

Génbanki *Triticum monococcum* tételek molekuláris
citogenetikai elemzése és kiaknázása a búzanemesítés
számára

Doktori (PhD) értekezés

Megyeri Mária

Martonvásár

2014

A doktori iskola:

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola
tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok
vezetője: Dr. Helyes Lajos
Intézetigazgató egyetemi tanár
SZIE, Kertészeti és Technológiai Intézet

Témavezetők:

Dr. Láng László
tudományos osztályvezető, az MTA doktora
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Kalászos Gabona Nemesítési
Osztály

Dr. Molnár István
tudományos főmunkatárs
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Génmegőrzési és Organikus
Nemesítési Osztály

.....
Dr. Helyes Lajos
iskolavezető

.....
Dr. Láng László
témavezető

.....
Dr. Molnár István
témavezető

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1 BEVEZETÉS.....	7
1.1 Célkitűzések	8
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
2.1 A búza evolúciója.....	11
2.1.1 A hexaploid búza kialakulása	11
2.1.2 Az allopoliploidizáció genetikai hatásai	12
2.1.3 A domesztikációval kapcsolatos változások.....	13
2.2 A búza génforrásai.....	15
2.2.1 A <i>Triticum monococcum</i> származása, elterjedése	16
2.2.2 A <i>Triticum monococcum</i> , mint génforrás	18
2.2.2.1 A <i>Triticum monococcum</i> a minőségi tulajdonságok kutatásában	18
2.2.2.2 A <i>Triticum monococcum</i> a rezisztencianemesítésben	19
2.2.3 A <i>Triticum monococcum</i> genomösszetételének vizsgálata.....	20
2.2.4 A <i>Triticum monococcum</i> fajjal végzett keresztezések.....	21
2.3 A genetikai diverzitás bővítése idegen fajú keresztezéssel	23
2.3.1 Keresztezhetőség	23
2.3.2 A kolhicin szerepe az idegen fajú keresztezésekben	25
2.3.3 Idegen fajú transzlokációk létrehozása	27
2.4 Idegen fajú kromatin kimutatása búza genetikai háttérben	29
2.4.1 Molekuláris citogenetikai vizsgálatok	29
2.4.2 Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció repetitív próbákkal	30
2.4.3 Genomi <i>in situ</i> hibridizáció	31
2.4.4 Kromoszómák vizsgálata a meiózis I. metafázisában	32
2.4.4.1 Meiotikus kromoszómák vizsgálatára használt citogenetikai módszerek.....	32
3 ANYAG ÉS MÓDSZER	35
3.1 Növényi anyag.....	35
3.2 Keresztezések	36
3.3 Molekuláris citogenetikai vizsgálatok.....	37
3.3.1 Citológiai preparátumkészítés	37
3.3.2 Kromoszómaszám meghatározása Feulgen módszerrel	38
3.3.3 Próbajelölés.....	38
3.3.4 Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (FISH)	39
3.3.5 Genomi <i>in situ</i> hibridizáció (GISH)	40

3.4	Kromoszómapárosodási vizsgálatok	41
3.5	Üvegházi levéltrozsdafertőzés.....	41
3.6	Tenyészkeri megfigyelések	42
4	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	43
4.1	<i>Triticum monococcum</i> kromoszómák azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel	43
4.1.1	A <i>Triticum monococcum</i> faj kariotipizálása repetitív DNS próbákkal.....	43
4.1.2	<i>In situ</i> hibridizáció mikroszatellit próbákkal	46
4.1.3	Az A ^m genomanalízis vizsgálatok eredményeinek megvitatása.....	49
4.2	Interspecifikus hibridek kromoszómavizsgálatai a meiózis I. metafázisában.....	52
4.2.1	Meiotikus kromoszómák vizsgálata GISH-sel, búza × rozs F ₁ hibridekben	52
4.2.2	Meiotikus kromoszómák vizsgálata repetitív DNS próbákkal, búza × rozs F ₁ hibridekben	54
4.2.3	Búza-búza kromoszómakar-asszociációk típusa és gyakorisága.....	57
4.2.4	Meiotikus kromoszómák vizsgálata <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i> × <i>Triticum monococcum</i> F ₁ hibridben	59
4.2.5	A kromoszómapárosodási vizsgálatok eredményeinek megvitatása	62
4.3	<i>Triticum monococcum</i> kromatin tartalmú genetikai anyag előállítása	65
4.3.1	Génbanki <i>Triticum monococcum</i> tételek jellemzése	65
4.3.2	<i>Triticum aestivum</i> × <i>Triticum monococcum</i> keresztezések	67
4.3.2.1	F ₁ hibridek előállítása.....	67
4.3.2.2	Visszakeresztezés búzával	70
4.3.2.3	A BC ₃ növények tenyészkerti megfigyelése és üvegházi rozsdafertőzése	74
4.3.3	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i> × <i>Triticum monococcum</i> keresztezések	77
4.3.3.1	Szintetikus amfiploid előállítás	77
4.3.4	A <i>Triticum monococcum</i> -mal végzett interspecifikus keresztezés eredményeinek megvitatása	81
4.4	Az eredmények általános megvitatása	84
4.5	Új tudományos eredmények.....	87
5	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	89
6	ÖSSZEFOGLALÁS	91
7	SUMMARY.....	93
8	MELLÉKLETEK	95
M1	Irodalomjegyzék	95
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	115

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

DAPI: 4',6'-diamidino-2-fenilindol

FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció

FITC: fluoreszcein-5-izotiocianát

GISH: genomi *in situ* hibridizáció

RNase: ribonukleáz enzim

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SSC: nátrium-citrát / nátrium-klorid oldat

SSR: egyszerű szekvencia ismétlődés (**S**imple **S**equence **R**epeats) - mikroszatellit markerek

Tween: polioxietilén-szorbitán-monolaurát

1 BEVEZETÉS

A búza (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$; AABBDD) világviszonylatban a rizs után a második legfontosabb gabonaféle, szerepe az emberi táplálkozásban, illetve a takarmányozásban kiemelkedő. Világviszonylatban termése 2012-ben meghaladta a 650 millió tonnát. Magyarországon jellemzően a szántóterület negyedén, 1-1,1 millió hektáron termesztik, a megtermelt búza mennyisége 2012-ben 3,7 millió tonna volt. A világ népességének folyamatos növekedése, valamint az élelmezésben betöltött központi szerepe miatt a termés mennyiségének és biztonságának növelése elsődleges szempont a búzanemesítés számára. A termés biztonsága a biotikus és abiotikus stresszekkel szemben ellenálló fajták előállításával és termesztésével növelhető gazdaságosan. Az ellenállóképesség növelésének egyik lehetséges módja a rokon fajok agronómiailag hasznos génjeinek átvitele a búzába idegen fajú keresztezések révén.

A búzával rokon fajok egy része közismerten jó biotikus és abiotikus stressz rezisztenciával rendelkezik, de sok esetben beltartalmi értékeik miatt is fontos génforrások lehetnek a nemesítés számára. Az alakor (*T. monococcum* L.) az első *Triticum* faj, melyet kifejezetten élelmezési céllal termesztettek. A búzát fertőző legjelentősebb betegségeknek, a szár- és levélrozsdának, sárgarozsdának, valamint a lizstharmanak is ellenáll, de szárazságtűrése is kiemelkedő. Génforrásként alkalmazva sikeresen vitték át a *T. monococcum* gombabetegségek elleni rezisztenciáját a hexaploid búzába hagyományos keresztezéssel. Termesztése és tudatos nemesítése az utóbbi két évtizedben új lendületet kapott, elsősorban az ökológiai gazdálkodás keretei között. Mivel a faj gazdaságilag értékes tulajdonságokat hordoz a génbankokban őrzött tételei nagy jelentőségre tehetnek szert.

Az idegen fajú keresztezésekkel történő génátvitel hatékony módja lehet a rokon fajok hasznos agronómiai tulajdonságainak a búzába való átvitelének, mely egyben alternatívaként szolgálhat a genetikai transzformációval történő génátvitel mellett. A búzanemesítés gyakorlatában jelenleg a faj- és nemzetséghibridek létrehozásával végzett kromoszóma-kapcsolt génátvitel alkalmazása mondható társadalmilag és törvényileg elfogadottnak.

Az idegen kromoszómák átvitelének folyamatában a faj- és nemzetséghibridek létrehozását a búza szülővel történő sorozatos visszakeresztezés követi (back-cross módszer). A folyamat során szükség van az egyes generációkban az átvitt idegen kromoszómák (kromoszómaszegmentumok) kimutatására és azonosítására, melyre az egyik leghatékonyabban alkalmazott módszer a molekuláris citogenetika eszköztárába tartozó DNS *in situ* hibridizáció. A meghatározott szekvenciákat hordozó repetitív DNS próbákkal végzett fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) kromoszóma specifikus mintázatot eredményez a hibridek és származékainak kromoszóma

preparátumain, lehetővé téve ezzel a búza és az idegen kromoszómák azonosítását. A génátviteli munkákban használt fajok FISH kariotípusának ismerete megkönnyíti az idegen fajú kromoszóma átrendeződések és transzlokációk azonosítását, ami hozzájárulhat a hasznos agronómiai tulajdonságokért felelős kromoszóma régiók meghatározásához.

A keresztezhetőség mellett a kromoszóma-kapcsolt génátvitel fontos feltétele, hogy a búza és a *T. monococcum* kromoszómák párosodjanak, majd rekombinálódjanak egymással a meiózis folyamán, elősegítve ezzel a nem kívánatos idegen kromatin mennyiségének csökkentését és a hasznos agronómiai tulajdonságokat hordozó *T. monococcum* genomi régiók integrálását a búza genomba. A meiotikus kromoszómapárosodásból nyerhető információk maximalizálásához szintén kiváló módszertani lehetőséget nyújtanak az *in situ* hibridizációs módszerek.

1.1 Célkitűzések

Kutatásaink távlati célja a *T. monococcum* génállományának hatékony felhasználása a búzanemesítési programokban, amit a következő feladatok megvalósításával kívánunk elősegíteni:

- A *T. monococcum* kromoszómák búza genomban történő nyomon követését lehetővé tevő molekuláris citogenetikai módszerek fejlesztése és módosítása. E célból a *Triticeae* fajok genomanalíziséhez használt DNS *in situ* hibridizációs próbákkal azonosítjuk a *T. monococcum* kromoszómákat. A búza kromoszómáktól való pontosabb megkülönböztetés érdekében mikroszatellit szekvenciákból előállított FISH próbák segítségével kidolgozzuk a *T. monococcum* új kariotípusait. Az alkalmazott próbák kariotípusa alapján összehasonlító elemzést végzünk az A^m kromoszómák és a különböző di-, tetra- és hexaploid *Triticum* fajok A kromoszómái között.
- A nemesítési programokban is alkalmazható transzlokációk előfeltételeként, célunk a meiotikus kromoszómapárosodás vizsgálata a búza faj- és nemzetséghibridjeiben. A meiózis I. metafázisában történő párosodás egyedi kromoszómák szintjén történő elemzéséhez megvizsgáljuk a meiotikus kromoszómák fluoreszcens *in situ* hibridizációval történő azonosításának lehetőségét *Triticum aestivum* × *Secale cereanum* F₁ hibrideken. Az így kidolgozott módszerekkel vizsgáljuk a *T. turgidum* subsp. *durum* × *T. monococcum* F₁ hibridek kromoszómapárosodását.

- Vizsgáljuk a *T. monococcum* keresztezhetőségét tetra- és hexaploid *Triticum* fajokkal. A *T. monococcum* előnemesítésben történő hasznosításra kétféle növényi anyagot állítunk elő. A *T. aestivum* × *T. monococcum* keresztezésekből származó utódok visszakeresztezésével olyan genotípus előállítása a célunk, mely alkalmas a kenyérbúza nemesítésében történő közvetlen felhasználásra és hordozza a *T. monococcum* kiváló rezisztenciáját. Durumbúzával keresztezve célunk az ABA^m genomösszetételű szintetikus amfiploid előállítása, nemesítése, illetve (elő-) nemesítési programokba történő bevonásával búza-alakor rekombinánsok előállítása.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A búza evolúciója

2.1.1 A hexaploid búza kialakulása

Az 1900-as évek eleje óta ismert, hogy a termesztett búza és a *Triticeae* nemzetségcsoportba tartozó fajok mindegyike azonos alap kromoszómaszámmal rendelkezik, mely $n=1x=7$ (Sakamura 1918). A nemzetségcsoportba tartozó fajok közös őstől eredeztethetőek, melyből a különböző genomokkal rendelkező fajok szétválása hozzávetőleg 1-3 millió évvel ezelőtt történt meg (Gill et al. 2007). A *Triticum* nemzetségbe diploid (*T. monococcum* L., *T. urartu* L., $2n=2x=14$, $A^m A^m$, vagy AA), tetraploid (*T. turgidum*, $2n=4x=24$, AABB, *T. timopheevii*, $2n=4x=24$, AAGG) és hexaploid (*T. aestivum*, $2n=6x=42$, AABBDD, *T. zhukovsky*, $2n=6x=42$, AAGGA^mA^m) búzafajok tartoznak.

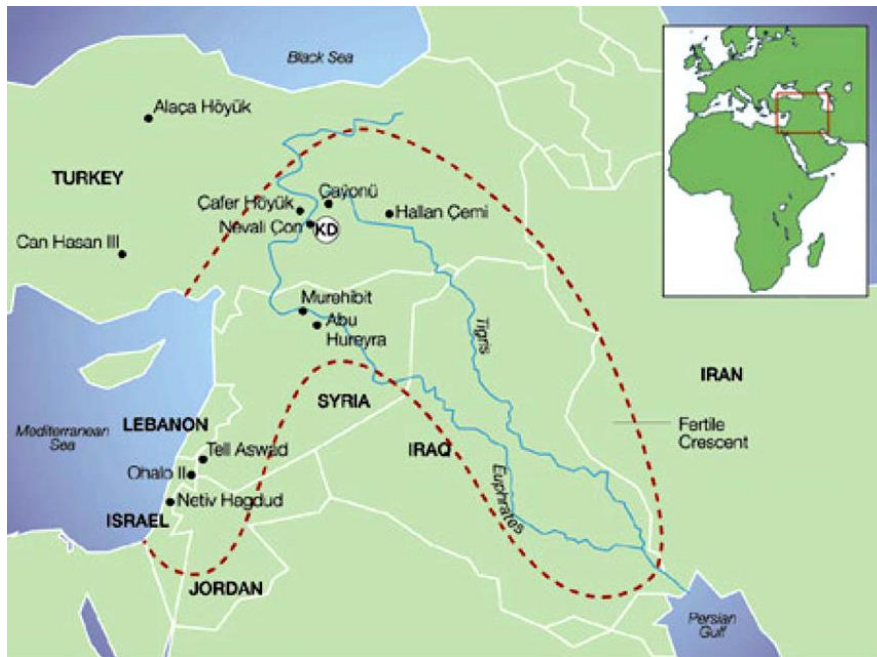
A hexaploid búza (*Triticum aestivum* L.) A, B és D genomjainak donorjai diploid *Triticum* és *Aegilops* fajok (Kihara 1924). Az A genom diploid őse a *T. urartu* (Chapman et al. 1976, Dvořák et al. 1993). A B genom őse pontosan nem ismert, de morfológiai (Sarkar és Stebbins 1956) és molekuláris genetikai (Dvořák és Zhang 1990, Tsunewaki 2009) vizsgálatok az *Aegilops* nemzetség *Sitopsis* szekciójába tartozó *Aegilops speltoides* Tausch. ($2n=2x=14$, SS) S genomjával mutatták ki a legnagyobb hasonlóságot. Eddigi ismereteink szerint természetes hibridizációjuk 100 000-500 000 évvel ezelőtt történt, ezt az időpontot erősítették meg Huang et al. (2002) is, akik a kloroplasztisz genomban kódolt *ACC-1* (acetil-CoA karboxiláz) és *Pgk-1* (3-foszfoglicerát kináz) gének szekvenciái alapján végeztek filogenetikai összehasonlító vizsgálatokat a hexaploid búza és diploid genom donor fajai között. Az első hibridizációs lépés eredményeképpen jött létre a vad tönke (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides* Körn. ex Asch. & Graebn.).

A tetraploid vad tönke kialakulása legnagyobb valószínűséggel egy lépésben történt, a kromoszómák megkettőződése pedig a diploid ősök ivarsejteiben vagy pedig a létrejött F₁ hibridekben történhetett. Jauhar (2003) ez utóbbit tartja kézenfekvőnek, mivel redukálatlan ivarsejtek nagyobb valószínűséggel fordulnak elő F₁ hibridekben, mint a szülői diploid fajokban. Az ősi földművesek a vad tönkét kb. 10 000 évvel ezelőtt vonták termesztésbe, ami a termesztett változatok, a durumbúza (*T. turgidum* subsp. *durum* L.) és a termesztett tönke (*T. turgidum* subsp. *dicoccum* L.), megjelenéséhez vezetett (Salamini et al. 2002, Gill et al. 2007, Charmet 2011).

Ezt követően újabb spontán kereszteződés történt a tetraploid durumbúza és a diploid kecskebúza, az *Aegilops tauschii* Coss. ($2n=2x=14$, DD) között (McFadden és Sears 1946), hozzávetőleg 8 000 évvel ezelőtt (Huang et al. 2002), ami a hexaploid búza kialakulásához vezetett. Matsuoka és

Nasuda (2004) szerint a hibridizáció eredményeképp először triploid ABD hibrid jöhetett létre, melynek nő- és hímiversejtjei redukálatlan kromoszómaszámmal rendelkeztek, így hexaploid szemeket eredményeztek, hasonlóan a tetraploid *Triticum* fajok kialakulásához.

A *Triticum* fajok származási helye a „Termékeny Félhold”-nak is nevezett terület a Közel–Keleten (1. ábra), amely magába foglalja a Földközi-tenger keleti, Törökország délkeleti részét, Észak-Irakot, Irán nyugati részét, és a szomszédos régiókat a Kaukázusban és Észak-Iránban.



1. ábra. A Termékeny Félhold a Közel-Keleten, a *Triticum* fajok származási helye. A KD jelzés a Karacadağ hegységet jelöli, ahol a di- és tetraploid *Triticum* fajok domesztikációja történt (Salamini et al. 2002 nyomán)

2.1.2 Az allopoliploidizáció genetikai hatásai

Az allopoliploidizáció hatására az amfiploidban két vagy több különböző genom egyesül. A folyamat hatására kétféle változás történt az így keletkezett növényfaj, többek közt a búza genomjában is. Azonnali változások indukálódtak a létrejött amfiploidban („forradalmi” változások), melyek genetikai és epigenetikai változásokat hoztak magukkal. Az „evolúciós változások” a faj élete során történnek, ez esetben az allopoliploid állapot segít elő a genomban olyan változásokat (például intergenomikus kromoszómaátrendeződések), melyek diploid szinten nem történhetnek meg (Feldman et al. 2012).

Az úgynevezett „forradalmi” változások citológiai diploidizációt okoznak azáltal, hogy a hibridizációt követően a nem kódoló DNS szekvenciák eliminálódnak. Ennek hatására növekszik a homeológ genomok közötti genetikai különbség, ami elősegíti az allopoliploid fajokban a

diploidokra jellemző homológ kromoszómapárosodást a meiózis során (Feldman et al. 1997). AFLP vizsgálatok bizonyítják, hogy ez a folyamat természetes körülmények között létrejött és mesterségesen létrehozott amfiploidokban egyaránt lejátszódik (Ozkan et al. 2001, Kashkush et al. 2002). A kromoszóma- vagy genom specifikus szekvenciák eliminálódása már a hibridizációt követő első generációban elkezdődik, és a második, harmadik generáció során befejeződik. Megfigyelték azt is, hogy ez a folyamat lassabban játszódik le olyan amfiploidok esetében, amelyek a természetben nem fordulnak elő (Ozkan et al. 2001).

Az újonnan létrejött allopoliploidban több különböző genom „találkozik”, mely azonnali genetikai és epigenetikai változásokat indukál a génműködés harmonizációja céljából. Több genom együttes jelenléte ugyanis mind pozitív, mind negatív hatásokat okozhat. A funkcionális fehérjéket kódoló gének háromszoros mennyiségben fordulnak elő az allohexaploid búzában, anélkül, hogy zavart okoznának, az összes duplikált gén (pl. tartalék fehérje gének, tRNS gének) aktiválódása azonban felesleges és sok esetben hatástalan lenne (Feldman és Levy 2009). Az allopoliploidok génharmonizációja gének eliminációjában, funkcióváltozásban (neofunkcionalizáció), dózishatásban, illetve géncsendesítésben/génaktiválásban (Kashkush et al. 2002, Feldman és Levy 2009) nyilvánul meg. Az inter-genomikus génkölsönhatások olyan új, adaptív tulajdonságokat is eredményezhetnek, amelyek a diploid szülőkben nem voltak meg. Erre példa a tetraploid vad tönke nagyobb termékenysége, ami a *T. urartu* nagy kalászonkénti kalásczszámának és a durumbúza több fertilis virágának kombinációjából származik. A hexaploid búza jó sütőipari minősége is a három genom közreműködésével meghatározott sikértulajdonságoknak köszönhető, ami csak hexaploid szinten nyilvánul meg (Feldman 2000, Feldman és Levy 2009). Ezek a funkcionális változások az amfiploid genetikai diploidizációját okozzák. Mindezek a változások az újonnan létrejött allopoliploid stabilizálását és a természetben új fajként való meghonosodását segítik elő.

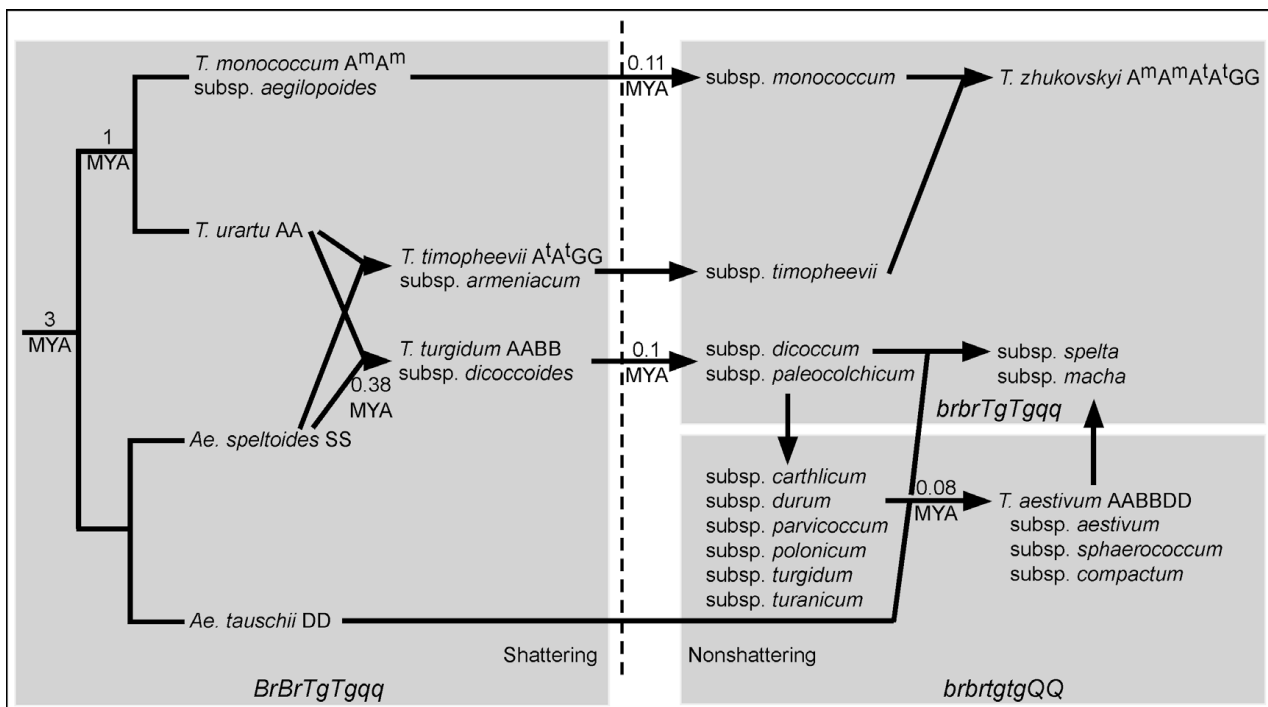
Az evolúciós változások azon alapulnak, hogy két vagy több különböző genom együttes jelenléte teszi lehetővé az intergenomikus transzlokációk, rekombináns genomok létrejöttét (Levy és Feldman 2002; Feldman és Levy 2005, 2009). Citogenetikai tanulmányok támasztják alá, hogy az intergenomikus transzlokációk kialakulása nagyon gyakori az allopoliploid *Triticum* és *Aegilops* fajokban (Belyayev et al. 2000, Badaeva et al. 2007, Molnár et al. 2011).

2.1.3 A domesztikációval kapcsolatos változások

A búza a domesztikációt megelőzően és a termesztésbe vonása során számos, mutációk által kiváltott változáson esett át, melyek megváltoztatták a kalász morfológiai tulajdonságait.

A vad fajokra jellemző törékeny kalászorsó a természetben való fennmaradást szolgálja. Monogénes tulajdonság, amit a *Br* gén határoz meg (Doebley et al. 2006, Li és Gill 2006), a *br* allél mutáció hatására alakult ki, és elterjedése még nem tudatos szelekciós tevékenység következménye (Charmet 2011). A csupasz szem kialakulását két gén mutációja okozta: a *T. monococcum*-ban a *Sog* (soft glume, puha pelyvalevél), a *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*-ben pedig a *Tg* (tenacious glume, kemény (erős) pelyvalevél) gén (Doebley et al. 2006, Sood 2009). Mindezek mellett a tetraploid- és hexaploid búza evolúciójának rendkívüli sikerét a *Q* mutáció (*Q* allél) okozta. A *Q* allél pleiotróp hatást fejt ki a pelyvalevek alakjára és textúrájára, valamint a kalász alakjára; a mutáció hatására létrejött növény kalásza hasábos alakú, a kalászkákban több virág található, ami terméshozadékot okoz (Faris et al. 2003, Charmet 2011).

A *Q* mutáció legnagyobb valószínűséggel egy olyan tetraploid *Triticum* fajban történt, amely nem törékeny kalással, puha pelyvalevelekkel és speltoid jellegű kalással (*br1br1tgTgq*) rendelkezett (Faris et al. 2003). A *Tg* és *Q* génben történt mutáció együttes hatása a búza csépelhetősége. A folyamatot a 2. ábra szemlélteti. A búza vad diploid és tetraploid rokon fajai mind *BrBrTgTgq* genotípussal rendelkeznek (Gill et al. 2007).



2. ábra Vad és termesztett diploid, tetraploid és hexaploid búzafajok eredete, főbb evolúciós időpontjai a domesztikációt befolyásoló gének feltüntetésével (*Br*=törékeny kalászorsó, *br*= nem törékeny kalászorsó;

Tg vagy *Sog*=kemény pelyvalevél, *tg* vagy *sog*=puha pelyvalevél; *q*=speltoid jellegű kalász, nem csépelhető; *Q*= hasábos típusú kalász, csépelhető). MYA=millió évvel ezelőtt (million years ago) (Gill et al. 2007 nyomán)

A domesztikációt követően a búza széles körű elterjedését a különböző klimatikus viszonyokhoz való alkalmazkodóképesség segítette elő. Az alkalmazkodóképesség jelentős részben a vernalizációs és fotoperiódusos igény változatosságára vezethető vissza (Ortiz-Ferrara et al. 1995), mivel mindkét tényező fontos szerepet játszik a búza kalászképződésében, így meghatározó jelentőségű a reprodukció szempontjából. A domesztikációt követően az első kalászosok az őseik vernalizációs és fotoperiódusos igényével rendelkeztek, majd a faj elterjedése során az új környezethez való alkalmazkodás új, adaptív tulajdonságokat igényelt. Ennek kulcsfontosságú eseménye volt a tavaszi típus kiszelektálódása (Peng et al. 2011). A tavaszi típusú búzáknak nincs vernalizációs igényük, vagy csak kismértékben van szükségük erre a generatív szakaszba történő átmenethez. A vernalizációs igényt nagyhatású gének szabályozzák (*Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3*, *Vrn4*), a recesszív genotípusok érzékenyek a vernalizációra míg a domináns allél részlegesen vagy teljesen gátolja ezt az igényt (Pugsley 1972). A faj elterjedését ezenkívül a *Ppd* gének által szabályozott nappalhossz érzékenységekben bekövetkező változatosság is segítette (Peng et al. 2011).

2.2 A búza génforrásai

A búza génforrásai közé tartozó fajok genomösszetételük alapján három csoportba sorolhatók (Friebe et al. 1996):

- Elsődleges génforrások közé tartoznak azok a fajok, melyek genomja (A, B, D) homológ a hexaploid búzával. Ide sorolhatók a tetraploid *Triticum* fajok vad és termesztett alfajai (pl. *Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccoides* (Korn. ex Asch. & Graebner) Thell.; *Triticum turgidum* L. subsp. *carthlicum* (Nevski in Kom.) Á. Löve & D. Löve ; valamint az A és D genomok diploid ősei, a *T. urartu* Tumanian ex Gandilyan és *Ae. tauschii* Coss..

Ebbe a kategóriába sorolható *T. monococcum* vad (*Triticum monococcum* L. subsp. *aegilopoides* (Link) Thell.) és termesztett alfaja (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) is, mely a *T. urartu*-hoz hasonlóan szintén A genommal rendelkezik. Az e fajokból történő génátvitel közvetlen keresztezéseken, homológ rekombináción, visszakeresztezéses módszeren és szelekción alapszik.

- Másodlagos génforrásoknak tekinthetők azok a poliploid *Aegilops* és *Triticum* fajok, melyeknek legalább egy genomja homológ a búzáéval. Ebbe a kategóriába sorolhatóak az *Aegilops* nemzetség *Sitopsis* szekciójába tartozó fajok (pl. *Aegilops speltoides* Tausch. és *Ae. longissima* Schweinf. & Muschl.), melyek S genomja mutatja a legnagyobb homológiát a termesztett búza B genomjával. Szintén a másodlagos génforrásokhoz tartoznak a

tetraploid *T. timopheevii* (AAGG) vad (*Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. subsp. *armeniicum* (Jakubz.) MacKey) és termesztett (*Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. subsp. *timopheevii*) alfajai, valamint, a hexaploid *T. zhukovsky* (AAGGA^mA^m).

A másodlagos génforrások búzanemesítésben történő felhasználása sokkal korlátozottabb, gyakran embriótenyésztés alkalmazása szükséges az utódok fenntartása érdekében.

- A harmadlagos génforrások csoportjába azok a diploid és poliploid fajok tartoznak, melyek genomjai nem homológok a búzáéval (például *Secale*, *Hordeum*, *Agropyron* fajok).

E fajokból a génátvitel már rendkívül bonyolult, nagyon ritka a párosodás a nem homeológ genomok kromoszómái között és embriótenyésztés alkalmazása szükséges.

Mint az a fentiekből is kitűnik, az előnemesítési programokba az elsődleges génforrások csoportjába tartozó fajok illeszthetők be a legkönnyebben, hiszen esetükben speciális biotechnológiai technikák alkalmazása nélkül is előállíthatók fertilis utódok.

A *Triticum* nemzetség mindössze 6 fajt tartalmaz, ezek a következők: *Triticum monococcum* L. ($2n=2x=14$; A^mA^m); *Triticum urartu* Tumanian ex Gandilyan ($2n=2x=14$; A^uA^u); *Triticum turgidum* L. ($2n=4x=28$; AABB); *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. ($2n=4x=28$; AAGG); *Triticum aestivum* L. ($2n=6x=42$; AABBDD); és *Triticum zhukovskyi* Menabde & Ericzjan ($2n=6x=42$; AAGGA^mA^m). E hat faj három, diploid, tetraploid és hexaploid szekcióba csoportosítható ploid szintje alapján (van Slageren 1994). A hat *Triticum* faj közül a *Triticum urartu* csak vad, a közönséges búza (*T. aestivum*) és a *T. zhukovsky* csak termesztett formában fordul elő. A *T. monococcum*, a *T. turgidum* és a *T. timopheevii* fajoknak egyaránt fellelhetők vad és termesztett alfajai is.

2.2.1 A *Triticum monococcum* származása, elterjedése

Az alakor (*Triticum monococcum*; $2n=2x=14$, A^mA^m) az árpa, borsó és lencse mellett egyike az úgynevezett „alapító növények”-nek, melyek az új kőkorszakban elindították a tudatos fölművelést (Zohary és Hopf 1993), és egyike az első kalászos növényeknek, melyeket kifejezetten élelmezési céllal termesztettek (Monneveux et al. 2000). Származási helye a Közel-Keleten található „Termékeny Félhold”-nak nevezett terület (1. ábra). Az alakor A^m genomja szoros kapcsolatban áll a *T. urartu* A^u genomjával, szétválásuk 0,5-1 millió évvel ezelőtt történhetett (2. ábra). Domesztikációja egy vad ősből történt a dél-kelet törökországi Karacadağ hegységben (Heun et al. 2008) hozzávetőleg 10 000 évvel ezelőtt (Zohary 1999, Charmet 2011). Az alakornak két alfaja van: a vad alakor (*T. monococcum* subsp. *aegilopoides*, $2n=2x=14$, A^bA^b) és a termesztett alakor (*T.*

monococcum subsp. *monococcum*, $2n=2x=14$, $A^{m}A^{m}$). A termesztett alakor három jelentős tulajdonságban különbözik a vad alfajtól: 1. szemtermése nagyobb és teltebb ; 2. erős kalászorsója van, mely éréskor sem törik, így megakadályozza, hogy a kalászkák éréskor szétszóródjanak; 3. a vad fajnál könnyebben csépelhető (Salamini et al. 2002).

A domesztikációt követően az alakor elterjedt az egész Közel-Keleten, a Kaukázuson túli területeken, a Mediterrániumban és a Balkánon is (Perrino et al. 1996). Termesztésének jelentősége a Bronzkor (ie. 3500–ie.1200) után jelentősen csökkent a nagyobb termőképességű és csépelhető tetraploid és hexaploid búzák térhódításával párhuzamosan. Tudatos nemesítése csak a XX. sz. végén indult meg. 2013-as adatok alapján az Európai Unióban mindössze 13 elismert és elismerés alatt álló alakor fajta van (forrás: CPVO-Közösségi Növényfajta-hivatal).

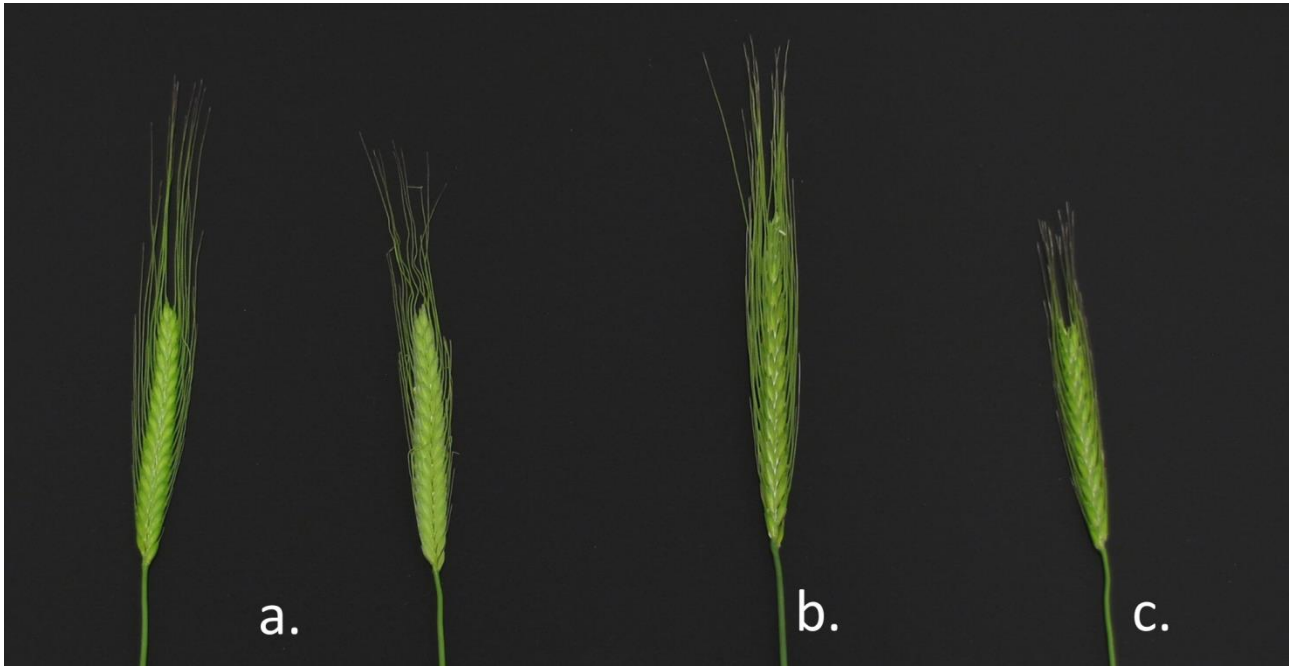
A vad alakornak a domesztikációt megelőzően három változata volt (α , β és γ), melyek elkülönítése genetikai és morfológiai polimorfizmuson alapul (Kilian et al. 2007). Ezek közül a β változatot aknáztta ki az emberiség az alakor termesztésbe vonása során. Kilian et al. (2007) vizsgálataikban arra a következtetésre jutottak, hogy a termesztett alakor genetikai diverzitása nagyobb, mint a β típusú vad testvér-csoporté. Régészeti leletek azt bizonyítják, hogy ez a vad alakor rassz már korábban elterjedt, majd ennek különböző genotípusai voltak összehangolt és tudatos beavatkozás nélkül a többszörös, egymástól független domesztikációs események alanyai vagyis az alakor domesztikációja, más növényfajokkal ellentétben nem járt együtt a diverzitás csökkenésével.

Az 1970-es években egy génbanki alakor tételben csupasz szemű diploid *Triticum* fajt azonosítottak, melyet az alakor természetes csupasz mutánsának és *Triticum sinskajae* Filat. et Kurk. néven önálló fajnak tekintenek (Goncharov et al. 2007). Jelentősége elsősorban csupasz alakor előállítását célzó nemesítési programokban (Frégeau-Reid és Abdel-Aal 2005) van.

A magyar alakorkutatásban Szabó T. Attila munkája kiemelkedő jelentőségű, mind az erdélyi alakorok gyűjtésével, mind az alakor taxonómiájával kapcsolatban.

Az alakor rendkívül kis területen való termesztése miatt, génforrásként elsősorban a génbankokban őrzött tételei jöhetnek számításba, habár a pelyvás kalászosok közül a különböző alakor genotípusok génbanki tételeinek száma a legkisebb (Perrino et al. 1996). Az európai génbankok *Triticum* fajokat tartalmazó adatbázisa (European Wheat Database) szerint Európában a legnagyobb *T. monococcum* gyűjtemény – 608 tétel – Olaszországban található (ISC S. Angelo Lodigiano), jelentős *T. monococcum* kollekción (285 tétel) található Törökországban (AARI, Izmir), Németországban (145 tétel IPK, Gatersleben; 285 tétel FALP, Braunschweig), Oroszországban (104 tétel VIR, Szentpétervár). Magyarországon a tápiószelei Növényi Diverzitás Központban 34 alakor tételt őriznek (European Wheat Database). Az MTA ATK Mezőgazdasági Intézetének Gabona Génbankjában 292 *T. monococcum* tétel található, melyek közül 218 *T. monococcum* subsp.

monococcum (termesztett alakor) és 74 *T. monococcum* subsp. *aegilopoides* (vad alakor); emellett 19 tételből álló *T. urartu* gyűjteménnyel is rendelkezik a génbank (3.ábra).



3. ábra Diploid *Triticum* genotípusok, a: különböző *T. monococcum* subsp. *monococcum*- termesztett alakor tételek; b: *T. monococcum* subsp. *aegilopoides* - vad alakor; c: *T. urartu*

A *T. monococcum*-mal folytatott kutatások alapvetően a génbanki tételekre alapozhatók, ezért e genotípusok jellemzésével világszerte sok kutatócsoport aktívan foglalkozik. A génbanki tételek jellemzésének célja lehet új génforrások azonosítása, de alapját jelentheti a *T. monococcum* genotípusok közvetlen felhasználásának is. A *T. monococcum* génbanki tételek jellemzése értékes információkat szolgáltat a genotípusok agronómiai és minőségi tulajdonságairól (Vallega 1992, Moudrý et al. 2011), azonosítottak olyan genotípusokat, melyek előnyös agronómiai tulajdonságokat (korai kalászás, alacsony növénymagasság) hordoznak (Castagna et al. 1996, Empili et al. 2000), de ismertek kiváló levélrozda rezisztenciával rendelkező tételek is (Hammer et al. 1996). Más betegségek, pl. szártörő gomba (*Tapesia yallundae*) tekintetében is jelentős eltéréseket találtak nagyszámú *T. monococcum* vizsgálata során (Cadle et al. 1997).

2.2.2 A *Triticum monococcum*, mint génforrás

2.2.2.1 A *Triticum monococcum* a minőségi tulajdonságok kutatásában

Az alakor napjainkban lokálisan előforduló növényfaj, termesztése Európában és Indiában főként olyan régiókban maradt fenn, ahol tradicionális termékek előállítására használják. Spanyolország,

Franciaország és Olaszország egyes területein szemterméséért termesztik hagyományos kenyerek és száraztészták előállítására, valamint takarmányozási célból (Laghetti et al. 2009). Erdélyben a szalmáját is felhasználják szalmakalapok készítéséhez, emellett ősi lepényféléket, pogácsát sütnek belőle. Az Erdélyben gyűjtött változat emellett jobban csépelhető. A különböző termesztési területein számos változata maradt fenn (Szabó T. és Hammer 1995).

Hagyományos termesztési körzeteiben intenzív kutatások folynak az alakor sütőipari minőségével, beltartalmi paramétereivel kapcsolatban. Jellemzően nagy karotin- és fehérjetartalommal rendelkezik (D'Egidio et al. 1993, Borghi et al. 1996, Brandolini et al. 2008), antioxidáns (lutein, β -tokotrienol, α -tokotrienol, α - és β -tokoferol) tartalma szintén kiemelkedő (Hidalgo et al. 2006) ezáltal funkcionális élelmiszerek alapanyagául szolgálhat. Felhasználható a búza sütőipari minőségének módosítására is, amit az is bizonyít, hogy *T. monococcum* subsp. *aegilopoides* fajból vittek át hexaploid búzába HMW glutenin alegységeket kódoló alléleket (*Glu-A1r* és *Glu-A1s*). A hexaploid búza *Glu-A1* allélja nulla vagy egy alegységet kódol, a *Glu-B1* és *Glu-D1* pedig maximum kettőt. A Rogers et al. (1997) által létrehozott törzsek a *Glu-A1r* és a *Glu-A1s* révén hat HMW glutenin alegységet kódolnak. A *Glu-A1r* csökkenti a tészta ragadosságát és javítja a stabilitását, a *Glu-A1s* pedig a siker erősségét befolyásolta kismértékben pozitív irányba.

2.2.2.2 A *Triticum monococcum* a rezisztencianemesítésben

A búzanemesítés egyik legfontosabb célja a betegség ellenállóságra történő nemesítés, hiszen a rezisztens fajták használata növeli leginkább a búzatermesztés biztonságát és gazdaságosságát. A fajták rendszeres cseréjét az új, virulens gomba patotípusok megjelenése is feltétlenül szükségessé teszi (Láng és Bedő 2006). Magyarországon a búza rezisztenciakutatásokban fontos szerepe van a rozsdabetegségek elleni rezisztenciára történő nemesítésnek. Mindhárom rozsdafajjal kapcsolatban megállapítható, hogy hatékony rezisztenciagének a búzával rokon és vad fajokból vihetők át (Purnhauser 2006). A *T. monococcum* ellenállósága a különféle gombabetegségekkel szemben kiemelkedően jó. Számos példa bizonyítja az alakor kiváló rezisztenciájának átvitelét a hexaploid búzába (Monneveux et al. 2000).

A búza legjelentősebb rozsdabetegsége hazánkban a levélrozsa (*Puccinia triticina*). Termesztett és vad alakorból egyaránt vittek át levélrozsa rezisztenciagént a búzába (Hussien et al. 1997), melyeket az 1A, 5A és a 6A kromoszómákon lokalizáltak (Hussien et al. 1998). Több száz vad és termesztett alakor, illetve *T. urartu* génbanki tétel levélrozsa rezisztenciáját tanulmányozta Anker és Niks (2000) és megállapították, hogy a legnagyobb számban a termesztett alakorok közt találhatóak rezisztens genotípusok. A *T. monococcum* fajban található rezisztenciagének eredetét kutatva Bai et al. (1998) eltérő földrajzi helyekről származó genotípusok diallél keresztezésével

létrehozott populációiban nem találtak levélrozsdára fogékony utódokat, amit közös gén jelenlétével magyaráztak. Több genotípus levélrozsdá rezisztenciáját tanulmányozva nagyon csekély mértékű diverzitást figyeltek meg a levélrozsdá fertőzésre adott válaszreakciókban, így szerintük a génátviteli munkák során célszerű csak néhány genotípust használni.

Jelentős szerepet játszhat az alakor a szárrozsdának (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) ellenálló búza genotípusok előállításában. Szárrozsdá rezisztenciáért felelős géneket (*Sr21*, *Sr22* és *Sr35*) azonosítottak *T.monococcum*-ban (Kerber és Dyck 1973, The 1973, McIntosh et al. 1984) és vittek át sikeresen búzába (Valkoun et al. 1989). Az alakor szárrozsdá rezisztenciaforrásként való fontosságát alátámasztja, hogy nagy számban azonosítottak a napjainkban jelentős Ug99 razzsal szemben ellenálló *T. monococcum* genotípusokat (Rouse és Jin 2011), illetve a *T. monococcum*-ban található *Sr35* gén Ug99-el szembeni rezisztenciával bír (Saintenac et al. 2013).

Hazánkban kisebb jelentőségű, de hűvös és csapadékos tavaszokon időnként járványt okozó rozsdabetegség a sárgarozsdá (*Puccinia striiformis*). Ma et al. (1997) a *T. monococcum* természetű és vad változataiban, valamint ABA^m genomösszetételű amfiploidokban vizsgálta a sárga rozsdá elleni rezisztenciát, melynek eredményeként számos rezisztenciaforrást azonosított. A későbbiekben Chhuneja et al. (2008) sárgarozsdával szemben ellenálló vad és természetű alakor genotípusok felhasználásával rekombináns vonalakat hozott létre, melyek felhasználásával és SSR és RFLP markerek segítségével sárgarozsdá-rezisztenciáért felelős lokuszokat térképezett a természetű alakor 2A és a vad alakor 5A kromoszómáján.

Az alakor fontos szerepet játszik lisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) ellenálló búza genotípusok előállításában. Vad alakorból vitték át hexaploid búzába az 1A kromoszómán található *Pm25* lisztharmat-rezisztencia gént (Shi et al. 1998). Ellenálló *T. monococcum* genotípusokon SSR, STS és EST markerekkel végzett vizsgálatok segítségével azonosították az *Mlm2033* és *Mlm80* rezisztenciagéneket a 7A kromoszómán, melyek nagy valószínűséggel részét képezik a *Pm1* rezisztencia lokuszoknak (Srnić et al. 2005, Yao et al. 2007). Recesszív lisztharmat-rezisztencia gént (*pm2026*) azonosítottak *T. monococcum*-ban és SSR és RFLP markerekkel az 5A kromoszóma hosszú karján lokalizálták (Xu et al. 2008).

Gombabetegségekkel szembeni rezisztenciája mellett az alakor abiotikus stresszekkel szembeni ellenállósága kiemelkedő, számos genotípus kiváló szárazságtűréssel rendelkezik (Jing et al. 2007).

2.2.3 A *Triticum monococcum* genomösszetételének vizsgálata

A hexaploid búza genetikai kutatásait nagyban megnehezíti a búza nagy (16 700 Mb) genommérete, a három homeológ genom jelenléte és a repetitív szekvenciák nagy részaránya (Bennett és Leitch 1995). A búza genomok diploid donorfajainak, mint modellfajok alkalmazásával a strukturális és

funkcionális genomikai kutatásokban feltett kérdések egyszerűbben megközelíthetőek. Az alakor, mint diploid faj a búzához képest viszonylagosan kis genommérettel (5 600 Mb) rendelkezik (Furata et al. 1986), ami miatt az utóbbi időben egyre jelentősebb szerepet tölt be a búza genomikai kutatásokban.

A termesztett és vad *T. monococcum* közti nagyfokú polimorfizmusra alapozva térképezési populáció létrehozásával készítették el az alakor RFLP markereken alapuló genetikai térképét Dubcovsky et al. (1996). Ezt felhasználva térképezték a vernalizációs igény meghatározásáért felelős (*Vrn*) géneket (Dubcovsky et al. 1998). A későbbiekben a PCR alapú markerek elterjedésével szükségessé vált a korábbi RFLP alapú térképek átkonvertálása olyan genetikai térképekké, melyek elkészítéséhez PCR alapú markereket alkalmaztak. Ezzel összefüggésben Kojima et al. (1998) a *T. monococcum* olyan kapcsoltsági térképét állították elő, mely egyaránt tartalmazott RFLP, továbbá PCR alapú ISSR és RAPD markereket. Martonvásári kutatók fagyérzékeny és jó fagyűrő képességű alakorokból létrehozott térképezési populáció segítségével azonosították az 5A^m kromoszómán a fagyállóságért felelős *Fr-A2* lokuszt (Vágújfalvi et al. 2003). Ez a térképezési populáció a továbbiakban is a fagyállóság genetikai hátterével kapcsolatos kutatások alapjaként szolgált (Miller et al. 2006).

A DV92 *T. monococcum* genotípus felhasználásával hozták létre az A genom BAC könyvtárát (Lijavetzky et al. 1999), mely megkönnyíti a gének térképezésén alapuló pozicionális klónozását. A DV92 BAC könyvtár felhasználásával izolálták a búza vernalizációs igényének meghatározásában központi szerepet játszó *Vrn1* gént (Yan et al. 2003), búza 1A kromoszómáján található *Lr10* levélrozda rezisztenciagént (Feuillet et al. 2003), valamint a búza domesztikációjában nagy szerepet játszó *Q* gént (Faris et al. 2003). *T. monococcum* térképezési populáció és BAC könyvtár felhasználásával térképezte Tranquilli et al. (1999) a búza szemkeménységért felelős géneket.

2.2.4 A *Triticum monococcum* fajjal végzett keresztezések

A *Triticum* fajokkal végzett első keresztezésekkel egy időben az alakorral is megkezdődött a keresztezhetőség tanulmányozása. Elsőként Beijerinck (1884) állított elő hibridet *T. turgidum* subsp. *dicoccum* × *T. monococcum* kombinációjából és hozzá hasonlóan tetraploid *Triticum* fajok és alakor keresztezéseiből származó utódokat sikerült létrehozni Biffennek (1905). Fertilis növényeket elsőként Blaringham (1914) tudott felnevelni *T. monococcum* × *T. turgidum* subsp. *durum* kombinációból származó szemekből. Ezek rozsa ellenállósága hamar ismertté vált a nemesítők körében, azonban kis termőképessége nem tette lehetővé a fajhibrid elterjedését (lásd Belea et al. 2005). Orosz kutatók (Vavilov, Jakuskina) a XX. sz. első felében szintén nagy számban

végeztek keresztezéseket a *Triticum* fajok között (Rajháthy 1955) és *T. monococcum* × *T. carthlicum* keresztezésből sikerült fertilis F₄ törzseket előállítaniuk.

Magyarországon *T. monococcum* fajjal végzett keresztezésekről először Rajháthy (1954) számolt be, kísérleteiben a különböző ploidszintű *Triticum* fajok keresztezhetőségét és genetikáját vizsgálta. Az általa Martonvásáron elkezdett munkát Belea (1976, 1986, 2005) folytatta. Evolúciógenetikai és gyakorlati (rezisztencia) célú kutatásai során számos *Triticum* és *Aegilops* faj keresztezhetőségét vizsgálta. Tetra- és hexaploid *Triticum* fajokkal végzett keresztezései eredményeként az alakor nehéz keresztezhetőségéről számolt be. A felsorolt kutatókon kívül hazánkban Kiss Árpád (1968) foglalkozott *T. monococcum* és rozs keresztezésével tetraploid tritikálé előállítása céljából.

A *T. monococcum*-ból történő génátvitel klasszikus keresztezési eljárással többféleképpen lehetséges. Az alakor közvetlen keresztezése tetraploid és hexaploid búzafajokkal és az F₁ hibridek visszakeresztezése hatékony módszere a rekombináción alapuló génátvitelnek, amit a Vardi és Zohary (1967) valamint a The és Baker (1975) kromoszómapárosodási adatokkal is alátámasztott. Jó eredményeket értek el autotetraploid *T. monococcum* (2n=28) és a *T. aestivum* közötti keresztezéssel, ami sikeresebbnek bizonyult, mint a diploid *T. monococcum* és a hexaploid búza közötti keresztezés (Belea 1986, Dyck és Bartos 1994).

A génátvitel lehetséges módja még az AABBBA^mA^m genomösszetételű szintetikus hexaploidok létrehozása, ahol a szintetikus amfiploid hídként szerepelhet a génforrásként szolgáló *T. monococcum* és a hexaploid búza között. A világ egyik legnagyobb gabonanemesítő programját végző CIMMYT-nél nagy számban végeztek keresztezéseket AABBAA genom összetételű szintetikus hexaploid előállítása céljából és ennek során a *T. turgidum*-ot A genommal rendelkező diploid fajokkal kombinálták (Mujeeb-Kazi és Hettel 1995). E munka keretében 154 különböző törzset hoztak létre durumbúza és A genommal rendelkező diploid genotípusok keresztezésével (*T. monococcum* subsp. *monococcum* és subsp. *aegilopoides*, *T. urartu*). Hasonlóan ABA genommal rendelkező szintetikus hexaploidot állítottak elő az alakor kiváló rezisztenciájának és a durumbúza nagyobb termőképességének kombinálására és Gill et al. (1988) és Plamenov et al. (2009). A *T. monococcum*-ból és *T. timopheevii*-ből történő génátvitel céljából AAGGA^mA^m genommal rendelkező szintetikus amfiploidot állítottak elő Martonvásáron Mikó et al. (2013). Sajnos az A genom alapú szintetikus hexaploidok nemesítési gyakorlatban történő hasznosításáról kevés információ áll rendelkezésre. Munkánk során mi a hagyományos visszakeresztezéses módszert használtuk és az ABA^m amfiploidok előállításán alapuló génátvitelt tűztük ki célul.

Az alakort a tritikálé nemesítésben is használják génforrásként, közvetlenül a tritikáléval keresztezve vagy *T. monococcum* × *Secale cereale* hibridek (amfiploid híd) létrehozásával (Neumann et al. 1985.). *T. monococcum*-ból vittek át tritikáléba kalászban csírázással szembeni

ellenállóságot (Sodkiewicz 2002) és levélrozsdá-rezisztenciát (Sodkiewicz és Strzembicka 2004, Sodkiewicz et al. 2009).

A *T. monococcum* fajjal végzett keresztezések célja általában biotikus és abiotikus rezisztencia faktorok átvitele búzába. A közismerten jó rezisztencia és a búzával való közeli rokonság ellenére, eddig kevés *T. monococcum*-ból származó rezisztenciagént azonosítottak és használata az előnemesítési programokban sem terjedt el. Ennek oka nagy valószínűséggel a nehéz keresztezhetőségben rejlik. Mindezek tükrében nagy jelentősége lehet egy jól keresztezhető és hasznos agronómiai tulajdonságokkal rendelkező alakor genotípus génforrásként való alkalmazásának a búza előnemesítési programokban.

2.3 A genetikai diverzitás bővítése idegen fajú keresztezéssel

A kedvező tulajdonságokért felelős gének idegen fajból búzába történő átvitele történhet génmódosított növények előállításával (genetikai transzformációval) illetve idegen fajú keresztezések révén faj-és nemzetséghibridek létrehozásával. Hazánkban a búzanemesítés gyakorlatában jelenleg ez utóbbi módszer használata mondható társadalmilag és jogszabály által elfogadottnak (Magyarország Alaptörvénye 2013). A búzával rokon fajok nagy része ivaros úton keresztezhető a búzával. Az első nehézséget a búza és az idegen faj közötti interspecifikus hibrid létrehozása jelenti. A különböző fajok egymással eltérő mértékben keresztezhetők (Belea 1986). Az idegen fajú keresztezések végső célja az, hogy hasznos agronómiai tulajdonságot hordozó, lehetőleg minél kisebb méretű idegen kromatint integráljunk a búza genomba transzlokációk formájában. Ez történhet közvetlenül az F₁ hibridek vagy amfiploidok létrehozása után, illetve addíciós majd szubsztitúciós vonalak előállításának közbeiktatásával.

Az idegen fajokon végzett keresztezések a génátviteli munkán túl hozzájárulnak az idegen kromatin kimutatására alkalmas módszerek fejlesztéséhez (Schwarzacher et al. 1989, 1991), kiváló alapanyagot szolgáltatnak az idegen kromoszómák közti homeológia meiotikus kromoszóma párosodás segítségével történő tanulmányozására (Naranjo et al. 1987, King et al. 1994., Miller et al. 1994), valamint evolúciós kutatásokhoz (McFadden és Sears 1946). A következőkben azokat a tényezőket mutatom be részletesen, melyek jelentősen befolyásolják az idegen fajokból történő kromoszómaalapú génátvitel hatékonyságát.

2.3.1 Keresztezhetőség

Az idegen fajú génátvitel hatékonyságát meghatározza a keresztezhetőség, vagyis az a tulajdonság, hogy a két faj szülői genotípusainak keresztezésével F₁ hibrid szem jöjjön létre. Búzában a

keresztezhetőségi jelleg kialakításában kulcsfontosságúak a keresztezhetőségi (*Kr*) gének. A *Kr* gének domináns allélja a pollentömlő növekedésének gátlásán keresztül akadályozza meg megtermékenyítést, és ez által az interspecifikus hibrid létrejöttét (Lange és Wojciechowska 1976). A *Kr* gének keresztezhetőségre gyakorolt hatását búza és rozs nemzetséghibridek létrehozása során figyelték meg először (Lein 1943), de az azóta végzett kutatások bebizonyították, hogy azok a genotípusok, melyek a rozssal jól keresztezhetők, más fajokkal is könnyen kombinálódnak (Thomas et al. 1980, Koba és Shimada 1993).

A legnagyobb hatással rendelkező keresztezhetőségi gén az 5B kromoszóma hosszú karján található *Kr1* (Riley és Chapman 1967). A kisebb hatású *Kr2* gén az 5A kromoszóma hosszú karján található (Sitch et al. 1985). A *Kr* gének domináns allélja csökkenti a keresztezhetőséget. Lein (1943) kutatásai azt bizonyítják, hogy a két gén recesszív alléljait (*kr1kr1kr2kr2*) hordozó genotípusok keresztezhetőségi százaléka 50 százalék feletti, míg domináns allélok esetében ez a szám 5 százalék alatt marad. Két további *Kr* gént azonosítottak még: a *Kr3*-at az 5D (Krowlow 1970) és a *Kr4*-et az 1A kromoszómán (Zheng et al. 1992), melyek hatása a *Kr1*-hez képest kisebb. Újabb kutatások során további nagyhatású keresztezhetőséget befolyásoló lokuszt, az *Skr*-t, térképeztek az 5B kromoszóma rövid karjára (Tixier et al. 1998). A *Kr* gének hatásukat nemcsak a megtermékenyítésre és a szemkötésre fejtik ki, hanem elősegítik a szemfejlődést, ezáltal előnyösen befolyásolják az embriótenyésztést is (Sharma 1995).

Martonvásáron recesszív *kr1* genotípus (Chinese Spring) és a Martonvásári 9 őszi búza genotípus felhasználásával hozták létre az Mv9kr1 jól keresztezhető és agronómiailag is megfelelő tulajdonságokkal rendelkező őszi búza genotípust Molnár-Láng et al. (1996). Az Mv9kr1 genotípus napjainkig meghatározó szerepet tölt be a martonvásári előnemesítési programokban, amit az is fémjelez, hogy sikeres keresztezéseket végeztek el árpával (Molnár-Láng et al. 2000), *Aegilops* fajokkal (Molnár-Láng et al. 2002), rozssal (Molnár-Láng et al. 2010), valamint *Agropyron* fajokkal (Kruppa et al. 2012).

Snape et al. (1987) valamint Gay és Bernard (1994) angol és francia fajtákba vitték be a recesszív *kr1* allélt, monoszómás vonalakba beépített Chinese Spring és Fukuhokomugi búzafajták 5B kromoszómáinak felhasználásával.

Sharma (1995) felhívja a figyelmet azonban arra is, hogy a keresztezhetőségben lévő variabilitás nemcsak a búzában, hanem a vele keresztezni kívánt vad faj különböző genotípusaiban is fellelhető, aminek a génforrásként használt genotípus helyes megválasztásában lehet jelentősége.

A keresztezések sikerességét a megfelelő genotípusok használatán kívül egyéb tényezők is befolyásolják. Ezek közt különösen jelentős a környezet (hőmérséklet, pára, megvilágítás) szerepe. A *Poaceae* családhoz tartozó fajok megtermékenyülése 20-25 °C hőmérsékleten és 60-70% relatív páratartalom mellett kedvező, a hőmérséklet csökkentésével és a páratartalom emelésével a

keresztezési munka sikere növelhető, különösen fajidegen pollen használata esetében (Belea 1986). Molnár-Láng és Sutka (1994) búza × árpa keresztezésekben 21 °C-on tapasztalták a legnagyobb arányú szemkötést. Kedvezőtlen körülmények mellett (túl magas vagy túl alacsony hőmérséklet, alacsony páratartalom) jelentősen csökken a szemkötés (Molnár-Láng et al. 1996). A tetra- és hexaploid búzák rozssal történő keresztezhetőségét szintén befolyásolják a keresztezés földrajzi helyének (Sirrka et al. 1993) eltérő környezeti adottságai. A környezet erősen befolyásolja az embrió és endospermium fejlődését is (Percy 1986), alacsony hőmérséklet lassítja az embrió fejlődését (Molnár-Láng és Sutka 1994)

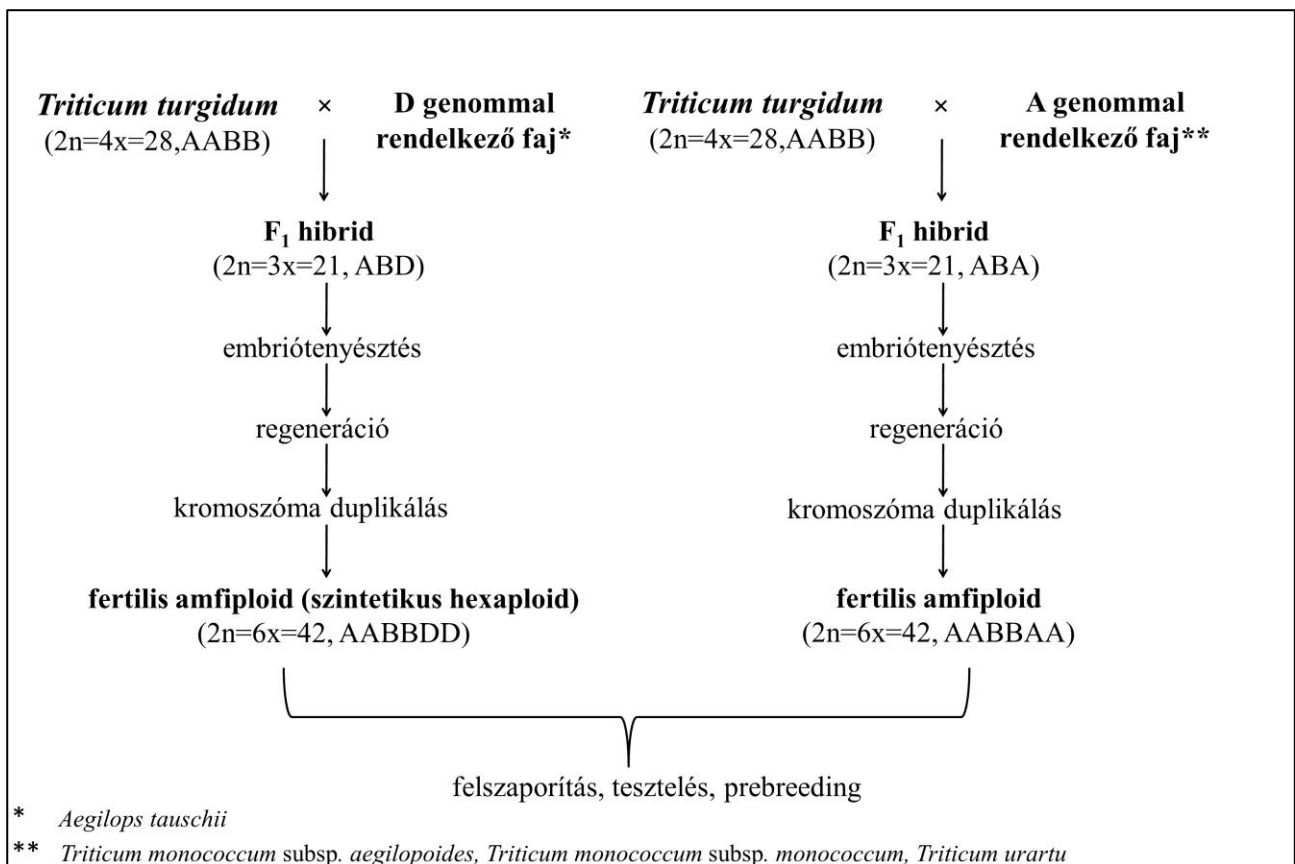
Az eltérő kromoszómaszámmal rendelkező keresztezési partnereknél az általánosan elterjedt gyakorlat a nagyobb kromoszómaszámmal rendelkező genotípus anyai partnerként való használata. Reciprok keresztezésekből kapott hibrid szemek általában gyengén csíráznak (Matsumara 1936), ami az endospermium nem megfelelő fejlődésével magyarázható (Beaudry 1951). Ezt támasztja alá Nishiyama és Inomata (1966) vizsgálata is, akik megfelelő endospermium fejlődést 2:1 anyai:apai genomarány esetén figyelték meg. Reciprok keresztezések során gyakran nagyobb szemkötés tapasztalható (Sharma és Waines 1981), de az így kapott szemekből gyakran csak embriótenyésztéssel nevelhetők fel növények (Sharma 1995). Belea (1976) széles körben végzett keresztezéseket a *Triticum*, *Aegilops* és *Secale* nemzetségen belül, melynek során vizsgálta a keresztezési irány szemkötésre gyakorolt hatását. A *T. monococcum*-mal végzett keresztezéseit tetra- és hexaploid *Triticum* fajokkal mindkét irányban elvégezve, azt tapasztalta, hogy a *T. monococcum*-ot anyai vagy apai partnerként használva egyaránt kapott szemeket, de különösen a *T. aestivum*-mal végzett keresztezés esetén alkalmasabb az alakornak pollenadóként való használata.

2.3.2 A kolhicin szerepe az idegen fajú keresztezésekben

A kolhicin használatának megjelenése áttörést hozott az idegen fajú keresztezések sikerességében az 1930-as évek végén. A kolhicin hatását a mitózis metafázisában fejteti ki azáltal, hogy a tubulin monomerekhez történő kötődésével gátolja a mikrotubulusok és a magorsók kialakulását, melynek következményeként a kromoszómák magi pólusokra vándorlása nem következik be, ezáltal leáll a sejtosztódás. Mindezek a genom duplikálásához vezetnek (Levan 1938).

A keresztezés során előállított hibridek a szülők kromoszómakészletének felét tartalmazzák. A különböző eredetű kromoszómák a meiózisban általában nem párosodnak (univalenseket alkotnak), így a keletkezett növény steril marad. Az ivarsejtképződést megelőző fejlődési stádiumokban alkalmazott kolhicin kezeléssel a növények kromoszómaszáma megkettőzhető, ezért a meiózis során homológ kromoszómák bivalenseket képeznek és fertilisek lesznek.

Habár az első szintetikus búzát több mint hatvan évvel ezelőtt állították elő, az akkori munkában a búza evolúciójával kapcsolatos kutatások voltak a középpontban (McFadden és Sears 1946) és az előállított amfiploidokat nem használták fel nemesítési célokra. A szintetikus hexaploid búza nemesítésben történő hasznosítására az 1980-as években indult intenzív munka a CIMMYT-nél. Munkájuk középpontjában elsősorban a hexaploid búzához hasonlóan AABBDD genomösszetétellel rendelkező törzsek előállítása állt. Céljuk a búza genetikai diverzitásának növelése, új rezisztenciagének bevitele a különböző *Ae. tauschii* genotípusokban rejlő diverzitás felhasználásával (Mujeeb-Kazi et al. 2002). A szintetikus hexaploid búza előállításának sémája a 4. ábrán látható.



4. ábra A D és A genommal rendelkező diploid *Triticum* fajok búzanemesítésben történő hasznosításának stratégiája a CIMMYT-nél (Mujeeb-Kazi et al. 2002 nyomán)

Az amfiploidoknak nagy szerepe van a génátviteli munkákban. Az O'Mara (1940) által ismertett technika szerint az F₁ hibridből kolhicinnel előállított amfiploidot búzával visszakeresztezve, addíciós vonalak állíthatók elő, melyek az idegen fajnak már csak egy pár kromoszómáját tartalmazza. Az addíciós vonalak felhasználhatók szubsztitúciók előállítására. Az addíciós és szubsztitúciós vonalak alkalmasak gének kromoszóma lokalizációjának meghatározására, rekombinációk, transzlokációk előállítására.

2.3.3 Idegen fajú transzlokációk létrehozása

A gyakorlati nemesítés számára az idegen fajok kedvező tulajdonságai transzlokációk formájában hasznosíthatók a leghatékonyabban, melyben a létrehozott genetikai anyag az idegen genomnak minél kisebb, lehetőleg csak a kedvező tulajdonságokért felelős régióját tartalmazza. Idegen fajú transzlokációk létrehozása történhet homeológ rekombináción alapuló eljárással, vagy random kromoszómatorések indukálásával (Sutka 2004, Lángné Molnár 2006). A homeológ rekombináció az azonos homeológ csoportba, de különböző genomokhoz tartozó kromoszómák között alakul ki a meiózis során. Munkám során a hexaploid búza A genomja és az azzal homeológ A^m genommal rendelkező *T. monococcum* közti idegen fajú keresztezéssel foglalkozom, ezért a továbbiakban csak a homeológ rekombináción alapuló eljárást, illetve az azt megelőző folyamatnak, a kromoszómák párosodásának befolyásoló tényezőit mutatom be.

A hexaploid búza A, B és D genomjának kromoszómái közül a meiózisban csak a homológ kromoszómák párosodnak, illetve rekombinálódnak egymással, az azonos homeológ csoportba tartozó kromoszómák szinte sohasem (Riley és Law 1965). Az allohexaploid búzában a stabil öröklődést lehetővé tevő diploid-jellegű meiózis szigorúan szabályozott kromoszómapárosodáson keresztül valósul meg. A meiotikus kromoszómapárosodást befolyásoló genetikai rendszer legerősebb hatású eleme az 5B kromoszóma hosszú karján található *Ph1* lokusz (Riley és Chapman 1958, Sánchez-Morán et al. 2001). Kisebbs hatású eleme a 3D kromoszóma rövid karján található *Ph2* lokusz (Sears 1976). A *Ph1* hatását a homeológ kromoszómák közötti párosodás megakadályozásával fejt ki, ezáltal az allopoliploid fajokban is diploid fajokra jellemző kromoszómapárosodás megy végbe. A *Ph1* lokusz kialakulása a poliploidizáció következménye, jelenléte a diploid fajokban nem figyelhető meg (Chapman és Riley 1970)

A *Ph1* lokusz kromoszómapárosodást gátló hatása dóziszfüggő. A növekvő dózisu *Ph1* a homeológ és homológ párosodást is gátolja (Moore 2005), és a *Ph1* lokusz dóziséától függ, hogy ezt a hatást a homeológ vagy homológ kromoszómák szintjén fejt-e ki.

A búza 42 kromoszómája a *Ph1* lokusz jelenlétében 21 bivalenst alkot a meiózis I. metafázisában. Megfigyelték, hogy a *Ph1* hiányában is a legtöbb sejtben szintén közel 21 bivalens figyelhető meg (Roberts et al. 1999). Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a *Ph1* lokusz hatását nem közvetlenül kromoszómapárosodásra és a rekombinációra, hanem a homológ kromoszómák felismerésére fejt ki (Moore 2005). A homológ felismerésben a kromoszómák telomér és centromér régiójának tulajdonítanak nagy jelentőséget. A *Ph1* lokusz befolyásolja a kromoszómák telomér régiójának felismerését, ami a szinaptonémás komplex kialakításában és ezen keresztül a meiotikus kromoszómapárosodás kiváltásában játszik szerepet (Prieto et al. 2004). A *Ph1* lokusz ezenkívül a centromérák közti specifikitást is befolyásolja. A meiózis korai szakaszában a

centromérák párokat képeznek a tetraploid és hexaploid búzában (Aragon-Alcaide et al. 1997; Martinez-Perez et al. 2000, 2001), míg ugyanez a folyamat nem figyelhető meg diploid fajokban (Martinez-Perez et al. 2000). A meiózis további szakaszaiban ezek a centroméra-párok 7 csoportot alkotnak a hét homeológ csoportnak megfelelően, majd homológ párokat alkotnak a kromoszómák (Martinez-Perez et al. 2001).

A *Ph1* lokusz molekuláris elemzése deléciós mutánsok, BAC klónok szekvenálását és elemzését követően rávilágított arra, hogy a *Ph1* lokusz egy sejtciklus szabályozásában résztvevő multigén családot és szubtelomérás heterokromatint foglal magába. Ez a multigén család *Cdk* (ciklin függő kináz) gének csoportja, amely szoros homológiát mutat a humán genom *Cdk2* génjeivel, melyek a nem-homológ kromoszómá párosodást akadályozzák meg (Griffiths et al. 2006, Al-Kaff et al. 2008). Búza × idegen fajú keresztezésekből származó utódokban szintén a *Ph1* lokusz a felelős a búza és az idegen kromoszómák közötti homeológ rekombináció megakadályozásért (Riley et al. 1959), jelentősen megnehezítve az idegen fajú transzlokációk kialakulását. Ezt az is alátámasztja, hogy a *Ph1* lokuszt nem hordozó búza és vad fajok interspecifikus hibrideiben gyakori a homeológ kromoszómák párosodása, míg a *Ph1* jelenlétében ez jóval kisebb mértékben figyelhető meg (Kimber et al. 1981). Ez a megfigyelés gyakorlati jelentőségű a búza és idegen faj közötti rekombináció előállításában és különböző módszereket alkalmaznak a homeológ transzlokáció indukálására. Ezek a módszerek egyrészt az 5B kromoszóma és ezzel együtt a *Ph1* lokusz eltávolításán alapulnak: 5B monoszómok, 5B nulli- 5D tetraszómok (ahol az 5B kromoszómát 5D helyettesíti) alkalmazásával a búza × idegen fajú keresztezésekben indukálhatók homeológ rekombinációk (Sears 1981). A *Ph1* lokusz eltávolítása 5B deléciós mutánsok létrehozásával is megvalósítható. Így hoztak létre a Chinese Spring búzából egy 70 Mb terjedelmű, interkaláris deléciót hordozó genotípust: a CS *ph1b* mutánst (Sears 1977), melyet széleskörűen alkalmaznak génátviteli munkákban. A *Ph1* lokusz kromoszómá párosodást gátló hatása csökkenthető annak eltávolítása nélkül is. Chen et al. (1994) *Aegilops speltoides*-ből vittek át a búzába *Ph1* inhibitor gént (*Ph¹*), ennek hatékonysága azonban elmarad az 5B kromoszóma eltávolításán és a *ph1b* mutáns alkalmazásán alapuló módszerektől. Búza × idegen fajú homeológ transzlokációk ezen kívül létrejöhetnek spontán módon is (Sutka 2004).

A génátvitelt nehezíti, hogy a kromoszómák közötti párosodás még a *Ph1* lokusz hiányában is egy meghatározott hierarchiát követ. A búza esetében azt figyelték meg, hogy a meiózis I. metafázisában a kromoszómá párosodások 80%-a az A és D genom között történik, de az A és B genom kromoszómái is párosodnak, ha az interspecifikus hibrid A és B genommal rendelkező tetraploid *Triticum* fajt és vad fajt tartalmaz (Blanco et al. 1988, Jauhar et al. 1991). A hexaploid búza A genomja és a *T. monococcum* A^m genomja közötti evolúciós kapcsolat arra enged következtetni, hogy ezek a kromoszómák egymással könnyen párosodnak és rekombinálódnak.

2.4 Idegen fajú kromatin kimutatása búza genetikai háttérben

Az idegen fajú kromatin búza genetikai háttérben történő kimutatására több módszer is alkalmas. A legfontosabbak ezek között azok a faj-, illetve genotípus specifikus genetikai markerek, melyek izoenzimek és tartalékfehérjék kimutatásán alapulnak (Kephart 1990, Cooke 1992), valamint a DNS szekvenciák variabilitását restriktív endonukleázok használatával (RFLP) (Botstein et al. 1980), vagy specifikus primerekkel végzett PCR reakcióval kimutató molekuláris markerek (Agarwal et al. 2008). A molekuláris genetika fejlődésével további módszerek váltak elérhetővé (DArT, újgenerációs szekvenálás stb.), melyek alkalmasak lehetnek a búza genomba integrálódott idegen kromatin kimutatására és azonosítására (Wenzl et al. 2004, Varshney et al. 2009). Tekintettel arra, hogy dolgozatomban citogenetikai és molekuláris citogenetikai módszereket alkalmaztam a *T. monococcum* kromatin kimutatására, ezért a továbbiakban csak az idegen kromatin azonosítására legáltalánosabban alkalmazott fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) és genomi *in situ* hibridizáció (GISH) módszereit részletezem. Az idegen fajú kromatin kimutatása általában mitotikus kromoszóma preparátumon történik. A kromoszómák meiózisban történő vizsgálatát, mely alkalmas a különböző genomok közötti homeológia tanulmányozására és munkám fontos részét képezte, szintén ebben a fejezetben ismertetem.

2.4.1 Molekuláris citogenetikai vizsgálatok

Az idegen kromatin kimutatására alkalmas citogenetikai módszerek közül az *in situ* hibridizáció az egyik legelterjedtebben alkalmazott módszer. Az *in situ* hibridizáció során jelölt DNS-t vagy RNS-t (próbát) hibridizálnak denaturált kromoszóma DNS-hez. A módszer kifejlesztése Gall és Pardue (1969) és John et al. (1969) nevéhez fűződik. A módszer alkalmas DNS szekvenciák kromoszómákon történő lokalizálására, kromoszómák és kromoszómaszegmentumok azonosítására és jellemzésére; segítségével jól követhetők a kromoszóma szerkezeti változások (Schwarzacher 2003). Az *in situ* hibridizációs technika alkalmazása során a legjelentősebb változások a próbajelölés területén következtek be. A módszer elterjedését kezdetben a radioaktív jelölési mód, az izotópok használatának veszélyessége és a detektálás hosszadalmassága gátolta. A 80-as évek közepétől terjedtek el a nem-radioaktív jelölési módok, melynek során biotint és digoxigenint használtak a próbák jelölésére, majd később közvetlenül fluorokrómokkal jelölt nukleotidokat építettek be a DNS próbákba (Jiang és Gill 1994). A módszer gyorsasága és ismételhősége miatt gyorsan elterjedt. A hibridizáció eredménye fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektálható, a módszert fluoreszcens *in situ* hibridizációnak (FISH) nevezik (Leitch et al. 1994). Búzán először

Rayburn és Gill (1985) használt biotinnal jelölt rozsszekvenciát és ezáltal azonosította az összes B kromoszómát, továbbá a 4A, 2D, 3D és 5D kromoszómákat.

A próba jelölése történhet direkt, vagy indirekt módon. Az előbbi esetben a nukleinsavba közvetlenül beépített fluorokróm használata nem igényel speciális detektálást. Ez a módszer gyors, de kevésbé érzékeny, mint az indirekten jelölt próbával működő. Ebben az esetben a nukleotidba egy haptén molekulát (digoxigenin vagy biotin) építenek be, melyhez a fluorokrómot (fluoreszcein, rhodamin) a hibridizációt követően kapcsolják antitesteken keresztül. A jelölés különböző reakciókkal történhet (nick transláció, random priming, PCR); a megfelelő módszer alkalmazását elsősorban a használt próba dönti el (Schwarzacher 2009). Az *in situ* hibridizáció sikerességét befolyásolja a próba mérete is. A hibridizációs próba nem lehet túl hosszú, mert az gátolná a próba DNS penetrációját valamint a kromoszómába történő beépülését, a túl rövid méret viszont a hibridizációs próba specifitását rontja. Átlagosan a 100-300 bp méretű próbák tekinthetők megfelelőnek (Schwarzacher 2003).

Az *in situ* hibridizációnak a próba jellegétől függően két változata ismert a növényi molekuláris citogenetikában. FISH esetén repetitív DNS szekvenciákat alkalmaznak próbaként, melyek a kromoszómákon specifikus mintázatot eredményeznek (Rayburn és Gill 1985, Pedersen és Langridge 1997). A teljes genomi DNS-t próbaként alkalmazó GISH eredményeként az adott genom (-ok) kromoszómái teljes hosszukban jelölődnek (Le et al. 1989, Schwarzacher et al. 1989), így a különböző genomokhoz tartozó kromoszómák vagy kromoszómaszegmentumok megkülönböztethetőek.

2.4.2 Fluoreszcens *in situ* hibridizáció repetitív próbákkal

A FISH kiválóan alkalmas az egyes repetitív DNS szekvenciák (pl. 5S és 45S riboszomális DNS, pAs1, pSc119.2 stb.) különböző gabona fajok kromoszómáin elfoglalt pozíciójának megállapítására. A jelölt repetitív szekvenciákat próbaként alkalmazva a FISH kromoszóma specifikus mintázatot eredményez az egyes kromoszómákon, és a FISH kariotípus alapján lehetőség nyílik a kromoszómák azonosítására.

A génátviteli munkákban használt fajok FISH kariotípusának ismerete megkönnyíti a kromoszóma átrendeződések, transzlokációk azonosítását. A búzával kapcsolatos molekuláris citogenetikai vizsgálatokban legelterjedtebben a rozsból izolált pSc119.2-t (Bedbrook et al. 1980), az *Ae. tauschii*-ből klónozott Afa family (Rayburn és Gill 1986) szekvenciákat, valamint a 45S riboszomális DNS pTa71 klónt (pTa71) használják próbaként (Fedak és Kim 2008). Mukai et al. (1993) a pSc119.2 és pAs1 (~Afa family) próbákkal azonosították a búza összes B és D

kromoszómáját, valamint az 1A, 4A és 5A kromoszómákat, Pedersen és Langridge (1997) pedig az összes búzakromoszómát azonosította a pAs1 és a GAA szekvenciát tartalmazó pHvG38 próbával. A pSc119.2, pAs1 (~Afa family) és pTa71 próbák sikerrel alkalmazhatók intergenomikus kromoszóma átrendeződések vizsgálatára a poliploid *Triticeae/Aegilops* fajokban (Kubaláková et al. 2005, Molnár et al. 2009). Hátrányuk azonban, hogy kevés és nagyon gyenge jelet adnak a búza A genomjának kromoszómáin (Sepsi et al. 2008). A mikroszatellitek, olyan ismétlődő DNS szekvenciák, melyek általánosan előfordulnak az eukarióták genomjában (Tautz és Renz 1984). Egy részük FISH próbaként alkalmazva alkalmas a búza és a rokon fajok kromoszómáinak azonosítására (Cuadrado et al. 2000, 2008).

A búza kariotípusának FISH elemzése után előtérbe kerültek azok a rokon fajok is, melyek potenciális génforrásként szolgálhatnak a nemesítésben. Kariotípusuk ismerete ugyanis megkönnyíti az idegen kromoszóma vagy kromoszómaszegmentum azonosítását búza háttérben. Martonvásári kutatások eredményeképpen több *Aegilops* (Molnár et al. 2005, 2011) és évelő *Elytrigia* faj (Linc et al. 2012) kariotípusát határozták meg az utóbbi években.

Az A^m genommal rendelkező *T. monococcum* FISH kariotípusára ezidáig nem találtunk információkat.

Repetitív DNS próbák és mikroszatellit szekvenciák alkalmazása növelheti a diagnosztikus sávok számát az A^m kromoszómákon, lehetővé téve ezáltal a *T. monococcum* kariotípusának kidolgozását és megfelelő mértékű polimorfizmus esetén a *T. monococcum* kromoszómáinak megkülönböztetését és nyomon követését a búza genetikai háttérben.

2.4.3 Genomi *in situ* hibridizáció

A módszer alkalmas az interspecifikus és intergenerikus hibridek és allopoliploid fajok genomösszetételének tanulmányozására, a szülői genomok megkülönböztetésére, valamint introgressziók, addíciók és szubsztitúciók vizsgálatára. A GISH alkalmazása során a kimutatni kívánt, teljes genomi DNS-t jelölik próbaként. Schwarzacher et al. (1989) *Secale africanum* × *Hordeum chilense* hibrid mitotikus kromoszóma-preparátumán végeztek GISH-t, ahol a biotinnal jelölt *S. africanum*-ot használtak próbaként és a különböző eredetű kromoszómák egyértelműen elkülöníthetőek voltak az utódok genetikai anyagában. A GISH emellett kiválóan alkalmas interspecifikus vagy intergenomikus transzlokációk azonosítására, transzlokációs töréspontok helyének meghatározására (Le et al. 1989).

A megkülönböztetni kívánt genomok közötti homológia fokától függően a próba DNS hibridizálhat a jelöltnem kívánt genomhoz is (kereszt-hibridizáció). Ennek elkerülésére nagy mennyiségű jelöletlen, a kimutatni nem kívánt genom DNS-ét (blokkoló DNS) adnak a hibridizációs keverékhez

(Schwarzacher 2003). A tetraploid durum búza A és B genomját Benavente et al. (2008) különböztették meg GISH-el. A Martonvásáron folyó előnemesítési kutatásokban már a 90-es évektől kezdődően nagy szerepe van a GISH technikának. E módszerrel mutattak ki árpa (Molnár-Láng et al. 1999, 2000) és rozs (Lángné Molnár et al. 1996, D. Nagy és Molnár-Láng 2000) kromoszómákat/kromoszóma szegmenseket búza háttérben. A GISH alkalmazásának speciális módja az ún. multikolor GISH, ahol egymás mellett több genom azonosítására van lehetőség. A búza 3 genomját Mukai et al. (1993) különböztették meg először multikolor GISH segítségével. Próbaként biotinnal jelölt *T. urartu* és digoxigeninnel jelölt *Ae. tauschii* DNS-t, blokkolóként pedig a B genom feltételezett őse, az *Ae. speltooides* örökítő anyagát használták. Szintén multikolor GISH technika alkalmazásával mutattak ki kromoszóma átrendeződéseket *T. aestivum* × *Ae. biuncialis* amfiploidban (Molnár et al. 2009), valamint a módszer alkalmas idegen fajú hibridek genomösszetételének jellemzésére is (*T. aestivum* × *Thinopyrum ponticum* hibrid, Sepsi et al. 2008). A GISH-sel folytatott eddigi kutatások alapján nem rendelkezünk információval az A^m és A^u genomok megkülönböztethetőségével kapcsolatban.

2.4.4 Kromoszómák vizsgálata a meiózis I. metafázisában

A hibridek kromoszómáinak meiózisban történő vizsgálata kiváló lehetőséget nyújt a genomok közti homeológia (Fominaya és Jouve 1985, Naranjo 1992) és ugyanazon faj eltérő típusai közötti különbségek (Mázik-Tőkei et al. 1997) tanulmányozására. Az interspecifikus hibridek meiotikus viselkedése aktívan kutatott terület. Értékes információ szerezhető így a búza és a rozs (Miller et al. 1994, Cuadrado et al. 1997), a búza és az *Aegilops* fajok (Fernandez-Kalvin és Orellana 1992, Logojan és Molnár-Láng 2000, Cifuentes et al. 2010), valamint a búza és az árpa (Molnár-Láng et al. 2000) genomjainak egymáshoz viszonyított kapcsolatáról. Ugyanakkor a búza és az idegen faj kromoszómái közti kromoszómapárosodás gyakorisága információval szolgál arról is, hogy mely kromoszómák esetén számíthatunk homeológ rekombinációk létrejöttére a legnagyobb valószínűséggel.

2.4.4.1 Meiotikus kromoszómák vizsgálatára használt citogenetikai módszerek

A citogenetikai módszerek közül, a '70-es évek elejétől a Feulgen-festést alkalmazták legelterjedtebben a meiotikus kromoszómák párosodásának vizsgálatára (Riley és Law 1965, Fedak 1977). Interspecifikus hibridekben ez a technika indirekt módon tette lehetővé a különböző eredetű kromoszómák közt létrejött asszociációk gyakoriságának megállapítását, hiszen nem volt alkalmas

a hibrideket alkotó szülői genomok egyértelmű megkülönböztetésére, sem a kromoszómák egyedi azonosítására.

A Giemsa festésen alapuló C-sávozásos technika, amely már lehetővé teszi a mitotikus kromoszómák azonosítását, új lehetőségeket nyitott a kromoszóma és kromoszómakar szinten történő homeológ kapcsolatok vizsgálatára (Ferrer et al. 1984). A módszer hátránya, hogy a kromoszómák egyedi azonosítása rendkívül nagyfokú tapasztalatot igényel (Naranjo és Fernández-Rueda 1996). Emiatt a meiotikus kromoszómák kromoszómakar szintjén történő vizsgálata C-sávozással meglehetősen ritka (Naranjo et al. 1987), és a módszer alkalmazása a meiotikus kromoszómák vizsgálatára leginkább a párosodott kromoszómák genomi szintű azonosítására korlátozódik (Jauhar et al. 1991).

Az *in situ* hibridizációs technika használatának elterjedése a meiózisban történő kromoszómavizsgálatok esetében is új távlatokat nyitott. A GISH technika alkalmazható a meiózis I. metafázisában készült kromoszómapreparátumon is az intra- és intergenomikus kromoszómakapcsolatok vizsgálatára (Miller et al. 1994, Molnár-Láng et al. 2000, Cifuentes et al. 2010, Molnár és Molnár-Láng 2010). E módszer hátránya, hogy a kromoszómák egyedi azonosítását nem teszi lehetővé. A FISH technika meiózis I metafázisában történő alkalmazására eddig csak kevés példa van (Cuadrado et al. 1997, Cifuentes et al. 2006, Cifuentes és Benavente 2009). Ennek az lehet az oka, hogy a kromoszómák kromatinszerkezete, kondenzáltsági foka mitózisban és meiózisban eltérő, ezért a mitotikus kromoszómákon végzett FISH eredményeképpen kapott kariotípus eltérő lehet, mint a meiózis I. metafázisában lévő kromoszómák esetében. Búza × idegen fajú hibrid kromoszómák meiotikus párosodás vizsgálata során a legtöbb B és D, illetve néhány A kromoszómát azonosítottak FISH-el (Cuadrado et al. 1997, Cifuentes et al. 2006, Cifuentes és Benavente 2009). A meiotikus kromoszómapreparátumról több információ nyerhető, ha egymást követő (szekvenciális) FISH-t és GISH-t végzünk el rajta. Mitotikus kromoszóma preparátumokon ezt a módszert eredményesen használják a gabonafélék, ezen belül a búza-idegen fajú hibrdek és származékai kariotípusának meghatározására. Ezzel szemben a szekvenciális FISH és GISH nyújtotta lehetőségek kevésbé kiaknázottak a búza × idegen fajú hibrdek kromoszómapárosodási vizsgálatában, használatáról napjainkig mindössze egy, *Alstroemeria* hibrdekkal foglalkozó beszámoló jelent meg (Kamstra et al. 2004). E módszerrel maximalizálható lenne az idegen fajú hibrdek meiotikus kromoszómapárosodásából nyerhető információ mennyisége, azaz lehetővé válna genomszinten, valamint egyedi kromoszóma és kromoszóma kar szinten vizsgálni a homeológia viszonyokat. Mindez fontos információval szolgálna a búza előnemesítési programok számára.

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Növényi anyag

A *T. monococcum*-mal történő idegen fajú keresztezésekhez a következő genotípusokat használtuk:

Triticum monococcum subsp. *monococcum* L. '1T-1' törzs, melyet Kovács Géza (Martonvásár) termesztett alakorból állított elő EMS (etil-metán-szulfonát) mutagenézissel Martonvásáron (Kovács Géza, személyes közlés). Tapasztalataink szerint ez egy jól keresztezhető, féltörpe alakor genotípus.

Triticum monococcum subsp. *monococcum* cv. 'Mv Alkor', hagyományos típusú, Martonvásáron nemesített alakor fajta.

Mindkét alakor genotípus rezisztens a levélrozsdával szemben, de a féltörpe alakor fogékony volt a szárrozsdára a 2013. évi mesterségesen fertőzött kísérletben (Vida Gyula, Martonvásár, személyes közlés).

Triticum aestivum L.: A *kr1* recesszív keresztezhetőségi gént tartalmazó Martonvásári 9 *kr1* (Mv9kr1) búza genotípus (Molnár-Láng et al. 1996) és a Martonvásári 9 (Mv9) búzafajta. A keresztezési partnerként alkalmazott Mv9kr1 búza genotípus, jó agronómiai tulajdonságokkal rendelkező, de a rozsdabetegségekre kifejezetten fogékony genotípus.

Triticum turgidum subsp. *durum* L.: MvTD14-04 durumbúza törzs, mely mérsékelten fogékony-fogékony a levélrozsdával szemben 2004-2005 évi provokációs kísérletekben Martonvásáron (Vida Gyula, személyes közlés).

MvTD14-04 × 1T-1 *Triticum turgidum* subsp. *durum* × *Triticum monococcum* subsp. *monococcum* ($2n=2x=42$, AABBA^mA^m) szintetikus amfiploid.

(Mv9kr1 × *T. monococcum* '1T-1') × Mv9kr1² féltörpe alakort tartalmazó BC₂ növények, melyet az MTA ATK Génmegőrzési és Organikus Nemesítési Osztályán állítottak elő (Molnár-Láng et al. 2012).

A diploid, tetraploid és hexaploid *Triticum* fajokban található különböző A genomok mikroszatellit próbákkal történő kariotipizálásához a következő genotípusokat használtuk:

T. monococcum subsp. *monococcum* '1T-1', *T. urartu* MVGB115, *T. turgidum* subsp. *durum* MVTD14-04, és *T. aestivum* Mv9kr1.

A meiózis első metafázisában a búza kromoszómák közötti párosodás vizsgálatához két *T. aestivum* × *Secale cereanum* F₁ hibridet használtunk, melyet Molnár-Láng et al. (2010) hozott létre: az anyai partner a hibridekben az Mv Béres kr1 és Mv Magdaléna kr1, melyet a jól keresztezhető Mv9kr1 és az Mv Béres, valamint az Mv Magdaléna őszi búza fajták keresztezésével állítottak elő. A pollenadó mindkét esetben a Kriszta (*Secale cereanum* = *S. cereale* × *S. montanum*) fajta volt.

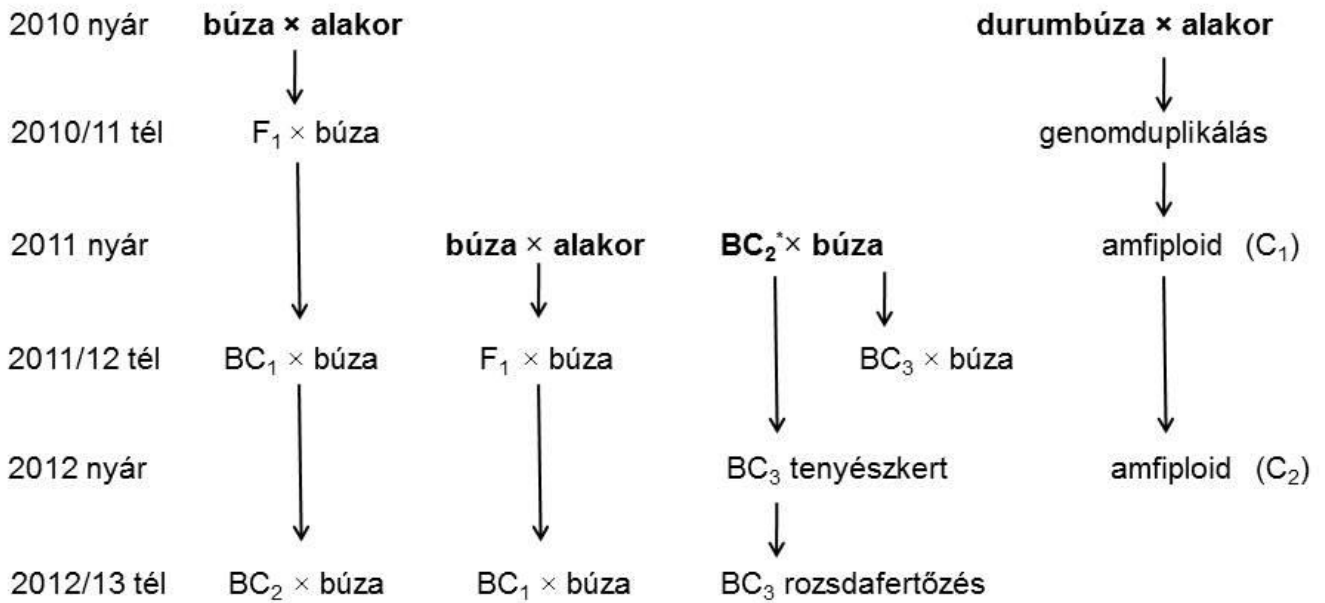
3.2 Keresztezések

A *T. aestivum* × *T. monococcum* keresztezéseket 2010-ben és 2011-ben végeztük. A keresztezésekhez használt durum- és kenyérbúza genotípusok a *T. monococcum*-hoz képest körülbelül két héttel korábban virágoznak, ezért, a virágzásuk szinkronizálásához, fitotronban (Convion, PGR-15 növénynevelő szekrény) neveltük az anyanövényként használt búza genotípusokat. A növénynevelés Tischner et al. (1997) által kidolgozott módszer szerint történt. Az 1-2 leveles csíranövényeket a 6 hetes vernalizációt követően 2 l űrtartalmú földet tartalmazó cserépbe ültettük, majd 250-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fényintenzitáson (PPFD-fotoszintetikusan aktív foton fluxus sűrűség) és 70-80 % relatív páratartalom mellett neveltük. A jól bokrosodott állapot eléréséig a növények 10/15 °C és 12/12 óra sötét/fény ciklus mellett nevelkedtek. Bokrosodás után, szárbaindulás kezdetekor, kalászoláskor és éréskor a hőmérsékletet 2-2°C-kal növeltük, a megvilágítás hosszát bokrosodás után 14 órára, szárbaindulástól érésig 16 órára növeltük.

Az anyanövényeket kasztrálás után izoláltuk, majd 3 nap múlva pörgetéssel poroztuk. A virágport a szántóföldi tenyészertben elvetett pollenadó növényekről gyűjtöttük.

A *T. aestivum* × *T. monococcum* F₁ hibrid növények valamint a későbbi generációk Mv9kr1-gyel történő visszakeresztezését hasonló körülmények között végeztük 2011-ben és 2012-ben. A részletes keresztezési program az 5. ábrán látható.

A *Triticum turgidum* subsp. *durum* × *Triticum monococcum* subsp. *monococcum* keresztezéseket tenyészerti körülmények között végeztük 2010-ben és 2011-ben. Az F₁ hibrid növényekből kolhicin kezeléssel amfiploidokat állítottunk elő. A genom duplikációt eredményező kolhicin kezeléshez a növényeket fitotronban neveltük. A bokrosodást követően a növények gyökerét 0,04%-os kolhicin oldatba helyeztük 4 órára, majd a gyökerek kolhicintartalmának folyóvízes kimosása (12 óra) után a kezelt növényeket újra elültettük és felneveltük.



5. ábra A *T. monococcum*-mal végzett keresztezési program, évenkénti bontásban. A vastagon kiemelt kombinációk az első keresztezéseket jelölik. A búza partner a kombinációkban Mv9kr1-et jelent. A keresztezésekhez használt alakor (*T. monococcum*) genotípusok az Mv Alkor, hagyományos típusú és az 1T-1 féltörpe típusú alakor voltak mindhárom kombinációban. A csillaggal jelölt BC₂ anyagot a Génmegőrzési és Organikus Nemesítési Osztályon korábban állították elő (Molnár-Láng et al. 2012).

BC₁, BC₂ és BC₃ = visszakeresztett nemzedékek

3.3 Molekuláris citogenetikai vizsgálatok

3.3.1 Citológiai preparátumkészítés

A mitózis metafázisában történő kromoszómvizsgálathoz a búzaszemeket Petri-csészében, nedves szűrőpapíron csíráztattuk. A szemeket felpattanást követően 48 óráig 2-4°C-on tároltuk. Ezt követően 25°C-os termosztátba helyeztük 26 órára. A búzaszemekről ekkor leszedtük az 1-1,5 cm hosszúságú gyökereket, jeges vízzel telt fiolába helyeztük és jégen tároltuk 24 óra hosszat. A gyökereket ezt követően etil alkohol és ecetsav 1:3 arányú keverékében 5 napig 37°C-on fixáltuk. A gyökereket kárminecetsav 1 %-os oldatában 2 órán keresztül festettük, majd további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A mitotikus kromoszómapreparátum készítésekor a gyökércsúcsot levágtuk és 45%-os ecetsavban, tárgylemezen szétnyomva vizsgáltuk fáziskontraszt mikroszkóp alatt. A megfelelő preparátumokról (8-10 olyan sejt jelenléte, ahol a kromoszómák átfedése minimális és a citoplazma mennyisége elhanyagolható) a fedőlemezt folyékony nitrogénben történt fagyasztás után eltávolítottuk, majd

etanol sorozatban (5 perc 70%, 5 perc 90%, 30 perc abszolút etanol) víztelenítettük és az *in situ* hibridizációig -20°C -on tároltuk.

A meiotikus kromoszómapreparátum készítéséhez a kalászolás előtt álló növényekből portokat gyűjtöttünk, amelyeket abszolút alkohol és jégcet 1:3 arányú keverékében fixáltunk az osztódás leállítása céljából. A portokokat tárgylemezen szétnyomva vizsgáltuk fénymikroszkóp alatt. A megfelelő preparátumokat a mitotikus kromoszómapreparátumhoz hasonlóan tartósítottuk az *in situ* hibridizációig.

3.3.2 Kromoszómaszám meghatározása Feulgen módszerrel

A *T. aestivum* \times *T. monococcum* F₁ hibridek és búzával visszakeresztezett nemzedékeik szomatikus kromoszómaszámát Feulgen módszerrel határoztuk meg. A citológiai preparátum készítéséhez az előző pontban ismertetett módon előkezelt gyökereket használtunk. A gyökereket 10-12 percig 1 N sósavban 60°C -on hidrolizáltuk, majd fukszinnal (0,5 g/100ml) festettük. A jól festődő gyökércsúcsokból 45%-os ecetsavban dörzspreparátumot készítettünk, amelyekben a kromoszómák számolhatóak voltak.

3.3.3 Próbajelölés

A FISH során a következő repetitív DNS próbákat használtuk:

1. Az Afa family próba, mely *Ae. tauschii*-ből izolált 260 bp hosszúságú repetitív DNS szekvenciát hordozó fragmentum (Nagaki et al. 1995); 2. rozsból izolált 120 bp hosszú pSc119.2 repetitív DNS (Bedbrook et al. 1980); 3. pTa71 DNS klón, ami 9,05 kb hosszúságú és a búza riboszómális génjeinek (18S-5.8S-25S rDNS) egy-egy szakaszát hordozza (Gerlach és Bedbrook, 1979). Az Afa family próbát *Ae. tauschii* teljes genomi DNS-ből szaporítottuk fel a Nagaki et al. (1995) által leírt PCR reakció segítségével. A pSc119.2 próbát rozs genomi DNS-ből amplifikáltuk a Contento et al. (2005) által leírt módon, míg a 18S riboszómális gén szekvenciáit rizs genomi DNS-ből szaporítottuk fel Chang et al. (2010) módszerével. Az Afa family próbát digoxigenin-11-dUTP-vel (Roche), a pSc119.2 próbát biotin-11-dUTP-vel (Roche) jelöltük nick translációval. A pTa71 próba jelölését 50% biotin-16-dUTP-vel és 50% digoxigenin-11-dUTP-vel végeztük, szintén nick translációval.

A mikroszatellit próbák felszaporítása búza (*T. aestivum* L.) genomi DNS-ből történt PCR-rel (Eppendorf MasterCycler5333, Eppendorf AG, Németország), Vrána et al. (2000) által leírt módszer szerint. A következő mikroszatellit motívumokat használtuk FISH próbaként, melyek

felszaporításához a megadott primereket alkalmaztuk: GAA: 5'(GAA)₇3', 5'(CTT)₇3'; CAG: 5'(CAG)₇3', 5'(GTC)₇3'; AAC: 5'(AAC)₇3', 5'(TTG)₇3'; AGG: 5'(AGG)₇3', 5'(TCC)₇3'.

A GAA próbát biotin-16-dUTP-vel, a CAG, AAC és AGG próbákat digoxigenin-11-dUTP-vel jelöltük nick translációval.

A GISH-hez használt próbához teljes genomi DNS-t izoláltunk rozsból (*Secale cereale* L.), *T. monococcum*-ból és *Ae. speltoides*-ből Quick Gene-Mini80 (FujiFilm, Tokyo, Japan) DNS izoláló kittel. A DNS-t biotin-16-dUTP-vel (Roche, Mannheim, Németország) jelöltük nick translációval (Roche nick translációs mix, Mannheim, Németország).

3.3.4 Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

A FISH során a Molnár et al. (2011) által leírt módszert követtük kisebb módosításokkal. A hibridizációt megelőzően a preparátumok RNS tartalmát RN-áz kezeléssel (5 mg/mL RN-áz 2× SSC-ben oldva, 37°C, 45 perc) távolítottuk el, majd egy mosási lépést (2 × 2perc, 37°C, 2× SSC-ben) követően frissen készített pepszinoldatban (1mg/ml (Sigma Aldrich) 1N HCl-ben oldva, 37°C, 1 perc) emésztettük a preparátumok citoplazma tartalmát. Ezt követően a kromoszómákat utófixáltuk (4% paraformaldehid, 25°C, 10 perc), majd további mosási lépések (3×2 perc 2× SSC, 25°C) után a preparátumokat dehidratáltuk (etanol sorozat: 70%, 90% és 100%, 5-5 perc, -20°C). A hibridizációs keverék (preparátumonként 30 µL) 50% formamidot, 10% 20× SSC-t, 10 % dextrán-szulfátot, 1% SDS-t, 30 ng jelölt próba DNS-t, 50 ng/µl blokkoló DNS-t (lazac sperma DNS, Sigma Aldrich) tartalmazott. A hibridizációs keveréket a benne lévő próba és blokkoló DNS denaturálása (10 perc, 80°C) után adtuk a tárgylemezekhez. A kromoszómákat a próba jelenlétében denaturáltuk 75°C-on 6 percig, majd a preparátumokat 12–16 órán keresztül hibridizáltuk 37°C -on.

A hibridizációt követően a nem-specifikusan hibridizált szekvenciák lemosása több lépésben történt (2 × 5 perc 2× SSC, 42°C; 2 × 5 perc 0,1× SSC, 42°C; 2 × 5 perc 2× SSC, 42°C). A biotinnal jelölt próbák hibridizációs jeleit a zöld fluoreszcens jelet adó sztreptavidin-FITC-el (Roche) (10 µg/ml TNB pufferben oldva), míg a digoxigeninnel jelölt próbákat a vörös jelet adó anti-digoxigenin-rodamin (Roche) (10 µg/ml TNB pufferben oldva) detektáltuk (37°C, 20 perc). A detektálást egy utolsó mosási lépés (4× SSC-Tween, 25°C, 5 perc) és kontrasztfestés (2 mg/mL DAPI, Amersham) követte.

A preparátumokat Plan Neofluar 100× objektívvel felszerelt Zeiss AxioImager.M2 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk. A hibridizációs jeleket a FITC (Zeiss filter set 38), a rodamin (Zeiss filter set 20) és a DAPI (Zeiss filter set 49) gerjesztési és emissziós spektrumaira érzékeny szűrőkön keresztül, Zeiss AxioCam

MRm CCD fényképezőgéppel fotóztuk. A fotók kiértékeléséhez AxioVision 4.8.2 szoftvert használtunk.

A mikroszatellit próbák *T. monococcum*-on valamint durum- és kenyérbúzán adott kromoszómális eloszlását egymást követő (szekvenciális) FISH-el határoztuk meg. Ennek során az Afa family, pTa71 és pSc119.2 próbákkal kapott kariotípust referenciaként használtuk a kromoszómák azonosításához, melyhez hasonlítva azonosítottuk az egyes mikroszatellit próbák mintázatát. A szekvenciális FISH során először az adott mikroszatellit próbákkal hibridizáltunk majd a referencia kariotípust adó próbákkal. Az első hibridizációt követően a hibridizációs jelek dokumentálása után a tárgylemezeket lemostuk (4× SSC Tween, 3× 30 perc; 2× SSC, in 2× 5 perc, 25°C), majd dehidratálást követően újrahibridizáltuk.

3.3.5 Genomi *in situ* hibridizáció (GISH)

A búza kromoszómák közötti párosodás tanulmányozásához használt GISH módszert búza × rozs F₁ hibridek meiotikus kromoszómapreparátumain Molnár-Láng et al. (2010) által leírt módszer szerint végeztük el. A GISH során a hibridizációt megelőző előkezelések valamint az azt követő mosási és detektálási lépések megegyeztek a FISH-nél leírtakkal.

A *T. aestivum* × *S. cereanum* F₁ hibridekben a búza kromoszómák közti meiotikus kromoszóma-párosodás tanulmányozásához próbaként biotinnal jelölt rozs genomi DNS-t, blokkoló DNS-ként hexaploid búza és lazac sperma DNS-t használtunk, melyeket előzőleg ultrahangos szonikálással fragmentáltunk. A próba és a blokkoló DNS hossza 1–12 kb, illetve 200 bp és 1,5 kb között változott. A hibridizációs keverék (preparátumonként 25 µL) 50% formamidot, 2xSSC-t, 5 % dextrán-szulfátot, 70 ng rozs genomi DNS próbát, valamint 2.1 µg blokkoló DNS-t tartalmazott. A hibridizáció 12 órán keresztül 42°C-on történt.

A GISH eredményeinek dokumentálása (mely hasonlóan történt a FISH esetében leírtakkal) után, a már leírt módon FISH-t végeztünk az Afa family, pSc119.2 és pTa71 próbákkal a kromoszómák azonosítása céljából.

A *T. turgidum* subsp. *durum* × *T. monococcum* F₁ hibridek és szintetikus amfiploidok genomösszetételének vizsgálatát szintén GISH-el végeztük. Lépései megegyeztek a meiózisban alkalmazott GISH-el, annyi különbséggel, hogy hibridizációs próbaként biotinnal jelölt *T. urartu* és digoxigeninnel jelölt *Ae. speltoides* DNS-t használtunk. Blokkolóként jelöletlen *Ae. speltoides* DNS-t 50× koncentrációban adtuk a hibridizációs keverékhez.

3.4 Kromoszómapárosodási vizsgálatok

A búza kromoszómák közötti párosodás vizsgálatát búza × rozs F₁ (Mv Béres kr₁ × Kriszta és Mv Magdaléna kr₁ × Kriszta) növények, meiózis I. metafázisában készült kromoszóma-preparátumain végeztük, GISH-sel és FISH-sel. A *T. monococcum* A^m kromoszómáinak és a búza A kromoszómáinak a párosodását durumbúza × alakor F₁ hibridekben szintén egymást követő GISH-sel és FISH-sel vizsgáltuk a meiózis I. metafázisában.

A pollenanyasejtekben a meiotikus kromoszómák konfigurációját Sybenga (1972) munkája alapján állapítottuk meg. A kromoszómák közötti párosodás gyakoriságának vizsgálatához meghatároztuk az egy sejten belül megfigyelhető kromoszómapárosodásokat. A kromoszómapárosodásokat a meiotikus konfigurációjuk alapján értékeltük: nyílt bivalens esetén egy, zárt bivalens (gyűrű) és nyílt trivalens (lánc) esetén kettő, “serpenyő” formájú trivalens esetén három kromoszómapárosodást állapítottunk meg.

A búza kromoszómakarok között észlelt és lehetséges párosodási gyakoriság összehasonlítására khi-négyzet (χ^2) próbát alkalmaztunk.

3.5 Üvegházi levélrozsdafertőzés

A *T. aestivum* × *T. monococcum* BC₃ növények levélrozsda-ellenállóságát üvegházi mesterséges fertőzéssel vizsgáltuk. A vernalizálatlan búzanövényeket 2 leveles állapotban fertőztük levélrozsda (*Puccinia triticina*) uredospóra szuszpenzióval. A mesterséges inokulációhoz szükséges levélrozsda fertőzőanyagot Vida Gyula és munkatársai állították elő fogékony növényeken (Alcedo őszi búzafajta). A levélrozsdat 1-2 leveles növényeken szaporították fel, mesterséges körülmények között, üvegházban. A fertőzőanyag természetes körülmények között izolált rozsdapopulációt tartalmazott. Habár az uredospóra-szuszenzió pontos rászösszetétele nem ismert, közeli izogén vonalak évek óta elvégzett mesterséges, tenyészkerti fertőzése azt bizonyítja, hogy az általunk is használt fertőzőanyag ellen az *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29* és *Lr35* rezisztenciagének nyújtanak hatékony védelmet (Vida et al. 2011).

A fertőzés után a növényeket 48 órán keresztül polietilén zacskóval takartuk be a kórokozó behatolásához szükséges páratartalom fenntartása érdekében. A zacskó levétele után normal páratartalmú és 22°C hőmérsékletű üvegházi kamrában neveltük a növényeket 16 órás megvilágítás mellett.

A növények fertőzöttségét a 10. napon értékeltük a Stakman et al. (1962) által kidolgozott skála szerint:

0 – Immunis; a betegségnek nincsenek tünetei.

; - Gyakorlatilag immunis; nincsenek uredotelepek, csak hiperszenzitív foltok.

1 – Nagyon ellenálló; igen apró és izolált rozsdatelepek éles vonalú és kiterjedt hiperszenzitív foltokkal.

2 – Ellenálló; a telepek apró vagy közepes méretűek és rendszerint a növény zöldszöveivel körülvéve, szigetszerűen helyezkednek el. A zöld szigeteket klorotikus vagy elhalt szövetek veszik körbe.

3 – Mérsékelten fogékony; a telepek közepes méretűek, általában egymástól külön helyezkednek el. Nincsenek elhalt szövetek, előfordulhatnak klorotikus részek.

4 – Fogékony; számos nagy és összefüggő uredotelep, nincsenek elhalt szövetek. Klorózis csak kedvezőtlen körülmények között fordul elő.

X – Heterogén reakció; különböző méretű telepek jelennek egy levélen, több reakciótípus látható egyszerre.

3.6 Tenyészkerti megfigyelések

A *T. aestivum* × *T. monococcum* BC₃ növényeket, a *T. turgidum* subsp. *durum* × *T. monococcum* amfiploidokat és a *T. monococcum* génbanki tétteleket tenyészkertben az alábbi fenotípusos tulajdonságokat figyeltük meg:

- Kalászolási idő (naptári nap)
- Növénymagasság (cm)
- Levélrozda-ellenállóság (0-9)
- Lisztharmat-ellenállóság (0-9)

A tulajdonságokat a búzanemesítésben általánosan használt gyakorlat szerint felvételeztük.

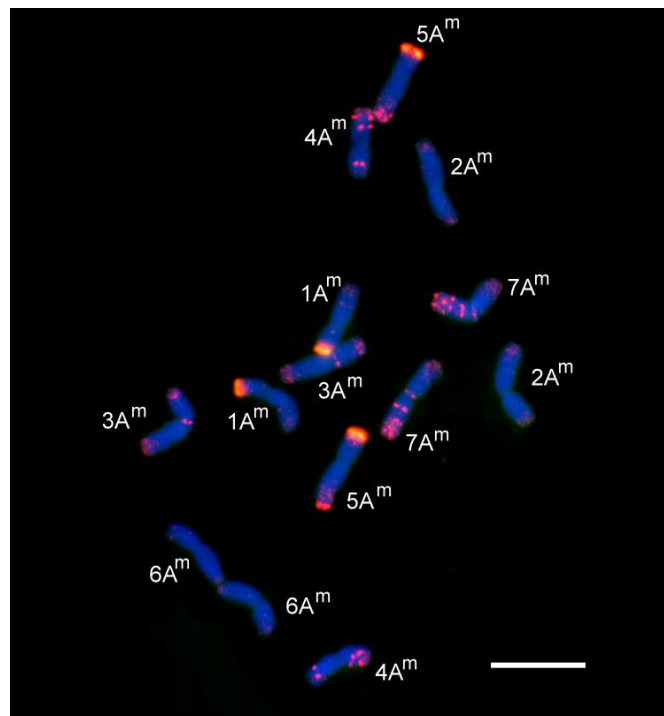
4 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1 *Triticum monococcum* kromoszómák azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel

4.1.1 A *Triticum monococcum* faj kariotipizálása repetitív DNS próbákkal

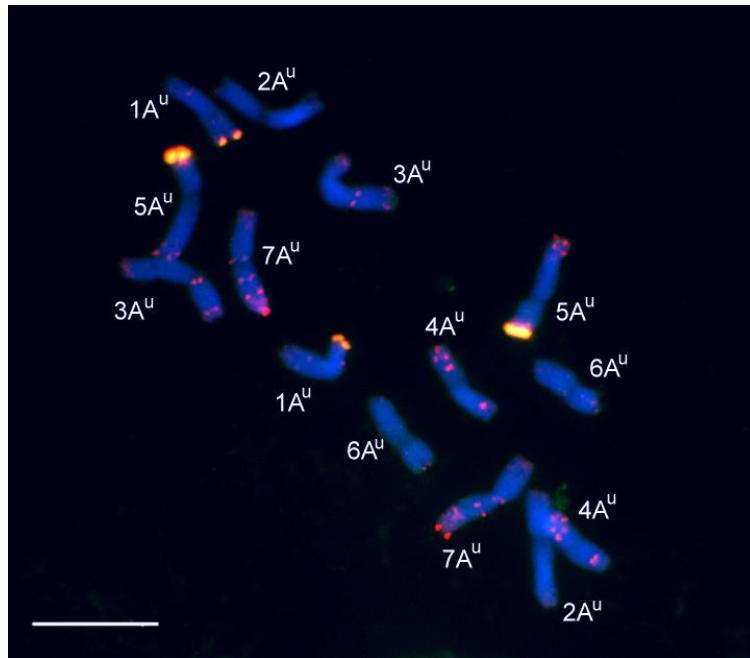
A *T. monococcum* kromoszómainak azonosítását első lépésben olyan repetitív DNS próbákkal végeztük, melyeket elterjedten használnak a búza rokonsági köréhez tartozó gabonafélék (*T. aestivum*, *T. turgidum* subsp. *durum*, *S. cereale*), valamint különböző *Aegilops* és *Agropyron* fajok genomanalíziséhez.

Az Afa family, pTa71 és pSc119.2 próbákkal történt hibridizáció után megállapítható volt, hogy a *T. monococcum* és *T. urartu* mitotikus kromoszómain az Afa family és pTa71 próbák határozott és specifikus hibridizációs mintázatot adnak (6-7. ábra), míg a pSc119.2 próba zöld hibridizációs jelei nem voltak kimutathatóak egyik diploid faj kromoszómain sem.



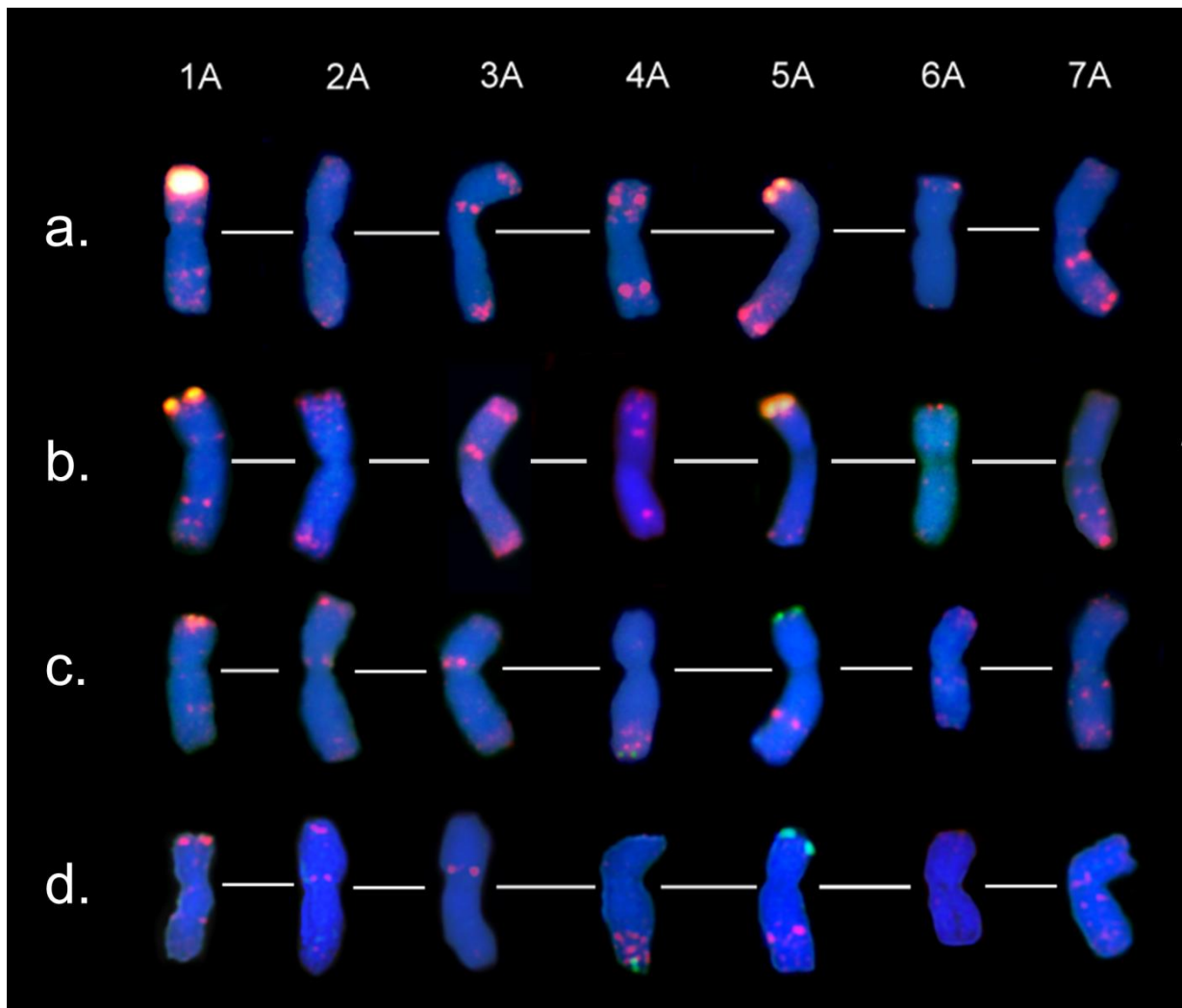
6. ábra A *Triticum monococcum* mitotikus kromoszómainak azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). Az Afa family próba mintázata piros, a pTa71 próba mintázata sárga, a DAPI háttérfestés kék színben látható. Skála= 10 μ m

A kapott hibridizációs mintázat alapján minden kromoszóma megkülönböztethető volt egymástól (6-7-8. ábra). Jellegzetes, eltérő intenzitású vörös Afa family hibridizációs jeleket figyeltünk meg a kromoszómák interkaláris, disztális és bizonyos esetekben (pl. 3A, 7A) centroméra régiójában. A legösszetettebb mintázat a diploid fajok 4A és 7A kromoszómáin látható, míg a 6A kromoszómákon észleltük a leggyengébb hibridizációs jelet az Afa family próbával. A pTa71 próba erős fluoreszcens jeleket eredményezett az 1A és 5A kromoszómák rövid karjainak telomér régiójában.



7. ábra A *Triticum urartu* mitotikus kromoszómák azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). Az Afa family próba mintázata piros, a pTa71 próba mintázata sárga, a DAPI háttérfestés kék színben látható. Skála= 10 μ m

Az Afa family, a pSc119.2 és a pTa71 repetitív DNS próbákkal kapott hibridizációs mintázat ismeretében elkészítettük a *T. monococcum* és a *T. urartu* kariotípusait (8.a., b. ábra), melyeket összehasonlítottunk a tetraploid durumbúza és a hexaploid kenyérbúza A genomjának kariotípusával (8. ábra). Általánosan kijelenthető, hogy a tetraploid és hexaploid búzafajok A genomjához képest a diploid *T. monococcum* (és *T. urartu*) A genom kromoszómáin intenzívebb és nagyobb számú Afa family hibridizációs sávok voltak megfigyelhetőek. Ugyanez a riboszómális DNS próba (pTa71) esetén is elmondható. A pSc119.2 próba hibridizációs jelei csak az allopoliploid *Triticum* fajokban jelennek meg.



8. ábra Az Afa family (piros), pTa71 (sárga) és pSc119.2 (zöld) repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata különböző eredetű A kromoszómákon

a. *Triticum monococcum* b. *Triticum urartu* c. *Triticum turgidum* subsp. *durum* d. *Triticum aestivum*

Mindezek alapján az A^m , valamint a tetraploid és hexaploid búzák A genomjainak kromoszómái a 2-es, 3-as és 6-os homeológ csoport esetében mutatták a legnagyobb hasonlóságot, ugyanakkor jól látható különbség volt megfigyelhető az 1-es, 4-es, 5-ös és 7-es homeológ csoportokhoz tartozó kromoszómák között.

A diploid *Triticum* fajok $1A^m$ kromoszómáján, a rövid kar teloméra régiójában megfigyelt erős pTa71 jel a durum búzában már jelentősen vesztett intenzitásából, a hexaploid búza $1A$ kromoszómáján pedig már általában nem látható. A 45S riboszómális DNS hasonló irányú változása figyelhető meg az $5A$ kromoszómák esetében is, ahol a pTa71 hibridizációs jel eltűnésével párhuzamosan az allopoliploid búzák esetében határozott pSc119.2 jel jelenik meg a rövid kar telomer régiójában. Szintén jelentős változás következett be a $4A$, $5A$ és $7A$ kromoszómák hosszú karján is. A $4A$ kromoszóma hosszú karján a *T. monococcum*-ban és *T.*

urartu-ban megfigyelt erős interkaláris Afa jel hiányzik az allopoliploid fajokban, ugyanakkor szubtelomérás Afa valamint telomérás pSc119.2 hibridizációs sávok jelennek meg e fajok A genomjában. Az 5A kromoszóma hosszú kar telomérás-szubtelomérás Afa sávja kizárólag a *T. monococcum*-ban van jelen, ehelyett egy határozott intersticiális Afa sáv jelenik meg a tetra- és hexaploid búzák kromoszómáin. A 7A^m hosszú karon lévő erős Afa jelek intenzitása jelentősen csökken az allopoliploid búzában.

4.1.2 *In situ* hibridizáció mikroszatellit próbákkal

A mikroszatellitek körébe tartozó trinukleotid ismétlődések nagyszámban fordulnak elő a *Triticeae* nemzetség-csoportba tartozó fajok genomjában, így potenciálisan alkalmasak FISH próbaként való alkalmazásra is. Kísérleteinkben a GAA, CAG, AAC és AGG trinukleotid ismétlődéseket alkalmaztuk, melyek hibridizációs mintázatát két egymást követő FISH-sel azonosítottuk a *T. monococcum* kromoszómákon.

Az első hibridizáció alkalmával, ahogyan az a 9. ábrán az AAC próba példáján látható, meghatároztuk az egyes SSR motívumok hibridizációs mintázatát. Az SSR hibridizációs jelek dokumentálását követően a kromoszóma preparátumokat újra hibridizáltuk a már ismert kariotípust adó Afa family és pTa 71 próbákkal (9b. ábra). A két kísérlet összehasonlításával meghatározható volt a különböző kromoszómák SSR próbákkal adott mintázata.

A *T. monococcum* kromoszómákon a mikroszatellit próbákkal végzett FISH a következő eredményeket adta (10. ábra):

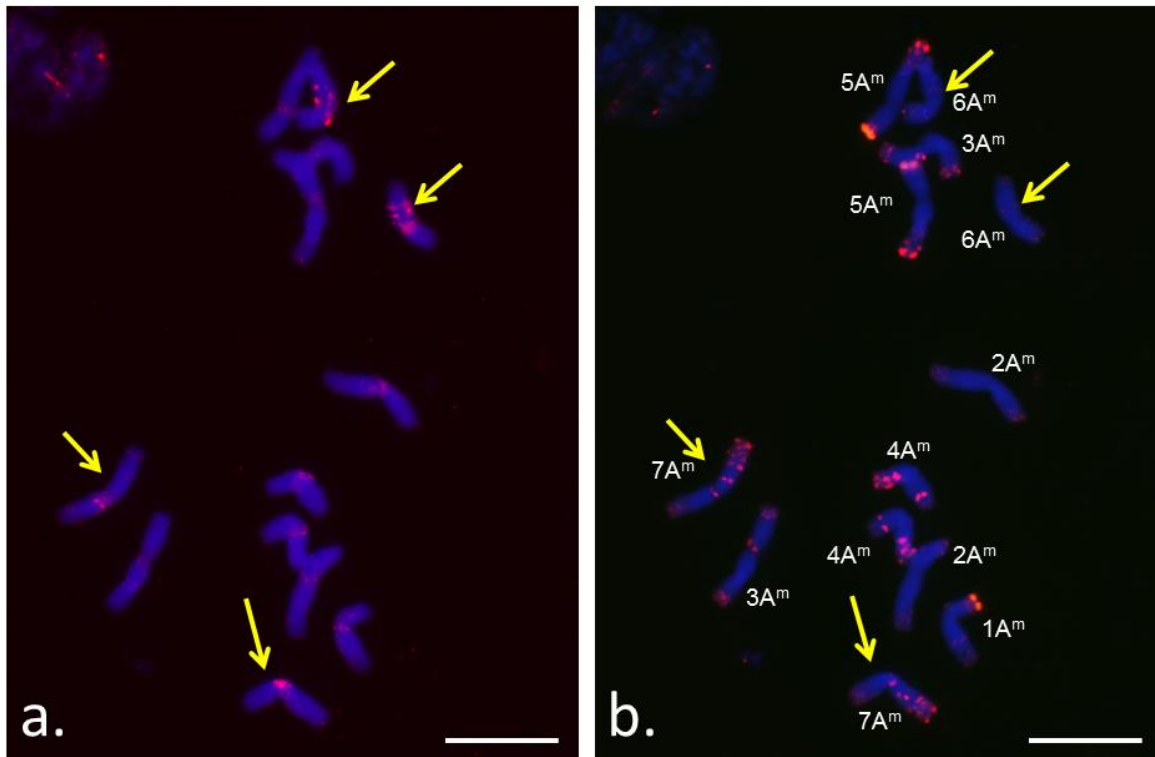
GAA: Határozott hibridizációs jel a 2A^m kromoszóma rövid karjának telomér régiójában és erős jel a 6A^m kromoszóma centroméráján.

CAG: Gyenge pericentromérás jel a 3A^m kromoszómán, erős pericentromérás és interkaláris jel a 6A^m kromoszóma hosszú karján és erős pericentromérás jel a 7A^m kromoszómán.

AAC: Gyenge, diszperz hibridizációs mintázat a 1A^m, 2A^m, 3A^m, 4A^m, 5A^m kromoszómák pericentromérás régiójában; erős pericentromérás és interkaláris jel 6A^m kromoszóma hosszú karján és erős pericentromérás jel a 7A^m kromoszómán.

AGG: Gyenge, interkaláris jel az 5A^m kromoszóma rövid karján és erős pericentromérás jel a 6A^m kromoszómán.

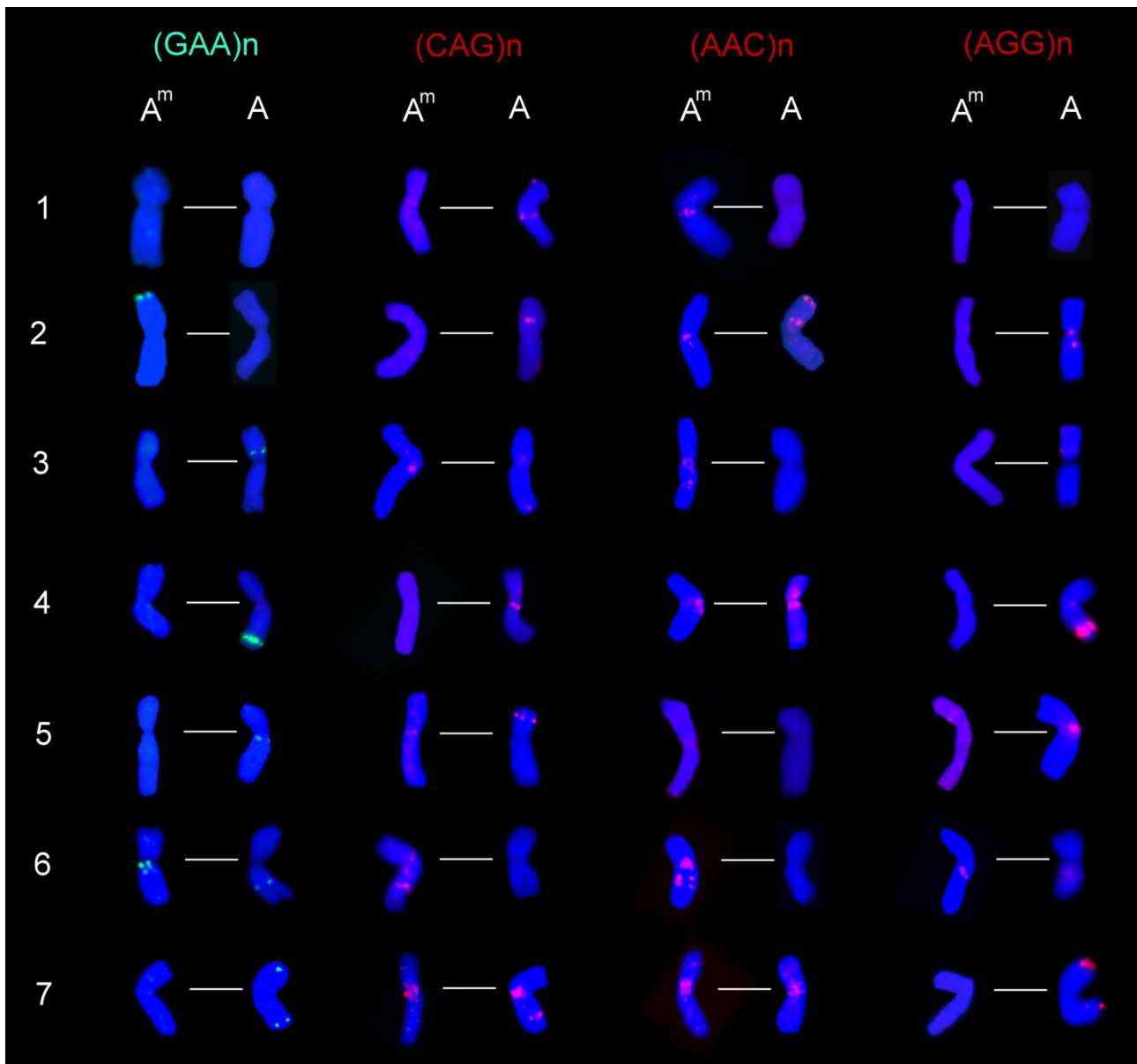
A vizsgált mikroszatellit próbák hibridizációs mintázata alapján megállapítható, hogy az SSR motívumok mindegyike határozott hibridizációs mintázatot adott a 6A^m kromoszómán, ami a korábban alkalmazott próbákkal (Afa family, pTa71) nehezen volt azonosítható, megkülönböztetése a 2A^m kromoszómától sok esetben csak méret és kar arány alapján volt lehetséges.



9. ábra. A mikroszatellit próbák hibridizációs mintázatának azonosítása a *Triticum monococcum* szomatikus kromoszómáin egymást követő (szekvenciális) fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH). a. A mikroszatellit próba (jelen esetben AAC) hibridizációja által eredményezett mintázat. b. A kromoszómák azonosítása az Afa family (piros) és pTa71 (sárga) próbák ismert kariotípusa alapján. A nyilakkal jelölt kromoszómákon AAC hibridizációs mintázat figyelhető meg. Skála= 10 μ m

Leghatározottabb hibridizációs mintázatot a GAA és a CAG próbák esetén tapasztaltunk. A GAA próba használatát követően a 2A^m és 6A^m kromoszómákon is erős hibridizációs mintázatot figyeltünk meg, ez abból a szempontból is érdekes, hogy a korábban használt repetitív próbák nem adtak hibridizációs jelet ezeken a kromoszómákon.

A továbbiakban összehasonlítottuk a használt mikroszatellit próbák A^m kromoszómákon kapott hibridizációs mintázatát a *T. aestivum* A kromoszómáinak ugyanezen próbákkal kapott hibridizációs mintázatával (10. ábra). Jól látható, hogy a különböző eredetű A kromoszómák hibridizációs mintázata sok esetben eltérő, a búza *T. urartu* eredetű A kromoszómái jóval összetettebb mintázatot adtak, különösen a GAA, CAG és az AGG próbák esetén. A GAA és CAG próbák hibridizációs mintázata pedig egyértelműen eltérő volt az A és A^m kromoszómákon. A GAA próba a *T. monococcum* 2A^m és 6A^m kromoszómáin adott jellegzetes mintázatot, a *T. aestivum* A kromoszómái közül a 3A és 5A kromoszómákon centroméra régióban, a 4A kromoszóma hosszú karjának és a 7A kromoszóma mindkét karjának teloméra régiójában figyeltünk meg határozott hibridizációs mintázatot.



10. ábra A *Triticum monococcum* A^m és a *Triticum aestivum* A kromoszómáinak hibridizációs mintázata mitózisban mikroszatellit próbákkal

A 6A kromoszómán gyenge interkaláris hibridizációs mintázat látható, ami egyértelműen különbözött a 6A^m kromoszóma erős centroméra közeli mintázatától. Ugyanakkor a GAA próba sem az 1A, sem az 1A^m kromoszómán nem eredményezett hibridizációs jelet. Szintén jelentősen eltérő hibridizációs mintázat figyelhető meg a CAG próba esetében is: a *T. monococcum* kromoszómái közül a 3A^m, 6A^m és 7A^m kromoszómákon figyeltünk meg jellegzetes mintázatot, míg a *T. aestivum* kromoszómái közül azokon kaptunk hibridizációs jelet, amelyek nem homeológok a jellegzetes mintázattal rendelkező *T. monococcum* kromoszómákkal (1A, 2A, 4A, 5A). A 7-es kromoszómák esetében mindkét fajnál erős hibridizációs jelet detektáltunk, de a 7A^m esetében ez csak a centroméra körül figyelhető meg, a 7A kromoszómán pedig ez a centromérás jel kiegészül a hosszú kar interkaláris régiójában található hibridizációs jellel.

4.1.3 Az A^m genomanalízis vizsgálatok eredményeinek megvitatása

A *T. monococcum* kromoszómák azonosítása céljából fluoreszcens *in situ* hibridizációt használtunk Afa family, pSc119.2 és pTa71 repetitív DNS próbákkal. A *T. monococcum* kariotípusát összevetve a hexaploid búza ugyanezen próbákkal készített kariotípusával megállapítottuk, hogy a tetraploid vagy hexaploid búza genetikai háttérben a *T. monococcum* kromoszómái közül az 1A^m, 4A^m, 5A^m és 7A^m kromoszómák megkülönböztetésére van a legnagyobb esély a megfelelő búza homeológ csoporthoz tartozó A kromoszómáktól. Meghatároztuk a GAA, CAG, AAC és AGG mikroszatellit próbák hibridizációs mintázatát az alakor kromoszómákon és összevetettük azokat a *T. aestivum* A kromoszómáinak mintázatával. Sok esetben eltérő hibridizációs mintázatot kaptunk a különböző eredetű, de azonos homeológ csoportba tartozó kromoszómák között. Kiemelkedő jelentőségű, hogy a 6A^m kromoszómákon mindegyik mikroszatellit próba jellegzetes mintázatot eredményezett, ami a búza 6A kromoszómáin nem figyelhető meg. A GAA próba 2A^m kromoszómán erős hibridizációs jelet adott, ami nem észlelhető a búza 2A kromoszómáján. Eredményeink hozzájárulnak a *T. monococcum* kromoszómáinak eddiginél jobb megkülönböztetésére a búza A kromoszómáitól.

A *T. monococcum*-mal kapcsolatos molekuláris citogenetikai kutatásokról rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. E faj kariotípusát először Gerlach (1977) írta le N sávozás, majd Friebe et al. (1990) C sáv technika alkalmazásával. Az A genom kromoszómáin *in situ* hibridizáció segítségével radioaktív jelölést alkalmazva azonosították a nukleolusz-organizáló régió (NOR) jelenlétét *T. monococcum*-ban és *T. urartu*-ban (Gerlach et al. 1980, Miller et al. 1983). Jiang és Gill (1994) már FISH-el vizsgálta a pTa71 és pSc119 repetitív próbák kromoszómális helyzetét *T. urartu*-ban, valamint tetraploid és hexaploid búzában.

A jelenleg elfogadott feltételezés szerint 0,5-1 millió évvel ezelőtt szétvált *T. monococcum* A^m és a *T. urartu* A^u genomja egymással szoros kapcsolatban áll (Dvořák et al. 1993), melyet a két diploid faj (Afa family és pTa71 próbákkal adott) FISH kariotípusa közötti hasonlóság is alátámaszt.

A gazdaságilag jelentősebb tetra- és hexaploid búzafajok A genomja a *T. urartu*-tól származik. Az ezeken a fajokon végzett intenzív molekuláris citogenetikai kutatások miatt részletesebb ismeretekkel rendelkezünk a tetraploid és hexaploid búza A genomjával kapcsolatban. A hexaploid búza A kromoszómáinak hibridizációs mintázatát a pSc119.2 és pAs1 repetitív DNS próbákkal Mukai et al. (1993) írták le, akik mindössze három kromoszómát (1A, 4A és 5A) tudtak azonosítani a hét A kromoszóma közül. Az A kromoszómák azonosításának nehézsége a hibridizációs sávok kis számában keresendő. Szintén az Afa family és pSc119.2 repetitív DNS próbák segítségével Kubaláková et al. (2005) azonosították a *T. turgidum* subsp. *durum* összes A kromoszómáját. Később, a pSc119.2, pTa71 és Afa family próbák kombinálásával végzett trikolor

FISH segítségével Sepsi et al. (2008) azonosította a hexaploid búza A kromoszómáit. Mindezen információk lehetővé teszik az allopoliploid *Triticum* fajok A és a *T. monococcum* A^m kromoszómáinak összehasonlítását. Az A^m kromoszómák Afa family próbával adott hibridizációs mintázata jóval összetettebb és intenzívebb, mint az a búza A kromoszómákon megfigyelhető. Különösen szembetűnőek az 1A^m és 5A^m kromoszómákon észlelt erős pTa71 jelek, melyek intenzitása ugrásszerűen csökkent a poliploidizáció során a tetraploid búzában (az 1A kromoszómán csökkent jel intenzitás, az 5A kromoszómán hiányzó rDNA jel), míg végül teljesen eltűnt a hexaploid búza A genomjának kromoszómáiról. A kapott eredmények alátámasztják azt a korábbi megfigyelést, hogy a diploid *T. monococcum* és *T. urartu* A genomja két nukleolusz-organizáló régióval (NOR) rendelkezik az 1AS és 5AS kromoszóma karokon (Gerlach et al. 1980, Miller et al. 1983). Az allopoliploid búzában az 1A rövid kar NOR régiója inaktív, míg az 5AS karon található eliminálódott (Miller et al. 1983, Jiang és Gill 1994). Mindez azzal állhat összefüggésben, hogy a B genomon található NOR régiók (1BS és 6BS kromoszómakarokon) aktivitása elnyomja az A és D genomok NOR régióinak aktivitását, ami a riboszomális gének eliminálódásához vezet a hexaploid búza 1A és 5A kromoszómáin. Ez a folyamat tükröződik a pTa71 próba *in situ* hibridizációs jeleinek gyengülésében, illetve eltűnésében a tetraploid és hexaploid búzában a diploid *T. monococcum*-hoz, illetve *T. urartu*-hoz képest. Hasonló nukleoláris dominancia figyelhető meg az allopoliploid *Aegilops* fajok esetében is, ahol például az U genomon található aktív NOR régiók elnyomják és deaktiválják az M genom NOR régióit, melyek rDNS szekvenciái már egyáltalán nem, illetve csak részben mutathatók ki FISH technikával az allopoliploid *Ae. geniculata*-ban (Badaeva et al. 1996) és *Ae. biuncialis*-ban (Molnár et al. 2011).

Hasonló megfigyelést tettek Han et al. (2005) a pGc1R-1 repetitív szekvenciával kapcsolatban, ami a *Triticum* fajok B és G genommal rendelkező diploid őseiben jelen van, azonban az allopoliploid búzafajokban hiányzik.

Mindezen eredmények alátámasztják azt a feltételezést, hogy az allopoliploid fajképződés specifikus, repetitív DNS szakaszok gyors és extenzív eliminációjával járt együtt, ami a citológiai diploidizációnak nevezett folyamat során az egyes genomok asszimmetriájához vezetett. A genomi asszimmetriát eredményező szekvencia különbségek hozzájárulnak a homológ kromoszómák felismeréséhez és búzában a *Ph*-rendszer működését kiegészítve, a meiózis folyamán a homológ kromoszómákosodás kiváltását és kiegyensúlyozott diploid-szerű öröklés kialakulását eredményezik (Ozkan et al. 2001, Han et al. 2005).

A tetra- és hexaploid *Triticum* fajok 4A és 5A kromoszómáin megfigyelhető erős pSc119.2 jel nem detektálható az A^m kromoszómákon. Ezek a különbségek az allopoliploid fajokban végbemenő kromoszóma átrendeződésekkel magyarázhatók. A pSc119.2 próba erős jelet adott a tetra- és hexaploid *Triticum* fajok B kromoszómáin. Az egyik legismertebb kromoszóma átrendeződést

ezekben a fajokban a 4A kromoszóma mutatta. Ez a kromoszóma két transzlokációt hordoz, melyek 5AL és 7BS kromoszómaszegmentumokat tartalmaznak (Devos et al. 1995). A transzlokációs töréspontok finomtérképezése lehetővé tette három, egymást követő kromoszóma átrendeződés azonosítását: a 4AS és 4AL kromoszómakarok pericentrikus inverzióját, majd ezt követően az 5AL és 7BS karokról származó fragmentumok átépülését a 4A kromoszóma hosszú karjára (Hernandez et al. 2012).

Ezek a folyamatok nem játszódtak le a *T. monococcum*-ban, így az 1A^m, 4A^m, 5A^m, és 7A^m kromoszómák jól megkülönböztethetők a tetra- és hexaploid búzafajok azonos homeológ csoportba tartozó kromoszómáitól. Ezt támasztja alá az is, hogy a *T. urartu* és a *T. monococcum* FISH mintázatának összehasonlítását követően a két faj kariotípusa a használt próbákkal nem volt megkülönböztethető, vagyis a *T. urartu* A genomja jelentős átalakuláson ment keresztül az evolúció során a búzagenomban.

Az AAG (GAA-ként is nevezett) mikroszatellit ismétlődéseket elterjedten használják a *Triticum* kromoszómák azonosítására (Pedersen és Langridge 1997; Cuadrado et al. 2000, 2008; Kubaláková et al. 2005; Molnár et al. 2005; 2007; Szakács és Molnár- Láng 2008), mely az allopoliploid búzák A kromoszómáin összetettebb hibridizációs mintázatot ad, mint az a *T. monococcum* A^m kromoszómáin megfigyelhető. Pedersen és Langridge (1997) valamint Molnár et al. (2007) a *T. aestivum* összes A kromoszómáját azonosították a pAs1 és GAA próbákkal. Kubaláková et al. (2005) szintén GAA mikroszatellit próbával, valamint Afa family és pSc119.2 repetitív próbákkal azonosították a *T. turgidum* subsp. *durum* A kromoszómáit. Az GAA próba erős pericentromérás és interkaláris jelet ad a durumbúza és a hexaploid búza valamennyi B kromoszómáján (Cuadrado et al. 2000, Kubaláková et al. 2005). A *T. monococcum*-hoz viszonyítva a hexaploid búza A kromoszómáin megfigyelt gyakoribb GAA jelek egyik lehetséges magyarázata az A és B genomok közötti kromoszóma átrendeződés lehet. Az A és B kromoszómák közötti intergenomikus átrendeződést erősíti meg Badaeva et al. (2007) munkája, amelyben különböző tetra- és hexaploid *Triticum* fajokban számos A és B kromoszómák közötti transzlokációról számol be. Ugyanakkor nem zárható ki egyéb mutációs mechanizmusok szerepe sem, melyek az SSR szekvenciák növekedését okozhatják. Például a DNS replikáció során bekövetkező slippage eredményezheti a rövid SSR régiók új alléljeinek létrejöttét (Levnison és Gutman 1987, Hancock 1996), míg a génkonverzió és transzpozíció révén hosszabb SSR klaszterek is kialakulhatnak (Dover 1993, McMurray 1995, Molnár et al. 2011).

Cuadrado et al. (2000) az AAC és GAA próbák közös lokalizációjáról számolnak be (ko-lokalizáció) a hexaploid Chinese Spring búzafajta esetében, főként a B kromoszómákon, habár az azonos helyen lévő hibridizációs jelek erőssége nagyban különbözött. Az A kromoszómák esetén ko-lokalizációt nem figyeltünk meg, ami azonos Cuadrado et al. (2000) eredményeivel. Jellegzetes

AAC jelek találhatóak a búza 2A, 4A és 7A kromoszómáin, míg a *T. monococcum* kromoszómái közül a 6A^m és 7A^m kromoszómán figyeltünk meg erős hibridizációs jelet.

Szintén különbségek figyelhetők meg a diploid és allopoliploid *Triticum* fajok A kromoszómái között az AGG próba hibridizálása során. Az AGG, melynek ismert az AAC és GAA mikroszatellit próbákkal lévő ko-lokalizációja, a hexaploid búza minden A kromoszómáján adott hibridizációs jelet (Cuadrado et al. 2008), míg az A^m kromoszómák közül csak az 5A és 6A kromoszómákon figyeltünk meg jellegzetes mintázatot.

Az GAA, AAC és AGG mikroszatellit ismétlődések ko-lokalizációja a *T. monococcum* esetében csak a 6A^m kromoszóma esetén igazolódott, ahol erős centromérás és pericentromérás jeleket figyeltünk meg az összes vizsgált SSR próbával. A legnagyobb hasonlóságot az alakor esetében az AAC és CAG próbák hibridizációs mintázatában mutattuk ki, de a CAG próba a legtöbb kromoszómán erősebb hibridizációs jelet adott. A búza A kromoszómák GAA és AGG próbákkal kapott hibridizációs mintázata a 3A, 4A, 5A, 6A és 7A kromoszómákon támasztotta alá a Cuadrado et al. (2008) által megfigyelt ko-lokalizációt, az AAC próba ettől jelentősen eltérő mintázatot adott a búza A kromoszómáin.

A kariotipizálási munka jelentőségét tovább növeli, hogy a gének térképezését és izolációját, valamint kromoszómaspecifikus markerek tervezését is segítő áramlásos citometriával szeparált kromoszómák és kromoszómacsoportok azonosítása általában *in situ* hibridizációval történik (Vrána et al. 2000, Doležel et al. 2001) ami szükségessé teszi a vizsgálatokhoz felhasznált fajok kariotípusának pontos ismeretét. A legújabb ezirányú kutatások azt bizonyítják, hogy az *in situ* hibridizáció már nemcsak a szeparált kromoszómák azonosítását teszi lehetővé, hanem a hibridizáció elvégezhető a kromoszómaszuspenzió is, majd ezt követően még nagyobb arányban és pontosságban válogathatók szét a kromoszómák (Giorgi et al. 2013).

Összefoglalásként megállapítható, hogy a *T. monococcum* kromoszómáin repetitív DNS- (Afa family és pTa71) és mikroszatellit próbákkal végzett FISH hibridizációval azonosíthatók az A^m kromoszómák, továbbá ezzel a módszerrel az A^m azonosításához és az A kromoszómák megkülönböztethetők tetra- és hexaploid búza háttérben.

4.2 Interspecifikus hibridek kromoszómavizsgálatai a meiózis I. metafázisában

4.2.1 Meiotikus kromoszómák vizsgálata GISH-sel, búza × rozs F₁ hibridekben

A *T. monococcum* búzanemesítésben történő felhasználása kisméretű idegen kromatint tartalmazó, kompenzáló típusú búza–*T. monococcum* homeológ transzlokációk segítségével oldható meg a leghatékonyabban. A rekombinációk kialakulása akkor várható, ha a búza és a *T. monococcum* A

kromoszómái egymással párosodnak a meiózis folyamán. Ennek egyértelmű igazolása lehet a meiózis I. metafázisában a párosodó kromoszómák azonosítása repetitív DNS próbákkal, ami a kromatin kondenzáltsági fokának megváltozása miatt nem feltétlenül lehetséges. Az *in situ* hibridizációs technika alkalmazhatóságát először búza × rozs keresztezésből származó hibrideken vizsgáltuk. A két faj közötti nagyobb genetikai távolság és a különböző fajokból származó kromoszómák egyszerű azonosíthatósága miatt ez a kombináció ideális alapanyagot biztosított a módszer kipróbálásához és finomításához.

A búza × rozs F₁ hibrideknek a meiózis I. metafázisában lévő kromoszóma preparátumain először genomi *in situ* hibridizációt (GISH) végeztünk jelölt rozs genomi DNS próbával. A GISH-t követően a rozs kromoszómák az erős fluoreszcens jelölődésnek köszönhetően egyértelműen megkülönböztethetőek voltak a búza kromoszómáktól. Kimutattuk hét rozs kromoszóma és az 1BL.1RS transzlokációban lévő 1R rozskromoszóma rövid karjának jelenlétét a búza × rozs F₁ hibrid 28 meiotikus kromoszómája között (11. a. ábra).

A vizsgált 274 pollen anyasejtben 330 kromoszómapárosodást (asszociációt) figyeltünk meg, melyek között az intra- és interspecifikus kromoszóma-asszociációk elkülöníthetőek voltak. A megfigyelt meiotikus kromoszóma konfigurációkat és a kromoszóma-asszociációk pollen anyasejtre számított gyakoriságát az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat Búza × rozs F₁ hibridek meiotikus konfigurációja a meiózis I. metafázisában

Kombináció	Sejtek száma	Meiotikus konfiguráció (összes/sejtek száma) ¹				Kromoszóma-asszociációk			
		I	nyílt II	gyűrű II	III	1BL.1RS-1RS transzlokációval		1BL.1RS-1RS transzlokáció nélkül	
						összes	átlag/sejt	összes	átlag/sejt
Mv Magdaléna kr1 × rozs	79	25,97	0,94	0,02	0,02*	84	1,06	58	0,71
Mv Béres kr1 × rozs	195	25,51	1,19	0,01	0,03**	246	1,25	136	0,70

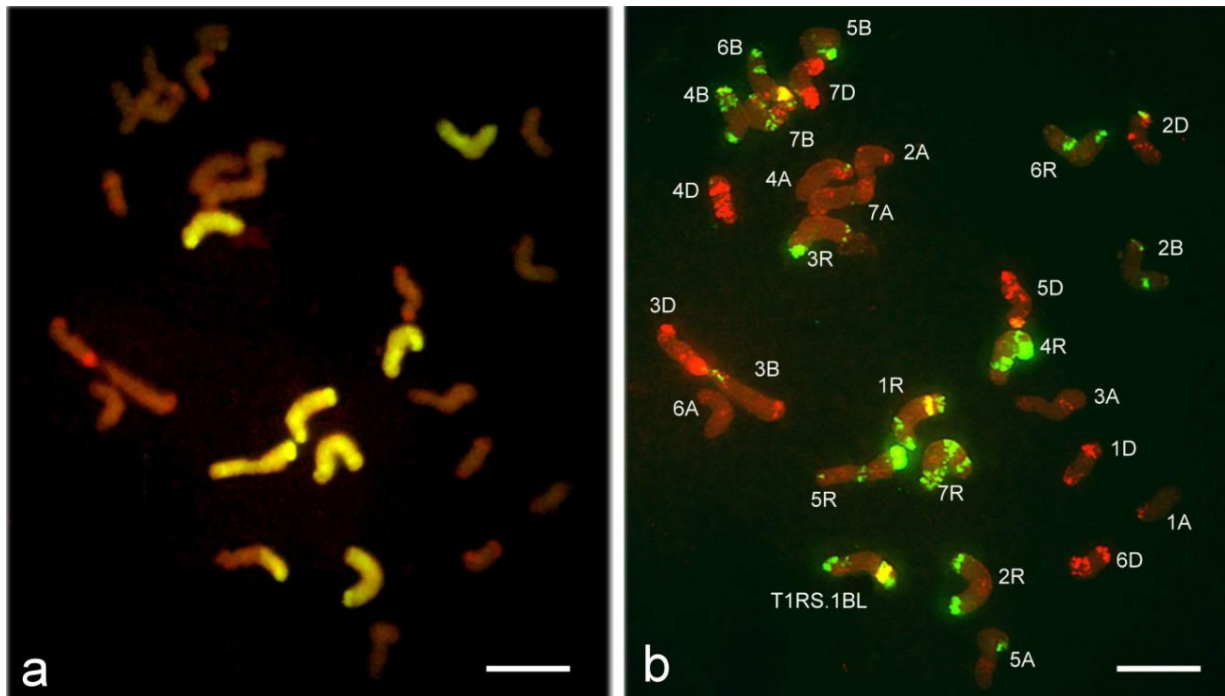
¹: I= univalens, II= bivalens, III= trivalens

*: Egy serpenyő és egy lánc formájú trivalens

** : Hat lánc trivalens

Az 1RS rozs kromoszómakarak közötti párosodások száma 133 volt, ezt az adatot a további összehasonlításoknál mellőztük, mivel kutatásunk tárgya nem a rozs kromoszómák közötti homológ párosodás tanulmányozása volt. Az 1BL.1RS-1RS-től eltérő kromoszóma-asszociációk

(194 db) (1. táblázat) csaknem kizárólag (93.8%) a búza kromoszómák közötti párosodásnak volt köszönhető (2. táblázat). A búza–rozs, illetve rozs–rozs kromoszómák közötti asszociációk száma jelentősen kisebb volt (5,2 és 1,0 %). A párosodott kromoszómák konfigurációja szinte kizárólag nyílt bivalensekre korlátozódott, a multivalens formációk nagyon ritkán fordultak elő, mindössze néhány trivalenst figyeltünk meg.



11. ábra *In situ* hibridizáció a búza × rozs F_1 hibridek meiózisének I. metafázisában lévő kromoszómáin. A genom *in situ* hibridizáció (GISH) fotóján (a) a rozs kromoszómák és az 1BL.1RS transzlokációban lévő 1RS rozskar sárgás-zölden jelölődött, míg a búza kromoszómák jelöletlenek maradtak. Az azonos pollenanyasejten végzett fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) (b) fotóján a pSc119.2 próbák jelei zölden, az Afa family próbáké vörösén, a pTa71 próbáké sárgán láthatóak. Skála= 10 μ m

4.2.2 Meiotikus kromoszómák vizsgálata repetitív DNS próbákkal, búza × rozs F_1 hibridekben

Az egyes kromoszóma-asszociációk azonosítása céljából a GISH során kapott hibridizációs mintázatot lemostuk és a kromoszómapreparátumokon FISH-t végeztünk el, Afa family, pSc119.2 és pTa71 próbákkal (11b. ábra).

A FISH kivitelezése után a meiózisban történő azonosítást nehezítette, a meiotikus kromoszómák megnyúlt alakja, de a kromoszómák FISH mintázata nagyfokú hasonlóságot mutatott a búza és rozs kromoszómák mitózisban megfigyelt mintázatával.

Erős Afa family mintázatot figyeltünk meg a D genom kromoszómáin, míg a pSc119.2 próba főként a rozs és a búza B genomjának kromoszómáihoz hibridizált. A pTa71 próba erős jelet adott a szatellites 1R rozs és a 6B búza kromoszóma NOR régiójában, valamint gyengébb jelet detektáltunk a 3D és 5D búzakromoszómák rövid karjain. Szintén erős pTa71 jel található a szatellites 1B búza kromoszómán, de ez a kromoszómakar az 1BL.1RS transzlokáció jelenléte miatt hiányzik a genetikai anyagból. Az A genom kromoszómáit a gyenge Afa family mintázat és a 4A és 5A kromoszómákon található jellegzetes pSc119.2 jel alapján azonosítottuk.

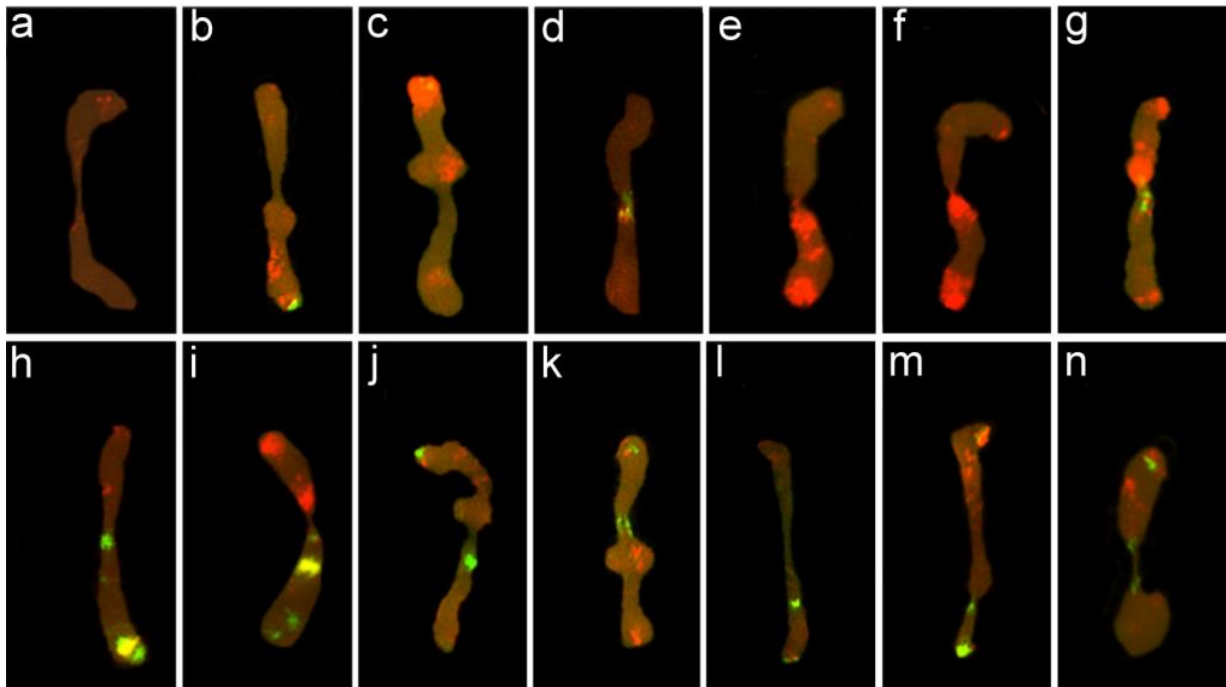
A búza–búza kromoszóma-asszociációk mindegyike (182 db) azonosítható volt genomi szinten (2. táblázat); ezek közül kettő búza–búza kromoszóma-asszociáció azonosítása nem volt lehetséges a FISH mintázat alapján (12. ábra m-n.). A 180 db azonosított kromoszóma-asszociáció közül kromoszómakar szinten 129 búza–búza asszociációt tudtunk a FISH mintázat alapján azonosítani (3. táblázat).

Az eredmények azt mutatják, hogy az intergenomikus kromoszómapárosodások gyakorisága nagyobb az F_1 hibridben, mint az intragenomikus párosodásoké. A leggyakoribb az A–D kromoszóma-asszociáció volt mindkét keresztezési kombinációban (sejtenként 0,342 és 0,354) (2. táblázat és 12. ábra a-f.). A B és D genomok közötti kromoszómapárosodások gyakorisága ennél kisebb volt (a két keresztezési kombinációban 0,190 és 0,226 gyakorisággal). Legkisebb gyakorisággal az A és B genomhoz tartozó kromoszómák párosodtak (párosodási gyakoriság: 0,038 és 0,056). A párosodott kromoszómák túlnyomó része homeológ kromoszóma volt, az intragenomikus A–A, B–B és D–D kromoszóma-asszociációk nagyon ritkán fordultak elő.

2. táblázat A búza × rozs F₁ hibridekben előforduló inter- és intragenomikus kromoszóma-asszociációk gyakorisága a meiózis I. metafázisában

Kombináció	Sejtek száma	búza-búza							búza-rozs				rozs-rozs ¹
		A-A	A-B	A-D	B-B	B-D	D-D	összesen	A-R	B-R	D-R	összesen	R-R
Mv Magdaléna kr1 × rozs	79	0,101	0,038	0,342	0,000	0,190	0,013	0,684	0,000	0,013	0,025	0,038	0,013
Mv Béres kr1 × rozs	195	0,005	0,056	0,354	0,005	0,226	0,010	0,656	0,010	0,015	0,010	0,036	0,005
Összesen	274	0,033	0,051	0,350	0,004	0,215	0,011	0,664 (93,8%)	0,007	0,015	0,015	0,036 (5,2%)	0,007 (1,00%)

¹A rozs kromoszómák közötti asszociációk gyakorisága nem tartalmazza az 1BL.1RS transzlokációt hordozó és az 1RS kromoszómakar párosodását.



12. ábra Búza-búza kromoszóma-asszociációk FISH mintázata. a-f.: Homeológ kromoszóma-asszociációk a búza A és D genomja között: a. 1DS-1AS, b. 2AL-2DL, c. 3DL-3AL, d. 5AS-5DS, e. 6AL-6DL, f. 7AL-7DL. g-j.: Homeológ kromoszóma-asszociációk a búza B és D genomja között: g. 3DS-3BS, h. 1DL-1BL, i. 6DS-6BS, j. 5DL-5BL. k.: nem homeológ asszociáció az 1D és 7B kromoszómák hosszú karjai között (1DL-7BL). l.: homeológ asszociáció a 2A és 2B kromoszómák hosszú karjai között (2AL-2BL). m-n.: azonosítatlan búza-búza kromoszóma-asszociációk

4.2.3 Búza-búza kromoszómakar-asszociációk típusa és gyakorisága

A búza-búza kromoszóma-asszociációban résztvevő kromoszómakarok többsége azonosítható volt a hexaploid búza mitózisban készült FISH kariotípusa ismeretében (12. ábra a-n.), melyeket a párosodási gyakoriságuk alapján hasonlítottunk össze (kromoszómakar-asszociációk száma/sejt) (3. táblázat).

Az A–D asszociációk között elsődlegesen a hosszú karok párosodását figyeltük meg (3. táblázat), a szignifikánsan leggyakoribb párosodás (0,048) a 3A és 3D kromoszómák hosszú karjai között volt. Az A és D kromoszómák rövid karjai csak nagyon ritkán párosodtak.

Érdekes párosodási kapcsolatot figyeltünk meg a B és D kromoszómák között (12. ábra g-j.). Az összes párosodási gyakoriság alacsonyabb volt (0,004-0,018), mint azt az A és D kromoszómakarok

3.táblázat FISH vizsgálattal azonosított búza-búza kromoszómakar-asszociációk gyakorisága (asszociáció/pollenanyasejt)

	Kromoszóma- asszociáció	Mv Magdaléna kr1 × rozs	Mv Béres kr1 × rozs	Összesen
Homológ kromoszóma-asszociációk	1AS-1DS	0.000	0.005	0.004
	1AL-1DL	0.013	0.031	0.026
	1DL-1BL	0.000	0.026	0.018
	2AS-2DS	0.013	0.005	0.007
	2AL-2DL	0.025	0.031	0.029
	2AS-2BS	0.013	0.000	0.004
	2AL-2BL	0.013	0.010	0.011
	2DS-2BS	0.013	0.000	0.004
	2DL-2BL	0.013	0.021	0.018
	3AS-3DS	0.025	0.000	0.007
	3AL-3DL	0.063	0.041	0.048***
	3DS-3BS	0.089	0.123	0.113***
	3DL-3BL	0.013	0.005	0.007
	4AL-4DL	0.000	0.005	0.004
	4DL-4BL	0.000	0.010	0.007
	5AS-5DS	0.013	0.010	0.011
	5DL-5BL	0.013	0.005	0.007
	6AS-6DS	0.013	0.015	0.015
	6AL-6DL	0.051	0.026	0.033
	6AS-6BS	0.013	0.005	0.007
	6DS-6BS	0.000	0.005	0.004
7AL-7DL	0.025	0.015	0.018	
7AL-7BL	0.000	0.010	0.007	
7DS-7BS	0.013	0.000	0.004	
7DL-7BL	0.000	0.005	0.004	
	Átlag			0.016
Nem homológ kromoszóma-asszociációk	3AS-6DS	0.025	0.000	0.007
	3AL-4AL	0.000	0.005	0.004
	4AL-5DL	0.013	0.000	0.004
	1DS-4DL	0.000	0.005	0.004
	1DL-7BL	0.000	0.005	0.004
	2DS-6BS	0.013	0.000	0.004
	2DL-5BS	0.013	0.000	0.004
	3DS-6BS	0.000	0.005	0.004
	3DL-4BL	0.000	0.005	0.004
	4DL-6BS	0.000	0.005	0.004
	4BS-7BS	0.000	0.005	0.004
		Átlag		

***: A kromoszómakar-asszociációk megfigyelt és elméleti gyakorisága közötti szignifikáns különbség, $P=0,001$ szignifikancia szinten.

között tapasztaltuk, kivéve egy kromoszómakar-asszociációt (3DS és 3BS). A kromoszómapárosodási gyakoriság mindkét búza × rozs hibrid kombinációban szignifikánsan nagyobb (0,113) volt annál, mint amit az összes többi kromoszómakar-asszociáció esetében megfigyeltünk. Meg kell még jegyezni, hogy a nem homeológ párosodások is főként a B és D genom között történtek, de a gyakoriságuk alacsony volt (12. ábra k.).

Az A és B kromoszómák közötti párosodást csak kis számban észleltünk, a legmagasabb párosodási gyakoriságot a 2AL és 2BL kromoszómakarok között mutattuk ki (párosodási gyakoriság: 0,011, 12. ábra l.).

Vizsgáltuk azokat a kromoszómákat, melyek a vizsgált sejtekben nem párosodtak egy másik kromoszómával sem. Mindössze négy ilyen kromoszómakart találtunk: 4AS, 5AL, 6BL és 4DS.

A kromoszómakar-asszociációk statisztikai értékelésére χ^2 próbát alkalmaztunk, melynek eredménye megerősített a 3-as homeológ csoport kromoszómái közti párosodások gyakoriságát. A szignifikánsan legmagasabb párosodási gyakoriság a 3A és 3D kromoszómák hosszú karja valamint a 3D és 3B kromoszómák rövid karja között volt kimutatható.

4.2.4 Meiotikus kromoszómák vizsgálata *Triticum turgidum* subsp. *durum* × *Triticum monococcum* F₁ hibridben

A *T. monococcum*-ból a tetra- és hexaploid búzába történő génátvitel optimálisan homeológ kromoszóma átrendeződések létrejöttével valósítható meg. A homeológ transzlokáció kialakulásának feltétele a rekombináció, ami a kromoszómák meiotikus párosodása révén jön létre. Az eddigi molekuláris citogenetikai kutatásaink az A és A^m genom nagyfokú hasonlóságát támasztották alá, ami alapján nagy volt a valószínűsége a homeológ rekombinációk kialakulásának olyan genotípusokban, melyek a búza genetikai háttérben *T. monococcum* kromoszómákat hordoznak. A kromoszómák közötti hasonlóságot és későbbi transzlokációk kialakulásának valószínűségét az F₁ hibridek kromoszómáinak meiózisban történő párosodása is jól jelzi. Munkánk során ezért vizsgáltuk az A és A^m kromoszómák közötti párosodást a mindkét genomot teljes egészében tartalmazó *T. turgidum* subsp. *durum* (MVTD14-04) × *T. monococcum* (1T-1) F₁ hibridek meiózisének metafázisában.

Összesen 97 darab meiózis I. metafázisában lévő pollenanyasejtben egymást követő GISH-sel és FISH-sel vizsgáltuk (13. ábra) a kromoszómapárosodások eloszlását (4. táblázat). Legnagyobb arányban sejtenként 5 (36,1 %), vagy 6 (24,7 %) bivalenst figyeltünk meg.

4. táblázat A vizsgált *Triticum turgidum* subsp. *durum* × *Triticum monococcum* hibrid pollenanyasejtjeinek (n=97) eloszlása a párosodott kromoszómák száma szerint

	Meiotikus konfiguráció ¹							
	17 ^I +2 ^{II}	15 ^I +3 ^{II}	13 ^I +4 ^{II}	12 ^I +3 ^{II} +1 ^{III}	11 ^I +5 ^{II}	9 ^I +6 ^{II}	9 ^I +3 ^{II} +2 ^{III}	7 ^I +7 ^{II}
Sejtek száma (db)	6	13	14	2	35	23	1	3
Eloszlás (%)	6,2	13,4	14,4	2,1	36,1	23,7	1	3,1

¹: I= univalens, II= bivalens, III= trivalens

Az eredmények a tetraploid búza × *T. monococcum* F₁ hibrid kromoszómáinak nagyfokú párosodását támasztották alá (5. táblázat). A vizsgált pollenanyasejtekben a megfigyelt összes kromoszóma asszociáció 667 volt, ennek pollenanyasejtenkénti átlagos értéke: 6,88 (összes kromoszóma asszociáció/ vizsgált sejtek száma) ami jóval gyakoribb, mint azt a búza × rozs hibridek esetében tapasztaltuk (0,66 ; 2. táblázat). A kromoszómák ilyen nagyarányú párosodása az A genomok közötti hasonlósággal magyarázható.

5. táblázat *Triticum turgidum* subsp. *durum* (MvTD14-04) × *Triticum monococcum* (1T-1) hibridek meiotikus konfigurációja a meiózis I. metafázisában

Kombináció	Sejtek száma	Meiotikus konfiguráció (összes konfiguráció/sejt) ¹				Kromoszóma asszociációk (összes kromoszóma asszociáció/ vizsgált sejtek)
		I	nyílt II	gyűrű II	III*	
MVTD14-04 × 1T-1	97	11,58	3,05	2,14	0,04	6,88

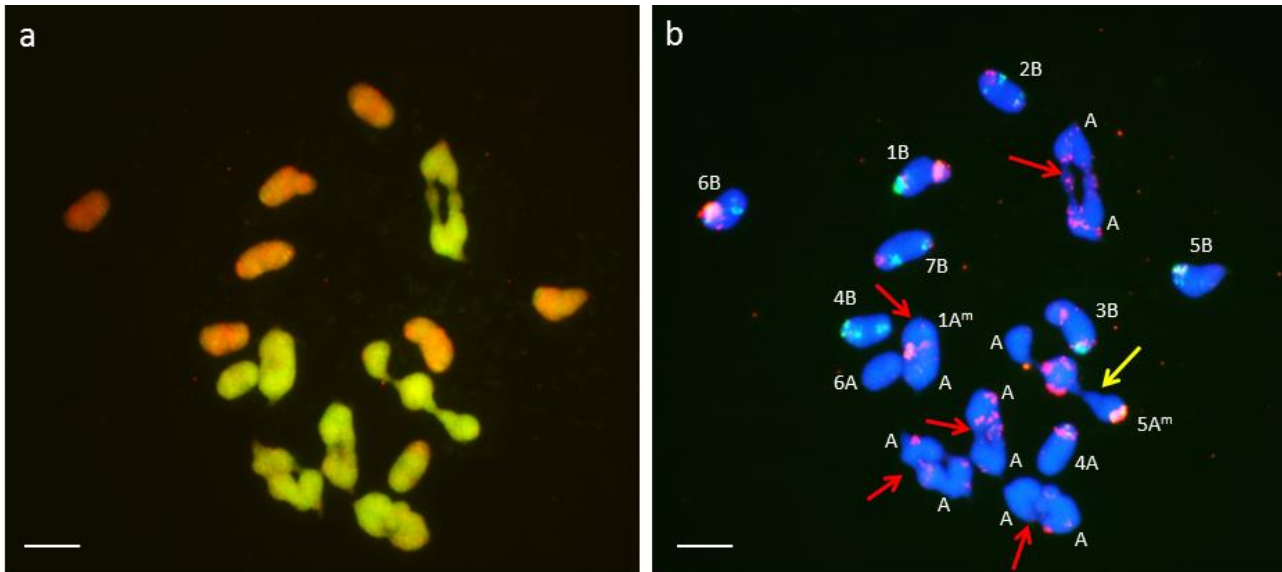
¹: I= univalens, II= bivalens, III= trivalens

*: 1 db serpenyő és 3 db lánc formájú trivalens

Az ABA^m genomösszetételű F₁ hibriden végzett genomi *in situ* hibridizáció során jelölt *Ae. speltoides* (B genom donor) és jelölt *T. urartu* (A genom donor) genomi DNS próbát hibridizáltunk az ABA^m genomösszetételű F₁ hibridek meiotikus kromoszóma preparátumain. A GISH-t követően mind az A és A^m, mind a B kromoszómák erős fluoreszcens jelölődésének köszönhetően egyértelműen elkülöníthetők voltak egymástól (13. ábra a.).

A GISH vizsgálat lehetővé tette, hogy genomi szinten azonosítsuk a kromoszómapárosodásokat (6. táblázat). Ahogy az várható volt, legnagyobb arányban az A és A^m kromoszómák párosodtak

egymással (99,7%), az A és B kromoszómák csak nagyon ritkán párosodtak (0,3 %), míg B kromoszómák közötti asszociációt nem figyeltünk meg.



13. ábra *In situ* hibridizáció *Triticum turgidum* subsp. *durum* × *Triticum monococcum* F₁ (2n=3x=21, ABA^m) hibrid meiózisének I. metafázisában lévő kromoszómáin. A genomi *in situ* hibridizáció (GISH) fotóján (a) az A és A^m kromoszómák zölden, a B kromoszómák narancssárga színnel jelölődtek. Az azonos pollenanyasejten végzett fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) fotóján (b) az Afa family próba jelei pirosan, a pTa71 próbáé sárgán és a pSc119.2 próbáé zölden láthatók. A hat bivalens közül egy nyílt- (sárga nyíllal jelölve), öt pedig zárt (gyűrű) bivalenst (piros nyíllal jelölve) alkotott. Skála= 10 μm

6. táblázat A *Triticum turgidum* subsp. *durum* × *Triticum monococcum* F₁ hibridekben előforduló intra- és intergenomikus kromoszóma asszociációk gyakorisága a meiózis I. metafázisában

Kombináció	Sejtek száma	Kromoszóma asszociációk			
		A ^m -A	A-B	B-B	Összesen
MVTD14-04 × 1T-1	97	6,86 (99,7%)	0,02 (0,3 %)	0,00 (0,0%)	6,88 (100%)

A kromoszómák azonosítását FISH-el nem tudtuk minden esetben elvégezni, ami a bivalens kromoszómák megváltozott struktúrájával magyarázható (13. ábra b.). A kromoszómák azonosítása a vizsgált sejtekben szinte kizárólag az univalensekre, illetve a nyílt bivalensekre korlátozódott. Kísérletet tettünk annak megállapítására, hogy melyek azok az A kromoszómák, amelyek nagy gyakorisággal nem párosodnak, mivel mindössze a vizsgált sejtek 3,1 százalékában figyelhető meg

mind a 7db A és A^m kromoszóma párosodása. A kis gyakorisággal párosodó kromoszómák vélhetően kisebb gyakorisággal rekombinálnának.

Olyan sejteket választottunk ki erre a célra, melyekben 5, vagy 6 bivalens található, mivel ilyen meiotikus konfigurációt figyeltünk meg a legnagyobb gyakorisággal. A kiválasztott sejtek (n=11) mindegyikében az univalensként lévő A kromoszómák között azonosítható volt a 4A búzakromoszóma és a sejtek felében 1 vagy 2 darab 6A kromoszóma. A 6A kromoszóma búza, vagy *T. monococcum* eredetét nem tudtuk tisztázni a gyenge és hasonló hibridizációs mintázat miatt. Emellett még 3A^m és 5A^m univalenseket is azonosítottunk. A vizsgált sejtek kis száma miatt statisztikailag nem tudtuk igazolni az univalens A kromoszómák eltérő előfordulási gyakoriságát.

4.2.5 A kromoszómapárosodási vizsgálatok eredményeinek megvitatása

A búza × rozs F₁ hibridek meiotikus kromoszóma preparátumain végzett szekvenciális GISH és FISH bizonyította, hogy az egymás után végzett *in situ* hibridizáció alkalmas az idegen fajú hibridek kromoszómapárosodásának genomi és kromoszóma szintű vizsgálatára. Mindezek alapján jó eséllyel használható a módszer a *T. monococcum* és búza kromoszómák közötti párosodás vizsgálatára is.

Cifuentes et al. (2006) és Cifuentes és Benavente (2009) genomi és repetitív DNS (pTa71) próbával végeztek egy lépéses *in situ* hibridizációt a meiotikus kromoszómapárosodások vizsgálatára búza × idegen fajú hibridekben, de az általuk alkalmazott próbák csak három búza kromoszóma azonosítását (4A, 1B és 6B) tették lehetővé. Búza × rozs hibridek meiotikus kromoszóma preparátumain végeztek egymást követő FISH-t Cuadrado et al. (1997) öt repetitív DNS próbával (pSc74, pSc119.2, pAs1, pTa71, pTa794) és a vizsgálataik eredményeképpen a búza kromoszómák többsége azonosítható volt. A GISH és FISH technikák egymás után történő alkalmazásával maximalizálható a búza és az idegen kromoszómák meiotikus párosodásának elemzésével kapható információ (genomok megkülönböztetése és az egyedi kromoszómák azonosítása).

A GISH vizsgálat igazolta, hogy a búza–búza kromoszóma asszociációk száma magasabb volt, mint a búza–rozs illetve rozs–rozs kromoszóma asszociációk száma a két búza × rozs F₁ hibridben a *Ph1* gén jelenlétében. A két hibridben megfigyelt hasonló párosodási gyakoriság oka a szülői genotípusok közeli rokonságával magyarázható (Molnár-Láng et al. 2010). Az általunk megfigyelttől gyakoribb búza–búza kromoszómapárosodásról számoltak be Miller et al. (1994), valamint Cuadrado et al. (1997) *Ph1* gént tartalmazó és anélküli búza × rozs hibridekben, ami arra utal, hogy a búzát alkotó genomok közötti homológia sokkal nagyobb, mint a búza és a rozs genomok közötti. Hasonló eredményekről számolt be Naranjo és Fernández-Rueda (1996) is. A

búza és a rozs kromoszómák közötti kis párosodási gyakoriságra ad magyarázatot Devos et al. (1993) munkája. A búza és a rozs RFLP markerekkel végzett összehasonlító genomikai elemzés során azt tapasztalták, hogy a rozs kromoszóma karok mindegyike legalább egy evolúciós átrendeződésen ment keresztül a búzához képest.

Megállapítható, hogy a két hibridben megfigyelt, viszonylag magas kromoszóma-asszociáció gyakoriság (1,06 és 1,25) a rozs 1R kromoszómájának rövid karja és az 1BL.1RS transzlokáció 1RS karja közötti gyakori párosodásnak tulajdonítható.

Az A, B és D genomok megkülönböztetésével kimutathatóvá vált az A–D párosodások túlsúlya, melyet a B–D és A–B asszociációk követtek (2. táblázat). Megfigyeléseink *Ph1* lokusz jelenlétében hasonlóak a búza haploidok A, B és D genomjának N sávozásával kapott eredményeihez, melyek azt bizonyították, hogy a meiózis I. metafázisában a kromoszóma-asszociációk 80 százaléka az A és D genomok között történik a *ph1b* mutáció jelenlétében (Jauhar et al. 1991), melyet az A–B és B–D asszociációk követnek. Az A–D asszociációk dominanciáját mutatták ki Naranjo et al. (1987) is, akik C-sávozással három különböző *T. aestivum* ‘Chinese Spring’ × rozs kombináció (5B hiányos, 3D hiányos és normál búzagenotípus használatával) meiotikus kromoszómapárosodását vizsgálta. Kísérleteikben azt is bizonyították, hogy a 3-as és 6-os homeológ csoport esetében a B–D kromoszómák közötti párosodási gyakoriság nagyobb volt, mint az A–B kromoszómák párosodásáé. Búza × rozs, illetve búza × *Ae. geniculata* hibrideken végzett további tanulmányok szintén az A–D asszociációk túlsúlyát támasztják alá (Cuadrado et al. 1997, Cifuentes és Benavente 2009). Az A–D asszociációk túlsúlya arra utal, hogy az A és D genomok közötti homológia nagyobb, mint az A és B, vagy a D és B genomok közötti. Ez azzal függhet össze, hogy a B genom kromoszómái erősebben heterokromatikusak, mint az A és D genomhoz tartozóké és sokkal nagyobb hajlandóságot mutatnak az átrendeződésre (Badaeva et al. 2007, Qi et al. 2006). Valószínűleg ezek a szerkezeti különbségek akadályozzák az A–B és D–B intergenomikus kromoszómapárosodások létrejöttét.

A kromoszómák hosszú karjainak, a rövid karokhoz viszonyított gyakoribb párosodása (3. táblázat) alátámasztja Naranjo et al. (1987) korábbi megfigyelését. A hosszú kromoszómakarok rövidkekhöz viszonyított gyakoribb párosodása a 3A–3D kromoszómáknál volt megfigyelhető, ahol az asszociációk gyakorisága sokkal nagyobb (0,048) volt a hosszú karok esetén (3AL–3DL), mint azt a rövid karoknál (3AS–3DS) megfigyeltük (0,007). Ezzel szemben leggyakrabban a 3B és 3D kromoszómák rövid karjai között fordult elő kromoszóma asszociáció. Ettől eltérő eredményt kaptak Naranjo et al. (1987), akik a 3-as homeológ kromoszómák közül a 3AL–3DL kromoszómakarok párosodását figyelték meg legnagyobb gyakorisággal. Eredményeink a 3B és 3D kromoszómák megnövekedett párosodási gyakoriságát bizonyítják, ami összefüggésben lehet a búza 3-as kromoszóma csoportjában megfigyelhető EST szekvenciák fizikai pozíciójának

rendellenességével. A Munkvold et al. (2004) által leírt 12 multi EST anomália közül, melyet a búza 3-as homeológ kromoszómáinak térképezése során figyeltek meg, 7 a 3B és 3D kromoszóma között volt. Munkájukban arra utaltak, hogy az eltérések oka a 3B és 3D kromoszómák közötti átrendeződés lehetett. A 3BS–3DS kromoszóma asszociációk megnövekedett gyakorisága indokolható a 3B és 3D kromoszómák közötti nagyfokú átrendeződéssel. Korábban már utaltunk arra, hogy a teloméráknak fontos szerepe van a homeológ kromoszómák felismerésében a meiózis korai szakaszában (Prieto et al. 2004, Martinez-Perez et al. 2000). A telomérés és szubtelomérés pozícióban található konstitutív heterokromatikus sávok mintázata (Gill et al. 1991) az A és D kromoszómák, valamint a 3BS és 3DS karok hasonlóságát jelzi, ami okozhatja a megnövekedett párosodási gyakoriságot. Mindazonáltal, a 3B és 3D kromoszómák közötti gyakori kromoszómapárosodás magyarázata további vizsgálatokat igényel.

Eredményeink bizonyítják, hogy a szekvenciális FISH és GISH eredményesen alkalmazható búza \times idegen fajú hibridekben a különböző genomok közötti homeológia tanulmányozására az egyedi kromoszómák szintjén bekövetkező meiotikus kromoszómapárosodások azonosításával. Mindez azt is jelzi, hogy e technikával tanulmányozható a búza és a *T. monococcum* kromoszómák párosodása is.

Az ABA^m genomösszetételű *T. turgidum* subsp. *durum* \times *T. monococcum* F₁ hibridek meiotikus kromoszóma preparátumán végzett *in situ* hibridizációval kimutattuk, hogy az A és A^m kromoszómák nagy számban párosodnak egymással, így nagy gyakorisággal várható a rekombinánsok kialakulása a két faj között. Az A és A^m genomok közötti nagyfokú hasonlóság nem teszi lehetővé a GISH-sel történő megkülönböztetésüket. *T. monococcum* eredetű hibrideken eddig még nem végeztek molekuláris citogenetikai vizsgálatot meiózisban, korábban a kromoszómapárosodásokat Feulgen módszerrel értékelték és csak valószínűsítették, hogy a párosodott kromoszómák az A és az A^m genomokhoz tartoznak (Vardi és Zohary 1967, The és Baker 1975, Gill et al. 1988). Munkánk során elsőként vizsgáltunk ABA^m genomösszetételű hibrideket egymást követő GISH-el és FISH-el. A GISH-el kapott eredményeink azonban mindet kétséget kizáróan bizonyították, hogy az ABA^m genomösszetételű F₁ hibridben csaknem kizárólag az A és A^m kromoszómák párosodtak egymással. Az ABA^m genomösszetétellel rendelkező F₁ hibrid kromoszómapárosodásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált pollenanyasejtek többségében (50% felett) 5 és 6 bivalens volt megfigyelhető, ami megegyezik az irodalomban felelhető adatokkal (Vardi és Zohary 1967, The és Baker 1975). Összehasonlításként Vardi és Zohary (1967) S¹ genommal rendelkező *Ae. longissima*-val is keresztezett durumbúzákat, ahol azonban csak univalensek voltak megfigyelhetők, a bivalensek előfordulási gyakorisága nagyon kicsi volt (1,15/pollenanyasejt), ami arra utal, hogy az A és A^m genom között szorosabb homológia áll fenn, mint a B és az S¹ genom között. A nagyfokú

homológia növeli a kromoszómapárosodás esélyét, ami végső soron a rekombináció feltétele. A kromoszómapárosodás és a rekombinációs gyakoriság nem 1:1 arányban feleltethető meg egymásnak (Benavente et al. 1996), mégis igaz az, hogy minél nagyobb arányban párosodik egymással két kromoszóma annál nagyobb arányban várható köztük rekombináció. A *T. monococcum* A^m genomja és a poliploid búzák A genomjai közötti hasonlóság, amit a kromoszómapárosodási adatokkal is alátámasztottunk megfelelő alapot szolgáltat rekombináció előfordulásához.

4.3 *Triticum monococcum* kromatint tartalmazó genetikai anyag előállítása

4.3.1 Génbanki *Triticum monococcum* tételek jellemzése

A martonvásári Gabona Génbankban található diploid *Triticum* tételek közül 145 genotípust vizsgáltunk az MTA ATK Mezőgazdasági Intézetének lászlópusztai tenyészkertjében 2013-ban (14. ábra), melyek között termesztett és vad *T. monococcum* és *T. uratu* génbanki tételek egyaránt voltak (7. táblázat).



14.ábra Génbanki *Triticum monococcum* és *Triticum urartu* tételek szántóföldi kísérlete. Martonvásár, 2013
A 2013-as évjárat kedvezett a különböző vad és termesztett *Triticum* fajok szántóföldi értékelésének. A kissé hűvösebb és csapadékos tavasznak köszönhetően Martonvásáron a búza kórokozói közül a sárga- és a levélrozsa erős fertőzést okozott, emellett jelentős

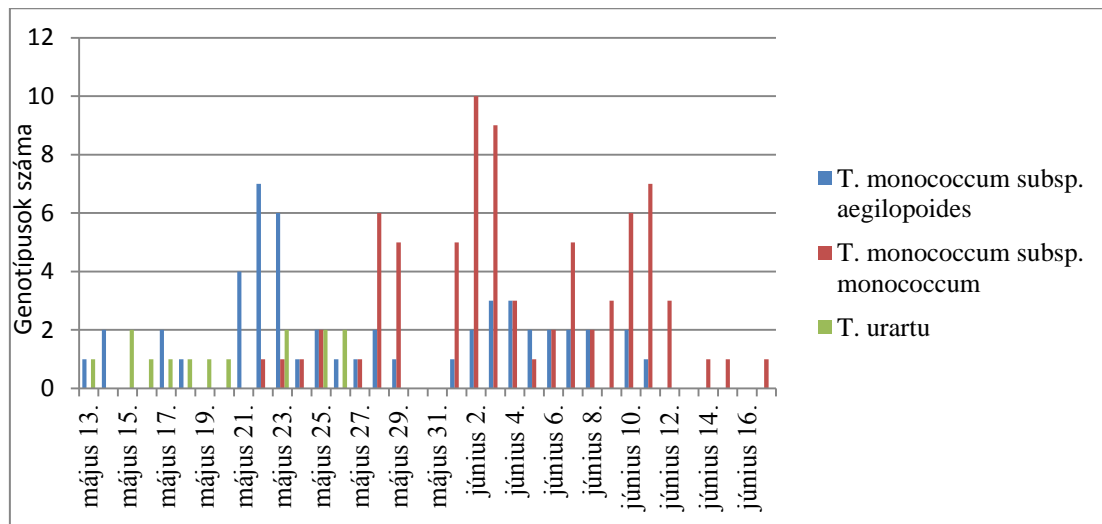
lisztharmatfertőzést is megfigyeltünk a területen. A diploid *Triticum* fajokon belül a *T. urartu*-n észleltünk jelentősebb lisztharmat-fertőzést, a vizsgált genotípusok több mint fele mutatott fogékonyságot, továbbá egy génbanki tételen levélrozsdat is találtunk. Ezzel szemben a *T. monococcum* tételek rezisztensek voltak mind a lisztharmat, mind pedig a levélrozsda fertőzéssel szemben. Egyetlen vad *T. monococcum* genotípusnál észleltünk közepes lisztharmat fogékonyságot. A vegetációs időszakban feljegyeztük a genotípusok kalászolási idejét és mértük a növények magasságát. Az fajoként összesített adatok a 7. táblázatban láthatók, ahol feltüntettük az előnemesítési programunkban használt *T. monococcum* subsp. *monococcum* '1T-1' és Mv9kr1 őszi búza genotípus adatait is.

7. táblázat Diploid *Triticum* tételek összesített adatai fajonként csoportosítva. Martonvásár, 2013

	Vizsgált tételek száma (db)	Kalászolási idő (nap) [átlag]	Növénymagas ság (cm) [átlag]	Lisztharmat fertőzöttség ¹	Levélrozsda fertőzöttség ¹
<i>T.monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	75	május 21- június 17 [június 4]	70-140 [130]	0 (75 genotípus)	0
<i>T. monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i>	54	május 13- június 11 [május 28]	45-165 [125]	7 (1 genotípus), 0 (53 genotípus)	0
<i>T. urartu</i>	14	május 13-26 [május 20]	84-125 [108]	6-8 (6 genotípus), 0 (8 genotípus)	5 (1 genotípus) 0 (13 genotípus)
'Mv Alkor' (<i>T. monococcum</i>)	1	május 22	115	0	0
'1T-1' (<i>T. monococcum</i>)	1	május 21	70	0	0
'Mv9kr1' (<i>T. aestivum</i>)	1	május 13	70	4	5

¹: 0-9 skála, 0 = tünetmentes, 9 = nagyon fogékony

A génbanki diploid *Triticum* fajok a megfigyelt tulajdonságok közül a legnagyobb diverzitást a kalászolási idő tekintetében mutatták (15. ábra). A legkorábbi genotípusok a *T. urartu* tételek voltak, egyes vad *T. monococcum* genotípusok is korán kalászoltak, de a különböző tételek kalászolása időben jobban elhúzódott, mint a *T. urartu* tétéleké. Legkésőbbben a termesztett *T. monococcum* genotípusok kalászoltak. A kalászolási időben lévő változatosság ismerete lényeges a későbbi keresztezések tervezéséhez.



15.ábra A diploid *Triticum* fajok genotípusainak kalászolási idő szerinti eloszlása, Martonvásár, 2013

4.3.2 *Triticum aestivum* × *Triticum monococcum* keresztezések

4.3.2.1 F₁ hibridek előállítása

A hagyományos és féltörpe *T. monococcum* genotípusok hexaploid búzával történő keresztezhetőségének vizsgálatához két egymást követő évben poroztuk be a keresztezhetőségi (*kr₁*) gént hordozó (Mv9kr1) és anélküli (Mv9) búza genotípust hagyományos (Mv Alkor) és féltörpe (1T-1) alakokkal. A termékenyített virágok számát és a fertilitási adatokat a 8. táblázat tartalmazza. Mind a hagyományos, mind pedig a féltörpe alakor genotípus pollenadóként való használatával kaptunk F₁ szemeket, de a féltörpe alakorral végzett keresztezések mindkét évben eredményesebbek voltak (nagyobb szemkötési arány). Jelentős különbséget tapasztaltunk az évjáratok között annak ellenére, hogy mindkét évben fitotronban neveltük az anyanövényeket és a megporzásokat is ott végeztük el a tenyészkertben begyűjtött virágzó alakor növények levágott kalászaival. Erre azért volt szükség, mert az anyaként használt Mv9kr1 jellemzően május elején kalászol (2010-ben május 13-án, 2011-ben május 14-én), míg a pollenadó *T. monococcum* genotípusok május végén, pár napos eltéréssel (2010-ben az Mv Alkor május 30-án, az 1T-1 május 29-én, 2011-ben az Mv Alkor május 29-én, az 1T-1 május 27-én kalászolt a tükrösi tenyészkertben). A két *T. monococcum* genotípussal előállított F₁ szemek csírázó képessége is jelentősen eltért. A hagyományos típussal előállított hibrid szemeknek legfeljebb 10 százaléka csírázott, és a növények nagy része még kalászás előtt elpusztult. A féltörpe *T. monococcum*-mal létrehozott kombinációk F₁ szemeinek 60-70%-a csírázóképes volt (8. táblázat). Az F₁ szemek közötti különbség szabad szemmel is jól látható volt (16. ábra).

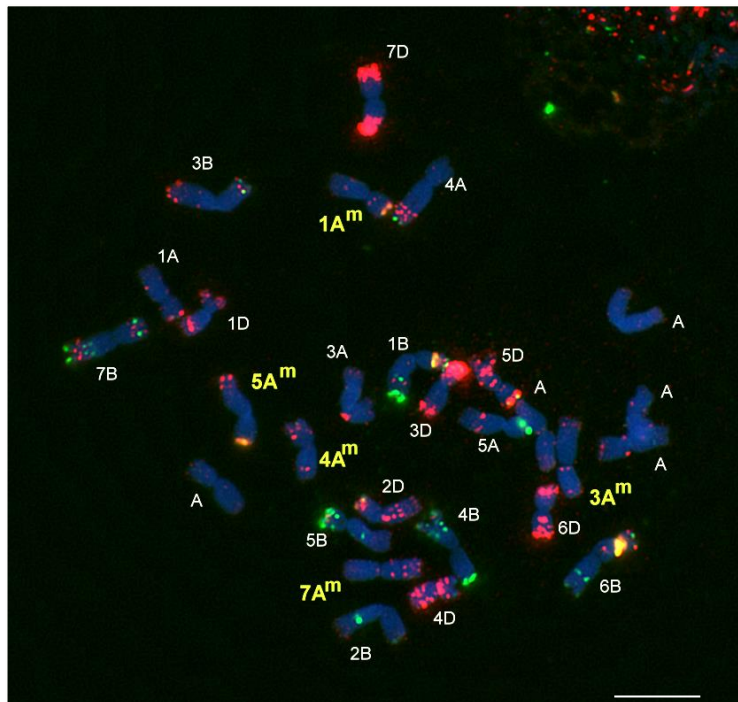
8. táblázat Hagyományos típusú (Mv Alkor) és féltörpe (1T-1) *Triticum monococcum* genotípusok keresztezhetősége a jól keresztezhető Mv9kr₁ törzssel és a Martonvásári 9 őszi búzafajtaival.

Anya	Pollenadó	Keresztezés éve	Megporzott virágok száma (db)	F₁ szemek száma (db)	Szemkötés (%)	Csírázott szemek száma (db)	F₁ szemek csírázása (%)	Felnevelt F₁ növények száma (db)
Mv9kr ₁	Mv Alkor	2010	211	66	31,42	7	10,06	2
Mv9kr ₁	1T-1	2010	195	106	53,91	71	66,03	36
Mv9kr ₁	Mv Alkor	2011	200	9	4,50	1	11,11	0
Mv9kr ₁	1T-1	2011	182	11	6,04	7	63,63	5
Mv9	Mv Alkor	2011	152	2	1,32	0	0,00	0
Mv9	1T-1	2011	164	4	2,44	4	100,00	3



16. ábra Hexaploid búza (Mv9kr1) és *Triticum monococcum* keresztezésével előállított F₁ szemek. A pollenadó a bal oldali szemek esetében a hagyományos típusú Mv Alkor, a jobb oldali szemeknél a féltörpe 1T-1

Az F₁ szemek csíráztatásával egy időben mitotikus gyökérpreparátumot készítettünk, melyeken ellenőriztük a hibrid növények kromoszómaszámát (ABDA^m; 2n=4x=28) és ezt követően FISH-t végeztünk el az Afa family, pSc119.2 és pTa71 próbákkal (17. ábra).



17. ábra Fluoreszcens *in situ* hibridizáció búza (Mv9kr1) × alakor (1T-1) F₁ hibrid (2n=3x=28, ABDA^m) mitotikus kromoszómapreparátumán, Afa family (piros), pTa71 (sárga) és pSc119.2 (zöld) repetitív DNS próbák használatával. A *T. monococcum* eredetű kromoszómákat sárga színnel jelöltük. Skála=10 μm

Az ABDA^m genom-összetételű F₁ hibriden végzett *in situ* hibridizációval azonosítottuk a 14 db A, 7 db B és 7 db D kromoszóma jelenlétét. A búza A kromoszómái nem minden esetben voltak megkülönböztethetők a *T. monococcum* kromoszómáktól, az eltérő hibridizációs mintázat az 1A, 3A, 4A, 5A és 7A kromoszómák elkülönítését tette lehetővé.

4.3.2.2 Visszakeresztezők búzával

Annak érdekében, hogy a nemesítési programban használható, a búzával megegyező kromoszómaszámú és fertilis növényi anyagot állítsunk elő, a steril F_1 hibrideket több generáción át visszakereszteltük az anyai partnerként használt Mv9kr1-gyel. Célunk olyan genetikai anyag előállítása volt, mely a *T. monococcum* kromatinjának csak kis részét tartalmazza transzlokáció formájában. A 2010-ben és 2011-ben előállított F_1 hibridek visszakeresztését fitotronban végeztük, célunk háromszori visszakeresztéssel BC_3 növények előállítása és ezek tesztelése volt. A keresztezések eredményeit a 8. táblázat tartalmazza. A hagyományos típusú, Mv Alkor-t tartalmazó F_1 növények búzával történő visszakeresztése nem járt sikerrel, az összes kalász beporzása után sem sikerült BC_1 szemet előállítani (9. táblázat). A féltörpe *T. monococcum*-mal előállított genetikai anyag visszakeresztései közül az F_1 növények első visszakeresztése bizonyult a legnehezebbnek, mindössze a beporzott virágok 0,86 százaléka termékenyült meg.

Az összes BC_1 szemet felhasználva folytattuk a keresztezési programot, a második és harmadik visszakeresztéseknél jelentősen nőtt a kötött szemek aránya. Ezekben a nemzedékekben a virágok már nem teljesen sterilek, ezért lehetséges volt a kalászok izolálásával a BC_1 és BC_2 szemek fertilitásának vizsgálata is. A második visszakeresztés során sikerült olyan nagy mennyiségű BC_2 szemet előállítani, hogy a további visszakeresztéshez nem volt szükség az összes szem csíráztatására, így csírázási százalékot a két utolsó generációban nem számoltunk. A keresztezési munkát nehezítette, hogy a BC_1 és BC_2 növények fejlődése időben nagyon elhúzódo, vontatott volt (18. ábra).



18. ábra Azonos időben vetett búza (Mv9kr1) × alakor (1T-1) BC_1 növények

9. táblázat A búza × alakor keresztezésekből származó utódgenerációk Mv9kr1-el történő visszakeresztezésének eredménye (BC₁, BC₂ és BC₃ = első, második és harmadik visszakeresztezett (backcrossed) nemzedék)

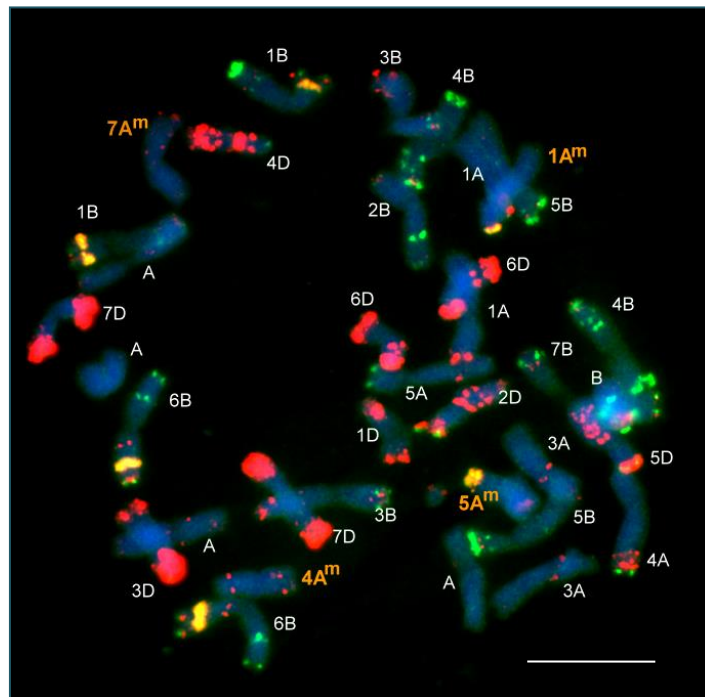
	Anya	Beporzó	Keresztezés éve	Megporzott virágok száma (db)	Szemek száma (db)	Szemkötés (%)	Csírázás (%)	Izolált kalászok száma(db)	Izolált szemek száma (db)
BC₁	Mv9kr1 × Mv Alkor	Mv9kr1	2011, 2012	194	0	0,00	0,0	-	-
	Mv9kr1 × 1T-1	Mv9kr1	2011, 2012	3232	28	0,86	59,6	-	-
BC₂	(Mv9kr1 × 1T-1) × Mv9kr1	Mv9kr1	2012, 2013	1098	318	28,05	n.a.	61	70
BC₃	(Mv9kr1 × 1T-1) × Mv9kr1 ²	Mv9kr1	2011, 2013	2913	1409	48,50	n.a.	200	877

Ezt követően elvégeztük az utódnemzedékek molekuláris citogenetikai elemzését is. A BC₁ növények kromoszómaszámát Feulgen módszerrel határoztuk meg (19. ábra), a kromoszómaszám 35 és 40 között változott a vizsgált növényekben (n= 9).



19. ábra 36 kromoszómával rendelkező BC₁ növény kromoszómái mitózisban Feulgen módszerrel festve

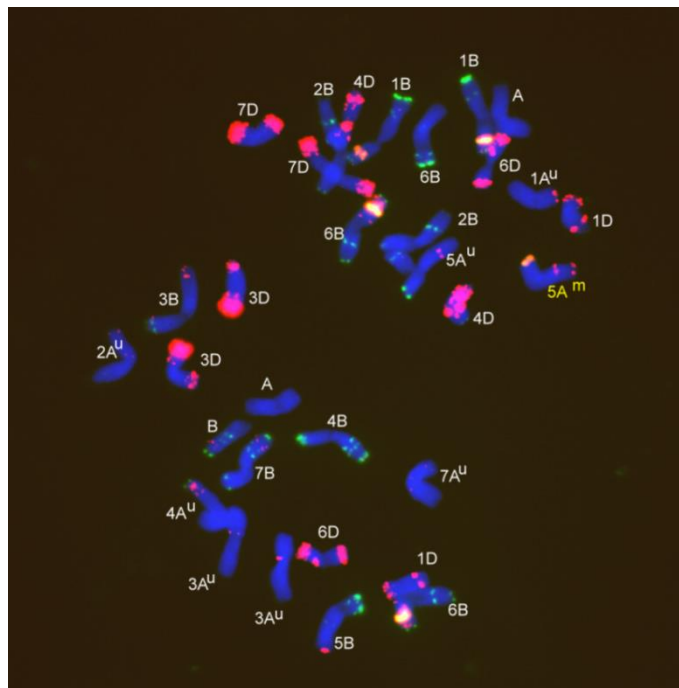
A BC₁ növények szomatikus sejtjein FISH-t végeztünk repetitív DNS próbákkal (Afa family, pTa71 és pSc119.2), ami lehetővé tette a búza és a *T. monococcum* kromoszómák azonosítását (20. ábra).



20. ábra Búza × alakor BC₁ növény kromoszómái mitózisban fluoreszcens *in situ* hibridizációval vizsgálva, Afa family (piros), pTa71 (sárga) és pSc119.2 (zöld) repetitív DNS próbákkal. Kromoszómaszám: 36, melyből négy *Triticum monococcum* kromoszómát azonosítottunk (sárga betűvel jelölve). Skála= 10 µm

A vizsgált növényben 4 *T. monococcum*-ból származó kromoszómát ($1A^m$, $4A^m$, $5A^m$ és $7A^m$) azonosítottunk. Összesen 15 BC_1 növény molekuláris citogenetikai elemzését végeztük el FISH-sel, melyekben átlagosan 2,4 A^m kromoszómát azonosítottunk növényenként. A BC_1 növényekben leggyakrabban az $1A^m$ és $4A^m$ kromoszómák voltak jelen (a vizsgált sejtek 90,1 és 54,5 százalékában), emellett még $3A^m$, $5A^m$ és $7A^m$ kromoszómákat figyeltünk meg a vizsgált növények kromoszómapreparátumain.

A BC_2 növények kromoszómaszáma 36-40 között változott, a számolást szintén Feulgen módszerrel végeztük. Ezt követően a már korábban is használt repetitív DNS próbákkal FISH-t végeztünk a BC_2 növények kromoszómapreparátumain ($n=6$). A 21. ábrán egy BC_2 növény részleges sejtjén készült FISH látható, a képen 34 búzakromoszóma között egy *T. monococcum* kromoszómát, az $5A^m$ -et azonosítottuk. A BC_2 növények esetében a *T. monococcum* kromoszómák száma kevesebb volt, mint a BC_1 növényeknél (1,8 A^m kromoszóma/ BC_2 növény). A leggyakrabban előforduló kromoszómák az $4A^m$, $1A^m$ és $5A^m$ voltak (66,6 %, 50,0 % és 50,0 %). Meg kell azonban jegyezni, hogy az általunk BC_1 és BC_2 növényekben azonosított A^m kromoszómák mind jellegzetes hibridizációs mintázattal rendelkeznek, így nem kizárt, hogy emellett még egyéb olyan *T. monococcum* kromoszómák is lehettek az utódokban, melyeket a használt repetitív próbákkal nem tudtunk azonosítani.

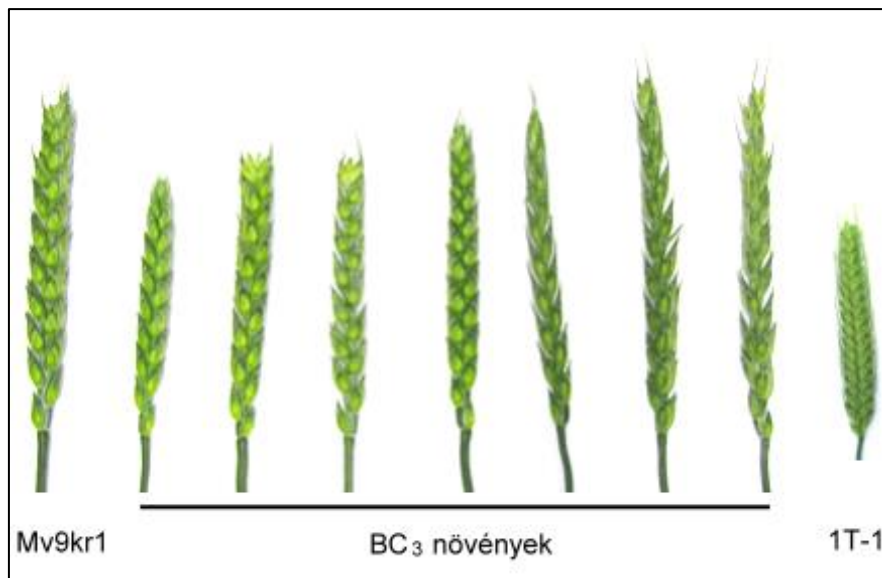


21.ábra Búza \times alakor BC_2 növény kromoszómái mitózisban fluoreszcens *in situ* hibridizációval vizsgálva, Afa family (piros), pTa71 (sárga) és pSc119.2 (zöld) repetitív DNS próbákkal. Az egyetlen azonosított *T. monococcum* kromoszómát sárga betűvel jelöltük.

4.3.2.3 A BC₃ növények tenyészkerti megfigyelése és üvegházi rozsdafertőzése

A búzával történő folyamatos visszakeresztezések során generációról-generációra nőtt a visszakeresztezett növények fertilitása. A BC₂ növények visszakeresztezésével előállított BC₃ szemek nagy száma lehetővé tette, hogy a 2011/12-es évben tenyészkerti körülmények között 44 BC₃ kalászutódsort vizsgálhassunk. Célunk a még hasadó anyag természetes betegségekkel szembeni ellenállóságának vizsgálata volt.

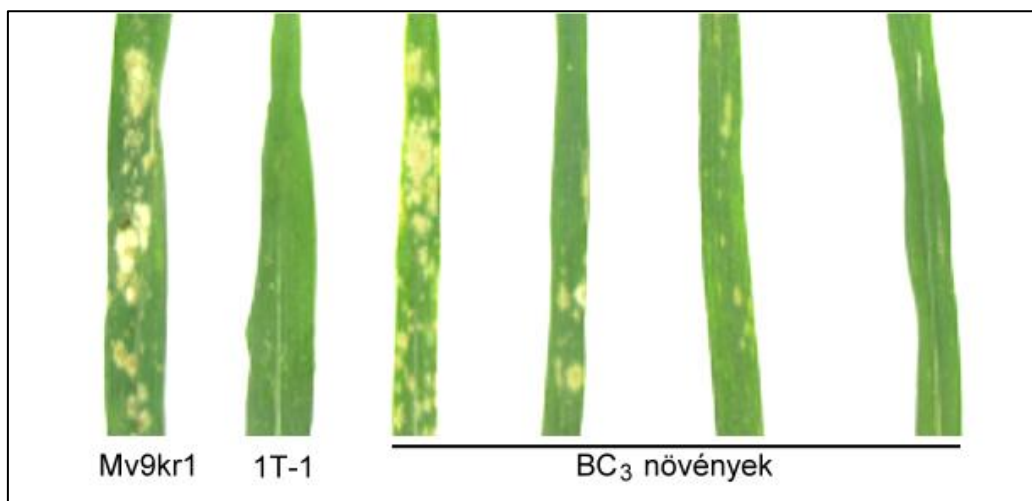
Kalászolási idő tekintetében a BC₃ növények a két szülői genotípus között helyezkedtek el. Kalászolásuk 2012-ben május 10 és 16 között zajlott, a keresztezésekhez használt búza genotípus (Mv9kr1) május 9-én, a *T. monococcum* '1T-1' május 22-én kalászolt. A kalászok morfológiáját vizsgálva eltérő típusokat találtunk (22. ábra), ami a *T. monococcum* kromatin BC₃ növények genomjában való jelenlétére utal.



22. ábra Eltérő kalázmorfológiával rendelkező BC₃ növények. Az ábra bal oldalán az anyai szülőként és a visszakeresztezésekhez használt Mv9kr₁ búza genotípus; a jobb oldalon a féltörpe '1T-1' *Triticum monococcum* genotípus látható

A 2012-es év meleg és száraz tavasza nem kedvezett a búzát károsító gombabetegségek megjelenésének, kísérletünkben csak enyhe lisztharmatfertőzés lépett fel június elején (23. ábra).

Az ellenállóság értékelése során a kalászutódsorokat 0 (fertőzésmentes)-9 (erősen fogékony) skála szerint bonitáltuk. A BC₃ kalászutódsorok 23 %-a fertőzésmentes, 52 %-a rezisztens, 18 %-a mérsékelten rezisztens és 7 %-a mérsékelten fogékony volt 2012-ben.

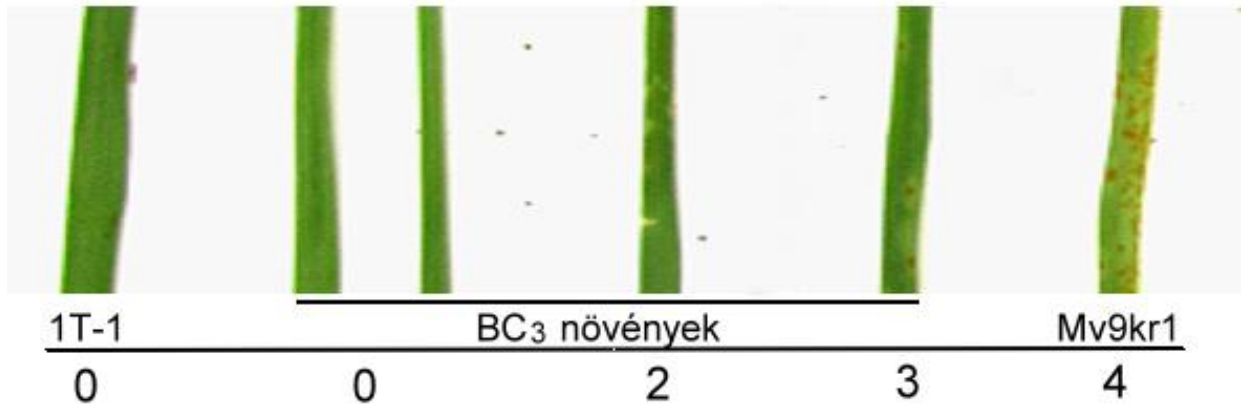


23. ábra Lisztharmat fertőzöttség a búza × alakor program búzával visszakeresztezett BC₃ növényeken és a szülői genotípusokon. Martonvásár, 2012

A 2012. évben nem volt természetes levélorzsa fertőződés Martonvásáron, a tenyészkertünkben még a fogékony fajtákon sem figyeltünk meg uredotelepeket, ezért nem tudtuk megállapítani a növények levélorzsa rezisztenciáját. Mivel a *T. monococcum*-mal végzett keresztezésekkel célunk elsősorban a rozsdarezisztencia átvitele volt, ezért az izolált kalászból származó növények levélorzsdával szembeni ellenállóságát üvegházban vizsgáltuk. A 65 BC₃ genotípus csíranövénykori fertőzésével kapott eredményeket a 10. táblázat tartalmazza. A növények jelentős része (85%-a) nagyfokú fogékonyságot mutatott a levélorzsdával szemben, de találtunk immunis genotípusokat is (24. ábra).

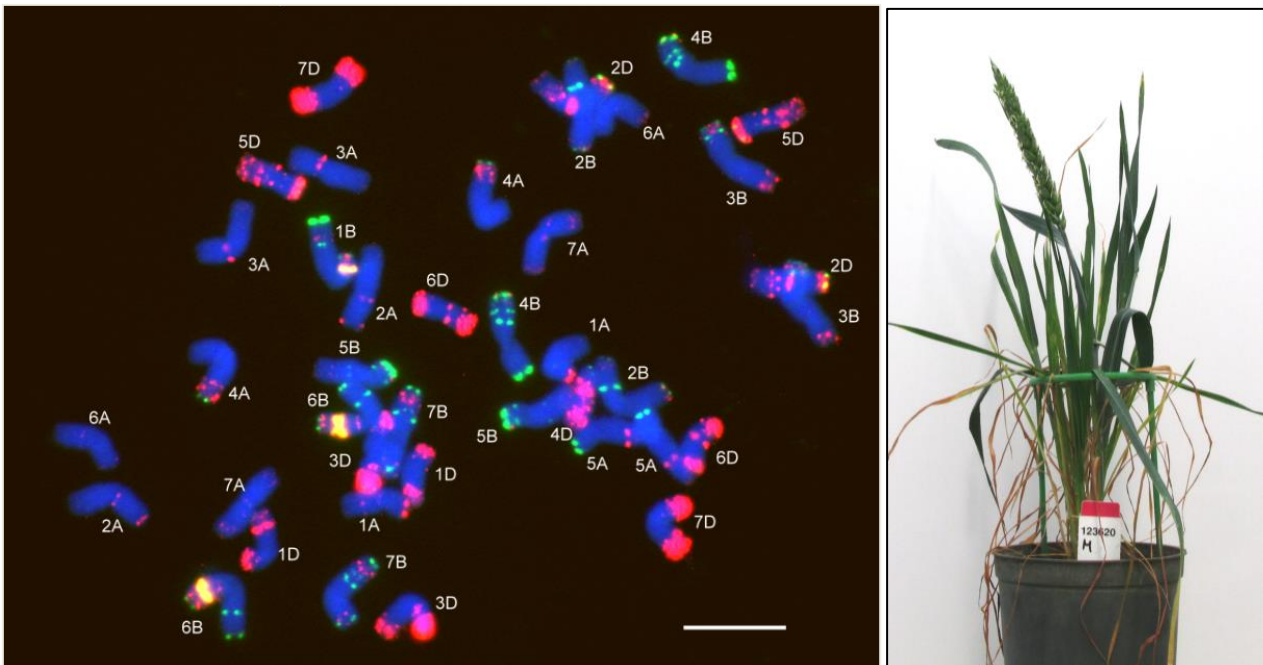
10. táblázat Búza × alakor keresztezésből származó BC₃ növények csíranövénykori levélorzsa ellenállósága üvegházban, mesterségesen fertőzött körülmények között (Stakman et al. (1962) módszere alapján meghatározva)

Csíranövénykori levélorzsa ellenállóság	Növények száma (db)
Fogékony (4)	55
Mérsékelten fogékony (3)	5
Ellenálló (2)	1
Nagyon ellenálló (1)	1
Gyakorlatilag immunis (;)	1
Immunis (0)	2



24. ábra Eltérő csíranövénykori ellenállóságú BC₃ növények és a szülői genotípusok reakciója mesterséges levélrozsdá fertőzésre. Az ábra bal szélén az immunis (0) *T. monococcum* (1T-1), jobb szélén a fogékony (4) búza (Mv9kr1) szülő levelei találhatóak. Középen különböző ellenállóságú BC₃ növények levelei láthatók: immunis (0), ellenálló(2) és mérsékelten fogékony (3). Martonvásár, 2012

Az üvegházi rozsdafertőzés után a levélrozsdával szemben immunis BC₃ növények gyökeréből készített kromoszómapreparátumon FISH-t végeztünk el (25. ábra). A megfigyelt sejtekben teljes *T. monococcum* kromoszómát nem azonosítottunk.



25. ábra Rozsdarezisztens BC₃ növény molekuláris citogenetikai analízise fluoreszcens *in situ* hibridizációval, repetitív DNS próbákkal: Afa family (piros), pTa71 (sárga) és pSc119.2 (zöld). A jobb oldalon a levélrozsdá rezisztens növény látható. Skála= 10 μ m

A csíranövénykori levélrozsda-ellenállósággal rendelkező növényeket a fertőzést és értékelést követően kiválogattuk és üvegházban felneveltük. A betakarított szemeket üvegházban szaporítottuk fel és a későbbiekben tenyészkeri körülmények között a következő, öntermékenyült generáció felnőttkori levélrozsda-ellenállóságának tesztelését tervezzük.

4.3.3 *Triticum turgidum* subsp. *durum* × *Triticum monococcum* keresztezések

A hagyományos (Mv Alkor) és féltörpe (1T-1) *T. monococcum* genotípusokat hexaploid búza mellett tetraploid durumbúzával is kereszteztük. Célunk az eltérő ploidszintű *Triticum* fajokkal történő keresztezhetőség vizsgálata, továbbá a triploid F₁ szemek genomduplikálásával ABA^m genomösszetételű szintetikus amfiploid létrehozása és a különböző eredetű A kromoszómák párosodásának meiózisban történő vizsgálatához megfelelő növényi anyag előállítása volt (11. táblázat). A *T. turgidum* subsp. *durum* × *T. monococcum* F₁ hibrid kromoszómapárosodási vizsgálatának eredményeit a 4.2.4 fejezetben mutattuk be.

A keresztezéseket két, egymást követő évben, 2010-ben és 2011-ben végeztük el, tenyészkeri körülmények között. Mindkét évben nagyon kis arányú szemkötést tapasztaltunk, szignifikáns különbség nem volt a hagyományos (Mv Alkor) és féltörpe (1T-1) típusú *T. monococcum* pollenadóval létrehozott kombinációkban.

A 2010 évben a búzával végzett keresztezésekhez hasonlóan a hagyományos típusú *T. monococcum*-ból származó F₁ szemek rossz csírázókéességét figyeltük meg, de ez a következő évben nem ismétlődött, a hibrid szemek csírázási százaléka mindkét kombinációban gyenge, 40 % volt.

4.3.3.1 Szintetikus amfiploid előállítás

A 2010. évben termelt F₁ szemek ($2n=3x=21$, ABA^m) kromoszómaszámát ellenőriztük és FISH-sel azonosítottuk a 14 A és 7 B kromoszómát (26. ábra), majd elvégeztük a genomduplikálást kolhicinkezeléssel. A bokrosodási fázis idején elvégzett kezelést követően kiültetett növényeken fejlődött kalászokat izoláltuk. A kísérlet eredményeként összesen 63 darab amfiploid szemet sikerült előállítani, ami 16,3 százalékos szemkötésnek felelt meg.

A kolhicinezést követően fitotronban szaporítottuk fel a C₁ nemzedéket, majd a következő évtől tenyészkerben vizsgáltuk tovább a növényeket, melynek adatait a 12. táblázat tartalmazza.

11.táblázat *T. turgidum* subsp. *durum* × *T. monococcum* keresztezések eredménye és a keresztezés célja

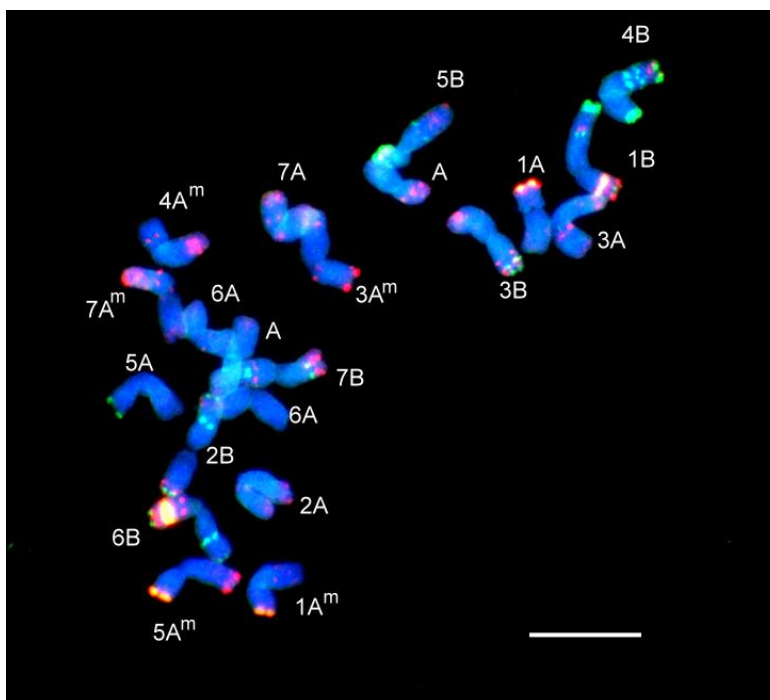
Anya	Pollenadó	Keresztezés éve	Megporzott virágok száma (db)	F ₁ szemek száma (db)	Szemkötés (%)	Csírázott növények száma (db)	F ₁ szemek csírázása (%)	A keresztezés célja
MvTD14-04	Mv Alkor	2010	210	4	1,9	0	0,0	Genomduplikálás, szintetikus amfiploid előállítás
MvTD14-04	1T-1	2010	309	9	2,9	4	44,4	
MvTD14-04	Mv Alkor	2011	158	5	3,2	2	40,0	A kromoszóma-párosodások vizsgálata*
MvTD14-04	1T-1	2011	252	14	5,5	6	42,8	

*Kromoszómapárosodási vizsgálatokat csak az MVTD14-04 × 1T-T F₁ hibrideken végeztünk

12.táblázat *Triticum turgidum* subsp. *durum* (MVTD14-04) × *Triticum monococcum* (1T-1) szintetikus amfiploidok és a szülő genotípusok tenyészkerti adatai 2012-2013-ban, Martonvásáron

Genotípus	Kalászolási idő (nap)		Növénymagasság (cm)		Levélrozsdá (0-9)	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013
MVTD14-04 × 1T-1 szintetikus amfiploid	május 25-29	május 28	55	65	0	2
<i>T. turgidum</i> subsp. <i>durum</i> 'MVTD14-04'	május 12	május 17	75	95	0	4
<i>T. monococcum</i> '1T-1'	május 25	május 22	50	70	0	0

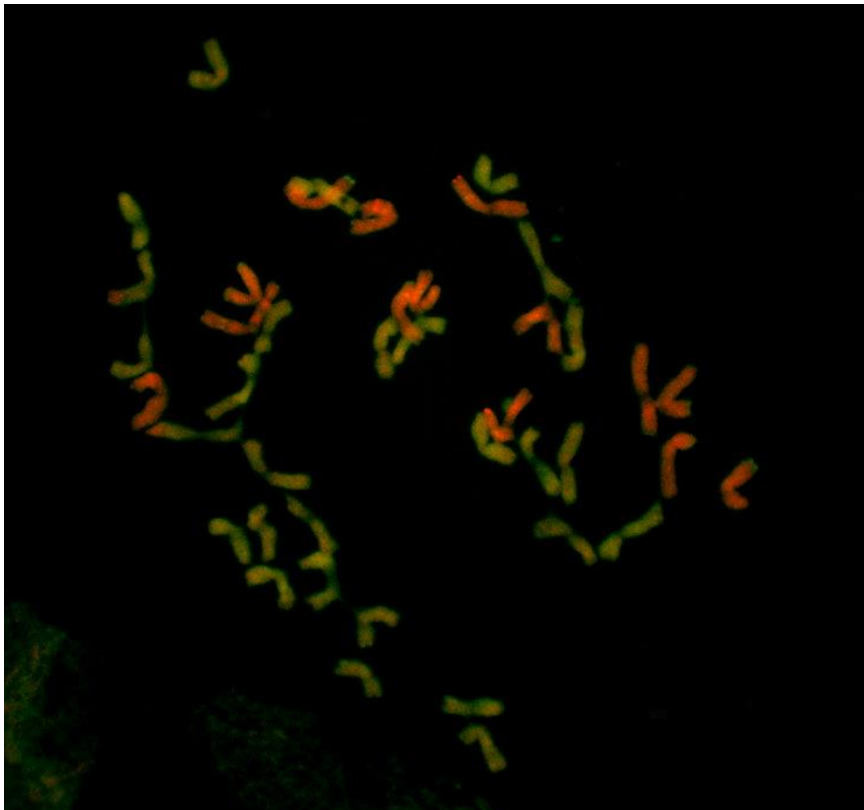
A jelenleg C₃ generációban lévő durum búza-alakor szintetikus amfiploid az alakorhoz hasonlóan késői kalászolású, de morfológiáját tekintve a durumbúza szülőhöz áll közelebb. A szintetikus amfiploidok nagyrésze 2013-ban mérsékeltellenállónak bizonyult a természetes eredetű levélrozsdafertőzéssel szemben, azonban apró uredotelepek megfigyelhetők voltak a növényeken (2012-ben levélrozsdafertőzés nem lépett fel a tenyészkertben).



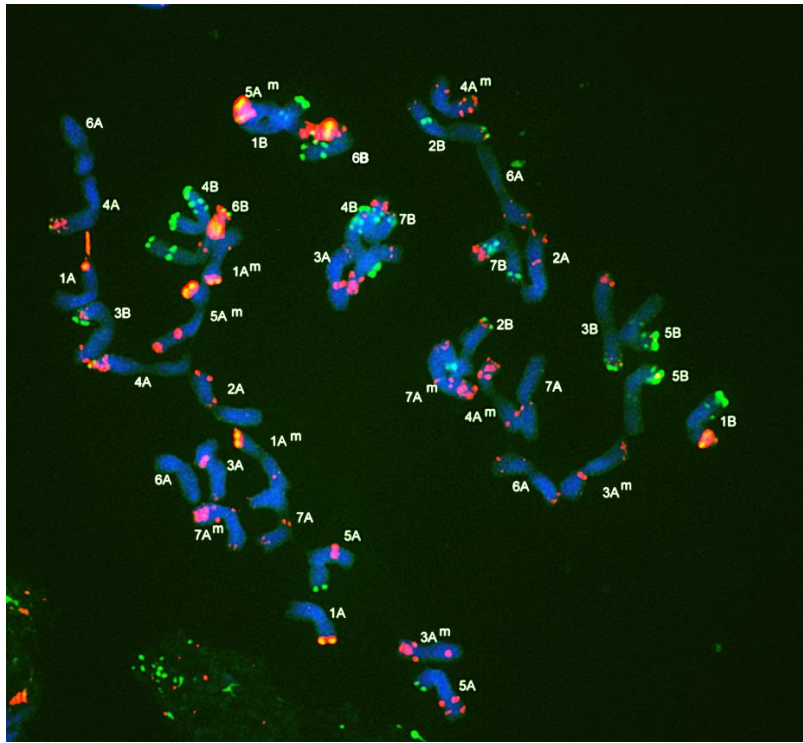
26.ábra *Triticum turgidum* subsp. *durum* (MVTD14-04) × *Triticum monococcum* (1T-1) F₁ hibrid genomanalízise repetitív DNS próbákkal végzett fluoreszcens *in situ* hibridizációval. Az ábrán az Afa family próba hibridizációs jele piros, a pTa71 próbáé sárga, míg a pSc119.2 próbáé zöld színben látható.

A hibrid genomösszetétele ABA^m, 1n=3x= 21. Skála= 10 μm

A 2013. esztendőben megkezdtek az erős kalászorsóval rendelkező egyedek szelekcióját. Az amfiploid genetikai stabilitását *in situ* hibridizációval ellenőriztük a C₃ nemzedékben. Az ABA^m genomösszetétel kimutatására genomi *in situ* hibridizációt végeztünk mitózisban készített kromoszómapreparátumon (27. ábra). A hibridizációs próbaként használt *T. urartu* genomi DNS határozott fluoeszcens jelet eredményezett az A kromoszómákon, ezáltal megkülönböztethető volt egymástól a 28 A és a 14 B kromoszóma. A *T. monococcum* és *T. urartu* közti nagyfokú hasonlóság azonban nem tette lehetővé az A és A^m genomok elkülönítését GISH-sel. Az azonos sejten a GISH vizsgálatot követően végzett FISH megerősítte az előző eredményeket, továbbá lehetővé tette a kromoszómák azonosítását (28. ábra).



27.ábra Genomi *in situ* hibridizáció *Triticum turgidum* subsp. *durum* (MVTD14-04) × *Triticum monococcum* (1T-1) amfiploid kromoszómáin, mitózisban. A jelöletlen B kromoszómák narancssárga színben láthatók, a biotinnal jelölt és sztreptavidin-FITC-vel detektált *Triticum urartu* genomi DNS próba zöld jelet adott az A és A^m kromoszómákon



28. ábra Fluoreszcens *in situ* hibridizáció a *Triticum turgidum* subsp. *durum* (MVTD14-04) × *Triticum monococcum* (1T-1) amfiploid mitotikus kromoszómáin Afa family (piros), pTa71 (sárga) és pSc119.2 (zöld) repetitív DNS próbákkal

4.3.4 A *Triticum monococcum*-mal végzett interspecifikus keresztezés eredményeinek megvitatása

A *T. monococcum* kromtint tartalmazó genetikai anyag előállításánál vizsgáltuk a martonvásári diploid *Triticum* fajok gyűjteményében rejlő változatosságot. Keresztezési kísérletben megállapítottuk, hogy a féltörpe alakor genotípus (1T-1) eredményesebben használható génátviteli munkában. Molekuláris citogenetikai eszközökkel nyomon követtük a *T. monococcum* kromoszómákat az utódnemzedékekben és a BC₃ növények mesterséges levélrozsda- fertőzése során immunis és ellenálló növényeket azonosítottunk.

Génbanki tételek értékelésének nagy jelentősége van az előnemesítési szempontból értékes tulajdonságot hordozó genotípusok azonosításában. Az általunk vizsgált genotípusok mindegyike ellenálló volt levél- és sárgarozsdával, valamint lisztbarnasággal szemben, természetes körülmények között, de pontosabb információt az egyes genotípusok rezisztenciájával kapcsolatban mesterséges fertőzés mellett kaphatunk. A keresztezéseinkhez használt alakor genotípusok levél- és szárrozsda provokációs kísérletben bizonyították kiváló levélrozsda rezisztenciájukat, de a féltörpe genotípus a szárrozsdával szemben fogékonyak bizonyult (Vida Gy. személyes közlés). Anker és Niks (2000) diploid *Triticum* genotípusok levélrozsda ellenállóságát vizsgálva azt tapasztalta, hogy a természetett alakorok többsége (88%) rezisztens, míg minden *T. urartu* és három kivétellel minden vad alakor

fogékony volt. Nagyszámú génbanki tétel és nemesítési anyag betegség rezisztenciájának jellemzése a búzanemesítésben is használt molekuláris markerekkel munka- és költséghatékony módon végezhető el (Purnhauser et al. 2006, 2011; Vida et al. 2009, 2011).

Az interspecifikus hibridizáció sikerességét több tényező befolyásolja: a keresztezhetőség, az F_1 szemek csírázó képessége, valamint a hibrid növény felnevelése és reprodukivitása. A *T. monococcum*-mal végzett eddigi keresztezési munkákban az alakor nehéz keresztezhetőségéről számoltak be, ami a tetra- és hexaploid *Triticum* fajok és a *T. monococcum* közötti inkompatibilitással magyarázható (Cox et al. 1991, Belea et al. 2005). Keresztezéseink során, bár jelentős volt az évjáratok közti különbség, az F_1 szemek előállítása nem okozott nehézséget, különösen az Mv9kr1 \times féltörpe alakor keresztezések esetében tapasztaltunk nagyarányú szemkötést (53,9 %, 2010). Eredményeink megerősítik The és Baker megfigyelését (1975), akik az alakort és a jól keresztezhető hexaploid Chinese Spring búzafajtát használva 77 %-os szemkötést értek el, míg normál búzafajtákat keresztezve alakorral csak nagyon kis arányú szemkötést tapasztaltak (0-7 %) azonos feltételek mellett. Az eredmények hasonlósága a *kr1* keresztezhetőségi gén jelenlétére vezethető vissza, mivel az általunk anyaként használt Mv9kr1 *kr1* allélja Chinese Spring eredetű (Molnár-Láng et al. 1996). Felhívják a figyelmet arra is, hogy az általánosságban jól keresztezhető genotípusokat használva is előfordulhat rossz szemkötés egyéb tényezők (környezeti hatások) miatt. Ez magyarázatul szolgálhat, a keresztezési programunkban 2011-ben tapasztalt rossz szemkötési arányra. A környezeti tényezők erős befolyását erősítik meg Bertin et al. (2009) is. Belea (1986) nagyon kis arányú szemkötésről (1,9 %) számol be a hexaploid búza és a *T. monococcum* között. A keresztezhetőségben lévő különbség a génforrásként szolgáló genotípusok között is fennáll, azonos fajok különböző genotípusai eltérő sikerrel alkalmazhatók az előnemesítési munkákban (Sharma 1995). Vad és termesztett alakor búzával történő keresztezhetőségét vizsgálva The és Baker (1975) a vad típusú alakor jobb keresztezhetőségéről számoltak be.

Az hexaploid búza \times alakor F_1 szemek csíráztatása során kapott eredményeink azt jelzik, hogy a jól keresztezhető alakor genotípus (1T-1) használatával létrehozott F_1 hibrid 63–100 %-ban csírázott, ami sokkal jobb arány, mint a hexaploid búza \times alakor F_1 hibridek csírázási százalékára az irodalmi forrásokban közölt adatok (The és Baker 1975: 19-30 %, Belea, 1986: 48 %). Az F_1 növények túlélése szintén kritikus pont, kísérletünkben a hagyományos típusú, Mv Alkorral kapott F_1 hibridek a gyenge csírázást követően sokszor még kalászás előtt elpusztultak. The és Baker (1975) hasonló genomösszetételű hibridjeiben azt tapasztalták, hogy csak a vad alakorral létrehozott hibridek jutottak el a kalászásig. Esetünkben tehát az 1T-1 féltörpe alakor annak ellenére, hogy a termesztett alakorok közé tartozik, rendelkezik mindazokkal a kedvező tulajdonságokkal, melyeket a vad típusal végzett keresztezési munkák során tapasztaltak (könnyebb keresztezhetőség, nagyobb arányú szemkötés, F_1 növények túlélése).

Az idegen fajból történő génátviteli munkában az egyik leginkább korlátozó tényező, hogy BC₁ szemek csak nagyon nagy munkával és kis számban állíthatók elő. Ennek kiküszöbölésére általában nagy számban kereszteznek vissza F₁ kalászokat. A búza × *T. monococcum* F₁ növények terméketlensége — más búza × idegen fajú hibridektől eltérően — azonban nemcsak a portokok sterilitásával magyarázható, hanem a bibe fejletlenségével is. The és Baker (1975) 181 búza × vad alakor F₁ növényből mindössze 5-nél talált fertilis bibét, amit be tudtak porozni. Az előző szerzők megfigyelését Cox et al. (1991) természetett és vad alakorokkal végzett keresztezéseinek eredményei is alátámasztják. Mindezek magyarázatul szolgálhatnak az alakor nehéz keresztezhetőségére. A keresztezési munkákban nagy jelentősége van az olyan alakor genotípusoknak, melyekről bizonyítható, hogy a velük létrehozott utódokban a hímsterilitás mellett nőfertilitással rendelkeznek. Cox et al. (1991) olyan *T. monococcum* tételt azonosítottak, amely rendelkezik nőfertilitással. A felhasználásával létrehozott *T. aestivum* × *T. monococcum* F₁ hibridek búzával való visszakeresztezése során sikerült olyan arányban BC₁ szemkötést elérni (0,5-1 BC₁ szem/kalász), ami már hasonló volt a más búza × idegen fajú kombinációk (*T. aestivum* × *Ae. tauschii*, *T. aestivum* × *T. urartu*) esetén elért eredményekhez. Habár a keresztezéseink során nem vizsgáltuk a búza × alakor F₁ növények bibéinek állapotát, valószínűsíthető, hogy az 1T-1 féltörpe alakor is rendelkezik a fent említett genotípus kedvező tulajdonságaival. Cox et al. (1991) a jól keresztezhető *T. monococcum* genotípus úgynevezett 'híd'-ként való használatát javasolják búzával nem keresztezhető alakor génforrások előnemesítésben történő hatékony alkalmazásához. A jól keresztezhető alakor genotípus és a génforrásként szóba jöhető, de egyébként búzával nehezen keresztezhető alakor keresztezésével lehetőség nyílik olyan genetikai anyag előállítására, mely a két szülő előnyös tulajdonságait ötvözi (jól keresztezhető alakor génforrás).

A búza × alakor F₁ hibrid és búzával visszakeresztezett nemzedékeit FISH-sel elemztük, mivel korábbi tapasztalataink alapján az A és A^m genom GISH-sel a nagyfokú hasonlóság miatt nem különböztethető meg egymástól (Megyeri et al. 2011). A FISH alkalmasnak bizonyult az F₁ hibridek genomösszetételének azonosítására mind a *T. aestivum* × *T. monococcum*, mind a *T. turgidum* subsp. *durum* × *T. monococcum* hibridekben. A későbbi nemzedékekben egyre csökkenő számban azonosítottunk *T. monococcum* kromoszómákat, mivel az egymást követő búzával történő visszakeresztezés az idegen kromoszómák eliminációját okozzák (Lángné Molnár M. 2006).

A génátviteli munkánk célja elsősorban a betegség (levélrozsda, lisztharmat stb.) rezisztencia átvitele természetett búzába. A létrehozott genetikai anyag betegség-ellenállósága vizsgálható természetes és mesterségesen fertőzött körülmények mellett. Búza × alakor BC₃ növényeink levélrozsda-ellenállóságát üvegházban vizsgáltuk, mesterséges csíranövénykori fertőzéssel, és azonosítottunk immunis és ellenálló genotípusokat. Irodalmi forrásokból ismert tény, hogy csíranövénykori levélrozsda-rezisztencia nem azonos a felnőttkori rezisztenciával. A több mint 60

levélrozsdarezisztenciáért felelős *Lr* gén közül a legtöbb csíranövénykorban is megnyilvánul (Dakouri et al. 2013). A csíranövénykori rezisztencia legtöbbször a növény egész élete során kifejeződik, míg a felnőttkori rezisztencia csak a kifejlett növényeken jelenik meg (Singh et al. 2001).

4.4 Az eredmények általános megvitatása

A *T. monococcum*-ból búzába történő génátvitelt célzó munkánk során kidolgoztuk a *T. monococcum* kromoszómák kariotípusát FISH-el repetitív és mikroszatellit próbákkal. Vizsgáltuk meiotikus kromoszómapárosodás tanulmányozásának lehetőségét egymástkövető FISH-el és GISH-el, majd ugyanezzel a módszerrel kimutattuk az A és A^m kromoszómák közötti nagy rekombinációs valószínűséget. *T. monococcum* felhasználásával genetikai anyagot állítottunk elő, melynek mesterséges levélrozsdafertőzése során immunis és ellenálló genotípusokat azonosítottunk.

A *T. monococcum* régóta ismert kitűnő rezisztenciájáról, de génátvitelt célzó munkát keveset találhatunk az irodalomban, ennek oka lehet az átvitt *T. monococcum* kromoszómszegmentum nehéz azonosíthatósága. Munkánk során FISH segítségével először a *T. monococcum* kariotípusának kidolgozása volt a célunk.

A kariotipizálási munka során a *T. monococcum*-on és *T. urartu*-n már korábbi molekuláris citogenetikai ismereteket (Gerlach et al. 1980, Miller et al. 1983, Jiang és Gill 1983) használtuk fel a kromoszómák azonosításához kiegészítve az Afa family repetitív DNS próbával. A kapott hibridizációs mintázat nagymértékben különbözött a tetra- és hexaploid búza A genomjának (Mukai et al. 1993, Kubaláková et al. 2005, Sepsi et al. 2008) hibridizációs mintázatától, a *T. monococcum* kromoszómákon jóval összetettebb mintázatot figyeltünk meg. Ez a jelenség az allopoliplod fajképződés során fellépő, az új faj citológiai és genetikai stabilitást elősegítő mechanizmusokkal, mint például a repetitív DNS szakaszok eliminációjával magyarázható (Ozkan et al. 2001).

A különböző eredetű A kromoszómák további megkülönböztetése érdekében a *Triticeae* fajok genomjában általánosan előforduló mikroszatelliteket (AAG, CAG, AAC, AGG) hibridizációs próbaként (Cuadrado et al. 2000). Leghatározottabb hibridizációs mintázatot a GAA és a CAG próbák esetén tapasztaltunk. Valamennyi SSR próba jellegzetes mintázatot eredményezett a 6A^m kromoszómákon, ez abból a szempontból is jelentős, hogy a korábban használt repetitív próbák nem adtak hibridizációs jelet ezeken a kromoszómákon, ugyanakkor a poliploid fajok 6A kromoszómáján nem figyelhető meg hasonló mintázat. Az AAG, AAC és AGG mikroszatellit ismétlődések hexaploid búzában megfigyelt ko-lokalizációját (Cuadrado et al. 2008) a *T. monococcum* esetében szintén csak a 6A^m kromoszóma esetén igazolódott. A repetitív próbákkal

ellentétben a *T. monococcum* kromoszómáin jóval kevesebb hibridizációs jelet figyeltünk meg a mikroszatellit próbákkal a poliploid fajok A kromoszómáihoz képest. A poliploid fajokban megfigyelt összetettebb hibridizációs mintázat oka a különböző genomok közötti transzlokációval magyarázható (Badaeva et al. 2007), ugyanakkor nem zárható ki egyéb mutációs mechanizmusok is növelhetik az SSR szekvenciák számát.

A génátviteli munka során célunk rekombinánsok előállítása, melyek transzlokáció formájában hordozzák az átvitt tulajdonságokat. A rekombináció gyakoriságára indirekt módon következtethetünk az interspecifikus hibridek meiózisének I. metafázisének analizisével, mivel ekkor történik meg a crossing over. A kromoszómapárosodási adatokból nyerhető információ maximalizálására szintén kiváló lehetőséget nyújt az *in situ* hibridizációs technika. Munkánk során először búza × rozs F₁ hibridek meiotikus kromoszómapárosodását vizsgáltuk egymást követő GISH-el és FISH-el, mellyel célunk a módszer tesztelése volt. A GISH vizsgálatunk eredményei alátámasztják az irodalomban búza × rozs hibrideknél megfigyelt kromoszómapárosodási adatokat: legnagyobb arányban a búza kromoszómák párosodtak egymással (Miller et al. 1994, Cuadrado et al. 1997). Majd az ezt követő FISH lehetővé tette a párosodott kromoszómák azonosítását. Eredményeink megerősítik a búza kromoszómák párosodásával kapcsolatos eddigi ismereteket, legnagyobb mértékben az A és D genomhoz tartozó kromoszómák párosodtak egymással (Jauhar et al. 1991, Naranjo et al. 1987). FISH-el korábban csak néhány esetben vizsgálták a meiotikus kromoszómák párosodását búza × idegen fajú hibridekben (Cuadrado et al. 1997, Cifuentes et al. 1997, Cifuentes et al. 2006) és csupán néhány kromoszóma azonosítását tudták elvégezni. A módszert, ezt követően durumbúza × alakor F₁ hibrid meiózis I. metafáziséban történő kromoszómapárosodásának vizsgálatára használtuk. A GISH vizsgálat során az A és A^m kromoszómák nagyfokú párosodását (99,7%) tapasztaltuk, nagy gyakorisággal várható a rekombinánsok kialakulása a két faj között. Korábbi tanulmányok az A és A^m genomokat is tartalmazó F₁ hibridek meióziséjáról Feulgen festéssel végzett kromoszóma vizsgálaton alapultak (Vardy és Zohary 1968, The és Baker 1975, Gill et al. 1988) ami nem teszi lehetővé a kromoszómák azonosítását. Eredményeink azonban minden kétséget kizáróan bizonyították az A és A^m genom közötti nagy rekombinációs valószínűséget. Habár a kromoszómapárosodást nem követi minden esetben rekombináció, mégis igaz az, hogy minél nagyobb arányban párosodik egymással két kromoszóma annál nagyobb arányban várható köztük átrendeződés.

Az A és A^m genomok közötti nagy rekombinációs valószínűség ismeretében keresztezési programot indítottunk a *T. monococcum* valamint a búza és durumbúza között. A keresztezések során olyan féltörpe alakor genotípust azonosítottunk, mely a hagyományos típusú alakortól eredményesebben használható a génátviteli munkában, rendelkezik mindazon tulajdonságokkal melyek döntően befolyásolják az interspecifikus hibridizáció sikerességét: jó keresztezhetőség, az F₁ szemek jó

csírázó képessége, valamint a hibrid növény felnevelhetősége és reprodukivitása (The és Baker 1975). A keresztezési munka során kétféle növényi anyagot állítottunk elő: hagyományos visszakeresztezéses módszerrel olyan a búzával megegyező kromoszómaszámú, fertilis növények előállítása volt a célunk, melyek hordozzák a *T. monococcum* kedvező tulajdonságait. Az alakor FISH kariotípusát felhasználva elemeztük a búza × alakor F₁ hibridek és a visszakeresztezés során előállított BC₁, BC₂ és BC₃ növényeket, melyekben egyre kevesebb alakorkromoszómát tudtunk kimutatni. A búza × alakor BC₃ növények levélrozsda-ellenállóságát mesterséges csíranövénykori fertőzéssel vizsgáltuk, melynek során immunis és ellenálló genotípusokat azonosítottunk. A búza × alakor keresztezések mellett durumbúza × alakor F₁ hibridek kromoszómakészletének megkettőzésével fertilis amfiploidot állítottunk elő, melyek később hídként szerepelhetnek az alakor és a hexaploid búza között (Gill et al. 1988, Mujeeb-Kazi et al. 2002). Emellett egymást követő GISH-t és FISH-t azonosítottuk az amfiploid A, B és A^m kromoszómáit.

4.5 Új tudományos eredmények

1. Elkészítettük a *Triticum monococcum* fluoreszcens *in situ* hibridizációs kariotípusát Afa family és pTa71 repetitív DNS próbákkal, ami alapján az 1A^m, 4A^m, 5A^m és 7A^m kromoszómák megkülönböztethetőek a búza A genomjához tartozó homeológ kromoszómáktól.
2. GAA, CAG, AAC és AGG mikroszatellit próbák hibridizációs mintázatát térképeztük a *T. monococcum* kromoszómákon és megállapítottuk, hogy a GAA és CAG próbák a legalkalmasabbak az A^m kromoszómák azonosítására a korábbi repetitív próbák használatával kombinálva.
3. Elsőként, egymást követő genomi és fluoreszcens *in situ* hibridizációval búza-búza kromoszómapárosodásokat és kromoszómakar-asszociációkat azonosítottunk búza × rozs F₁ hibridek meióziséban. A módszerrel igazoltuk az A és D kromoszómák párosodnak a legnagyobb arányban (53%). Leggyakrabban a 3A és 3D kromoszómák hosszú karja, valamint a 3D és 3B kromoszómák rövid karjai között alakult ki asszociáció.
4. Genomi *in situ* hibridizációval kimutattuk az A és A^m kromoszómák párosodását *T. turgidum* subsp. *durum* × *T. monococcum* hibridekben.
5. Keresztezési programot indítottunk *T. monococcum*-ból hexaploid búzába történő génátvitel céljából, melynek során kimutattuk az 1T-1 féltörpe alakor genotípus jó keresztezhetőségét és levélrozsa rezisztenciáját.
6. *T. aestivum* (Mv9kr1) × *T. monococcum* (1T-1) hibrid búzával történő visszakeresztezésével BC₃ növényeket állítottunk elő, amelyek közt mesterséges csíranövénykori levélrozsa fertőzése során immunis és rezisztens növényeket azonosítottunk.
7. Durumbúza és alakor keresztezésével előállított ABA^m genomösszetételű amfiploid genomösszetételének megállapítása genomi és fluoreszcens *in situ* hibridizációval.

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

1. A *Triticum monococcum* kromoszómák azonosítása molekuláris citogenetikai módszerekkel

Az Afa family és pTa71 repetitív DNS próbákkal, valamint a GAA, CAG, AAC és AGG mikroszatellit ismétlődésekkel azonosított *Triticum monococcum* kromoszómák kariotípusa és a hexaploid búza A genomjának ugyanezen próbákkal megállapított kariotípusa között jelentős eltéréseket tapasztaltunk, ami az evolúció során bekövetkezett szekvencia-eliminációval, mutációval illetve intergenomikus átrendeződésekkel magyarázható. A repetitív próbákkal létrehozott kariotípus alapján a *T. monococcum* kromoszómák egymástól egyértelműen elkülöníthetők, azonban a tetra- és hexaploid búza homeológ A kromoszómáitól nem minden esetben különböztethetők meg azonos genetikai háttérben. A mikroszatellit próbák használata tovább növelte a diagnosztikus sávok számát és lehetővé tette a 6A és 6A^m kromoszómák megkülönböztetését. Az A és A^m kromoszómák egymástól való jobb megkülönböztethetősége érdekében további hibridizációs próbák kipróbálása lenne célszerű.

Eddigi tapasztalataink szerint az A és az A^m genom egymástól nem különböztethető meg genomi *in situ* hibridizációval. A *T. monococcum*-ból búzába történő génátviteli munka során ezért a transzlokációk nyomon követése szempontjából mindenképpen molekuláris markerek használata javasolt a molekuláris citogenetikai vizsgálatok kiegészítéseként. Ehhez azonban először *T. monococcum* kromoszómákhoz kapcsolt markerek azonosítása szükséges.

2. Kromoszómapárosodási vizsgálatok

Interspecifikus hibridek meiózis I. metafázisában készült kromoszómapreparátumain végzett egymást követő GISH és FISH lehetővé tette a párosodott kromoszómák és sok esetben kromoszómakarok azonosítását.

Búza × rozs F₁ hibridben a módszer alkalmasnak bizonyult a kromoszómák homeológia viszonyainak tanulmányozására, amit korábban GISH és FISH együttes alkalmazásával még nem végeztek el. Eredményeink megerősítették az irodalmi adatokat, de a párosodott kromoszómakarok FISH mintázat alapján történő azonosítása során olyan kromoszóma-asszociácót (3DS–3BS) azonosítottunk a legnagyobb gyakorisággal, melyet korábban még nem írtak le. Vizsgálataink alátámasztották a FISH alkalmazásának lehetőségét meiózisban. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a mitózisban rutinszerűen használt egymást követő GISH és FISH alkalmazásával növelhető az egy kromoszómapreparátumról szerezhető információ mennyisége meiózisban is.

Durumbúza × alakor F₁ hibridben bizonyítottuk az A és A^m kromoszómák közötti nagyfokú párosodást, ami az alakor A^m és a búza A genomjának jó kombinálódóképességét bizonyítja.

3. *Triticum monococcum* kromatint tartalmazó genetikai anyag előállítás

A *T. monococcum*-ból történő sikeres génátvitel annál hosszadalmasabb folyamat, minthogy az egy PhD munka keretében befejeződjen, de kezdeti eredményeink biztatóak.

Jól keresztezhető féltörpe alakor felhasználásával sikeresen hoztunk létre hexaploid búza és durumbúza × alakor hibrideket, majd azokból visszakeresztezéssel BC₃ növényeket, illetve genomduplikálással amfiploidokat. A növények jelenleg a tenyészkerti tesztelés fázisában vannak, de nemesítésben történő későbbi hasznosíthatóságukat jól előrevetíti, hogy mesterséges levélrozsdafertőzéssel jó csiranövénykori ellenállósággal rendelkező genotípusokat azonosítottunk.

A martonvásári Gabona Génbank *T. monococcum* gyűjteményében nagy genetikai diverzitás rejlik, melynek kiaknázására a jól keresztezhető alakor genotípus előnemesítési programban történő használata nyújt lehetőséget. Ez a genotípus összekötő kapocsként is szolgálhat az előnemesítési programokban, felhasználásával úgynevezett 'híd' keresztezések hozhatók létre a búzával nem, vagy nagyon nehezen keresztezhető *T. monococcum* genotípusok és a hexaploid búza között.

További *T. monococcum* tételek nemesítésbe ily módon történő bevonása azonban szükségessé teszi a martonvásári alakor gyűjtemény pontosabb jellemzését, melyben nagy szerepe lehetne a molekuláris markerek használatának.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A búzanemesítés egyik legfontosabb célja a termesztett búzafajok betegség-ellenállóságának javítása, hiszen rezisztens fajták használatával biztonságosabbá és gazdaságosabbá tehető a búzatermesztés. A *Triticum monococcum* L. ($2n=2x=14$, $A^m A^m$) a búzát fertőző legjelentősebb levélbetegségekkel szemben (szár- levél- és sárgarozsda, valamint a lisztharmat) kiváló ellenállóságú. Kedvező tulajdonságai génforrásként alkalmazva hagyományos keresztezésekkel sikeresen vihetők át hexaploid búzába.

Kutatásaink távlati célja a *T. monococcum* génállományának hatékony felhasználása a búzanemesítési programokban, amelynek elősegítéséhez a munkánk során a hatékony génátvitel feltételeit kutattuk. A kromoszómakapcsolt génátvitel egyik feltétele az átvitt kromoszómák és kromoszómaszegmentumok követése a búza genomában, melyre jó lehetőséget ad a molekuláris citogenetika eszköztárába tartozó *in situ* hibridizáció. Alkalmazása azonban megköveteli a kimutatni kívánt faj kariotípusának pontos ismeretét, ami a *T. monococcum* esetében eddig nem állt rendelkezésre. A génátvitel másik fontos feltétele a kromoszómák párosodása meiózisban, mivel így várhatunk rekombináns egyedeket a későbbi generációkban, ezért vizsgáltuk a búza és alakor kromoszómák meiotikus viselkedését. A megfelelő növényi anyag létrehozásához tetraploid és hexaploid búzafajokat kereszteztünk *T. monococcum*-mal.

Kutatásaink eredményeképp elkészítettük a *T. monococcum* fluoreszcens *in situ* hibridizációs kariotípusát Afa family és pTa71 repetitív DNS próbákkal, ami alapján az $1A^m$, $4A^m$, $5A^m$ és $7A^m$ kromoszómák megkülönböztethetőek a hasonló búza homeológ csoportokhoz tartozó A kromoszómáktól. Ezt követően különböző mikroszatellit próbák (GAA, CAG, AAC és AGG) hibridizációs mintázatát térképeztünk a *T. monococcum* kromoszómákon. A vizsgált próbák közül a GAA és CAG próbák bizonyultak a legalkalmasabbnak az A^m kromoszómák azonosítására, melyek a korábbi repetitív próbák használatával kombinálva lehetővé tették az A és A^m kromoszómák jobb megkülönböztetését.

A meiotikus kromoszómapárosodás vizsgálatára egymást követő genomi és fluoreszcens *in situ* hibridizációval búza-búza kromoszómapárosodásokat és kromoszómakar-asszociációkat azonosítottunk búza \times rozs F_1 hibridek meiózisában. A módszerrel igazoltuk, hogy az A és D kromoszómák párosodnak a legnagyobb arányban (53%). Leggyakrabban a 3A és 3D kromoszómák hosszú karja, valamint a 3D és 3B kromoszómák rövid karjai között fordult elő asszociáció. Ugyanezen módszer alkalmazásával igazoltuk az A és A^m kromoszómák preferált párosodását (99,7%) *T. turgidum* subsp. *durum* \times *T. monococcum* hibridekben. Megfigyelésünkre *T. monococcum* A^m és a hexaploid búza A genomja között rekombináció jöhet létre.

Hagyományos (Mv Alkor) és féltörpe (1T-1) *T. monococcum* felhasználásával keresztezési programot indítottunk tetraploid durumbúzával és hexaploid búzával, melynek során kimutattuk az

1T-1 féltörpe alakor genotípus jó keresztezhetőségét. Ezt követően a *T. aestivum* (Mv9kr1) × *T. monococcum* (1T-1) F₁ utódok többszöri, búzával történő visszakeresztezésével BC₃ növényeket állítottunk elő, amelyek között mesterséges csíranövénykori levélrozsda fertőzési tesztben immunis és rezisztens növényeket azonosítottunk.

Durumbúza × alakor keresztezésével ABA^m genomösszetételű F₁ hibridet, majd kolhicinkezeléssel amfiploidot állítottunk elő, melynek genomösszetételét GISH-sel és FISH-sel állapítottuk meg. Az újonnan létrehozott amfiploidok felhasználásával az alakor kedvező tulajdonságai az amfiploid híd felhasználásával feltételezhetően nagyobb eséllyel vihetők át a hexaploid búzába, mint az alakorral történő közvetlen keresztezéssel.

7 SUMMARY

One of the most important aims of wheat breeding is to improve the biotic resistance of wheat species, because production of resistant varieties offers the safest and most economical way of disease control. Among the *Triticeae*, einkorn wheat (*T. monococcum* L. subsp. *monococcum*, $2n=2x=14$, $A^m A^m$) is thought to be one of the most valuable sources of resistance genes for cereal breeding. It is highly resistant to stem, leaf and stripe rust and powdery mildew. Its fungal disease resistance is transferable into hexaploid wheat using traditional crossing methods.

The aim of this research is the utilization of *T. monococcum* in wheat breeding programmes and to study the requirements of effective gene transfer. Molecular cytogenetic methods make it possible to detect and follow the transferred chromosomes and chromosome segments in wheat background. In order to use the fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect the alien chromatin we have to know the karyotype of the donor species. FISH karyotype of *T. monococcum* using the repetitive DNA probes were not studied so far. In order to obtain recombinant lines the chromosomes of wheat and alien species have to be paired in meiosis metaphase I. Therefore meiotic behaviour of wheat-alien F_1 hybrids were studied. The genetic material was produced by crossing *T. aestivum* with *T. monococcum* and *T. turg.* subsp. *durum* with *T. monococcum*.

The identification of *T. monococcum* chromosomes was carried out by FISH using repetitive DNA probes, Afa family and pTa71. All chromosomes of einkorn were distinguishable and some chromosomes ($1A^m$, $4A^m$, $5A^m$ and $7A^m$) showed very similar hybridization pattern to the A chromosomes of tetraploid and hexaploid wheat originated from *T. urartu* (2, 6 and 7 A^m).

Hybridization pattern of microsatellite motifs (GAA, CAG, AAC and AGG) were mapped on *T. monococcum* chromosomes. FISH proved that GAA and CAG motifs could clearly identify the chromosome $6A^m$. SSRs represent additional landmarks for the identification of A^m chromosomes. FISH using repetitive DNA probes Afa family and pTa71 in combination with SSR probes, makes possible to identify the A^m chromosomes of *T. monococcum* and the better discrimination of A^m and A chromosomes.

Chromosome pairing in the meiotic metaphase I have been characterized by sequential genomic and fluorescent *in situ* hybridization in wheat-rye F_1 hybrids. The method allow not only the discrimination of wheat and rye chromosomes but the identification of individual wheat and rye chromosome arms involved in the chromosome associations of wheat-rye hybrids.

53 % of wheat-wheat chromosome associations were detected between the A and D genomes. Among the A-D chromosome associations the pairing between the 3AL and 3DL arms was observed with the highest frequency, while the 3DS-3BS was the most frequent association among all types of chromosome associations. The same method was used to confirm the preferential

pairing (99,7%) of A and A^m chromosomes of *T. turgidum* subsp. *durum* × *T. monococcum* which is essential for the recombination between the chromosomes.

A crossing programme was started to test the crossability of traditional (Mv Alkor) and semi-dwarf (1T-1) einkorn with tetraploid and hexaploid wheats. Our results confirm the good crossability of semi-dwarf einkorn line. Wheat-einkorn BC₃ plants were produced by the backcrossing *T. aestivum* (Mv9kr1) × *T. monococcum* (1T-1) F₁ hybrids with wheat. The leaf rust resistance of BC₃ plants were evaluated by artificial infection in greenhouse at seedling stage and immune and resistant plants were identified.

Amphiploids were produced by the genome duplication of *T. turg.* subsp. *durum* × *T. monococcum* F₁ hybrids using colchicine treatment. The ABA^m genome structure of the progenies were confirmed by GISH and FISH. The newly developed amphiploids could be used in bread wheat improvement to transfer the biotic resistance of einkorn into cultivated hexaploid wheat via 'bridge-crossing'.

8 MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- AGARWAL M., SHRIVASTAVA N., PADH H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27 617–631. p.
- AL-KAFF N., KNIGHT E., BERTIN I., FOOTE T., HART N., GRIFFITHS S., MOORE G., (2008): Detailed dissection of the chromosomal region containing the *Ph1* locus in wheat *Triticum aestivum*: With deletion mutants and expression profiling. *Annals of Botany*, 101 863–872. p.
- ANKER C.C., NIKS R.E., (2000): Prehaustorial resistance to wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*, in *Triticum monococcum* (s.s.). *Euphytica*, 117 209–215. p.
- ARAGON-ALCAIDE L., READER S., BEVAN A., SHAW P., MILLER T., MOORE G. (1997): Association of homologous chromosomes during floral development. *Current Biology*, 7 905–908. p.
- BADAEVA E. D., FRIEBE B., GILL B.S. (1996): Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome*, 39 293–306. p.
- BADAEVA E.D., DEDKOVA O.S., GAY G., PUKHALSKYI V.A., ZELENIN A.V., BERNARD S., BERNARD M. (2007): Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*, 50 907–926. p.
- BAI D., KNOTT D.R., ZALE J.M. (1998): The inheritance of leaf and stem rust resistance in *Triticum monococcum* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 78 223–226. p.
- BEAUDRY J. R. (1951): Seed development following the mating of *Elymus virginicus* L. and *Agropyron repens* L. Beauv. *Genetics*, 36 109–126. p.
- BEDBROOK J., JONES J., O'DELL M., THOMPSON R.D., FLAVELL R.B. (1980): A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*, 19 525–560. p.
- BEIJERINCK N. W. (1884): Über die Bastarde zwischen *Triticum monococcum* × *Triticum dicoccum*. *Botanische Zeitung*, 31 11-13. p.
- BELEA A. (1976): Fajkeresztezők citogenetikája a *Triticinae* alakkörben. Akadémiai doktori értekezés. Budapest: MTA TMB. 78 p.
- BELEA A. (1986): Faj- és nemzetségkeresztezők a növényvilágban. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 235 p.
- BELEA A., VÖRÖSVÁRY G., HOLLY L. (2005): Fajkeresztezők az alakor (*Triticum monococcum*) és más búzafajok között (*Triticum* spp.). *Növénytermelés*, 54 101–109. p.

- BELYAYEV A., RASKINA O., KOROL A., NEVO E. (2000): Coevolution of A and B genomes in allotetraploid *Triticum dicoccoides*. *Genome*, 43 1021–1026. p.
- BENAVENTE E., CIFUENTES M., DUSAUTOIR J.C., DAVID J. (2008): The use of cytogenetic tools for studies in the crop-to-wild gene transfer scenario. *Cytogenetic and Genome Research*, 120 384–395. p.
- BENAVENTE E., FERNANDEZ-CALVIN B., ORELLANA J. (1996): Relationship between the levels of wheat-rye metaphase I chromosomal pairing and recombination revealed by GISH. *Chromosoma*, 105 92-96. p.
- BENNETT M.D., LEITCH I.J. (1995): Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Annals of Botany*, 76 113–176. p.
- BERTIN I., FISH L., FOOTE T. N., KNIGHT E., SNAPE J., MOORE G. (2009): Development of consistently crossable wheat genotypes for alien wheat gene transfer through fine-mapping of the *Kr1* locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 119 1371–1381. p.
- BIFFEN R.H. (1905): Mendel's law of inheritance and wheat breeding. *Journal of Agricultural Science*, 1 4. p.
- BLANCO A., PERRONE V., SIMEONE R. (1988): Chromosome pairing variation in *Triticum turgidum* x *Dasypyrum villosum* (L) candargy hybrids and genome affinities. In: Proceedings of VII. International Wheat Genetic Symposium, Cambridge, 1 63–68. p.
- BLARINGHAM L. (1914): Sur la production d'hybrides entre l'engrain (*T. monococcum* L.) et differents blés cultives. *CH Academy of Sciences*, 346–349. p.
- BORGHI B., CASTAGNA R., CORBELLINI M., HEUN M., SALAMINI F. (1996): Breadmaking quality of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum*). *Cereal Chemistry*, 73 208–214. p.
- BOTSTEIN D., WHITE R. L., SKOLNICK M., DAVIS R. W., (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32 314–333. p.
- BRANDOLINI A., HIDALGO A., MOSCARITOLO S. (2008): Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour. *Journal of Cereal Science*, 47 599–609. p.
- CADLE M.M., MURRAY T.D., JONES S.S. (1997): Identification of resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides* in *Triticum monococcum*. *Plant Disease*, 81 1181–1186. p.
- CASTAGNA R., BORGHI B., HEUN M., SALAMINI F. (1996): Integrated approach to einkorn wheat breeding. 183-192. In: PADULOSI S. HAMMER K. HELLER J. (Szerk.) *Hulled wheats*. Rome (Italy): International Plant Genetic Resources Institute. 263 p.

- CHAPMAN V., RILEY R. (1970): Homoeologous meiotic chromosome pairing in *Triticum aestivum* in which chromosome 5B is replaced by an alien homoeologue. *Nature*, 226 376–377. p.
- CHAPMAN V., MILLER T.E., RILEY R., (1976): Equivalence of the A genome of bread wheat and that of *Triticum urartu*. *Genetics Research*, 27 69–76. p.
- CHARMET G. (2011): Wheat domestication: lessons for the future. *Comptes Rendus Biologies*, 334 212–220. p.
- CHANG K.D., FANG S.A., CHANG F.C., CHUNG M.C. (2010): Chromosomal conservation and sequence diversity of ribosomal RNA genes of two distant *Oryza* species. *Genomics*, 96 181–190. p.
- CHEN P.D., TSUJIMOTO H., GILL B.S. (1994): Transfer of *Phl* genes promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 88 97–101. p.
- CHHUNEJA P., KAUR S., GARG T., GHAI M., KAUR S., PRASHAR M., BAINS N.S., GOEL R.K., KELLER B., DHALIWAL H.S., SINGH K. (2008): Mapping of adult plant stripe rust resistance gene in diploid A genome wheat species and their transfer to bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 116 313–324. p.
- CIFUENTES M., BENAVENTE E. (2009): Wheat-alien metaphase I pairing of individual wheat genomes and D genome chromosomes in interspecific hybrids between *Triticum aestivum* L. and *Aegilops geniculata* Roth. *Theoretical and Applied Genetics*, 119 805–813. p.
- CIFUENTES M., BLEIN M., BENAVENTE E. Theoretical(2006): A cytomolecular approach to assess the potential of gene transfer from a crop (*Triticum turgidum* L.) to a wild relative (*Aegilops geniculata* Roth.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112 657–664. p.
- CIFUENTES M., GARCIA-AGÜERO V., BENAVENTE E. (2010): A comparative analysis of chromosome pairing at metaphase I in interspecific hybrids between durum wheat (*Triticum turgidum* L.) and the most widespread *Aegilops* species. *Cytogenetic and Genome Research*, 129 124–132. p.
- CONTENTO A., HESLOP-HARRISON J. S., SCHWARZACHER T. (2005): Diversity of a major repetitive DNA sequence in diploid and polyploid *Triticeae*. *Cytogenetic and Genome Research*, 109 34–42. p.
- COOKE R. J., (1992): Handbook of variety testing. Electrophoresis handbook: variety identification. Zürich: International Seed Testing Association. 46 p.
- COX T.S., HARRELL L.G., CHEN P., GILL B.S. (1991): Reproductive behaviour of hexaploid/diploid wheat hybrids. *Plant Breeding*, 107 105–118. p.
- CPVO - Közösségi Növényfajta Hivatal: www.cpvo.europa.eu

- CUADRADO A., SCHWARZACHER T., JOUVE N. (2000): Identification of different chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 711–717. p.
- CUADRADO A., VITELOZZI F., JOUVE N., CEOLONI C. (1997): Fluorescence *in situ* hybridization with multiple repeated DNA probes applied to the analysis of wheat–rye chromosome pairing. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 347–355. p.
- CUADRADO A., CARDOSO M., JOUVE N. (2008): Physical organisation of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 120 210–219. p.
- D. NAGY E., MOLNÁR-LÁNG M. (2000): Frequency of pairing between the 1B/1R translocations and its respective homo(eo)logous in a wheat-rye hybrid as revealed by GISH. *Cereal Research Communications*, 28 41–48. p.
- D’EGIDIO M.G., NARDI S., VALLEGA V. (1993): Grain, flour and dough characteristics of selected strains of diploid wheat *Triticum monococcum* L. *Cereal Chemistry*, 70 298–303. p.
- DAKOURI A., MCCALLUM B. D., RADOVANOVIC N., CLOUTIER S. (2013): Molecular and phenotypic characterization of seedling and adult plant leaf rust resistance in a world wheat collection. *Molecular Breeding*, 32 663–677. p.
- DEVOS K.M., ATKINSON M.D., CHINOY C.N., FRANCIS H.A., HARCOURT R.L., KOEBNER R.M.D., LIU C.J., MASOJC P., XIE D.X., GALE M.D. (1993): Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 85 673–680. p.
- DEVOS K. M., DUBCOVSKY J., DVOŘÁK J., CHINOY C. N., GALE M. D. (1995): Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination. *Theoretical and Applied Genetics*, 91 282–288. p.
- DOEBLEY J. F., GAUT B.S., SMITH B.D. (2006): The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127 1309–1321. p.
- DOLEŽEL J., MACAS J., LUCRETTI S. (2001): Flow analysis and sorting of plant chromosomes. *Current Protocols in Cytometry*, 9 5.3.1–5.3.33.
- DOVER G. A. (1993): Evolution of genetic redundancy for advanced players. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3 902–910 p.
- DUBCOVSKY J., LIJAVETZKY D., APPENDINO L., TRANQUILLI G. (1998): Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 968–975. p.

- DUBCOVSKY J., LUO M.C., ZHONG G.Y., BRANSTEITTER R., DESAI A., KILIAN A., KLEINHOF S. A., DVOŘÁK J. (1996): Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*, 143 983–999. p.
- DVOŘÁK J., DI TERLIZZI P., ZHANG H.B., RESTA P. (1993): The evolution of polyploid wheats: Identification of the A genome donor species. *Genome*, 36 21–31. p.
- DVOŘÁK J., ZHANG H.B. (1990): Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87 9640–9644. p.
- DYCK P.L., BARTOS P. (1994): Attempted transfer of leaf rust resistance from *Triticum monococcum* and durum wheat to hexaploid wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 74 733–736. p.
- EMPILI S., CASTAGNA R., BRANDOLINI A. (2000): Morpho-agronomic variability of the diploid wheat *Triticum monococcum* L. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 124 36–40. p.
- EUROPEAN WHEAT DATABASE. <http://genbank.vurv.cz/ewdb/>
- FARIS J.D., FELLERS J.P., BROOKS S.A., GILL B.S. (2003): A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus *Q* in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics*, 164 311–321. p.
- FEDAK G. (1977): Increased homoeologous chromosome pairing in *Hordeum vulgare* × *Triticum aestivum* hybrids. *Nature*, 266 529–530. p.
- FEDAK G., KIM N.S. (2008): Tools and methodologies for cytogenetic studies of plant chromosomes. *Cytology and Genetics*, 42 189–203. p.
- FELDMAN M. (2000): The origin of cultivated wheat. 3–55p. In: BONJEAN A. ANGUS W. (Szerk.): *The World Wheat Book*. Paris: Lavoisier Tech&Doc. 1201 p.
- FELDMAN M., LEVY A.A. (2005): Allopolyploidy: a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 109 250–258. p.
- FELDMAN M., LEVY A.A. (2009): Genome evolution in allopolyploid wheat - a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. *Journal of Genetics and Genomics*, 36 511–518. p.
- FELDMAN M., LEVY A.A., FAHIMA T., KOROL A. (2012): Genomic asymmetry in allopolyploids plants: wheat as a model. *Journal of Experimental Botany*, 63 5045–5059. p.
- FELDMAN M., LIU B., SEGAL G., ABBO S., LEVY A.A., VEGA J.M. (1997): Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, 147 1381–1387. p.

- FERNANDEZ-KALVIN B., ORELLANA J. (1992): Relationships between pairing frequencies and genome affinity estimations in *Aegilops ovata* × *Triticum aestivum* hybrid plants. *Heredity*, 68 65–172. p.
- FERRER E., GONZÁLEZ J.M., JOUVE N. (1984) : Identification of C-banded chromosomes in meiosis of common wheat, *Triticum aestivum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 67 257–261. p.
- FEUILLET C., TRAVELLA S., STEIN N., ALBAR L., NUBLAT A., KELLER B. (2003): Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100 15253–15258. p.
- FOMINAYA A., JOUVE N. (1985): C-banding at meiosis as a mean of analyzing cytogenetic structure in wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 27 689–696. p.
- FRÉGEAU-REID J., ABDEL-AAL E.S.M. (2005): Einkorn: A potential functional wheat and genetic resource. 37–61 p. In: ABDEL-AAL, E., WOOD, P. (Szerk.) *Speciality grains for food and feed*. St.Paul, MN: American Association of Cereal Chemistry 413 p.
- FRIEBE B., KIM N.S., KUSPIRA J., GILL B.S. (1990): Genetic and cytogenetic analyses of the A genome of *Triticum monococcum*. VI. Production and identification of primary trisomics using the C-banding technique. *Genome*, 33 542–555. p.
- FRIEBE B., JIANG J., RAUPP W.J., MCINTOSH R.A., GILL B.S. (1996): Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*, 71 59–87. p.
- FURATA Y., NISHIKAWA K., YAMAGUCHI S. (1986): Nuclear DNA content in diploid wheat and its relatives in relation to the phylogeny of tetraploid wheat. *Japanese Journal of Genetics*, 61 97–105. p.
- GALL J.G., PARDUE M.L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 69 378–383. p.
- GAY G., BERNARD M. (1994): Production of intervarietal substitution lines with improved interspecific crossability in the wheat cv. Courtot. *Agronomie*, 14 27–32. p.
- GERLACH W.L. (1977): N-banded karyotypes of wheat species. *Chromosoma*, 62 49–56. p.
- GERLACH W.L., BEDBROOK J.R. (1979): Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research*, 7 1869–1885. p.
- GERLACH W.L., MILLER T.E., FLAVELL R.B. (1980): The nucleolus organizers of diploid wheats revealed by *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 58 97–100. p.

- GILL R.S., DHALIWAL H.S., MULTANI D.S. (1988): Synthesis and evaluation of *Triticum durum* – *T. monococcum* amphiploids. *Theoretical and Applied Genetics*, 75 912–916. p.
- GILL B.S., FRIEBE B., ENDO T.R. (1991): Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 34 830–839. p.
- GILL B.S., LI W., SOOD S., KURAPARTHY V., FRIEBE B.R., SIMONE K.J., ZHANG Z., FARIS J.D. (2007): Genetics and genomics of wheat domestication-driven evolution. *Israel Journal of Plant Sciences*, 55 223–229. p.
- 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(2): e57994. doi:10.1371/journal.pone.0057994
- GONCHAROV N.P., KONDRATENKO E.J.A., BANNIKOVA S.V., KONOVALOV A.A., GOLOVNINA K.A. (2007): Comparative genetic analysis of diploid naked wheat *Triticum sinskajae* and the progenitor *T. monococcum* accession. *Russian Journal of Genetics*, 43 1248–1256. p.
- GRIFFITHS S., SHARP R., FOOTE T.N., BERTIN I., WANOUS M., READER S., COLAS I., MOORE G. (2006): Molecular characterisation of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in hexaploid wheat. *Nature*, 439 749–752. p.
- HAMMER K., NEUMANN M., KISON H.U. (1996): Pre-breeding work on einkorn - cooperation between genebank and breeders. 200-204. In: PADULOSI S. HAMMER K. HELLER J. (Szerk.) *Hulled wheats*. Rome (Italy): International Plant Genetic Resources Institute. 263 p.
- HAN F., FEDAK G., GUO W., LIU B. (2005): Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids. *Genetics*, 170 1239–1245. p.
- HANCOCK J.M. (1996): Simple sequences and the expanding genome. *Bioessays*, 18 421–425. p.
- HERNANDEZ P., MARTIS M., DORADO G., PFEIFER M., GÁLVEZ S., SCHAAF S., JOUVE N., ŠIMKOVÁ H., VALÁRIK M., DOLEŽEL J., MAYER K.F.X. (2012): Next-generation sequencing and syntenic integration of flow-sorted arms of wheat chromosome 4A exposes the chromosome structure and gene content. *The Plant Journal*, 69 377–386. p.
- HEUN M., HALDORSEN S., VOLLAN K. (2008): Reassessing domestication events in the Near East: einkorn and *Triticum urartu*. *Genome*, 51 444–451. p.
- HIDALGO A., BRANDOLINI A., POMPEIA C., PISCOZZI R. (2006): Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *Journal of Cereal Science*, 44 182–193. p.

- HUANG S., SIRIKHACHORNKIT A., SU X., FARIS J., GILL B., HASELKORN R., GORNICKI P. (2002): Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/ Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99 8133–8138. p.
- HUSSIEN T., BOWDEN R.L., GILL B.S., COX T.S., MARSHALL D.S. (1997): Performance of four new leaf rust resistance genes transferred to common wheat from *Aegilops tauschii* and *Triticum monococcum*. *Plant Disease*, 81 582–586. p.
- HUSSIEN T., BOWDEN R.L., GILL B.S., COX T.S. (1998): Chromosomal locations in common wheat of three new leaf rust resistance genes from *Triticum monococcum*. *Euphytica*, 101 127–131. p.
- JAUHAR P.P. (2003): Formation of 2n gametes in durum wheat haploids: sexual polyploidization. *Euphytica*, 133 81–94. p.
- JAUHAR P.P., RIERA-LIZARAZU O., DEWEY W.G., GILL B.S., CRANE C.F., BENETT J.H. (1991): Chromosome pairing relationships among the A, B and genomes of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 82 441-449. p.
- JIANG J., GILL B.S. (1994): Non-isotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping; the first ten years. *Genome*, 37 105–111. p.
- JING H., KORNYYUKHIN D., KANYUKA K., ORFORD S., ZLATSKA A., MITROFANOVA O.P., KOEBNER R., HAMMOND-KOSACK K. (2007): Identification of variation in adaptively important traits and genome-wide analysis of trait-marker associations in *Triticum monococcum*. *Journal of Experimental Botany*, 58 3749-3764. p.
- JOHN H.A., BIRNSTIEL M.L., JONES K.W. (1969): RNA–DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223 582–587. p.
- KAMSTRA S.A., DE JONG J.H., JACOBSEN E., RAMANNA M.S., KUIPERS A.G.J. (2004): Meiotic behaviour of individual chromosomes in allotriploid *Alstroemeria* hybrids. *Heredity*, 93 15–21. p.
- KASHKUSH K., FELDMAN M., LEVY A.A. (2002): Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*, 160 1651–1659. p.
- KEPHART S.R. (1990): Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *American Journal of Botany*, 77 693–712. p.
- KERBER E.R., DYCK P.L. (1973): Inheritance of stem rust resistance transferred from diploid wheat (*Triticum monococcum*) to tetraploid and hexaploid wheat and chromosome location of the gene involved. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 15 397–409. p.

- KIHARA H. (1924): Cytologische und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen und die Sterilität in den Bastarden. *Memoirs of the College of Science Kyoto Imperial University*, 1 1–200. p.
- KILIAN B., ÖZKAN H., WALTHER A., KOHL J., DAGAN T., SALAMINI F., MARTIN W. (2007): Molecular diversity at 18 loci in 321 wild and 92 domesticate lines reveal no reduction of nucleotide diversity during *Triticum monococcum* (Einkorn) domestication: implications for the origin of agriculture. *Molecular Biology and Evolution*, 24 2657–2668. p.
- KIMBER G., ALSONSO L.S., SALLEE O.J. (1981): The analysis of meiosis in hybrids. Aneuploid hybrids. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 23 209–219. p.
- KING I.P., READER S.M., PURDIE K.A., ORFORD S.E., 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*, 72 318–321. p.
- KISS Á. (1968): Triticale, a homok új gabonája. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 179 p.
- KOBA T., SHIMADA T. (1993): Crossability of common wheat with *Aegilops squarrosa*. *Wheat Information Service*, 77 7–12. p.
- KOJIMA T., NAGAOKA T., NODA K., OGIHARA Y. (1998): Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 96 37–45. p.
- KROWLOW K.D. (1970): Untersuchungen über die Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 64 44–72. p.
- KRUPPA K., SZAKÁCS É., SEPSI A., LÁNGNÉ MOLNÁR M. (2012): Az *Agropyron glael* és búza×*A.glael* hibrid utódvonalak genom-összetételének vizsgálata mcGISH technikával. XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2012. március 6. MTA, Budapest. 133 p.
- KUBALÁKOVÁ M., KOVÁŘOVÁ P., SUCHÁNKOVÁ P., ČÍHALÍKOVÁ J., BARTOŠ J., LUCRETTI S., WATANABE N., KIANIAN S. F., DOLEŽEL J. (2005): Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics*, 170 823–829. p.
- LANGE W., WOJCIECHOWSKA B. (1976): The crossing of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.). I. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica*, 25 609–620. p.
- LÁNG L., BEDŐ Z. (2006): A hazai búzanemesítés stratégiai jelentősége. 19–25. p. In: DUDITS D. (Szerk.) *A búza nemesítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft. 334 p.
- LÁNGNÉ MOLNÁR M. (2006): Idegen fajú addíciók, szubsztitúciók és transzlokációk létrehozása a búzában. 33–43. p. In: DUDITS D. (Szerk.) *A búza nemesítésének tudománya. A*

- funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft. 334 p.
- LÁNGNÉ MOLNÁR M., KŐSZEGI B., LINC G., SUTKA J. (1996): Búza (*Triticum aestivum* L.)/*Triticum timopheevii* Zhuk. addíció, szubsztitúció és búza/rozs transzlokáció kimutatása C-sávozással és in situ hibridizációval. *Növénytermelés*, 45 237–245. p.
- LAGHETTI G., GIROLAMO F., HAMMER K., PIGNONE D. (2009): On the trail of the last autochthonous Italian einkorn (*Triticum monococcum* L.) and emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) populations: a mission impossible? *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56 1163–1170. p.
- LE H.T., ARMSTRONG K.C., 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*, 7 150–158. p.
- LEIN A. (1943): Die Genetische Grundlage der Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. *Zeitschrift für induktive Abstammungs und Vererbungslehre*, 81 28–61. p.
- LEITCH A.R., SCHWARZACHER T., JACKSON D., LEITCH I.J. (1994): *In situ* hybridization: a practical guide. Oxford: Bios Scientific Publishers 118.p
- LEVAN A. (1938): Effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, 24 471–486. p.
- LEVINSON G., GUTMAN G. A. (1987): High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 15 5323–5338. p.
- LEVY A. A., FELDMAN M. (2002): The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiology*, 130 1587–1593. p.
- LI W., GILL B.S. (2006): Multiple genetic pathways for seed shattering in the grasses. *Functional and Integrative Genomics*, 6 300–309. p.
- LIJAVETZKY D., MUZZI G., WICKER T., KELLER B., WING R., DUBCOVSKY J. (1999): Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for the A genome of wheat. *Genome*, 42 1176–1182. p.
- LINC G., SEPSI A., MOLNÁR-LÁNG M. (2012): A FISH karyotype to study chromosome polymorphisms for the *Elytrigia elongata* E genome. *Cytogenetic and Genome Research*, 136 138–144. p.
- LOGOJAN A., MOLNÁR-LÁNG M. (2000): Production of *Triticum aestivum*-*Aegilops biuncialis* chromosome additions. *Cereal Research Communications*, 28 221–228. p.
- MA H., SINGH R.P., MUJEEB-KAZI A. (1997): Resistance to stripe rust in durum wheats, A-genome diploids, and their amphiploids. *Euphytica*, 94 279–286. p.

- MAGYARORSZÁG ALAPTÖRVÉNYE (2013) I. Az alaptörvény és annak módosításai (2013.04.01.) *Magyar Közlöny*, 55 14584–14614 p.
- MARTINEZ-PEREZ E., SHAW P., MOORE G. (2000): Polyploidy induces centromere association. *Journal of Cell Biology*, 148 233–238. p.
- MARTINEZ-PEREZ E., SHAW P., MOORE G. (2001): The *Ph1* locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. *Nature*, 411 204–208. p.
- MATSUMARA S. (1936): Chromosome numbers in male germ cells of pentaploid wheat hybrids. *Japanese Journal of Genetics*, 12 104–106. p.
- MATSUOKA Y., NASUDA S. (2004): Durum wheat as a candidate for the unknown female progenitor of bread wheat: an empirical study with a highly fertile F1 hybrid with *Aegilops tauschii* Coss. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 1710–1717. p.
- MÁZIK-TÓKEI K., LELLEY T., GYULAI G., KISS E., HESZKY L.E. (1997): Meiotic and RAPD analysis of a dwarf type of *Agropyron repens* L. *Cereal Research Communications*, 25 127–133. p.
- MCFADDEN E.S., SEARS E.R. (1946): The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity*, 37 107–116. p.
- MCINTOSH R.A., DYCK P.L., THE T.T., CUSICK J., MILNE. D.L. (1984): Cytogenetical studies in wheat. XIII. *Sr35*- a 3rd gene from *Triticum monococcum* for resistance to *Puccinia graminis tritici*. *Zeitschrift für. Pflanzenzüchtung*, 92 1–14. p.
- MCMURRAY C.T. (1995): Mechanisms of DNA expansion. *Chromosoma*, 104 12–13. p.
- MEGYERI M., MIKÓ P., MOLNÁR I., KOVÁCS G. (2011): Development of synthetic amphiploids based on *Triticum turgidum* × *T. monococcum* crosses to improve the adaptability of cereals. *Acta Agronomica Hungarica*, 59 267–274. p.
- MIKÓ P., MEGYERI M., MOLNÁR-LÁNG M., KOVÁCS G. (2013): Characterization of *Triticum timopheevii* Zhuk. gene bank accessions for the development of synthetic amphiploid wheat lines. *Acta Agronomica Hungarica*, 61 113–121. p.
- MILLER T.E., HUTCHINSON J., READER C.M. (1983): The identification of the nucleolar organizer chromosomes of diploid wheat. *Theor Appl Genet*, 65 145–147. p.
- MILLER T.E., READER S.M., PURDIE K.A., KING I.P.(1994): Determination of the frequency of wheat–rye chromosome pairing in wheat / rye hybrids with and without chromosome 5B. *Theoretical and Applied Genetics*, 89 255–258. p.
- MILLER A.K., GALIBA G., DUBCOVSKY J. (2006): A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-A m 2 in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 275 193–203. p.

- MOLNÁR I., BENAVENTE E., MOLNÁR-LÁNG M. (2009): Detection of intergenomic chromosome rearrangements in irradiated *Triticum aestivum* – *Aegilops biuncialis* amphiploids by multicolour genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 52 156–165. p.
- MOLNÁR I., CIFUENTES M., SCHNEIDER A., BENAVENTE E., 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 65–76. p.
- MOLNÁR I., LINC G., DULAI S., NAGY E.D., 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*, 126 369–374. p.
- MOLNÁR I., MOLNÁR-LÁNG M., (2010): GISH reveals of meiotic pairing with wheat for individual *Aegilops biuncialis* chromosomes. *Biologia Plantarum*, 54 259–264. p.
- MOLNÁR I., SCHNEIDER A., 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 GAA sequences. *Cereal Research Communications*, 33 673–680. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., CSEH A., SZAKÁCS É., MOLNÁR I. (2010): Development of a wheat genotype combining the recessive crossability alleles *kr1kr1kr2kr2* and the 1BL.1RS translocation, for the rapid enrichment of 1RS with new allelic variation. *Theoretical and Applied Genetics*, 120 1535–1545. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., D.NAGY E., SCHNEIDER A., MOLNÁR I. (2002): Molecular cytogenetic analysis of wheat-alien hybrids and derivatives. *Acta Agronomica Hungarica*, 50 303–311. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., LOGOJAN A., SUTKA J. (2000): Production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) × winter barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, 43 1045–1054. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., SUTKA J. (1996): Transfer of the recessive crossability allele *kr1* from Chinese Spring into the winter wheat variety Martonvásári 9. *Euphytica*, 90 301–305. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., SUTKA J. (1999): Production and molecular cytogenetic identification of wheat-barley hybrids and translocations. *Journal of Plant Biotechnology*, 1 8–12. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., SZAKÁCS É., MOLNÁR I., CSEH A., SCHNEIDER A., KRUPPA K. (2012): Wheat-alien introgression programme in Martonvásár. 239–240 p. In: Abstracts of III. Vavilov International Conference. St. Petersburg, 6-9 November 2012. 380 p.

- MOLNÁR-LÁNG M., SUTKA J. (1994): The effect of temperature on seed set and embryo development in reciprocal crosses of wheat and barley. *Euphytica*, 78 53–58. p.
- MONNEVEUX P., ZAHARIEVA M., REKIKI D. (2000): The utilization of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. *CIHEAM-Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens*, 40 71–81. p.
- MOORE G. (2005): How to date the correct partner? – Role of the *Ph1* locus. 49–57. p. In: TSUNEWAKI K. (Szerk.) *Frontiers of Wheat Bioscience. The 100th Memorial Issue of Wheat Information Service*. Yokohama, Japan: Kihara Memorial Foundation For the Advancement of Life Sciences. 256. p.
- MOUDRÝ J., KONVALINA P., STEHNO Z., CAPOUCHOVÁ I., MOUDRÝ J. (2011): Ancient wheat species can extend biodiversity of cultivated crops. *Scientific Research and Essays*, 6 4273–4280. p.
- MUJEEB-KAZI A., HETTEL G.P. (1995): Utilizing wild grass biodiversity in wheat improvement: 15 years of wide cross research at CIMMYT. *CIMMYT Research Report No. 2*, 140 p.
- MUJEEB-KAZI A., RAJARAM S. (2002): Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement. In: *Bread Wheat Improvement and Production*, FAO, 199–215. p.
- MUKAI Y., NAKAHARA Y., YAMAMOTO M. (1993): Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolour fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, 36 489–494. p.
- MUNKVOLD J.D., GREENE R.A., BERMUDEZ-KANDIANIS C.E., LA ROTA C.M., EDWARDS H. et al. (2004): Group 3 chromosome bin maps of wheat and their relationship to rice chromosome 1. *Genetics*, 168 639–650. p.
- NAGAKI K., TSUJIMOTO H., ISONO K., SASAKUMA T. (1995): Molecular characterization of a tandem repeat, Afa family, and its distribution among *Triticeae*. *Genome*, 38 479–486. p.
- NARANJO T. (1992): The use of homoeologous pairing in the identification of homoeologous relationships in *Triticeae*. *Hereditas*, 116 219–223. p.
- NARANJO T., FERNÁNDEZ-RUEDA P. (1996): Pairing and recombination between individual chromosomes of wheat and rye in hybrids carrying the *ph1b* mutation. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 242–248. p.
- NARANJO T., ROCA A., GOICOECHEA P.G., GIRALDEZ R. (1987): Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome*, 29 873–882. p.
- NEUMANN M., SODKIEWICZ W., SKIEBE K. (1985): On possibilities of genetic information transfer from *Triticum monococcum* to triticale. *Genetica Polonica*, 26 209–215. p.

- NISHIYAMA I., INOMATA N. (1966): Embryological studies on cross incompatibility between $2\times$ and $4\times$ in *Brassica*. *Japanese Journal of Genetics*, 41 27–42. p.
- O'MARA J.G. (1940): Cytogenetic studies on *Triticeae*. I. A method for determining the effect of individual *Secale* chromosomes on *Triticum*. *Genetics*, 25 401–408. p.
- ORTIZ-FERRARA G., MOSAAD M.G., MAHALAKSHMI V., FISHER R.A. (1995): Photoperiod and vernalization response of wheat under controlled environment and field conditions. *Plant Breeding* 114 505–509. p.
- OZKAN H., LEVY A.A., FELDMAN M. (2001): Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell* 13 1735–1747. p.
- PEDERSEN C., LANGRIDGE P. (1997): Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome*, 40 589–593. p.
- PENG J.H., SUN D., NEVO E. (2011): Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Molecular Breeding*, 28 281–90. p.
- PERCY R.G. (1986): Effects on environment upon ovule abortion in interspecific hybrids and single species cultivars of cotton. *Crop Science*, 26 938–942. p.
- PERRINO P., LAGHETTI G., D'ANTUONO L.F., AL AJLOUNI M., KANBERTAY M., SZABÓ A.T., HAMMER K. (1996): Ecogeographical distribution of hulled wheat species. 102–118. p. In: PADULOSI S., HAMMER K., HELLER J.(Szerk.) *Hulled wheats*. Rome (Italy): International Plant Genetic Resources Institute. 263 p.
- PLAMENOV D., BELCHEV I., KIRYAKOVA V., SPETSOV P. (2009): Fungal resistance of *Triticum durum* –*T. monococcum* ssp. *aegilopoides* amphiploid. *Journal for Plant Diseases and Plant Protection*, 116 60–62. p.
- PRIETO P., SHAW P., MOORE G. (2004): Homologue recognition during meiosis is associated with a change in chromatin conformation. *Nature Cell Biology*, 6 906–908. p.
- PUGSLEY A.T. (1972): Additional genes inhibiting winter habit in wheat. *Euphytica*, 21 547–552. p.
- PURNHAUSER L. (2006): Molekuláris markerek a rezisztenciagének nyomon követéséhez. 289–299. p. In: DUDITS D. (Szerk.) *A búza nemesítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft. 334 p.
- PURNHAUSER L., BÓNA L., LÁNG L. (2011): Identification of *Sr31* and *Sr36* stem rust resistance genes in wheat cultivars registered in Hungary. *Cereal Research Communications*, 39 53–66. p.
- QI L., FRIEBE B., GILL B.S. (2006): Complex genome rearrangements reveal evolutionary dynamics of pericentromeric regions in the *Triticeae*. *Genome*, 49 1628–1639. p.

- RAJHÁTHY T. (1954): Genetic investigation of interspecific wheat hybrids. *Acta Agronomica Hungarica*, 4 203–237. p.
- RAJHÁTHY T. (1955): Faj- és nemzetségkeresztezések. 271–323. p. In: LELLEY J., RAJHÁTHY T.: *A búza és nemesítése*. Budapest: Akadémiai Kiadó. 544 p.
- RAYBURN A.L., GILL B.S. (1985): Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *Journal of Heredity*, 76 78–81. p.
- RAYBURN A.L., GILL B.S. (1986): Molecular identification of the D genome chromosomes of wheat. *Journal of Heredity*, 77 253–255. p.
- RILEY R., CHAPMAN V. (1958): Genetic control of cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature*, 182 713–715. p.
- RILEY R., CHAPMAN V. (1967): The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genetics Research*, 9 259–267. p.
- RILEY R., CHAPMAN V., KIMBER G. (1959): Genetic control of chromosome pairing in intergeneric hybrids with wheat. *Nature*, 183 1244–1246. p.
- RILEY R., LAW C.N. (1965): Genetic variation in chromosome pairing. *Advances in Genetics*, 13 57–114. p.
- ROBERTS M.A., READER S.M., DALGLIESH C., MILLER T.E., FOOTE T.N., FISH L.J., SNAPE J.W., MOORE G. (1999): Induction and characterisation of *Ph1* wheat mutants. *Genetics*, 153 1909–1918. p.
- ROGERS W.J., MILLER T.E., PAYNE P.I., SEEKINGS J.A., SAYERS E.J., HOLT L.M., LAW C.N. (1997): Introduction to bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and assessment for bread-making quality of alleles from *T.boeoticum* Boiss ssp *thaoudar* at Glu-A1 encoding two high-molecular-weight subunits of glutenin. *Euphytica*, 93 19–29. p.
- ROUSE M. N., JIN Y. (2011): Stem rust resistance in A-genome diploid relatives of wheat. *Plant Disease*, 95 941–944. p.
- SAINTENAC C., ZHANG W., SALCEDO A., ROUSE M.N., TRICK H.N., AKHUNOV E., DUBCOVSKY J. (2013): Identification of wheat gene *Sr35* that confers resistance to Ug99 stem rust race group. *Science*, 341 783–786. p.
- SAKAMURA T. (1918): Kurze Mitteilung über die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der *Triticum*-Arten. *Shokubutsugaku Zasshi*, 32 151–153. p.
- SALAMINI F., OZKAN H., BRANDOLINI A., SCHAFER-PREGL R., MARTIN W. (2002): Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, 3 429–441. p.

- SÁNCHEZ-MORÁN E., BENAVENTE E., ORELLANA J.(2001): Analysis of karyotypic stability of homoeologous-pairing (*ph*) mutants in allopolyploid wheats. *Chromosoma*, 110 371–377. p.
- SARKAR P., STEBBINS G.L. (1956): Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *American Journal of Botany*, 43 297–304. p.
- SCHWARZACHER T. (2003): DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome*, 46 953–962. p.
- SCHWARZACHER T. (2009): Fluorescent *in situ* hybridization to detect transgene integration into plant genomes. In: JONES H. D., SHEWRY P.R. (Szerk.) *Transgenic Wheat, Barley and Oats. Methods in Molecular Biology, Vol 478*, . New York, NY: Humana Press.227–246. p.
- SCHWARZACHER T., ANAMTHAWAT-JONSON K., HARRISON G. E., ISLAM A., JIA J.Z., KING I.P., LEITCH A.R., MILLER T.E., READER S.M., ROGERS W.J., SHI M., HESLOP-HARRISON J.S. (1991): Genome *in situ* hybridization to identify alien chromosome segments in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 84 778–786. p.
- SCHWARZACHER T., LEITCH A.R., BENNETT M.D., HESLOP-HARRISON J.S.(1989): *In-situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*, 64 315–324. p.
- SEARS E.R. (1976): Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annual Review of Genetics*, 10 31–51. p.
- SEARS E.R. (1977): An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 19 585–593.p.
- SEARS E.R. (1981): Transfer of alien genetic material to wheat. 75–89. p. In: EVANS L.T., PEACOCK W.J. (Szerk.) *Wheat science – Today and Tomorrow*. Cambridge : Cambridge University Press. 304 p.
- SEPSI A , MOLNÁR I., SZALAY D., MOLNÁR-LÁNG M. (2008): Characterization of a leaf rust resistant wheat–*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1 using sequential multicolor GISH and FISH. *Theoretical and Applied Genetics*, 116 825–834. p.
- SHARMA H.C., WAINES J.G.(1981): Attempted gene transfer from tetraploids to diploids in *Triticum*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 23 639–645. p.
- SHARMA H.C.(1995): How wide can a wide cross be? *Euphytica*, 82 43–64. p.
- SHI A.N., LEATH S. MURPHY J.P. (1998): A major gene for powdery mildew resistance transferred to common wheat from wild einkorn wheat. *Phytopathology*, 88 144–147. p.
- SINGH D., PARK R.F. MCINTOSH R.A. (2001): Inheritance of seedling and adult plant resistance to leaf rust of selected Australian spring and English winter wheat varieties. *Plant Breeding*, 120 503–507. p.

- SIRRKA A.T.I., VARUGHESE W.H., PFEIFFER W.H., MUJEEB-KAZI A. (1993): Crossability of tetraploid and hexaploid wheats with ryes for primary triticale production. *Euphytica*, 65 203–210. p.
- SITCH L.A., SNAPE J.W., FIRMAN S.J. (1985): Intrachromosomal mapping of crossability genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 70 309–314. p.
- SNAPE J.W., PARKER B.B., LECKIE D. (1987): Progress report. Intervarietal transfer of crossability genes. 17–18. p. In: SUTKA J., WORLAND A.J. (Szerk.) Proceedings of EWAC (European Wheat Aneuploid Cooperative) Conference 1987, *EWAC Newsletter*, Agric Res Inst Hung Acad Sci, Martonvásár & Inst Plant Sci Res, Cambridge Laboratory. 109. p.
- SODKIEWICZ W. (2002): Diploid wheat: *Triticum monococcum* as a source of resistance genes to preharvest sprouting of triticale. *Cereal Research Communications*, 30 323–328. p.
- SODKIEWICZ W., STRZEMBICKA A. (2004): Application of *Triticum monococcum* for the improvement of triticale resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*). *Plant Breeding*, 123 39–42. p.
- SODKIEWICZ W., STRZEMBICKA A., SODKIEWICZ T., MAJEWSKA M. (2009): Response to stripe rust (*Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici*) and its coincidence with leaf rust resistance in hexaploid introgressive triticale lines with *Triticum monococcum* genes. *Journal of Applied Genetics*, 50 205–211. p.
- SOOD S. (2009): The major threshability genes soft glume (*sog*) and tenaciousglume (*Tg*), of diploid and polyploid wheat, trace their origin to independent mutations at non-orthologous loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 119 341–351. p.
- SRNIĆ G., MURPHY J.P., LYERLY J.H., LEATH S., MARSHALL D.S. (2005): Inheritance and chromosomal assignment of powdery mildew resistance genes in two winter wheat germplasm lines. *Crop Science*, 45 1578–1586. p.
- STAKMAN E.C., STEWART D.M., LOEGERING W.Q. (1962): Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Washington DC: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service E617. 53 p.
- SUTKA J. (2004): Növényi citogenetika. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 232.p.
- SYBENGA J. (1972): General Cytogenetics. Amsterdam: North-Holland Publishing Co. 359 p.
- SZABÓ T.A., HAMMER K. (1995): Notes on taxonomy of farro: *Triticum monococcum*, *T. dicoccon* and *T. spelta*. 2–40. p. In: PADULOSI S. HAMMER K. HELLER J. (Szerk.) *Hulled wheats*. Rome (Italy): International Plant Genetic Resources Institute. 263 p.

- SZAKÁCS É., MOLNÁR-LÁNG M. (2008): Fluorescent *in situ* hybridization polymorphism on the 1RS chromosome arms of cultivated *Secale cereale* species. *Cereal Research Communications*, 36 247–255. p.
- TAUTZ D., RENZ M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research*, 12 4127–4138. p.
- THE T.T. (1973): Chromosome location of genes conditioning stem rust resistance transferred from diploid to hexaploid wheat. *Nature–New Biology*, 241 256. p.
- THE T.T., BAKER E. P. (1975): Basic studies relating to transference of genetic characters from *Triticum monococcum* L. to hexaploid wheat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 28 189–199. p.
- THOMAS J.B., KALTSIKES P.J., ANDERSON G. (1980): Relation between wheat-rye crossability and seed set of common wheat after pollination with other species in the *Hordeae*. *Euphytica*, 30 121–127. p.
- TISCHNER T., KŐSZEGI B., VEISZ O. (1997): Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agronomica Hungarica*, 45 85–104. p.
- TIXIER M.H., SOURDILLE P., CHARMET G., GAY G., JABY C., CADALEN T., BERNARD S., NICOLAS P., BERNARD S. (1998): Detection of QTLs for crossability in wheat using a doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 1076–1082. p.
- TRANQUILLI G., LIJAVETZKY D., MUZZI G., DUBCOVSKY J. (1999): Genetic and physical characterization of grain texture-related loci in diploid wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 262 846–850. p.
- TSUNEWAKI K. (2009): Plasmon analysis in the *Triticum-Aegilops* complex. *Breeding Science*, 59 455–470. p.
- VÁGÚJFALVI A., GALIBA G., CATTIVELLI L., DUBCOVSKY J. (2003): The cold-regulated transcriptional activator *Chf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Molecular Genetics and Genomics*, 269 60–67. p.
- VALKOUN J., KUCEROVA D. BARTOS P. (1989): Transfer of a new gene for stem rust resistance from *T. monococcum* L. to hexaploid wheat, *T. aestivum* L. *Genetika a Slechteni*, 25 209–214. p.
- VALLEGA V. (1992): Agronomic performance and breeding value of selected strains of diploid wheat, *Triticum monococcum*. *Euphytica*, 61 13–23. p.
- VAN SLAGEREN M.W. (1994): Wild wheats: A monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub and Spach) Eig (*Poaceae*). Wageningen: Agricultural University, Aleppo: International Center for Agricultural Research in Dry Areas. 513 p.

- VARDI A., ZOHARY D. (1967): Introgression in wheat via triploid hybrids. *Heredity*, 22 541–560. p.
- VARSHNEY R.K., NAYAK S.N., MAY G.D., JACKSON S.A. (2009): Next generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*, 27 522–530. p.
- VIDA G., GÁL M., UHRIN A., VEISZ O., SYED N.H., FLAVELL A.J., WANG Z., BEDŐ Z. (2009): Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica*, 170 67–76. p.
- VIDA G., CSÉPLŐ M., GULYÁS G., KARSAI I., KISS T., KOMÁROMI J., LÁSZLÓ E., PUSKÁS K., WANG Z.L., DE PACE C., BEDŐ Z., LÁNG L., VEISZ O. (2011): Effectiveness of major resistance genes and identification of new sources for disease resistance in wheat. *Acta Agronomica Hungarica*, 59 241–248. p.
- VRÁNA J., KUBALÁKOVÁ M., SIMKOVÁ H., ČÍHALÍKOVÁ J., LYSÁK M. A., DOLEŽEL J. (2000): Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, 156 2033–2041. p.
- WENZL P., CARLING J., KUDRNA D., JACCOUD D., HUTTNER E., KLEINHOF S. A., KILIAN A. (2004): Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101 9915–9920. p.
- XU H., YAO G., XIONG LI., YANG L., JIANG Y., FU B., ZHAO W., ZHANG Z., ZHANG C., MA Z. (2008): Identification and mapping of *pm2026*: a recessive powdery mildew resistance gene in an einkorn (*Triticum monococcum* L.) accession. *Theoretical and Applied Genetics*, 117 471–477. p.
- YAN L., LOUKOIANOV A., TRANQUILLI G., HELGUERA M., FAHIMA T., DUBCOVSKY J. (2003): Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100 6263–6268. p.
- YAO G., ZHANG J., YANG L., XU H., JIANG Y., XIONG L., ZHANG C., ZHANG Z., MA Z., SORRELLS M.E. (2007): Genetic mapping of two powdery mildew resistance genes in einkorn (*Triticum monococcum* L.) accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 114 351–358. p.
- ZHENG Y., LUO M., YEN C., YANG J. (1992): Chromosome location of a new crossability gene in common wheat. *Wheat Information Service*, 75 36–40. p.
- ZOHARY D. (1999): Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46 133–142. p.
- ZOHARY D., HOPF M. (1993): Domestication of plants in the Old World. Oxford: Oxford University Press. 328 p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki az MTA ATK Mezőgazdasági Intézetének főigazgatójának, Dr. Bedő Zoltánnak, hogy a rendelkezésemre álltak mindazon szellemi, tárgyi és anyagi feltételek, amelyek lehetővé tették a PhD dolgozatom elkészítését és szakmai fejlődésemet.

Külön köszönöm témavezetőim segítségét: Dr. Láng Lászlónak, aki mellett 2009-ig a Kalászos Gabona Nemesítési Osztályon dolgoztam, hogy segítségével megismerhettem a búzanemesítés tudományát és aki azóta is segítséget nyújt ha munkám során nehézségek lépnek fel. Dr. Molnár Istvánnak, hogy segített elindítani a molekuláris citogenetikai kutatásaimat és már mielőtt hivatalosan is témavezetőm lett volna rengeteg ötlettel és tanáccsal segítette munkámat.

Szeretnék hálás köszönetet mondani Dr. Lángné dr. Molnár Mártának, a Génmegőrzési és Organikus Nemesítési Osztály vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy 2009-től az osztályukon folytathassam tovább a munkámat és a *T. monococcum*-mal bekapcsolódhattam az osztályon folyó génátviteli munkába.

Köszönettel tartozom a 2012-ben elhunyt Dr. Kovács Gézának, aki először ismertetett meg a *T. monococcum*-mal és hogy mellette folyamatosan bekapcsolódhattam a génbanki munkába, amit mindig is magamhoz közel állónak éreztem.

Az Organikus Nemesítési Csoport minden munkatársát köszönet illeti meg, külön köszönöm Mikó Péter kollégámnak a mindennapi munka során nyújtott segítségét. A keresztezési és növénynevelési munkákban a csoport mérnöke Bencze Ágnes, és technikusai, Miklósi Dóra, Timár Gergely és Csóti József segítettek. Hálával tartozom a nyugdíjas éveiket töltő Lévy Józsefnek és Kiss György Gyulánának akik a PhD tanulmányaim kezdetekor a kísérletek precíz kivitelezésével járultak hozzá a munkám sikeréhez.

A Génforrások Hasznosítása Csoport valamennyi munkatársainak köszönöm, hogy megosztották velem ismereteiket és gyakorlati tapasztalataikat az idegen fajú keresztezések és a molekuláris citogenetika tudományában. Közülük is szeretném kiemelni Bucsi Istvánnét, akinek sokéves tapasztalatára és pontos munkájára mindig számíthattam, valamint Farkas Andrást, aki a labormunkákban nyújtott sok segítséget.

Köszönettel tartozom Dr. Vida Gyulának, a biotikus rezisztencia kísérletek beállításához és értékeléséhez adott útmutatásaiért.

Köszönöm szüleimnek, hogy mindig mellettem álltak, szeretetükkel és támogatásukkal segítették mind a pályaválasztásomat, mind a felnőtté válásomat.

Végezetül megkülönböztetett köszönet illeti meg családomat. Férjemnek, Szundy Péternek köszönöm, hogy mindig megmutatja a dolgok reális oldalát, ezáltal nagy segítséget nyújt a mindennapi munkában is és lányaimnak, Annának és Sárának a tőlük kapott sok szeretetet.

Pályázatok, melyek a kísérletek kivitelezéséhez és a szakmai fejlődéshez szükséges anyagi körülmények megteremtéséhez hozzájárultak:

OM00363 — ALKOBEEER

„Organikus egészségvédő alakor sörfélék kifejlesztése és gyártása”

TECH-08-A3/2-2008-0397 — CONFU_08

„Célorientált organikus nemesítés felhasználása új, magas minőségű organikus tejtermékek kifejlesztésére”

EU FP7-KBBE 245058 — SOLIBAM

„Strategies for Organic and Low-input Integrated Breeding and Management”

Továbbá annak kiegészítő pályázata: EU_BONUS_12-1-2012-0032