

Szakmai záró jelentés az OTKA PD83444 sz. pályázathoz

A búza rokonsági köréhez tartozó vad fajok az agronómiai tulajdonságokért felelős gének olyan allél változatait hordozzák, amelyek a búzában nem fordulnak elő. Ezen allélek azonosítása és marker kapcsolt szelekcióval történő átvitele a termesztett búzába jelentősen hozzájárulhat a megváltozott biotikus és abiotikus környezethez jól adaptálódó búzafajták előállításához.

A kutatási ösztöndíj távlati célja az volt, hogy az idegen fajú keresztezések szempontjából fontos vad fajok esetében egyedi kromoszómák izolálásával megteremtse a kromoszóma alapú genomika alkalmazásának lehetőségét, utat nyitva az egyedi kromoszómák szekvenálásán keresztül új kromoszóma specifikus markerek előállításához.

A pályázat fő kutatási célkitűzései a következők voltak:

(I.) U és M genommal rendelkező *Aegilops* fajok kromoszómáinak áramlásos citometria segítségével történő izolálása és azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel.

(II.) Az izolált *Aegilops* kromoszómák szekvenálása újgenerációs szekvenálási eljárásokkal

(III.) *Aegilops* specifikus molekuláris markerek fejlesztése

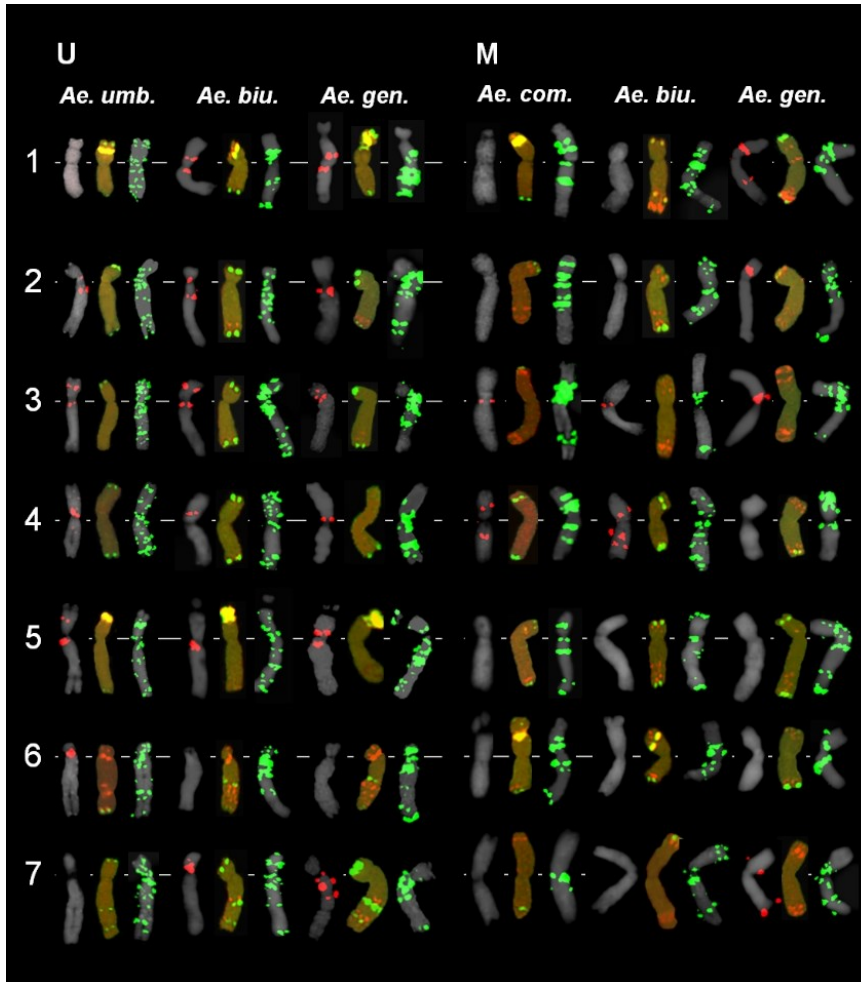
I. *Aegilops* kromoszómák izolálása és azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel

Az I. pontban megfogalmazott kutatási cél megvalósításának érdekében a következő feladatok megoldását tartottuk szükségesnek:

1. Diploid és allotetraploid *Aegilops* genotípusok kariotípusának meghatározása az izolált kromoszómák későbbi azonosításának érdekében.
2. Az áramlásos (flow-) cytometriai kísérletekhez szükséges szemszám biztosításának érdekében a kiválasztott *Aegilops* genotípusok felszaporítása.
3. Az egyes *Aegilops* fajok flow-kariotípusának meghatározása és kromoszómák izolálása a flow-kariotípus csúcsokból.
4. Az izolált kromoszómák azonosítása fluorescens *in situ* hibridizációval és molekuláris markerekkel

A munkaterv 1. pontjának megfelelően meghatároztuk egy diploid *Ae. umbellulata* (UU), egy diploid *Ae. comosa* (MM), nyolc allotetraploid *Ae. biuncialis* ($U^bU^bM^bM^b$) és nyolc szintén allotetraploid *Ae. geniculata* ($U^sU^sM^sM^s$) genotípus kariotípusát repetitív DNS próbákkal (Afa family, pSc119.2, pTa71) végzett *in situ* hibridizáció (FISH) segítségével (Molnár et al. 2011a). A diagnosztikus sávok növelése és a pontosabb azonosítás érdekében leírtuk a fenti fajok (ACG)_n és (GAA)_n mikroszatellit motívumokkal adott kariotípusát is. A FISH és az U és

M genomok párhuzamos kimutatását lehetővé tevő genomi *in situ* hibridizáció (GISH) segítségével 4 *Ae. biuncialis* genotípusban (TA10058, MvGB377, AE751/82) mutattunk ki 7U^b-7M^b, valamint két *Ae. geniculata* genotípusban (AE839/91, AE660/83) 7U^g-1M^g illetve 5U^g-5M^g reciprok kromoszóma átrendeződéseket. Mindezek alapján az áramlásos citometriai kísérletekhez a továbbiakban olyan *Aegilops* genotípusokat használtunk, amelyek nem tartalmaztak intergenomikus kromoszóma átrendeződéseket (*Ae. umbellulata* MvGB470, *Ae. comosa* MVGB1039, *Ae. biuncialis* MvGB382, *Ae. geniculata* AE1311/00).



1. Ábra: Az *Ae. umbellulata*, *Ae. comosa*, *Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata* U és M kromoszómáinak FISH karyotípusa Afa family, pSc119.2 és pTa71 (középen) valamint (ACG)_n (balra) és (GAA)_n (jobbra) mikroszatellit próbákkal (Molnár et al. 2011a).

A flow-citometriai kísérletek mellett, a molekuláris citogenetikai (FISH, GISH) módszertani fejlesztések lehetővé tették az U és M *Aegilops* kromoszómák azonosítását és megkülönböztetését búza genetikai háttérben is a hasznos *Aegilops* tulajdonságok (a szemtermés magas mikroelem tartalma, szárazságtűrés) búzába való átvitelét célzó előnemesítési programok során (Farkas et al. Genome 2014; Dulai et al. J Plant Physiol 2014).

A búza-*Aegilops* nemesítési anyagok mitotikus kromoszómáin folytatott módszertani fejlesztéseket sikkerrel alkalmaztuk más idegen fajú búza hibridek egyedi kromoszómáinak meiotikus kromoszómapárosodásának tanulmányozására (Megyeri et al. Cytogenet Genome Res. 2013).

A 2. pontban megfogalmazott célkitűzés alapján a kiválasztott *Aegilops* genotípusokat az MTA ATK MGI üvegházában, növénynevelő kamráiban, illetve szabadföldi kísérleti területein szaporítottuk fel a flow-citometriai kísérletekhez szükséges szemszám (500-1500 szem/genotípus) biztosítása érdekében.

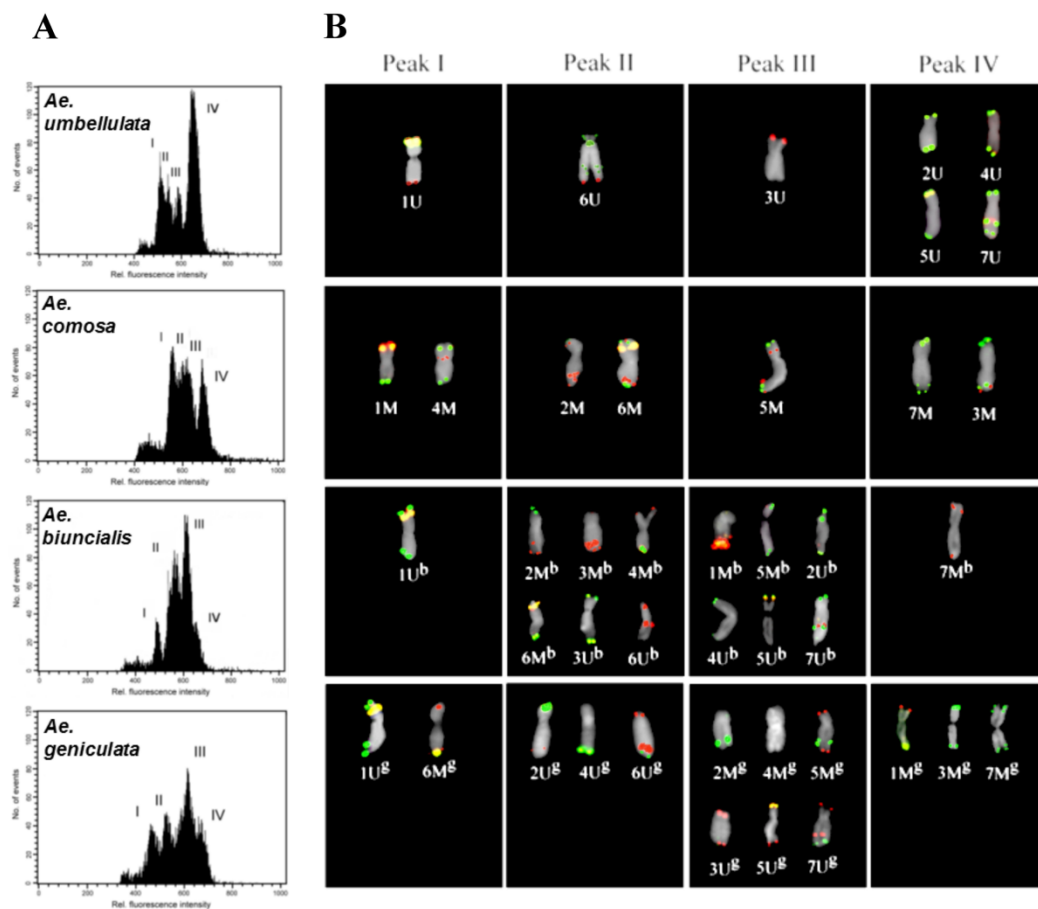
A 3. és 4. pont célkitűzéseit nemzetközi együttműködésben (Jaroslav Dolezel, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic) valósítottuk meg. A fenti *Aegilops* genotípusok gyökércsúcs merisztéma sejtjeinek sejtciklusát hydroxyurea kezeléssel szinkronizáltuk és amiprofos-methyl segítségével metafázisban akumuláltuk. Az előállított kromoszóma szuszpenziók DAPI-val történt festését követően meghatároztuk a fajok flow-kariotípusát (~30 000 kromoszóma/minta). Mind a diploid *Ae. umbellulata* és *Ae. comosa*, mind a tetraploid *Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata* flow-kariotípusa négy csúccsal rendelkezett. Az egyes csúcsok által reprezentált kromoszómákat méret (azaz DAPI fluoreszcencia intenzitás) alapján izoláltuk egy FACS Advantage SE flow cytometer (Becton Dickinson, San José, USA) segítségével melyeket egy mikroszkóp tárgylemezen fixáltunk (1000 kr. /csúcs) és FISH (próbák: Afa family, pSc119.2, pTa71) segítségével azonosítottuk (Molnár et al. 2011b).

Az *Aegilops* fajok flow-kariotípus csúcsai a következő kromoszómákat tartalmazták:

***Ae. umbellulata* I:** 1U, **II:** 6U, **III:** 3U, **IV:** 2U, 4U, 5U és 7U; ***Ae. comosa* I:** 1M, 4M, **II:** 6M, **III:** 2M, 5M, **IV:** 3M, 7M; ***Ae. biuncialis* I:** 1U^b, **II:** 2M^b, 3M^b, 4M^b, 6M^b, 3U^b, 6U^b, **III:** 1M^b, 5M^b, 2U^b, 4U^b, 5U^b, 7U^b, **IV:** 7M^b; ***Ae. geniculata* I:** 1U^g, 6M^g, **II:** 3U^g, 4U^g, 6U^g, **III:** 2M^g, 4M^g, 5M^g, 5U^g, 7U^g, 2U^g, **IV:** 1M^g, 3M^g, 7M^g.

A csúcsenként 100-200 kromoszóma FISH azonosítása alapján megállapítható, hogy az *Ae. umbellulata* 1U (98,9%), 6U (74,1%), és 3U (86,4%) valamint az *Ae. biuncialis* 1U^b (95,9%) kromoszómája nagy tisztaságban izolálható. A kromoszóma izolálás optimalizálása (a sorter beállításainak változtatása, érzékenyebb detektor alkalmazása majd az izolált kromoszómák FISH azonosítása) lehetővé tette, hogy a 6U és 3U kromoszómák esetében is 90% fölé (95,3%, 97,8%) tudjuk növelni az izolált frakciók tisztaságát.

Mindezen módszertani fejlesztések lehetővé tették, hogy az U és M genommal rendelkező *Aegilops* fajokon kívül további, a búza evolúciójában jelentős szerepet játszó, annak vad diploid genom donor fajaiból (*T. urartu*-AA-, *Ae. speltooides*-SS-, *Ae. tauschii*-DD-), valamint további *Aegilops* fajokból (*Ae. caudata* -CC-, *Ae. cylindrica*-C^cC^cD^cD^c- és *Ae. triuncialis*-U^tU^tC^tC^t-) is sikerrel izoláljunk egyedi kromoszómákat (5A, 5S, 5D, valamint 4C, 5C, 5D^c, T6U^tS.6U^tL-5C^tL és 7C^t) (Molnár et al. Theor Appl Genet 2014).



2. ábra: Az *Ae. umbellulata*, *Ae. comosa*, *Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata* kromoszóma méret alapján meghatározott flow kariotípusa (A) és a flow kariotípus csúcsokból által reprezentált kromoszómák (B) (Molnár et al. 2011b).

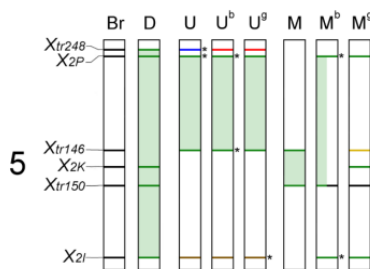
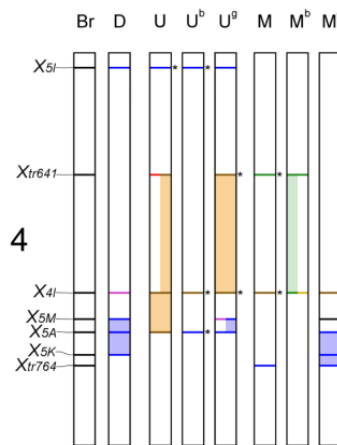
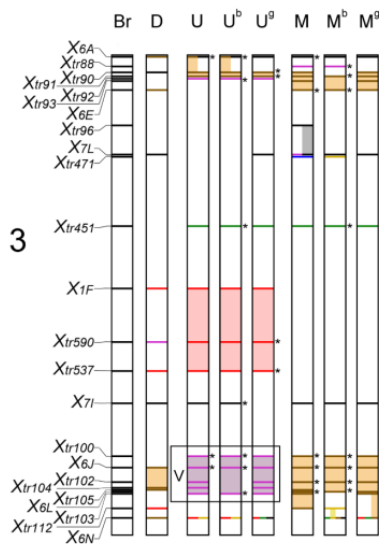
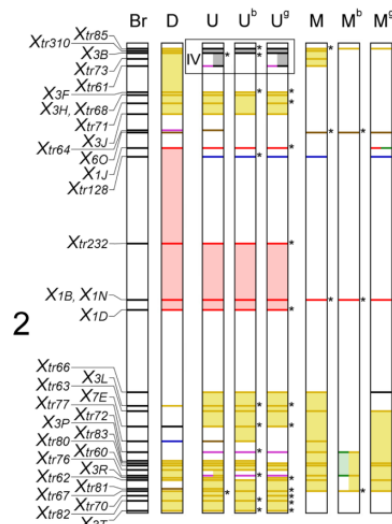
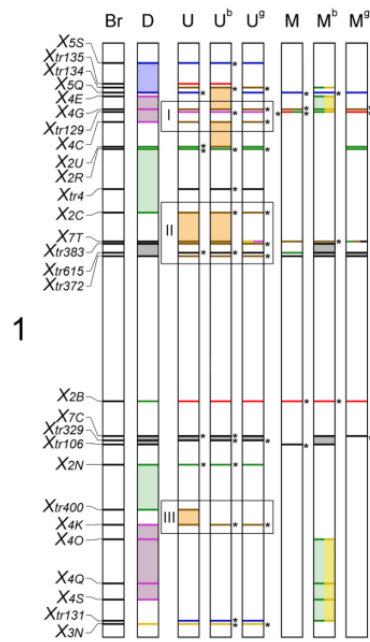
Az egyes flow-kariotípus csúcsok kromoszómaösszetételére vonatkozó molekuláris citogenetikai eredményeket molekuláris markerekkel is alátámasztottuk, illetve az izolált kromoszóma frakciók segítségével meghatároztuk számos marker kromoszómális lokalizációját. A marker analízishez csúcsenként 25-50 000 kromoszómát izoláltunk PCR csövekbe (~20-60 ng DNS), amelyek DNS tartalmát proteinase kezelést követően multiple displacement amplification (MDA) segítségével (Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit) felszaporítottuk. A kísérletekben szintén felhasználtuk a flow-citometriai kísérletekhez használt *Aegilops* genotípusok teljes genomi DNS-ét, valamint búza (Chinese Spring)-*Ae. geniculata* (1U^g, 2U^g, 3U^g, 4U^g, 5U^g, 6U^g, 7U^g, 1M^g, 2M^g, 3M^g, 5M^g, 6M^g, 7M^g) és búza (Mv9kr1)- *Ae. biuncialis* (1U^b, 6U^b, 3U^b, 2M^b, 3M^b, 7M^b) addíciós vonalakat. A PCR termékeket agaróz gélelektrofoézis (később pedig egy kapilláris elektroforézis eleven működő fragmentanalizátor - Advanced Analytical Technologies, Ames, USA-) segítségével elemeztük. A 25 búza specifikus SSR marker közül 13 marker adott specifikus terméket legalább egy *Aegilops* fajon. Tíz SSR marker kromoszómális elhelyezkedését határoztuk meg a flow-sorted kromoszóma DNS mintákban való előfordulásuk illetve az addíciós vonalak segítségével (a búza és az *Aegilops* specifikus sávok hosszpolimorfizmusa alapján): *Ae. umbellulata* (1U: *Xgdm33*, *Xcfd59*; 3U: *Xgwm391*, *Xcfa2134*; 6U: *Xwmc48*, *Xcfa2040*), *Ae. biuncialis* (1U^b: *Xgdm33*, *Xcfd59*) és *Ae. geniculata* (1U^g: *Xcfd59*; 3U^g: *Xgwm391*, *Xgwm114*, *Xcfa2134*; 4U^g: *Xgwm165*; 5U^g: *Xgdm34*, *Xgwm205*) (Molnár et al. 2011b).

A genomi SSR markerekkel kapcsolatban megállapítottuk, hogy a sok esetben több, különböző genomi elhelyezkedésű PCR termék komplikáltá teszi az egyes *Aegilops* kromoszómák genomi SSR markerekkel történő nyomonkövetését. A COS (Conserved Ortholog Set) markereket olyan gének exon-intron határ régióira tervezték melyek az evolúció során nagymértékben konzerválódtak a szekvencia és a kópiaszám tekintetében. Előnyük a genomi SSR markerekkel szemben, hogy góyalapú markerek, így a későbbiek során hatékonyabban alkalmazhatóak az *Aegilops* fajok agronómiai tulajdonságainak QTL analíziséhez, valamint az *Aegilops* fajok genomi struktúrájának összehasonlításához a búzával és különböző modell fajokkal (*Brachypodium*, rizs).

A flow-citometria segítségével izolált kromoszóma frakciók lehetőséget adtak további nemzetközi kooperáció létrehozására Dr. Simon Griffiths-el (JIC, Norwich UK), akivel együttműködve megkezdtük góyalapú COS markerek azonosítását az egyes *Aegilops* kromoszómákon.

A vizsgálatok meghatározott kromoszómális összetételű *Ae. umbellulata*, *Ae. comosa*, *Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata* flow-sorted DNS mintákon, valamint *T. aestivum*-*Aegilops* addíciós vonalakon (*Ae. umbellulata*: 1U, 2U, 4U, 5U, 6U, 7U; *Ae. comosa*: 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M; *Ae. biuncialis*: 1U^b, 6U^b, 3U^b, 2M^b, 3M^b, 7M^b és *Ae. geniculata*: 1U^g, 2U^g, 3U^g, 4U^g, 5U^g, 6U^g, 7U^g, 1M^g, 2M^g, 3M^g, 5M^g, 6M^g, 7M^g) történtek. A tesztelt 141 marker közül 100 esetben tudtam az U és M genomi pozíciót kromoszóma szinten meghatározni (Molnár et al. PLoS One 2013). Ezek közül, 51 marker 169 lókusza mutatott jelentős (≥ 2 bp) polimorfizmust a búza szülőhöz képest. Ezek a markerek lefedik mind a 7 db U és M homeológ csoportot, így alkalmasak lehetnek új búza-*Aegilops* addíciós vonalak és kromoszóma átrendeződések marker-kapcsolt szelekciójára.

A COS markerek helyzetének kromoszóma szintű meghatározása lehetővé tette az *Aegilops* fajok és a búza, valamint *Brachypodium* és rizs közt fennálló szinténikus kapcsolatok tanulmányozását. Az összehasonlítás során meghatároztuk a COS markerek fejlesztéséhez használt EST szekvenciák kromoszómális helyzetét (start pozícióját) a *Brachypodium* és rizs genomok összeillesztett genomi referencia szekvenciáin (*Brachypodium distachyon* v1.0; *Oryza sativa* Japonica Group, The IRGSP pseudomolecules, Build 4.0, GenBank Assembly ID: CA_000005425.2). A start genomi pozíciók alapján megszerkesztettük a COS markerek fizikai térképét a *Brachypodium*-ban és rizsben. Ezután az egyes markerek kromoszóma szintű helyzetét a búza D genomjában valamint a diploid és poliploid *Aegilops* fajok U és M genomjaiban az I.-VII. homeológ csoportokra specifikus szín kódokkal vizualizáltuk. Ennek eredményeként meghatározhatjuk, hogy az egyes *Brachypodium* (ill. Rizs) kromoszóma régióknak megfelelő régiók mely kromoszómákon találhatóak a búza, illetve U és M *Aegilops* genomokban. Az így kapott eredmények lehetővé tehetik a jövőben az egyes *Aegilops* kromoszómákra specifikus góyalapú markerek célzott fejlesztését a *Brachypodium* és rizs szekvenciák alapján.



Homoeologous groups in *Triticum/Aegilops*



3. ábra: A COS markerek kromoszóma szintű genomai pozíciója alapján meghatározott homológia viszonyok a *Brachypodium distachyon*, a búza D genomja valamint a diploid és poliploid *Aegilops* fajok U és M genomja között. Az összehasonlítás alapjául a COS markerek *Brachypodium* genomon meghatározott fizikai pozíciója szolgál (Molnár et al. 2013).

Gyakorlati téren a markerek segítségével gyorsabbá válhat a búza–*Aegilops* transzlokációk kiválogatása is. Az adott vizsgálatok bizonyították a géalapú COS markerek alkalmazhatóságát az *Aegilops* kromoszómák búza genetikai háttérben történő nyomon követésére. Ennek alapján az eredeti munkatervtől eltérően (melyben SSR markerek fejlesztése szerepelt) további géalapú markerek (SNP, COS, PAV) fejlesztése mellett döntöttünk az *Aegilops* kromoszómák későbbi szekvencia adatainak felhasználásával.

II. Az izolált *Aegilops* kromoszómák szekvenálása újgenerációs szekvenálási eljárásokkal

Az II. pontban megfogalmazott kutatási cél megvalósításának érdekében a következő feladatok megoldását tartottuk szükségesnek:

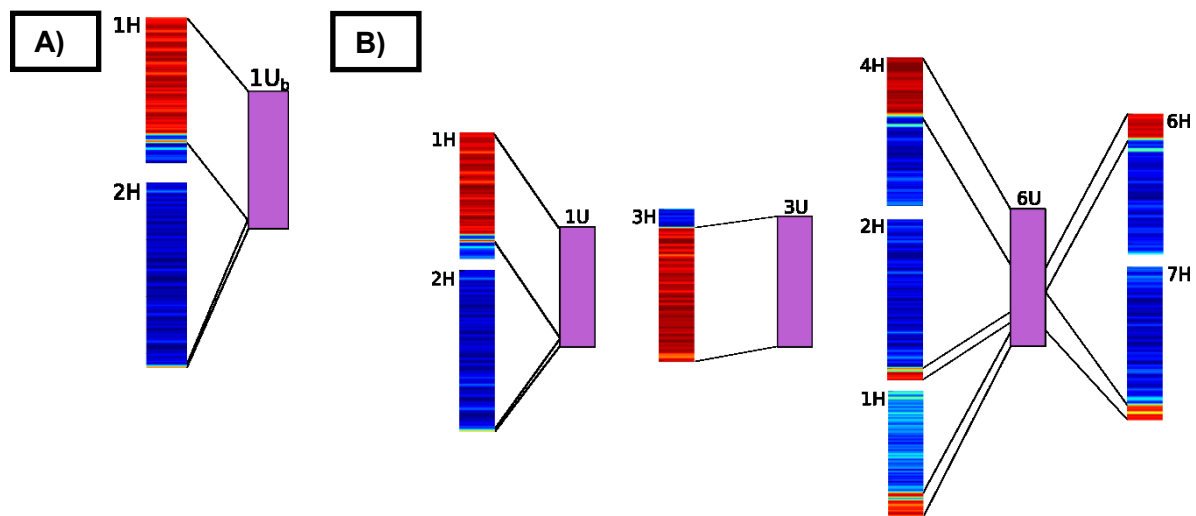
1. Az *Aegilops* fajok izolált (flow-sorted) kromoszómáinak szekvenálása új generációs módszerek segítségével,
2. A szekvenciák bioinformatikai feldolgozása, kromoszóma specifikus adatbázisok létrehozása különböző referencia genomokkal történő összehasonlítás segítségével.

Az 1. pontban megfogalmazottak alapján elvégeztük az *Ae. umbellulata* 1U, 6U és 3U, valamint az *Ae. biuncialis* 1U^b kromoszómáinak shot-gun szekvenálását. A szekvenáláshoz szükséges DNS minta előállításához 38126 db 1U illetve 1U^b kromoszómát, 37215 db 3U és 36880 db 6U kromoszómát izoláltunk PCR csövekbe, mely 50 ng DNS-nek felelt meg. Az izolált DNS frakciók tisztasága minden esetben 94% fölött volt (1U: 96,9%, 1U^b: 94,7%, 3U:97,8%, 6U: 95,3%) Az izolált kromoszómák DNS tartalmát a korábban leírt módon (MDA, Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit) felszaporítottuk, mely mintánként 4-6 µg DNS kihozatalt eredményezett (1U: 6,85 µg; 1U^b; 4,54 µg; 3U: 6,55µg; 6U: 6.68µg). Az izolált kromoszómák felszaporított DNS-ét nemzetközi együttműködés keretében (Federica Cattonaro, IGA Institute of Applied Genomics, Udine, Italy) megszekvenáltuk egy Illumina HiSeq2000 berendezés segítségével. A szekvenálás 330-480 bp inserteket tartalmazó Illumina 100bp paired-end könyvtárakon történt, melynek eredményeként kromoszómánként 30 Gbp 2x100bp paired-end readeket kaptunk (elsődleges szekvenciák).

2. A szekvenálásból származó adatok bioinformatikai feldolgozása a Dr. Klaus Mayer és csoportjával (MIPS, München), valamint az MTA ATK bioinformatikai csoportjával együttműködésben végeztük. Az Illumina paired-end readek összeillesztése SOAPdenovo softwer segítségével történt különböző k-mer méretek mellett (21 és 29 bp k-mer értékek között 3 bp-os lépéseket, míg 35 és 85 bp között 5bp-os lépésekt alkalmazva) annak érdekében, hogy a meghatározzuk a legjobb genom lefedettséggel és L50 értékkel rendelkező illesztést. Az *Ae. umbellulata* kromoszómák esetében a további vizsgálatokhoz a 45bp k-mer méretek melletti illesztésekkel kapott, míg az *Ae. biuncialis* 1U^b kromoszóma esetében a 60 bp k-mer érték mellett kapott scaffoldokat használtuk. Ezen másodlagos adatbázisok főbb statisztikai mutatói a következő határértékek közt mozogtak: szekvenciák száma: 617391-997537, szekvenciák összesített mérete (bp): 323808605-373114526, átlagos szekvencia hossz (bp): 374,03-564,9 és L50 érték: 1230-2129. Ezt követően a VMATCH softwer (<http://www.vmatch.de/>) alkalmazásával és a MIPS-REdat Poaceae v8.6.2 Repeat adatbázissal való összehasonlítás segítségével azonosítottuk az egyes *Aegilops* kromoszómákban a repetitív szekvenciákat (1U^b: 62,4%, 1U: 42,5%, 3U: 43,1%, 6U: 40,2%) ami lehetővé tette az adatbázisokból történő eltávolításukat (= harmadlagos adatbázis).

Az *Aegilops* kromoszómák génösszetételének meghatározásához összehasonlítottuk az *Aegilops* kromoszómák repetitív szekvenciáktól megszűrt adatait az árpa virtuális génsorrendjével valamint a *Brachypodium*, a rizs és a cirok összeillesztett genomi szekvenciáival (BLASTX, kritériumok: (a) csak a legjobb találatot vettük figyelembe, mely legalább 30 aminosavnyi illesztési hosszal rendelkezett és a minimális szekvencia azonosság 85% (az árpával való összehasonlításnál), 75% (a *Brachypodium*-mal), illetve 70% (a rizsszel és a *Shorgum bicolor*-ral történt összehasonlításnál) volt. A génspecifikus szekvenciák alapján

megállapítottuk, hogy az 1U^b és 1U kromoszómák szinténikusak az árpa 1H kromoszómával valamint egy rövid fragmenttel a 2H hosszúkar telomer régiójában. Az *Ae. umbellulata* 3U kromoszóma szintén megfelel az árpa 3H kromoszóma hosszú karjának. Ezzel ellentétben a jelentős evolúciós átrendeződésen keresztül ment 6U kromoszóma megfelel az 1H, 2H és 7H hosszú karján, a 4H rövid és hosszú karján, valamint a 6H rövid karján található konzervált szinténikus régióknak (Šimková et al. 2011ab, Molnár et al. 2012abc; Martis et al. 2012; Dolezel et al. 2013).



4. ábra: Szinténia az *Ae. biuncialis* 1U^b (A), az *Ae. umbellulata* 1U, 3U, 6U (B), valamint az árpa kromoszómái között. Az összehasonlítás alapjául az árpa kromoszómák 10 Mb régióiban és az *Aegilops* kromoszómákon található azonos gének hányada szolgált, melyet hőtérkép segítségével ábrázoltunk (minél magasabb az azonos gének aránya, annál vörösebb színnel jelöltük az egyes régiókat).

III. *Aegilops* specifikus molekuláris markerek fejlesztése

Az 1U^b kromoszómára fókuszálva a szekvencia adatok felhasználásával géalapú, *Aegilops* kromoszóma specifikus markerek előállítását kezdtem meg intézetünk bioinformatikai csoportjának irányítása alatt. Figyelembe véve az izolált *Aegilops* kromoszómák és rokon fajtái (búza D genom, árpa) közt előzőleg megállapított homológia viszonyokat, első lépésben kiválogattam 633 db, a búza 1D kromoszómáján előzetesen fizikailag térképezett EST szekvenciát, melyeket az *Ae. biuncialis* 1U^b szekvenciáihoz illeszttem (A BLASTn során alkalmazott paraméterek: illesztési hossz >100bp; ID%=93-100). Azt a 49 EST-t, melyek 1 scaffoldon adtak találatot és a búzához képest mutatózó eltérés (gap) ≥ 3 bp volt egyenként illeszttem a megfelelő 1U^b *Aegilops* scaffoldra és primereket terveztem a variábilis régiókra. A 66 előállított primerpárból az NCBI PrimerBLAST segítségével kiszűrtem a durum és hexaploid búza szekvenciákhoz képest nem variábilis primereket, melynek eredményeként 44 db olyan primer párt hoztam létre, melyek az adott génre nézve az 1U^b specifikus allélt fogják felszaporítani. E markerek PCR-es validálása búza – *Aegilops* addíciós vonalakon, ezek búza és *Aegilops* szülői genotípusain, valamint flow-sorted kromoszóma DNS-en folyamatban van,

de az eddig vizsgált 14 marker specifikusnak bizonyult az 1U kromoszómára. Így a fenti megközelítést alkalmazva további kromoszóma specifikus markerek előállítását tervezem a többi izolált *Aegilops* kromoszóma szekvenciáinak felhasználásával.

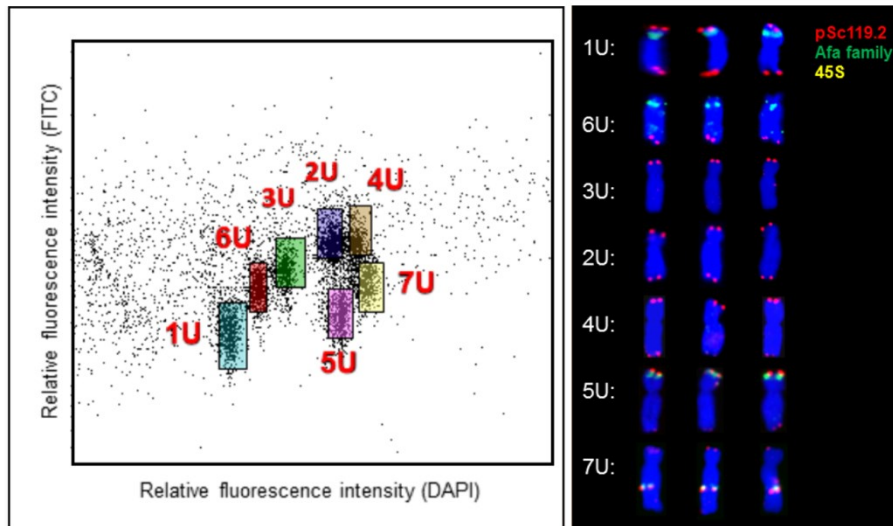
A fenti eredmények igazolták azt a feltevést, hogy áramlásos citometria segítségével lehetséges egyedi kromoszómákat nagy tisztaságban izolálni vad *Aegilops* fajokból is, melyek szekvenálásával és egyéb genomikai alkalmazásával jelentősen növelhető a vad *Aegilops* fajok genomjáról rendelkezésre álló szekvencia szintű ismeretanyag. Mindez lehetővé teszi az előnemesítési folyamatok felgyorsításához nélkülözhetetlen molekuláris markerek előállítását és térképezését.

Ugyanakkor azt a következtetést is le kell vonni, miszerint a méret alapján történő monoparametrikus kromoszómaizolálás csak néhány (1-3) kromoszóma izolálását teszi lehetővé az adott *Aegilops* fajok esetében, hiszen az egyes kromoszómák közti kis méretkülönbségeket- és ebből fakadóan a kis DAPI fluoreszcencia intenzitás különbségeket- a flow citométerek jelenleg alkalmazott detektorai nem képesek feloldani.

Az ideális helyzet az volna, ha minden *Aegilops* kromoszómát külön-külön lehetne nagy tisztaságban izolálni. Erre adott lehetőséget egy 2013-elejen megjelent publikáció (Giorgi et al. 2013), mely fluorokrómmal (FITC-el) jelölt repetitív DNS próbák szuszpenzióban lévő növényi kromoszómákhoz történő *in situ* hibridizációját írja le. A növényi kromoszóma szuszpenziók *in situ* hibridizációval történő jelölése a DAPI festéssel kombinálva lehetőséget ad az egyes kromoszómák biparametrikus (FITC és DAPI fluoreszcencia alapján történő) flow-citometriai analizisére és izolálására. Tekintettel arra, hogy az alkalmazott SSR oligonukleotid próbákkal az OTKA pályázat keretében korábban már leírtuk az *Ae. umbellulata*, *Ae. comosa*, valamint *Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata* kariotípusát és igazoltuk, hogy az egyes kromoszómákon különböző mennyiségű és intenzitású hibridizációs sávok jelennek meg (Molnár et al. 2011a), indokoltnak tartottuk a FISHis (Fluorescence in situ hybridisation in suspension) jelölés és a biparametrikus flow citometria alkalmazását további kromoszómák izolálása céljából. A 2013 novembere és 2014 márciusa közt Olomouc-ban töltött tanulmányutam során elsajátítottam a FISHis (Fluorescence in situ hybridisation in suspension) módszerét.

Az *Ae. umbellulata* (MvGB470) kromoszómák FISHis jelölése FITC-(GAA)₇-FITC és/vagy FITC-(ACG)₇-FITC fluorokrómmal konjugált mikroszatellit próbák segítségével történt a Giorgi et al. (2013) által leírt módon, a körülmények (pH, hőmérséklet) optimalizálása után. A FISHis jelölt és DAPI festett kromoszóma szuszpenziók biparametrikus flow kariotípusát BD FACSAria™ flowcitométer segítségével határoztuk meg, illetve izoláltuk az elkülönített kromoszóma populációkat. Az izolált kromoszómákat FISH segítségével azonosítottuk és határoztuk meg a tisztaságukat a korábban leírt módon.

Az *Ae. umbellulata* kromoszómáinak FITC-(GAA)₇-FITC próbával és DAPI-val történt jelölése után meghatározott flow kariotípusán hét jól elkülöníthető populációt azonosítottunk, melyek a megfeleltek az egyes (1U-7U) kromoszómáknak. A 300-400 kromoszóma/populáció azonosításával meghatározott tisztaság a 2U kromoszóma kivételével (88,8%) minden esetben 90-98% között volt.



5. ábra: Az *Ae. umbellulata* biparametrikus flow-kariotípusa és a kromoszóma frakciók azonosítása FISH-sel.

Tekintettel arra, hogy a szekvenáláshoz alkalmazható izolált kromoszóma frakciók tisztaságának alsó határa 80% (Jaroslav Dolezel személyes közlés), eredményeink azt jelentik, hogy az *Ae. umbellulata* minden kromoszómája izolálható és felhasználható további genomikai célú kutatásokra. (Bár a jelen pályázat anyagilag már nem tudott hozzájárulni, szeretném mégis megemlíteni, hogy a FISHis segítségével izolált további *Ae. umbellulata* kromoszómák -2U, 4U, 5U és 7U- szekvenálását sikerült más pályázati forrásból fedezni. A kromoszómák szekvenálása 2014 májusában befejeződött, jelenleg az adatok bioinformatikai feldolgozása folyamatban van. Így elmondható, hogy az *Ae. umbellulata* teljes U genomját sikerült kromoszómánként izolálni és megszekvenálni.)

Összefoglalásul elmondható, hogy

- (1) a postdoktori OTKA pályázat támogatásával létrehozott FISH kariotípusok jelentősen hozzájárulnak a martonvásári *Aegilops* fajokkal kapcsolatos előnemesítési programok hatékonyságához és lehetővé tették a flow-sorted kromoszóma frakciók azonosítását.
- (2) A vad fajok egyedi kromoszómáinak izolálásával megnyílt a lehetőség a kromoszóma alapú genomikai megközelítés alkalmazására a genomszekvenálás területén, amint azt eredményeim is igazolták az *Ae. umbellulata* és *Ae. biuncialis* kromoszómái esetében.
- (3) Az izolált *Aegilops* kromoszómákon azonosított illetve a kromoszómák szekvencia adatai alapján tervezett új gén alapú (COS) markerek a jövőben alapját képezhetik e vad fajok genetikai térképek előállításának, hasznos agronómiai tulajdonságok térképezésének és ezek marker kapcsolt szelekcióval történő átvitelének a búzába.
- (4) A FISHis jelölés és biparametrikus flow citometriai analízis jelentősen növeli az izolált kromoszómák számát és a kromoszóma frakciók tisztaságát, ami megnyitja az utat a búza génforrásaiként használt vad fajok genomjának nagyfelbontású strukturális és funkcionális genomikai vizsgálata felé.

Eredményeinket 17 konferencián mutattuk be és 7db folyóiratcikk formájában publikáltuk melyek összesített impact faktora: 21,716.

A posztdoktori OTKA pályázat alapját képező nemzetközi együttműködés fő célkitűzései és eredményei egy komplementer projekt keretében megtalálhatóak a Nemzetközi Búza Genom Szekvenálási Konzorcium (International Wheat Genome Sequencing Consortium, IWGSC) honlapján is: <http://www.wheatgenome.org/Projects/Complimentary-Projects/Wild-Relatives>

Irodalom

Dulai S, Molnár I, Szopkó D, Darkó É, Vojtkó A, Sass-Gyarmati A and Molnár-Láng M: Wheat-*Aegilops biuncialis* amphiploids have efficient photosynthesis and biomass production during osmotic stress., *Journal of Plant Physiology*, 171: 509-517., 2014

Farkas A, Molnár I, Dulai S, Rapi S, Oldal V, Cseh A, Kruppa K, Molnár-Láng M: Increased micronutrient content (Zn, Mn) in the 3M^b(4B) wheat-*Aegilops biuncialis* substitution and 3M^b.4BS translocation identified by GISH and FISH., *Genome*, 57: 61–67 IF: 1.668, 2014

Molnár I, Cifuentes M, Schneider A, Benavente E, Molnár-Láng M.: Association between SSR-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats., *Annals of Botany* 107(1): 65-76., 2011a

Molnár I, Kubaláková M, Šimková H, Cseh A, Molnár-Láng M. and Doležel J.: Chromosome isolation by flow sorting in *Aegilops umbellulata* and *Ae. comosa* and their allotetraploid hybrids *Ae. biuncialis* and *Ae. geniculata*., *PLoS ONE* 6(11): e27708, 2011b

Molnár I., Šimková H., Leverington-Waite M., Goram R., Cseh A., Vrána J., Farkas A., Doležel J., Molnár-Láng M., Griffiths S.: 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., 2013

Molnár I, Kubaláková M, Šimková H, Farkas A, Cseh A, Megyeri M, Vrána J, Molnár-Láng M, Doležel J.: Flow cytometric chromosome sorting from diploid progenitors of bread wheat, *T. urartu*, *Ae. speltoides* and *Ae. tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 127:1091–1104, 2014a

Molnár I, Vrána J, Burešová V, Cápál P, Farkas A, Molnár-Láng M, Doležel J Establishment of chromosome genomics in wild wheat relatives: Dissecting the S, U, M and C genomes of *Aegilops* by biparametric chromosome sorting. 2014 Annual Main Meeting of the Society of Experimental Biology, 1st - 4th of July, Manchester, UK. Abstract C3.14 pp. 98. 2014b

Megyeri M, Molnár-Láng M and Molnár I.: Cytomolecular identification of individual wheat-wheat chromosome arm associations in wheat-rye hybrids, *Cytogenetic and Genome Research*, 139:128-136, 2013

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