

*“...A Természet csendes logikája  
Érti azt, mit Te csupán sejtessz  
Úgy, mint egy álmot, az igaz valót.”*

*Henry Baker*

*...Szüleimnek*



## TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés – Kutatási célok	9.
2. Irodalmi áttekintés	11.
2.1. A búza rokonsági köréhez tartozó fajok molekuláris citogenetikai vizsgálata	11.
2.1.1. Búza rokon fajok genetikai felépítése	11.
2.2. Génátvitel fajhibridizációval	14.
2.2.1. Faj- és nemzetséghibridek	14.
2.2.2. Idegen fajú addíciós vonalak előállítása és azonosítása	15.
2.2.3. Genomok közötti transzlokációk előfordulása és azonosítása	18.
2.2.4. Rózs kromoszóma szegmentum beépítése a búza genomba	20.
3. Anyagok és módszerek	23.
3.1. Növényi anyagok	23.
3.2. DNS klónok	24.
3.3. Alkalmazott módszerek	25.
3.3.1. Citológiai preparátum készítés	25.
3.3.2. Feulgen festés	26.
3.3.3. Giemsa C-sávozás	26.
3.3.4. Egymást követő N-sávozás és genomikus <i>in situ</i> hibridizáció	26.
3.3.5. DNS izolálás	27.
3.3.6. Nick transzláció	27.
3.3.7. Genomikus <i>in situ</i> hibridizáció (GISH)	28.
3.3.8. Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (FISH)	29.
4. Eredmények és megvitatásuk	31.
4.1. A búza rokonsági körébe tartozó fajok molekuláris citogenetikai vizsgálata	31.
4.1.1. <i>Aegilops cylindrica</i> Host. genomszerveződésének molekuláris citogenetikai vizsgálata	31.
4.2. Génátvitel fajhibridizációval	44.
4.2.1. Új búza-árpa diszómás addíciós vonalak kimutatása és azonosítása őszi búza genomban	44.
4.2.2. Búza-árpa transzlokációk kimutatása és azonosítása egymást követő N-sávozással és GISH-el	50.
4.2.3. 1BL/1RS búza-rózs transzlokációt tartalmazó martonvásári búzafajták vizsgálata GISH-el	58.
4.3. Új tudományos eredmények	65.
5. Következtetések és javaslatok	67.
6. Összefoglalás	69.

Summary	70.
Irodalomjegyzék	71.
Köszönetnyilvánítás	81.

### **Alkalmazott rövidítések**

ISH – *in situ* hibridizáció

FISH – fluoreszcens *in situ* hibridizáció

GISH – genomikus *in situ* hibridizáció

PCR – polymerase chain reaction – polimeráz láncreakció

RFLP – restriction fragment length polymorphism – restrikciós fragmenshossz polimorfizmus

PI – propidium jodid

DAPI – 4,6 diamidino-2-fenilindol

SSC – trinátrium-citrát és nátrium-klorid oldatok megfelelő arányú keveréke

NT puffer – nick translációs puffer

PK puffer – proteináz-K puffer

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

TRIS – trisz(hidroxi-metil)amino-metán

Tween – polioxietilén-szorbitán-monolaurát

TE – trisz-EDTA

### **Pufferek összetétele**

Sörensen puffer – 1M dinátrium-hidrogénfoszfát és 1M kálium-dihidrogénfoszfát megfelelő arányú keveréke

DNS extrakciós puffer (pH 8,5) – 100mM TRIS, 100mM EDTA, 250mM nátrium-klorid, 0,5%SDS és 100µg/ml proteináz K

NT puffer (pH 7,8) – 0,5M TRIS, 0,05M magnézium-klorid, 0,5mg/ml bovin-szérum-albumin

PK puffer (pH 7,5) – 0,2M TRIS, 0,02 M kalcium-klorid

PK Stop puffer (pH 7,5)– 0,2M TRIS, 0,2M EDTA



## 1. BEVEZETÉS

A világon a termesztett növények nemesítése több ezer éves múltra tekint vissza. A korai földművesek elsősorban fenotípusos bélyegek alapján szelektáltak; mindig a legkívánatosabb példányok magjait vetették el és így állítottak elő egyre kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező növényeket. A múlt századtól azonban jelentős változás figyelhető meg a világ növénynemesítésében. A megnövekedett igények és piaci követelmények következtében egyre szigorodó módszerek terjedtek el, amelyet követett a nemesítéshez kapcsolódó tudományágak, így a növénygenetikai kutatások rohamos fejlődése.

A búzatermesztés hazánk mezőgazdaságában meghatározó jelentőségű, a búza vetésterülete az elmúlt évek átlagában 1,2 millió ha volt. Az utóbbi évtizedekben a termesztett búza (*Triticum aestivum* L.) genetikai variabilitása jelentősen csökkent, a köztermesztésben lévő búza fajták nagy része hasonló genetikai forrásokra vezethető vissza. Ez genetikai szempontból fokozott veszélyeket jelent a kórokozókkal és egyéb stressztényezőkkel szemben, ezért szükségessé vált a búza génállományának bővítése.

A termesztett búza rokonsági köréhez tartozó fajok széles genetikai változatosságot képviselnek a legtöbb hasznos agronómiai tulajdonság tekintetében (betegség-ellenállóság, só-, hő- és szárazságtűrés, télállóság, minőség, stb.). A *Triticeae* törzsben végzett hagyományos faj- és nemzetségkeresztezők révén hasznos agronómiai tulajdonságok génjeit építhetjük át a rokon fajokból a termesztett búza genomjába. A különböző rendszertani besorolású növényfajok és fajták rokonsági viszonyainak, genomszerveződésének részletes feltárása feltétele az idegen fajokból származó gének hatékony és kontrollálható beépítésének a búza genomba.

Az utóbbi évtizedekben számos eredmény született ezen a területen. Sikertült kedvezőbb agronómiai tulajdonságokkal rendelkező növénynemesítési alapanyagokat előállítani, amelyek *Aegilops*, *Secale*, *Hordeum*, *Agropyron*, *Triticum* nemzetségekből származó géneket, kromoszóma szegmentumokat tartalmaznak. A különböző módszerekkel létrehozott transzlokációk, addíciós és szubsztitúciós változatok kiinduló populációkat jelentenek a növénynemesítés számára.

A hagyományos keresztezésekkel és különböző géntechnológiai módszerekkel előállított genetikai alapanyagok egyaránt megkövetelik olyan módszerek alkalmazását, amelyek segítségével a génátvitel kontrollálható. Egyes molekuláris technikák alkalmazásával részletes információ szerezhető néhány bázispárnai hosszúságú DNS fragmentumok fizikai elhelyezkedéséről a vizsgált genomban. Molekuláris citogenetikai technikák felhasználásával lehetőség nyílik arra, hogy a keresett DNS szakaszok közvetlenül a kromoszómákon tanulmányozhatók legyenek. A módszerek fokozatos fejlődésével és a különböző molekuláris citogenetikai technikák kombinációjával gének csoportjai vagy egyedi gének fizikai helyzete is megfigyelhető a vizsgált genom kromoszómáin.

## KUTATÁSI CÉLOK

- a) Az *Aegilops* nemzetséghez tartozó fajok számos kedvező agronómiai tulajdonságot hordoznak, amelyek hagyományos fajkeresztezésekkel a termesztett búza genomjába átépíthetők. A hatékony génátvitel alapvető feltétele a búzával rokon fajok genomikus felépítésének részletes tanulmányozása. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy meghatározták a diploid *Aegilops* fajok kromoszóma kariotípusát, azonban a tetraploid fajok genomszerveződéséről napjainkig kevés információ áll rendelkezésre. **Kutatásaink során célunk volt az *Aegilops cylindrica* Host. tetraploid vadbúza faj (kecskebúza) genomszerkezetének tanulmányozása molekuláris citogenetikai módszerekkel. Vizsgálni kívántuk az *Ae. cylindrica* Host. és a két donor diploid faj genomjai közötti különbségeket és hasonlóságokat a kromoszómák szintjén.**
- b) A búza és az árpa keresztezéséből az őszi búza genomjában létrehozott addíciós vonalak a búza genom kromoszómái mellett egy árpa kromoszóma párt tartalmaznak. **Kísérletünkben célunk volt a búza-árpa diszómás addíciós vonalakban az árpa kromoszómák azonosítása molekuláris citogenetikai módszerek felhasználásával.**
- c) Megfelelő technikák alkalmazásával (virágok hormonkezelése, kontrollált környezeti feltételek, embriókultúra) a búza és az árpa fajok ha nagyon kis gyakorisággal is, de sikeresen keresztezhetők. A szövettenyésztésben regenerált hibridek utódaiban a osztódások során a kromoszómák törhetnek, ami a két genom közötti DNS szakaszok átrendeződéséhez, transzlokációk kialakulásához vezet. **Célunk volt a Martonvásáron korábban előállított búza-árpa transzlokációs vonalakban a búza és az árpa kromoszóma szakaszok azonosítása molekuláris citogenetikai módszerek alkalmazásával.**
- d) A hazánkban köztermesztésben lévő búzafajták nagy százaléka genomjában tartalmazza az 1BL/1RS búza-rozs transzlokációt. A búza genomba beépült rozs kromoszóma kar kedvező agronómiai tulajdonságokért felelős géneket hordoz, de rontja a búza sütőipari minőségét. A növénygenetikusok és nemesítők számára egy lehetőséget jelent, hogy a hasznos génlokuszok megtartásával és a liszt minőségét negatívan befolyásoló tulajdonság kiiktatásával új nemesítési alapanyagokat, illetve a későbbiek során új búza fajtákat állítsanak elő. **Eltérő sütőipari tulajdonságokkal rendelkező martonvásári genotípusokat vizsgáltunk molekuláris citogenetikai módszerrel azzal a céllal, hogy tanulmányozzuk az 1BL/1RS búza-rozs transzlokáció méretét és szerepét az egyes genotípusok liszt minőségének kialakításában. Feltételeztük, hogy a minőségi tulajdonságokat kedvezőtlenül befolyásoló kromoszóma fragmentum a jobb sütőipari minőségű fajtáknál hiányzik, ezért a transzlokációs kromoszóma kar rövidebb.**

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A búza rokonsági köréhez tartozó fajok molekuláris citogenetikai vizsgálata

#### 2.1.1. Búza rokon fajok genetikai felépítése

A *Triticeae* törzsbe tartozó vad fajok hatalmas, a növénynevelés számára még kiaknázatlan géntartalékokkal rendelkeznek és a legtöbb esetben jól keresztezhető a kenyérbúzával (Jiang és mtsai 1994a). A búza a keresztezések során a genomjában bekövetkező kromoszóma szerkezeti megváltozásokat (addíció, deléció, transzlokáció, szubsztitúció stb.) poliploid természeténél fogva jól tolerálja. Ahhoz, hogy az idegen fajokból származó kromoszómákat, hasznos géneket hordozó kromoszóma fragmentumokat minél nagyobb hatékonysággal tudjuk beépíteni a termesztett búza genomjába, szükséges a vad fajok genetikai variabilitásának, genomfelépítésének részletes tanulmányozása és ismerete (Jiang és mtsai 1994b).

A diploid és poliploid *Aegilops* fajok első kariotípusai mintegy 40 éve készültek, hagyományos kromoszóma festési módszerek felhasználásával (Chennaveeraiah 1960). Az egyes kromoszómák hossza és a karok arányának hasonlósága miatt azonban mindössze a szatellittel rendelkező kromoszómák voltak nagy biztonsággal azonosíthatók ezen kariotípusok segítségével. Egy évtizeddel később, a különböző kromoszóma sávozási technikák megjelenése nagy előrelépést jelentett a növényi kromoszómák azonosítása területén. A heterokromatikus festési eljárás (Giemsa C-sávozás) módszerének kidolgozásával és alkalmazásával megbízhatóbb eredményeket kaptak a fajok evolúciójára vonatkozóan (Hadlaczky és Belea 1975).

Az *in situ* hibridizáció (ISH), mint technika megjelenése - a különböző sávozási módszerek mellett - megnyitotta az utat a kromoszómák és genomok részletes molekuláris citogenetikai analízise felé (Jiang és Gill 1994). A DNS próbák nem radioaktív úton történő jelölésével lehetőség nyílt specifikus DNS szakaszok térképezésére közvetlenül a kromoszómákon (Rayburn és Gill 1985).

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) során fluorokrómokat használnak a DNS próbák jelölésére és fluoreszcens mikroszkóppal történik a hibridizációs jelek vizsgálata és kimutatása. Multicolor FISH esetén többféle fluoreszcens festékkel különböző DNS szekvenciák jelölhetők. Ebben az esetben meghatározható az egyes megfestett DNS szakaszok elhelyezkedési sorrendje a kromoszómákon (Mukai és mtsai 1993).

Napjainkban számos DNS próba áll rendelkezésre a *Triticeae* törzsbe tartozó fajok genomjának vizsgálatára. A különböző fajokból származó, repetitív, nem kódoló DNS szekvenciákat hordozó DNS klónok egy része általánosan alkalmazható a búza rokonsági körébe sorolható fajok elemzésére. A fajspecifikus repetitív DNS próbák az egyes fajok kromoszómáin jellegzetes hibridizációs mintázatot adnak, amely alapján a fajokon belüli és a fajok közötti különbségek is azonosíthatók a kromoszómák szintjén (Badaeva és mtsai 1996a,b). A búza és rokonsági köréhez tartozó fajok, így az *Aegilops* fajok vizsgálatára is leggyakrabban alkalmazott DNS klónok a pSc119 (Bedbrook és mtsai 1980) és a pAs1 (Rayburn és Gill 1986a), amelyek a *Secale cereale* L. és az *Ae. tauschii* Coss. genomjából

izolált repetitív, nem kódoló DNS szekvenciákat tartalmaznak.

A búza riboszómális génjeinek eltérő hosszúságú szakaszait tartalmazzák a pTa71 (Gerlach és Bedbrook 1979) és a pTa794 (Gerlach és Dyer 1980) DNS klónok. Az 5.8S-18S-25S, valamint az 5S rDNS lókuszok általában azonos kromoszómákon, de nem kapcsoltnak, vagy másik kromoszómákon helyezkednek el a termesztett búza és rokonsági köréhez tartozó fajok genomjában (Appels és mtsai 1980, Mukai és mtsai 1990). A pTa71 és a pTa794 DNS klónok a napjainkban leggyakrabban alkalmazott DNS próbák a *Triticeae* törzsbe tartozó fajok FISH vizsgálatára (Badaeva és mtsai 1996a, b).

Teljes genomikus DNS jelölésével (genomikus *in situ* hibridizáció, GISH) lehetőség van egész genomok elkülönítésére (Le és mtsai 1989, Schwarzacher és mtsai 1992), így poliploid növény fajokban kimutathatók genomok közötti transzlokációk (Mukai és mtsai 1993, Jiang és Gill 1994d) vagy az idegen eredetű kromoszómák a búza genomjában (Friebe és mtsai 1996). Abban az esetben, ha a kromoszómák strukturális változásai a faj különböző vonalainál egyaránt előfordulnak, fajspecifikus kromoszóma átrendeződésekről beszélünk. *Triticum turgidum* L. és *Triticum aestivum* L. eltérő származási helyű vonalain vizsgálták a meiotikus kromoszómák párosodását, majd kromoszóma sávozást, ISH-t és RFLP (restriction fragment length polymorphism - restrikciós fragmenthossz különbség) analízist végeztek. A 4A kromoszómán pericentrikus inverziót, illetve a 4AL-5AL-7BS kromoszómákat érintő ciklikus transzlokációt figyeltek meg az elemzett vonalak mindegyikénél (Devos és mtsai 1993).

Kromoszóma sávozás és ISH módszerek felhasználásával a tetraploid *Triticum timopheevii* Zhuk. fajnál a 6A<sup>t</sup>-1G-4G kromoszómákat érintő ciklikus transzlokációt azonosították (Jiang és Gill 1994d). Badaeva és mtsai (1995) a *T. araraticum* Jakubz. (a *T. timopheevii* Zhuk. tetraploid, vad donor genomja) kilenc különböző származású vonalát vizsgálták GISH-el. A 6A<sup>t</sup>-1G-4G ciklikus transzlokációt a vonalak mindegyikénél azonosították, valamint nyolc intergenomikus transzlokációt figyeltek meg az A<sup>t</sup> és G genom egyes kromoszómái között.

Jellen és mtsai (1994) az *Avena* nemzetség egyes poliploid fajainak genomszerveződését tanulmányozták GISH-el. Megállapították, hogy az *Avena sativa* L. hexaploid zab A, C és D genomja közül az A és D genom nagy számú homológ DNS szekvenciát tartalmaz, a C genom kromoszómáit pedig sikerrel azonosították. A kutatók intergenomikus transzlokációkról is beszámoltak az A és C genom egyes kromoszómái között. Ugyancsak az A és C genom kromoszómái közötti transzlokációkat figyeltek meg Linares és mtsai (2000), akik az *A. sativa* L. C genom kromoszómáin térképeztek FISH-el négy, *A. strigosa* Schreb. fajból izolált nem kódoló DNS szekvenciát.

Az *Aegilops cylindrica* Host. (2n=4x=28, DDCC) a termesztett búza tetraploid vad rokona, amely őshonos Magyarországon, elterjedt Európa mediterrán vidékein, a Közel-Keleten, Ázsiában és az Egyesült Államok egyes területein (Van Slageren 1994). A faj genomjának felépítését a kromoszómák párosodásának vizsgálatával (Kihara 1931), tartalékfehérje (Masci és mtsai 1992) és izoenzim meghatározással (Jaaska 1981), RFLP módszerével elemezték (Dubcovsky és Dvorak 1994).

A vizsgálatok egybehangzóan kimutatták, hogy a faj két donor genomja az *Ae. caudata* L., (2n=2x=14, CC) és az *Ae. tauschii* Coss., (2n=2x=14, DD) diploid *Aegilops* fajok. Az *Ae. cylindrica* Host. faj citoplazmája *Ae. tauschii* Coss. eredetű (Tsunewaki 1996).

Az *Aegilops* nemzetségbe további 9 diploid, 9 tetraploid és 2 hexaploid fajt sorolnak (Van Slageren 1994). Napjainkig még csak a diploid fajok részletes kariotípusa áll rendelkezésre.

A diploid *Aegilops* fajok a következők: *Ae. speltoides* Tausch., (2n=2x=14, SS), *Ae. sharonensis* Eig., (2n=2x=14, S<sup>sh</sup>S<sup>sh</sup>), *Ae. longissima* Schweinf. & Muschl., (2n=2x=14, S<sup>l</sup>S<sup>l</sup>), *Ae. searsii* Feldman & Kislev ex Hammer., (2n=2x=14, S<sup>s</sup>S<sup>s</sup>), *Ae. bicornis* (Forssk.) Jaub & Spach., (2n=2x=14, S<sup>b</sup>S<sup>b</sup>), *Ae. umbellulata* Zhuk., (2n=2x=14, UU), *Ae. uniaristata* Vis., (2n=2x=14, NN), *Ae. comosa* Sm. in Sibth. & Sm., (2n=2x=14, MM) és *Amblyopyrum muticum* (Boiss.) Eig (a vadbúzák legfrissebb taxonómiai besorolása szerint (Van Slageren 1994). Az *Ae. mutica* Boiss. az *Amblyopyrum* nemzetségbe sorolható (2n=2x=14, TT) (Friebe és mtsai 1992b, 1995c, 1996c, Friebe és Gill 1996, Badaeva és mtsai 1996a, b). Kromoszóma sávzással egész karokat érintő reciprok transzlokációt azonosítottak az *Ae. tauschii* Coss., *Ae. searsii* Feldman & Kislev ex Hammer., *Ae. sharonensis* Eig. és *Ae. uniaristata* Vis. egyes vizsgált vonalainak kromoszómáin. Az *Ae. longissima* Schweinf. & Muschl. eltérő származási helyű genotípusainál a 4S<sup>l</sup> és 7S<sup>l</sup> kromoszómákat érintő fajspecifikus transzlokációt mutattak ki, amely alapján a faj S<sup>l</sup> genomja jól megkülönböztethető a *Sitopsis* csoportba tartozó további négy faj S genomjától (Naranjo 1995).

Az *Aegilops* nemzetségbe tartozó további poliploid fajok a következők: *Ae. geniculata* Roth., (2n=4x=28, MMUU), *Ae. biuncialis* Vis., (2n=4x=28, UUMM), *Ae. columnaris* Zhuk., (2n=4x=28, UUMM), *Ae. triuncialis* L., (2n=4x=28, UUCC), *Ae. peregrina* (Hack. In J.Fraser) Maire & Weller., (2n=4x=28, SSUU), *Ae. kotschyi* Boiss., (2n=4x=28, SSUU), *Ae. ventricosa* Tausch., (2n=4x=28, DDNN), *Ae. crassa* Boiss., (2n=4x=28, DDMM and 2n=6x=42, DDDMM), *Ae. neglecta* req. ex Bertol., (2n=4x=28, UUMM and 2n=6x=42, UUMMNN), valamint *Ae. juvenalis* (Thell.) Eig., (2n=6x=42, DDMMUU) és *Ae. vavilovii* (Zhuk.) Chennav. (2n=6x=42, DDMMSS).

Az *Aegilops* nemzetségbe sorolt fajok értékes géntartalékokat képviselnek a mai modern növénynevelés számára, hiszen számos betegség-, rovar- és egyéb rezisztencia gént hordoznak (Gill és mtsai 1986, Cox és mtsai 1992). Az elmúlt évek során agronómiai szempontból értékes tulajdonságokat, például betegség- és rovarrezisztenciát, só-, hő- és egyéb stressztoleranciát építettek át a búza genomjába, amelyek közül több sikerrel felhasználható a növénynevelésben (Friebe és mtsai 1996).

A poliploid *Aegilops* fajokról részletes kariotípussal jelenleg nem rendelkezünk. A nemzetséghez tartozó genotípusok széles genetikai variabilitásának feltárásához és felhasználásához részletes molekuláris citogenetikai vizsgálatok szükségesek. A Giemsa C-sávzás az *in situ* hibridizáció különböző módszereivel kombinálva értékes és új adatokat szolgáltat a vad búza fajok genetikai hovatartozásáról. Az egyes poliploid fajok különböző származási helyű vonalainak molekuláris citogenetikai elemzése evolúciogenetikai szempontból kívánatos és kiemelt kutatási terület a növénygenetikuskok és növénynevelők számára.

## 2.2. Génátvitel fajhibridizációval

### 2.2.1. Faj- és nemzetséghibridek

A növények életjelenségeivel és tulajdonságaik öröklődésével foglalkozó kutatók a XIX. és a XX. században nagy érdeklődéssel fordultak a távoli fajok és nemzetségek keresztezésének lehetősége felé. Az azonos vagy különböző nemzetségekbe tartozó fajok klasszikus úton történő keresztezésének célja valamilyen hasznos tulajdonságért felelős gén vagy génkomplexum átvitele volt a vad fajokból a kultúr fajokba.

Az első fajkeresztelési kísérletek Koelreuter (1760) nevéhez fűződnek, akinek eredményeit a későbbiek során számos kutató használta példaként. A búza fajkeresztelési kísérletek a XIX. század derekán, illetve második felében indultak el határozott elméleti és gyakorlati célkitűzésekkel.

Hazánkban széles körű faj- és nemzetségkeresztelési programok 1945 után kezdődtek, elsősorban betegségrezisztencia-nemesítési és evolúciógenetikai kutatási céllal (Kiss és Rajháthy 1956). A 70-es években számos faj- és nemzetségkeresztelési programban sikerrel alkalmazták az embriókultúra módszerét (Heszky 1972, Hu és Wang 1986, Dudits és Heszky 2000).

A kutatások kezdetétől fogva a keresztezések legintenzívebben - Földünk talán legfontosabb gabona faja - a búza (*Triticum aestivum* L.,  $2n=6x=42$ ) és rokonsági körében folytak. A *Triticeae* törzsbe tartozó vad fajok általában jól keresztezhetők a termesztett búzával ezért hatalmas géntartalékuk a búzanesemesítésben is felhasználható (Friebe és mtsai 1996).

Sears (1956) úttörő munkájában - ionizáló sugárzás segítségével - az *Aegilops umbellulata* Zhuk. levélrozsa génjét vitte át a búza genomjába. Az elmúlt évtizedekben a búza és a rokonsági köréhez tartozó fajok között számos keresztezést végeztek, különböző faj- és nemzetséghibrideket állítottak elő (Sharma és Gill 1983, Friebe és mtsai 1996).

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.,  $2n=2x=14$ ) a mérsékelt égöv fontos gabona faja, felhasználása a humán táplálkozásban igen jelentős és szerteágazó. A búza és az árpa genomok hibridizálása új lehetőségeket teremthet a növény-nemesítés számára. A keresztezések megkezdésekor a kutatók elsődleges célja hasznos agronómiai tulajdonságok, mint a szárazság- vagy sótűrés, a kedvező fehérjeösszetétel és a koraiság átvitele volt az árpából a búza genomjába. A két genom közötti hibridek és utódaik vizsgálata kiindulópontot jelent a búza és az árpa kromoszómáinak evolúciógenetikai kutatásaiban, illetve a közöttük lévő rokonsági kapcsolat pontos meghatározásában (Islam és Shepherd 1990).

A két faj hibridizálására tett kezdeti sikertelen próbálkozások után Kruse (1973) állított elő elsőként bizonyíthatóan hibridet a búza és az árpa keresztezésével, ahol az árpát használta anyai partnerként. Kísérletét a későbbiekben számos kutató megismételte és sikerrel hozott létre hibrideket különböző árpa és búza genotípusok felhasználásával (Thomas és mtsai 1977, Shimada és mtsai 1987). Molnár-Láng és mtsai (1985) egy martonvásári nemesítésű tavaszi árpa fajta, a Martonvásári 50 (Mv50) bevonásával sikerrel állítottak elő árpa-búza hibridet.

Az előállított hibridek általában alacsony fokú nőfertilítást mutattak, azonban a búzával visszakeresztezett BC<sub>1</sub> utódokon már sikerült szemeket kapni (Islam és mtsai 1975, Fedak

1980). Martonvásáron Molnár-Láng és mtsai (1991) a szövetyészetben regenerált árpa-búza hibridek egyes utódain kiugró nőfertilítást figyeltek meg. A BC<sub>2</sub> utódoknál nagy arányban tapasztalták a piztilloidia jelenségét, azaz a virágokban a portokok helyén is termők fejlődtek (Islam és mtsai 1975). Az árpa citoplazma és a búza sejtmag között fellépő inkompatibilitás miatt a hibridek sorozatos visszakeresztezésével sem sikerült fertilis utódokat létrehozni, ezért a kutatók érdeklődéssel fordultak a két faj közötti reciprok keresztezés lehetősége felé, amelyben már a búzát használták anyai partnerként.

Az első sikeres keresztezéseket a 70-es évek második felében végezték és kis gyakorisággal állítottak elő hibrideket, illetve a hibridek búzával történő visszakeresztezésével BC<sub>1</sub> növényeket (Islam és mtsai 1981, Fedak 1980). A kísérletekben szereplő búza fajták közül a legjobb termékenyülést a Chinese Spring tavaszi búza fajta adta, míg az árpa fajták közül a Betzes tavaszi árpa fajta kereszteződött a legjobban.

Martonvásáron Molnár-Láng és Sutka (1994) sikerrel hoztak létre búza-árpa hibridet tavaszi búza és árpa fajták keresztezésével. A kutatók a hőmérsékletnek a szemkötésre és az embrió fejlődésére gyakorolt hatását vizsgálták a hibridek előállításánál.

Koba és mtsai (1991) kísérletükben a *kr* keresztezhetőségi gént hordozó japán búzafajtát használták anyai partnerként és nagyobb gyakorisággal állítottak elő F<sub>1</sub> búza-árpa hibrideket.

A későbbiek során Molnár-Láng és mtsai (1996) sikerrel építették át a recesszív *kr*<sub>1</sub> keresztezhetőségi allélt a Chinese Spring tavaszi búza fajtából a Martonvásári 9 őszi búza fajtába. Ezzel lehetőség nyílt arra, hogy nagyobb hatékonysággal állítsanak elő új őszi búza-őszi árpa hibridkombinációkat (Molnár-Láng és mtsai 2000).

### 2.2.2. Idegen fajú addíciós vonalak előállítása és azonosítása

A diszómás addíciós vonalak egy pár idegen fajból származó kromoszómát tartalmaznak általában poliploid kultúrfaj genomjában. A kenyérbúza allohexaploid természetű a genomjában előforduló kromoszóma szerkezeti megváltozásokat jól tűri. Így a búza rokonsági köréhez tartozó fajok egy-egy kromoszóma párjának beépítése a búza genomba sikerrel valósítható meg. A diszómás addíciós vonalak előállításával az agronómiailag hasznos gének, gén csoportok közvetlenül építhetők be a természetű búza genomjába. További előnyük még, hogy felhasználásukkal az idegen fajok kromoszómái részletesen tanulmányozhatók a búza genomjában.

Elsőként O'Mara (1940) számolt be szisztematikus módszerrel előállított rozs diszómás addíciós vonalakról természetű búzában. Ezt követően számos, a *Triticeae* törzsbe tartozó faj kromoszómáit építették be a búza genomjába mono-, di-, illetve teloszómás formában (Sears 1956, Dhaliwal és mtsai 1990, Friebe és mtsai 1996, 1999, Yang és mtsai 1996). Ezek az addíciós vonalak fontos szerepet játszanak az idegen fajból származó kromoszómák agronómiailag hasznos géneinek jellemzésében. Különböző vizsgálatokkal megállapítható a beépült idegen kromoszóma és a megfelelő homeológ búza kromoszóma közötti hasonlóság (Islam és Shepherd 1991).

Időszerűvé vált a búzában előállított addíciós vonalakat összefoglaló, rendszerező munka megjelentetése, hiszen ilyen jellegű irodalom utoljára több, mint tíz évvel ezelőtt látott napvilágot (Shepherd és Islam 1988).

Az addíciós vonalak előállításának egyik módja az  $F_1$  hibrid haploid kromoszóma szerelvényének megkettőzése, majd sorozatos visszakeresztése a recipiens fajjal. Ezzel olyan populáció hozható létre, amely a donor faj összes kromoszómáját hordozza a populáció különböző növényeiben, egy kópiában. A monoszómás sorozatok öntermékenyítése után morfológiai és citogenetikai vizsgálatokkal kiválogathatók a diszómás addíciós vonalak.

A búza addíciós vonalainak előállítása során viszonylag könnyen hozhatók létre 43 kromoszóma számú monoszómás sorozatok, de a diszómás sorozatok kiválogatása gyakran problémát jelenthet (Islam és Shepherd 1990).

Monoszómás addíciós vonalakban az idegen extra kromoszóma nő gamétán keresztüli transzmissziójának gyakorisága várhatóan 25% lehet. Ezzel szemben Sears (1956) mindössze 1-3%-ban kapott diszómás sorozatokat a monoszómás *Aegilops umbellulata* Zhuk. sorozatok öntermékenyítését követően búzánál. Az *Agropyron elongatum* (Host) Beauv. monoszómás addícióját hordozó tetraploid búza öntermékenyítésével nem sikerült diszómás addíciót tartalmazó növényt előállítani (Mochizuki 1963). Ezzel szemben Endo (1988) közel 100%-os pollenen keresztül idegen kromoszóma transzmisszióról számolt be különböző *Aegilops* fajok esetében és így sikerrel hozott létre diszómás addíciós vonalakat.

A 70-es években dolgozták ki a *bulbosum* technikát, amely segítségével előállíthatók diszómás addíciók a termesztett búza genomjában. A 21 búza kromoszóma mellett 1 idegen kromoszómát hordozó petesejt *Hordeum bulbosum* pollennel megtermékenyítve - a *bulbosum* kromoszómák eliminációja után - 22 kromoszómás aneuploidot, majd kromoszóma számának megkettőzésével diszómás addíciót eredményezhet (Dudits és Heszky 1990).

A módszert elsőként Barclay alkalmazta (1975), aki kísérletében Chinese Spring búza fajtát keresztetett diploid és tetraploid *H. bulbosum* -mal és a *bulbosum* kromoszómák eliminációjával búza haploidokat állított elő. Kukoricával végzett keresztelésnél hasonló jelenséget figyeltek meg Zenkteler és Nitzsche (1984), majd a későbbiek során a Seneca kukorica fajtával történő haploid előállítás módszerét Laurie és Bennett (1988) tökéletesítették.

Elsőként Islam és mtsai (1981) állítottak elő sikeresen búza-árpa addíciós sorozatokat. A korábban létrehozott 28 kromoszómát tartalmazó  $F_1$  Chinese Spring - Betzes búza - árpa hibrid búzával visszakeresztett utódai közül 43 kromoszómás monoszómás addíciókat válogattak ki, majd a növényeket öntermékenyítették. Az extra árpa kromoszóma pollenen keresztül alacsony transzmissziós rátája következtében a kutatók a monoszómás és a monotelodiszómás addíciók egy részét *H. bulbosum*-mal keresztelték vissza, majd az előállított haploidok kolhicinkezelése után válogatták ki a diszómás addíciós vonalakat.

A lehetséges 7 árpa kromoszóma közül 6-nál sikerrel hoztak létre diszómás búza-árpa addíciós vonalat. Napjainkig a 14 előállítható diteloszómás vonal közül 12 áll rendelkezésre a Chinese Spring tavaszi búza fajta és a Betzes tavaszi árpa fajta kereszteléséből. Hiányoznak viszont az 5-ös árpa kromoszómát hordozó addíciós vonalak. A kromoszóma jelenléte a búza genomban abnormalis meiotikus osztódást és a növények sterilitását okozta. Önsteril, kettős monoszómás vonalban sikerült fenntartani azt a vonalat, amely az 5-ös árpa kromoszóma mellett a 6-os árpa kromoszómát is tartalmazta a búza kromoszómák mellett (Islam és Shepherd 1990).

A diszómás addíciós vonalak első megjelenése óta tizennyolc év után Islam és Shepherd

(2000) sikerrel állította elő az 1H árpa kromoszómát hordozó fertilis diszómás búza-árpa addíciós vonalat. Napjainkig nem hoztak létre addíciós sorozatot más búza és árpa fajták kombinációiból. Martonvásáron Molnár-Láng és mtsai (2000) sikerrel hoztak létre olyan új őszi búza-őszi árpa hibridkombinációkból búzával visszakeresztezett növénypopulációkat, amelyek a jövőben alapját képezhetik új búza-árpa addíciós sorozatok előállításának.

Szükséges megemlíteni az árpa kromoszómák nomenklatúrájának megváltozását, amely a búza kromoszómákkal rokon homeológia alapján nevezte el újra az egyes árpa kromoszómákat (Linde-Larsen és mtsai 1997). Így az elsőként előállított diszómás búza-árpa addíciós sorozatból hiányzó 5-ös árpa kromoszóma az új nomenklatúra alapján az 1H árpa kromoszómát jelenti.

A későbbiek során McGuire és Qualset (1990) számoltak be új, 3H árpa kromoszómát tartalmazó diszómás addíciós vonal előállításáról, amely a BYDV (árpa sárga törpeség mozaik vírus) *Yd2* rezisztencia génjét hordozza. A 6H és a 7H árpa kromoszómákat hordozó diszómás addíciós vonalakat állítottak elő Koba és mtsai (1997), akik a vonalak kiválogatása során egyes búza és árpa kromoszómák közötti transzlokációkat is megfigyeltek.

A különböző addíciós vonalak azonosítását morfológiai bélyegek (pl. kalászforma), izoenzim vizsgálatok és kromoszóma N- és C- sávózással végezték.

Az allohexaploid búza kromoszómák első Giemsa C-sávós kariotípusát követően (Gill és Kimber 1974) egy évvel később jelent meg a diploid árpa kromoszómákat bemutató kariotípus Giemsa C-sávózással (Linde-Laursen 1975). Az eredményeket a továbbiakban más szerzők is megerősítették és sikerrel azonosították az egyes árpa kromoszómákat C-sávózással (Noda és Kasha 1976).

A búza és az árpa kromoszómák Giemsa C-sávós mintázatának tanulmányozása során később megállapították, hogy egyes centromérikus és centromérához közeli sávok hasonlóan helyezkednek el a két faj kromoszómaiban, amely megnehezítheti az árpa kromoszómák megkülönböztetését a búza kromoszómáitól (Islam 1980).

Az N-sávózás módszerét Gerlach (1977) alkalmazta elsőként a termesztett búza kromoszómaiban azonosítására. A technika egyszerűbbnek és gyorsabbnak bizonyult a C-sávózáshoz viszonyítva és kezdetben a búza 21 pár kromoszómája közül 9 meghatározását tette lehetővé. A módszer továbbfejlesztésével később lehetőség nyílt a 21 búza kromoszóma pár közül 16 azonosítására N-sávózással (Endo és Gill 1984).

A Giemsa C- és N-sávózás összehasonlítása során megállapították, hogy C-sávózással a kromoszómák teljes konstitutív heterokromatin állománya festődik. N-sávózással nem mutattak ki extra sávokat a C-sávós kromoszóma mintázathoz képest (Gill és mtsai 1991).

A korábban búza kromoszómák azonosítására sikerrel alkalmazott N-sávózást használta Islam (1980) azzal a céllal, hogy megvizsgálja a módszer alkalmasságát az egyes árpa kromoszómák elkülönítésére a búza kromoszómáitól. A festés után az árpa genom összes kromoszóma párja specifikus mintázatot mutatott, így az egyes kromoszómák határozottan megkülönböztethetőek voltak a búza kromoszómáitól.

*Hordeum vulgare* L. és egyes rokon fajainak Giemsa N- és C-sávós kromoszóma festését hasonlította össze Linde-Larsen (1985) összefoglaló munkájában.

Az árpa kromoszómák heterokromatikus megoszlását tanulmányozták Kakeda és mtsai (1991). Megállapították, hogy az egyes kromoszómák N- és C-sávós mintázata általánosságban nagyon hasonló. A két festési módszer közötti különbség a kromoszómák centromérája körül jelentkezett. Minden kromoszómán megfigyeltek N-sávokat a centroméra körül, amelyek C-sávózás után nem jelentkeztek.

A napjainkban rendelkezésünkre álló búza-árpa diszómás addíciós sorozat a Betzes tavaszi árpa fajta kromoszómáit hordozza Chinese Spring tavaszi búza fajta háttérben. Kívánatos lenne olyan árpa fajták kromoszómáit hordozó addíciós vonalak előállítása az őszi búza genomjában, amelyek igazolhatóan hasznos rezisztencia géneket hordoznak és felhasználásukkal növelhető a búza genom különböző betegségekkel szembeni ellenállósága.

### 2.2.3. Genomok közötti transzlokációk előfordulása és azonosítása

Két genom DNS szekvenciáinak kicserélődéséhez szükséges a homeológ kromoszómák párosodása. Napjainkig kevés számú rekombinációt figyeltek meg a búza és az árpa genomok kromoszómái között (Islam és Shepherd 1988, Schubert és mtsai 1998). Islam és Shepherd (1992) a korábban létrehozott *ph1* mutáns vonalat használták búza és árpa kromoszómák közötti párosodás indukálásához, illetve rekombinánsok előállításához. Összesen tizenkét rekombináns növényt izoláltak, amelyek a 6HL árpa telocentrikus és a 6A búza univalens, valamint a 3HL árpa telocentrikus és a 3A búza univalens kromoszómákat tartalmazták. A rekombinánsok felhasználhatók molekuláris marker alapú genetikai térképek készítéséhez.

A *Triticeae* törzsbe tartozó fajok által hordozott legtöbb kívánatos gén homeológ kromoszóma párosodással nem minden esetben vihető át a búza genomjába. Agronómiai szempontból hasznos gének, illetve géncsoportok átépítésének egyik klasszikus módja transzlokációk indukálása a vizsgált genomok kromoszómái között, amelyek előidézhettek ionizáló sugárzással, szövettenyésztéssel vagy egyéb módszerekkel (Feldman 1988).

A táptalajon regenerált hibrid növények utódainál - az *in vitro* körülmények által kiváltott, a szülői kromoszómák DNS molekula szintű változásai következtében - kromoszóma aberrációk, transzlokációk keletkezése várható (Larkin és Scowcroft 1981).

Armstrong és mtsai (1983) szövettenyésztésben regenerált Triticale növények citológiai vizsgálata során különböző kromoszóma szerkezeti megváltozásokat és transzlokációkat figyeltek meg. Búza-rozs hibridek táptalajon történt regenerációja után az utódok kromoszómái számos intergenomikus transzlokációt hordoztak (Lapitan és mtsai 1984).

A szövettenyésztés során előforduló kromoszóma átrendeződések molekuláris háttere még nem teljesen tisztázott. Mesterséges körülmények indukálhatják kromoszómák törését és újraegyesülését, aktiválhatnak olyan géneket, amelyek a genomok DNS tartalmának újrendeződéséért felelősek, illetve befolyásolhatják a premeiotikus és meiotikus sejtosztódást (Feldman 1988).

Teljes kromoszóma karokat érintő transzlokációk a meiosis I. metafázisában kialakuló centrikus kromoszóma hidak törése következtében keletkezhetnek (Sears 1952a). A sejtek osztódása során az univalens kromoszómák centroméránál törnek, majd tört végüknél újra összekapcsolódnak. Amennyiben egy idegen fajtából származó és egy homeológ búza univalens kromoszóma találkozik a sejtosztódás során, kompenzáló transzlokáció alakul ki (Lukaszewski 1993). A kompenzáló transzlokációk genetikailag általában stabilak, így nagyobb agronómiai potenciállal rendelkeznek a nem kompenzáló transzlokációkkal összehasonlítva (Friebe és mtsai 1996).

Koba és mtsai (1997) spontán létrejött, nem kompenzáló típusú transzlokációkat írtak le a

7HS árpa és az 5BL búza kromoszóma karok között. Három további, új búza-árpa hibridkombinációból származó kromoszóma kicserélődést is megfigyeltek a két genom között, amelyeket nem sikerült azonosítaniuk. Martonvásáron Molnár-Láng és mtsai (2000) búza-árpa hibridek szövettényezetben regenerált utódainál figyeltek meg különböző típusú transzlokációkat a búza és az árpa genomok kromoszómái között.

Az *Aegilops* nemzetség egyes fajai speciális, ún. gametocid kromoszómákat hordoznak, amelyek szubletális kromoszóma töréseket vagy mutációt okozhatnak az osztódás során (Endo 1990). Az *Aegilops cylindrica* Host. 2C gametocid kromoszómáját használták búza-árpa transzlokáció indukálására a korábban előállított búza-árpa addíciós vonalakon (Endo és mtsai 1998).

A búza és az idegen faj kromoszómái között létrejött kromoszóma átrendeződések többféle módszerrel tanulmányozhatók. A legelterjedtebb technikák a meiotikus kromoszóma párosodás vizsgálata, monoszómás analízis, morfológiai és biokémiai tulajdonságok elemzése (Friebe és mtsai 1996).

Az utóbbi évtizedekben a kutatók elsősorban különböző molekuláris citogenetikai technikákat használnak az idegen fajból származó transzlokációk kimutatására a búza genomjában. A kromoszóma N-sávozás mellett C-sávozással a búza 21 pár kromoszómáján kívül rokon fajokból származó homeológ kromoszóma csoportok is biztonsággal és viszonylag rövid idő alatt azonosíthatók (Gill és mtsai 1991).

Genomikus *in situ* hibridizációval pontosan kimutatható a vizsgált genomok közötti transzlokáció töréspontja, meghatározható a búza genomjába beépült idegen fajból származó DNS szakasz mérete (Le és mtsai 1989). A módszer lényege, hogy a kimutatni kívánt fajból izolált teljes genomikus DNS-t fluoreszcens festékkel jelölik, amelyet próbaként alkalmaznak. Az idegen faj és a búza genomok közötti homológ DNS szekvenciák blokkolására búza növényből izolált teljes DNS-t használnak. A módszerrel számos transzlokációt mutattak ki különböző genomok kromoszómái között (Mukai és Gill 1991, Schwarzacher és mtsai 1992, Jellen és mtsai 1994, Badaeva és mtsai 1995, Linares és mtsai 2000, Molnár-Láng és mtsai 2000).

Fluoreszcens *in situ* hibridizációval specifikus DNS szakaszok térképezhetők a kromoszómákon, amely alapján a transzlokációkban résztvevő kromoszómák azonosíthatók. Különböző aberrációt hordozó árpa kromoszómákat elsőként Belostotsky és Ananiev (1990) határoztak meg, akik a HvT01 DNS klón elhelyezkedését tanulmányozták az árpa kromoszómákon fluoreszcens *in situ* hibridizáció módszerével. Schubert és mtsai (1998) terminális árpa deléciókat és transzlokációkat azonosítottak a próba felhasználásával a búza genomjában. Megfigyelték, hogy a 2H és 5H árpa kromoszómák hosszú karja kivételével a legtöbb árpa kromoszóma határozott szubterminális festődést mutatott. Így megállapították, hogy az egyes árpa kromoszómák terminális végein történő változások a HvT01 DNS próba segítségével kimutathatók. Kromoszóma sávozási- és *in situ* hibridizációs technikák kombinációival biztonsággal azonosíthatók az egyes transzlokációkban szereplő búza és az idegen faj kromoszóma szakaszai.

Jiang és Gill (1993) dolgozták ki elsőként két molekuláris citogenetikai módszer, az N-sávozás és GISH egymás utáni alkalmazását ugyanazon a preparátumon (sequential N-banding-GISH). Módosított C-sávozás (Gill és mtsai 1991) és GISH technikákat alkalmaztak Endo és mtsai (1998) árpa és rozs kromoszóma szerkezeti változásainak elemzésére a búza genomjában.

Egymást követő N-sávozást és GISH-t használtunk kísérletünkben a korábban

Martonvásáron előállított és szövettenyészetben regenerált új búza-árpa hibridek utódai között előforduló transzlokációk kimutatására azzal a céllal, hogy meghatározzuk az egyes transzlokációkban szereplő búza és árpa kromoszómákat.

#### **2.2.4. Rozs kromoszóma szegmentum beépítése a búzába**

A búza (*Triticum aestivum* L.) és a rozs (*Secale cereale* L.) genom kromoszómái között létrejött intergenomikus átrendeződések lehetővé teszik a növénynemesítés számára hasznos gének átvitelét a rozsból a búza genomjába.

A világ és hazánk búzanemesítésében széles körben elterjedt az 1BL/1RS búza-rozs transzlokáció. Rabinovich (1998) összefoglaló munkájában a világ 35 különböző országából származó fajta közül 330 genotípusnál tesz említést a transzlokáció jelenlétéről.

A két genom közötti Robertsoni transzlokációban a búza 1BS kromoszómájának rövid karját a rozsból származó 1RS kromoszóma rövid karja helyettesíti. Az ivarsejtek osztódása során az 1B és 1R univalens kromoszómák centroméránál törtek (miszdivízió), amelyet a kromoszóma karok kicserélődése és fúziója követett (Islam és Shepherd 1991). A spontán kromoszóma kicserélődésről a 30-as években számoltak be először (Katterman 1937, O'Mara 1947, Friebe és mtsai 1996). A transzlokáció a németországi búza-rozs keresztezési programból származott, amely később a világ nemesítési programjaiba keresztezési partnerként került be. Korábban két német rozs fajtára, a Salzmünde-re és Weihenstephan-re vezették vissza a transzlokációban szereplő rozs kar eredetét (Zeller és Fuchs 1983). Újabb, RFLP módszerrel végzett összehasonlító pedigré vizsgálatok alapján azonban megállapították, hogy a rozs kromoszóma kar egyetlen német rozs fajtából, a Petkusból származik (Schlegel és Korzun 1997).

Az 1BL/1RS transzlokáció a magyarországi búzanemesítésbe elsősorban az akkori Szovjetunióban a 60-as években nemesített Auróra, Kavkáz és Bezostaya 2 fajtákkal került be. A Martonvásáron nemesített fajták pedigréjében a fent említett búza fajták közül a 70-es években leggyakrabban a Kavkáz fajta szerepelt keresztezési partnerként (Láng és Bedő 1994). A keresztezési programokból kikerülő, államilag minősített fajták egyes betegségekkel szembeni rezisztenciáját jelentősen megnövelte a beépült rozs kar, mivel hasznos rezisztencia géneket magába foglaló génklomplexumot hordozott. Az 1RS rozs kromoszóma rövid karján találjuk az *Sr31* szárrozsda (*Puccinia graminis* Pers.), az *Lr26* levélrozsdá (*P. recondita* Robillard Ex Desm.), az *Yr9* sárgarozsda (*P. striiformis* West.), a *Pm8* lisztharmat (*Erisiphe graminis* De Candolle Ex Merat) és a *Gb* levéltetű (*Schizapis graminum*) rezisztencia géneket (Bartos és Bares 1971, Sebesta és Wood 1978, Zeller és Fuchs 1983, Heun és Fischbek 1987).

Az 1BL/1RS búza-rozs transzlokációt hordozó fajták nagy része különböző környezeti hatások következtében generációról generációra fokozatosan elveszítette sárga- és levélrozsdával szembeni ellenállóságát. A martonvásári nemesítésű búza fajták agronómiai tulajdonságainak tesztelése során Bedő és mtsai (1993) megállapították, hogy az *Sr31* szárrozsda gén még aktívan fejti ki hatását és megvédi a fajtákat a betegséggel szemben.

A transzlokációt hordozó búza genotípusokról általánosságban elmondható, hogy megnövekedett produktivitással (Rajaram és mtsai 1983), de az átlagosnál kedvezőtlenebb sütőipari minőségi tulajdonságokkal rendelkeznek (Zeller és mtsai 1982, Dhaliwal és mtsai 1988).

A rozs  $\alpha$ - és  $\omega$ -secalin endospermium fehérjéinek kódoló szekvenciái az 1RS karon,

fizikailag jól elkülöníthetően helyezkednek el (Busch és mtsai 1995). Dhaliwal és MacRitchie (1990) vizsgálatai alapján arra a következtetésre jutott, hogy a liszt sütőipari minőségére elsősorban a  $\omega$ -secalin van negatív hatással. A nemesítési alapanyagokban jelenlévő IRS rozs kar hosszának módosításával olyan búza vonalak is előállíthatók, amelyek az  $\omega$ -secalint kódoló kromoszóma szakaszt nem tartalmazzák (Millet és Feldman 1993). A kedvezőtlen sütőipari minőség másik két összetevője az IBS búza kromoszóma rövid karján elhelyezkedő  $\omega$ - és  $\gamma$  gliadinokat kódoló, valamint a kismolekula-súlyú glutenin gén alegységek hiánya (Lookhart és mtsai 1991). Egyes durum búza fajták (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) agronómiai tulajdonságainak vizsgálata során is hasonló megállapításra jutottak a kutatók (Boggini és mtsai 1998).

Bedő és mtsai (1993) egyes martonvásári nemesítésű búza fajták sütőipari minőségének tesztelése során megállapították, hogy az IBL/IRS búza-rozs transzlokáció jelenléte mellett a fajták nagy része jó minőségi tulajdonságokkal rendelkezik. A világ eltérő tájain termesztett búza genotípusok esetében megfigyelték, hogy a transzlokációt hordozó fajták genetikai háttere nagy mértékben befolyásolja a liszt minőségi tulajdonságait (Graybosch és mtsai 1990, Javornik és mtsai 1991, Martin és Carillo 1999). A vizsgált minőségi paraméterek közül a genotípusok SDS (sodium dodecyl sulfáta)-értéke kimutathatóan kedvezőtlenül hat a liszt sütőipari minőségére, függetlenül a búza-rozs transzlokációt hordozó fajta genetikai összetételétől (Bullrich és mtsai 1998).

A genetikai háttér mellett fontos az IBL/IRS búza-rozs transzlokáció stabilitásának, a beépült IRS rozs kromoszóma kar esetleges genetikai átrendeződésének, illetve rövidülésének nyomonkövetése, amelyről napjainkig az irodalomban kevés adat áll rendelkezésünkre (Friebe és mtsai 1989, Rajaram és mtsai 1983). A rozs genom kromoszómáinak RFLP analízise során megfigyelték, hogy az 1R rozs kromoszóma kivételével mindegyik rozs kromoszóma DNS tartalma átrendeződött a megfelelő búza homeológ kromoszóma csoportokhoz viszonyítva (Devos és mtsai 1993).

Az elmúlt évek során szükségessé vált olyan biokémiai, molekuláris genetikai és citológiai módszerek alkalmazása, amelyek segítségével a transzlokáció nagy biztonsággal azonosítható és nyomon követhető a nemesítési alapanyagokban.

Az IBL/IRS transzlokáció vizsgálatára számos módszer ismert és alkalmazott (Berzonsky és Francki 1999).

Howes és mtsai (1989) monoklonális antitestek hibridizációjával (Western blot) vizsgálták a búza és a rozs genom DNS tartalma közötti átrendeződés jelenlétét. A módszer egy, a búza IBS karján lokalizált gén működésének hiányát mutatta ki. SDS-PAGE analízissel teljes endospermium fehérje extraktum felhasználásával azonosították a búza-rozs transzlokációt (Gupta és Shepherd 1990). A fehérje vizsgálati módszerek mellett alkalmazták a HPLC (High Performance Liquid Chromatography - magas nyomású folyadék kromatográfia) (Lookhart és mtsai 1991), PCR (Froidmont és De-Froidmont 1998), RFLP (Schlegel és Korzun 1997) technikákat, valamint magas nyomású kapilláris elektroforézist (Lookhart és mtsai 1996).

Az alapvető kromoszóma sávozási technikák közül a Giemsa N- (Kump és mtsai 1995) és C- sávozás (Friebe és mtsai 1989) a legismertebb és széles körben alkalmazott rozs kromoszóma szakaszok kimutatására a búza genomjában. A rozs kromoszómák erősen heterokromatikus telomérás festődést mutatnak és így jól megkülönböztethetők a búza kromoszómáitól.

Az *in situ* hibridizáció a napjainkban ismert leghatékonyabb molekuláris citogenetikai módszer idegen eredetű DNS kimutatására a búza genomban. Alkalmazásával egész rozs

kromoszóma kar, illetve intersticiális transzlokációk is kimutathatók a termesztett búza kromoszómáin.

A molekuláris citogenetikai technikák segítségével pontosabban nyomon követhető a búza genomjába beépült, idegen fajból származó rövid DNS szakasz, mint biokémiai vagy kromoszóma sávozási módszerek felhasználásával.

Genomikus *in situ* hibridizáció segítségével a rozs kromatin elhelyezkedése meghatározható az egyes búza kromoszómákon (Heslop-Harrison és mtsai 1990, Shi és mtsai 1999). A technika alkalmas a transzlokációs töréspont és az idegen fajból származó kromatin mennyiségének pontos meghatározására is (Jiang és Gill 1994).

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Növényi anyagok

*Aegilops cylindrica* Host ( $2n=4x=28$ ,  $D^C D^C C^C C^C$ ) tetraploid vadbúza (kecskebúza) faj genomszerveződését vizsgáltuk molekuláris citogenetikai módszerekkel, amelyhez a faj öt eltérő földrajzi eredetű vonalát használtuk fel:

TA2201 (=AE663) (var. panciariatat Eig) Franciaország  
TA2202 (=AE889) (var. aristulata (Zhuk.) Tzvel) Románia  
TA2203 (=AE746) Irán  
TA 2204 (=AE719) Örményország  
TA 2205 (=BGRC1461) ismeretlen eredet

A korábban Martonvásáron előállított Chinese Spring-Betzes búza-árpa hibrid Molnár-Láng és mtsai (1991) szerint szövettényészetben elszaporított, az Asakaze komugi japán őszi búza fajtával kétszer visszakeresztezett, majd több generáción keresztül öntermékenyített utódai közül kiválogatott 44 kromoszómaszámú növényeket használtuk Giemsa C-sávozáshoz, hogy meghatározzuk az addicionált árpa kromoszómákat. A kromoszómák párosodása alapján ezek már feltehetően diszómás addíciók voltak.

A Chinese Spring-Betzes búza-árpa hibrid szövettényészetben elszaporított, az Mv9kr<sub>1</sub> búzatörzssel kétszer visszakeresztezett, majd Seneca kukoricával megporzott, kolhicinnel kezelt és két generáción keresztül öntermékenyített utódai közül kiválogattuk a 44 kromoszóma számú növényeket. Az addicionált árpa kromoszóma párt Giemsa C-sávozással azonosítottuk a búza genomjában.

A korábban Martonvásáron előállított Chinese Spring-Betzes búza-árpa hibrid szövettényészetben regenerált, majd az Mv9kr<sub>1</sub> őszi búza vonallal visszakeresztezett utódai közül kiválogatott búza-árpa transzlokációkat hordozó növényeket elszaporítottuk (Molnár-Láng és mtsai 2000). Ezek osztódó gyökércsúcsaiból mitotikus kromoszóma preparátumokat készítettünk a transzlokációk azonosítására egymást követő N-sávozással és genomikus *in situ* hibridizációval.

Tizenöt eltérő sütőipari minőségű martonvásári nemesítésű búzafajtát vizsgáltunk genomikus *in situ* hibridizációval. A felhasznált genotípusok a következők voltak: Martonvásári (Mv)16, Mv17, Mv19, Mv21, Mv23, Mv25, Optima, Fatima, Magdaléna, Emma, Pálma, Irma, Vilma, Madrigál, Mv14-85. Az egyes fajták sütőipari minőségi adatait az 1. táblázat mutatja (Bedő és mtsai 1993).

1.táblázat. A kísérletben felhasznált martonvásári búza fajták egyes sütőipari adatai.

Fajták	SDS (cm <sup>3</sup> )	Fehérje %	Sikér %	Farinográf	Kenyér (cm <sup>3</sup> )
Mv16	58	13,7	32,2	83,2	370
Mv17	56	12,1	21,7	66,2	280
Mv19	60	13,7	31	91,2	340
Mv21	66	11,2	27,5	69,95	320
Mv23	73	14,4	29,4	88	350
Mv25	58,5	11,1	24,4	66,3	270
Optima	66	11,5	27,9	63,1	390
Fatima	58	13,3	29,6	100	330
Magdaléna	68	14,7	36,5	85,3	410
Emma	73	14,3	36,1	80,8	450
Pálma	62	12,9	30,1	80	340
Irma	64	12,3	24,3	53,4	330
Vilma	56	12,5	29	74,6	330
Madrigál	64	14,5	28,2	100	300
Mv14-85	43	13,3	30,8	28,5	300

### 3.2. DNS klónok

A **pTa71** DNS klón 9.05 kb hosszúságú, a búza riboszómális génjeinek egy-egy szakaszát hordozza (18S, 5.8S és 25S rDNS) a pUC19 vektorba klónozva (Gerlach és Bedbrook 1979).

A **pTa794** DNS klón 410 bp hosszúságú, a búza riboszómális gének egy szakaszát tartalmazza (5S rDNS), amelyet a pBR322 plazmidba építettek be (Gerlach és Dyer 1980).

A **pAs1** DNS klón *Ae. tauschii* Coss.-ből izolált és pUC8 plazmidba inzertált 1kb hosszúságú repetitív, nem kódoló DNS szekvenciát hordozó fragmentum (Rayburn és Gill 1986a).

A **pSc119** DNS próba 120 bp hosszúságú, rozból izolált repetitív szekvenciákat hordozó DNS szakasz, amelyet a pBR322 plazmidba építettek be (Bedbrook és mtsai 1980).

A DNS próbákat fluorogreennel és fluororeddel (Amersham) jelöltük Nick translációval a következő kombinációkban:

**2. táblázat.** DNS próbák jelölése fluorokrómokkal.

<b>Próba</b>	<b>Fluorokróm</b>	<b>Excitation<sub>max</sub> (nm)</b>	<b>Emission<sub>max</sub> (nm)</b>
<b>PAs1</b>	Fluorogreen (fluorescein-11-dUTP)	490	520
<b>PSc119</b>	Fluorogreen (fluorescein-11-dUTP)	490	520
<b>PSc119</b>	Fluorored (rhodamin-4-dUTP)	545	575
<b>PTa71</b>	Fluorored (rhodamin-4-dUTP)	545	575
<b>PTa794</b>	Fluorogreen (fluorescein-11-dUTP)	490	520

### 3.3. Alkalmazott módszerek

#### 3.3.1. Citológiai preparátumkészítés

A különböző kísérletekhez felhasznált növényi anyagok szemeit nedves szűrőpapíron csíráztattuk. Amikor a gyökerek elérték az 1-1,5 cm-es hosszúságot, jeges vízben rögzítettük őket 24 órán át, szinkronizálva ezzel a sejtek osztódását a metafázisban. A hidegkezelés után abszolút alkohol és jégcet 3:1 arányú keverékében fixáltuk a gyökércsúcsokat, leállítva ezzel a sejtek osztódását. A rögzített gyökereket 4°C-on tároltuk további felhasználásig. Preparátumkészítéshez a fixált gyökércsúcsokat kármínecetsav 1%-os oldatába helyeztük 10-30 percre, felpuhítva ezzel a szöveteket és sejteket. Az így kapott gyökércsúcsokat ecetsav 45%-os oldatában nyomtuk szét, majd a tárgylemezeket fénymikroszkóppal, fáziskontraszt feltét alatt vizsgáltuk. Az *in situ* hibridizációhoz alkalmas tárgylemezekről a fedőlemezt folyékony N<sub>2</sub>-ben fagyasztottuk, majd pattintottuk le és -20°C-on tároltuk felhasználásig.

Meiotikus preparátumok vizsgálatához antérákat gyűjtöttünk az egyes fajtákról, amelyeket abszolút alkohol és jégcet 3:1 arányú keverékében rögzítettük, leállítva ezzel a sejtek osztódását meiosis I. metafázisában. Néhány óra elteltével az oldatot 70%-os alkoholra cseréltük felhasználásig. A preparátumok készítéséhez a portokokat 45%-os ecetsavban

nyomtuk szét. A megfelelő kromoszómákat tartalmazó tárgylemezekről a fedőlemezt folyékony N<sub>2</sub>-ben fagyasztottuk és pattintottuk le, majd a lemezeket -20°C-on tároltuk felhasználásig.

### 3.3.2. Feulgen festés

1. A vizsgálandó gyökereket - a fixáló oldat eltávolítása után - 1N HCl oldatban hidrolizáltuk 60°C-on 11-14 percig, majd bázikus fuxinban festettük min. 20-30 percig.
2. A megfestett gyökércsúcsokból dörzspreparátumokat készítettünk és fénymikroszkóp alatt számoltuk a kromoszómákat.

### 3.3.3. Giemsa C-sávozás

1. A vizsgálathoz a gyökérpreparátumokat 45%-os ecetsavban készítettük, majd az alkalmas tárgylemezeket - a fedőlemez lepattintása után - abszolút alkoholban tároltuk másnap reggelig.
2. A festés előtti előkezeléshez a tárgylemezeket 1N HCl oldatban inkubáltuk 2 és fél percig 60°C-on, majd desztillált vizes öblítés után 7 percre Ba(OH)<sub>2</sub> telített oldatába helyeztük őket szobahőmérsékleten.
3. Alapos desztillált vizes öblítés után a preparátumokat 2×SSC oldatban kezeltük 60°C-on 1 órán át, majd közvetlenül a festékoldatba helyeztük át őket.
4. A festés 5%-os Giemsa-Sörensen puffer keverékében történt 30-60 percig. Az értékelést a lemezek desztillált vizes öblítése és szárítása után végeztük fénymikroszkóp alatt.

### 3.3.4. Egymást követő N-sávozás és genomikus *in situ* hibridizáció

A búza-árpa transzlokációt hordozó kromoszómák azonosításához N-sávozást és GISH-t alkalmaztunk ugyanazokon a tárgylemezeken Jiang és Gill (1993) módszerét felhasználva.

1. A kromoszóma preparátumokat a már ismertetett módon készítettük.
2. A fedőlemez lepattintása után a tárgylemezeket 45%-os ecetsavban kezeltük 5-7 percig 50°C-on majd éjszakán át kiszárítottuk őket.
3. Következő nap 94°C-on 2 percig inkubáltuk az egyes preparátumokat 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oldatban. Desztillált vízzel történt öblítés után a kromoszómák festését Banco Giemsa oldatban végeztük (1 csepp Giemsa festék/1ml Sörensen puffer) 15-20 percig.
4. Az N-sávozás értékelése és az egyes sejtek fényképezését követően a tárgylemezeket alkoholsorozaton keresztül víztelenítettük (70%, 90%, 100%).
5. Az *in situ* hibridizációt a lemosott preparátumokon végeztük.

### 3.3.5. DNS izolálás

Az alkalmazott molekuláris genetikai és molekuláris citogenetikai módszerekhez felhasznált DNS-t 3-4 hetes növények leveleiből nyertük Sharp és mtsai (1988) Proteináz-K módszere alapján.

1. A fiatal növények leveleiből 3-4 g-ot levágtunk, majd előre lehűtött mozsarakban, folyékony N<sub>2</sub>-ben alaposan porrá dörzsöltük. A levélmintákhoz 17 ml extrakciós puffert és 90 µl Proteináz-K enzimet adagoltunk.
2. A mintákat elegyítés után 50 ml-es centrifuga csövekbe töltöttük és 50°C-os vízfürdőben inkubáltuk 1 órán át.
3. Egy óra elteltével a mintákhoz 1 térfogat (17 ml) fenolt (pH 8.0) adtunk, majd a centrifugacsövek forgatásával 10 percig kevertük.
4. Az extraktumokat 4°C-on 15 K-n 15 percig centrifugáltuk. A felülúszót új centrifuga csövekbe vittük át, amelyekhez 1 térfogat (17 ml) kloroformot adagoltunk és rázással 10 percig kevertük.
5. A mintákat 4°C-on 12 K-n 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót új, steril centrifuga csövekbe pipettáztuk át. Egy térfogat (17 ml) isopropanol hozzáadása után mintáinkat legalább 1 óra hosszat -20°C-on tároltuk.
6. A DNS-t centrifugálással kicsaptuk (4°C, 8 K, 10 perc), papírtörölközőn kiszárítottuk (kb. 15-20 perc), majd feloldottuk 1 ml steril vízben. Ezután az egyes mintákhoz 10 µl (10 µg/µl) RNáz-t adagoltunk és 37°C-on, 2 órán át inkubáltuk.
7. Két óra elteltével 4 ml steril vizet és 1 ml 5M NaCl oldatot pipettáztunk az egyes centrifuga csövekhez (össztérfogat 6 ml). A kloroform:fenol (3-3 ml-t adagolni a mintákhoz, 10 perc keverés rázással, lecentrifugálni 4°C-on, 12 K-n 10 percig, a felülúszót új, steril centrifuga csövekbe átvinni), majd a kloroform (6 ml-t adni az egyes mintákhoz, a többi művelet az előzőekkel megegyezik) tisztítást követően a felülúszót 30 ml-es üveg csövekbe vittük át.
8. A mintákhoz 2 térfogat (12 ml) előzőleg -20°C-on tárolt abszolút alkoholt adtunk. Óvatos de alapos összekeverés után a csöveket -20°C-ra állítottuk legalább egy éjszakára.
9. A kicsapódott DNS-t steril hajlított Pasteur pipettával eltávolítottuk, majd 1 ml 70%-os alkoholban mostuk néhány percig.
10. A DNS mintákat kiszárítottuk (legalább 20-30 percig), majd feloldottuk 500 µl steril vízben. Feloldódás után a DNS rövid ideig 4°C-on, hosszabb ideig -20°C-on tárolható.

### 3.3.6. Nick transláció - próba jelölése fluorokrómmal

A különböző kísérletekben a genomikus *in situ* hibridizációhoz próbaként használt rozs, *Aegilops caudata* L. és árpa DNS-t Sau3AI restrikciós enzimmel hasítottuk. A fluoreszcens

*in situ* hibridizációhoz próbaként alkalmazott pTa71, pTa794, pAs1 és pSc119 DNS klónokhoz hasonlóan a fragmentált, különböző fajokból származó DNS mintákat Fluorogreenel (fluorescein-11-dUTP), illetve Rhodaminnal (rhodamin-4-dUTP) jelöltük nick transzlációval.

1. Egy steril, alufóliával borított, 1,5 ml-es eppendorfcsőbe pipettáztuk a szükséges puffereket és összetevőket: 10×NT puffer, jelöletlen nukleotid keverék, fluorokrómmal jelölt nukleotid, 100 mM dithiothreitol, jelöletlen - előzőleg fragmentált DNS. A mennyiséget 45 µl-re egészítettük ki steril vízzel.
2. Hozzáadtunk 5 µl DNA polymerase I/DNase I enzimoldatot, majd centrifugáltuk.
3. Az eppendorfcsővet 15°C-on inkubáltuk 3 és fél órán keresztül.
4. A kezelés után hozzáadtunk: 5 µl 0,3 M EDTA-t (pH 8), a megfelelő mennyiségű - előzőleg fragmentált - blokkoló DNS-t, 1/10 térfogat 3 M nátrium-acetát-ot, illetve 2 és fél - 3 térfogat abszolút alkoholt. Alapos, de óvatos összekeverés után kicsaptuk a DNS-t (-70°C-on fél órán át vagy -20°C-on éjszakán át).
5. Az eppendorfcsővet 12 ezer g fordulattal 4°C-on 10-15 percig centrifugáltuk. Leöntöttük a felülúszót, majd 500 µl jéghideg 70%-os alkoholt pipettáztunk a kicsapott mintához és a csövet 4°C-ra helyeztük fél órára.
6. 4°C-on, 4 percig, 12 ezer g fordulattal történt centrifugálás után leöntöttük a felülúszót és a csapadékot éjszakán át kiszárítottuk.
7. A jelölt DNS-hez 20 µl 1×TE pufert adtunk, majd rövid ideig 4°C-on, hosszabb ideig -20°C-on tároltuk.

### 3.3.7. Genomikus *in situ* hibridizáció (GISH)

A GISH vizsgálatokat Reader és mtsai (1994) módszere alapján végeztük kisebb módosításokat követően.

1. Az *in situ* hibridizációhoz alkalmas tárgylemezeket 37°C-os termosztátban előmelegítettük (kb. 1-2 óra), majd frissen készített 10 µg/ml (w/v) koncentrációjú RNáz oldatba helyeztük fél órára.
2. Fél óra elteltével a tárgylemezeket 2×2 percig 37°C-os 2×SSC oldatban mostuk.
3. A denaturációt megelőzően a kromoszómák fixálásához a preparátumokat 4%-os (w/v) frissen depolimerizált paraformaldehid oldatban kezeltük szobahőmérsékleten 10 percig, majd 3×2 percig 2×SSC oldatban öblítettük őket. Az utolsó mosást követően a tárgylemezeket 37°C-os vízfürdőben előmelegítettük.
4. A preparátumokon a DNS denaturációját 70%-os formamid oldatban végeztük. A metszeteket 70°C-os vízfürdőben inkubáltuk 3 percig, majd a formamid oldatot jéghideg 70%-os alkoholra cseréltük, amely kezelést még két alkalommal megismételtünk 2-2 percig. Ezt követően a tárgylemezeket -20°C-on tárolt 90%-os és abszolút alkohol oldatokban öblítettük 3, illetve 5 percig, majd levegőn szárítottuk a hibridizációs oldat elkészítéséig.
5. Ötven µl hibridizációs keverék 2×SSC-t, 10% dextrán szulfátot, 0,2% nátrium dodecilt

szulfátot és 1 ng/μl jelölt próba és blokkoló DNS keverékét tartalmazta tárgylemezenként. Az egyes kísérletekben szereplő két faj homológ DNS szekvenciáinak blokkolására jelöletlen DNS-t használtunk, amelyet autoklavozással fragmentáltunk és megfelelő arányban adagoltuk a hibridizációs keverékhez. A jelölt próba és a blokkoló DNS denaturációját forralással végeztük 5 percig, majd az eppendorfcsővet pár percre jégre helyeztük.

6. A forralás következtében elpárolgott mennyiség miatt a tárgylemezekre egyenként 45 μl hibridizációs keveréket cseppentettünk és steril műanyag lappal fedtük le őket.
7. Az *in situ* hibridizációt 2 és fél órán át 65°C-on végeztük, majd 2×SSC pufferben mostuk, illetve hűtöttük a preparátumokat.
8. A szobahőmérsékletűre hűlt tárgylemezeket 4×SSC/0,2%Tween oldatban mostuk a kontrasztfestést megelőzően (a preparátumok éjszakán át tárolhatók az oldatban, amennyiben a folyamatot megszakítjuk).
9. A jelöletlen kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (4'6-diamidino-2-phenylindole, 1 μg/ml) vagy PI-dal (propidium jodid) történt, majd a preparátumokat fakulásgátló (Vectashield) folyadékban fedtük le.
10. A jelölt kromoszómák azonosítását Zeiss Axioskop 20 epifluoreszcensz mikroszkóppal végeztük, amely 10-es, 25-ös (triple band) filterekkel, fotoberendezéssel és Spot CCD kamerával felszerelt.

A meiotikus preparátumokon a GISH a mitotikus preparátumok festéséhez hasonlóan történt a tárgylemezek proteináz K kezelését követően (Reader és mtsai 1994). Az RNase-oldat használata után a sejteket 1-5 μg/ml proteináz K enzimet tartalmazó PK pufferrel kezeltük 37°C-on 10 percig. Az inkubálás után PK Stop pufferrel leállítottuk az enzim működését, a tárgylemezeket öblítettük és szobahőmérsékletűre hűtöttük (2×2 perc mosás) a paraformaldehid kezeléshez. Proteináz K enzim alkalmazásával eltávolítható a kromoszómák körüli citoplazma. Az *in situ* technika hatékonyan működik meiotikus preparátumokon, amennyiben a vizsgálandó kromoszómák citoplazma mentesek.

### 3.3.8. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

A folyamatot Pickering és mtsai (1997) módszere alapján hajtottuk végre, az előkezelések a GISH-nél bemutatott módon történtek.

1. A hibridizációs keverék (30 μl/tárgylemez) 50% formamidot, 2×SSC-t, 10% dextrán szulfátot, 0,1% nátrium dodecyl szulfátot, 50 ng/μl carrier (lazac sperma) DNS-t, valamint 400 pg/μl jelölt pTa71-pTa 794 (pTa71-pAs1, illetve pTa71-pSc119) fluorokrómmal
2. jelölt DNS próbák keverékét tartalmazta tárgylemezenként.
3. A kromoszóma DNS denaturálását 80°C-on 10 percig (az egyszer már lemosott, újra hibridizált minták esetében 8 percig) hajtottuk végre.
4. Denaturálás után a preparátumokat 37°C-os termosztátba helyeztük át, ahol 6 órán keresztül végeztük a hibridizációt.
5. A tárgylemezek *in situ* hibridizációt követő mosása a következő volt: 2×SSC-ben 42°C-

on 2×5 percig, 25%-os formamid oldatban 42°C-on 2×5 percig végül 2×SSC-ben 42°C-on 3, illetve 5 percig. A preparátumokat az utolsó 2×SSC oldatban szobahőmérsékletűre hűtöttük.

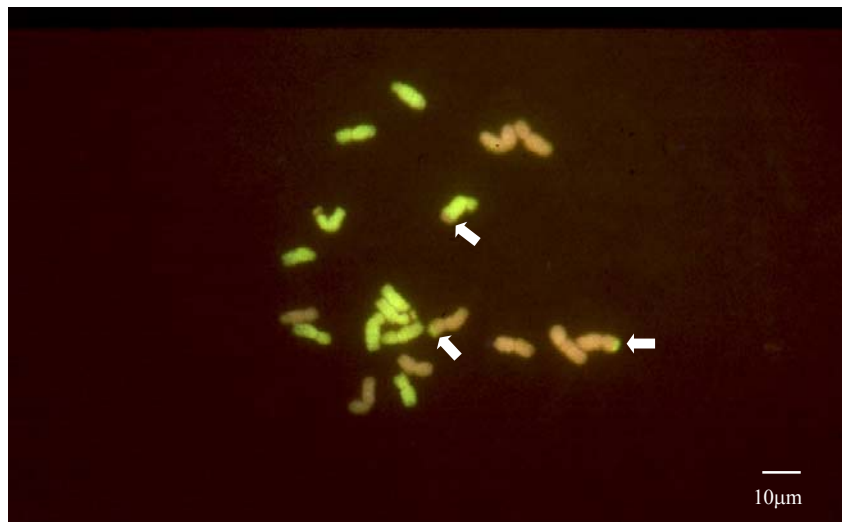
6. Kontrasztfestés előtt a mintákat 4×SSC/0,2% Tween oldatban mostuk (a folyamat itt megszakítható, éjszakán át tárolhatók a lemezek az oldatban).
7. A kromoszómák kontrasztfestését 1 µg/ml DAPI-val végeztük (az újra hibridizált tárgylemezek esetében az oldat koncentrációja 2 µg/ml volt), majd a preparátumokat 4×SSC/ 0,2% Tween oldatban öblítettük.
8. A minták lefedése és az adatok értékelése a GISH-nél bemutatott módon történt.
9. A hibridizációs jelek rögzítése után a tárgylemezeket 50% formamide és 0,5×SSC keverékében mostuk újra hibridizáláshoz.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 4.1. A búza rokonsági körébe tartozó fajok molekuláris citogenetikai vizsgálata

#### 4.1.1. *Aegilops cylindrica* Host. genomszerveződésének molekuláris citogenetikai vizsgálata

Az *Aegilops cylindrica* Host. öt eltérő földrajzi eredetű vonalát vizsgáltuk genomikus *in situ* hibridizációval és különböző DNS próbák térképezésével az egyes kromoszómákon (FISH). Az egyes vonalaknál általában 10-12 sejt analízise után vontuk le következtetéseinket. A GISH kísérletek alapján megállapítottuk, hogy három vonal intergenomikus (a  $C^C$  és  $D^C$  genomok közötti) transzlokációt hordozott, míg a TA2204 és TA2205 vonalak elemzése során nem mutattunk ki átrendeződést a két genom egyes kromoszómái között. A TA2203 iráni eredetű *Ae. cylindrica* Host. vonalnál a  $C^C$  genom egyik hosszú akrocentrikus és a  $D^C$  genom egy szubmetacentrikus kromoszómája között homozigóta reciprok transzlokációt azonosítottunk (1. ábra).



**1. ábra.** A TA2203 iráni eredetű *Ae. cylindrica* Host. vonal metafázisban lévő kromoszómái GISH-t követően ( $C^C$  genom kromoszómák fluorogreennel jelöltek, kontrasztfestés propidium jodid). A nyilak a transzlokációk elhelyezkedését jelölik.

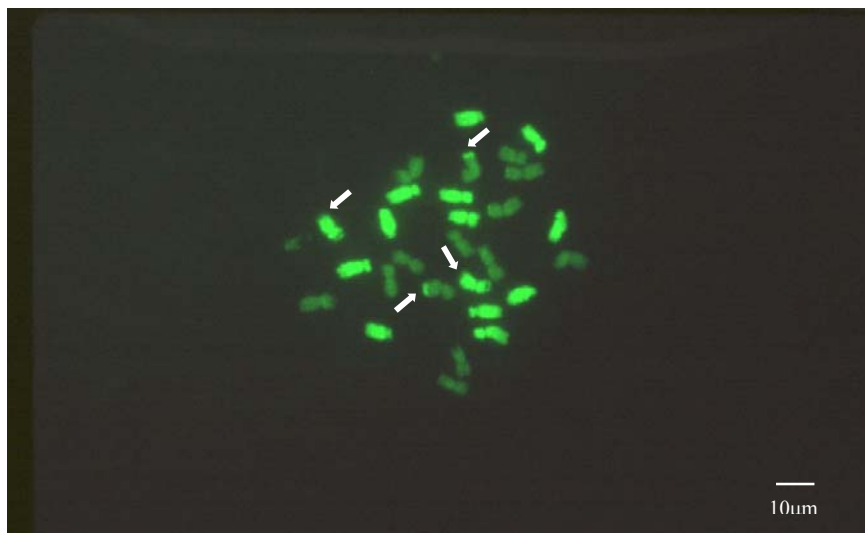


A transzlokációs töréspontot a C<sup>C</sup> genom kromoszómáján a hosszú kar 0.85 pontja körül azonosítottuk (a kromoszóma kar 85%-a jelölődött genomikus *in situ* hibridizáció után), tehát a kar disztális vége (15%) D<sup>C</sup> genom eredetű volt (nem mutatott zöld festődést, a kontrasztfestést követően piros színű). Az intergenomikus kicserélődésben szereplő D<sup>C</sup> genomból származó szubmetacentrikus kromoszómán a transzlokáció töréspontja a rövid kar 0.70 pontján volt látható (a kar 70%-a jelöletlen maradt), a kar disztális vége (30%) a C<sup>C</sup> genomból származott (élénk zöld festődést mutatott).

A transzlokációs kromoszómák mérete és a kromoszóma karok aránya alapján nagy valószínűséggel megállapíthatjuk, hogy a C<sup>C</sup> genom B vagy a D kromoszómája, illetve a D<sup>C</sup> genom 3D vagy az 5D kromoszómája között történt a genetikai anyag kicserélődése.

A TA 2202 Romániából származó *Ae. cylindrica* Host. vonal vizsgált növényei két eltérő típusú kromoszóma összetételt mutattak.

Három növény homozigóta transzlokációt hordozott, amely egy szatellites C<sup>C</sup> genom kromoszóma hosszú karja és egy szubmetacentrikus D<sup>C</sup> genom kromoszóma hosszú karja között jött létre (2. ábra).



**2. ábra.** A TA2202 Romániából származó *Ae. cylindrica* Host. vonal metafázisban lévő kromoszómái GISH után, ahol a C<sup>C</sup> genom kromoszómái élénk zöld festődést mutatnak. A nyilak a homozigóta reciprok transzlokációt jelölik az egyes kromoszómákon.

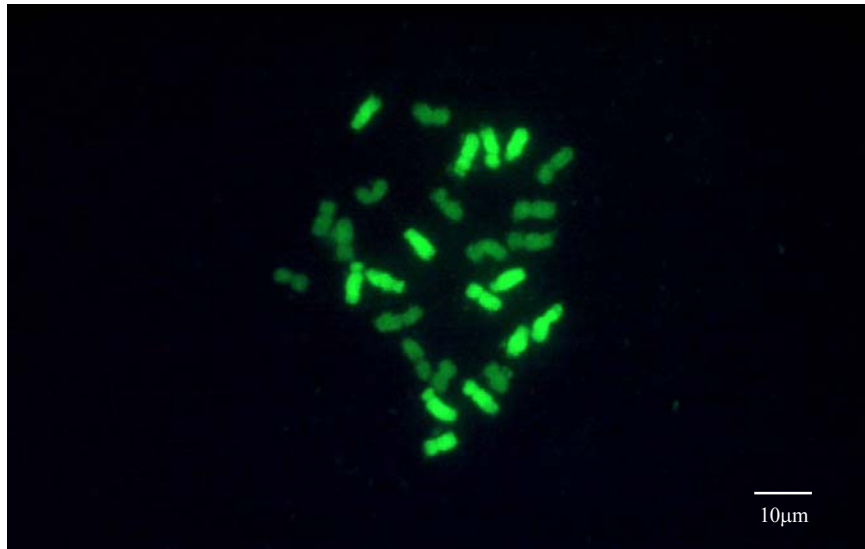
A transzlokációs töréspont a C<sup>C</sup> és D<sup>C</sup> genom kromoszómák hosszú karján a 0.85 pont körül volt található, így mindkét transzlokációban szereplő kromoszóma hosszú karjának mintegy 15%-a származott az ellentétes genomból.

A másodlagos befűződés alapján megállapítottuk, hogy a transzlokációt hordozó C<sup>C</sup> genom kromoszóma az A volt. Mérete és a kromoszóma karok aránya alapján nagy valószínűséggel





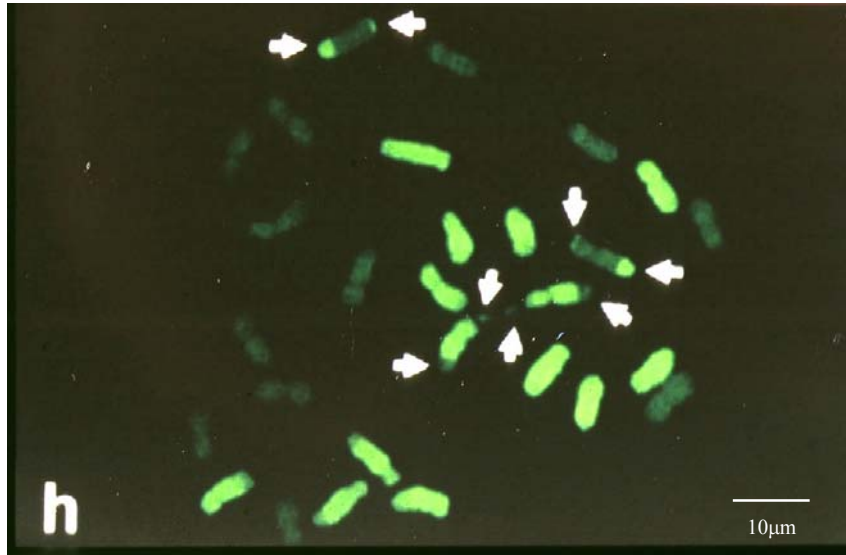
állíthattuk, hogy a  $D^C$  genom átrendeződött kromoszómája vagy a 3D vagy az 5D kromoszóma volt. A TA2202 vonal öt további vizsgált növénye semmiféle intergenomikus átrendeződést nem mutatott a  $C^C$  és  $D^C$  genomok kromoszómái között genomikus *in situ* hibridizációt követően (3. ábra).



**3. ábra.** A TA2202 vonal metafázisban lévő kromoszómái. A  $C^C$  genom fluorogreennel jelölt (élénk zöld festődés).

A TA2201 francia eredetű *Ae. cylindrica* Host. vonal 8 vizsgált növénye közül 6 kettős homozigóta reciprok transzlokációt tartalmazott. A genomikus átrendeződés a szatellites  $1C^C$  (A) és a szintén másodlagos befűződést hordozó  $5D^C$  kromoszómák esetében mindkét kart érintette (4. ábra).





**4. ábra.** A TA2201 vonal kromoszómái GISH-t követően. A C<sup>c</sup> genom fluorogreennel jelölt, a nyilak a kettős homozigóta reciprok transzlokáció töréspontjait jelzik.

Az 1C<sup>c</sup> kromoszóma pár szatellitje és rövid karjának disztális vége jelöletlen maradt a GISH után, ami azt jelezte, hogy ezek a kromoszóma szakaszok a D<sup>c</sup> genomból származtak. A rövid karon a kromoszóma teljes szatellitje D<sup>c</sup> genom eredetű volt, a hosszú karon a transzlokációs töréspontot a 0.70 pontnál figyeltük meg. Az 5D<sup>c</sup> kromoszóma pár karjainak disztális vége ezzel szemben határozott jelölődést mutatott genomikus *in situ* hibridizáció után, tehát ezek a kromoszóma szakaszok a C<sup>c</sup> genomból származtak. A transzlokációs töréspont a rövid kar 0.85 pontja körül, illetve a hosszú kar 0.70 pontján helyezkedett el. A búza riboszómális gének eltérő szakaszainak térképezését fluoreszcens *in situ* hibridizációval végeztük a pTa71 és a pTa794 DNS próbák kombinációinak felhasználásával. A pTa71 tetrametyl-rhodaminnal jelölt DNS próba összesen hat eltérő erősségű hibridizációs jelet (3 génlókuszt) mutatott a TA2204 vonal kromoszómáin. A legkifejezettebb fluoreszcens jel az 1C<sup>c</sup> kromoszóma pár rövid karjának NOR régiójában helyezkedett el (18S-5.8S-25S rDNS lókuszt). Két-két kisebb, gyengébben festődött hibridizációs jelet figyeltünk meg az 5D<sup>c</sup> kromoszóma pár rövid karjának terminális, illetve az 5C<sup>c</sup> kromoszóma pár rövid karjának disztális részén (5b ábra).

A fluoreszcein-11-dUTP-vel jelölt pTa794 DNS próba hibridizálásával összesen nyolc 5S rDNS hibridizációs jelet (4 génlókuszt) térképeztünk (5c ábra). Három lókuszt elhelyezkedése terminális irányú volt az 1C<sup>c</sup>, 5D<sup>c</sup> és 5C<sup>c</sup> kromoszóma párok NOR régiójához viszonyítva. A negyedik lókuszt az 1D<sup>c</sup> kromoszóma pár rövid karjának disztális végén figyeltük meg.

A pSc119 és a pAs1 repetitív DNS szekvenciákat tartalmazó próbákat használtuk sequential FISH módszert alkalmazva azért, hogy az egyes kromoszómákat azonosítsuk (Rayburn és

Gill 1986b, Badaeva és mtsai 1996a).



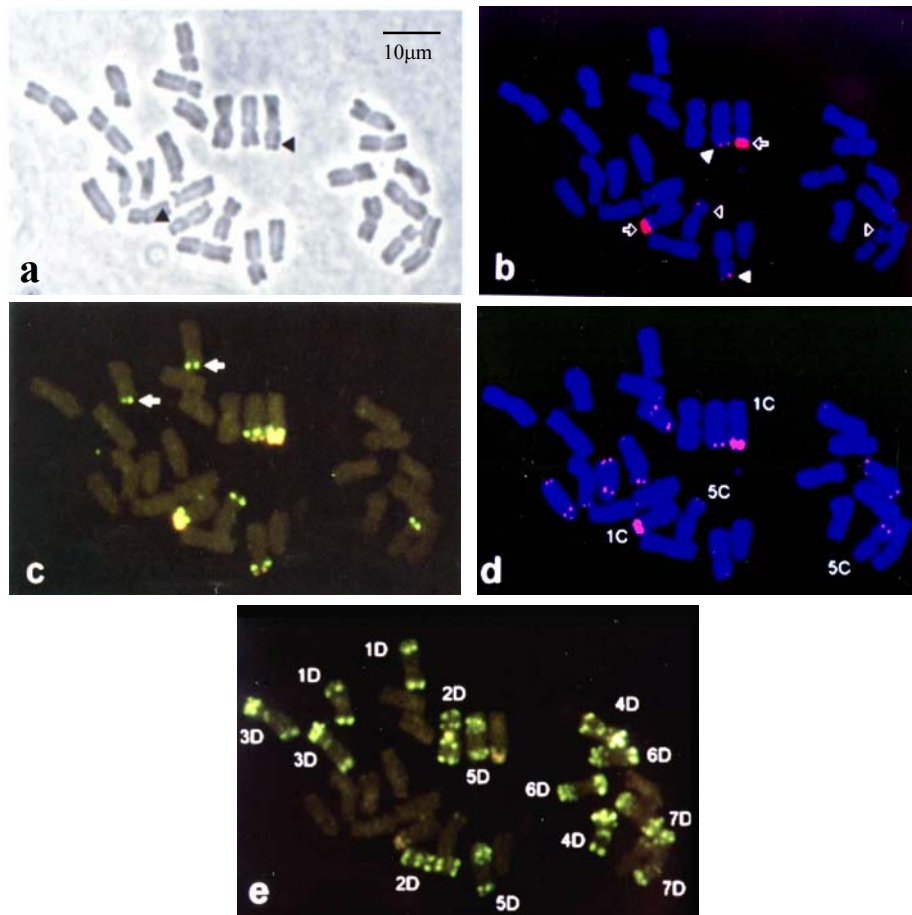
A pSc119 DNS próbát tertametyl-rhodaminnal jelöltük (5d ábra). A fluoreszcein-11-dUTP-vel jelölt pAs1 repetitív, *Ae. tauschii* Coss. DNS szekvenciát hordozó klónnal történt FISH után a D<sup>C</sup> genom kromoszómái specifikus jelölődést mutattak, amely alapján az egyes kromoszómák azonosíthatók voltak (5e ábra).

A TA2201, TA2202 és TA2203 számú *Ae. cylindrica* Host. vonalak FISH vizsgálatai során a TA2204 vonalnál már részletesen meghatározott, hasonló erősségű és elhelyezkedésű hibridizációs jeleket figyeltünk meg.

A klasszikusnak számító citológiai módszerek (C-sávozás, N-sávozás stb.) mellett pontosabb meghatározást tesz lehetővé a különböző molekuláris citogenetikai módszerek (GISH, FISH) alkalmazása az egyes fajok genomösszetételének vizsgálatára. A kromoszóma sávozási technikák felhasználása továbbra is szükséges, hiszen napjainkban még nem áll rendelkezésünkre elegendő számú genetikai marker a búza rokonsági körébe sorolt különböző fajok molekuláris vizsgálataihoz (Lapitan és mtsai 1997).

C-sávozással meghatározták az *Ae. cylindrica* Host. C<sup>C</sup> és D<sup>C</sup> genomjának kromoszóma mintázatát (Linc és mtsai 1999). A két szülői genom, az *Ae. tauschii* Coss. (D genom) és az *Ae. caudata* L. (C genom) kromoszómái C-sávozással nagy hasonlóságot mutattak az *Ae. cylindrica* Host kromoszómákon megfigyelt sávozással (Friebe és mtsai 1992b). A diploid fajok esetében azonban sokkal nagyobb arányú polimorfizmust tapasztaltak C-sávozással a tetraploid fajhoz viszonyítva. Nagy hasonlóságot figyeltek meg az *Ae. tauschii* Coss. D-genom kromoszómái és az *Ae. cylindrica* Host. D<sup>C</sup> genomjának kromoszómái között a D-genom specifikus pAs1 próbával történt FISH-t követően (Rayburn és Gill 1986b, Badaeva és mtsai 1996a).





**5. ábra.** FISH a TA2204 vonal metafázisban lévő kromoszómáin. 5a fáziskontraszt felvétel, 5b pTa71 (üres nyíl 1C<sup>C</sup>, üres nyílhegy 5C<sup>C</sup>, telt nyílhegy 5D<sup>C</sup>), 5c pTa794 (nyíl 1D<sup>C</sup>), 5d pSc119, 5e pAs1 DNS próbákkal történt hibridizációt mutatja az egyes kromoszómákon.

Az *Ae. caudata* L. különböző kromoszómáira előállított szubsztitúciós sorozatokat használtak a búzával homeológ kromoszómák és kromoszóma csoportok elemzéséhez. Az A (1D), C (5D) (Friebe és mtsai 1992b) és a B (2D) (Endo 1996) szubsztitúciós vonalak vizsgálata alapján megállapították, hogy az *Ae. caudata* L. A, C és B kromoszómái a búza 1, 5 és 2 kromoszóma csoportjaival homeológok. Izoenzim (Schmidt és mtsai 1993) és RFLP (Schubert és mtsai 1998) vizsgálatokat követően a további D, E, F és G *Ae. caudata* L. kromoszómákra egynél több búza kromoszóma csoporttal mutattak ki homeológiát. Ezen kromoszómák DNS összetétele az evolúció során feltehetően nagy mértékben átrendeződött. Az *Ae. caudata* L. C-genomja mellett az *Ae. umbellulata* Zhuk. U- és az *Ae. uniaristata* Vis. N-genomja is molekuláris szintű átrendeződést mutat a többi diploid vadbúza faj



szimmetrikus kariotípusához viszonyítva (Badaeva és mtsai 1996a,b).

Chennaveeraiah 1960-ban mindössze egy szatellit kromoszómapárt talált az *Ae. cylindrica* Host. kromoszómái között, míg Pathak már korábban (1940) két NOR régiót tartalmazó kromoszóma pár jelenlétéről számolt be. A vita végül is a nyolcvanas években dőlt el (Cermeno és mtsai 1984): az *Ae. cylindrica* Host. két C<sup>C</sup>-genom eredetű, aktív NOR régiót hordozó kromoszómával rendelkezik (1C<sup>C</sup> és 5C<sup>C</sup>), valamint a D<sup>C</sup> genomból származó 5 kromoszómával, amely NOR régiója általában inaktív.

A pTa71 DNS próbával (18S-5.8S-25S rDNS) történt FISH analízist követően megállapítható, hogy a két fő génlókuszt az *Ae. cylindrica* Host. 1C<sup>C</sup> és 5D<sup>C</sup> kromoszómák rövid karján, míg egy kisebb lókuszt az 5C<sup>C</sup> kromoszóma rövid karján található. Az *Ae. cylindrica* Host. két diploid donor fajának elemzése során megfigyelték, hogy az *Ae. caudata* L. két pár szatellit kromoszómát hordoz, amelyet A=1C és C=5C-ként azonosítottak. Az *Ae. tauschii* Coss. ezzel szemben egy szatellit kromoszóma párral, az 5D-vel rendelkezik (Chennaveeraiah 1960, Cermeno és mtsai 1984, Friebe és mtsai 1992b). A diploid fajok FISH vizsgálata során két fő rDNS (18S-5.8S-25S) lókuszt figyeltek meg az *Ae. caudata* L. 1C és 5C kromoszómák rövid karján, míg mindössze egyetlen hibridizációs jelet határoztak meg az *Ae. tauschii* Coss. 5D kromoszómájának rövid karján (Badaeva 1996b). Az *Ae. tauschii* Coss. egyes eltérő származású vonalainak vizsgálata során további polimorfikus 18S-5.8S-25S rDNS lókuszt azonosítottak a 7D kromoszóma rövid karján (Badaeva és mtsai 1996b), amelyet kísérletünkben az *Ae. cylindrica* Host. különböző származási helyű vonalainak vizsgálata során nem mutattunk ki a 7D<sup>C</sup> kromoszómán.

Az *Ae. cylindrica* Host. Ag-NOR sávozásával megállapították, hogy a faj két aktív (1C<sup>C</sup> és 5C<sup>C</sup>) és egy inaktív (5D<sup>C</sup>) sejtmagvacska működését szabályozó régiót (NOR) hordozó kromoszóma párral rendelkezik (Cermeno és mtsai 1984). Az általunk végzett FISH vizsgálatok eredményei azt sugallják, hogy a sejtmagvacska aktív működésének hiánya a NOR régióban a 18S-5.8S-25S rDNS gének alacsonyabb kópia számával is magyarázható. A *Triticum turgidum* L. és *T. timopheevii* Zhuk. A/A<sup>1</sup> genomjának vizsgálata során hasonló eredményeket figyeltek meg: a 18S-5.8S-25S rDNS lókuszon a gének kópia száma csökkent (Jiang és Gill 1994).

A pTa794 5S rDNS lókuszt tartalmazó DNS próbával történt FISH után megállapítható volt, hogy az *Ae. cylindrica* Host. C<sup>C</sup> és D<sup>C</sup> genomjának két-két kromoszóma párján összesen négy 5S rDNS génlókuszt hordoz. Eredményeinkhez hasonló megfigyelés született a két diploid donor faj pTa794 DNS próbával végzett FISH vizsgálata során: az *Ae. caudata* L. és *Ae. tauschii* Coss. 1-es és 5-ös homeológ kromoszóma csoport két-két kromoszóma párjának rövid karján helyezkednek el az 5S rDNS génlókuszok (Badaeva és mtsai 1996b).

Genomikus *in situ* hibridizációval a vizsgált öt *Ae. cylindrica* Host. vonal közül háromnál intergenomikus transzlokációt azonosítottunk. A megfigyelt transzlokációk mindegyikénél a transzlokációs töréspont a kromoszómák disztális végén helyezkedett el. C-sávozással - az intergenomikus kicserélődésben részt vett kromoszóma szakaszok hasonló festődése következtében - nem sikerült kimutatnunk ezeket a kromoszóma átrendeződéseket (Linc és mtsai 1999).

Jellen és mtsai (1994) GISH-el több intergenomikus átrendeződést mutatott ki az *Avena* nemzetség egyes fajainak eltérő genomból származó kromoszómáin, amelyek C-sávozással is azonosíthatók voltak.

A TA2202 számú *Ae. cylindrica* Host. vonal C-sávozása után az 5D<sup>C</sup> kromoszóma rövid

karján szerkezeti átrendeződést mutattunk ki. GISH-el nem volt megfigyelhető ugyanez a változás az 5D<sup>C</sup> kromoszóma rövid karján. Ebből arra következtethettünk, hogy a kérdéses kromoszóma szakasz átrendeződése intragenomikus jellegű volt, a D<sup>C</sup> genom kromoszómáján belül történt.

A diploid *Aegilops* fajok eltérő származású vonalainak C-sávozása során kevés számú transzlokációt figyeltek meg (Friebe és Gill 1996, Friebe és mtsai 1992b, 1996). A kromoszómák morfológiája és sávozás utáni mintázata alapján arra következtettek, hogy a transzlokációk kialakulása a sejtosztódás meiózis I metafázisában történt. Az univalens kromoszómák centromérái között ún. hidak alakulnak ki, amelyek aztán az osztódás során a két centroméra között bárhol eltörhetnek. Az *Ae. tauschii* Coss. tizenhat különböző vonalát vizsgálták C-sávozással és két vonalnál találtak egész kromoszóma kart érintő transzlokációt (Friebe és Gill 1996). Az *Ae. caudata* L. tizenkilenc eltérő származási eredetű vonalának C-sávozása során azonban semmilyen kromoszóma átrendeződést nem sikerült kimutatni (Friebe és mtsai 1992b).

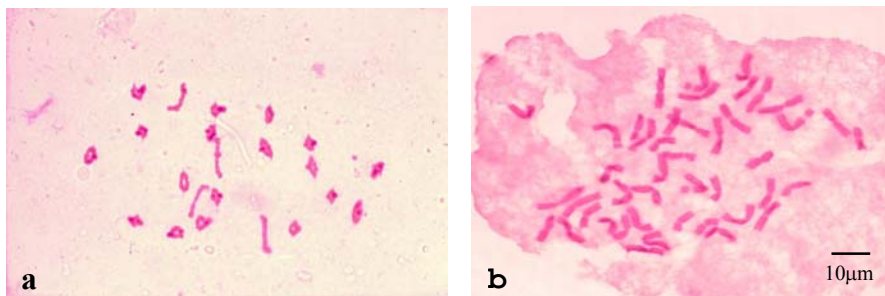
Gametocid kromoszómákat azonosítottak az *Ae. cylindrica* Host. C<sup>C</sup>, az *Ae. caudata* L. C és az *Ae. triuncialis* L. C<sup>t</sup> genomjának kromoszómái között (Endo 1990). Ismert, hogy ezek a kromoszómák elsődlegesen adódnak át az utódokba és nagy mértékben hozzájárulnak az egyes kromoszóma átrendeződések kialakulásához az osztódás során. A gametocid kromoszómák az *Ae. cylindrica* Host. esetében a 2-es kromoszóma csoportba, míg az *Ae. caudata* L. és az *Ae. triuncialis* L. fajoknál a 3-as kromoszóma csoportba tartoznak (Endo 1996). Megállapíthatjuk, hogy az általunk az *Ae. cylindrica* Host. eltérő földrajzi származású vonalainál azonosított, két genom közötti kromoszóma átrendeződések a Gc gén aktivitás következtében alakulhattak ki.

## 4.2. Génátvitel fajhibridizációval

### 4.2.1. Új búza-árpa diszómás addíciós vonalak kimutatása és azonosítása őszi búza genomban

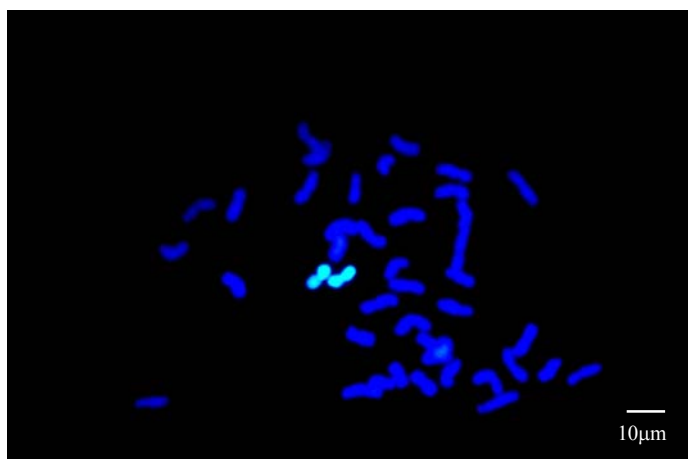
Kísérletünkben két új őszi búza genomban létrehozott búza-árpa diszómás addíciós vonalat azonosítottunk Giemsa C-sávozással. Az addíciós vonalak kromoszóma számát Feulgen festéssel ellenőriztük meiózis I. metafázisában és mitózisban (8a,b ábra).





**8. ábra.** A 2H és 6H diszómás addíciós vonalak kromoszóma készlete meiozis I. metafázisában (a), illetve mitózisban (b).

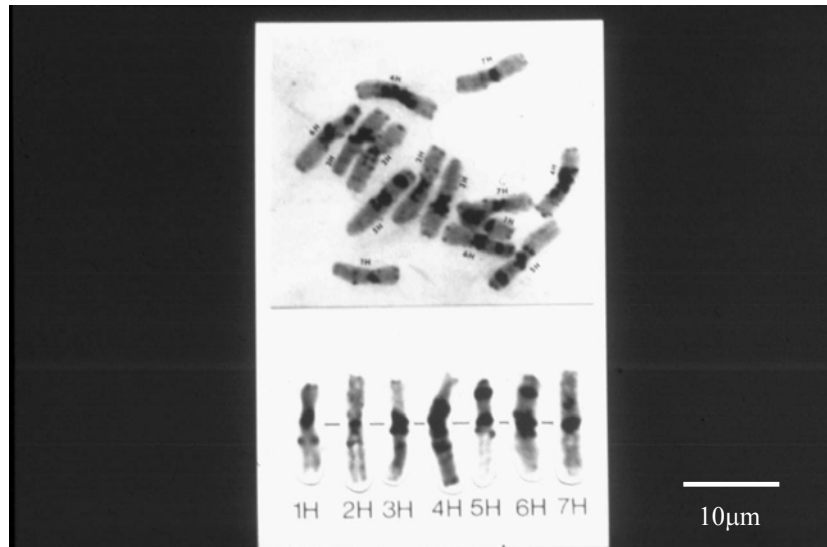
Az egy pár árpa kromoszóma genomikus *in situ* hibridizáció után jól elkülöníthető volt (9. ábra).



**9. ábra.** 2H diszómás addíciós vonal kromoszómái GISH-t követően. Az árpa kromoszómák világosabb színeződést mutatnak (kontrasztfestés DAPI).

Az egyes kromoszómák mintázatának összehasonlító vizsgálatához árpa C-sávok kariotípusát készítettünk (10. ábra). Az általunk készített Betzes árpa fajta kariotípuson az egyes kromoszómák sávozása hasonló a már ismert, korábban készített árpa C-sávozás utáni kariotípusokhoz (Kakeda és mtsai 1991, Linde-Larsen 1992).



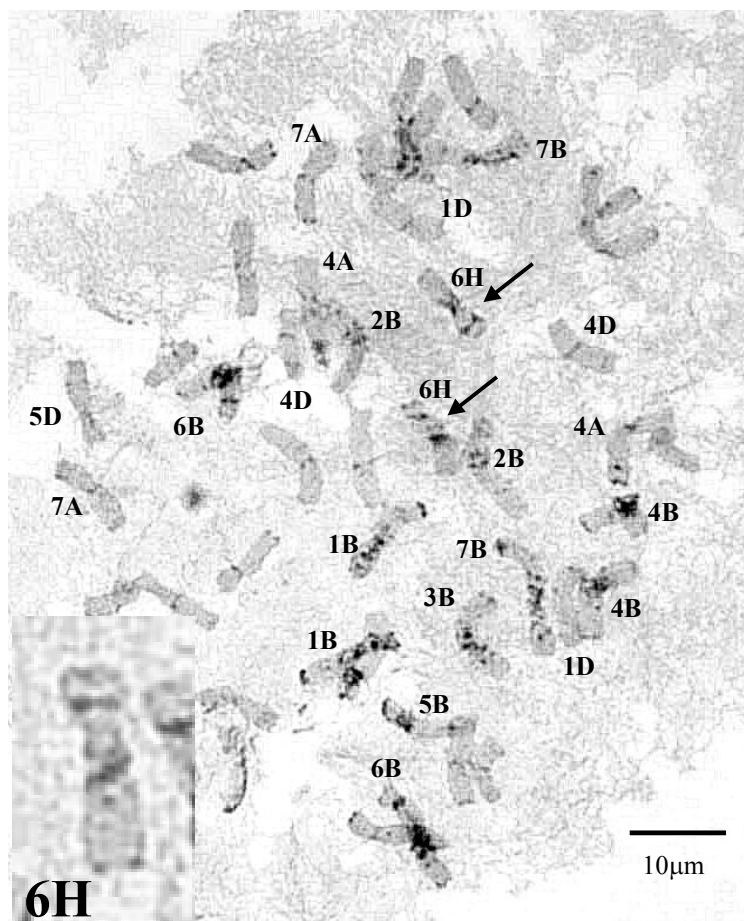


**10. ábra.** Betzes árpa fajta kariotípusa Giemsa C-sávozás után.

A Betzes árpa fajta hét kromoszóma párja specifikus mintázatuk alapján jól megkülönböztethető a búza kromoszómáktól C-sávozást követően. Az egyes kromoszómák centromérás, centromérához közeli és számos intersticiális sávot hordoznak. A vizsgált két új búza-árpa diszómás addíciós vonal egyes kromoszómáit a Gill és mtsai (1991) búza, illetve a Kakeda és mtsai (1991) árpa, valamint a saját árpa kariotípusok alapján azonosítottuk.

A (*Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring  $\times$  *Hordeum vulgare* L. cv. Betzes)*T. Aestivum* L. cv. Asakaze komugi<sup>2</sup>) $\times$ <sup>5</sup> kombinációból származó diszómás addíciós vonal egy árpa kromoszóma párját 2H-ként határoztuk meg Giemsa C-sávozást követően. A 2H árpa kromoszóma nem tartalmaz centromérás sávokat, mindkét karján egy-egy centromérához közeli, illetve egy-egy intersticiális sávot figyeltünk meg. A hosszú karon disztális helyzetű sávot, illetve a rövid karon halvány terminális sávot határoztunk meg (11. ábra).





**12. ábra.** A 6H diszómás addíciós vonal kromoszómái Giemsa C-sávoztást követően. A nyilak a 6H árpa kromoszómákat mutatják.

Az irodalmi adatokkal összevetve megállapíthatjuk, hogy az egyes fajták között polimorfizmus figyelhető meg. Linde-Larsen (1992) a 6H árpa kromoszóma C-sávoztása során nem azonosított telomérás sávot a rövid karon Bonus fajta vizsgálatánál. Eredményeinkhez hasonló megfigyelést tettek Kakeda és mtsai (1991) Shin Ebisu és Betzes árpa fajták kromoszóma vizsgálatát követően. Két másik fajta elemzése során nem mutattak ki telomérás sávokat a 6H árpa kromoszóma hosszú és rövid karján C-sávozással. Singh és Tsuchiya (1982a) arról számoltak be kísérleteik során, hogy N- és C-sávoztást követően a kromoszóma mintázatok közötti különbségek az egyes árpa fajtáknál az alkalmazott technikák, illetve a vizsgált mitotikus fázisok eltéréseiből adódnak. Nem

állapítottak meg heterokromatikus polimorfizmust az árpa kromoszómáknál. Kakeda és mtsai (1991) vizsgálataik során eltérő preparátumkészítési és festési technikákat alkalmaztak különböző sejtosztódási fázisban lévő árpa kromoszómák sávozásához. Igazolták, hogy a kromoszóma mintázatok eltérései a heterokromatikus polimorfizmus következményei az egyes árpa fajtáknál.

Árpa fajták kariotípusai közötti polimorfizmust több szerző megfigyelt N- és C-sávozással. Islam (1980) és Linde-Larsen (1981) a két sávozási módszert összehasonlítva N-sávozással nem figyeltek meg centromérás sávokat egyes árpa kromoszóma karokon. Kakeda és mtsai (1991) eredményei szerint C-sávozást követően is hiányoztak a centromérás sávok a 2HL kromoszóma karokról, amelyet vizsgálataink során mi is megfigyeltünk.

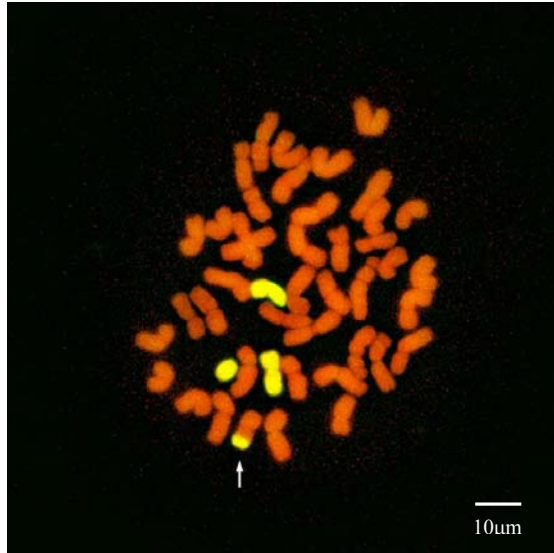
Burkholder (1988) kísérletei alapján megállapította, hogy a C-sávozási technika egy folyamata szelektíven hat az árpa kromoszómák egyes DNS szakaszaira és fehérjéire, így C-sávozással heterokromatikus nem festődő kromoszóma részek alakulnak ki. Gill (1987) meghatározása alapján C-sávozással minden típusú heterokromatin vizsgálható, míg N-sávozással specifikus, polypirimidin szekvenciákat hordozó heterokromatin mutatható ki a kromoszómákon. Más szerzők vizsgálata alapján N-sávozással egy specifikus phosphoprotein festődik az egyes kromoszómákon (Buys és Osinga 1982).

A különböző kromoszóma sávozási technikák a leggyorsabb és költségkímélő módszerek addíciós vonalak azonosítására. Az idegen fajokból származó kromoszómák specifikus festődésük alapján jól megkülönböztethetők a búza genomjában.

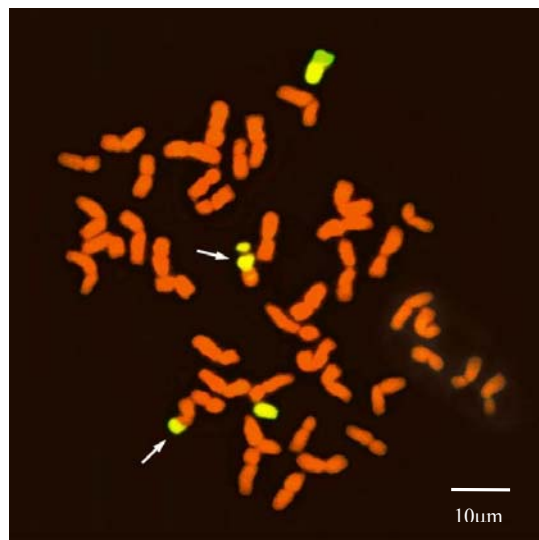
#### **4.2.2. Búza-árpa transzlokációk kimutatása és azonosítása egymást követő N-sávozással és GISH-el**

A korábban Martonvásáron előállított búza×árpa hibrid búzával visszakeresztezett utódai között kimutatott öt különböző transzlokáció azonosítását kíséreltük meg egymást követő N-sávozással és GISH-el.

Az egyik genomikus átrendeződés (I.típus, 13. ábra) egy metacentrikus búza kromoszómát érintett: a kromoszóma rövid karjának kb. a fele (FL 0.50) élénk festődést mutatott az *in situ* hibridizációt követően, tehát az árpa genomból származott. A másik transzlokáció az egyik szatellit árpa kromoszóma (5H vagy 6H) hosszú karján helyezkedett el (II. típus, 14. ábra). A transzlokációs töréspontot az árpa kromoszóma hosszú karján figyeltük meg, a kar disztális végének 20%-a búza genom eredetű volt (FL 0.20). A szatellit árpa kromoszómát érintő transzlokációt hordozó növények elpusztultak.



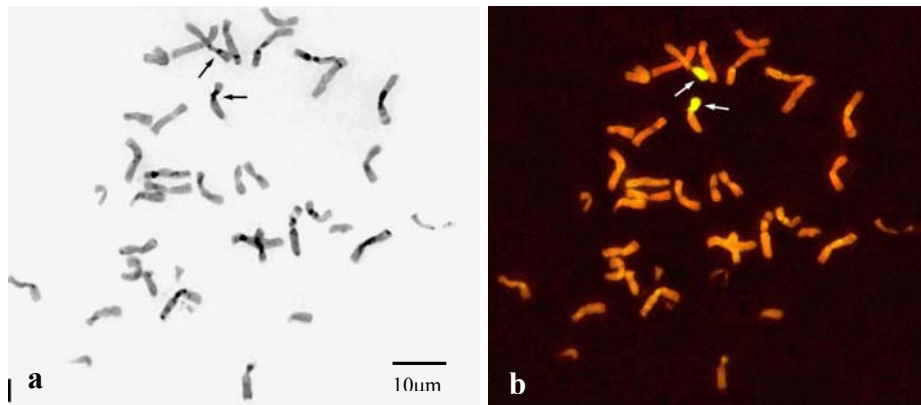
**13. ábra.** Búza-árpa transzlokáció (I. típus) kimutatása GISH-el. Az árpa genom fluorogrennel jelölt, a búza kromoszómák propidium jodiddal kontrasztfestettek.



**14. ábra.** Búza-árpa transzlokáció (szatellites kromoszóma, II. típus, a másik nyíl az I. típusú transzlokációt jelzi). Az árpa DNS fluorogrennel jelölt (kontrasztfestés propidium jodid).



Két növény utódai között centrikus fúziót mutattunk ki, amelyben a kromoszóma rövid karja az árpa, míg hosszú karja a búza genomból származott (CF, 15. ábra). A Robertsoni-transzlokációt hordozó növények életképesek és fertilisek voltak.

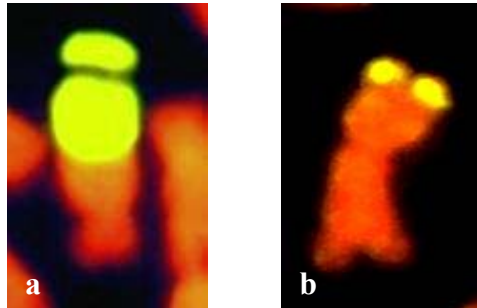


**15. ábra.** Búza-árpa transzlokáció (CF) kimutatása egymást követő N-sávozás (a) és GISH-t (b) követően. A nyilak a centromérákat, illetve az árpa DNS-t jelölik.

A III. típusú transzlokáció egy szatellitese árpa kromoszómából származott (16a ábra). A transzlokációs töréspont a hosszú karon helyezkedett el: a kar mintegy 50%-a származott az árpa genomból. A rövid kar búza genom eredetű volt, a kar nagy része azonban letört. A három növény közül kettő bizonyult fertilisnek.

A IV. típusú átrendeződés egy metacentrikus búza kromoszómát érintett, a transzlokációs töréspontot a kromoszóma rövid karján figyeltük meg (FL 0.80). A kar disztális végének mintegy 20%-a származott az árpa genomból, a kromoszóma szakasz a hibridizációt követően élénk festődést mutatott (16b ábra).



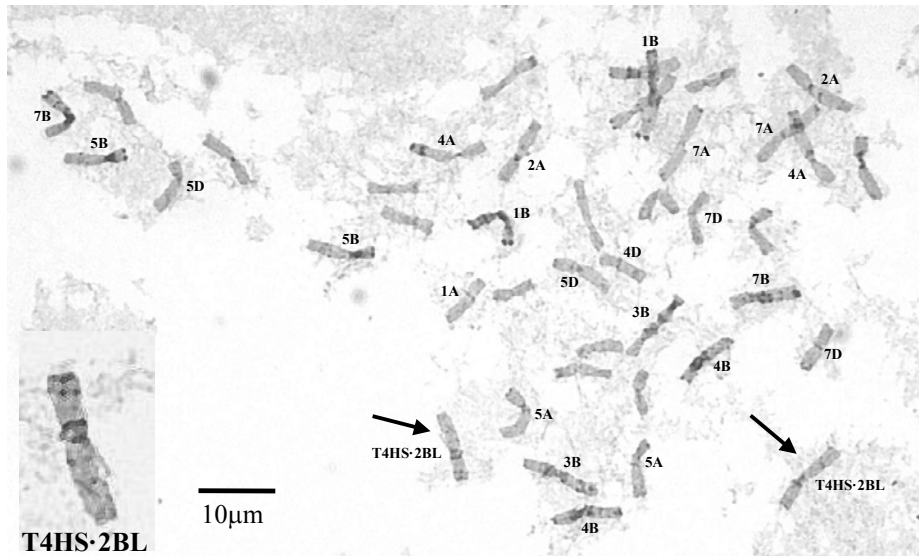


**16. ábra.** Szatellites transzlokáció (a, III. típus) kimutatása GISH-el. Az árpa DNS fluorogreennel jelölt, a búza kromoszómák propidium jodiddal (PI) kontrasztfestettek. A IV. típusú búza-árpa transzlokációt hordozó kromoszómán (b) az árpa DNS fluorogreennel jelölt, a búza kromoszóma piros festődést mutat (kontrasztfestés PI).

Az öt eltérő típusú transzlokációt hordozó növények mindegyikénél a vizsgált sejtek további telocentrikus, illetve teljes árpa kromoszómákat is tartalmaztak.

Az egyes transzlokációkat hordozó növények kromoszómáit egymást követő N-sávozással, majd genomikus *in situ* hibridizációval vizsgáltuk és elemeztük. Az I, II, III és IV. típusú transzlokációk tanulmányozásánál a két genom átrendeződött kromoszómáit- jellegzetes N-sávok hiányában- nem sikerült azonosítani. A Robertsoni- transzlokációt hordozó növények N- sávozása során kromoszóma- és fajspecifikus mintázatot figyeltünk meg a transzlokációt hordozó kromoszómán. A kromoszóma rövid karja a centroméránál erős heterokromatikus festődést mutatott. A hosszú karon centroméránál és intersticiális helyzetben azonosítottunk sávokat a festést követően. Az egyes sávok mintázata és specifikus elhelyezkedésük alapján meghatároztuk, hogy a transzlokációt hordozó kromoszóma kialakításában a 2BL búza kromoszóma hosszú és a 4HS árpa kromoszóma rövid karja vett részt. Eredményeinket a későbbiek során Giemsa C-sávozással is igazoltuk (17. ábra).





**17. ábra.** A CF-t hordozó növény kromoszómái Giemsa C-sávozás után. A nyilak a 4HS-2BL transzlokációs kromoszómákat jelölik.

Búza-árpa transzlokációk kialakulásához szükséges a két genom kromoszómáinak párosodása, amelyről az irodalomban kevés adat áll rendelkezésünkre (Molnár-Láng és mtsai 2000). Az 5BL búza kromoszómán elhelyezkedő *Phl* gén működését kiiktatva Islam és Shepherd (1988) 4.5%-os párosodást figyeltek meg az árpa 2HS telocentrikus kromoszómája és a homeológ búza kromoszómák között. Diteloszómás búza-árpa addíciós vonalak búzával történő keresztezésekor rekombinánsok kialakulását tapasztalták 1.4%-ban 6HL és 1.1%-ban 3HL árpa kromoszómákra (Islam és Shepherd 1992). A rekombinánsokat biokémiai markerek segítségével izolálták az árpa karon előforduló izoenzim jelenlétének vizsgálatával.

A búza és az árpa genomok között előforduló strukturális átrendeződések azonban nem minden esetben mutathatók ki különböző izoenzimek tesztelésével a kérdéses kromoszómákon. Genomikus *in situ* hibridizációval olyan rövid, idegen fajból származó DNS szakaszok is megfigyelhetők a búza genomjában, amelyek nem hordoznak izoenzim lokuszokat vagy jellegzetes és a kromoszómák azonosítására alkalmas N-, illetve C-sávokat (Jiang és Gill 1994). A kísérletünkben vizsgált I., II. és III. típusú búza-árpa transzlokációknál az árpa genomból származó DNS szakaszok nem mutattak jellegzetes mintázatot N-sávozás után.

Irodalmi adatokból jól ismert, hogy szövettenyésztés és ionizáló sugárzás hatására a kezelt növények utódainál nagy számban előfordulhatnak kromoszóma törések (Larkin és Scowcroft 1981, Friebe és mtsai 1996).

Faj- és nemzetséghibridek szövettenyésztésben történő regenerációja után az utódok között intergenomikus transzlokációk kialakulását figyelték meg (Lapitan és mtsai 1984, Jiang és

mtsai 1994b). *Triticum aestivum* L. és *T. durum* Desf. -*Dasyphyrum villosum* L. amfiploid közötti hibridek szövettényészetben regenerált utódainál nagy számú búza-*D. villosum* L. transzlokációkat mutattak ki genomikus *in situ* hibridizációval (Li és mtsai 1999). *Thynopyrum intermedium* -ből származó kromoszóma szegmentumokat építettek át a búza genomjába sejt-kultúra alkalmazásával és így számos rekombináns vonalat állítottak elő (Banks és mtsai 1995). Eredményeink megegyeznek az irodalmi adatokkal, mivel a megfigyelt öt eltérő típusú búza-árpa transzlokáció kialakulása valószínűleg a szövettényésztés következménye.

Megállapítható, hogy a szövettényésztés az ionizáló sugárzáshoz hasonlóan véletlenszerű kromoszóma töréseket okoz, amely nem kompenzáló típusú transzlokációk kialakulásához vezet. Kísérletünkben 4HS-2BL centrikus fúziót sikerült azonosítanunk, a többi általunk vizsgált búza-árpa transzlokációról még nem tudjuk, hogy kompenzáló típusúak-e vagy sem. Koba és mtsai (1997) az 5BL búza kromoszóma hosszú- és a 7HS árpa kromoszóma rövid karja közötti nem kompenzáló típusú centrikus fúziót azonosítottak C-sávozással.

A búza-árpa transzlokációs vonalak hatékonyan felhasználhatók az árpa genom térképezéséhez, mivel az árpa kromoszóma szakaszok a búza genomjában helyezkednek el (Endo és mtsai 1998).

#### **4.2.3. 1BL/1RS búza-rozs transzlokációt tartalmazó marionvásári búza fajták vizsgálata GISH-el**

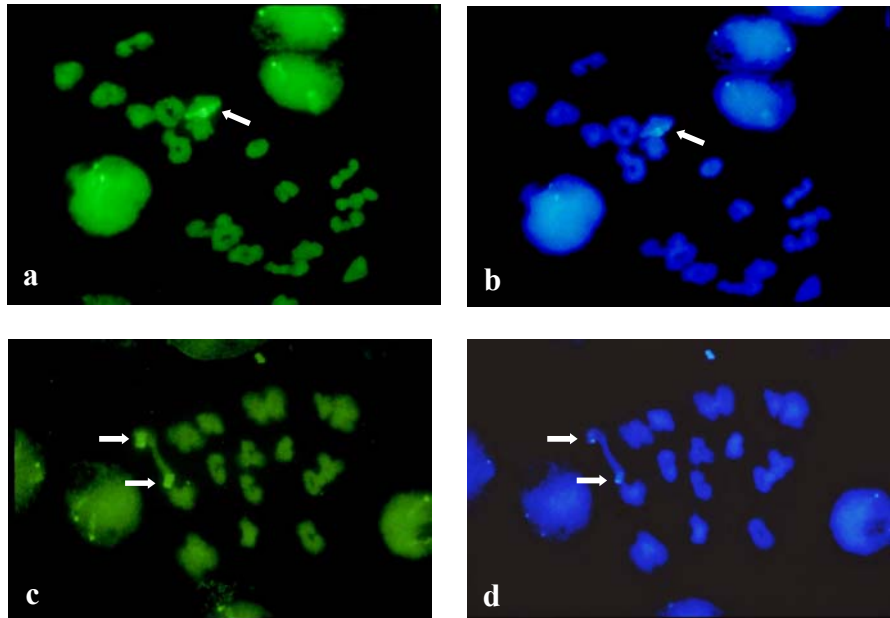
Tizenöt eltérő sütőipari minőségi adatokkal rendelkező marionvásári nemesítésű búza fajtát vizsgáltunk genomikus *in situ* hibridizációval (GISH) azzal a céllal, hogy megállapítsuk van-e különbség az egyes fajták esetében az 1BL/1RS búza-rozs transzlokáció méretében. Az általunk tesztelt tizenöt marionvásári búza genotípus mindegyikének 3-5 növényében, egyenként 6-12 sejtjében vizsgáltuk az 1BL/1RS transzlokáció jelenlétét, illetve a kromoszóma karok hosszát és egymáshoz viszonyított arányát.

Ismert, hogy a rozsból származó génkomplexum bizonyos mértékben kedvezőtlen hatással van a liszt sütőipari minőségére (Bedő és mtsai 1993). Azt feltételeztük, hogy a jobb minőségi tulajdonságokkal rendelkező marionvásári búza fajtákban a korábban beépült rozs kromoszóma kar egy szakasza ( $\omega$ -secalint hordozó DNS szakasz) eliminálódott.

Idegen DNS szegmentumok kimutatására legalkalmasabb módszerek az RFLP, GISH és FISH. Az RFLP magas költsége miatt a növény-nemesítők és a növénygenetikusok leginkább az *in situ* hibridizációs technikákat részesítik előnyben idegen eredetű DNS tanulmányozására a búza genomjában (Jouve és mtsai 1998).

Portokokból készített preparátumokon, ötven pollen anyasejtben (PMCs) tanulmányoztuk az 1BL/1RS búza-rozs transzlokációt hordozó kromoszóma és a búza kromoszómák közötti párosodást.

A búza kromoszómák hagyományos körülmények között 21 gyűrű bivalens konfigurációs formát alkotva párosodnak egymással meiosis I. metafázisában. Néha megfigyelhető nyílt bivalens kromoszómák kialakulása is.



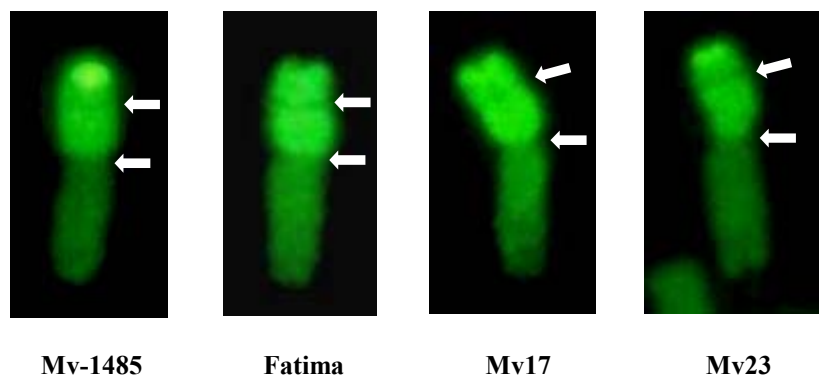
**18. ábra.** Az 1BL/1RS transzlokáció kimutatása meiosis I. metafázisában. A rozs DNS elhelyezkedését nyilak jelzik, a búza kromoszómák DAPI-val kontrasztfestettek (b,d ábra).

Az általunk vizsgált sejtek 78%-ában az 1RS rozs kromoszóma kar zárt gyűrűt alkotott a búza kromoszómával (18a,b ábra), míg 22%-ban azonosítottunk nyílt bivalens kromoszómákat, amelyek a rozs kart tartalmazták (18c,d ábra). Az ötven sejt közül 1-nél trivalens kromoszóma konfigurációt figyeltünk meg, amely az 1RS rozs kart is hordozta. Zeller (1973) keresztezéseket végzett az 1BL/1RS transzlokációt heterozigóta és homozigóta formában hordozó valamint euploid búza vonalak között. A transzlokációt heterozigóta formában hordozó vonal és a búza kromoszómák osztódásánál a meiosis I. metafázisában heteromorf bivalens kromoszóma párok alakultak ki a 20 gyűrű bivalens kromoszóma pár mellett. A homozigóta transzlokációs vonal euploid búzával visszaeresztve 21 gyűrű bivalens alkotott a sejtosztódás során. 1BL/1RS transzlokációt hordozó vonalat keresztezett D.Nagy és Molnár-Láng (2000) *Triticale*-val, akik a PMCs-ek vizsgálata során trivalenseket és quadrivalenseket is azonosítottak, amelyek tartalmazták az 1RS rozs kromoszóma kart. Az általunk megfigyelt kromoszóma párosodási adatoknál nagyobb szórás figyelhető meg, ami a fajták eltérő genetikai hátterének eltéréseiből adódhat.

Az osztódó gyökérsúcsokból készített preparátumokon végzett genomikus *in situ* hibridizáció (GISH) után megállapítottuk, hogy az 1BL/1RS búza-rozs transzlokáció hasonló méretű volt az általunk vizsgált fajták mindegyikénél. A NOR régió és így a szatellit is jól megfigyelhető és elkülöníthető volt az 1RS rozs kromoszóma karon. A transzlokációs töréspontot minden esetben a centoméránál figyeltük meg (19. ábra). A transzlokációban szereplő 1RS rozs karon belül történhetett genetikai átrendeződés, amely GISH-el nem



mutatható ki. Eredményeink az irodalmi adatokkal összhangban állnak, számos szerző különböző búza vonalak *in situ* hibridizációs (ISH) vizsgálata alapján hasonló megfigyelést tett.



**19. ábra.** Az 1BL/1RS kromoszóma GISH után különböző martonvásári genotípusokban. A nyilak a centromérát és a NOR régiót jelzik.

Hat különböző, 1BL/1RS búza-rozs transzlokációt hordozó búza genotípust vizsgáltak Heslop-Harrison és mtsai (1990) GISH-el. Megfigyelték, hogy a beépült rozs kromoszóma kar mérete hasonló volt az egyes fajtáknál. Lapitan és mtsai (1986) eltérő genotípusok GISH elemzésénél megállapították, hogy az egyes fajták a Robertsoni transzlokáció teljes 1RS rozs kromoszóma karját hordozták.

Merker (1982) megállapítása szerint az 1RS rozs kromoszóma kar szatellitje vagy a másodlagos befűződés nem figyelhető meg a búza genomban. A normál (1BL/1RS transzlokáció nélküli) búza genotípusok négy szatellites kromoszómával rendelkeznek (1B és 6B). Számos szerző megfigyelte és a szatellittel rendelkező kromoszómák száma alapján határozta meg a transzlokáció jelenlétét különböző búza genotípusokban (Zeller 1973, Merker 1982, Berzonsky és mtsai 1991). Az általunk tapasztaltak eltérnek az irodalmi adatoktól, mivel kísérletünkben az 1RS rozs kromoszóma kar másodlagos befűződése minden vizsgált fajtánál megfigyelhető volt, ami nagy valószínűséggel az eltérő genetikai háttér következménye lehet.

Az 1BL/1RS búza-rozs transzlokációt hordozó búza fajták fehérje vizsgálata során megállapították, hogy a liszt sütőipari minőségére az 1RS rozs kromoszóma rövid karján lokalizált  $\omega$ -secalin hat a legkedvezőtlenebbül (Dhaliwal és MacRitchie 1990). Ehhez járul az  $\omega$ - és  $\gamma$  gliadinok, illetve a kismolekula-súlyú guletenin gén alegységek hiánya, amelyek az 1BS búza rövid karon lokalizáltak (Lookhart és mtsai 1991). A fent említett génszekvenciák rozs karon történő pontos elhelyezkedésének ismeretében előállíthatók olyan búza vonalak, amelyek a  $\omega$ -secalin kódoló szekvenciáját nem hordozzák (Millet és Feldman 1993). Ezen megfigyelések figyelembevételével megállapítható, hogy a transzlokáción belüli esetleges DNS szekvenciákban történt átrendeződések részletes



tanulmányozásához szükséges a búza genomba beépült rozs DNS mennyiségi meghatározása. Saját és irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a GISH - mellett, hogy a legalkalmasabb molekuláris citogenetikai módszer rozs DNS kimutatására a búza genomban - nem szolgáltat pontos információt a transzlokálódott rozs karon belül történt esetleges molekuláris szintű változásokról.

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció módszerét (FISH) alkalmazták Jiang és mtsai (1994a) észak-amerikai búza genotípusok vizsgálatához az 1AL/1RS búza-rozs transzlokáció kimutatására. Megfigyelték, hogy a fajták a teljes 1RS rozs kromoszóma kart tartalmazták. A transzlokáció jelenlétét tanulmányozták Mujeeb-Kazi és mtsai (1996) durum búza genotípusok visszakeresztett utódai között. Megállapították, hogy az 1RS rozs kromoszóma kar strukturális átrendeződés nélkül adódott át a vizsgált utódok genomjába.

Különböző DNS próbák ugyanazon kromoszómához történő hibridizációjával FISH technikával vizsgálható a kromoszóma karok DNS tartalmának átrendeződése. PCR *in situ* alkalmazásával (PCR-ISH) lehetőség nyílt low-copy DNS szekvenciák kimutatására az egyes kromoszómákon (Gosden 1997).

Wang és mtsai (1998) munkájukban biokémiai, molekuláris és citogenetikai módszerek kombinációjával tanulmányozták a búza genomjába beépült rozs DNS szakasz mennyiségét és elhelyezkedését. Megállapították, hogy az 1RS rozs kromoszóma hosszú karjának egy szegmense disztálisan transzlokálódott a búza kromoszómához. Rozs-specifikus próbával mutatták ki a rozs kromatint a búza genomban és molekuláris próbák segítségével határozták meg az interkaláris transzlokáció méretét.

A fentiek alapján megállapítható, hogy genomikus *in situ* hibridizációs vizsgálatok segítségével nem adható pontos magyarázat az általunk elemzett tizenöt 1BL/1RS búza-rozs transzlokációt hordozó genotípus közötti sütőipari minőségi érték különbségekre. A válasz így az irodalmi adatok között, illetve az egyes fajták eltérő genetikai háttérében keresendő.

Különböző sütőipari paramétereket vizsgáltak a transzlokációt stabilan örökítő és a rozs kart nem tartalmazó fajtáknál (Johnson és mtsai 1999). Megállapították, hogy a lisztminőséget negatívan befolyásoló, korábban az 1BL/1RS transzlokáció jelenlétének tulajdonított hatások egy része a transzlokációt hordozó fajták genetikai háttérének köszönhető. Martin és Carrillo (1999) kísérleteikben megfigyelték, hogy a tesztelt fajták minőségi tulajdonságai függték a genetikai háttértől.

A keresztezési programokban szereplő genotípusok milyensége nagy hatással lehet az új, búza-rozs transzlokációt hordozó fajták sütőipari paramétereire. A változatos és széles genetikai háttér, egzotikus származású vonalak felhasználása a keresztezési programokban hozzájárul új, produktív, rezisztens és jó minőségi tulajdonságokkal rendelkező fajták előállításához (Láng és Bedő 1994).





### 4.3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A búza rokonsági körébe tartozó fajok közül molekuláris citogenetikai módszerekkel elemeztük az *Aegilops cylindrica* Host. tetraploid vadbúza faj genomszerveződését. Az eltérő származási helyű *Ae. cylindrica* Host. genotípusok vizsgálata során három eltérő típusú intergenomikus transzlokációt azonosítottunk.
2. Az *Ae. cylindrica* Host. faj kromoszómáin térképeztük a pSc119, a pAs1, a pTa71 és a pTa794 DNS klónokat.
3. A Martonvásáron az őszi búza genomjában előállított búza-árpa diszómás addíciós vonalakban C-sávozással azonosítottuk a 2H, valamint a 6H árpa kromoszómákat.
4. A búza-árpa hibridekből Martonvásáron előállított öt különböző búza-árpa transzlokáció közül a centrikus fúzióban azonosítottuk a búza és az árpa kromoszóma karokat egymást követő N-sávozással és genomikus *in situ* hibridizációval. Megállapítottuk, hogy a CF a 2B búza kromoszóma hosszú karja és a 4H árpa kromoszóma rövid karja között jött létre.
5. Meghatároztuk tizenöt Martonvásáron nemesített búzafajta által hordozott 1BL/1RS búza-rozs transzlokáció méretét genomikus *in situ* hibridizációval. Megállapítottuk, hogy a transzlokáció stabil és a teljes 1RS rozs kar megtalálható az általunk vizsgált fajták genomjában.



## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

1. Öt eltérő származási helyű *Aegilops cylindrica* Host. vonal genomikus *in situ* hibridizációval végzett vizsgálata során három vonalnál intergenomikus transzlokációt azonosítottunk. A három transzlokáció különböző kromoszómákat érintett az egyes vonalak genomjában. Kialakulásuk valószínűleg az eltérő földrajzi körülményeknek, valamint a különböző mikroklímatis viszonyoknak köszönhető. A tetraploid és a hexaploid *Aegilops* fajok genomszerveződésének további részletes molekuláris citogenetikai vizsgálata feltétlenül indokolt, mivel a vadbúza fajok a búzanemesítés számára jelentős géntartalékot képeznek. Felhasználásuk csak az egyes genomok alapos ismeretében lehet igazán hatékony és pontosan nyomon követhető.
2. A búza és az árpa genomok sikeres keresztezésével lehetőség nyílik az árpa egyes kedvező tulajdonságainak átépítésére a búza genomba. Addíciós vonalak előállításával közvetlenül vihetők át agronómiailag hasznos tulajdonságokat ellenőrző gének a termesztett búza genomjába. Az addíciós vonalak a későbbiek során alkalmasak lehetnek célzott transzlokációk előállítására. Az általunk azonosított új diszómás addíciós vonalak az őszi búza genomban tartalmazzák az árpa kromoszómákat. Tervezzük további árpa kromoszóma párokat hordozó addíciós vonalak kiválogatását, amelyhez molekuláris citogenetikai módszereket használunk fel. Vizsgálni kívánjuk a közeljövőben az addicionált árpa kromoszómákon lokalizált gének expresszióját a búza genomjában, valamint hatásukat a búza egyes morfológiai és agronómiai tulajdonságaira.
3. A Martonvásáron előállított búza-árpa hibridek szövettanyészetben regenerált utódainál transzlokációk kialakulását figyeltük meg. A kompenzáló transzlokációk lehetővé teszik a búza és az árpa kromoszómák közti homeológia tanulmányozását. A későbbiekben a még általunk nem azonosított transzlokációk részletes vizsgálatát specifikus DNS markerek felhasználásával végezzük. Megkezdtük mikroszatellit markerek alkalmazását, illetve különböző, az árpa genomból származó specifikus DNS próbák térképezését a transzlokációt hordozó kromoszómákon. Vizsgálni kívánjuk a transzlokálódott árpa kromoszóma szegmentumok hatását a búza agronómiai tulajdonságaira. A transzlokációk az árpa fizikai térképezésében is felhasználhatók. Tervezzük további új transzlokációk előállítását azzal a céllal, hogy az árpa genomból hasznos tulajdonságokat (pl. koraiság) építsünk be a búza genomjába.
4. Az IBL/IRS búza-rozs transzlokációt tartalmazó martonvásári búza fajták genomikus *in situ* hibridizációval történt vizsgálata során megállapítottuk, hogy a fajták mindegyike hordozza a teljes IRS rozs kart. A liszt sütőipari minőségi tulajdonságait kedvezőtlenül befolyásoló  $\omega$ -secalin allél valószínűleg továbbra is jelen van az általunk vizsgált genotípusok kromoszóma készletében. Az egyes fajták eltérő sütőipari minősége a genetikai háttér variabilitása következtében alakult ki, illetve lehetséges, hogy az IRS rozs kromoszóma karon intragenomikus átrendeződés következett be. Molekuláris citogenetikai módszerekkel (FISH) faj- és kromoszóma specifikus DNS klónok térképezhetők a transzlokációs kromoszómán. Az egyes DNS próbák specifikus

elhelyezkedése alapján az esetleges kromozómán belül történt átrendeződések is kimutathatók és pontosan nyomonkövethetőek.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A búzatermesztés hazánkban meghatározó jelentőségű. A *Triticeae* törzsbe tartozó növényfajok hatalmas géntartalékot képviselnek, amelyek a növénynevelésben felhasználhatók. A termesztett búza rokonsági köréhez tartozó fajok a búzával jól keresztezhetők, így a kedvező agronómiai tulajdonságokért felelős géneket hordozó alapanyagok a növénynevelés számára fajkeresztezésekkel előállíthatók. Különböző molekuláris citogenetikai módszerek alkalmazása lehetővé teszi az utódnemzedékek genomjában a beépült kromoszómák és kromoszóma szegmentumok kimutatását és pontos nyomkövetését.

A poliploid vadbúza fajok genomfelépítésének részletes molekuláris citogenetikai tanulmányozása lehetővé teszi, hogy az agronómiailag hasznos gének, gén csoportok irányítottan és hatékonyan épüljenek be a búza genomjába. Meghatároztuk az *Aegilops cylindrica* Host. tetraploid faj genomorganizációját molekuláris citogenetikai módszerek (GISH, FISH) felhasználásával és a faj egyes vizsgált vonalainál intergenomikus transzlokációkat figyeltünk meg.

A búza és az árpa két fontos gabonafélének, amelyek hibridizálása új lehetőségeket teremthet a növénynevelés számára. Megfelelő technikák alkalmazásával a búza és az árpa genom kis gyakorisággal keresztezhető.

A szövettanilag regenerált hibridek utódainál a két genom kromoszómái között kialakult transzlokációk figyelhetők meg. Az előállított utódok sorozatos visszakeresztezésével különböző árpa kromoszómákat tartalmazó addíciós sorozatok hozhatók létre a búza genomjában.

A Martonvásáron előállított öt különböző búza-árpa transzlokációt egymást követő N-sávozással és GISH-el elemeztük. Megállapítottuk, hogy a centrikus fúzióban a 2B búza kromoszóma hosszú, és a 4H árpa kromoszóma rövid karja között jött létre transzlokáció. A többi transzlokációban az árpa kromoszóma szegmentumok nem hordoztak jellegzetes N-sávokat, ezért azonosításukhoz további molekuláris genetikai módszerek alkalmazása szükséges.

Az őszi búza genomjában előállított árpa diszómás addíciós vonalakban az árpa kromoszómákat Giemsa C-sávozással azonosítottuk (2H, 6H).

Magyarországon a köztermesztésben lévő búzafajták nagy százaléka hordozza az 1BL/1RS búza-rozs transzlokációt, amely kedvező agronómiai tulajdonságokért felelős génkomplexumot tartalmaz, de rontja a liszt sütőipari minőségét. A liszt sütőipari minőségi tulajdonságait kedvezőtlenül befolyásoló génlokusz kiiktatásával és a hasznos tulajdonságok megtartásával felmerül a lehetősége új genetikai alapanyagok előállításának.

Eltérő sütőipari tulajdonságokkal rendelkező martonvásári nemesítésű búzafajták molekuláris citogenetikai vizsgálata során megállapítottuk, hogy az egyes genotípusok a teljes 1RS rozs kart hordozták. Az elemzett fajták liszt minőségbeli eltérései valószínűleg a fajták különböző genetikai hátterének következményei.

## SUMMARY

Wheat production has a decisive role in Hungarian agriculture. Related species of wheat represent a great reservoir of useful traits that can be exploited for wheat improvement.

Wild wheats can be successfully crossed with bread wheat and the most favourable traits can be transferred to the wheat genome. The utilization of different molecular cytogenetic methods makes it possible to detect and follow the alien DNA in a wheat background.

Studies on the genome organization of polyploid wild wheats make the controlled and efficient transfer of useful agronomical traits to the wheat genome possible.

The standard karyotype of tetraploid *Aegilops cylindrica* Host. has been determined using molecular cytogenetic techniques (GISH, FISH) and intergenomic translocations among the investigated lines of *Ae. cylindrica* have been detected.

Wheat and barley are both important crops in Hungary. Hybridization between these two species opens up new possibilities for plant breeders. Testing different barley varieties with molecular genetic methods could help to select the best genotypes for wheat-barley crosses.

Using appropriate techniques, hybridization between the wheat and barley genomes is possible. Plants regenerated from tissue culture may carry translocations between wheat and barley chromosomes. Backcrosses of the progenies of wheat-barley hybrids are suitable for selecting barley disomic addition lines.

Sequential N-banding GISH technique was used to analyse five different wheat-barley translocations produced in Martonvásár and a 4HS-2BL barley-wheat centric fusion was detected. Due to the lack of specific bands the other translocations need further analysis using various molecular methods to identify the wheat and barley chromosomes involved in the translocations.

New 2H and 6H barley disomic addition lines in a winter wheat genome have been successfully identified using Giemsa C-banding technique.

A high percentage of the wheat varieties in Hungary carry the 1BL/1RS wheat-rye translocation. The translocation is responsible for useful agronomical traits but has a negative impact on flour quality. The development of wheat lines carrying this useful gene complex but without the negative agronomical traits could be beneficial for wheat breeding. Using molecular cytogenetic method it has been established that fifteen Martonvásár wheat varieties with different flour quality parameters carry the whole 1BL/1RS wheat-rye translocation. The differences between the flour quality parameters probably originate from the diverse backgrounds of the varieties.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Appels, R., Gerlach, W.L., Dennis, E.S., Swift, H., Peacock, W.J. 1980.** Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* 78: 293-311.
- Armstrong, K.C., Nakamura, C., Keller, W. A. 1983.** Karyotype instability in tissue culture regenerants of triticale ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack) cv. Welsh from 6-month old callus cultures. *Z. Pflanzenzuchtg* 91:233-245.
- Badaeva, E.D., Jiang, J., Gill, B.S. 1995.** Detection of intergenomic translocations with centromeric and noncentromeric breakpoints in *Triticum araraticum*: mechanism of origin and adaptive significance. *Genome* 38:5, 976-981.
- Badaeva, E.D., Friebe, B., Gill, B.S. 1996a.** Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome* 39:293-306.
- Badaeva, E.D., Friebe, B., Gill, B.S. 1996b.** Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18.26S ribosomal RNA gene families in diploid species. *Genome* 39:1150-1158.
- Banks, P.M., Larkin, P.J., Bariana, H.S., Lagudah, E.S., Appels, R., Waterhouse, P.M., Brettell, R.I.S., Chen, X., Xu, H.J., Xin, Z.Y., Qian, Y.T., Zhou, X.M., Cheng, X.M., Zhou, G.H. 1995.** The use of cell culture for subchromosomal introgression of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Genome* 38:395-405.
- Barclay, I.R. 1975.** High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature (London)* 256:410-411.
- Bartos, P. and Bares, I. 1971.** Leaf and stem rust resistance of hexaploid wheat cultivars 'Salzmünder Bartweizen' and 'Weique'. *Euphytica* 20:435-440.
- Belostotsky, D.A., Ananiev, E.V. 1990.** Characterization of relic DNA from barley genome. *Theor. Appl. Genet.* 80:374-380.
- Bedbrook, J.R., Jones, J., O'Dell, M., Thompson, R.J., Flavell, R.B. 1980.** A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* 19:545-560.
- Bedő, Z., Balla, L., Szunics, L., Láng, L., Kramarikné, Kissimon J. 1993.** A martonvásári 1B/1R transzlokációs búzafajták agronómiai tulajdonságai. *Növénytermelés* 42:391-398.
- Berzonsky, W.A., Clements, R.L., Lafever, H.N. 1991.** Identification of "Amigo" and "Kavkaz" translocations in Ohio soft red winter wheats (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 81:629-634.
- Berzonsky, W.A., Francki, M.G. 1999.** Biochemical, molecular and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat: a review. *Euphytica* 108:1, 1-19.
- Boggini, G., Tusa, P., Sivestro, S di, Pogna, N.E., di Sivestro, S. 1998.** Agronomical and quality characteristics of durum wheat lines containing the 1BL/1RS translocation. *Journal of Genetics and Breeding* 52:2, 167-172.
- Bullrich, L., Tranquilli, G., Pfluger, L.A., Suarez, E.Y., Barneix, A.J. 1998.** Bread making quality and yield performance of 1BL/1RS wheat isogenic lines. *Plant Breeding* 117: 119-122.

- Busch, W., Herrmann, R.G., Martin, R. 1995.** Refined physical mapping of the *Sec1* locus on the satellite of the chromosome 1R of rye (*Secale cereale*). *Genome* 38:889-893.
- Burkholder, G.D. 1988.** The analysis of chromosome organization by experimental manipulation. In: Gustafson J.P., Appels R. (eds) *Chromosome structure and function. Impact of new concepts.* Plenum Press, New York, London, pp 1-52.
- Buys, C.H.C.M., Osinga, J. 1982.** A relation between G-, C-, and N-banding patterns as revealed by progressive oxidation of chromosomes and a note of the nature of N-bands. *Genetica* 58:3-9.
- Cermeno, M.C., Orellana, J., Santos, J.L., Lacadena, J.R. 1984.** Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops*. *Heredity* 53:603-611.
- Chennaveeraiah, M.S. 1960.** Karyomorphologic and cytotaxonomic studies in *Aegilops*. *Acta Horti. Gotob.* 23:85-178.
- Cox, T.S., Raupp, W.J., Wilson, D.L., Gill, B.S., Leath, S., Bockus, W.W., Browder, L.E. 1992.** Resistance to foliar diseases in a collection of *Triticum tauschii* germplasm. *Plant Disease* 76:1061-1064.
- Devos, K.M., Atkinson, M.D., Chinoy, C.N., Francis, H.A., Harcourt, R.L., Koebner, R.M.D., Liu, C.J., Masojc, Xie, D.X., Gale, M.D. 1993.** Chromosome rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 85:673-689.
- Dhaliwal, A.S., Mares, D.J., Marshall, D.R., Skeritt, J.H. 1988.** Protein composition and pentosan content in relation to dough stickiness of 1B/1R translocation wheats. *Cereal Chemistry* 62:143-149.
- Dhaliwal, A.S., Friebe, B., Gill, K.S., Gill, B.S. 1990.** Cytogenetic identification of *Aegilops squarrosa* chromosome additions in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 79:6, 769-774.
- Dhaliwal, A.S., MacRitchie, F. 1990.** Contributions of protein fractions to dough handling properties of wheat-rye translocation cultivars. *J. Cereal Sci.* 12:113-122.
- D. Nagy, E., Molnár-Láng, M. 2000.** Frequency of pairing between the 1B/1R translocation and its respective homo(eo)logues in a wheat-rye hybrid as revealed by GISH. *Cereal Res. Comm.* 28, 1-2:41-48.
- Dubcovsky, J., Dvorak, J. 1994.** Genome origin of *Triticum cylindricum*, *Triticum triunciale*, and *Triticum ventricosum* (Poaceae) inferred from variation in repeated nucleotide sequences: A methodological study. *Am. J. Bot.* 81:1327-1335.
- Dudits, D., Heszky, L. 2000.** Növényi biotechnológia és géntechnológia. *Agroinform Kiadóház Rt. Budapest*, pp 312.
- Dudits, D., Heszky, L. 1990.** Növénybiotechnológia. *Mg. Kiadó, Budapest*, pp 310.
- Endo, T.R., Gill, B.S. 1984.** Somatic karyotype, heterochromatin distribution, and nature of chromosome differentiation of common wheat, *Triticum aestivum* L. em Thell. *Chromosoma* 89:361-369.
- Endo, T.R. 1988.** Induction of chromosomal structural changes by a chromosome of *Aegilops cylindrica* L. in common wheat. *J. Hered.* 79:366-370.
- Endo, T.R. 1990.** Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Jpn. J. Genet.* 65:135-152.
- Endo, T.R. 1996.** Allocation of a gametocidal chromosome of *Aegilops cylindrica* to wheat homoeologous group 2. *Genes Genet. Syst.* 71:243-246.

- Endo, T.R., Shi., F., Tsvetko, K.S. 1998.** Genetic induction of chromosomal structural changes of alien chromosomes in common wheat. In: A.E. Slinkard (ed) Proc. 9<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp. Saskatoon, Canada 2:40-43.
- Fedak, G. 1980.** Production, morphology and meiosis of reciprocal barley-wheat hybrids. Can. J. Genet. Cytol. 22:117-123.
- Feldman, M. 1988.** Cytogenetic and molecular approaches to alien gene transfer in wheat. Proc. 7<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge, England.
- Friebe, B., Heun, M., Bushuk, W. 1989.** Cytological characterization, powdery mildew resistance and storage protein composition of tetraploid and hexaploid 1BL/1RS wheat-rye translocation lines. Theor. Appl. Genet. 78:3, 425-432.
- Friebe, B., Schubert, V., Blüthner, W.D., Hammer, K. 1992b.** C-banding pattern and polymorphism of *Aegilops caudata* and chromosomal constitutions of the amphiploid *T. aestivum*-*Ae. caudata* and six derived chromosome addition lines. Theor. Appl. Genet. 83: 589-596.
- Friebe, B., Jiang, J., Tuleen, N.A., Gill, B.S. 1995c.** Standard karyotype of *Triticum umbellulatum* and the identification of *T. umbellulatum* chromatin in common wheat. Theor. Appl. Genet. 90:150-156.
- Friebe, B., Gill, B.S. 1996.** Chromosome banding and genome analysis in diploid and cultivated polyploid wheats. In: Methods of genome analysis in plants. P.P. Jahuar (ed) CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo. pp 271-299.
- 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 91:59-87.
- Friebe, B., Tuleen, N.A., Badaeva, E.D., Gill, B.S. 1996c.** Cytogenetic identification of *Triticum peregrinum* chromosomes added to common wheat. Theor. Appl. Genet. 39:272-276.
- Friebe, B., Tuleen, N.A., Gill, B.S. 1999.** Development and identification of a complete set of *Triticum aestivum*-*Aegilops geniculata* chromosome addition lines. Genome 42:374-380.
- Froidmont, D de., De Froidmont, D. 1998.** A co-dominant marker for the 1BL/1RS wheat-rye translocation via multiplex PCR. Journal of Cereal Science 27:3, 229-232.
- Gerlach, W.L. 1977.** N-banded karyotypes of wheat species. Chromosoma (Berl.) 62:49-56.
- Gerlach, W.L., Bedbrook, J.R. 1979.** Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic. Acids. Res. 7:1869-1885.
- Gerlach, W.L., Dyer, T.A. 1980.** Sequence organization of the repeat units in the nucleus of wheat which contains 5S rRNA genes. Nucleic. Acids. Res. 8:4851-4865.
- Gill, B.S., Kimber, G. 1974.** Giemsa C-banding and the evolution of wheat. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 71:4086-4090.
- Gill, B.S., Raupp, W.J., Sharma, H.C., Browder, L.E., Hatchett, J.H., Harvey, T.L., Moseman, J.G. 1986.** Resistance in *Aegilops squarrosa* to wheat leaf rust, wheat powdery mildew, greenbug, and Hessian fly. Plant Disease 70:553-556.
- Gill, B.S. 1987.** Chromosome banding methods, standard chromosome band nomenclature, and applications in cytogenetic analysis. In: Heyne E.G (ed) Wheat and wheat improvement. 2<sup>nd</sup>. Edn. Am. Soc. Agron., Madison WI, pp 243-254.
- 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* L.). Genome 34:830-839.

**Gosden, J.R. 1997.** PRINS and *in situ* PCR protocols. Humana Press, New Jersey, USA  
**Graybosch, R.A., Peterson, C.J., Hansen, L.E., Mattern, P.J. 1990.** Relationships between protein solubility characteristics, 1BL/1RS, high molecular weight glutenin composition, and end-use quality in winter wheat germ plasm. Cereal Chemistry 67:4, 342-349.

**Gupta, R.B., Shepherd, K.W. 1990.** Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. Theor. Appl. Genet. 80:1, 65-74.

**Hadlaczky, Gy., Belea, A. 1975.** C-banding in wheat evolutionary. Plant Sci. Lett. 4:85-88.

**Heslop-Harrison, J.S., Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Anamthawat-Jonsson, K. 1990.** Detection and characterization of 1B/1R translocations in hexaploid wheat. Heredity 65:3, 385-392.

**Heszky, L. 1972.** A new artificial hybrid of species from the genera *Festuca* and *Lolium* (*Festuca pratensis* Huds. × *Lolium temulentum* L.). Acta Agr. Acad. Sci. Hung. 21:3-4, 363-368.

**Heun, M., Fischbeck, G. 1987.** Identification of wheat powdery mildew resistance genes by analysing host-pathogen interactions. Plant Breeding 98:124-129.

**Howes, N.K., Lukow, O.M., Dawood, M.R., Bushuk, W. 1989.** Rapid detection of the 1BL/1RS chromosome translocation in hexaploid wheats by monoclonal antibodies. Journal of Cereal Science 10:1, 1-4.

**Hu, C., Wang, P. 1986.** Embryo culture: Technique and application. In: Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. (eds) Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 4. Techniques and Applications. MacMillan Pub. Comp. New York, 41-96.

**Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W., Sparrow, D.H.W. 1975.** Addition of individual barley chromosomes to wheat. In: Proc. Int. Barley Genet. Symp. Garching, W.Germ. pp 260-270.

**Islam, A.K.M.R. 1980.** Identification of wheat-barley addition lines with N-banding of chromosomes. Chromosoma 76:365-373.

**Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W., Sparrow, D.H.W. 1981.** Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. Heredity 46:161-174.

**Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1988.** Induced pairing between wheat and barley chromosomes. In: T.E. Miller & R.M.D. Koebner (eds) Proc. 7<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge England, pp 309-314.

**Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1990.** Incorporation of barley chromosomes into wheat. Biotechn. in Agr. And Forestry, Vol. 13. Wheat (ed Y.P.S. Bajaj)

**Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1991.** Alien genetic variation in wheat improvement. In: P.K. Gupta & T. Tsuchiya (eds) Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, Part A, Elsevier Publ. NY, USA. pp 291-312.

**Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1992.** Production of wheat-barley recombinant chromosomes through induced homoeologous pairing. I. Isolation of recombinants involving barley arms 3HL and 6HL. Theor. Appl. Genet. 83:489-494.

**Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 2000.** Isolation of a fertile wheat-barley addition line carrying the entire barley chromosome 1H. Euphytica 111:2, 145-149.

**Jaaska, V. 1981.** Aspartate aminotransferase and alcohol dehydrogenase isoenzymes:

Intraspecific differentiation in *Aegilops tauschii* and the origin of the D genome polyploids in the wheat group. *Plant Syst. Evol.* 137:259-273.

**Javornik, B., Sinkovic, T., Vapa, L., Koebner, R.M.D., Rogers, W.J. 1991.** A comparison of methods for identifying and surveying the presence of 1BL/1RS translocations in bread wheat. *Euphytica* 54:1, 45-53.

**Jellen, E.N., Gill, B.S., Cox, T.S. 1994.** Genomic *in situ* hybridization differentiates between A/D and C-genomes chromatin detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus *Avena*). *Genome* 37:4, 613-618.

**Jiang, J., Gill, B.S. 1993.** Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis. *Genome* 36:792-795.

**Jiang, J., Gill, B.S. 1994.** New 18.26S ribosomal RNA gene loci: Chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. *Chromosoma* 103:179-185.

**Jiang, J., Friebe, B., Gill, B.S. 1994a.** Chromosome painting of Amigo wheat. *Theor. Appl. Genet.* 89:811-813.

**Jiang, J., Friebe, B., Gill, B.S. 1994b.** Recent advances of alien gene transfer in wheat. *Euphytica* 73:199-212.

**Jiang, J., Gill, B.S. 1994d.** Different species specific translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Res.* 2:59-64.

**Johnson, J.M., Griffey, C.A., Harris, C.H. 1999.** Comparative effects of 1BL/1RS translocation in relation to protein composition and milling and baking quality of soft red winter wheat. *Cereal Chemistry* 76:4, 467-472.

**Jouve, N., Bernardo, A., Cuadrado, A., De Bustos, A., Rubino, P., Soler, C. 1998.** Detection of alien introgression into cultivated cereals using cytogenetic and molecular techniques. In: T. Lelley (ed) *Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement*. WUV-Univ.-Verl. Austria, pp 33-42.

**Kakeda, K., Fukui, K., Yamagata, H. 1991.** Heterocromatic differentiation in barley chromosomes revealed by C- and N-banding techniques. *Theor. Appl. Genet.* 81:144-150.

**Kattermann, G. 1937.** Zur Cytologie halmbehaarter Stämme aus Weizenroggen bastardierung. *Züchter* 9:196-199.

**Kihara, H. 1931.** Genomalyse bei *Triticum* and *Aegilops*. II. *Aegilotriticum* and *Aegilops cylindrica*. *Cytologia* 2:106-156.

**Kiss, Á., Rajháthy, T. 1956.** Untersuchungen über die Kreuzbarkeit innerhalb des Subtribus *Triticinae*. *Züchter* 26:4-5, 127-136.

**Koba, T., Handa, T., Shimada, T. 1991.** Efficient production of wheat-barley hybrids and preferential elimination of barley chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 81:285-292.

**Koba, T., Takumi, S., Shimada, T. 1997.** Isolation, identification and characterization of disomic and translocated barley chromosome addition lines of common wheat. *Euphytica* 96:289-296.

**Koelrauter, Y.G. 1760.** *Klasz. D. exact. Wiss. Leipzig* XII. c.

**Kruse, A. 1973.** *Hordeum* × *Triticum* hybrids. *Hereditas* 73:157-161.

**Kump, B., Sinkovic, T., Javornik, B. 1995.** Identification of 1BL/1RS wheat-rye translocation by N-banding. *Zbornik Biotechn. Fakultete Univ. v Ljubljani, Kmetijstvo* No.65, 19-24.

- Lapitan, N.L.V., Sears, R.G., Gill, B.S. 1984.** Translocations and other karyotypic structural changes in wheat×rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 68:547-554.
- Lapitan, N.L.V., Sears, R.G., Rayburn, A.L., Gill, B.S. 1986.** Wheat-rye translocations. Detection of chromosome breakpoints by *in situ* hybridization with a biotin-labeled DNA probe. *J. Heredity* 77:415-419.
- Lapitan, N.L.V., Brown, S.E., Kennard, W., Stephens, J.L., Knudson, D.L. 1997.** FISH physical mapping with barley BAC clones. *Plant J.* 11:149-156.
- Larkin, P.J., Scowcroft, W.R. 1981.** Somaclonal variation - A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-204.
- Laurie, D.A., Bennett, M.D. 1988.** The production of haploid wheat plants from wheat×maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 76:393-397.
- Láng, L., Bedő, Z. 1994.** Genetic background of the Martonvásár wheat breeding programme. Evaluation and Exploitation of Genetic Resources Pre-Breeding. Proc. of the Genetic Resources Meeting of Eucarpia, 15-18 March 1994, Clermont-Ferrand, France pp. 117-122.
- 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 Mol. Biol. Rep.* 7: 150-158.
- Li, H., Chen, X., Xin, Z.Y., Ma, Y.Z., Xu, H.J. 1999.** Development and identification of wheat-*Haynaldia villosa* 6DL/6VS translocation lines with powdery mildew resistance. *Scientia Agr. Sinica*, 32:5, 9-15.
- Linares, C., Irigoyen, M.L., Fominaya, A. 2000.** Identification of C-genom chromosomes involved intergenomic translocations in *Avena sativa* L., using cloned repetitive DNA sequences. *Theor. Appl. Genet.* 100:3-4, 353-360.
- Linc, G., Friebe, B., Kynast, R., Molnár-Láng, M., Kőszegi, B., Sutka, J., Gill, B.S. 1999.** Molecular cytogenetic analysis of *Aegilops cylindrica* Host. *Genome* 42:497-503.
- Linde-Larsen, I. 1975.** Giemsa C-banding of the chromosomes of 'Emir' barley. *Hereditas* 81:285-289.
- Linde-Larsen, I. 1981.** Giemsa banding patterns of cultivated and wild barleys. In: *Barley Genetics IV.* (eds M.J.C. Asher, R.P. Ellis, A.M. Hayter and R.N.H. Whitehouse), Edinburgh University Press Edinburgh, pp 786-795.
- Linde-Larsen, I. 1985.** Cytology and cytogenetics of *Hordeum vulgare* and some allied species using chromosome banding techniques. Den. Kgl. Veterinaer og Landbohøjskole, Copenhagen, Denmark
- Linde-Larsen, I. 1992.** Relationships in the genus *Hordeum*: Giemsa C-banded karyotypes. *Hereditas* 116:111-116.
- Linde-Larsen, I., Heslop-Harrison, J.S., Shepherd, K.W., Taketa, S., Burnham, C.R., Hagberg, A. 1997.** The barley genome and its relationship with the wheat genome. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas-Landskrona.* 126:1, 1.16.
- Lookhart, G.L., Graybosch, R., Peterson, J., Lukaszewski, A. 1991.** Identification of wheat lines containing the 1BL/1RS translocation by high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry* 68:3, 312-316.
- Lookhart, G.L., Bean, S.R., Graybosch, R., Chung, O.K., Morena-Sevilla, B.,**

- Baenzinger, S. 1996.** Identification by high-performance capillary electrophoresis of wheat lines containing the 1AL/1RS and the 1BL/1RS translocation. *Cereal Chemistry* 73:5, 547-550.
- Lukaszewski, A.J. 1993.** Reconstruction in wheat of complete chromosomes 1B and 1R from the 1RS/1BL translocation of Kavkaz origin. *Genome* 36:821-824.
- Martin, P., Carrillo, J.M. 1999.** Cumulative and interaction effects of prolamin allelic variation and of 1BL/1RS translocation on flour quality in bread wheat. *Euphytica* 108:1, 29-39.
- Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., Tanzarella, O.A., Porceddu, E. 1992.** Electrophoretic and molecular analysis of alpha-gliadins in *Aegilops* species (Poaceae) belonging to the D genome cluster and their putative progenitors. *Plant Syst. Evol.* 179:115-128.
- McGuire, P.E., Qualset, C.O. 1990.** Transfer of the *yd2* barley yellow dwarf virus resistance gene from barley to wheat. In: Burnett P.A. (ed) *World perspectives on barley yellow dwarf*. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico pp 476-481.
- Merker, A. 1982.** 'Veery'- a CIMMYT spring wheat with the 1B/1R chromosome translocation. *Cereal Res. Commun.* 10:105-106.
- Millet, E., Feldman, M. 1993.** Deletion of secalin gene *Sec1* in 1BL/1RS line by  $\gamma$ -irradiation. 8<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp. Beijing China, pp 851-854.
- Mochizuki, A. 1963.** *Agropyron* addition lines of durum wheat. *Wheat Information Service* nos 15-16, pp 50-53.
- Molnár-Láng, M., Sutka, J., Barnabás, B., Sági, L., Belea, A. 1985.** Árpa (*Hordeum vulgare* L.)×búza (*Triticum aestivum* L.) hibrid előállítás. *Növénytermelés* 34:4, 257-261.
- Molnár-Láng, M., Galiba, G., Kovács, G., Sutka, J. 1991.** Changes in the fertility and meiotic behaviour of barley (*Hordeum vulgare*)×wheat (*Triticum aestivum*) hybrids regenerated from tissue cultures. *Genome* 34:261-266.
- 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.
- Molnár-Láng, M., Linc, G., Sutka, J. 1996.** Transfer of the recessive crossability allele *kr<sub>1</sub>* from Chinese Spring into the winter wheat variety Martonvásár 9. *Euphytica* 90:301-305.
- 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.
- Molnár-Láng, M., Linc, G., Friebe, B., Sutka, J. 2000.** Detection of wheat-barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro*. *Euphytica* 112: 119-123.
- Mujeeb-Kazi, A., William, M.D.H.M., Islam-Faridi, M.N. 1996.** Homozygous 1B and 1BL/1RS chromosome substitutions in *Triticum aestivum* and *T. turgidum* cultivars. *Cytologia* 61:147-154.
- Mukai, Y., Endo, T.R., Gill, B.S. 1990.** Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J. Hered.* 81: 290-295.
- Mukai, Y., Gill, B.S. 1991.** Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. *Genome* 34:448-452.
- Mukai, Y., Friebe, B., Hatchett, J.H., Yamamoto, M., Gill, B.S. 1993.** Molecular cytogenetic analysis of radiation-induced wheat-rye terminal and intercalary chromosomal

translocations and the detection of rye chromatin specifying resistance to Hessian fly. *Chromosoma* 102:88-95.

**Naranjo, T. 1995.** Chromosome structure of *Triticum longissimum* relative to wheat. *Theor. Appl. Genet.* 91:105-109.

**Noda, K., Kasha, K.J. 1976.** Barley chromosome identification with the C-banding Giemsa stain technique. *Barley Genet. Newsl.* 6:47-50.

**O'Mara, J.G. 1940.** Cytogenetic studies on *Triticeae*. I. A method for determining the effects of individual *Secale* chromosomes on *Triticum*. *Genetics* 25:401-408.

**O'Mara, J.G. 1947.** The substitution of a specific *Secale cereale* chromosome for a specific *Triticum aestivum* chromosome. *Genetics* 32:99-100.

**Pathak, G.N. 1940.** Studies in the cytology of cereals. *J. Genet.* 39:437-467.

**Pickering, R.A., Hill, A.M., Kynast, R.G. 1997.** Characterization by RFLP analysis and genomic *in situ* hybridization of a recombinant and a monosomic substitution plant derived from *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. crosses. *Genome* 40:195-200.

**Rabinovich, S.V. 1998.** Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. *Euphytica* 100:323-340.

**Rajaram, S., Mann, C.E., Ortis Ferrera, G., Mujeeb-Kazi, A. 1983.** Adaptation, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheats. In: Sakamoto, S. (ed) *Proc 6<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp.* Kyoto Japan pp 613-621.

**Rayburn, A.L., Gill, B.S. 1985.** Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J. Hered.* 76:78-81.

**Rayburn, A.L., Gill, B.S. 1986a.** Isolation of a D genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 4:102-109.

**Rayburn, A.L., Gill, B.S. 1986b.** Molecular identification of the D-genome of wheat. *J. Hered.* 77:253-255.

**Reader, S.M., Abbo, S., Purdie, K.A., King, I.P., Miller, T.E. 1994.** Direct labelling of plant chromosomes by rapid *in situ* hybridization. *Trends. Genet.* 10:265-266.

**Schlegel, R., Korzun, V. 1997.** About the origin of 1RS/1BL wheat-rye chromosome translocations from Germany. *Plant Breeding* 116:6, 537-540.

**Schmidt, J.C., Schubert, V., Blüthner, W.D. 1993.** Use of isozymes to characterize *Triticum aestivum*-*Aegilops markgrafii* addition lines. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 188:385-392.

**Schubert, I., Shi, F., Fuchs, J., Endo, T.R. 1998.** An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *The Plant Journal* 14:4, 489-495.

**Schwarzacher, T., Ananthawat-Jonson, K., Harrison, G.E., Islam, A.K.M.R., Jia, Z.Z., King, I.P., Leitch, A.R., Miller, T.E., Reader, S.M., Rogers, W.J., Shi, M., Heslop-Harrison, J.S. 1992.** Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84:778-786.

**Sears, E.R. 1952a.** Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma* 4:535-550.

**Sears, E.R. 1956.** The transfer of leaf-rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symp. Biol.* 9:1-22.

**Sebesta, E.E., Wood, E.A. 1978.** Transfer of greenbug resistance from rye to wheat with X-rays. *Agr. Abstr.* 70:61-62.

**Sharma, H.C., Gill, B.S. 1983.** Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica* 32: 17-31.

**Sharp, P.J., Kris, M., Shewny, P.R., Gale, M.D. 1988.** Location of  $\beta$ -amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor. Appl. Genet.* 75:286-290.

**Shepherd, K., Islam, A.K.M.R. 1988.** Fourth compendium of wheat-alien chromosome lines. In: *Proc. 7<sup>th</sup> Intl. Wheat Genet. Symp.* pp 1373-1398. Institute of Plant Science Research, Cambridge.

**Shi, Y.S., Li, H.J., Guo, B.H., Zhang, Y.M., Wang, Z.N., Wen, Z.Y. 1999.** Identification of 1B/1R translocation in wheat background by fluorescent *in situ* hybridization. *Acta Agric. Boreali Sinica* 14:1, 18-21.

**Shimada, T., Koba, T., Otani, M., Niizeki, H. 1987.** Morphology, meiosis, and *in vitro* propagation of barley-wheat hybrids. In: *Barley Genetics V, Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Barley Genet. Symp.* pp 343-350. Research Inst. For Bioresources, Okayama Univ. Kurashiki

**Singh, R.J., Tsuchiya, T. 1982a.** An improved Giemsa N-banding technique for the identification of barley chromosomes. *J. Hered.* 73:227-229.

**Thomas, J.B., Mujeeb-Kazi, A., Rodriguez, R., Bates, L.S. 1977.** Barley $\times$ wheat hybrids. *Cereal Res. Comm.* 5:181-188.

**Tsunewaki, K. 1996.** Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis. In: *Methods of genome analysis in plants.* Edited by P.P. Jahuar. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo. pp 71-299.

**Yang, Y.C., Tuleen, N.A., Hart, G.E. 1996.** Isolation and identification of *Triticum aestivum* L. em. Thell. Cv. Chinese Spring-*T. peregrinum* Hackel disomic chromosome addition lines. *Theor. Appl. Genet.* 92:591-598.

**Van Slageren, M.V. 1994.** Wild wheats: A monograph of *Aegilops* L., and *Ambylopyrum* (Jaub&Spach) Eig (Poaceae). Wageningen Agr. Univ. Papers 94-7. Joint Publication of ICARDA, Aleppo, Syria and Herbarium Vadense, Dept. of Plant Taxonomy, Wageningen Univ. The Netherlands

**Wang, E., Xing, H., Wen, Y., Zhou, W., Wei, R., Han, H. 1998.** Molecular and biochemical characterization of a non-Robertsonian wheat-rye chromosome translocation line. *Crop Sci.* 38:1076-1080.

**Zeller, F.J. 1973.** 1B/1R wheat-rye chromosome substitutions and translocations. pp 209-221. In: E.R. Sears & L.M.S. Sears (eds) *Proc. 4<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp.* Univ. of Missouri, Columbia USA.

**Zeller, F.J., Günzel, G., Fischbek, G., Gersternkorn, P., Weipert, D. 1982.** Veränderungen der Backeigenschaften des Weizens durch die Weizen-Roggen-Chromosomen Translokation 1B/1R. *Getreide, Mehl und Brot* 36: 141-143.

**Zeller, F.J., Fuchs, E. 1983.** Cytologie und Krankheitsresistenz einer 1A/1R und 1B/1R Weizen-Roggen-Translokationsorten. *Z. Pflanzenzüchtg.* 90:285-296.

**Zenkter, M., Nitzsche, W. 1984.** Wide hybridization experiments in cereals. *Theor. Appl. Genet.* 68:311-315.





## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm intézetünk igazgatójának, Dr. Bedő Zoltánnak, hogy lehetővé tette számomra dolgozatom elkészítését a Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézetében, Martonvásáron.

Köszönettel tartozom Dr. Sutka Józsefnek, a Genetikai Osztály tudományos osztályvezetőjének és Dr. Heszky László akadémikusnak, Ph.D. programvezetőmnek (Szent István Egyetem, Gödöllő) éveken át nyújtott megtisztelő támogatásukért és szakmai segítségükért.

Hálás köszönet illeti szakmai irányítómat és témavezetőmet Dr. Lángné Dr. Molnár Márta tudományos főmunkatársat, aki végig figyelemmel kísérte és mindig helyes irányba terelte munkámat.

Külön köszönettel tartozom Dr. Bernd Friebe professzornak (Kansas State University, Manhattan, KS, USA) támogatásáért és önzetlen barátságáért.

Munkámhoz folyamatos technikai segítséget nyújtottak Bucsi Istvánné és Havasi Józsefné technikusok, hálásan köszönöm nekik.

Megkülönböztetett köszönet szeretteim és barátaim megértéséért és végtelen türelméért.