

OTKA zárójelentés T 043502

A pályázat célja idegen fajú kromoszómákat, szegmentumokat hordozó búza genotípusok előállítása volt, majd azok azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval különböző repetitív DNS próbák segítségével és molekuláris markerekkel. A már korábban létrehozott interspecifikus és intergenerikus hibridekből, amphidiploidokból, utódnemzedékekből különböző módszerekkel megkíséreltük a kromoszómák törését, majd transzlokációk létrehozását, melyek a kromoszómák fizikai térképezésére is felhasználhatók. A transzlokációk révén a rokon fajok kedvező tulajdonságaiért felelős génkomplexumok építhetők be a búzába. A pályázati munkában a következő rokon fajokból történő génátvitelre koncentráltunk: az árpa (*Hordeum vulgare*), egy kecskebúzafaj (*Aegilops buncialis*) és egy tarackbúzafaj (*Agropyron glael*). Az őszi árpából annak koraiságát, kedvező fehérjeösszetételét, az *Ae. biuncialis*ből só- és szárazságtűrést, az *A. glael*ből betegség-ellenállóságot (levélrozsa) terveztük átvinni a búzába.

1. Őszi búza/őszi árpa (Mv9 kr1/Igri) addíciós vonalak előállítása és azonosításuk fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH) és SSR markerekkel

Búza és árpa kromoszómák azonosítása fluoreszcens in situ hibridizációval

A búza kromoszómák a GAA trinukleotid szekvencia és a pAs1 DNS klón alkalmazásával fluoreszcens *in situ* hibridizációval jól azonosíthatók, az általunk használt Mv9 kr1 búzagenotípus minden kromoszómáját ezzel a próba kombinációval jellemeztük. A búza kromoszómák elemzésére korábban használt pSc119.2–pAs1 próba kombináció az árpa kromoszómákon szórt jelet ad, megkülönböztetésükre nem alkalmas. A GAA trinukleotid szekvenciával végzett FISH után az egyes árpa kromoszómák mintázata egymástól eltér, ezzel a próbával elsősorban a 2H és a 4H kromoszómák könnyen felismerhetők. A HvT01 szubtelomérás ismétlődő szekvencia nagy előnye, hogy csak az árpa kromoszómákon ad jelet, a búzán nem, így a búza genomban az árpa kromoszómák rögtön láthatók. A HvT01 próbával a 3H árpa kromoszóma jellegzetes mintázatot ad. Az 5H és a 6H árpa kromoszómák szatellittel rendelkeznek, így a pTa71 riboszómális DNS próba ezeken erős hibridizációs jelet ad. Az 1H kromoszóma rövid karján is látható egy intersticiális jel a pTa71 próbával, így ez is jól kimutatható. Az Afa family próba a 7H kromoszóma proximális régiójában ad egyértelműen felismerhető jelet. A HvT01, GAA, és az Afa family próbák a teljes genomi árpa DNS-ből PCR-rel felszaporíthatók, így bármikor könnyen előállíthatók. Négy próba kombinációjával (HvT01-GAA, HvT01-pTa71, HvT01-Afa family) az árpa kromoszómák a búza genom mellett nagy biztonsággal azonosíthatók.

Búza/árpa addíciós vonalak azonosítása FISH-sel és SSR markerekkel

Az Mv 9 kr1 búzatörzs és az Igri őszi árpafajta keresztezéséből addíciós vonalakat állítottunk elő, melyekben az árpa kromoszómák azonosítását FISH-sel, több DNS próba használatával és molekuláris markerekkel végeztük el. A 4H addíciós vonalat a GAA trinukleotid szekvencia és a pAs1 DNS próba segítségével azonosítottuk. A 4H árpa kromoszóma a GAA szekvencia jellegzetes FISH mintázata alapján felismerhető, ezen a kromoszómán látható a legtöbb hibridizációs sáv. A 4H kromoszóma GAA mintázata a Giemsa festésnél tapasztalt C-sávokhoz hasonló, ez a legheterokromatikusabb árpa kromoszóma. A 4H árpa kromoszóma jelenlétét a búza genomban genomi *in situ* hibridizációval (GISH) is kimutattuk. A citológiai azonosítást a HvM40 és a HvM67 molekuláris markerek is megerősítették.

A 2H addíciós vonalat szintén a GAA-pAs1 DNS próba kombinációval, majd a HvT01 szubtelomérés ismétlődő szekvencia felhasználásával azonosítottuk. A 2H kromoszóma jelenlétét egymást követő FISH és GISH analízissel is megerősítettük. A 2H árpa kromoszóma mindkét karján a GAA próba két szimmetrikus FISH jelet ad. A HvT01 próbával a 2H-nak csak a rövid karján figyelhető meg szubtelomérés jel. A többi árpa kromoszómának mindkét karján látható HvT01 jel, kivéve az 5H kromoszómát, az azonban a szatellit alapján a 2H-től jól elkülöníthető. A citológiai azonosítást a HvM36 molekuláris marker is alátámasztotta.

A 3H addíciós vonal a GAA és a pAs1 próbák kombinálásával nem volt egyértelműen azonosítható, ezért ennek a vonalnak a meghatározásában a HvT01 próba döntő szerepet játszott. A HvT01 próbával a 3H kromoszóma hosszú karján egy erős szubtelomérés és két intersticiális sáv látható. Ez az egyetlen árpa kromoszóma, amelynek a hosszú karján a HvT01 próbával több hibridizációs sáv is megjelenik. A 3H kromoszóma jelenlétét ebben a vonalban a HvM60 és a HvM62 árpa mikroszatellit markerek is megerősítették.

A negyedik addíciós vonalban a GAA és a HvT01 próbák FISH hibridizációs mintázata alapján feltehető volt, hogy ez a vonal a 7H árpa kromoszómát tartalmazza, de a 7H-án korábban térképezett árpa mikroszatellit markerek (Bmag0120, HvID) nem adtak megfelelő jelet. A HvT01 és a pTa71 DNS próbákkal végzett FISH egyértelművé tette, hogy ez a vonal az 1HS izokromoszómát tartalmazza diszómás állapotban. A pTa71 próbával két teljesen szimmetrikus intersticiális sáv jelent meg a kromoszóma két karján, amely az 1HS karra jellemző. A citogenetikai azonosítást Bmac0213 marker (1HS) termékének megjelenése és a HvHvA1 (1HL) marker termékének hiánya is megerősítette.

A diszómás addíciós vonalak mellett az Mv9 kr1 × Igr1 hibridek búzával visszakeresztett utódai közül azonosítottunk egy 7H monoszómás vonalat. A 7H kromoszóma azonosítását az Afa family és a HvT01 próba kombinációjával végeztük. Az Afa family a 7H centroméra körüli régiójában intenzív jelet ad. A három darab 7H monoszómás növényen összesen 406 szemet kaptunk. Az eddig vizsgált 60 utódszemből eddig még nem találtunk diszómás addíciót, ezért folytatjuk azok keresését.

Az addíciós vonalak morfológiai jellemzése

A 2H, 3H, 4H addíciós vonalakat tenyészkertben felszaporítottuk, és morfológiailag is részletesen jellemeztük. A 2H Mv9 kr1/Igr1 diszómás addíciós vonal hosszú, laza kalásszal rendelkezik. Fertilitása elmarad az Mv9 kr1 búza szülőpartnerétől. A növények magasabbak mint a búza szülőpartner.

A 3H diszómás addíciós vonal kalászhosszai rövidek, nagyon tömöttek, szálcacsonkokkal rendelkeznek. A növények alacsonyok, de fertilitásuk jó.

A 4H addíciós vonal kalászhosszai hasonlítanak leginkább az Mv9 kr1 kalászához, nagyon jó a fertilitásuk. A növények alacsonyabbak mint a búza szülőpartner, és bokrosodási képességük is elmarad az Mv9 kr1-től.

Az 1HS izokromoszómát diszómás állapotban tartalmazó három növényt fitotronban felneveltük és azokon összesen 254 szemet kaptunk. Az 1HS diszómás addíciós vonalak fitotronban az Mv9 kr1 × Igr1 keresztezésből származó többi utódnövénynél több nappal korábban kalásztak, ezért célszerűnek tűnik koraiságukat később pontosan beállított kísérleti körülmények közt vizsgálni. A kalászhosszok a 2H addícióhoz hasonlóan hosszúak, fertilitásuk jó. Az 1HS kromoszómakaron több agronómiai szempontból is fontos gén található, pl. hordein gének, *Hor 1, 2, 3, 4, 5*, és a magas endospermium lizin (*Lys 4*). Ez a vonal alkalmas lehet a felsorolt gének vizsgálatára búza genom háttérben, hiszen azok ebben a vonalban 4-szeres dózisban vannak jelen.

Publikáció: Szakács, É., Molnár-Láng, M. 2007. *Development and molecular cytogenetic identification of new winter wheat/winter barley (Martonvásári 9 kr1/Igri) disomic addition lines. Genome, in press*

2. Búza/árpa transzlokációk előállítása genetikai módszerekkel

Idegen fajú transzlokációk előállítása genetikai módszerekkel

A búza és az árpa kromoszómák közt transzlokációkat kívántunk létrehozni a homeológ kromoszómák párosodását gátló *Ph* gén működésének elnyomásával, illetve kiiktatásával. Ennek érdekében a Martonvásáron korábban előállított búza/árpa diszómás addíciós vonalakat (2H, 6H), a 4H(4D) szubsztitúciót, a centrikus fúziót (3HS.3HL) és két terminális transzlokációt (2DS.2DL-1HS, 6BS.6BL-4HL) az *Aegilops speltoides* *Ph* szupresszor génjét (*Ph^I*) hordozó CO-4 vonallal és a Chinese Spring *ph* mutánssal megporoztuk 2002 májusában, F₁ szemeket állítottunk elő. Az F₁ szemek jelentős hányadát 2002 őszén tenyészkertben elvetettük, azonban 2002/2003-ban a hideg tél miatt kipusztultak, miután a keresztezések egyik szülője a Chinese Spring tavaszi búza genotípus (annak *ph* mutánsa, illetve ebbe a fajtába építették be az *Aegilops speltoides*-ből a *Ph* szupresszor gént is). Az F₁ szemek biztonságos felnevelésének érdekében 2003 őszén az F₁ hibrid szemeket laboratóriumban csíráztattuk, majd a növényeket részben üvegházban - részben fitotronban neveltük fel. Az F₂ szemeket 2004 májusában arattuk le.

Kromoszóma átrendeződések létrehozása 4H(4D) szubsztitúcióból az Aegilops speltoidesből származó Ph^I szupresszor gén segítségével

A 4H(4D) szubsztitúciót Martonvásáron állítottuk elő szövettenyészetben elszaporított Chinese Spring × Betzes búza × árpa hibridből, Mv9 kr1 vonallal való kétszeri visszakeresztezéssel majd öntermékenyítéssel. Az utódok citogenetikai analízise során megállapítottuk, hogy ez a vonal 42 kromoszómaszámú, de két árpa kromoszómát tartalmaz, amelyeket GISH-sel detektáltunk. A szubsztitúció spontán módon jött létre. FISH-sel a GAA és a pAs1 próbák kombinációjával demonstráltuk, hogy a 4H árpa kromoszóma épült be a 4D kromoszóma helyére. A 4H és a 4D kromoszómák is jól felismerhetők a pAs1 és a GAA próbák kombinációjával. A szubsztitúciós vonalban vizsgáltuk a 4H kromoszóma hatását a növények morfológiai tulajdonságaira illetve szárazságtűrésére. A szubsztitúciós vonal szárazságtűrése a búza szülőpartnernél kedvezőbb lett, az árpa szülőhöz hasonlóan. Feltehetően, hogy a 4H árpa kromoszómán szárazságtűrésért felelős gének lokalizáltak.

Molnár, I., Linc, G., Dulai, S., D. Nagy, E., Molnár-Láng, M. 2006. *Ability of chromosome 4H to compensate for 4D in response to drought stress in a newly developed and identified wheat-barley 4H(4D) disomic substitution line. Plant Breeding (in press)*

A *Ph^I* szupresszor gént tartalmazó CO-4 vonallal való keresztezéssel megkíséreltük a 4H kromoszóma egyes szegmentumait beépíteni a búzába. A 4H(4D) búza/árpa szubsztitúció × CO-4 keresztezésből származó F₂ szemek GISH vizsgálatát végeztük el. Összesen 150 F₂ szemet csíráztattunk genomikus *in situ* hibridizációra (GISH) alkalmas kromoszóma preparátumok készítéséhez. Általában 10-10 szemet csíráztattunk minden egyes fitotronban felnevelt F₁ növényről, kivéve két növényt, amelyekről összesen 20-20 szemet indítottunk citológiai vizsgálatra. GISH-sel 3 db F₂ növényben figyeltünk meg búza-árpa transzlokációkat.

Az első vizsgált F₂ növényben (04668) egy dicentrikus transzlokációs kromoszómát találtunk, amelynek egyik karja az árpából, másik karja a búzából származott, és a két centroméra közt még egy búza kromoszómaszakasz volt látható. A második F₂ (04748) növényben egy akrocentrikus kromoszómát figyeltünk meg, amelynek egyik karja az árpából, a másik nagyon rövid kromoszómakarja a búzából származott. Ugyanebben a növényben megfigyelhető volt egy másik típusú transzlokációs kromoszóma is, amely szintén dicentrikus volt, de a két centroméra közti szakasz hosszabb volt az előzőnél. Feltehető, hogy az akrocentrikus kromoszóma már ebből a dicentrikus kromoszómából képződött. A harmadik F₂ (04731) növényben centrikus fúziót figyeltünk meg az árpa és a búza kromoszómák közt. A vizsgált szemekben megfigyelt árpa kromoszómák (karok) számát táblázatban tüntettük fel (1. táblázat).

1. táblázat A 4H(4D) búza/árpa szubsztitúció × CO-4 keresztezésből származó F₂ szemek közt a különböző számú árpa kromoszómákat és búza-árpa transzlokációkat hordozó egyedek száma

Az F ₂ szemekben kimutatott árpa kromoszómák (karok) száma	A különböző számú árpa kromoszómát hordozó növények száma	Gyakoriság %
1 árpa	26	22,2
1 telocentrikus árpa kromoszóma	21	18,0
1 árpa és 1 telocentrikus árpa kromoszóma	13	11,1
2 árpa	10	8,5
2 telocentrikus árpa kromoszóma	2	1,7
Nincs benne árpa kromoszóma	42	35,9
Búza-árpa transzlokáció	3	2,6
Összesen	117	100

A búza-árpa transzlokációkat hordozó F₂ növények közül a 04668 számú növény kiültetés után elpusztult, de a másik két transzlokációt hordozó F₂ (04731 és 04748) növényt fitotronban felneveltük. A 04731-es számú növényen összesen 108, a 04748 számú növényen 157 szemet kaptunk, amelyek csíráztatása után megkezdtük az F₃ generációban a homozigóta transzlokációk keresését. A két növényen kapott szemek közül eddig 58-at elemeztünk GISH-sel. Sajnos az eddig vizsgált egyedekben nem találtunk búza-árpa transzlokációs kromoszómát. A GISH-sel elemzett 58 darab F₃ szem közül 15-ben 1 vagy 2 árpa kromoszómát, 31-ben pedig legalább egy telocentrikus árpa kromoszómát mutattunk ki. A további 12 szemben egyáltalán nem volt árpa kromoszóma. Valószínűleg a búza/árpa transzlokációs kromoszómák meiózisban eliminálódtak.

2002 májusában csak a CO-4 vonallal tudtuk megporozni a 4H(4D) szubsztitúciót, mert csak néhány CS *ph* mutáns növény maradt meg a tenyészkertben, ezért 2004 májusában a megporzásokat a CS *ph* mutánssal is elvégeztük, és ebből a kombinációból 342 F₁ szemet állítottunk elő. Ezekből 50-et 2004 őszén tenyészkertben elvetettük. Az F₁ növényeken 47 kalászt izoláltunk, amelyeken összesen több mint 2000 F₂ szemet kaptunk. Eddigiek során 50 F₂ szemből készítettünk kromoszóma preparátumokat GISH-re. A vizsgált preparátumokon még egy egyedben sem mutattunk ki búza-árpa transzlokációt. Tervezzük az utódokban a *ph*

recesszív gént homozigóta formában hordozó egyedek kimutatását molekuláris markerekkel, mert ezeknek az utódaiban várható nagy valószínűséggel transzlokációk létrejötte. A *ph* gén nyomkövetéséhez a megfelelő markert beszereztük, így lehetséges az F₂ utódok közül molekuláris markerrel a *ph* recesszív homozigóta egyedek kiválogatása. A továbbiakban csak a recesszív homozigóta *ph* gént hordozó F₂ növények F₃ szemein fogunk GISH-t végezni. Az eredmények összegzése után összehasonlítjuk a CS *ph* mutáns és a CO4-1 vonal alkalmazásának eredményességét a transzlokációk indukciójára.

Publikáció: Sepsi, A., Németh, K., Molnár, I., Szakács, É., Molnár-Láng M. 2006. Induction of chromosome rearrangements in a 4H(4D) wheat-barley substitution using a wheat line containing a Ph suppressor gene. Cereal. Res. Commun., 34: 1215-1222.

2004 májusában a csoportunkban előállított búza/*Aegilops biuncialis* addíciós vonalakat (2M, 3M, 7M, 3U, 5U) is megporoztuk a CS *ph* mutánssal és nagyszámú F₁ szemet állítottunk elő (255; 349; 230; 301; 214). A kapott F₁ szemek jelentős hányadát a tenyészkertben 2004 őszén elvetettük, és a 2005-ben arattuk az F₂ szemeket. A GISH vizsgálatokhoz ezekből a kombinációkból megfelelő számú F₂ szem rendelkezésre áll.

3. Búza/árpa transzlokációk, deléciók azonosítása és fizikai térképezése szövettényezetben elszaporított búza × árpa (Asakaze komugi × Manasz) hibridek utódaiban

Az ukrán őszi, hatsoros árpafajtával létrehozott Asakaze komugi × Manasz hibridet szövettényezetben több cikluson keresztül elszaporítottuk, amíg végül búzával való megporzással sikerült egy darab BC₁ növényt előállítani. Vizsgáltuk a regenerált hibridek meióziséban a kromoszómák párosodását genomikus *in situ* hibridizációval (GISH) három egymást követő *in vitro* ciklusban. Megfigyeltük, hogy az *in vitro* szaporítás folyamán nőtt a búza és az árpa kromoszómák közti párosodás, nőtt a kromoszóma törések, a telocentrikus árpa kromoszómák és az amphiploid sejtek száma. A meiózis vizsgálatok során szerzett megfigyeléseink arra utalnak, hogy a regeneráció után nő a rekombinánsok képződésének gyakorisága. Búza/árpa transzlokációs kromoszómákat figyeltünk meg a harmadik ciklusban regenerált hibridek meióziséban. További búzával végzett visszakeresztesés után 26 BC₂ utódot állítottunk elő ebből a kombinációból. GISH-sel megállapítottuk, hogy a BC₂ utódok 1-3 árpa kromoszómát tartalmaztak. Húszt kromoszómaspecifikus árpa mikroszatellit markert teszteltünk a BC₂ utódokon, amelyek segítségével kimutattuk, hogy azokban mind a hét árpa kromoszóma fellelhető. Egy növényben búza-árpa transzlokációt, két másik növényben két deléciós (5H, 3H) árpa kromoszómát találtunk, amelyeket felhasználtunk mikroszatellit markerek fizikai térképezésére.

Két növényben (egy búza/árpa transzlokációt és egy deléciós árpa kromoszómát hordozó egyed) a 3HS kromoszómakaron lokalizált HvLTPPB marker az árpára jellemző PCR terméket adta, de a 3HL karon lokalizált Bmag0013 marker nem adott jelet. Ebből arra következtettünk, hogy mindkét növényben a 3H árpa kromoszóma rövid karja és a 3H kromoszóma hosszú karjának egy rövid proximális szakasza van jelen. A deléciós és a transzlokációs kromoszómában is a töréspont a 3H kromoszóma hosszú karján a ± 0,3 frakció hosszúságnál fordult elő. Elképzelhető, hogy a deléciós és a transzlokációs kromoszóma létrejötte is ugyanarra a korábbi kromoszómatörésre vezethető vissza egy közös ősből, feltehetően a szövettényezetben.

A másik deléciós kromoszómában a deléciós töréspont az 5HL kromoszómakar ± 0.3 frakció hosszúságánál volt megfigyelhető. Az 5HS kromoszómakart a Bmac0306 markerrel azonosítottuk. Az 5H kromoszóma hosszú karján a centromérához legközelebb térképezett Bmag0337, Bmag0394 és a Bmag0323 markerek tesztelése során megállapítottuk, hogy azok

a deléciós vonalban nem mutathatók ki, azaz a ± 0.3 frakciós hosszúságon túl található. Korábbi vizsgálatainkból egy 7DS.7DL-5HS Mv9kr1/Igri búza/árpa transzlokációs vonalban kapott eredményeket (D.Nagy, Molnár-Láng, Linc, Láng, 2002. GENOME, 45, 1238-1247) összevetve a mostani megfigyelésekkel, megállapítottuk, hogy az 5H árpa kromoszómán az 5HS rövid kar közepétől a centroméra körüli régióban az 5HL hosszú kar 0.3 frakció hosszúságnál levő töréspontjáig nem található egyetlen mikroszatellit marker sem az eddig térképezettek közül.

A BC₂ utódok közül hatban fordult elő a 4H árpakromoszóma, ötben az 1H, 6H és a 7H és négyben a 2H és a 3H kromoszómák, illetve azoknak egy szegmentuma. A különböző árpa kromoszómákat hordozó egyedek alkalmasak arra, hogy azokból a Manasz hatsoros ukrán árpa kedvező tulajdonságait a búzába beépítsük.

Publikáció: Molnár-Láng, M., Novotny, C., Linc, G., D. Nagy, E. 2005. Changes in the meiotic pairing behaviour of a winter wheat-winter barley hybrid maintained for a long term in tissue culture, and tracing the barley chromatin in the progenies using GISH and SSR markers. Plant Breeding, 124: 247-252.

4. Búza-Aegilops biuncialis transzlokációk létrehozása szövettenyésztésben és besugárzással, majd kimutatásuk GISH-sel

A búza (Mv9 kr1) \times *Aegilops biuncialis* amphidiploidok közül 11 növényről, 16 db 2-3 cm-es fejletlen kalászkezdeményt helyeztünk táptalajra, amelyekből kalluszokat indukáltunk. A kalluszokból azonban ebben a kombinációban nem sikerült növényeket regenerálni, gyökerek fejlődtek, de hajtások nem. A szövettenyésztés sikertelensége miatt a továbbiakban a besugárzással kiváltott kromoszómatörésekre koncentráltunk.

⁶⁰Co- γ -val történt besugárzással intergenomikus kromoszóma átrendeződéseket terveztünk létrehozni a búza és az *Ae. biuncialis* között, amely kiinduló pontja lehet az *Ae. biuncialis* kromoszóma szegmentumok búza genomba történő beépítésének. A munkánk során a további kérdésekre is választ akartunk kapni: (1) A besugárzási dózisok növekedésével változik-e az egyes aberráció típusok egymáshoz viszonyított gyakorisága? (2) Van-e különbség az *Ae. biuncialis* U és M genom kromoszómáinak érzékenységében az alkalmazott γ sugárzással szemben? (3) Mely aberráció típusok jelennek meg legnagyobb gyakorisággal a következő nemzedékben?

Kísérletünkben búza- *Ae. biuncialis* amphidiploidok (AABBDDMMUU, (2n=10x=70) száraz szemeit ⁶⁰Co- γ sugárforrással besugároztuk, 5, 50 és 100 Gy dózisok alkalmazásával. A spontán és a besugárzás hatására kialakult intergenomikus kromoszóma átrendeződéseket multikolor genomi *in situ* hibridizáció (mcGISH) segítségével mutattuk ki a besugárzott és az első öntermékenyített utódnemzedékben. Az mcGISH során a random primer jelöléssel előállított biotinilált *Ae. comosa* (MM, 2n=2x=14) és digoxigeninált *Ae. umbellulata* (UU, 2n=2x=14) genomi DNS-ét használtuk M és U genom specifikus próbaként annak érdekében, hogy az amphidiploidokban az *Ae. biuncialis* U és M genomjának kromoszómái, valamint a búza kromoszómák különböző színekkel jelölődjenek. A búza kromoszómák jelölődését pedig *T. durum* (AB genom) fragmentált DNS alkalmazásával akadályoztuk meg. A hibridizációs szignál detektálása FITC-Avidin D-vel és Rhodamine-anti digoxigeninnel történt.

Összesen 114 növényben 1034 sejtet elemeztünk mcGISH-sel. A módszer segítségével búza \times *Ae. biuncialis* amphidiploidokban az *Ae. biuncialis* U és M genomjának kromoszómáit a búza kromoszómáktól egyértelműen elkülönítettük. Intergenomikus kromoszóma átépüléseket hoztunk létre a búza és az *Ae. biuncialis* kromoszómák között. A besugárzás hatásaként kimutattuk dicentrikus kromoszómák, terminális és intersticiális transzlokációk, centrikus

fúziók, valamint kromoszóma fragmentek jelenlétét. Megállapítottuk, hogy az *Ae. biuncialis* U genomjának kromoszómái érzékenyebbek voltak a besugárzásra mint az M genom kromoszómái. Az U genom kromoszómák a centoméránál, illetve ahhoz közeli régiókban, az M genom kromoszómái inkább az interkaláris régiókban törtek, amit a terminális és intersticiális transzlokációk nagy száma jelzett. A terminális transzlokációk és fragmentek kismértékben, a dicentrikus kromoszómák egyáltalán nem adódtak át a következő nemzedékbe. Az intersticiális transzlokációk és centrikus fúziók gyakorisága általában nőtt az első utódnemzedékben. A búzával történő visszakeresztezések révén az előállított idegenfajú transzlokációk stabilizálódhatnak az utódokban és a kedvező tulajdonságokat hordozó genotípusok bevonhatók a nemesítésbe.

*Publikáció: Molnár, I., Benavente, E., Molnár-Láng, M. (2007) Molecular cytogenetic characterization of intergenomic chromosome rearrangements in γ -irradiated wheat/ *Ae. biuncialis* amphiploids. Genome(előkészületben)*

*5. Szövettenyésztés felhasználása intergenomikus kromoszóma átépülések indukciójára búza \times *Agropyron* hibridekben*

Az Mv9 kr1 vonalat az *Agropyron glael* tarackbúza fajjal megporoztuk és nagy számban hoztuk létre F₁ szemeket. Az *Agropyron glael* az *Agropyron glaucum* és az *Agropyron elongatum* keresztezéséből származó, betegségekkel (levélrozsa, lisztharmat) szemben nagyon ellenálló vadfaj. Az F₁ hibrideken búzával történő megporzásokor tenyészkertben nem kaptunk szemeket, ezért a hibrideket szövettenyésztésben elszaporítottuk. Célunk volt a szövettenyésztésben intergenomikus átrendeződések létrehozása is. Két ciklusban indítottunk kalluszkultúrát a hibridek 1-2 cm-es fejletlen kalászkezdeményeiből. Az első ciklusban 19 regenerált növényt ültettünk ki, amelyek közül 12 növény elpusztult, így végül 7 növényt neveltünk fel. A második ciklusban az F₁ hibridekből *in vitro* szaporítás után összesen 9 növényt tudtunk kiültetés után felnevelni. Annak ellenére, hogy a regeneránsokon és a kiindulási hibrideken több mint 50 kalászt poroztuk meg búzával, mindössze két darab BC₁ növényt sikerült fitotronban felnevelnünk. A két BC₁ növény kromoszómaszáma 49 és 62 volt. A 49 kromoszómaszámú 0566 számú BC₁ növény steril lett, de a másik BC₁ (0567) növényen önmegporzással 46 szemet kaptunk. Búzával való visszakeresztezéssel a BC₁ növényeken összesen 30 darab BC₂ szemet kaptunk.

A 0567 számú BC₁ növényen öntermékenyítéssel fejlődött szemek kromoszómaszáma 54-től 62-ig terjedt. Ezekben a növényeken összesen 833 szemet kaptunk, amelyekből 110 szemet 2006 őszén tenyészkertben elvetettünk (1-m-es sorokba, soronként 10 szemet vetve). Vizsgálni kívánjuk, hogy mely növények rezisztensek (levélrozsdával, lisztharmattal szemben) az *Agropyron glael* szülőpartnerhez hasonlóan. A búza recipiens partner, az Mv9 kr1 rendkívül fogékony levélrozsdára, így az utódok betegség-rezisztenciájukat csak az *A. glael*-től örökölhetik.

A 30 darab BC₂ kromoszómaszáma 43-től 58-ig változott. A BC₂ növényeken öntermékenyítéssel összesen 583 szemet kaptunk, melyek közül 60 szemet 2006 őszén tenyészkertbe elvetettünk (1-m-es sorokba, soronként 10 szemet vetve). A BC₂F₂ utódok betegségellenállóságát 2007 nyarán tenyészkertben megfigyeljük, kiemeljük az ellenálló egyedeket. A rezisztens növények utódaiban FISH-sel kívánjuk elemezni, hogy azokba hány *Agropyron* kromoszóma (szegmentuma) épült be, illetve megfelelő repetitív próbákkal azokat azonosítani is kívánjuk.

Az *Agropyron* (szinonima: *Thinopyrum*) genom a búza genommal nagyfokú homeológiát mutat, ezért a két faj kromoszómáinak megkülönböztetéséhez a genomikus *in*

situ hibridizáció érzékenységét fokoznunk kellett. A búza × *A. glael* hibridek utódainak elemzésére csak azután kerülhet sor, ha már nagy biztonsággal meg tudjuk különböztetni a két nemzetség kromoszómáit GISH-sel.

A módszer kidolgozásához kiváló alapanyagként bizonyult az a Martonvásáron korábban előállított búza × *Agropyron* amphiploid, amelyet a Bánkúti 1201' búzafajta és a 70 kromoszómás *Agropyron elongatum* (szinoníma: *Thinopyrum ponticum*) keresztezés F₃ nemzedékéből válogattak ki (Szalai, 1978). Ez a részleges amphiploid citológialag viszonylag stabilnak bizonyult (2n=56). A különböző kórokozókkal szembeni ellenállósága (levélrozsa, lisztharmat) alapján a búzanemesítés számára értékes génforrás lehet, továbbá értékes tulajdonsága magas fehérjetartalma is.

A búza és az *Agropyron* kromoszómák megbízható megkülönböztetésének érdekében a GISH technika egyes lépéseit módosítottuk. Bevezettük az indirekt jelölést, amelynek során digoxigenint és biotint használtunk, majd a detektálást fluorokrómmal jelölt anti-digoxigeninnel és sztrepavidinnel végeztük. Kidolgoztuk a búza-*Agropyron* kromoszómák megkülönböztetéséhez szükséges blokkoló - jelölt DNS arányt és meghatároztuk az optimális denaturációs időt. A hibridizáció hőmérsékletét 42 °C-ra állítottuk be és azt egy éjszakán át végeztük, a korábbi 65°C-on és két órán keresztül végzett hibridizációhoz képest.

A BE-1-ben így 16 *Agropyron* kromoszómát és 40 búza kromoszómát azonosítottunk, ami azt mutatta, hogy egy pár búza kromoszóma hiányzik a vizsgált amphiploidból. Három *Agropyron* kromoszóma pericentromerikus régiójában idegen fajú transzlokációt detektáltunk. Meghatároztuk a transzlokációs kromoszómák töréspontjait. Az első transzlokációs kromoszóma egy nagy méretű szubmetacentrikus kromoszóma, melynek transzlokációs töréspontjai a különböző karokon a ± 0,2 és ± 0,3 frakcióhosszúságnál voltak. A második kromoszóma egy közepes méretű, szintén szubmetacentrikus kromoszóma volt, töréspontjai ± 0,4 és ± 0,5 frakcióhosszúságnál helyezkedtek el. A harmadik átrendeződést egy kis méretű szubmetacentrikus kromoszómán észleltük, itt a töréspontok ± 0,3 és ± 0,4 frakcióhosszúságnál fordultak elő.

Különböző repetitív DNS klónok (pSc119, pTa71, Afa-family) fluoreszcens *in situ* hibridizációjával (FISH) az amphidiploidban jelenlévő búza kromoszómákat azonosítottuk és megállapítottuk, hogy a búza 7D kromoszómapárja eliminálódott. Leírtuk a BE-1 *Agropyron* kromoszómáinak FISH mintázatát a fent említett három repetitív DNS próba segítségével. Megállapítottuk, hogy a 16 *Agropyron* kromoszóma 8 párba rendeződik, amelyek egymástól FISH mintázatuk és kar arányaik figyelembevételével egyértelműen elkülöníthetők.

A BE-1 amphiploid elemzése során kidolgozott GISH technika lehetővé teszi, hogy az Mv9 *kr1* × *A. glael* hibridek utódaiban az *Agropyron* kromoszómákat illetve a lehetséges búza/*Agropyron* kromoszóma átrendeződéseket kimutassuk.

Publikáció: Sepsi, A., Molnár, I., Szalay, D., Molnár-Láng, M. : Egy levélrozsa rezisztens, magas fehérjetartalmú búza - Thinopyrum ponticum (szin. Agropyron elongatum) amphidiploid, a BE-1 molekuláris citogenetikai elemzése multicolor-GISH-el és FISH-el. (előkészületben)