 2815–2827. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03390-5>
- Zhang, Z., Song, L., Han, H., Zhou, S., Zhang, J., Yang, X., Li, X., Liu, W., and Li, L. (2017). Physical localization of a locus from *Agropyron cristatum* conferring resistance to stripe rust in common wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112403>
- Zheng, Q., Klindworth, D. L., Friesen, T. L., Liu, A. F., Li, Z. S., Zhong, S., Jin, Y., and Xu, S. S. (2014). Characterization of *Thinopyrum* species for wheat stem rust resistance and ploidy level. *Crop Science*, 54(6), 2663–2672. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.02.0093>
- Zhou, S., Zhang, J., Che, Y., Liu, W., Lu, Y., Yang, X., Li, X., Jia, J., Liu, X., and Li, L. (2018). Construction of *Agropyron* Gaertn. genetic linkage maps using a wheat 660K SNP array reveals a homoeologous relationship with the wheat genome. *Plant Biotechnology Journal*, 16, 818–827. <https://doi.org/10.1111/pbi.12831>

M2 8. táblázat A kariotipizálási munkák során felhasznált primerek neve, szekvenciái, olvadáspontjuk és a felszaporított termékek mérete

Oligonukleotid neve	Forward primer	Reverz primer	Olvadási hőmérséklet (°C)	PCR profil	Termék hossza (bp)
Afa-family	GATGATGTGGCTT TGAATGG	GCATTTCAAATGAA CTCTG A	55	94 °C 3 min; 29 ciklus: 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min; és 72 °C 10 min	340
pSc 119.2	GTGCTGATGACCG AAACG	GCACTCGCAGTTTT GGCCG	60	94 °C 5 min; 35 ciklus: 94 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 1 min 30 sec; és 72 °C 5 min	120
pTa71	CGAACTGTGAAAC TGCGAATGGC	TAGGAGCGACGGGC GGTG TG	68	94 °C 5 min; 35 ciklus: 94 °C 35 sec, 68 °C 50 sec, 72 °C 1 min 40 sec; és 72 °C 5 min	1600
AAC	AACAACAACAACA ACAACAACAAC	TTGTTGTTGTTGTTG TTGTT GTT	62	94 °C 5 min; 35 ciklus: 94 °C 35 sec, 62 °C 50 sec, 72 °C 1 min 40 sec; és 72 °C 5 min	(AAC) _n
ACG	ACGACGACGACGA CGA	CGTCGTCGTCGTCG TC	64	94 °C 5 min; 35 ciklus: 94 °C 35 sec, 64 °C 50 sec, 72 °C 1 min 40 sec; és 72 °C 5 min	(ACG) _n
ACT	ACTACTACTACTA CTACT ACTACTACTACTA CT	AGTAGTAGTAGTAG TAGTA GTAGTAGTAGTAGT	50	94 °C 5 min; 35 ciklus: 94 °C 35 sec, 50 °C 50 sec, 72 °C 1 min 40 sec; és 72 °C 5 min	(ACT) _n
CAC	CACCACCACCACC ACC	GTGGTGGTGGTGGT GG	63	94 °C 5 min; 35 ciklus: 94 °C 35 sec, 63 °C 50 sec, 72 °C 1 min 40 sec; és 72 °C 5 min	(CAC) _n
CAG	CAGCAGCAGCAGC AGC	GTCGTCGTCGTCGT CG	64	94 °C 5 min; 35 ciklus: 94 °C 35 sec, 64 °C 50 sec, 72 °C 1 min 40 sec; és 72 °C 5 min	(CAG) _n
GAA	GAAGAAGAAGAA GAAGA AGAA	CTTCTTCTTCTTCTT CTTCT T	54	94 °C 5 min; 35 ciklus: 94 °C 35 sec, 54 °C 50 sec, 72 °C 1 min 40 sec; és 72 °C 5 min	(GAA) _n

M3. Az *in situ* hibridizációs vizsgálatokhoz alkalmazott törzs és munkaoldatok összetétele

Törzsoldatok

20×SSC: 3M NaCl, 0,3M C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (trinátrium-citrát dihidrát)

10×PBS: 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄

TNB: 0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Blocking Reagent (Roche)

Munkaoldatok

2×SSC: 900 ml MQ víz + 100 ml 20×SSC

4×SSC-Tween: 800 ml MQ víz + 200 ml 20×SSC + 2 ml 10 % Tween-20

1×PBS: 900 ml MQ víz + 100 ml 10×PBS

Paraformaldehyd: 50 ml MQ víz + 2 g paraformaldehyd + 8 M NaOH

Etanol sorozat: 70% – 90% - 100% etanol

Pepszin: 1 mg/ml 10 mM HCl-ban oldva

RNáz: 5 mg/ml 2×SSC-ben oldva

M4. 9. táblázat A molekuláris markeres munkák során felhasznált primerek neve, szekvenciái és olvadáspontjuk

Marker neve	Homológ búza csoport	Forward primer	Reverz primer	Olvadási hőmérséklet (°C)
TR170	I	ATTCTGTGATGAGCGGAT	GCTCAACGACTGAGATTCCC	51
TR196	I	GTGAAGCAGCTCAACGAGTG	CCAGTTGCGGTCCGACTC	53
TR218	I	TGTCTCAGAACAACCCCTCC	TCGAGGACCATGTTGACGTA	52
TR574	I	CGTGATTGTCGGAGTCTTGA	CAAAAATCACGTGCAGGAAC	50
TR592	I	GAAATGGCACCTGGAGTGAC	TGCTGCCATTTAACAGCTTG	51
BE443103	I	GTCTGAAGAAGAGACGCACG	GCCACATTCATAGCATGTCC	60
726029	I	TCAGAATCTCCATCAGTGCC	AGAAGCTATATGCTGCCACG	59
735941	I	CCTCTGGGTAGATCTCTCGC	GTTGAAGATGACCGCAGC	59
737520	I	GCTACAAGCAGAAGCTGAGG	GTTCAACGATGAGGTCTTCC	58
738964	I	AGATCTCAGGAGGAGGTTGC	AAGATTTGACAAGGATAGGCG	58
743018	I	GCAGCTGGAGTTCTTCTACG	TGCATTAGCTAACTCGGTGC	59
743346	I	GGAATTCGAGATGTCGCC	TCGTGTATCGTGTTCCCTAAC	59
744533	I	TGCTAAAGCTGAAGAAACGG	TGTTGTCACAATGATCTGGC	58
744747	I	AATGGGTTAGTTTTTGTGGG	TAGCCAGATCTTCAGCAAGC	58
757212	I	AAGCACGTGATTGCCTTCTC	TTCTTTAAATTTACCAGCAGCAAC	60
1J	I	AAGATTGATGGAGAACCTGGAGACT	GAGATTGTAACCTGTTGCATGCAGGT	55
TR143	II	CCAGAGAGATCTTGAAGTCATC	TTCAGCCAGTCTTCTCTGCAG	52
TR146	II	GGACAGGTTCTACAGGCAGAG	CTCTGCGGATTTGGTACTTTC	52
TR248	II	GTCTCCTCCGACGTGCTC	GAAGTTACGGCCAAGGATCA	53
TR390	II	ATTGCTATCATGAGCCACCC	CAACATTGTGAGAATAGGAACAACA	50
TR416	II	CTTGGTGCTGAAAGACTCCG	TCTACAGCTTTGCCATGACG	52
TR430	II	AGCCTAAGCCTCAACCCATT	TCCTTGGTGGCATGATGATA	51
TR636	II	GCAGCAATTGAGGCTATGGT	ACAGGGCTTGCTTTACCCTT	52

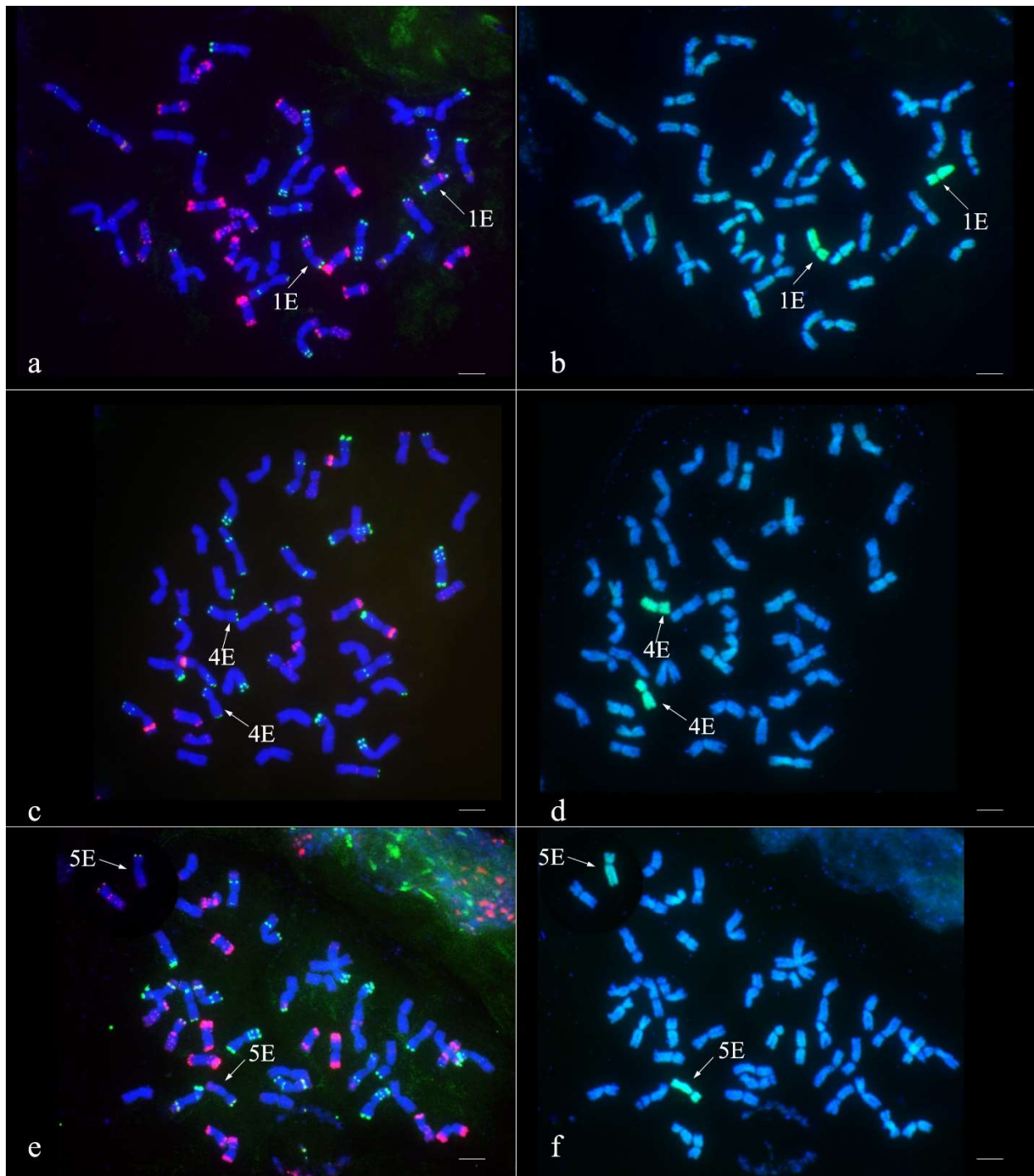
TR725	II	GTCCTTCATCTTCGGGGACT	CGTAGTTCACGCCGTTTCAG	52
TR731	II	AGAAAGGAAAAGGGTGGCAT	AGGTTCCATTCCAGATGTGC	51
737274	II	AGGCGGTAAGCAGAAAGTGG	CAGAAATTCTCTTGATGCTCG	62
740970	II	AAGTCAAGCTCGCCTTCC	GTAGAAGACGATGAGGTTCG	58
744070	II	CACCTACCTCGTCAACGG	GCCGAGAGCTCGATCAGG	62
746642	II	GTGCTGCTGCCATTACTTTAG	AGCAGCAGCCAATTGAAG	58
757237	II	CTTGAGGAAGGAATCAGACG	CTGAATGAGGTTCGTAGGGG	58
2N	II	CTTGATGGAAGCCATCAGCTGCA	CTGGGGCTAATGAAAGCTGAGAAGA	55
2R	II	CTGATGTTGACGAGAAGGTAGACGA	CGTTTCTGGTGTCGTGTCATCTTCA	55
TR4	III	TCAACTTCGGCGACTCCTAC	TACGCATTTCAGGTAACGCAG	52
TR60	III	AATGATGTTGGTGCTGTGGTG	ACTTCAGCCACTGATACGTTG	52
TR62	III	ATGTGCTCGAAGATGCTGGAC	TGGTCTCGATGCGGAAGGTTG	55
TR63	III	GTAGATGAGATCCTGCTTGTC	ACTTCACATGCTTGTTGTCTG	49
TR67	III	CAGAGTTTAAACGTCAAAGGAC	GGCTGGTACCAGAAATCATAG	48
TR71	III	GAACTCGTTGCTCACTATCTG	AATGCCACTTGTTATCCTGTG	49
TR72	III	CGTCGTACGTCCTTGAAAAG	TGAACTCCGTGTCCATCCAGTC	54
TR73	III	CGCTCATCAAGCAGGACTTC	GAAATCGGCGTTTCTAAGGTC	51
TR76	III	CTATGCCGACAATCCAGAGTG	GTTGTACATCCTTTGCCAACTG	51
TR80	III	GAGAAGCACGCCAACATCATG	TCTGAGCTCCTTGAGGTCGAC	54
TR82	III	GCTTAACACGTCATGTGCATC	GTTTGAGAATGCTTTCTGACC	49
TR85	III	ATAACAATGGTGCCCTCGGAG	GAGTGTGCCGAGAAACCAGGAG	57
TR87	III	AGATGTTTTCTCTGTCATGGTG	TGATAGGTCGGTACTCTGGTG	50
TR90	III	AACAGCTCCATGAGCAACTAG	TATCTTGCATGCTCCTCTATG	49
TR96	III	TTTCACCCGGATACACCCATG	CTCGCAGGTCATATAACCTG	53
751053	III	CGAGGCTGACCTTTAGTGG	AAATTTCCAGGGCATTTAGC	58
752685	III	GCAACATGAACCACTGGG	AATGCCTTGTGCAGTGGC	60
755442	III	GCTCGTCTTGCATTTTGG	GGCTGCGTATCTTTCTTGG	59
756059	III	TACTGGAAGCGGTTGTAAGG	CTGAAAGATGTTTGCTTCCG	58
757460	III	AGTTCTACGACCACTCGTGC	CTGATGGAGTTCTTGTTGGG	58

767527	III	CACAGTTGATTGCACGTAGG	TCTGCTGAAGAAATCAAGGC	58
803223	III	TGAAGCTCCTGAGGTACTION	TCCTCTCGTACTTGGAGTGC	58
805553	III	CTCTGCTACAAGAAGTGGGC	ATGAGCAGGTTGAAGTGAGG	58
TR114	IV	TCAAGGAGGAGTTGTTGACTC	CACGCGAACCTTTGACACATC	52
TR116	IV	TCTGAATTTGCTGCACGCAAG	CTCAACCATCAAAGCCATATC	51
TR118	IV	GAATGGTCTTTAATGAAGAGGG	TGCCATGTCCAAGGAATG	48
TR119	IV	ATGCAGTACGAGAATTTCCCTG	CTCCATTGAGTGTCCAATG	49
TR131	IV	AAAGACCACCTCACCACCGTC	AGTACTGGTCACAGATGTAAC	51
TR133	IV	CATTGAACAGCCTTGGCAATG	TCTGCCAGATACTGTTTCAGAC	51
TR634	IV	TGGAGTTGTTGGGGCTACTC	CTTTCAAACCCAGTCCTCCA	52
TR638	IV	CCCCAACTTTCAAGCTCAAG	CCCATCTTGGCATCCTTGTA	50
TR647	IV	CAAATGAGCTATCCAGGCGT	CGAATTTGCAGTCAGATCACA	50
752858	IV	CAGAGTCCATCAAAACCGC	AGGATGAGGAGGTCCTTGG	59
758628	IV	CAACTGTAGCAACATAGGCG	AGCTTGGCGTTAGGAATGG	60
760004	IV	AAGAAGTACGTGGACATCGG	GGTAATTGAACTTGATGGCG	58
765452	IV	CCTCTTTCAGAAGGGAAAGC	GTACACCGCGTAGATGATCC	58
770094	IV	AAAGAAACGATGTAGCAGGC	CTCCCCATATAGAGGATGCC	58
771467	IV	CTTATGCATTTGCTCCTGC	ATATCACGCTCTTGTGGAGC	58
771529	IV	CGGACAATCTGGAGACTAAGC	AGGTCAGATAGTGTGCGAGG	57
4C	IV	GTCCAAGTAGAAAGCATGCTCCGA	GGCCCTGTCACAATCCTCAACT	55
TR128	V	TCTGAAGAAACCTGGAGGATC	ATTTGCTTTGGGTTGACCAAG	50
TR451	V	GATGAGAAGCACATTGGGGT	CATTGATCCTCCTCTGCCAT	51
TR471	V	AGCCCAGGAGTCTCTTGACA	CTGCTCTTTTGTCTACCGC	52
TR512	V	TTCCTGATGAAACGAGGAGG	AGCATCCATGTTGAAGGATTG	50
TR513	V	ATCGAGGGTGGCCTTCTTAC	TCATTTGGTTGGAGCTGCTT	52
TR514	V	ATGTGCCCTCCATATTCAGC	GGAACCAAACGGAACATCAT	50
TR757	V	CATGACGGTGGAGAAGTTCA	AGAAGGATGAGCCTCAGCAA	51
TR759	V	TGGCGGTTACACAGTTTGAA	CAGCTGGAACCTCCAATGTT	51
TR764	V	CCGACTCCAAGAAGAGGAGA	CTTTATCTTTGCTCTGGGCG	51

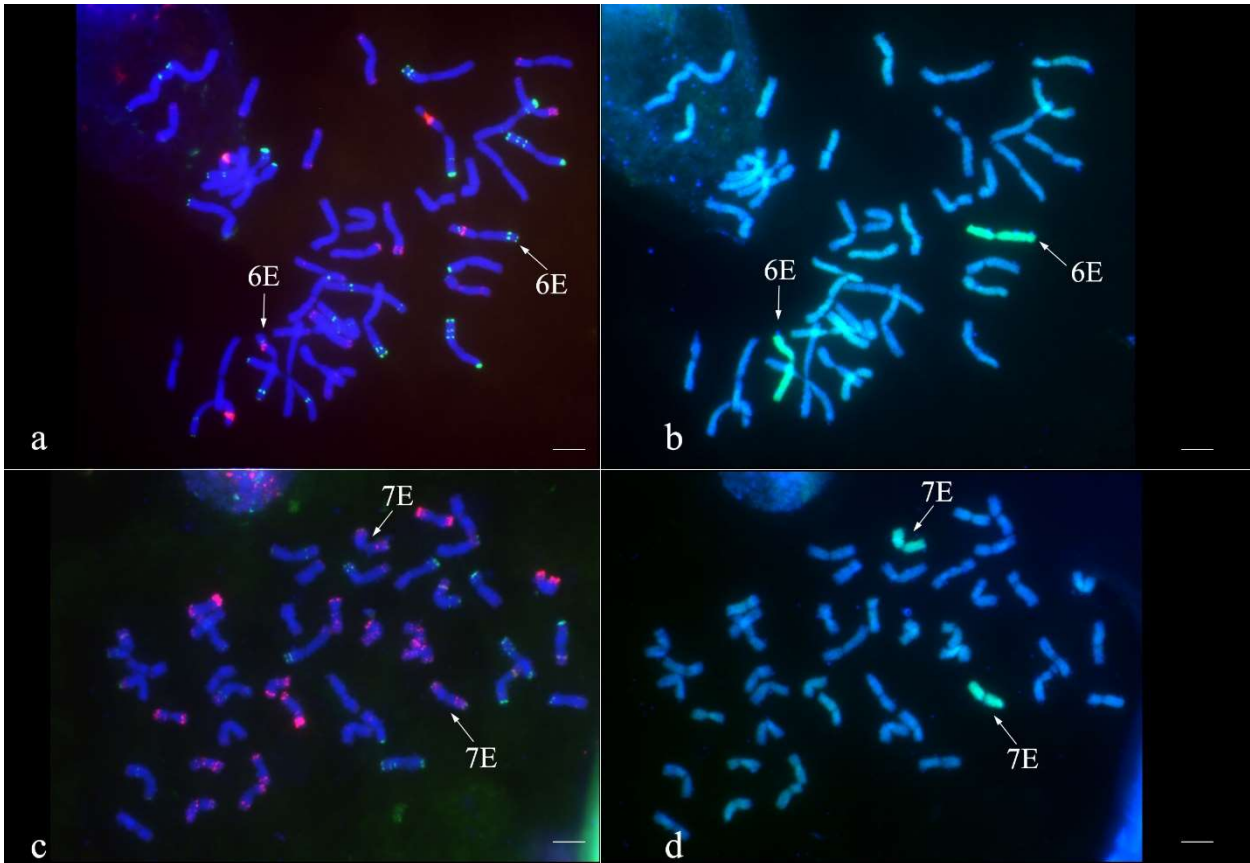
TR766	V	ACACCGAGGAGTCCTACCCT	AACCGTCGATCACCTCAAAG	55
717465	V	TATATTGCTTGGACATTCTTTGG	GTTCACTAGCATGCCTTTCC	49
749645	V	GACTTCATCGACTGGACCG	TGAAGGGGATGTAGATGAGC	51
762599	V	TGCTTTCTACTTGGACTGGG	GCTGCTATACGGCTTACTGC	58
764126	V	TCATCCAACCCTAAGTCTGC	CACTGCAATCTCTTGAAGG	50
TR88	VI	CTTTTCTGCGCCTCCCTAAG	GTCAATAGTCTTCTTGTGGCAG	49
TR91	VI	GCGAAAGCGCAAATCGTTCTC	AAAACGATCACGAAGAGGATG	53
TR92	VI	TTGAATCGCACGCCTTCGGAC	CATGTCATAGCAGGAAGCTTG	54
TR103	VI	CGGCACGCCAAGGACAC	CTTCGCCAATTGCAGGAC	54
BE426214	VI	CTGGGCTTTACCGTGGATTCAACA	GGTCATCATCATCCTTCTGCGGA	55
BE445667	VI	AACCTGAGCTTGCCTCTCACCT	TCGCCTTGACGTCTCTATGGATGA	56
BE446153	VI	GCTCTTCGAGAGAATGCTGTTCTGA	TGCTGAGCCTGCTGTAGATGCA	56
BE490226	VI	GATTCCTACCAGCTACCAGATGCT	CGTTCCTCCTCAGTGATTCCCAA	54
BE496826	VI	CAGTATACTTCGACGTTCCACTGCT	GAAGGACAACACCTACGTCTACATGT	54
BE591696	VI	CGTATCGTCAGCAATGATGAGCGT	GCCCTGTTTGTGCTCCAAGTACA	55
724406	VI	GCAGCAATCAAAGAAATGG	CTCCTCTTCCATTCTCCTCG	51
741435	VI	GGCATCTTCGTCATCACC	GTGTACAAGTATGCTCCGCC	51
747871	VI	GAACAATGAAGGTTGGTTGC	TTTCCAATCTCTTGTGTCACC	49
749072	VI	GTCTTCACATTGATCCCAGC	TCTCAAGAACCTACCCTGCC	51
756538	VI	GAGAAGAAGAAATCGAGAGCG	CGACTTCTCGAAGACCTGC	50
TR151	VII	GGTATAAGCCAGAGGTTGGTG	AACCGCCAGCGCTTTGGAG	55
TR329	VII	AAGAGCTGTGGTTGTTGGCT	CCTCATTCTTGGTACGCCAT	52
TR335	VII	AGACCACCATCCACGACTTC	AGATGAGCGCCATGTCTTTT	52
TR355	VII	CTGAGGGCAGAGACACACAA	CATCCAACCCTTGAAACAGAA	53
TR453	VII	CAGCGTCGACTACATCCAGA	GGCCAAGTGGTAGTACCTGC	53
TR495	VII	AGTGATGATGGTAGGCGTCC	GTCGTTTGAAAGAGCGCAAT	51
TR738	VII	ATGCCACATGAGAAGCACAG	CATTGATGAGGCATGTGAGC	51
TR749	VII	TTGGAAGTGCTTCAACGACA	CATCATCCACGATTCGACAG	50
741119	VII	GAAGACAATGTGATTTCCCG	AGGGCTGACCGACAACAC	52

753911	VII	CTCTGCTCTCTCGCATCC	CGACCCTTCACGAACTCC	52
754211	VII	CATCAGCCTCTTCTTTTCCC	GAACCACTAGATGTCGCCC	50
759439	VII	AGCAAAGCAAGACTTCATGG	ACTTCTTGTTGCTACCGTGC	51
7C	VII	GCTGGTTGAATCCAGGTGGTGT	CCCAAACCACTTCTTATTGGTGCT	55

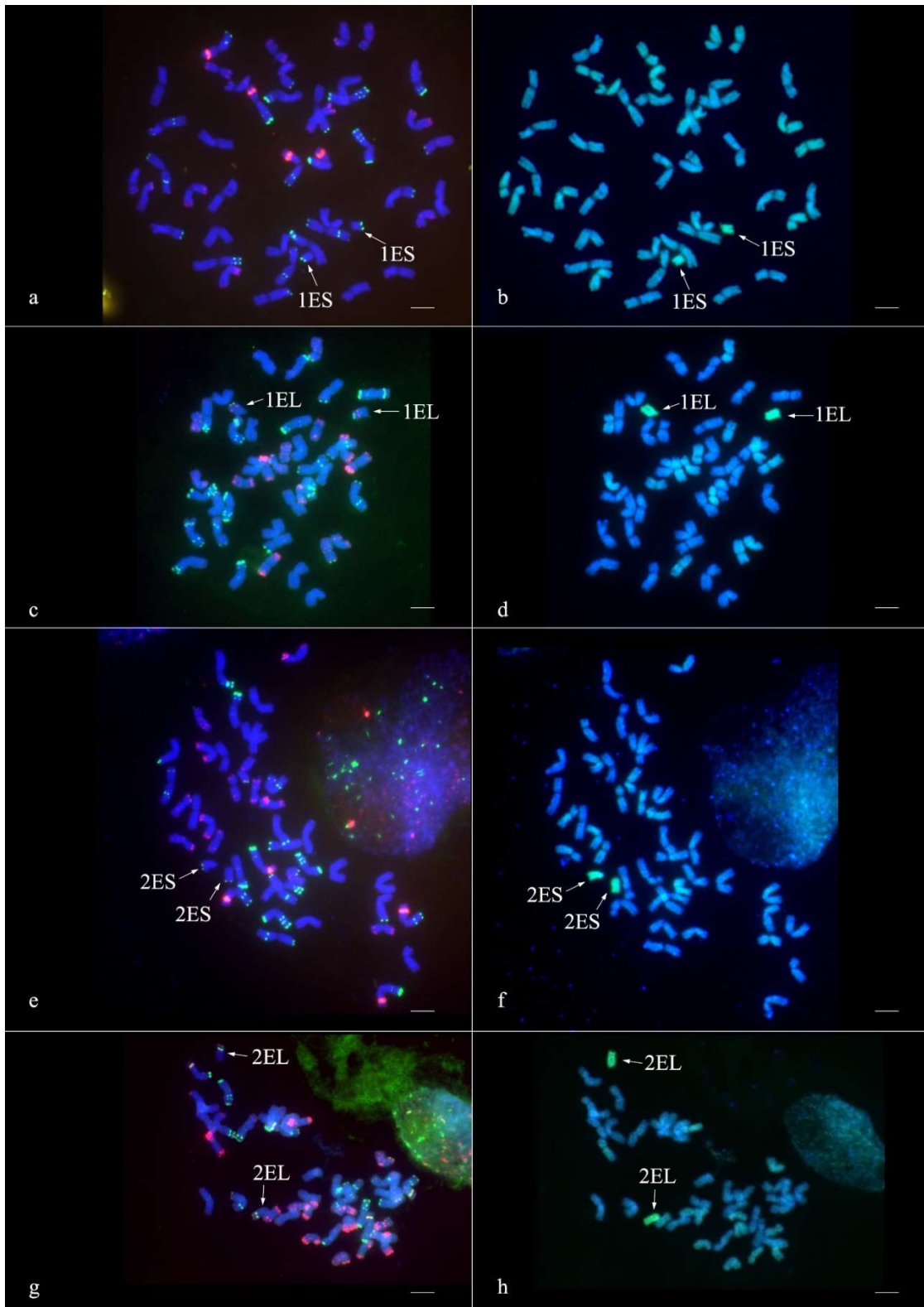
M5. A COS markeres vizsgálatokhoz felhasznált CS-*Th. elongatum* diszómás és ditelosómás addíciós vonalak ellenőrzése molekuláris citogenetikai módszerekkel



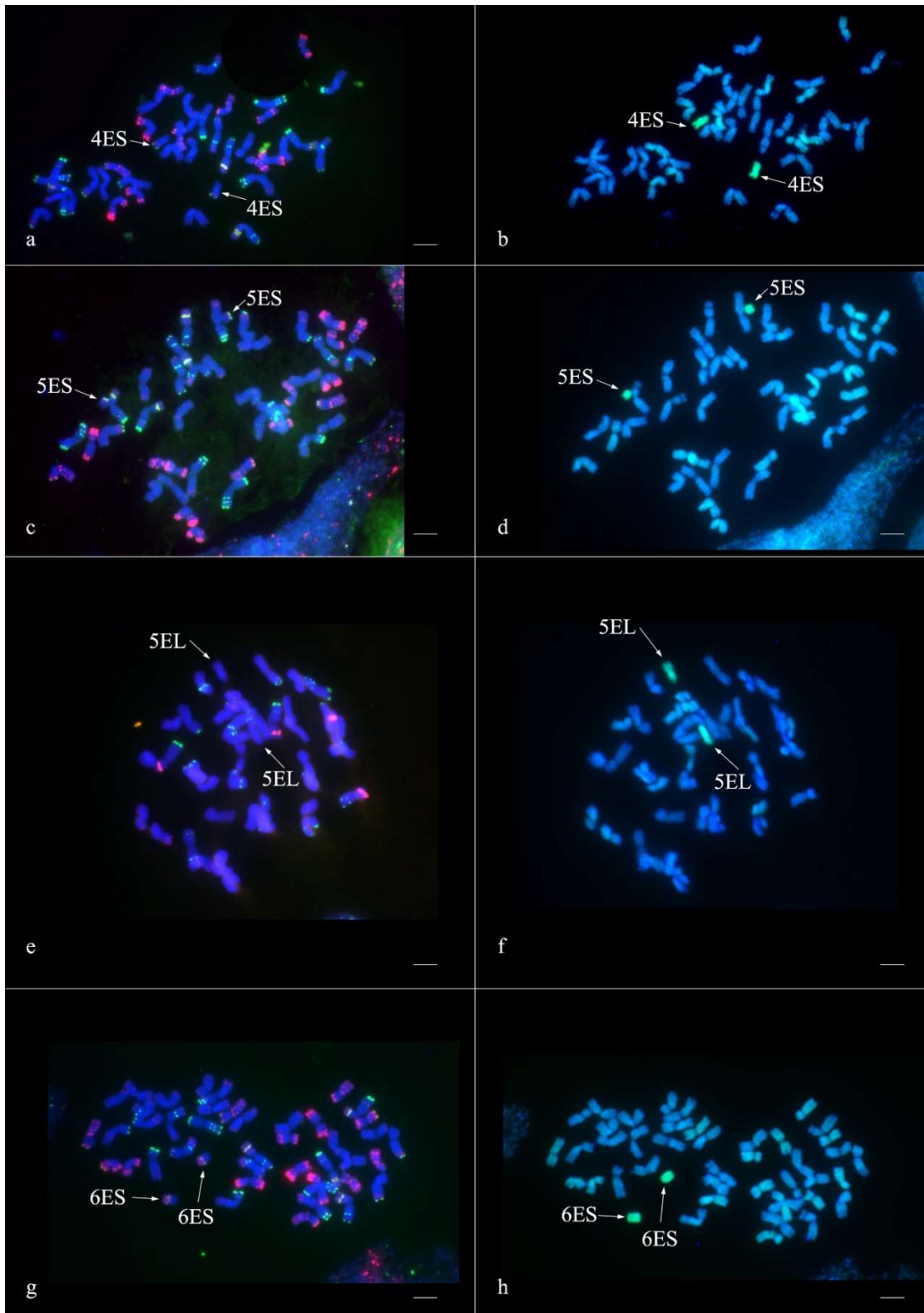
33. ábra A Chinese Spring-*Th. elongatum* 1E (a, b), 4E (c, d) és 5E (e, f) diszómás addíciós vonalainak kromoszómális összetételének ellenőrzése FISH (a, c, e) és GISH (b, d, f) segítségével. A FISH során a kromoszómákat az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata alapján azonosítottuk (a, c, e). A GISH során a *Th. elongatum* kromoszómák zölden jelöltek (b, d, f). A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt. A skála 10 μ m-nek felel meg.



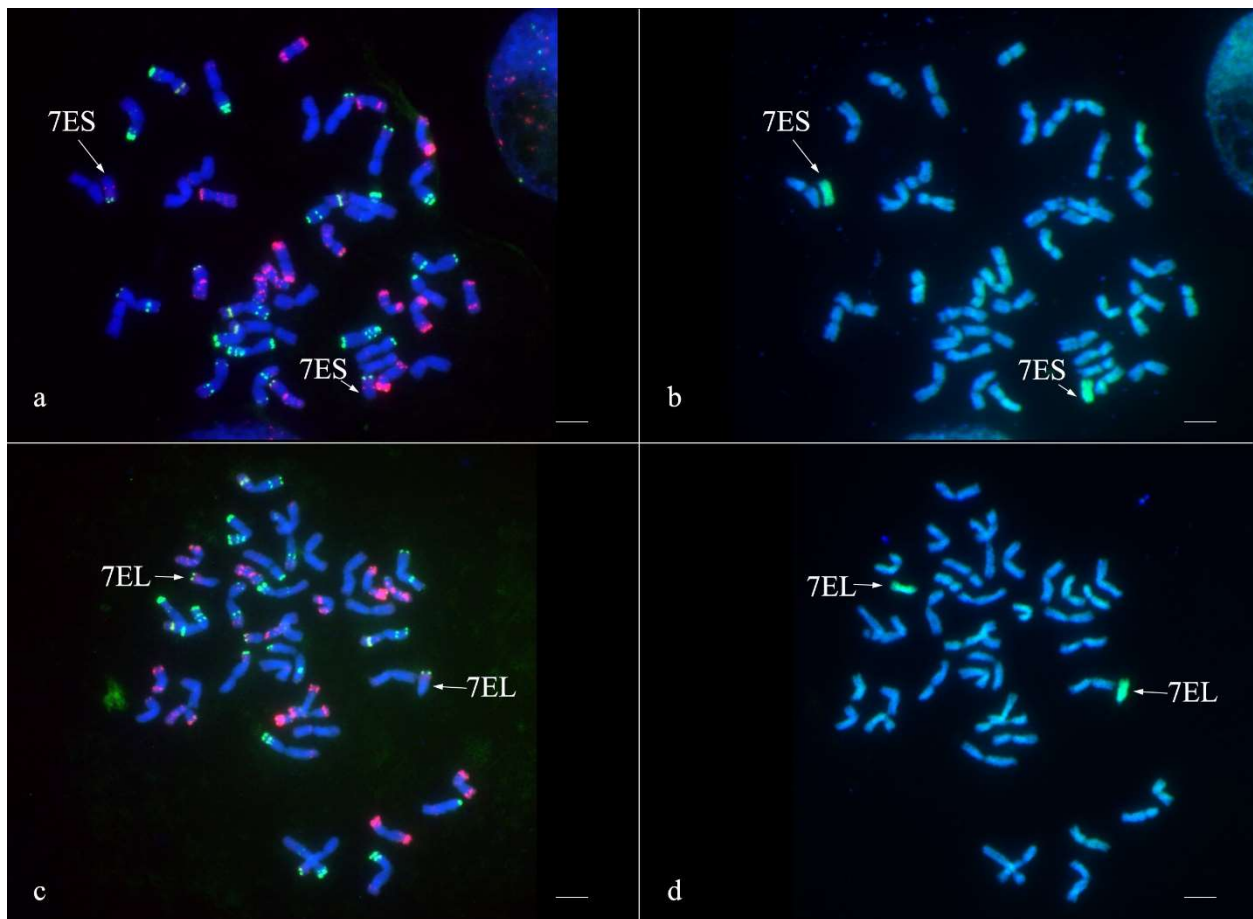
34. ábra A Chinese Spring-*Th. elongatum* 6E (a, b) és 7E (c, d) diszómás addíciós vonalainak kromoszómális összetételének ellenőrzése FISH (a, c) és GISH (b, d) segítségével. A FISH során a kromoszómákat az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata alapján azonosítottuk (a, c). A GISH során a *Th. elongatum* kromoszómák zölden jelöltek (b, d). A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt. A skála 10 μm -nek felel meg.



35. ábra A Chinese Spring-*Th. elongatum* 1ES (a, b), 1EL (c, d), 2ES (e, f) és 2EL (g, h) diteloszómás addíciók vonalainak kromoszómális összetételének ellenőrzése FISH (a, c, e, g) és GISH (b, d, f, h) segítségével. A FISH során a kromoszómákat az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata alapján azonosítottuk (a, c, e, g). A GISH során a *Th. elongatum* kromoszómák zölden jelöltek (b, d, f, h). A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt. A skála 10 μ m-nek felel meg.



36. ábra A Chinese Spring-*Th. elongatum* 4ES (a, b), 5ES (c, d), 5EL (e, f) és 6ES (g, h) diteloszómás addíciós vonalainak kromoszómális összetételének ellenőrzése FISH (a, c, e, g) és GISH (b, d, f, h) segítségével. A FISH során a kromoszómákat az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata alapján azonosítottuk (a, c, e, g). A GISH során a *Th. elongatum* kromoszómák zölden jelöltek (b, d, f, h). A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt. A skála 10 μm -nek felel meg.



37. ábra A Chinese Spring-*Th. elongatum* 7ES (a, b) és 7EL (c, d) diteloszómás addíciós vonalainak kromoszómális összetételének ellenőrzése FISH (a, c) és GISH (b, d) segítségével. A FISH során a kromoszómákat az Afa-family (piros), a pSc119.2 (zöld), és a pTa71 (sárga) repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata alapján azonosítottuk (a, c). A GISH során a *Th. elongatum* kromoszómák zölden jelöltek (b, d). A kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (kék) történt. A skála 10 μm -nek felel meg.

M6. A BLASTn keresőprogrammal végzett keresés eredményei

A *Th. elongatum* E genomja és a búza A, B, és D genomja közötti hasonlóságok és eltérések vizsgálatához a polimorf COS markerek alapjául szolgáló EST szekvenciákat összevetettük a búza referencia szekvenciájával ((IWGSC, 2018), RefSeq v1 www.wheatgenome.org). Az összehasonlításhoz a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, (Altschul et al., 1990)) alkalmazást használtuk (<https://urgi.versailles.inra.fr/Tools/BLAST>). A polimorf markerek EST szekvenciáit kereső szekvenciaként használva végeztük a BLASTn keresést a búza referencia szekvencián a homológia viszonyok feltárása érdekében. A BLASTn keresés eredményei közül a megfelelő (E -érték $< 2.8e^{-08}$, Identity (azonosság) $> 82\%$ és szekvencia hossz $> 100\text{bp}$) találatokat választottuk ki a búza és a *Th. elongatum* genomjai közötti homológia viszonyok ábrázolásához.

10. táblázat A *Th. elongatum* E genomja és a búza A genomja közötti BLASTn összehasonlítás eredményei

1A: 594102056 bp

Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i>
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Azonosság (%)	Expect	
<i>c737520</i>	-	66892280	327	236/255	92	8.00E-87	1ES
<i>c757212</i>	C-1AL1-0.17	248879477	208	105/105	100	5.00E-51	1EL
<i>TR574</i>	-	279740841	615	319/322	99	1.00E-172	1EL
<i>c744533</i>	1AL1-0.17-0.61	342381202	250	129/130	99	2.00E-63	1EL

2A: 780798557 bp

Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Azonosság (%)	Expect	
<i>TR725</i>	-	69202904	773	463/484	95	0.0	2ES
<i>2R</i>	-	107383863	426	215/215	100	1.00E-116	2ES
<i>TR430</i>	-	122400280	40.1	23/24	95	3.3	2ES, 6ES
<i>TR416</i>	-	127201636	83.8	51/54	94	2.00E-13	2ES
<i>TR636</i>	-	414989866	392	396/462	85	1.00E-105	2EL, 6EL, 6ES
<i>TR146</i>	-	526065155	747	384/385	99	0.0	2EL, 6EL
<i>c744070</i>	C-2AL1-0.85	678372250	293	162/169	95	1.00E-76	2EL, 6EL
<i>2N</i>	-	705878686	238	126/128	98	2.00E-59	2EL, 6EL
<i>c746642</i>	2AL1-0.85-1.00	773181048	212	107/107	100	3.00E-52	2EL, 6EL

3A: 750843639 bp

Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Azonosság (%)	Expect	
<i>TR4</i>	-	13410325	934	535/550	97	0.0	Amp
<i>TR85</i>	-	13518619	95.6	81/92	88	2.00E-16	Amp
<i>c755442</i>	3AS4-0.45-1.00	45598297	365	193/196	98	4.00E-98	Amp
<i>c752685</i>	3AS4-0.45-1.00	84189859	367	188/189	99	1.00E-98	Amp
<i>c756059</i>	3AS4-0.45-1.00	150718564	266	134/134	100	3.00E-68	Amp
<i>c767527</i>	C-3AL3-0.42	438602901	430	236/241	97	1.00E-118	Amp
<i>TR63</i>	-	497649227	1023	516/516	100	0.0	Amp
<i>TR62</i>	-	649544516	428	280/300	93	1.00E-117	Amp
<i>TR67</i>	-	663437994	301	215/236	91	3.00E-78	Amp
<i>TR82</i>	-	710826801	250	180/198	90	6.00E-63	5EL

4A: 744588157 bp

Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Azonosság (%)	Expect	
<i>c770094</i>	4AS3-0.76-1.00	6887650	145	88/93	94	7.00E-32	4EL
<i>c765452</i>	4AS4-0.63-0.76	122736265	319	161/161	100	2.00E-84	4ES
<i>c771467</i>	4AL12-0.43-0.59	513288259	454	242/245	98	1.00E-125	4EL
<i>c760004</i>	4AL12-0.43-0.59	559044545	484	244/244	100	1.00E-134	4EL
<i>TR131</i>	-	582508204	101	120/143	83	2.00E-18	4ES
<i>4C</i>	-	597678521	781	505/544	92	0.0	4EL

5A: 709773743 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Azonosság (%)	Expect	
TR759	-	397515227	184	123/133	92	9.00E-43	4EL
TR513	-	417051515	347	250/275	90	6.00E-92	5EL
TR764	-	466027716	115	67/70	95	3.00E-22	7EL
TR757	-	540063102	258	184/202	91	4.00E-65	5EL
TR471	-	559809946	428	216/216	100	1.00E-117	5ES
c764126	5AL10-0.57-0.78	561553309	274	147/150	98	1.00E-70	5EL
TR128	-	570505617	418	211/211	100	1.00E-113	4ES, 5EL
c749645	5AL17-0.78-0.87	619679235	178	103/106	97	5.00E-42	5EL, 7ES
6A: 618079260 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Azonosság (%)	Expect	
c747871	6AS_6AS5-0.65-1.00	18707197	270	181/196	92	2.00E-69	6ES
TR88	-	52398149	551	290/294	98	1.00E-153	6ES
TR636	-	71537193	414	419/489	85	1.00E-112	2EL, 6EL, 6ES
TR90	-	77538748	99.6	229/290	78	2.00E-17	6ES
TR91	-	97987789	93.7	98/115	85	4.00E-16	6ES
TR92	-	105179069	250	132/134	98	4.00E-63	6ES
c741435	6AL_C-6AL4-0.55	455708365	147	77/78	98	2.00E-32	4EL
BE490226	-	550077241	365	184/184	100	9.00E-98	2EL, 6EL
7A: 736706236 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Azonosság (%)	Expect	
7C	-	55003417	367	188/189	99	2.00E-98	7ES
TR451	-	101446124	42.1	21/21	100	1.1	2EL, 6EL
TR355	-	127770622	46.1	26/27	96	0.040	7ES
TR151	-	143355558	198	286/348	82	2.00E-47	7ES, 7EL
TR335	-	206924941	50.1	46/53	86	0.007	7ES
c753911	7AL_7AL1-0.39-0.71	543774355	168	88/89	98	5.00E-39	7EL

11. táblázat A *Th. elongatum* E genomja és a búza B genomja közötti BLASTn összehasonlítás eredményei

1B: 689851870 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
c737520		109728206	490	254/255	99	2.00E-135	1ES
c757212	C-1BL6-0.32	278090562	184	102/105	97	8.00E-44	1EL
TR574	-	311427628	955	496/498	99	0.0	1EL
c744533	1BL1-0.47-0.69	354223088	242	204/235	86	4.00E-61	1EL

2B: 801256715 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
TR725	-	105688194	918	481/486	98	0.0	2ES
2R	-	160402589	426	215/215	100	1.00E-116	2ES
TR416	-	175633425	81.8	50/53	94	7.00E-13	2ES
TR430	-	354084615	44.1	38/42	90	0.21	2ES, 6ES
TR636	-	385568090	361	392/462	84	4.00E-96	2EL, 6EL, 6ES
TR146	-	461093002	557	351/373	94	1.00E-155	2EL, 6EL
c744070	C-2BL2-0.36	636481972	254	157/169	92	1.00E-64	2EL, 6EL
c746642	2BL6-0.89-1.00	788658562	212	107/107	100	3.00E-52	2EL, 6EL
2N	-	677807241	254	128/128	100	3.00E-64	2EL, 6EL
3B: 830829764 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
TR4	-	7380646	198	210/244	86	2.00E-47	Amp
TR85	-	8132772	95.6	81/92	88	2.00E-16	Amp
c755442	3BS9-0.57-0.78	55735939	389	196/196	100	1.00E-105	Amp
c752685	3BS9-0.57-0.78	117928502	375	189/189	100	1.00E-101	Amp
c756059	3BS1-0.33-0.57	193614684	232	130/134	97	4.00E-58	Amp
c767527	3BL10-0.50-0.63	423812076	396	225/232	96	1.00E-107	Amp
TR63	-	488532420	922	504/516	97	0.0	Amp
TR62	-	676947169	726	436/460	94	0.0	Amp
TR67	-	700070819	307	251/283	88	5.00E-80	Amp
TR82	-	765332654	250	180/198	90	6.00E-63	5EL
4B: 673617499 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
4C	-	10592429	726	384/390	98	0.0	4EL
TR131	-	30839217	109	121/143	84	1.00E-20	4ES
c760004	4BS_4BS1-0.81-1.00	59594777	307	228/251	90	8.00E-81	4EL
c771467	C-4BS4-0.37	106860020	438	240/245	97	1.00E-120	4EL
c765452	C-4BL1-0.71	424862093	278	156/161	96	7.00E-72	4ES
c770094	4BL5-0.86-1.00	578043183	200	101/101	100	1.00E-48	4EL

5B: 713149757 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
TR759	-	341530282	182	241/290	83	3.00E-42	4EL
TR513	-	373046529	339	249/275	90	1.00E-89	5EL
TR764	-	430741570	117	68/71	95	9.00E-23	7EL
TR757	-	515197145	226	198/226	87	1.00E-55	5EL
TR471	-	540255332	367	213/221	96	3.00E-98	5ES
c764126	5BL14-0.75-0.76	541527247	297	150/150	100	7.00E-78	5EL
TR128	-	551505947	379	206/211	97	1.00E-101	4ES,5EL
c749645	5BL16-0.79-1.00	612670392	165	104/109	95	7.00E-38	5EL, 7ES
6B: 720988478 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
c747871	6BS_6BS-Sat	32329624	309	186/196	94	2.00E-81	6ES
TR88	-	95327126	155	93/98	94	3.00E-34	6ES
TR636	-	127604664	361	392/462	84	4.00E-96	2EL, 6EL, 6ES
TR90	-	134825701	91.7	64/70	91	5.00E-15	6ES
TR91	-	156219229	103	100/116	86	5.00E-19	6ES
TR92	-	165330180	266	134/134	100	7.00E-68	6ES
c741435	6BL_6BL5-0.40-1.00	506126376	137	75/77	97	2.00E-29	4EL
BE490226	-	604214114	357	183/184	99	2.00E-95	2EL, 6EL
7B: 750620385 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
TR355	-	88561592	46.1	26/27	96	0.040	7ES
TR151	-	106597810	222	289/348	83	1.00E-54	7ES, 7EL
TR451	-	446845894	44.1	22/22	100	0.28	2EL, 6EL
c753911	7BL_7BL2-0.33-0.63	477819390	176	89/89	100	2.00E-41	7EL
TR335	-	730547065	46.1	29/31	93	0.11	7ES
7C	-	-	-	-	-	-	7ES

12. táblázat A *Th. elongatum* E genomja és a búza D genomja közötti BLASTn összehasonlítás eredményei

1D: 495453186 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
c737520	-	68445853	351	238/255	93	6.00E-94	1ES
c757212	1DL4-0.18-0.41	198087389	200	104/105	99	1.00E-48	1EL
TR574	-	217644495	815	479/498	96	0.0	1EL
c744533	1DL2-0,41-1.00	258587294	289	206/232	88	2.00E-75	1EL

2D: 651852609 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
TR725	-	65639691	648	451/490	92	0.0	2ES
2R	-	110938900	426	215/215	100	1.00E-116	2ES
TR416	-	122867454	75.8	50/54	92	4.00E-11	2ES
TR430	-	294965384	44.1	38/42	90	0.21	2ES, 6ES
TR636	-	317947598	408	398/462	86	1.00E-110	2EL, 6EL, 6ES
TR146	-	389278457	700	378/385	98	0.0	2EL, 6EL
c744070	2DL_2DL9-0.76-1.00	535108642	278	160/169	94	7.00E-72	2EL, 6EL
2N	-	565478843	230	122/124	98	4.00E-57	2EL, 6EL
c746642	2DL_2DL9-0.76-1.00	647283255	196	105/107	98	2.00E-47	2EL, 6EL
3D: 615552423 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
TR85	-	6729401	105	74/81	91	2.00E-19	Amp
TR4	-	6971953	720	502/542	92	0.0	Amp
c755442	3DS6-0.55-1.00	33184185	381	195/196	99	1.00E-103	Amp
c752685	3DS6-0.55-1.00	71969285	375	189/189	100	1.00E-101	Amp
c756059	3DS3-0.24-0.55	135379495	218	128/134	95	6.00E-54	Amp
c767527	C-3DL2-0.27	326700889	476	240/240	100	1.00E-131	Amp
TR63	-	374928615	898	501/516	97	0.0	Amp
TR62	-	514653860	888	448/448	100	0.0	Amp
TR67	-	529486158	317	247/276	89	5.00E-83	Amp
TR82	-	574824072	250	180/198	90	6.00E-63	5EL
4D: 509857067 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
4C	-	6037616	1047	528/528	100	0.0	4EL
TR131	-	18725916	109	121/143	84	1.00E-20	4ES
c760004	4DS_4DS2-0.82-1.00	40657024	309	221/244	90	2.00E-81	4EL
c771467	4DS3-0.67-0.82	74374799	462	246/249	98	1.00E-127	4EL
c765452	4DL9-0.31-0.56	343061378	295	158/161	98	3.00E-77	4ES
c770094	4DL12-0.71-1.00	462835649	153	89/93	95	3.00E-34	4EL

5D: 566080677 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
TR759	-	299940216	192	136/149	91	4.00E-45	4EL
TR513	-	321903540	339	249/275	90	1.00E-89	5EL
TR764	-	364745816	117	68/71	95	9.00E-23	7EL
TR757	-	425850515	242	200/226	88	2.00E-60	5EL
TR471	-	443636914	404	213/216	98	1.00E-109	5ES
<i>c764126</i>	-	444710638	297	150/150	100	7.00E-78	5EL
TR128	-	451681243	402	209/211	99	1.00E-109	4ES,5EL
<i>c749645</i>	5DL5-0.76-1.00	495615345	170	92/94	97	1.00E-39	5EL, 7ES
6D: 473592718 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
<i>c747871</i>	6DS_6DS6-0.99-1.00	18013781	389	196/196	100	1.00E-105	6ES
TR88	-	41928088	178	96/98	97	2.00E-41	6ES
TR636	-	56909276	414	419/489	85	1.00E-112	2EL, 6EL, 6ES
TR90	-	60547435	91.7	64/70	91	5.00E-15	6ES
TR91	-	81589689	103	100/116	86	5.00E-19	6ES
TR92	-	87278803	234	130/134	97	3.00E-58	6ES
<i>c741435</i>	6DL_6DL6-0.29-0.47	318151539	155	78/78	100	7.00E-35	4EL
BE490226	-	403321603	333	180/184	97	3.00E-88	2EL, 6EL
7D: 638686055 bp							
Marker	bin	BLASTn eredmény					Syntenic <i>Th. elongatum</i> group
		Kezdő pozíció (bp)	Score	Identities (Query length)	Percentage	Expect	
7C	-	53261770	375	189/189	100	1.00E-101	7ES
TR335	-	72921601	60.0	48/54	88	7.00E-06	7ES
<i>TR355</i>	-	126996735	46.1	26/27	96	0.040	7ES
TR151	-	141356056	214	288/348	82	3.00E-52	7ES, 7EL
<i>c753911</i>	7DL_7DL5-0.30-0.61	454090119	168	88/89	98	5.00E-39	7EL
<i>TR451</i>	-	-	-	-	-	-	2EL, 6EL

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Molnár Istvánnak a PhD dolgozatom elkészítésében nyújtott szakmai segítségét, számos javaslatát és észrevételét, és támogatását.

Köszönöm volt témavezetőmnek, Dr. Linc Gabriellának, hogy segítségével megismerhettem a molekuláris citogenetika tudományát és lehetővé tette a PhD dolgozatom elkészítését, szakmai segítségét.

Köszönettel tartozom az Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet jelenlegi főigazgatójának Dr. Balázs Ervinnek, volt főigazgatójának Dr. Bedő Zoltánnak és Dr. Veisz Ottó igazgató úrnak, hogy biztosították a dolgozatom elkészítéséhez szükséges szellemi, tárgyi és anyagi feltételeket.

Köszönöm a Génmegőrzési Osztály jelenlegi tudományos osztályvezetőjének, Dr. Molnár Istvánnak, volt vezetőinek Dr. Hegedűs Attilának, Dr. Linc Gabriellának és Dr. Lángné Dr. Molnár Mártának, hogy segítették és irányították szakmai fejlődésem, és lehetővé tették, hogy bekapcsolódhassak az osztályon folyó citogenetikai és markeres munkákba.

Külön köszönet illeti a Génmegőrzési Osztály minden jelenlegi és volt munkatársát, hogy munkámat mind szakmailag, mind emberileg segítették, megosztották velem tapasztalataikat és javaslataikat a citogenetikai, keresztezési és molekuláris markeres munkák során. Köszönöm Dr. Farkas Andrásnak és Ivanizs Lászlónak a molekuláris markeres vizsgálatokban nyújtott segítségüket, Dr. Könyvesné Lakner Ildikónak a számos feldolgozásban és citogenetikai munkában nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Vida Gyulának és Károlyiné Dr. Cséplő Mónikának a rezisztenciakísérletekben nyújtott munkájukért.

Köszönöm családomnak, szüleimnek, hogy támogatták tanulmányaimat, ösztönzésüket és lelki támogatásukat.