

Szent István Egyetem

***Triticum timopheevii* eredetű új genetikai anyagok
előállítása és jellemzése**

Doktori (PhD) értekezés

Mikó Péter

Gödöllő

2015

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Prof. Dr. Helyes Lajos
intézetigazgató, egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezető: Dr. Lángné dr. Molnár Márta
tudományos tanácsadó, az MTA doktora
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet,
Génmegőrzési Osztály

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1 BEVEZETÉS	7
1.1 Célkitűzések	8
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1 Az őszi búza evolúciója és génforrásai	9
2.1.1 Származás	9
2.1.2 Kialakulás	10
2.1.3 A búza génforrásai.....	11
2.2 <i>Triticum timopheevii</i>	13
2.2.1 Származása, jellemzői	13
2.2.2 Kialakulásának folyamata	15
2.2.3 <i>Triticum timopheevii</i> és származékai a génbankokban.....	16
2.2.4 Szerepe a rezisztencianemesítésben	18
2.2.4.1 Lisztharmat rezisztencia	20
2.2.4.2 Levélrozsda rezisztencia.....	20
2.2.4.3 Szárrozsda rezisztencia.....	21
2.2.4.4 Kalászfuzárium rezisztencia	22
2.2.4.5 Tartós- és felnőttkori rezisztencia	23
2.2.4.6 Egyéb biotikus és abiotikus rezisztencia	24
2.2.5 Felhasználása a technológiai minőség javítására.....	24
2.2.6 Felhasználása a hibridbúza nemesítésben	26
2.3 A genetikai diverzitás bővítése idegen fajú keresztezéssel	27
2.3.1 Interspecifikus hibridizáció	27
2.3.2 Rokon fajok keresztezhetősége	28
2.3.2.1 Az F ₁ hibridek életképessége.....	29
2.3.2.2 A keresztezhetőség genetikai háttere.....	30
2.3.3 Amfiploidok előállítása kolhicinnel	31
2.3.4 Aneuploidok előállítása és felhasználása az előnemesítésben.....	32
2.3.4.1 Addíciós vonalak előállítása	32
2.3.4.2 Addíciós vonalak felhasználása.....	33
2.3.4.3 Idegen fajú transzlokációk indukálása.....	33
2.3.5 <i>Triticum timopheevii</i> és <i>Triticum monococcum</i> a búza előnemesítésében	35
2.3.5.1 <i>Triticum timopheevii</i> az előnemesítésben.....	35
2.3.5.2 <i>Triticum monococcum</i> , mint lehetséges keresztezési partner	36
2.4 Idegen kromatin kimutatása és azonosítása	37
2.4.1 Molekuláris citogenetikai módszerek	37

2.4.1.1	FISH: fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció repetitív DNS próbákkal	38
2.4.1.2	GISH: fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció komplett genomi DNS próbákkal	40
2.4.2	Inter- és intragenomikus átrendeződések a <i>Triticum timopheevii</i> fajban.....	40
3	ANYAG ÉS MÓDSZER	43
3.1	Növényi anyagok és keresztezések	43
3.1.1	Keresztezési kombinációk	44
3.2	Fajhibridek előállítása.....	45
3.2.1	Megporzás	45
3.2.2	Növénynevelés.....	45
3.2.3	Genomduplázás	46
3.3	Molekuláris citogenetikai vizsgálatok.....	46
3.3.1	Kromoszómapreparátum készítése	46
3.3.2	Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció	47
3.3.2.1	DNS próbák.....	47
3.3.2.2	Preparátumok előkezelése	48
3.3.2.3	<i>In situ</i> hibridizáció	49
3.3.2.4	Fluoreszcens jelek detektálása.....	50
3.4	Fiatalkori rezisztencia-vizsgálat.....	50
3.4.1	Mesterséges levélrozsda-fertőzés	50
3.4.2	Mesterséges lisztharmat-fertőzés.....	51
3.4.2.1	Lisztharmat-fogékonyság megállapítása	52
3.4.2.2	Lisztharmat – növény interakció vizsgálata	52
3.5	Kalászfuzárium rezisztencia vizsgálata	53
3.6	Fenotípusos tulajdonságok meghatározása.....	54
3.6.1	<i>Triticum timopheevii</i> génbanki tételek szántóföldi felvételezése	54
3.6.2	<i>Triticum timococcum</i> és szülői genotípusainak fenotípusos és agronómiai jellemzése.....	54
3.7	Fenotípusos- és rezisztencia-tulajdonságok statisztikai kiértékelése	55
4	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	57
4.1	<i>Triticum timococcum</i> előállítása.....	57
4.1.1	<i>Triticum timopheevii</i> génbanki tételek jellemzése.....	57
4.1.2	Szülőpartnerek keresztezhetőségi vizsgálata	59
4.1.3	<i>Triticum timopheevii</i> × <i>Triticum monococcum</i> amfiploid előállítása	61
4.1.4	<i>Triticum timococcum</i> előállításának megvitatása	61
4.2	<i>Triticum timococcum</i> molekuláris citogenetikai jellemzése.....	62
4.2.1	Szülői genomok kariotipizálása.....	62
4.2.2	<i>Triticum timopheevii</i> genomokon végzett mcGISH optimalizálása	65
4.2.3	<i>Triticum timococcum</i> genomszerkezete.....	67

4.2.4	<i>Triticum timococcum</i> molekuláris citogenetikai elemzésének megvitatása	68
4.3	A <i>Triticum timococcum</i> fenotípusos és agronómiai jellemzése	71
4.3.1	Morfológiai jellemzők	71
4.3.2	Betegség-ellenállóság	75
4.3.2.1	Levél- és sárgarozsda rezisztencia	75
4.3.2.2	Lisztharmat rezisztencia	76
4.3.2.3	Kalászfuzárium rezisztencia	81
4.3.3	<i>Triticum timococcum</i> fenotípusos és agronómiai jellemzésének megvitatása	82
4.4	<i>Triticum timopheevii</i> kromatint hordozó búza előnemesítési anyag előállítása	84
4.4.1	<i>Triticum timococcum</i> amfiploiddal végzett keresztezések	84
4.4.1.1	F ₁ hibridek előállítása	85
4.4.1.2	Hibridek visszakeresztezése búzával	86
4.4.1.3	Utódnemzedékek genomvizsgálata	87
4.4.1.4	Utódnemzedékek fenotípusos vizsgálata és üvegházi rozsdafertőzése	88
4.4.1.5	<i>Triticum zhukovskyi</i> genetikai diverzitásának szélesítése	90
4.4.2	A <i>Triticum timopheevii</i> fajjal végzett keresztezések	91
4.4.2.1	Búzával alkotott F ₁ hibridek előállítása és visszakeresztezésük búzával	92
4.4.2.2	Visszakeresztezett utódnemzedék genomvizsgálata	92
4.4.2.3	Utódnemzedékek fenotípusos vizsgálata és üvegházi rozsdafertőzése	94
4.4.2.4	<i>Triticum timopheevii</i> citoplazmát hordozó búzatörzsek előállítása	95
4.4.3	6B/6G monoszómás szubsztitúciós búza vonal (20 ^{II} +1 ^I 6B+1 ^I 6G) előállítása	96
4.4.3.1	<i>Triticum timopheevii</i> kromoszómás búza vonalak levélrozsda-rezisztencia vizsgálata	97
4.4.3.2	6G diszómás addíció molekuláris citogenetikai azonosítása	97
4.4.3.3	'Rannaja' 6B monoszómás búza vonal ellenőrzése és F ₁ hibridek létrehozása	98
4.4.3.4	6B/6G monoszómás szubsztitúciós (20 ^{II} +1 ^I 6B+1 ^I 6G) F ₁ hibridek FISH azonosítása	99
4.4.4	<i>Triticum timopheevii</i> fajra alapozott génátvitel lehetőségének megvitatása	101
4.5	Új tudományos eredmények	104
5	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	107
5.1	<i>Triticum timococcum</i> előállítása	107
5.2	<i>Triticum timococcum</i> molekuláris citogenetikai jellemzése	108
5.3	<i>Triticum timococcum</i> fenotípusos és agronómiai jellemzése	108
5.4	<i>Triticum timopheevii</i> kromatint hordozó búza előnemesítési anyag előállítása	109
6	ÖSSZEFOGLALÁS	111
7	SUMMARY	113
8	MELLÉKLETEK	115
M1.	Irodalomjegyzék	115
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS		139

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- APR: felnőttkori betegség-ellenállóság (adult plant resistance)
- BC: visszakeresztezés (back-cross)
- CMS: citoplazmás hímsterilitás (cytoplasmic male sterility)
- DAPI: 4',6'-diamidino-2-fenilindol (kéken fluoreszkáló kontrasztfesték)
- DNS: dezoxiribonukleinsav
- FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció (repetitív DNS próbákkal)
- GISH: genomi *in situ* hibridizáció (teljes genomi DNS a fluoreszcens próba)
- MAS: genetikai marker alapú szelekció (marker-assisted selection)
- McGISH: többszínű (multicolour) genomi *in situ* hibridizáció
- MQ: Milli-Q víz (a desztillált víz ultratiszta változata)
- NOR: nukleolusz-organizáló régió
- PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
- QTL: kvantitatív tulajdonságot meghatározó lokusz (quantitative trait locus)
- SSC: nátrium-citrát és nátrium-klorid oldatok megfelelő arányú keveréke (saline sodium citrate)
- SSR: egyszerű szekvencia ismétlődés (simple sequence repeats) - mikroszatellit

1 BEVEZETÉS

A búza (*Triticum aestivum* L.) korunk legnagyobb területen (219 millió ha) termesztett gabonanövénye, mely közel 700 millió tonnás éves termésmennyisége az emberiség harmadának az egyik legalapvetőbb táplálékforrása. Hazánk szántóterületeinek közel negyedén ($\approx 1,1$ millió ha) termesztik, és éves szinten átlagosan 4-5 millió tonnát takarítanak be belőle. Az egyre növekvő népesség miatt a búza termésszintjének és termésbiztonságának folyamatos növelésére van szükség. Ezt, az agrotechnika fejlesztésével karöltve, leghatékonyabban a növénynemesítés eszköztárát felhasználva lehet elérni. A *Triticum aestivum* fajban rejlő terméspotenciál kiaknázása mellett fontos a termést csökkentő, abiotikus és biotikus stresszfaktorok ellen is felvenni a küzdelmet, melynek az egyik leghatékonyabb módja a búzával rokon vad fajok nemesítésben történő felhasználása. E közeli, vagy távolabbi rokon fajok értékes genetikai tartalékot jelentenek a rezisztencianemesítés számára. A vad fajokat őrző és fenntartó génbankok ezért egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert a modern búza nemesítésében, mivel annak beszűkült genetikai diverzitása hatékonyan leginkább az idegen fajú keresztezések útján növelhető. A világ génbankjaiban található 855 000 *Triticum* spp. tételnek csupán 4,2%-át teszik ki e rokon fajok (FAO 2010), melyek közül a *Triticum timopheevii* Zhuk. különböző tételei már több mint fél évszázada jelentős szerepet töltenek be a rezisztencianemesítésben. Ez a faj nagymértékben ellenáll a búzát fertőző fontosabb gombabetegségeknek (levél-, sárga- és szározosda, lisztharmat, fuzárium), továbbá egyes genotípusai kiemelkedő technológiai minőségi tulajdonságokkal is rendelkeznek. Az idegen fajú génátvitel hagyományosan, genetikai transzformációtól mentesen a fajok ivaros keresztezésével valósítható meg. Ez elsősorban a fajok közötti közvetlen keresztezést jelenti, azonban ugyancsak sikeres génátvitelt tesz lehetővé egy keresztezési hídként használt szintetikus amfiploid előállítására és használata. A hexaploid búzával azonos kromoszómaszámú, homológ genomokat is tartalmazó amfiploid előállítására a *T. timopheevii*-t a diploid alakokkal (*Triticum monococcum* L.) célszerű keresztezni, mivel ez utóbbi is kiemelkedő biotikus és abiotikus rezisztenciával, valamint előnyös beltartalmi tulajdonságokkal rendelkezik. E szintetikus hexaploid búzanemesítésben történő hasznosításának jelentőségét igazolja, hogy a hexaploid búza szintetikus változatai már évtizedek óta kiemelt szerepet töltenek be a genetikai diverzitás szélesítésén alapuló búzanemesítési programokban. E két fajból előállított szintetikus amfiploid felhasználása a búzanemesítésben egyúttal lehetővé teszi, hogy nemcsak a *T. timopheevii*, hanem az alakor hasznos tulajdonságait is beépíthessük a búzába. Napjainkig már mindkét fajból több rezisztenciagént is sikeresen építettek be a búza

genomjába, azonban a génbankokban őrzött változatos tételeik még mindig sok hasznos gént hordozhatnak, melyek kiaknázása a jövő egyik kiemelkedő fontosságú feladata.

A *T. timopheevii* vagy a *T. timopheevii* × *T. monococcum* amfiploid búzával végzett keresztezése után az idegen kromatin mennyiségének csökkentése több éven át tartó visszakeresztezéssel (BC: back-cross) érhető el a leghatékonyabban. E folyamat során a szelekciót nagymértékben segítheti az idegen kromoszóma vagy kromoszómaszakasz molekuláris citogenetikai módszerekkel történő nyomonkövetése. Erre a feladatra az egyik leghatékonyabb módszer a DNS (dezoxiribonukleinsav) *in situ* hibridizáció, melynek során ismert szekvenciákat hordozó repetitív DNS szakaszokat (FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció), vagy az azonosítani kívánt genom teljes DNS-ét (GISH: genomi *in situ* hibridizáció) használjuk próbaként. A fluoreszcens festékekkel jelölt próbákat az egyes generációk növényeiből készített kromoszómapreparátumokra hibridizálva kromoszóma-, illetve genom-specifikus mintázatot detektálhatunk, mely a búza és az idegen kromoszómák azonosítását teszi lehetővé. Az azonosításhoz az ismert búza FISH kariotípus mellett szükséges az idegen kromoszómák kariotípusát is elkészíteni, hogy az utódnemzedékekben az idegen kromatin könnyebben azonosíthatóvá váljon.

1.1 Célkitűzések

Kutatómunkánk célja a *T. timopheevii* vad rokon búzafaj hasznos tulajdonságainak kiaknázása a búzanemesítésben, amit a következő feladatok kidolgozásával kívántunk megvalósítani:

- Az MTA Agrártudományi Kutatóközponthoz (MTA ATK) tartozó Martonvásár Gabona Génbankban tárolt *T. timopheevii* tételek jellemzését követően kiválasztani azt a genotípust, amivel egy többirányú búza előnemesítési programot indíthatunk, mely során vizsgáljuk a hibridek ellenállóságát is a búza főbb gombakórokozóival szemben,
- E kiválasztott *T. timopheevii* genotípus és a martonvásári MTA ATK Mezőgazdasági Intézetében korábban nemesített alakor törzs felhasználásával új *T. timopheevii* × *T. monococcum* amfiploid létrehozása, részletes morfológiai, agronómiai és molekuláris citogenetikai jellemzése, valamint a búza előnemesítési programba történő bevezetése,
- A martonvásári intézetben korábban előállított, *T. timopheevii* kromoszómát hordozó addíciós búza genetikai anyag létrehozását eredményező előnemesítési program folytatása,
- Az előnemesítési program során a búzába beépült *T. timopheevii* és *T. monococcum* kromoszómák, kromoszómaszakaszok nyomonkövetésére alkalmas molekuláris citogenetikai módszerek (FISH, GISH) fejlesztése és optimalizálása, továbbá, az idegen kromoszómák azonosíthatóságának megkönnyítésére a *T. timopheevii* FISH kariotípusának elkészítése.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az őszi búza evolúciója és génforrásai

2.1.1 Származás

A búza (*Triticum aestivum* L.) a *Poaceae* (perjefélék) család *Pooideae* (perjeformák) alcsalád *Triticeae* nemzetségcsoportjának *Triticum* nemzetségébe tartozó növényfaj. E 26 nemzetségből álló, gazdaságilag jelentős fajokat (pl. búza, rozs, árpa, tritikále) is tartalmazó csoportba közel 100 egyéves és négyszer annyi évelő fűfajt sorolunk, melyek nagyban hozzájárultak az emberi civilizáció, életminőség és élelmezésbiztonság fejlődéséhez (Wang és Lu 2014). A *Triticeae* fajok többsége az emberi civilizáció bölcsőjének számító, a Tigris és Eufrátesz folyók, valamint a Földközi-tenger Közel-Keleti partvidéke által határolt területről származik, melyet „Termékeny Félhold” néven is ismerünk (Salamini *et al.* 2002).

A búza evolúciója körülbelül 3 millió évvel ezelőtt kezdődött, amikor a *Triticeae* nemzetségcsoport fajainak közös őseiből kialakultak a különböző nemzetségek (melyekre általánosan jellemző az azonos alapkromoszómaszám: $n=1x=7$), köztük a *Triticum* és az *Aegilops* első diploid fajai (Sakamura 1918, Gill *et al.* 2007). A hexaploid ($2n=6x=42$) búza 3 genomját e 2 nemzetséghez tartozó diploid ($2n=2x=14$) fajok adták, melyek körülbelül 1 millió éve alakultak ki. Ekkor jött létre a *T. monococcum* L. ($A^m A^m$) és a *T. urartu* Tumanian ex Gandilyan ($A^u A^u$), valamint az *Aegilops tauschii* Coss. és az *Aegilops Sitopsis* szekciójába tartozó fajok, melyek természetes hibridizációja következtében alakultak ki később a magasabb ploidszintű *Triticum* fajok (Gill *et al.* 2007). Az első vad tetraploid fajok 0,1-0,5 millió évvel ezelőtt alakultak ki a B illetve G genomok ősi donorfaja(i) és a *T. urartu* kereszteződéséből (Huang *et al.* 2002). Számos korábbi kutatás igazolta, hogy mind a B, mind a G genom az *Ae. speltoides* Tausch faj S genomjával mutatja a legnagyobb hasonlóságot (pl. Sarkar és Stebbins 1956, Dvorak és Zhang 1990, Tsunewaki 2009), azonban hibridek vizsgálatával e megállapítást nem lehetett alátámasztani, ugyanis a szintetikus durum nem tudott fertilis utódot létrehozni durumbúza (*T. turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husnot) keresztezési partnerével (Dvorak 1972). Kloroplasztisz genomikai vizsgálata alapján (Golovnina *et al.* 2007), illetve alacsony kópiaszámú kromoszómaspecifikus, nem kódoló DNS szekvenciák vizsgálata alapján (Liu *et al.* 2003) később megállapították, hogy a B és a G genom feltehetően eltérő *Aegilops* genotípusokból származik, azonban mind a vad tönke (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides* Körn. ex Asch. & Graebn.), mind a vad *T. timopheevii* (*T. timopheevii* subsp. *armeniicum* (Jakubz.) MacKey (syn. *Triticum araraticum* Jakubz.)) kialakulásában a rendkívül variábilis *Ae. speltoides*

különböző változatai vehettek részt. E variabilitás kérdését tovább fokozzák evolúciós genomikai vizsgálatok eredményei, melyek alapján mind az *Aegilops Sitopsis* szekciójába tartozó fajok, mind pedig az ősi tetraploid fajok egy közös ősi B genomot hordozó diploid fajtól alakulhattak ki (Rai *et al.* 2012).

Az irodalomban leginkább elterjedt genomfelírási forma (pl. AABBDD, AABB vagy AAGG) helyett informatívabb a citoplazmát adó genomdonor genomjának előbbre sorolásával alkotott képlet, mert így az adott tetra- vagy hexaploid faj kialakulásának történetét is tükrözi a genomszerkezet (Kilian *et al.* 2007).

Van Slageren (1994) besorolása alapján, a búza (BBA^uA^uDD) mellett a *Triticum* nemzetség hexaploid faja még a *T. zhukovskyi* Men. et Ericz. ($GGA^lA^lA^mA^m$), míg a diploid *Triticum* fajok körét a *T. urartu* (A^uA^u) és az alakor, a *T. monococcum* (A^mA^m) alkotják. A vad alakor (*T. monococcum* L. subsp. *aegilopoides* (Link) Thell.) 12 000 évvel ezelőtti termesztésbe vonása következtében alakult ki az emberiség első kalászos gabonája, a termesztett alakor (*T. monococcum* L. subsp. *monococcum*). A tetraploid ($2n=4x=28$) *Triticum* fajok közé a BBA^uA^u genommal rendelkező – többek között a durumbúza és a termesztett tönke (*T. turgidum* subsp. *dicoccum* (Schrank ex Schübler) Thell.) őseként ismert – vad tönke (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides*), valamint a GGA^lA^l genomszerkezetű *T. timopheevii* tartozik. Ez utóbbi fajnak is van vad (*T. timopheevii* subsp. *armeniicum*) és termesztett (*T. timopheevii* subsp. *timopheevii* Zhuk.) alfaja, valamint ez utóbbinak egy csupasz szemű mutációja is, melyet először külön fajként (*T. militinae* Zhuk. et Migusch.) írtak le, majd 1979-ben botanikai fajta (*T. timopheevii* var. *militinae* Zhuk. et Migusch.) besorolást kapott (Hammer *et al.* 2011).

2.1.2 Kialakulás

A vad tönke és a vad *T. timopheevii* kialakulásához vezető első hibridizáció során feltehetően a szülőket képviselő 2 diploid faj utódjaiban redukálatlan ivarsejtek alakultak ki, melyek később duplázódott genomú tetraploid utódokat eredményeztek (Jauhar 2003). A vad tönkét (az alakorhoz hasonlóan) a Karacadağ hegység vidékén, a mai Törökország délkeleti régiójában vonták termesztésbe közel 10 000 évvel ezelőtt (Salamini *et al.* 2002). A következő hibridizációs lépés körülbelül 8 000 évvel ezelőtt következett be, amikor a vad tönke egyik termesztett alfaját, legnagyobb valószínűséggel a csupasz szemű durum búzát, a diploid kecskebúza, az *Aegilops tauschii* ($2n=2x=14$, DD) termékenyítette meg, és a tetraploidok kialakulásához hasonlóan a triploid hibridekben létrejött redukálatlan nő- és hímvarsejtek hexaploid utódot eredményeztek (Matsuoka és Nasuda 2004). A hibridizációt követően az új amfiploidban a nem kódoló,

kromoszóma- vagy genomspecifikus DNS szekvenciák már az első néhány generációban eliminálódnak, míg a természetben nem fellelhető amfiploidok esetében ez a folyamat lassabban játszódik le (Ozkan *et al.* 2001). Az eliminálódási folyamat eredményeként a homeológ genomok közötti genetikai hasonlóság csökken, mely elősegíti ezekben az allopoliploid fajokban a diploidokra jellemző homológ kromoszómapárosodást (Feldman *et al.* 1997). Az allopoliploidizáció során az új hibrid génműködésének harmonizációja is bekövetkezik (génélimináció, neofunkcionalizáció, géncsendesítés, génaktiválás), mely eredményeként az amfiploid (pl. az allohexaploid búza) teljes értékű, stabil, genetikai értelemben vett diploid fajként tud a természetben meghonosodni (Feldman és Levy 2009). Az allopoliploid növények által hordozott különböző genomok közötti transzlokációk kialakulása a faj evolúciós fejlődését segítik elő (Feldman és Levy 2005). Ezek a transzlokációk gyakran megtalálhatók az allopoliploid *Triticum* és *Aegilops* fajokban, melyet citogenetikai vizsgálatokkal is többen igazoltak (pl. Linc *et al.* 1999, Badaeva *et al.* 2007, Molnár *et al.* 2011).

Az első kalászos gabonák tudatos termesztése következtében a nem törékeny kalászorsójú, mutáns egyedek (*br* allél) aránya fokozatosan nőtt, míg végül a populációban már nem volt fellelhető a vad típusokra jellemző törékeny kalászorsójú, *Br* allélt hordozó egyed. Ezzel a nem tudatos szelekcióval alakulhatott ki a vad alakor, a vad tönke és a vad *T. timopheevii* termesztett változata. A tönke pelyvalevél- (*Tg* allél) és kalászalak-mutációja (*q* allél) következtében alakult ki a csupasz szemű (*tg* allél), tömött kalászu (*Q* allél), nagyobb szemméretű, jól csépelhető durumbúza (*brbrtqtgQQ*), majd a hexaploid kenyérbúza (Doebly *et al.* 2006, Li és Gill 2006, Gill *et al.* 2007, Charmet 2011, Sormacheva *et al.* 2015). A domesztikációt leginkább a *Q* gén mutációja tette lehetővé, mivel ennek nemcsak a kalászalakra van hatása, hanem egyféle elsődleges géneként a többi agronómiailag fontos tulajdonságot (csépelhetőség, nem törékeny kalászorsó, növénymagasság, kalászolási erély) szabályozó gén működését is befolyásolja (Faris *et al.* 2003, Sormacheva *et al.* 2015). A búzatermesztés területi terjeszkedésével, a hidegebb éghajlatokhoz adaptálódott populációkban megjelentek a vernalizációs (*Vrn1*, *Vrn2* és *Vrn3*) és nappalhossz (*Ppd*) érzékenységet mérséklő vagy megszüntető génmutációk, emiatt alakulhatott ki a búza tavaszi típusa, amely vernalizációtól és nappalhossztól függetlenül is képes generatív fázisba lépni (Peng *et al.* 2011).

2.1.3 A búza génforrásai

A növényfajokba gazdasági és nemesítési szempontból előnyös, új tulajdonságok építhetők be azok rokonsági körébe tartozó más fajokkal történő keresztezés útján (Heszky 1970). Ezeket a

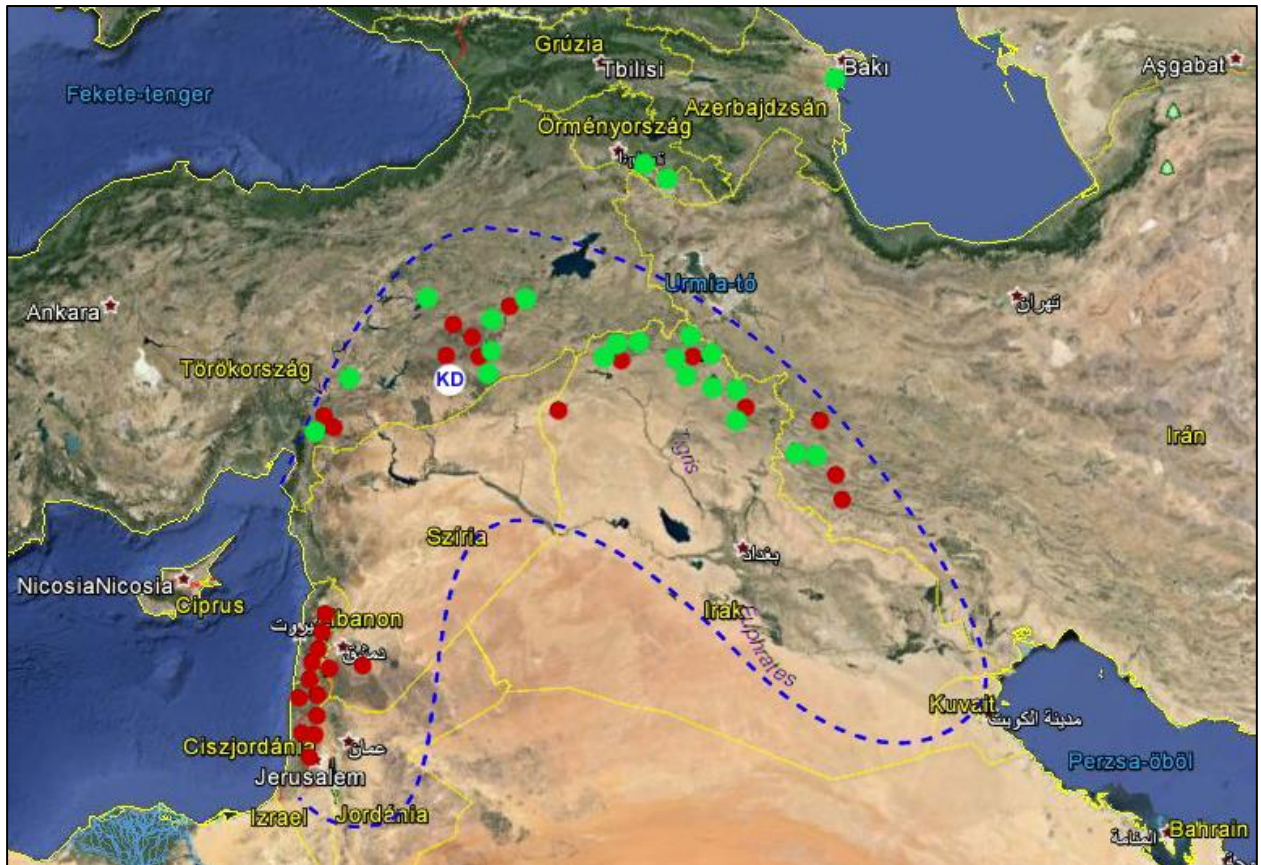
rokon fajokat ezért génforrásnak nevezzük, melyek a búza esetében három csoportba sorolhatók genomszerkezetük alapján (Friebe *et al.* 1996):

- A búza elsődleges génforrásai az alfajai (pl. *T. aestivum* subsp. *spelta* (L.) Thell. (tönköly), *T. aestivum* subsp. *compactum* (Host) MacKey, *T. aestivum* subsp. *macha* (Dekapr. & Menabde) MacKey) mellett a vele homológ genomot (B, A, D) hordozó di- és tetraploid fajok vad és termesztett változatai, melyekből a génátvitel elsősorban közvetlen keresztezés, homológ rekombináció, visszakeresztesés, valamint szelekció egymást követő elvégzésén alapszik. Ide soroljuk az A genommal rendelkező *T. urartu* és *T. monococcum* fajt, a BA^u genommal rendelkező tönkét és durumbúzát, valamint a *T. turgidum* L. faj többi alfaját, továbbá a D genom donorját, az *Ae. tauschii* fajt, melyekből már több, biotikus rezisztenciát javító gént sikerült beépíteni a búzába (Friebe *et al.* 1996).
- A búza másodlagos génforrásai közé soroljuk azokat a fajokat, amelyeknek legalább egy genomja homológ, illetve közel azonos a búzáéval. Ebbe a csoportba tartoznak az *Aegilops* nemzetség *Sitopsis* szekcióját alkotó diploid fajok (*Ae. speltoides*, *Ae. searsii* Feldman & Kislev ex K. Hammer, *Ae. bicornis* (Forsskål) Jaub. & Spach és *Ae. longissima* (Schweinf. & Muschl. in Muschl.) Eig), melyek a B genom ősének feltételezett S genom különböző evolúciós variánsaival rendelkeznek. Másodlagos génforrás még a B genommal szintén közel homológ G genomot hordozó tetraploid *T. timopheevii* vad és termesztett alfaja és a hexaploid *T. zhukovskyi* is, mely fajok A^t genomja, az alakor A^m genomjához hasonlóan, szoros hasonlóságot mutatnak a búza A^u genomjával, de nem azonosak vele. Itt jegyezném meg, hogy Friebe *et al.* (1996) logikája szerinti felosztás a *T. monococcum* másodlagos génforrások közé sorolását indokolná. Az elsődleges génforrásokhoz hasonlóan e fajokból is több hasznos rezisztenciagén származik, melyeket homológ rekombináció útján tudtak hasznosítani a búzanemesítők (McIntosh 1983).
- A búza harmadlagos génforrásai közé a vele nem homológ genomot hordozó *Triticeae* nemzetségcsoport fajai tartoznak, mint például a *Hordeum* (árpa), a *Secale* (rozs) vagy az *Agropyron* (tarackbúza) nemzetség tagjai. A nem homológ genomok közötti rekombináció hiánya miatt a kromoszóma-párosodást mesterségesen kell indukálni. A búzával való keresztezés után kialakuló embrió általában életképtelen, ezért embriókultúrát is szükséges alkalmazni, amely megnehezíti e fajok előnemesítésben való felhasználását.

2.2 *Triticum timopheevii*

2.2.1 Származása, jellemzői

A vad *T. timopheevii* feltehetően később alakulhatott ki, mint a vad tönke, és a „Termékeny Félhold” keleti élőhelyeit, valamint észak felé húzódva a Kaukázus hegység vidékét foglalta el (1. ábra) (Zohary 1999, Zohary *et al.* 2012).



1. ábra A *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* (piros) és a *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum* (zöld) génbanki tételeinek főbb gyűjtési helye a *Triticum* fajok bölcsőjeként ismert, Közel-keleti Termékeny Félhold (kék szaggatott) területén és az azt övező régióban. A di- és tetraploid *Triticum* fajok domesztikációjának helyét a KD jelzés (Karacadağ hegység) mutatja (Zohary 1999 nyomán, műholdkép forrása: Google Earth 2015)

Az *Aegilops speltoides* és a *Triticum urartu* hibridizációja a vad tönke kialakulásához hasonlóan, ám néhány százezer évvel később zajlott le, ezért az ezt követő DNS szekvencia-eliminálódási és génharmonizációs folyamat eredményeként létrejött tetraploid faj már kissé eltérő genomokkal (GGA¹A¹) rendelkezett, mint a vad tönke (BBA^uA^u). A tönke- és durumtermesztés folyamatos térnyerése elérte a Kaukázus hegység vidékét is, ahol a helyi flóra tagjaként a tönkeföldeken gyomként volt jelen a vad *T. timopheevii*, amely így bekerülhetett a termesztési körforgásba, és a

tönke szemekkel való közös kezelése és szelekciója következtében megtörténhetett a spontán domesztikációja (Nesbitt és Samuel 1996). A termesztett tönkében és alakorban bekövetkezett génmutációk a *T. timopheevii* fajban is lejátszódtak a spontán domesztikációja során, így alakult ki a mai Nyugat-Grúzia területén a termesztett *T. timopheevii* (más néven zanduri búza), majd ezt követően annak az alakorral alkotott természetes hibridje a *T. zhukovskyi* (Kilian *et al.* 2009). Egy másik elképzelés szerint a vad és a termesztett alfaj kialakulása két különböző hibridizációs folyamat eredménye, melyet Takahashi *et al.* (2010) evolúciós genomikai vizsgálattal igazoltak. Eszerint a termesztett alfaj, a vad alfajtól eltérően, nem az *Ae. speltoides* fajtól alakult ki, hanem a *Sitopsis* szekció másik három fajának egyikéből.

A *T. timopheevii*-t először Zhukovsky (1923) írta le, ám akkor még a vad tönke egyik változatának tartotta. Azonban a kalászáin, levelein és szárain megfigyelhető dús szőrözöttsége, valamint a szálkás kalászkok lapos, deltoid formája miatt öt évvel később már új fajként ismertette (2. ábra) (Zhukovsky 1928).



2. ábra A *Triticum timopheevii* vad (subsp. *armeniacum*, balra) és termesztett (subsp. *timopheevii*, jobbra) alfajának kalászái virágzás utáni (zöld) és érett (barna) állapotban

Ez az újonnan leírt faj hamar felkeltette a rezisztenciakutatók és a búzanemesítők érdeklődését is, mivel kimagasló ellenállóságot mutatott a búzát fertőző főbb gombabetegségekkel (lisztharmat, levélrozsdá, szárrozsdá) szemben (Pridham 1939, Shands 1941, Hart 1943), mely munkával egyidejűleg egy új genom, a G genom tanulmányozását is elkezdték (Allard 1949).

Mivel a *T. timopheevii* természetesi közege csak a Kaukázus hegység vidékét foglalja magába, ezért morfológiai és genetikai különbségek is csak kis mértékben alakulhattak ki az egyes változatai között (Badaeva *et al.* 1994a, Brown-Guedira *et al.* 1996). Ezzel szemben a vad őse (*T. timopheevii* subsp. *armeniacum*) nagyobb elterjedési területtel (1. ábra) és diverzebb genetikai háttérrel rendelkezik (Badaeva *et al.* 1994b, Brown-Guedira *et al.* 1996), azonban felhasználása a nemesítésben nehézkes, mivel a búzával alkotott hibridjei kevésbé fertilisek (Shands 1941).

2.2.2 Kialakulásának folyamata

A *T. timopheevii* kialakulását eleinte a tönke kialakulásával azonos folyamatnak vélték (monofiletikus elmélet), melynek csak a végén vált el egymástól a 2 faj a különböző kromoszóma-átrendeződések következtében (Gill és Chen 1987). Azonban a difiletikus kialakulást, azaz a különálló hibridizációs utat támasztják alá a 2 fajban lévő eltérő, fajspecifikus transzlokációk, illetve a heterokromatin-eloszlásban megfigyelt különbségek (Jiang és Gill 1994a, Salina *et al.* 2006, Badaeva *et al.* 2010). Több filogenetikai kutatás is igazolta, hogy a *T. timopheevii* G genomja az *Aegilops speltoides* S genomjából származik (Feldman 1966, Shands és Kimber 1973, Dvorak és Appels 1982, Nath *et al.* 1983, Dvorak és Zhang 1990, Jiang és Gill 1994b, Salina *et al.* 2006, Takahashi *et al.* 2010). Kloroplasztisz DNS (cpDNS) vizsgálatok nemcsak azt igazolták, hogy a *T. timopheevii* cpDNS-e hasonló az *Aegilops speltoides* fajéhoz (míg a tönkéhez ezekről eltérő), hanem egyben azt is, hogy nagy valószínűséggel az *Ae. speltoides* anyai szülőpartnerként, míg a *T. urartu* pollenadóként vett részt a *T. timopheevii* kialakulásában (Ogihara és Tsunewaki 1988, Jiang és Gill 1994b). Emellett molekuláris vizsgálatokkal is alátámasztották a tönke és a *T. timopheevii* különböző eredetét, mely következtében genomjaik kariotípusa is eltérő (Badaeva *et al.* 1986, Shcherban *et al.* 2004, Salina *et al.* 2006). Citológiai kutatások során a 2 tetraploid faj kromoszómáin végzett N- és C-sávozás, valamint fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) eredményeként kialakított kariotípusok is különbözőnek bizonyultak (Salina *et al.* 2006). Dobrovolskaya *et al.* (2009) kimutatták, hogy a vad tönke és a vad *T. timopheevii* kialakulása között eltelt közel 200 ezer év során az A genom donor *T. urartu* őseit ért mutációs változások, valamint az új amfiploidizáció

eltérő lefolyása eredményeként jöhettek létre az egyes A^u és A^t homeológ kromoszómák közötti különbségek. A *T. timopheevii* G kromoszómáinak vizsgálata során megállapították, hogy azok a búza B kromoszómáktól heterokromatikus szerkezetükben illetve a rajtuk található transzlokációs helyekben különböznek (Hutchinson és Miller 1982). Több kutatás is rávilágított a *T. timopheevii* kromoszómáin megtalálható fajspecifikus transzlokációkra, melyek populációtól függetlenül vannak jelen, és öröklődnek tovább (Jiang és Gill 1994a, Salina *et al.* 2006, Badaeva *et al.* 2010).

2.2.3 *Triticum timopheevii* és származékai a génbankokban

A búza B genomjával viszonylag jól konjugálódó G genommal rendelkező génbanki tételek nagymértékben növelhetik a búzanemesítési bázis genetikai diverzitását (Feldman 1966), ezért azok fenntartása és nemesítési programba való beépítése hozzájárulhat a búzafajták további fejlesztéséhez. A búza rokonsági körébe tartozó G genomú fajok különböző helyekről begyűjtött genotípusait, illetve a belőlük előállított szintetikus amfiploidokat (*Triticum timococcum* Kost., nom. nud. GGA^tA^tA^mA^m; *T. kiharae* Dorof. et Migusch., GGA^tA^tDD; *T. miguschovae* Zhir, GGA^tA^tDD; *T. flaksbergeri* Navr., GGA^tA^tBBA^uA^u; *T. fungicidum* Zhuk. (syn. *T. soveticum* subsp. *fungicidum* Zhebrak), BBA^uA^uGGA^tA^t; *T. timonovum* Heslot et Ferrary, GGA^tA^tGGA^tA^t) fenntartó európai génbankok közös adatbázisa (European Wheat Database) szerint a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpontjához (MTA ATK) tartozó Martonvásár Gabona Génbank rendelkezik a legtöbb G genomot tartalmazó génbanki tétellel (110 tétel: az adatbázis G genomú tételeinek 21%-a), igaz ebből 50 tételt a *T. timonovum* amfiploid bizonytalan származású törzsei tesznek ki (1. táblázat). A génbank egykori kurátora, Dr. Kovács Géza is kiemelt figyelmet fordított a *T. timopheevii* tételek és a belőlük előállított amfiploidok vizsgálatára és búzanemesítésben való hasznosíthatóságára, mely munka jelen kutatásunkat alapozta meg. A magyarországi G genomú tételek gazdag körét bővíti a tápiószelei Növényi Diverzitás Központban fenntartott 8 *T. timopheevii* tétel. A martonvásári génbankon kívül jelentős gyűjtemény található Németországban (95 tétel, IPK, Gatersleben), Oroszországban (81 tétel, VIR, Szentpétervár) és Csehországban (60 tétel, VURV, Prága).

A szintetikus fajokat figyelmen kívül hagyva, a G genommal rendelkező botanikai taxonok (*T. timopheevii* subsp. *timopheevii*, *T. timopheevii* subsp. *armeniacum*, *T. timopheevii* var. *militinae*, *T. zhukovskyi*) tekintetében az MTA ATK a cseh génbankkal (VURV) közel azonos számú tételt tart fenn, míg őket az IPK (85 tétel) és a VIR (76 tétel) előzi csak meg ezen a téren.

1. táblázat A G genomot tartalmazó *Triticum* fajokat (*Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii*, *T. timopheevii* subsp. *armeniicum*, *T. timopheevii* var. *militinae*, *T. zhukovskyi*) és amfiploidokat (*T. timococcum*, *T. kiharae*, *T. miguschovae*, *T. flaksbergeri*, *T. fungicidum*, *T. timonovum*) fenntartó főbb európai génbankok a European Wheat Database (EWDB) alapján (2015). Szürkével az MTA ATK jelenlegi tételszáma (tételszámok sorrendje a címben közölt sorrend szerint)

Génbankot fenntartó intézet (EWDB génbanki tételazonosító)		Összes tételszám (saját génbanki tételek arányában)	G - faj tételszám (taxononként)	G - amfiploid tételszám (taxononként)
MTA Agrártudományi Kutatóközpont (MTA ATK), Martonvásár, Magyarország (MVGB)	JELENLEGI	118 (0.88%)	55 (35/13/3/4)	63 (10/1/3/0/0/49)
	EWDB SZERINTI	110 (13.10%*)	56 (29/16/6/5)	54 (0/1/3/0/0/50)
Növénygenetikai- és Növénytermesztési Kutatóintézet (IPK), Gatersleben, Németország (IPK)		95 (0.33%)	85 (15/61/3/6)	10 (0/0/0/0/7/3)
N.I. Vavilov Növénytudományi Kutatóintézet (VIR), Szentpétervár, Oroszország (K)		81 (0.22%)	76 (41/32/2/1)	5 (0/0/1/1/2/1)
Növénytermesztési Kutatóintézet (VURV), Prága, Csehország (RICP)		60 (0.50%)	54 (5/46/1/2)	6 (0/1/1/1/2/1)
K. Malkov Növényi Génforrások Intézet (IRGR), Sadovo, Bulgária (BG)		40 (0.31%)	34 (22/5/3/4)	6 (1**/1/0/0/3/1)
Növénynemesítési és Növényaklimatizációs Intézet (IHAR), Radzików, Lengyelország (PL)		18 (0.17%)	17 (15/1/1/0)	1 (0/1/0/0/0/0)
Gabonatermesztési Kísérleti Intézet (CRA), Sant'Angelo Lodigiano, Olaszország (ITASAL)		16 (0.32%)	16 (7/2/0/7)	0
Állami Növénytermesztési Kutatóközpont Changins (Agroscope), Nyon, Svájc (RAC)		15 (0.19%)	14 (9/3/0/2)	1 (0/0/0/0/1/0)

* Búzanemesítési törzsgyűjtemény nélkül

** A *T. timococcum* tételről saját vizsgálataink kiderítették, hogy valójában *T. monococcum*

Az MTA ATK 110 tételes gyűjteménye azonban kisebb változáson is átesett az adatbázis (European Wheat Database) feltöltését követő több mint egy évtized során, melynek eredményeként a *T. timopheevii* termesztett alfajából hattal több, a vad alfajából és a *militinae* változatából 3-3-mal kevesebb, továbbá a *T. zhukovskyi* tételekből eggyel kevesebb és az amfiploidokból kilencel több van jelenleg a génbankban, mely utóbbi növekedés a jelen dolgozatban ismertető *T. timocococcum* törzsek előállításának az eredménye (1. táblázat). Világviszonylatban 37 génbank összesen 1901 *T. timopheevii* génbanki tételt tárol a subsp. *timopheevii* (607 tétel) és a subsp. *armeniacum* (1294 tétel) alfajból, továbbá 64 tételt a *T. zhukovskyi* fajból. A G genomot tartalmazó szintetikus amfiploid genotípusokból összesen 51 tételt őriznek ezek a génbankok (Knüpfner 2009).

2.2.4 Szerepe a rezisztencianemesítésben

Hazánkban a búza két legelterjedtebb biotróf gombabetegsége a vörös, vagy más néven levélrozsa (*Puccinia triticina* Eriks.) és a lizstharma (*Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici* Em. Marchal), melyek az asszimilációs felület csökkentése és élősködő életmódjuk miatt, járványos években 20-50%-kal is csökkenthetik a termést. Ennél is nagyobb termésvesztést okozhat a hazánkban ritkán fellépő sárgarozsa (*Puccinia striiformis* West.) járvány, mely legutóbb 2014-ben pusztított. A múlt század első feléig a legjelentősebb búzakárosító, a szárrozsa (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn.) Magyarországon jelenleg kisebb jelentőségű, de a járványoknak kitett régiókban 100%-os termés kiesést is okozhat. A nekrotróf kórokozók (pl. *Fusarium* spp., *Pyrenophora* spp., *Mycosphaerella* spp.) fitotoxinjaikkal gyengítik a gazdanövényt, ami az asszimilációs felület nekrotizálódását követően termésvesztésben ($\approx 40\%$) is megnyilvánul. A termés kiesés ennél még jelentősebb is lehet a kalászfuzárium (*Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc.) esetében, ugyanis a kórokozók által termelt toxinok emberi fogyasztásra alkalmatlanná tehetik a terményt. A biotróf és nekrotróf kórokozók ellen az egyik leghatásosabb védekezési mód a rezisztens fajták nemesítése, mivel a károsítás mértéke a környezeti feltételek mellett nagyban függ a gazdanövény genetikailag kódolt ellenálló képességétől is (Szunics és Szunics 2010). A búzatermesztés gazdaságossága, biztonsága és fenntarthatósága nagymértékben csak a rezisztencianemesítés folyamatos fenntartásával biztosítható, amelyet a különféle gombafajok újabb és újabb virulens rasszainak megjelenése tesz szükségessé (Láng és Bedő, 2006).

A búzával rokon fajok felhasználásával eddig már több, rozsdarezisztenciáért felelős gént sikerült beépíteni modern búzafajtákba. Napjainkig az *Aegilops* (*Ae. umbellulata* Zhuk. – *Lr9*;

Ae. speltooides – Lr35, Lr47, Lr51, Lr66, Sr32, Sr39 és Sr47; *Ae. tauschii* – Lr39, Lr40, Sr33, Sr45 és Sr46; *Ae. kotschy* Boiss. – Lr54; *Ae. sharonensis* Eig – Lr56; *Ae. triuncialis* (L.) Á. Löve – Lr58; *Ae. peregrina* (Hackel in J. Fraser) Maire & Weiller – Lr59; *Ae. geniculata* Roth – Sr53; *Ae. ventricosa* Tausch – Sr38; *Ae. comosa* Sm. in Sibth. & Sm. – Sr38), a *Thinopyrum* (*Th. ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey – Lr19, Lr24, Lr29, Sr24, Sr25, Sr26, Sr43 és Sr44), a *Secale* (*S. cereale* L. – Lr25, Lr26, Lr45, Sr27, Sr31 és Sr50), valamint a *Triticum* (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides* – Lr53, Lr64 és Sr2; *T. monococcum* – Lr63, Sr21, Sr22 és Sr35) nemzetséghez tartozó fajokból építettek be levélrozsa (Lr) és szárrozsa (Sr) rezisztenciagéneket a búza genomjába. A búza sárgarozsa ellenállóságát *S. cereale* (Yr9), *T. turgidum* (Yr15), *Ae. tauschii* (Yr24) és *Haynaldia villosa* (Yr26) eredetű rezisztenciagénekkel javították (Purnhauser 2006, KOMUGI 2015). Búzalisztharmat rezisztenciáért felelős géneket is sikerrel építettek be a búzafajtákba *Aegilops* fajokból (*Ae. speltooides* – Pm12, Pm32 és Pm53; *Ae. longissima* – Pm13; *Ae. tauschii* – Pm19, Pm34 és Pm35; *Ae. geniculata* – Pm29), valamint a *S. cereale* (Pm7, Pm8, Pm17 és Pm20), a *Th. ponticum* (Pm40, Pm43 és Pm51), a *T. turgidum* (Pm4, Pm5, Pm16, Pm26, Pm31, Pm36, Pm42, Pm49 és Pm50), a *T. monococcum* (Pm25) és a *Haynaldia villosa* (Pm21) fajokból (Bennett 1984, KOMUGI 2015). Ezek közül is kiemelkedik a hazai viszonyok között teljes védelmet adó Pm21 gén, melyet a 6AL/6VS transzlokációval építettek be búzába, és az így kapott búzatörzsek (pl. *T. aestivum* 'Nannong-02Y23') felhasználásával Martonvásáron is folyik egy ígéretes rezisztencianemesítési munka (Komáromi *et al.* 2014).

A búzanemesítők már több évtizede használják a *T. timopheevii* vad és termesztett alfaját a különböző gombabetegségek elleni kiemelkedően jó ellenállóképességük miatt, melynek eredményeként már több, lisztharmat-, levélrozsa- és szárrozsa elleni rezisztenciagént sikerült beépíteni a modern búzafajtákba. Ezidáig négy lisztharmat-, négy levélrozsa- és három szárrozsa-rezisztenciát kódoló, *T. timopheevii* eredetű gént, valamint néhány nagy hatású, kvantitatív tulajdonságot meghatározó lokuszt (QTL) írtak le búzával alkotott hibridekben. A rezisztencianemesítők többsége első lépésben *T. timopheevii* kromoszómákat hordozó szubsztitúciós vonalakat állított elő búza háttérben, majd ezeket használva vitt át új rezisztenciagéneket a búzába (Brown-Guedira *et al.* 1996, Badaeva *et al.* 2000, Gordeeva *et al.* 2009). Számos kutatás igazolta, hogy a búza × *T. timopheevii* hibridekben a lisztharmat-rezisztenciát főként a 2G és 6G kromoszómák, vagy azok részeinek beépülése, míg a levélrozsdával szembeni ellenállóságot a 2A^t, 2G, 5G és 6G kromoszómák jelenléte vagy ezek meghatározott szakaszainak transzlokálódása okozza (pl. McIntosh és Gyárfás 1971, McIntosh

1983, Badaeva *et al.* 2000, Järve *et al.* 2000, Brown-Guedira *et al.* 2003, Gordeeva *et al.* 2009, Leonova *et al.* 2010). A lisztharmat és rozsdabetegségek mellett a búza kalászfuzárium és egyéb, levélfoltosságot okozó betegségek leküzdésére is folynak kutatások a *T. timopheevii* felhasználásával (Ma és Hughes 1995, Masár *et al.* 2010).

2.2.4.1 Lisztharmat rezisztencia

A *T. timopheevii* felhasználásával az első lisztharmat elleni géneket egy 'Illinois No.1' × 'Chinese Spring' populációból szelektált búzatörzsbe építették be (Allard és Shands 1954), melyben később Jørgensen és Jensen (1972) az 5D kromoszómára térképezett *Pm2* gén (McIntosh és Baker 1970) mellett egy új gént is azonosított, a 2B kromoszómán *Pm6* néven. A *Pm6* *T. timopheevii* eredetét támasztja alá, hogy a korábban *T. timopheevii* kromatint tartalmazó nemesítési búzatörzsekben leírt *Sr36* szárrozsdarezisztencia génnel kapcsolatban öröklődik (McIntosh és Gyárfás 1971). Új, *T. timopheevii* eredetű, lisztharmat ellenállóságért felelős gént Järve *et al.* (2000) egy Badaeva *et al.* (1995) által létrehozott, 6G kromatint hordozó búzatörzsben írtak le *Pm27* néven (6B centroméra közelében). Emellett a búza 7A kromoszómájára is sikerült beépíteni és térképezni két újabb *T. timopheevii* eredetű lisztharmat-rezisztencia gént, melyek a *Pm37* (Perugini *et al.* 2008), illetve az ideiglenes *MIAG12* (Maxwell *et al.* 2009) elnevezést kapták. Csírákori rezisztencia mellett felnőttkori lisztharmat rezisztenciáért is felelős nagy hatású QTL-t azonosítottak *T. timopheevii* var. *militinae* eredetű transzlokációban a 4A kromoszóma hosszú karján egy búza háttérben előállított térképezési populációban (Jakobson *et al.* 2006), amelyet később *Q_{Pm.tut-4A}* néven publikáltak (Jakobson *et al.* 2012).

2.2.4.2 Levélrozsdarezisztencia

Tyryshkin *et al.* (2006) által vizsgált 540 *Triticum* génbanki tétel közül a *T. timopheevii*, a *T. zhukovskyi* tételek többsége, valamint négy vad alakor tétel mutatott nagyfokú csírákori ellenállóságot a levélrozsdával szemben. Búza levélrozsdája elleni rezisztenciát kiváltó gént (*Lr18*) először a búza 5B kromoszómájába építették be a *T. timopheevii* felhasználásával (McIntosh 1983), majd Brown-Guedira *et al.* (2003) azonosítottak egy újabb rezisztencia gént többszörösen visszakeresztezett búza × *T. timopheevii* hibridekben a 2B kromoszóma hosszú karján, és *Lr50* névvel publikálták. E két génen kívül, hasonlóan létrehozott introgressziós törzsekben sikerült még 2 új levélrozsdarezisztenciát biztosító gént azonosítani a 2A (*LrTt1*) és az 5B (*LrTt2*) kromoszóma hosszú karján (Leonova *et al.* 2004, Leonova *et al.* 2011). *T.*

timopheevii eredetű, levélrozsdá rezisztenciát javító kromoszómaszakaszt azonosítottak búza × *T. timopheevii* introgressziós vonal 5A kromoszómáján, ahol a gén térképezése jelenleg is folyik (Shulembayeva és Tokubayeva 2014). Davoyan és Ternovskaya (1996) egy *T. timopheevii* var. *militinae* és egy *Ae. tauschii* keresztezésével előállított amfiploid (*T. miguschovae*) segítségével vitt át levélrozsdá ellenállóságot búzába, és egy új 7G eredetű *Lr* lokuszt azonosítottak a recipiens fajta 7B kromoszómáján monoszómás sorozattal, azonban a gén pontos leírása még nem történt meg. Magyarországon is felkeltette a kutatók érdeklődését a *T. timopheevii* gombabetegségek elleni rezisztenciája, melynek kiaknázásának egyik első eredményeként 2n=70 kromoszómás allopoliploid búza × *T. timopheevii* növényeket állítottak elő, majd azok redukálódott, oktoploid (2n=56) utódait levélrozsdá-rezisztencia előnemesítési programokban használták fel (Belea 1986, Horváthné Uhrin 2013).

2.2.4.3 Szárrozsdá rezisztencia

Allard és Shands (1954) által vizsgált 2 búza × *T. timopheevii* introgressziós törzs ('CI12632' és 'CI12633') kiváló szintű rezisztenciával rendelkezett a búza szárrozsdájával szemben. Ehhez hasonlóan az Ausztráliában előállított 'Timvera' és az USA-ban nemesített 'Arthur' ('CI12633' származék) búzafajták és származékaik is a *T. timopheevii* fajtól örökölték szárrozsdá-ellenállóságukat (Watson és Luig 1958, Patterson *et al.* 1974). Később *T. timopheevii* génbanki tételek vizsgálata során azonosították ezeket a szárrozsdá-ellenállóságért felelős géneket, melyeket *Sr36*, valamint *Sr37* néven írtak le (McIntosh és Gyárfás 1971, McIntosh 1988). Génbanki anyag vizsgálata során azt is feljegyezték, hogy a termesztett alfaj (subsp. *timopheevii*) tétéleinek betegség-ellenállósága nemcsak a szárrozsdával, hanem a levél- és sárgarozsdával szemben is jobb volt, mint a vad alfajhoz (subsp. *armeniicum*) tartozó tétéleké (McIntosh és Gyárfás 1971, Tomar *et al.* 1988). A rezisztens búza × *T. timopheevii* törzsekben az *Sr36* a 2B kromoszóma rövid karján levélrozsdá-rezisztenciát kódoló, durum búza eredetű *Lr23* génnel, valamint a lisztharmat-rezisztenciáért felelős, *T. timopheevii* fajból származó *Pm6* génnel kapcsolatosan fordul elő (McIntosh és Dyck 1975, Dyck 1992), míg az *Sr37* gént a 4G kromoszómáról a 4B kromoszómára átépült kromoszómaszegmensben lokalizálták (McIntosh és Gyárfás 1971, Dvorak 1983). Az *Sr36* gént hordozó búzatörzsek eleinte rezisztensnek bizonyultak a legtöbb szárrozsdá génnel szemben virulensnek mutakozó, újonnan megjelent 'Ug99' szárrozsdá rasszal szemben (Pretorius *et al.* 2000), azonban néhány éven belül ez a gén sem tudott teljeskörű ellenállóságot biztosítani e rendkívül virulens és gyorsan terjedő patogénnel szemben (Jin *et al.* 2007). Az *Sr37* gént hordozó búza × *T. timopheevii* introgressziós

törzsek még teljes mértékben ellenállnak az 'Ug99' eredetű patotípusok fertőzésének, azonban hátrányuk, hogy a gént sok, a búzanemesítés számára hátrányos tulajdonsággal kapcsoltan sikerült csak átvinni a búzába, ezért az idegen kromatin méretének csökkentése jelenleg az egyik legfontosabb feladat (Xu *et al.* 2008). Dyck (1992) új *Sr* gént épített be búzába vad *T. timopheevii* felhasználásával, amelyet a 2B rövid karjára, közvetlenül az *Sr36/Lr23/Pm6* génklaszter közelébe térképezett, és *Sr40* elnevezéssel publikált. Ez a gén is hatékony védelmet nyújt az 'Ug99' szárrozda rasszal szemben (Xu *et al.* 2008). A hazánkban fellelhető szárrozda-rezisztens, *T. timopheevii* eredetű *Sr36/Pm6* génklasztert hordozó búzafajták többségének pedigréjében megtalálható az amerikai 'Arthur' búzafajtából szelektált 'Arthur 71' fajta (Patterson *et al.* 1975), melyet a szegedi Gabonakutató nKft. búzanemesítői nagyobb arányban használtak, mint a martonvásári MTA ATK nemesítői (Purnhauser *et al.* 2011).

2.2.4.4 Kalászfuzárium rezisztencia

A búza kalászfuzáriuma világszinten jelentős kórokozója a kalászos gabonáknak. Az ellene való védekezést nehezíti, hogy a többi betegség-ellenállósággal ellentétben a fuzárium-rezisztencia nem monogénes tulajdonság, hanem több genetikai faktor együttesen határozza meg, melyek hatását a környezet is nagymértékben befolyásolhatja (kvantitatív tulajdonság). A kalászfuzárium nemcsak termőképesség csökkenést okozhat, hanem a *Fusarium* nemzetségbe tartozó gombafajok által termelt toxinok (főként trichotecén-vázás és ösztrogénhatású vegyületek) emberi fogyasztásra alkalmatlanná tehetik a fertőzött termést (Mesterházy 2006). Igazán hatékony kémiai védekezés nincs ellene, ezért a legjobb védelmet a fajták toleranciájának növelése jelentheti (Cai *et al.* 2005). Nagyon kevés részlegesen rezisztens tavaszi búzafajta (pl. 'Sumai#3', 'Nobeokabozu', 'Frontana', 'Praag 8') áll a nemesítők rendelkezésére (Mentewab *et al.* 2000, Mesterházy 2006), ezért az 1980-as évek óta számos búzával rokon vad faj fuzáriumellenállóságát vizsgálták. A kalászfuzáriummal szembeni I. és II. típusú rezisztencia, azaz a fuzárium behatolásának és a kalászorsón keresztüli terjedésének mértéke adja a növény szántóföldi rezisztenciáját, mely tulajdonság a II. típusú rezisztencia külön értékelésével tovább pontosítható (Puskás 2013). Az adott genotípus ellenállóságának kialakításában a két rezisztenciatípus közel azonos jelentőségű (Bai és Shaner 2004), azonban a II. típusú rezisztenciaforrás az őszi búzák körében még a szántóföldi rezisztenciánál is korlátozottabb mértékben áll a nemesítők rendelkezésére (Puskás 2013), amely a búza génforrásainak felhasználásával nagymértékben növelhető. A búza harmadlagos génforrásainak (pl. *Agropyron*, *Elymus*, *Secale* és *Thinopyrum* fajok) többsége jó szintű ellenállósággal rendelkezik, azonban a

rezisztencia búzába történő átvitelének nehézségét a tulajdonság kvantitatív jellege méginkább fokozza (Cai *et al.* 2005). A génátvitel hatékonyabban végezhető el a búzával közelebbi rokonságban álló fajokból. A *Triticum* fajok vizsgálata során megállapították, hogy a *T. timopheevii*, a *T. turgidum* és a *T. monococcum* fajokban azonosíthatók kalászfuzárium-rezisztens genotípusok, míg az *Aegilops* fajok közül az *Ae. tauschii* volt leginkább ellenálló (Fedak *et al.* 2004, Cai *et al.* 2005). Ezidáig az idegen faj alapú, fuzáriummal szemben rezisztens fajtaelőállításban leginkább a vad tönke genotípusait használták fel, azonban egy, a *T. timopheevii*-t is a pedigrijében hordozó búzafajta ('Stoa') 2A kromoszómájának hosszú karján mérsékelt rezisztenciát okozó QTL-t (*QFhs.ndsu-2A*) azonosítottak, amely a *T. timopheevii* fajból is származhat (Masár *et al.* 2010). A búza vad rokon fajai, köztük a *T. timopheevii* és az alakor, még hatalmas, kiaknázatlan rezisztenciataralékokkal rendelkeznek a kalászfuzáriummal szemben is.

2.2.4.5 Tartós- és felnőttkori rezisztencia

Az egygénes (rasszspecifikus) rezisztencia kiváló szintű védettséget biztosíthat a kórokozó populációban megtalálható patotípusok kisebb, vagy nagyobb részével szemben, azonban az ilyen gének, az ezeket hordozó fajták vetésterületének növekedésével rövid időn belül elveszíthetik hatékonyságukat, azaz letörhetnek. Egy búzafajta tartós rezisztenciáját több gén kombinálásával (piramidálás) és/vagy nem rasszspecifikus gének beépítésével lehet elérni, azonban a betegség-ellenállóságot a rezisztenciagének közötti interakció is befolyásolhatja (Komáromi *et al.* 2006, Kolmer *et al.* 2009). A rezisztenciagének egy része nemcsak csíranövénykori, hanem felnőttkori ellenállóságot is biztosít néhány vagy sok patotípussal szemben, míg néhány gén esetén a rezisztencia csak felnőttkorban fejeződik ki, amit felnőttkori rezisztenciának nevezünk (APR: adult plant resistance). A napjainkig a búzában azonosított kisszámú, felnőttkori rezisztenciáért felelős gén/QTL többsége nem rasszspecifikus (horizontális rezisztencia), mely hatására a fertőződés hosszabb látens periódusban, továbbá enyhébb tünetekben nyilvánul meg, de tartós rezisztenciát eredményez. Ezt a tünettypust a szakirodalomban gyakran lassú rozsdásodásnak, illetve lassú lisztharmat-fertőződésnek is nevezik. A levélrozda rezisztenciáért felelős DNS szekvenciák közül ide tartozik a búza 7D kromoszómájának rövid karján lévő *Lr34* gén, az 1B kromoszóma hosszú karjára térképezett *Lr46* gén, valamint egy, az 1B rövid karján lévő nagyhatású QTL (Kolmer *et al.* 2009). A lisztharmattal szembeni APR kutatása során eddig 1-1 QTL-t azonosítottak az 1B (*QPm.vt-1B*), 2A (*QPm.vt-2A*) és a 2B (*QPm.vt-2B*) kromoszómán (Liu *et al.* 2001), illetve egy további QTL-t

az 5D kromoszmán, és egy gént (*MIRE*) a 6A kromoszóma hosszú karjának disztális részén (Chantret *et al.* 2000). Az idegen fajok felhasználása az APR kutatásban egyre inkább előtérbe kerül, melynek egyik kiinduló pontja volt egy *Ae. tauschii* eredetű levélrozsa APR-ért felelős gén azonosítása egy szintetikus hexaploid búzatörzsben (Dyck és Kerber 1970). A búza rokon vad fajait célszerű minél szélesebb körben bevonni a levélbetegségekkel szembeni APR kutatásba, hiszen ezek a fajok jelentős genetikai tartalékokkal rendelkezhetnek ezen a téren is. A csíranövénykori rezisztenciavizsgálat és a szántóföldi felvételezések együttes kiértékelése rávilágíthat a vizsgált idegen faj adott kórokozóval szemben mutatott APR tulajdonságára, mely később célzottan kiaknázzható lehet az előnemesítés során.

2.2.4.6 Egyéb biotikus és abiotikus rezisztencia

Az eddig leírt rezisztenciagének mellett még további, eddig nem azonosított gombabetegség-rezisztenciát okozó géneket is hordozhat a *T. timopheevii* (Järve *et al.* 2002, Leonova *et al.* 2011), hiszen például a búzában eddig publikált több mint ötven szárrozsa gén közül húsznál is több származik valamelyik vad rokon fajból, amelyek közül 12 hatékonyan áll ellen az Ug99 rassznak is, és ezek közül eddig csupán hármat írtak le *T. timopheevii* eredetűként (Xu *et al.* 2008, KOMUGI 2015). Továbbá a *T. timopheevii* felhasználásával Ma és Hughes (1995) durumbúza 3A kromoszómájára épített be és azonosított egy levél- és pelyvavelevélfoltosság (*Phaeosphaeria nodorum* (E. Müll.) Hedj., anamorf: *Stagonospora nodorum* (Berk.) Castell. & Germano) elleni rezisztenciát okozó gént (*SnbTM*). Tyryshkin *et al.* (2006) által vizsgált 540 *Triticum* génbanki tétel közül csupán 3 *T. timopheevii* tétel volt rezisztens a *Stagonospora* fertőzéssel szemben, amely jól mutatja e gén jelentőségét.

A biotikus stresszek elleni rezisztencia mellett több *T. timopheevii* genotípus kiváló szárazságtűréssel is rendelkezik (Farshadfar 1995), amely – a globális felmelegedés káros hatásait is szem előtt tartva – fontos búzanemesítési alapanyaggá teheti ezt a fajt.

2.2.5 Felhasználása a technológiai minőség javítására

Az alapvető tápanyagok (pl. szénhidrát, fehérje, ásványi anyagok) mellett a *T. timopheevii* viszonylag nagy ezerszem tömegű szemtermése – hasonlóan a többi *Triticeae* fajhoz – fontos másodlagos anyagcsere termékeket (karotinoidok, flavonoidok, fenolsavak) is tartalmaznak, amelyek a belőlük készült sütőipari termékek végső minőségét és antioxidáns tartalmát is növelhetik (Engert és Honermeier 2011). Azonban a *T. timopheevii* fenolsav tartalma elmarad a tönkében és az alakorban mért értékektől és a hexaploid búzáéval közel azonos (Engert és

Honermeier 2011), vagy egyes esetekben kisebb is ennél (Giambanelli *et al.* 2013). Giambanelli *et al.* (2013) a *T. timopheevii* egy grúz tájfajtáját vizsgálták (*T. timopheevii* var. *rubiginosum*) különböző bioaktív komponensek tekintetében őszi és tavaszi vetésben, melynek eredményeként nagyobb össz-tokol (tokoferol, tokotrienol) tartalmat találtak a vizsgált búza és durumbúza genotípusokhoz, valamint a tönke és alakor genotípusok többségéhez viszonyítva. Ez az eltérés nem volt szignifikáns, azonban a *T. timopheevii* tokotrienol/tokol aránya kimagasló volt. Karotinoidok tekintetében a legnagyobb mennyiségben a lutein pigment volt megtalálható a Giambanelli *et al.* (2013) által vizsgált különböző fajokban, amiből az alakor és a durum egyes genotípusai mellett a *T. timopheevii* is kimagasló mennyiséget tartalmazott.

Fehérje és mikroelem kutatásai eredményeként Abugalieva *et al.* (2011) nagy fehérje- (16% <) és vastartalomról (60 mg/kg <) számoltak be *T. timopheevii* génbanki tételek és azok búzával alkotott hibridjeinek vizsgálata eredményeként. Méréseik alapján a csupasz szemű változatban (*T. timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *militinae*) mutatták ki a legnagyobb értékeket (20% fölötti fehérjetartalom).

A búzaszem endospermiumában raktározott, és ezeken belül is főként a sikért alkotó fehérjéknek nagy szerepe van a liszt sütőipari minőségének kialakításában (rugalmasság, nyújthatóság). A siker minőséget nagymértékben meghatározzák a nagy (HMW: high molecular weight) és a kis molekulásúlyú (LMW: low molecular weight) glutenin alegységek. Az ezeket kódoló lokuszok (*Glu*) az 1-es homeológ kromoszómákon található, azonban a búzafajtákban megfigyelhető variabilitás korlátozott ezen a téren, amit a rokon fajok felhasználásával lehet növelni (Li *et al.* 2007). A *T. timopheevii* 1A¹ kromoszómáján ezidáig két HMW glutenin alegységet kódoló allélt (Wan *et al.* 2002), míg az 1G kromoszómáján 8 allélt (Li *et al.* 2007) azonosítottak. Újabban az LMW glutenin alegységeket kódoló régiók kutatása során két gént (*TTLMW-m1* és *TTLMW-m2*) azonosítottak G kromoszómán lévő *Glu-G3* lokuszon (Zhang *et al.* 2010). Ezek az új gének/allélek, a búzanemesítési programba történt bevezetésüket követően hozzájárulhatnak a technológiai minőség javításához, esetleg speciális célra fejlesztett termékek előállítására alkalmas búza genotípusok nemesítéséhez.

A *T. timopheevii* beltartalmi paramétereit eddig kevesen kutatták, és még kisebb a búzanemesítésben történt felhasználásával kapcsolatos publikáció. Azonban a *T. timopheevii* egyik genotípusán (*Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* MVGB845) végzett előzetes méréseink alapján is elmondható, hogy ez a genotípus a búzához képest kiemelkedően nagy α -tokoferol-, α -tokotrienol- és mikroelem (Se, Mn, K) tartalommal

rendelkezik, melyet az egészségvédő, magas minőségű élelmiszerek előállítása terén is lehetne hasznosítani a jövőben.

2.2.6 Felhasználása a hibridbúza nemesítésben

A biotikus rezisztenciára történő nemesítés mellett a *T. timopheevii* hasonlóan intenzíven kutatott tulajdonsága a citoplazmás hímsterilitás (CMS: cytoplasmic male sterility), amivel a búza vetőmagpiacának – és így közvetetten a nemesítésének – a gazdasági fenntarthatósága növelhető. Emellett nem elhanyagolható szempont, hogy a heterózis-hatás következtében a hibridbúzában 5-15%-os terméstöbblet várható, valamint a hibridek alkalmazásával a szélsőséges környezeti feltételek között termesztett búza termésstabilitása is javítható. Ezen előnyöktől ösztönözve a hibridbúza előállítás tanulmányozásának 1970-es és 1990-es évek közötti első hullámát követően az elmúlt években ismét a kutatás és a gyakorlati felhasználás homlokterébe került, melynek eredményeként a világon 300 000 ha körülire nőtt a hibridbúza termőterülete (Longin *et al.* 2012). A termőterület döntő többségén (Európában) vegyszerrel előidézett hímsterilitásra (CHA: chemical hybridization agent) alapoznak, azonban a kínai terület felén (15 000 ha) és az Indiában található 35 000 hektáron a *T. timopheevii* CMS tulajdonságát használó hibrideket termesztnek (Singh *et al.* 2010, Longin *et al.* 2012). A körülbelül 20 lehetséges, búzával rokon faj közül (pl. árpa, rozs) a CMS technológia során legtöbbször a *T. timopheevii* (T-CMS), az *Aegilops kotschyi* (K-CMS) vagy az *Aegilops variabilis* Eig. (V-CMS) citoplazmáját használják fel (Whitford *et al.* 2013, Singh *et al.* 2015). Az 1960-as években kialakított T-CMS technológia alapja, hogy a *T. timopheevii* citoplazmájában lévő, pollensterilitást okozó mitokondriális DNS-mutáció következtében életképes pollent csak a sejtmagban lévő fertilitást helyreállító (restorer) gének (*Rf*) fehérjetermékeinek segítségével lehet elérni (Wilson és Ross 1962). A búza genotípusok nagy variabilitást mutatnak a *T. timopheevii* citoplazma okozta hímsterilitás helyreállítása tekintetében. Kezdetben 2-3 fő restorer lokuszt azonosítottak a búzában (Bahl és Maan 1973), azonban az intenzív kutatómunkának köszönhetően jelenleg 8 db T-CMS-t helyreállító *Rf* gént (*Rf1-1A*, *Rf2-7D*, *Rf3-1B*, *Rf4-6B*, *Rf5-6D*, *Rf6-5D*, *Rf7-7B*, *Rf8-2D*) sikerült térképezni a búza különböző kromoszómáin (Sinha *et al.* 2013). A gének pontos funkciója nem teljesen ismert, de feltehetően az *Rf* gének többsége PPR (pentatricopeptid repeat) tartalmú fehérjéket kódol, amelyek képesek meggátolni a tapétum szövet zavarai miatt kialakuló steril pollenek képződését. Több domináns *Rf* allél együttes expressziója nagyban fokozza a teljes fertilitás visszaállításának hatékonyságát, továbbá a heterózis hatás mértékét is növeli (Whitford *et al.* 2013). A *T. timopheevii* alapú hibridbúza

nemesítés hosszadalmas folyamat, mert nemcsak a *T. timopheevii* sejtmagját kell többszöri visszakeresztezés útján kicserélni egy kívánt búzafajtára (a citoplazma így *T. timopheevii* eredetű marad), hanem ezzel párhuzamosan egy távolabbi heterózis csoportból választott búzafajtába minél több, T-CMS-t helyreállító *Rf* gént kell beépíteni homozigóta domináns formában (Zhou *et al.* 2005). A CMS-alapú hibridbúza nemesítés szűk keresztmetszete, hogy csak kevés hatékony *Rf* gén(ek)e)t tartalmazó búzatörzs áll a nemesítők rendelkezésére, igaz az *Rf* génekre történő genetikai marker alapú szelekció (MAS: marker-assisted selection) nagymértékben segítheti a nemesítői munkát ezen a téren is. Jelenleg azonban az *Rf* gének felére (*Rf3* (1BS), *Rf4* (6BS), *Rf6* (5DL) és *Rf8* (2DS)) van csak használható mikroszatellit marker. A CMS technológia további hátránya, hogy a fertilitás helyreállításának mértéke nagyban függ a környezeti tényezőktől (hőmérséklet), amely az F₁ hibridvetőmag terméscsökkenésében nyilvánulhat meg (Sinha *et al.* 2013, Whitford *et al.* 2013). Doig *et al.* (1975) a kalászban csírázás megnövekedett előfordulását mutatták ki T-CMS alapú búzatörzsekben, ahol e negatív tulajdonság mértéke nagyban függött a sejtmagot adó búza genotípusától. A CMS technológia kiemelt előnye azonban, hogy a vetőmagelőállítás során nincs szükség a CHA technológiánál használt sávos vetésre, és csupán 5%-nyi pollenadó növény szórt elrendezése is elegendő lehet a sikeres vetőmagelőállításhoz (Whitford *et al.* 2013). A hexaploid búzán kívül intenzív kutatások folynak durumbúzában és tritikáléban is a *T. timopheevii* alapú hibridek előállítására (Longin *et al.* 2012, Stojalowski *et al.* 2013).

2.3 A genetikai diverzitás bővítése idegen fajú keresztezéssel

2.3.1 Interspecifikus hibridizáció

Az első ismert mesterséges növényi fajhibridet Fairchild állította elő 1717-ben szegfű fajok keresztezésével, majd ezt követően Haartman (1751-ben), Linné (1758-ban) és Koelreuter (1760-ban) számolt be újabb fajhibridekről műveikben (Belea 1986). Az első *Triticum* fajhibridet 1861-ben ismertette Hallet, de Cifferi (1955) szerint Bellardi és Barelle botanikusok már az 1800-as évek első évtizedében is előállítottak hibrideket *Triticum* fajokból.

A búzatermesztőknek és feldolgozóknak fontos tulajdonságok nagymértékben javíthatók a nemesítési bázis genetikai diverzitásának szélesítésével, amelynek az egyik leghatékonyabb útja a búzával rokon vad fajokkal végzett keresztezés útján nyert, új hasznos géneket hordozó faj- és nemzetséghibridek előállítása. Az első ilyen irányú keresztezéseket Wilson hajtotta végre tarackbúza (*Agropyron* sp.) és rozs (*Secale* sp.) genotípusok felhasználásával 1876-ban (Lángné Molnár 2006). A rozssal végzett intenzív keresztezések eredményeként születhetett meg az első

köztermesztésben hasznosított szintetikus gabonafaj, a tritikálé (Kiss 1968, Bóna 2004), valamint terjedhetett el az 1RS.1BL transzlokáció a világ több száz búzafajtájában (Bedő *et al.* 1993), ami a martonvásári eredetű búzafajták nagy hányadában megtalálható (Kőszegi *et al.* 2000, Purnhauser *et al.* 2011).

Az idegen fajú keresztezést követő nemesítési munka során fontos feladat a rokon fajból származó kedvező tulajdonságok rögzítése és a kedvezőtlenek eliminálása. Előnyös, ha a recipiens genotípusban az átvinni kívánt tulajdonságért felelős gén(eke)t hordozó transzlokáció minél kisebb méretű. A génátviteli munka első lépéseként leggyakrabban a szülőket adó két faj hagyományos keresztezését követően amfiploidot állítanak elő. Ezekből addíciós majd szubsztitúciós vonalakat hoznak létre és ezekre alapozva történik a nemesítés folyamatában hasznosítható források előállítása. Az utóbbi évtizedekben kidolgozott, az idegen kromatin kimutatására alkalmas eljárások (pl. GISH) sikeresen alkalmazhatók az idegen fajokkal végzett keresztezések eredményeként létrejött utódok kutatásában (Schwarzacher *et al.* 1989, Schwarzacher *et al.* 1991). Ezek a keresztezések a genetikai bázis szélesítése mellett az evolúciós kutatásokhoz is nagymértékben hozzájárultak (McFadden és Sears 1946). Hazánkban először Obermayer Ernő állított elő búza × rozs hibrideket (1917-ben) a mosonmagyaróvári Növénynemesítő Kísérleti Intézetben, mely munkát Györffy Barna és Kiss Árpád folytatta (Kiss és Rédei 1952). A XIX. század második felében már egyre több kutató foglalkozott a fajkeresztezés elméleti (búza evolúciója) és gyakorlati (búzanemesítés) hasznosíthatóságával. Ennek okán az 1950-es évek elején az idegen fajú keresztezések nagy lendülettel indultak meg Martonvásáron (MTA ATK) is, ahol elsősorban rezisztencianemesítési célokat szolgáltak (Rajháthy 1955). Ezt a munkát a Szegedi Biológia Központban az 1970-es évektől folyó evolúciós genetikai kutatások egészítették ki később (Belea 1986).

2.3.2 Rokon fajok keresztezhetősége

Az idegen fajú génátvitel fajkombinációnként eltérő hatékonyságú lehet, mivel a keresztezhetőséget nagyban befolyásolja a genotípus, amely virágzási időben, a keresztezés irányában, ploidfokban és genomszerkezetbeli eltérésekben, valamint inkompatibilitásban, életképtelen vagy steril F₁ utódnemzedékekben nyilvánulhat meg (Belea 1986). Az erős genotípushatás mellett a keresztezés sikerességére a környezeti tényezők is hatással lehetnek (Sirrka *et al.* 1993, Molnár-Láng *et al.* 1996), amelyek többségét ki lehet küszöbölni klímatisztított növénynevelő házak vagy kamrák használatával (Bertin *et al.* 2009). A növénynevelő berendezések használatakor a *Poaceae* fajoknál ismert, megtermékenyítésükhöz szükséges

optimum hőmérséklethez (20-25 °C), illetve relatív páratartalomhoz (60-70%) való közelítés nagymértékben növelheti az idegen fajú keresztezés hatékonyságát (Belea 1986).

A keresztezhetőség csökkenését általában a megtermékenyülési folyamatban bekövetkezett zavarok idézik elő, amely adódhat a pollen csírázásának, a pollentömlő növekedésének, illetve az ivari gaméták egyesülésének gátlásából. Az életképtelen vagy gyenge életképességgel rendelkező utódok kialakulása pedig a szülők genomszerkezetének, az egyik szülő citoplazmájának és a másik szülő genomjának, illetve az F_1 zigótának és az endospermiumnak genotípusbeli összeférhetetlenségéből adódhat (Gill és Waines 1978, Sharma és Gill 1983).

2.3.2.1 Az F_1 hibridek életképessége

Az idegen fajú génátvitel során sokszor eltérő kromoszómaszámú szülőket használunk, hiszen a hexaploid búza vad rokon fajainak többség di- vagy tetraploid. Az F_1 hibridben lejátszódó meiótikus párosodás során egymással nem párosodó kromoszómák következtében kialakuló eltérő kromoszómaszámú gaméták általában sterilitást eredményeznek, amely megszüntethető az F_1 hibridek genomduplázásával vagy visszakeresztezéssel (BC: back-cross) (Sharma és Gill 1983). További megoldás lehet, hogy a nagyobb méretű genommal rendelkező fajt választjuk a citoplazmát adó anyai partnernek, mert ellenkező esetben a kisebb genomú faj rövidebb meiótikus sejtciklusa gátolhatja a kromoszómák maradéktalan szétválását, amely a kromoszóma-hidak törésén keresztül kromoszóma-eliminációkhoz, illetve -addíciókhoz vezethet. A fordított kombinációban is kialakulhat abnormális genomszerkezet, azonban ennek mértéke az utódok életképességét kevésbé csökkenti. (Bennett és Kaltsikes 1973, Gustafson *et al.* 2009). Ennek a folyamatnak köszönhető, hogy a nehezen keresztezhető *T. timopheevii* és *T. monococcum* esetében kétszeres mennyiségű szemkötést (1,4%) lehet elérni, ha a diploid alakor a pollenadó és a tetraploid *T. timopheevii* az anyai partner (Belea 1986). A hexaploid búza előnemesítése során a *T. timopheevii* pollenadóként történő felhasználását az utóbbi fajra jellemző citoplazmás hímsterilitás elkerülése is indokolja.

A B-G, illetve az $A-A^t$ genomok közötti homológiát *T. aestivum* × *T. timopheevii* hibridek F_1 utódain végzett pollenanyasejt-vizsgálattal mutatta ki Feldman (1966), melynek eredményeként leírta, hogy a meiózis I. metafázisában vizsgált B és G genomi kromoszómák az esetek 30%-ában, míg az A és A^t kromoszómák az esetek 70%-ában konjugálódtak egymással. Gordeeva *et al.* (2009) molekuláris markerek használatával mutatták ki, hogy *T. aestivum* × *T. timopheevii* hibridek többszörösen öntermékenyített BC_1 (az anyaként használt búzával visszakeresztezett) utódaiban a homeológ kromoszómák közötti párosodás kisebb arányban fordul elő a meiózisban

csak bivalenseket alkotó, tehát stabil utódokban, mint az instabil párosodást mutatókban. Leggyakrabban a 2B/2G szubtitúció vagy transzlokáció volt megfigyelhető a hibridekben, melyet Brown-Guedira *et al.* (1996) is igazoltak korábban nulli-tetraszómás búza vonal és a *T. timopheevii* keresztezésével előállított hibridek vizsgálatával. Ugyancsak kimutatták, hogy egyes kromoszómák hiánya különbözően hat a meiózis stabil lefolyására. Például a 6B/6G transzlokáció nem okozott rendellenességeket a meiózisban, míg a kettes homeológ kromoszómák közötti átépülések abnormális konjugációhoz vezettek, továbbá a 7A/7A^t transzlokáció az esetek többségében multivalensek kialakulását eredményezte (Gordeeva *et al.* 2009).

2.3.2.2 A keresztezhetőség genetikai háttere

Az inkompatibilitás elkerülése érdekében alapvető fontosságú a megfelelő szülőpartnerek kiválasztása, illetve távoli keresztezés esetén az embriómentést követő embriókultúra létrehozása (Farshadfar 1995). Ezt támasztja alá, hogy a vad fajok keresztezhetőségében nagy a genetikai variabilitás. A búza keresztezhetőségének genetikai hátterét először Lein (1943) kutatta rozs használatával, aki kimutatta, hogy a tulajdonságot 2 keresztezhetőségi gén (*Kr1* és *Kr2*) határozza meg (a pollentömlő növekedésének gátlásával), melyek recesszív alléljai lehetővé teszik az idegen fajokkal történő sikeres keresztezést. A két gén additív hatása megnövekedett szemkötésben nyilvánul meg: domináns allélpárok (*Kr1Kr1/Kr2Kr2*) esetén tapasztalt 5%-os szemkötést több mint 50%-ra lehet növelni recesszív allélpárral (*kr1kr1/kr2kr2*) rendelkező búza genotípusok használatával. Heterogén allélpár esetén 20% (*Kr1Kr1/kr2kr2*) és 40% (*kr1kr1/Kr2Kr2*) körüli a szemkötés, amely jól mutatja a két gén hatásának különböző erősségét. Riley és Chapman (1967) a *Kr1* gént az 5B kromoszóma hosszú karjára, míg Sitch *et al.* (1985) a *Kr2* gént az 5A kromoszóma hosszú karjára térképezték, ahol ez utóbbi kutatócsoport a gén kapcsoltságát is kimutatta a *Q* és *Vrn1* génekkel. Zheng *et al.* (1992) a *Kr2* génnél nagyobb, de a *Kr1* génnél kisebb hatású *Kr4* gént azonosítottak az 1A kromoszómán, így az 5D kromoszómán korábban lokalizált, kisebb hatású *Kr3* génnel (Snape *et al.* 1979) együtt összesen 4 gén additív hatása szabályozza a búza és rokon fajainak keresztezhetőségét. Tixier *et al.* (1998) dihaploid (DH) alapú térképezési populációt használva az 5B kromoszóma rövid karjának disztális régiójába térképeztek egy nagyhatású, keresztezhetőséget befolyásoló QTL-t is, amelyet *Skr* néven publikáltak.

Hazánkban Martonvásáron vittek át a 'Chinese Spring' modell búzafajta egyik genotípusából a keresztezhetőséget elősegítő recesszív *kr1* allélt egy agronómiailag sokkal megfelelőbb őszi búza fajtába ('Martonvásári 9'), így alakítva ki az 'Mv9kr1' genotípust (Molnár-Láng *et al.* 1996),

mely azóta is az intézetben folyó idegen fajú génátviteli munka egyik kulcsfontosságú növényanyaga. E genotípusba napjainkig már sikeresen építettek be rozs (*Secale cereale*) (Molnár-Láng *et al.* 2010), árpa (*Hordeum vulgare* L.) (Molnár-Láng *et al.* 2000a, Molnár-Láng *et al.* 2000b), *Aegilops* (Molnár-Láng *et al.* 2002), illetve *Agropyron* eredetű kromatint (Kruppa *et al.* 2012).

2.3.3 Amfiploidok előállítása kolhicinnel

A közvetlen keresztezés mellett ugyancsak sikeres génátvitelt tesz lehetővé az amfiploid előállítás, amely különböző genommal rendelkező szülők (interspecifikus hibridizáció) esetén allopoliploidot, míg azonos genomok számának növelése (intraspecifikus- illetve intragenerikus hibridizáció) esetén autopoliploidot eredményez. A három különböző eredetű genomja alapján a hexaploid búza is egy allopoliploid (allohexaploid), amelyet a kromoszóma-párosodás során mutatott diploid viselkedése miatt (hasonlóan a többi tetra- és hexaploid *Triticeae* fajhoz) amfidiploidnak is nevezhetünk (Stebbins 1947). Az amfiploid-előállítási munkáknak nagy lendületet adott a kolhicin genomduplázódást okozó hatásának felfedezése (Blakeslee és Avery 1937). Ez a természetes eredetű (*Colchicum* (kikerics) növényfaj) alkaloid a mitózis metafázisában a tubulin monomerekhez kapcsolódva fejt ki hatását az osztódási magorsók és mikrotubulusok gátlásán keresztül, melynek eredményeként a duplázódott kromoszómák nem válnak el egymástól, és a sejtosztódás leáll, így hozva létre egy duplázódott genomú sejtet. Amennyiben a kolhicin kezelés az ivarsejtek kialakulása idején történik, úgy a duplázódott genomú (2n) ivarsejtek önporzással autopoliploid utódot eredményeznek (Levan 1938). Ez a felfedezés lehetővé tette az addig nem, vagy nehezen keresztezhető fajokból történő fertilis hibridnövény előállítását, melyek használatával a növénynevelés genetikai bázisa nagymértékben kiszélesíthető. A nevelés mellett az evolúciós kutatásokban is nagy hasznát vették a kolhicinnel, hiszen e vegyületet használva rekonstruálni tudták a búza kialakulását szintetikus hexaploidok létrehozásával (McFadden és Sears, 1946). Később a nevelés is felfedezte a szintetikus hexaploid búzában rejlő lehetőségeket, melynek nyomán az 1980-as években nagyléptékű munka indult a CIMMYT-nél (Nemzetközi Kukorica- és Búzanemesítő Központ) a különböző *Ae. tauschii* genotípusokban rejlő hasznos tulajdonságok kiaknázására, melynek eredményeként búzafajtáik több mint felének pedigréjében található szintetikus hexaploid búza (Trethowan és van Ginkel 2009). Európában újabban *T. timopheevii* alapú GGAAAA (Mikó *et al.* 2013) és GGAADD (Stoyanov 2014) genomú szintetikus amfiploidokat állítottak elő és vontak be előnevelési programokba.

2.3.4 Aneuploidok előállítása és felhasználása az előnemesítésben

2.3.4.1 Addíciós vonalak előállítása

A nemesítési munka mellett, a genetikai és funkcionális genomikai kutatások számára is nagy jelentőséggel bírnak az aneuploid búzavonalak, melyek a normál 21 pártól (euploid) néhány darab kromoszómával eltérő nagyságú genommal rendelkeznek, azonban ez az abnormalitás a búza hexaploid szerkezete miatt több generáción keresztül – igaz csökkent életképességgel – fenntartható (Lángné Molnár 2006). A legelterjedtebb idegen fajú addíció előállításához a búza \times idegen faj F_1 hibridjének genomját kolhicinnel megduplázzák, majd az öntermékenyített, duplázódott genomú utódokat visszakeresztezik a búza szülővel, így állítva elő egy teljes értékű ($2n$) búzagenomot és egy haploid (n) idegen genomot hordozó köztes genotípust. Ebből a genotípusból néhányzori, búza szülővel végrehajtott visszakeresztezés követően kiválogathatók a monoszómás addíciós (21^{II} búza + 1^I idegen) vonalak, melyek öntermékenyítése révén stabil diszómás addíciós (21^{II} búza + 1^{II} idegen) búzatörzseket, vagy akár az összes idegen kromoszómát képviselő addíciós sorozatot is nyerhetünk (O'Mara 1940). Az idegen kromoszómát hordozó gaméták a normál gamétákhoz képest kevésbé kompetitívek, ezért a monoszómás addíciók öntermékenyítése eredményeként a mendeli öröklődéstől eltérően, csupán 3-4%-nyi diszómás addíciós vonal válogatható ki az utódok közül (Lángné Molnár 2006). Önmegporzás mellett dihaploidok létrehozásával (Shepherd és Islam 1981), illetve *Hordeum bulbosum* L. fajjal vagy kukoricával (*Zea mays* L.) végzett keresztezést (eredménye 22 kromoszómás haploid növény) követő kolhicin kezeléssel (Linc és Lángné Molnár 2003) is lehet a monoszómás addíciókból diszómás addíciókat előállítani.

Az idegen fajú kromoszóma addíciója sok esetben fenotípusosan is megnyilvánul az utód nemzedék kalázmorfológiai (pl. szálkasság, alak, tömörség, hosszúság), levélmorfológiai (pl. állás, színintenzitás, szélesség, hosszúság, szőrözöttség), illetve agronómiai (magasság, bokrosodási készség) bélyegeiben (Farshadfar 1995). Az idegen kromoszómapár tagjai a meiózis során nem mindig képesek a normális bivalens képzésére, ezért megfelelő szelekció nélkül a diszómás addíciós populációban már csak kevesebb mint 20% diszómás addíciós növény fordul elő a nyolcadik generációra, amely arány még alacsonyabb lehet, ha a szigorú öntermékenyítés sem volt biztosítva. Ezt a jelenséget Riley és Kimber (1966) addíciós leromlásként ismertette.

Martonvásáron hasonló módszerrel állítottak elő diszómás addíciós sorozatot búza háttérben *Aegilops biuncialis* Vis. (Schneider *et al.* 2005), árpa (Linc és Lángné Molnár 2003, Molnár-Láng *et al.* 2012), illetve rozs (Lángné Molnár 2006) felhasználásával.

2.3.4.2 *Addíciós vonalak felhasználása*

Az addíciós vonalak a szubsztitúciók, illetve transzlokációk kiváló alapanyagai lehetnek. Idegen fajú monoszómás (vagy diszómás) szubsztitúció esetén a búza egyik kromoszómá(pár)ja helyére épül be az idegen kromoszóma(pár). Idegen fajú szubsztitúció bekövetkezhet természetes úton is a keresztezést követő többszöri visszakeresztezés útján, melyre példa az első idegen fajú szubsztitúciós (rozs 1R kromoszómapárja) búzatörzs előállítása is (Kattermann 1938). A diszómás szubsztitúció legelterjedtebb előállítási módja a helyettesíteni kívánt búzakromoszómára monoszóm ($20^{\text{II}} + 1^{\text{I}}$) búza genotípus bekeresztezése az idegen kromoszómapárt hordozó diszómás addíciós törzssel (21^{II} búza + 1^{II} idegen), majd a 42 kromoszómára (21^{II} búza + 1^{I} búza + 1^{I} idegen) szelektált utódnemzedék öntermékenyítését követően a 20^{II} búza + 1^{II} idegen genomszerkezetű utódok kiválogatása (Unrau *et al.* 1956, Gale és Miller 1987). A módszer alkalmazásával Martonvásáron már számos szubsztitúciós törzset állítottak elő árpa és rozs felhasználásával (Lángné Molnár 2006, Molnár *et al.* 2007), melyek – a nemesítés mellett – az addíciós törzseknél pontosabb funkcionális genetikai vizsgálatokra is alkalmasak.

A gyakorlati nemesítés számára mind az addíciók, mind a szubsztitúciók általában köztes növényanyagoknak tekinthetők, melynek további célja különböző, a búzába átvenni kívánt hasznos tulajdonságot hordozó kromoszómaszakaszok beépítése (transzlokációja) a búza genomba. A diszómás addíciós törzsekből általában indukált kromoszómatöréssel állítanak elő transzlokációt, ezzel szemben a szubsztitúciós törzsek már alkalmasabbak arra is, hogy hagyományos keresztezés útján, homeológ rekombinációval vigyenek át (minél kisebb) idegen fajú kromoszómaszakaszokat a búza genomba (Sutka 2004, Lángné Molnár 2006). Ennek speciális esete, amikor a fent leírt szubsztitúciós búza vonal előállítása során kiválogatott monoszómás szubsztitúciós vonalak öntermékenyítésével centrikus fúzió keletkezik a két homeológ kromoszóma között (1^{I} búza/ 1^{I} idegen), ami a következő nemzedékben kompenzáló transzlokációk kialakulásához vezethet (Sears 1953, Lukaszewski 1993).

2.3.4.3 *Idegen fajú transzlokációk indukálása*

A hexaploid búza három genomjához tartozó homeológ kromoszómák egymással nem párosodnak meiosisban, amely a búza diploid jellegű öröklődési tulajdonságát szolgálja (Riley *et al.* 1959, Riley és Law 1965). Ezen oknál fogva a természetben csak kevés eséllyel jöhet létre búza és idegen faj hibridjében spontán módon homeológ transzlokáció (Sutka 2004), azonban ez ritkán mégis megtörténhet és e kromoszóma átrendeződések nagy hatással voltak a búza

evolúciójára. A homológ rekombinációt szolgáló és a homeológ rekombinációt gátló, nagyhatású lokusz (*Ph1*) az 5B kromoszóma hosszú karján (Riley és Chapman 1958, Sánchez-Morán *et al.* 2001), míg a kisebb hatású *Ph2* lokusz a 3D kromoszóma rövid karján található (Sears 1976). A meiózis I. metafázisában a búza kromoszómák 21 bivalenst alkotnak, azonban a *Ph1* lokusz hiányában is főként bivalensek születnek (de nem feltétlenül homológ kromoszómák között), ami azt igazolja, hogy a *Ph1* lokuszon kifejezetten a homológ kromoszómák felismerését segítő gének találhatóak és nem közvetlenül a kromoszómák párosodására és rekombinációjára fejt ki hatását (Roberts *et al.* 1999, Moore 2005). Ennek alapján, a búza nem elsődleges génforrásai közé tartozó, idegen fajjal történő keresztezésének sikeressége érdekében a búza genotípusban a *Ph1* lokusz hiányát vagy gátlását szükséges előidézni. A homeológ transzlokáció erősíthető 5B nulliszóm, illetve 5B monoszóm búza vonalak használatával, mely utóbbi jó példa a hatás dóziszfüggő jellegére, hiszen az 5B kromoszómán lévő *Ph1* lokuszok felének az elvesztése is már érezhető hatással van a homeológ keresztezések gyakoriságára (Sears 1981, Moore 2005). A teljes 5B kromoszóma eltávolítása helyett azonban előnyösebb megoldás lehet deléciós mutánsok előállítás, melyek csak az 5B kromoszóma *Ph1* lokuszt tartalmazó részét nem hordozzák. A leginkább elterjedt ilyen búzatörzs a 'Chinese Spring' 70Mb hosszúságú, interkaláris deléciót hordozó mutánsa, a CS *ph1b* mutáns (Sears 1977). Kevésbé hasznos, de még használható megoldás a *Ph1* lokusz hatásának inhibitor gén (ph^1) beépítésével való csökkentése, melyet Chen *et al.* (1994) *Aegilops speltoides* transzlokáció révén ért el.

A homeológ rekombinációval létrejött transzlokációk egyik előnye, hogy kompenzáló típusúak, mivel a beépült idegen kromatin hasonló funkciójú DNS szakasz helyére épül be. Ezzel ellentétben a mesterségesen indukált (röntgensugárzás, kémiai mutagén, szövettenyésztés) kromozómatörések révén létrejött transzlokációk előnye, hogy kisebb kromozómaszakaszok is átépíthetők, azonban ezek általában nem kompenzáló típusú transzlokációk (Feldman 1988, Lángné Molnár 2006). Endo (1988) a kromozómatörés természetes útját dolgozta ki, miszerint az *Aegilops cylindrica* Host. faj 2C kromozómapárját (és azon lévő gametocid gént) hordozó búza diszómás addíciós törzs idegen fajú keresztezésekben számos transzlokációt eredményez a kromozómák törése majd újraegyesülése következtében.

Már számos gombarezisztenciáért (pl. sárgarozsda, szárrozszda, levélrozszda) felelős gént sikerült beépíteni a búzába indukált kromozómatöréseken keresztüli idegen fajú transzlokációk létrehozása útján, amelyben donorként főként *Aegilops* és *Agropyron* fajokat használtak (Lángné Molnár 2006).

2.3.5 *Triticum timopheevii* és *Triticum monococcum* a búza előnemesítésében

A többi *Triticum* fajhoz hasonlóan alakor alapú fajhibridek is születtek a XIX. és XX. század fordulóján, ahol többek között a termesztett tönkét anyaként (Beijerinck 1884), illetve a durumbúzát apaként (Blaringham 1914) használták a keresztezéseknel. Magyarországon először Rajháthy (1954) számolt be különböző ploidszintű *Triticum* fajok keresztezhetőségéről. E munkát folytatva, Belea (1986) evolúciógenetikai kutatásai során számos tetra- és hexaploid *Triticum* fajjal végzett keresztezési eredményről számolt be, mely során mind a *T. timopheevii*, mind az alakor nehéz keresztezhetőségét mutatta ki. Mindkét faj esetében a közvetlen keresztezésük a hexaploid búzával, majd a hibrid utódok búzával történő, több generáción át folytatott visszakeresztezése (BC) a legelterjedtebb génátviteli technika a búza előnemesítési gyakorlatban. A klasszikus módszer mellett mindkét faj esetében hatékony eljárás lehet egy közbeiktatott szintetikus amfiploid előállítás, amely a búzával azonos ploidszintet képvisel. Ez az új, mesterségesen előállított hexaploid hídként („bridge”) használható fel a keresztezési munkákban, ahol a ploidszint azonosság miatt nagyobb arányú szemkötésre lehet számítani.

2.3.5.1 *Triticum timopheevii* az előnemesítésben

A *T. timopheevii* fajjal végzett keresztezések elsődleges célja a biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni rezisztencia átvitele a búzába, mely sikeressége érdekében a rendelkezésre álló genotípusokat célszerű e tulajdonságok mellett a keresztezhetőségre is előzetesen szelektálni, ide értve a szintetikus amfiploid előállítását esetén az alakor genotípus gondos kiválasztását is. A keresztezési partnerek az előnemesítést megelőzően végzett körültekintő kiválasztása kulcsfontosságú eleme egy sikeres előnemesítési és nemesítési munkának.

A klasszikus keresztezés mellett a *T. timopheevii* előnemesítésben történő felhasználását teheti lehetővé a belőle és az alakorból előállított szintetikus amfiploid, mely várható eredményességét jól demonstrálja az a néhány eset, amikor különböző *T. turgidum* × A genommal rendelkező diploid taxonok segítségével előállított szintetikus amfiploidot (BBA^uA^uAA) használták fel sikeresen a búzanemesítésben (Gill *et al.* 1988, Mujeeb-Kazi és Hettel 1995, Plamenov *et al.* 2009).

A *T. timopheevii* fajból először a diploid *T. monococcum* felhasználásával állítottak elő amfiploidot (Kostov 1936), így hozva létre a természetes hexaploid *T. zhukovskyi* szintetikus változatát, melynek a *Triticum timococcum* Kost. nevet adták (Goncharov *et al.* 2009). Kostovhoz hasonlóan Zhebrak (1944) is kolhicin kezeléssel állított elő *T. timopheevii* alapú amfiploidokat különböző *T. turgidum* alfajok (pl. subsp. *durum*, subsp. *polonicum*) illetve *T.*

aestivum felhasználásával. Munkája során megállapította, hogy idegen fajú keresztezésekben és amfiploid ellőállításokban a *T. timopheevii* alkalmasabb lehet anyai partnerként. A *T. turgidum* subsp. *durum* és a *T. timopheevii* 56 kromoszómás amfiploidját *Triticum soveticum* Zhebrak, míg a *T. aestivum* és a *T. timopheevii* 70 kromoszómás amfiploidját *Triticum borisovi* Zhebrak néven publikálta és számos előnyös tulajdonságukat írta le. Például a *T. soveticum* fagyűrő képessége megnövekedett a durumbúzához képest, illetve mindkét szintetikus faj rezisztens volt a gombabetegségekkel szemben.

A *T. timopheevii* és az alakor alapú szintetikus amfiploid nemesítésben való felhasználásáról nincs információnk. Ezt a hiányt pótlandó, munkánk során – a *T. timopheevii* fajban és az alakorban rejlő hasznos tulajdonságok hasznosítása céljából – a $GGA^tA^tA^mA^m$ genomszerkezetű szintetikus amfiploid előállításán alapuló előnemesítési programot is indítottunk.

2.3.5.2 *Triticum monococcum*, mint lehetséges keresztezési partner

Az alakor vad és termesztett alfaja a *T. timopheevii* fajhoz hasonlóan értékes genetikai forrás a búzanemesítők számára. Vad változatát őseink az első kalászos növényként fogták termesztésbe 12 000 évvel ezelőtt a mai Törökország területén lévő Karacadağ hegység vidékén (Monneveux *et al.* 2000, Heun *et al.* 2008, Charmet 2011). Termesztése a XIX. század végére visszaszorult, azonban a napjainkra jellemző egészségtudatos táplálkozás hatására nemesítése ismét fellendülőben van és több elismert fajtájával is találkozhatunk az európai szántóföldeken (Megyeri 2014).

A búzanemesítők számára hasznosítható, nagy diverzitással rendelkező alakor gyűjteményeket tárolnak a fontosabb európai növényi génbankok, köztük az MTA ATK Mezőgazdasági Intézetének gabona génbankja, ahol 292 *T. monococcum* tételt tartanak fenn (Megyeri 2014). A génbankokban tárolt alakor tételek között azonosítottak már kiváló levélrozsa rezisztenciaforrást, kedvező agronómiai (koraiság, féltörpe típus), valamint beltartalmi (nagy karotin- és antioxidáns-tartalom) tulajdonságú tételeket is, amelyek fontos forrásai lehetnek a búzanemesítésnek (Castagna *et al.* 1996, Hammer *et al.* 1996, Empili *et al.* 2000, Brandolini *et al.* 2008). A biotikus rezisztencia mellett több alakor genotípus kiemelkedő szárazságtűréssel és/vagy télállósággal is rendelkezik (Megyeri 2014).

A gyakorlatban eddig számos, *T. monococcum* eredetű levélrozsa (Hussien *et al.* 1998), szárrozsa (Valkoun *et al.* 1989), sárga rozsa (Ma *et al.* 1997), valamint lisztharmat (Shi *et al.* 1998) ellenállóságért felelős gént vittek át nemesítésben használt búzatörzsekbe. Sikeresen kapcsolták be a Martonvásáron zajló előnemesítési programokba is, ahol a hagyományos

visszakeresztezéses módszer mellett, durumbúza alapú szintetikus hexaploidjait is használják (Megyeri 2014). Az alakor kiváló tulajdonságai és előnemesítésben való felhasználhatósága a *T. timopheevii* fajjal közös amfiploid előállítás ígéretes keresztezési partnerévé teszik ezt a fajt.

2.4 Idegen kromatin kimutatása és azonosítása

Az idegen fajú addíciók, szubsztitúciók és transzlokációk kimutatására számos eljárást dolgoztak ki, melyek közül a legelterjedtebbek a különböző morfológiai és molekuláris (biokémiai, citogenetikai és genetikai) különbségek kimutatására alkalmas markerek használata. A hibridekben expresszálódó idegen eredetű gének és a recipiens szülő azonos funkcióért felelős génjeinek kölcsönhatása eltérő morfológiai felépítésben (pl. kalászalak, szőrözöttség, kalász szálkássága) is megnyilvánulhat, ami egy egyszerűen követhető markerként funkcionálhat (O'Mara 1940, Driscoll 1975). Erre a jelenségre példa a búza × árpa (Szakács és Molnár-Láng 2010) illetve búza × *Ae. biuncialis* (Schneider *et al.* 2005) diszómás addíciós sorozat, ahol a különböző addíciós kromoszómát hordozó utódok nemcsak a szülőktől, hanem egymástól is elkülöníthetők kalásmorfológiájuk alapján. Azonban a kizárólag morfológiai markerekre alapozott hibridvizsgálat az esetek többségében nem tud pontos információval szolgálni a vizsgált tulajdonság genetikai hátteréről, hiszen annak kifejeződését többnyire a környezet is befolyásolja (Farshadfar 1995). A molekuláris markerek ezzel szemben alkalmasak az idegen fajból/genotípusból származó kromatin kimutatására izoenzim, illetve tartalékfehérjék vizsgálatával (Kephart 1990, Farshadfar 1995). A molekuláris kutatás területén szelés körben használják a vizsgált DNS variabilitását kimutató, restrikciós felismerőhelyek (RFLP) azonosításán, illetve PCR-rel (polymerase chain reaction: polimeráz láncreakció) felszaporított, különböző hosszúságú DNS szakaszok polimorfizmusán alapuló (pl. RAPD – random primerrel szaporított szekvenciák, SSR – egyszerű szekvencia-ismétlődések (mikroszatellit), SNP – egyetlen nukleotid eltérést is kimutató) módszereket, melyek még pontosabb azonosítást, nyomonkövetést tesznek lehetővé (Galiba és Tóth 2006, Agarwal *et al.* 2008). A közeli rokonság miatt sok, a részletesen feltérképezett hexaploid búzából származó molekuláris marker a *T. timopheevii* vizsgálatára is felhasználható. Így készítették el az A¹ és G kromoszómák SSR markerekre alapozott térképét (Salina *et al.* 2006).

2.4.1 Molekuláris citogenetikai módszerek

A molekuláris citogenetikai módszerek alkalmazása nagy múltra tekint vissza, hiszen kromoszómapreparátumokat már több mint 100 éve használnak a kutatók. Ezzel a módszerrel

több idegen kromoszómát méret, kararány, illetve a szatellit megléte alapján lehet azonosítani. Klasszikus kromoszóma-morfológiai vizsgálatokkal igazolták először, hogy az újonnan leírt hexaploid faj, a *T. zhukovskyi* feltehetően a *T. timopheevii* és a *T. monococcum* spontán hibridizációjából született (Upadhyya és Swaminathan 1963). Ugyancsak kromoszóma morfológia alapján azonosított Kimber és Sallee (1976) *T. timopheevii* és árpa kromoszómákat *T. timopheevii* × *Hordeum bogdanii* Wilensky hibridben. A kromoszómák többsége azonban morfológiailag nem különíthető el egymástól, ezért különböző festési eljárásokat dolgoztak ki, amely segítségével a kromoszómák jelentős része a heterokromatin-eukromatin eloszlás alapján specifikus (sávós) mintázatot mutatott (Lángné Molnár 2006). A kromoszómák metafázisos kromoszómapreparátumokon sávozással történő elkülönítése az 1970-es évektől kezdett kibontakozni. Elsőként a kinakrin mustárral festett Q-sávós technika jelent meg (Caspersson *et al.* 1968), azonban a legelterjedtebb sávozási eljárást a Giemsa festésen alapuló C-sávozás (illetve a ritkábban használt N-sávozás) jelentette, amely a konstitutív (C), konzerválódott heterokromatikus régiókat (centroméra és teloméra környéke), valamint N- sávozás esetén a nukleolusz-organizáló régiót (NOR) festi meg (Gall és Pardue 1969). A *T. timopheevii* fajt és a belőle származó hibrideket először szintén N-sávozással (Gill és Chen 1987) és C-sávozással (Belea és Fejér 1980, Hutchinson és Miller 1982, Badaeva *et al.* 1986, Lángné Molnár *et al.* 1996) kezdték vizsgálni. C-sávós eljárással sikeresen azonosították a *T. timopheevii* kromoszómáit (Badaeva *et al.* 1986), és a vad típusából felhasznált 185 génbanki tételének vizsgálata által mutatott polimorfizmus számos intraspecifikus kromoszóma-átrendeződést fedett fel főként a G genomban, míg a tételek 44%-a azonos volt a termesztett alfaj kariotípusával (Badaeva *et al.* 1994b).

2.4.1.1 FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció repetitív DNS próbákkal

A Giemsa-festésen alapuló kromoszóma-azonosítás ugyan gyors és olcsó eljárás, azonban kivitelezéséhez nagy gyakorlat szükséges, továbbá a végső kiértékelés pontossága a festék minőségétől is függ. A módszer hátrányai egy új azonosítási eljárás elterjedéséhez vezettek, ami ismert, jelölt DNS vagy RNS (ribonukleinsav) szekvenciák (próba DNS/RNS) kromoszómapreparátumokon lévő denaturált DNS-hez történő *in situ* hibridizációja útján előállított kromoszóma-specifikus mintázatokon alapul (Gall és Pardue 1969). A nukleinsav próbákat először radioaktív izotópokkal jelölték, majd ezek veszélyessége miatt fokozatosan átvették helyüket a fluorokrómok (fluoreszcein, rhodamin), melyek fluoreszcens mikroszkópban könnyen detektálható mintázatot adtak (Jiang és Gill 1994c). Ezt a molekuláris citogenetikai

technikát fluoreszcens *in situ* hibridizációnak (FISH) nevezték el, mely során az azonosítani kívánt kromoszómákat – a próbák fluorokrómmal történő jelölésétől függően – közvetlen vagy közvetett úton is meg lehet jelölni (Leitch *et al.* 1994). A direkt jelölésnél az azonosítani kívánt kromoszóma DNS-éhez a fluorokrómot hordozó nukleotidokkal rendelkező próba DNS kapcsolódik, míg indirekt jelölésnél a próbaként szolgáló nukleotidra egy haptén molekulát (biotin, digoxigenin) építenek, melyhez a hibridizáció után, antitestekkel kapcsolják a fluorokrómot. A FISH eredményességét nagyban befolyásolja a próba mérete, mely 100-300 bp (bázispár) közötti méretben biztosítja a legoptimálisabb kötődést és detektálhatóságot. A próbától függően a jelölés különböző eljárásokkal (nick transláció, random priming, PCR) történhet (Schwarzacher 2003, Schwarzacher 2009). Ezzel a módszerrel nemcsak a kromoszómák azonosíthatók egyenként, hanem azok egyes részei is, így a transzlokációk és egyéb szerkezeti változások követésére is alkalmas (Schwarzacher 2003).

Az elsők között Rayburn és Gill (1985) bizonyította, hogy egy biotinnal jelölt, rozsól származó 120 bp hosszúságú szekvencia (pSc119.2) kromozómaspecifikus mintázatot eredményez a búza B kromozómáin, továbbá néhány D (2D, 3D és 5D) és A (4A) kromozómán is. Többféle fluorokróm együttes használatával több próba is jelölhető, így többszínű mintázatot kapunk (multicolour FISH), ílymódon a búza összes kromozómáját el tudták különíteni egymástól (Mukai *et al.* 1993, Pedersen és Langridge 1997), illetve a vele rokon fajok többségének kariotípusát is meghatározták (Pedersen *et al.* 1996). A búza és közeli rokon fajainak FISH technikával történő vizsgálata során leggyakrabban a pSc119.2 (Bedbrook *et al.* 1980), a D és néhány A kromozómához kötődő, *Ae. tauschii* eredetű Afa-family (~pAs1) (Rayburn és Gill, 1986) szekvenciákat, valamint a szatellit kromozómák NOR régióit jelölő, 45S riboszomális DNS pTa71 klónt (pTa71) használják próbaként (Fedak és Kim 2008). Emellett mikroszatellitek (SSR) is alkalmazhatók próbaként *Triticeae* kromozómák azonosítására (Cuadrado *et al.* 2008). Martonvásáron több próba együttes használatával végzett FISH-t használva készítették el a hexaploid búza mellett (Schneider *et al.* 2003, Sepsi *et al.* 2008) *Aegilops* fajok (Linc *et al.* 1999, Schneider *et al.* 2005, Molnár *et al.* 2011), évelő fajok (Sepsi *et al.* 2008, Linc *et al.* 2012), a *T. monococcum* (Megyeri *et al.* 2012) és a búza diploid őseinek (Molnár *et al.* 2014), illetve a *T. timopheevii* (Uhrin *et al.* 2012, Mikó *et al.* 2015) kariotípusát.

A *T. timopheevii* FISH vizsgálatát először N- vagy C-sávozással összekötve végezték el, így a már korábban leírt sávok alapján azonosított kromozómákhoz hozzá tudták rendelni a specifikus fluoreszcens mintázatot (Hutchinson és Miller 1982, Jiang és Gill 1994c). Zoshchuk *et al.* (2007) több *T. timopheevii* génbanki tételt vizsgált *Ae. speltoides* eredetű repetitív próbákkal (Spelt1 és

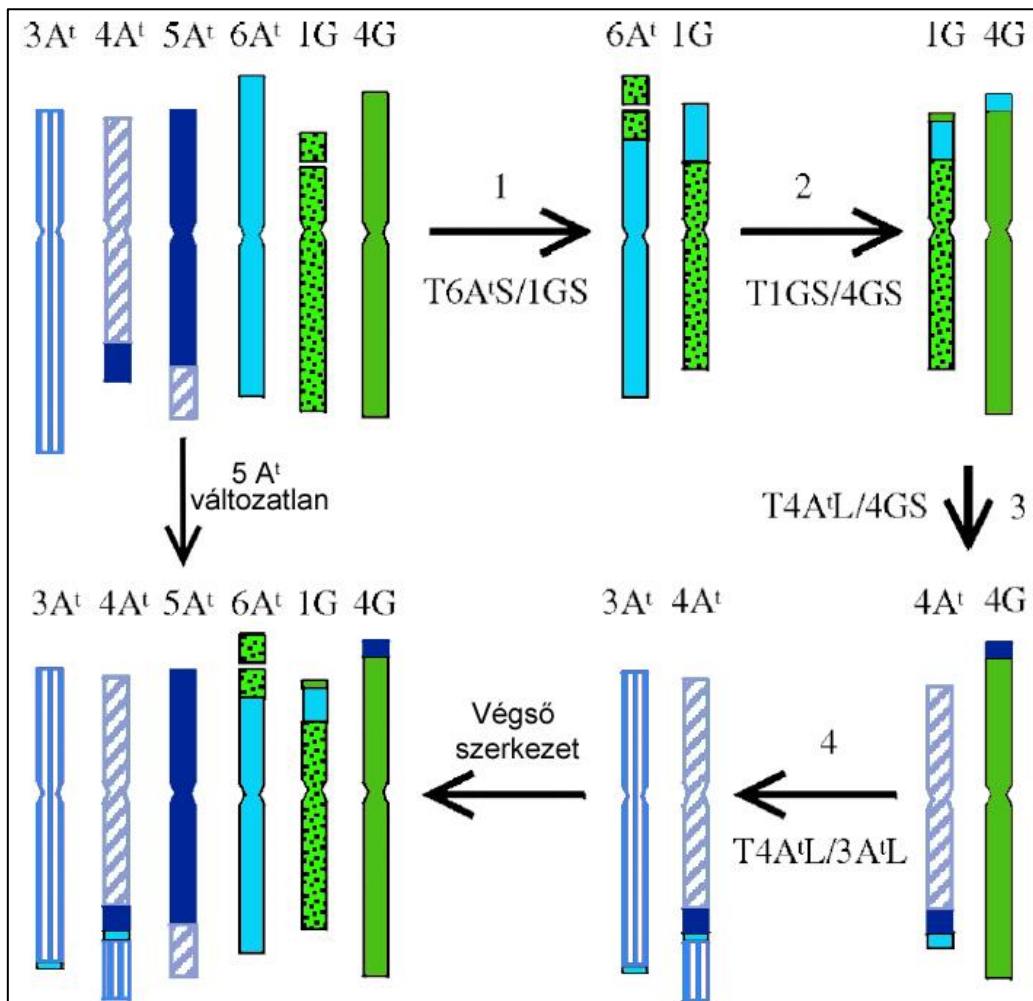
Spelt52), melynek eredményeként a vad alfajban polimorfizmust és a G genom donor *Ae. speltoides* mintázatához képest csökkent kópiaszámot találtak. Uhrin *et al.* (2012) a *T. timopheevii* 6G kromoszómáját mutatta ki 6G(6B) szubsztitúciós búzatörzsben.

2.4.1.2 GISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció komplett genomi DNS próbákkal

Az *in situ* hibridizáció során nemcsak repetitív szekvenciákat lehet próbaként használni, hanem teljes genomi DNS-t is (GISH: genomi *in situ* hibridizáció). E módszerrel egyszerűbb a búza × idegen fajú hibridekben a búzától eltérő genommal rendelkező idegen faj (illetve két eltérő genomú faj által alkotott amfiploid) kromoszómáinak, kromoszóma szegmentumainak azonosítása és nyomonkövetése, mivel a próba a vizsgált DNS teljes egészét fluoreszcens színnel jelöli (Le *et al.* 1989, Schwarzacher *et al.* 1989). A genomok elkülöníthetőségének növelése érdekében a kimutatni kívánt genomhoz történő jelölt genomi próba hibridizációja mellett a jelöletlen genomhoz a saját (jelöletlen) genomi DNS-ét is hibridizáljuk (blokkoló DNS), így akadályozva meg a kereszt-hibridizációt. Ezután csak a kimutatni kívánt kromoszómák jelölődnek a fluorokrómmal (Schwarzacher 2003). A GISH során is lehetőség van több genom egyidejű (multicolour) kimutatására (mcGISH), amely módszerrel a búza három genomja is elkülöníthető egymástól a diploid A és B genomdonorok genomi DNS-ét (a D genom blokkolásával) használva próbaként (Mukai *et al.* 1993). Az idegen fajú keresztezésekben a kromoszómák és transzlokációk nyomonkövetésére Martonvásáron már az 1990-es évektől kezdődően használják a GISH technikát, főként a búza harmadlagos génforrásaiból származó (rozs (Lángné Molnár *et al.* 1996), árpa (Molnár-Láng *et al.* 2000a, Molnár-Láng *et al.* 2000b), kecskebúza (Linc *et al.* 1999, Molnár *et al.* 2009), évelő fajok (Sepsi *et al.* 2008, Kruppa *et al.* 2012)) kromatin kimutatására búza háttérben.

2.4.2 Inter- és intragenomikus átrendeződések a *Triticum timopheevii* fajban

A kezdeti transzlokációs vizsgálatok eredményeit (pl. Gill és Chen 1987, Badaeva *et al.* 1994a) és a FISH technika adta lehetőségeket felhasználva Rodríguez *et al.* (2000) dolgozták ki a *T. timopheevii* kialakulása során bekövetkezett ciklikus intra- és intergenomikus transzlokációk feltételezett evolúciós sorrendjét (3. ábra).



3. ábra Fajspecifikus kromoszóma-átrendeződések a *Triticum timopheevii* A^t (kék árnyalatai) és G (zöld árnyalatai) genomjában (Rodríguez *et al.* 2000 nyomán)

A *T. timopheevii* kialakulásakor – a vad tönkéhez hasonlóan – már rendelkezett egy *T. urartu* eredetű specifikus reciprok transzlokációval a 4A^u és 5A^u kromoszómák hosszú karjai között (Jiang és Gill 1994a). A *T. timopheevii* két kiindulási genomjából (S: *Ae. speltoides* és A^u: *T. urartu*) a poliploidizációt követően, a ciklikus transzlokáció első lépéseként az eredeti 1S kromoszóma rövid karjának szatellitese része cserélődött ki a 6A^u kromoszóma rövid karjának teloméra régiójával, így alakítva ki a szatellitese 6A^t kromoszómát, mely a későbbiekben paracentrikus inverzió is átesett. A második reciprok transzlokációs lépés során pedig az 1S kromoszóma 6A^u kromatint hordozó részének és a 4G kromoszóma rövid karjának teloméra régiói cserélődtek ki, mely következtében alakult ki az 1G kromoszóma. A harmadik transzlokációban a 4A^u kromoszóma hosszú karjának 5A^u kromatint hordozó részének teloméra régiója és a második lépés során kialakult, átmeneti 4S kromoszóma rövidkarjának 6A^u kromatint hordozó része vett részt, így alakítva ki a ma ismert 4G kromoszómát. A ciklikus

transzlokációs folyamat utolsó részeként a $3A^u$ kromoszóma hosszú karjának disztális része épült át a harmadik transzlokációs lépés során kialakult, ideiglenes $4A^u$ kromoszóma hosszú karjának, két idegen ($5A^u$ és $6A^u$) transzlokációt hordozó végéhez, mely transzlokációt már Gill és Chen (1987) is ismertetett. Ebben a transzlokációban az ideiglenes $4A^u$ kromoszóma hosszú karjának teloméra részéről, az ott lévő $6A^u$ kromoszóma rövid karjának telomérájának egy része átépült a $3A^u$ hosszú karjának disztális végére, melyet Rodríguez *et al.* (2000) meiotikus párosodási vizsgálatokkal igazoltak. A négy lépésben lejátszódó folyamat végére alakult ki a *T. timopheevii* A genomi ($3A^t$, $4A^t$, $5A^t$ és $6A^t$) és G genomi (1G és 4G) kromoszómáinak jelenlegi egyedi szerkezete, minek következtében a többi fajtól eltérő, A^t és G megjelölést kapták (a változatlanul maradt kromoszómákat is beleértve). Az 5AL/4AL transzlokációt mindkét faj a *T. urartu* fajtól örökölte, ezért az $5A^u$ és az $5A^t$ kromoszómák között a transzlokáció ellenére sincs számottevő különbség (Devos *et al.* 1995). A vad tönke leszármazottjaira (köztük a búzára is) jellemző $4A^u$ - $5A^u$ -7B kromoszómák közötti transzlokációval és a $4A^u$ kromoszóma dupla pericentrikus inverziójával szemben (Devos *et al.* 1995) tehát a *T. timopheevii*-re az imént ismertetett, 4 db fajspecifikus átrendeződés ($6A^tS/1GS$, $1GS/4GS$, $4GS/4A^tL$, $4A^tL/3A^tL$), valamint a $6A^t$ hosszú karjának paracentrikus inverziója jellemző (Jiang és Gill 1994b, Rodríguez *et al.* 2000, Salina *et al.* 2006). Ezeken a fajspecifikus transzlokációkon kívül a *T. timopheevii* különböző populációiban – főként a vad alfaj populációiban – számos random transzlokáció is történt (pl. $5A^t/3GL$, $1G/2G$, $5G/6G$), melyek az A^t és G kromoszómák az A^u és B kromoszómáktól való még markánsabb elkülönülését eredményezték (Badaeva *et al.* 1994b; Maestra és Naranjo 1999; Rodríguez *et al.* 2000). Az A^t és G kromoszómák közötti intergenomikus átrendeződések kimutatására a mcGISH technika is alkalmas, amennyiben a kimutatni kívánt kromoszóma szakasz nem túl rövid (Rodríguez *et al.* 2000, Uhrin *et al.* 2012, Mikó *et al.* 2015).

Kutatásunk során ezzel a technikával, illetve a genomok FISH kariotípusának kidolgozásával kívántuk hatékonyabbá tenni a *T. timopheevii* kromatin nyomonkövetését a búzával alkotott hibridekben. Ez az eszköz jól hasznosítható lehet a jövő búzanemesítői számára is.

A *T. timopheevii* fentebb részletesen ismertetett, előnyös tulajdonságai miatt már több kutatócsoport is vizsgálta e faj búzanemesítésben történő felhasználásának lehetőségét. E potenciális forrás további részletes vizsgálata azonban további, eddig még nem hasznosított előnyös tulajdonságok azonosításához vezethet. Munkánk legfontosabb célja ezért egy többirányú előnemesítési program elindítása volt, melynek során e faj hasznos, elsősorban biotikus rezisztenciát javító tulajdonságainak beépítését kezdtük meg a búzába, ezzel segítve elő legfontosabb kenyérgabonánk termésbiztonságának növelését.

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Növényi anyagok és keresztezések

A Martonvásár Gabona Génbankban tárolt, összesen 56 *Triticum timopheevii* Zhuk. génbanki tételt (MVGB) vizsgáltuk szántóföldön. A tételek megoszlása a következő volt:

- alapfaj: 19 génbanki tétel,
- *T. timopheevii* var. *timopheevii*: 5 tétel,
- *T. timopheevii* var. *typicum*: 3 tétel,
- *T. timopheevii* var. *rubiginosum*, a *T. timopheevii* var. *nigrum* és a *T. timopheevii* var. *viticulosum* változatokból: 1-1 génbanki tétel,
- a *T. timopheevii* subsp. *timopheevii* alfajból (beleértve 3 *T. militinae* tételt is, mely a *T. timopheevii* var. *militinae* szinonimája): 8 tétel,
- *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* (régábban *T. araraticum* Jakubz.): 13 génbanki tétel,
- *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* var. *araxacum*: 3 tétel,
- a *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* var. *nachitacheromicum* és a *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* var. *tumaniani* változatokból: 1-1 génbanki tétel.

Ezeket a *T. timopheevii* tégeket összesen 12 taxon-csoportba sorolva jellemeztük előnemesítésben való felhasználhatóságuk alapján. Csírázási, illetve időjárási okok miatt néhány vizsgált *T. timopheevii* tétel jelenleg már nem található meg a génbankban. A csak fajnévvel és annak varietas formájával nyilvántartott tégelekről megállapítottuk, hogy mind a subsp. *timopheevii* alfajhoz tartoznak, ezért vizsgálataink során ebbe az alakkörbe soroltuk őket.

A keresztezhetőségi vizsgálatban a kiválasztott *T. timopheevii* génbanki tégelek keresztezési partnereként egy féltörpe alakor törzset (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum* '1T-1') használtunk, amelyet etil-metán-szulfonát (EMS) mutagenezissel állítottak elő Martonvásáron (Kovács *et al.* 2012). E törzs szelekciójának fókuszában a kiemelkedő agronómiai tulajdonságok és az egyéb *Triticum* fajokkal való jó keresztezhetőség állt (Megyeri *et al.* 2011). Az '1T-1' alakor törzset, a *T. timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* (MVGB845) genotípust és a belőlük előállított *T. timococcum* amfiploidot külön is vizsgáltuk munkánk során.

A búzába történő idegen fajú génátvitelnél többségében a jól keresztezhető *T. aestivum* 'Mv9kr1' búzatörzset (Molnár-Láng *et al.* 1996) használtuk, néhány keresztezést pedig normál, *Kr1Kr1* allélpárt hordozó, modern búzafajtával ('Mv Karizma', 'Mv Marsall', 'Mv Nádor', 'Mv Suba') is elvégeztünk. Az 'Mv9kr1' törzs jó agronómiai tulajdonságokkal rendelkezik, azonban levélbetegségekre kifejezetten fogékony, mely tulajdonság hatékonyan járulhat hozzá a

rezisztenciagének sikeres beépülésének megállapításához, valamint az idegen fajjal alkotott hibridek utódnemzedékeinek szelekciójához.

A *T. timococcum* és szülői genotípusainak (*T. timopheevii* MVGB845 és *T. monococcum* '1T-1') betegségrezisztenciájának vizsgálata során a következő genotípusokat használtuk kontrollként:

- Levélrozsda: *T. aestivum* 'Mv9kr1' (fogékony), *T. aestivum* 'Alcedo' (fogékony), rezisztens kontrollként a szülői genotípusok szolgáltak,
- Lisztharmat: *T. aestivum* 'Mv9kr1' (fogékony), *T. aestivum* 'Carstens V.' (fogékony) *T. monococcum* 'Mv Alkor' (rezisztens), *T. aestivum* 'Nannong 02Y23' (rezisztens),
- Kalászfuzárium: *T. aestivum* 'Mv222-13' (fogékony) és *T. aestivum* 'Mv213-11' (mérsékelt rezisztens) martonvásári búzatörzs (Puskás *et al.* 2014).

Mesterségesen fertőzött kísérletben levélrozsdával szemben ellenálló genotípusokat szelektáltunk a Prof. Sutka József által Martonvásáron előállított 28 db BC₃I₃ (háromszor visszakeresztett majd háromszor izolált), *T. timopheevii* kromozómát hordozó búza vonalból (Farshadfar 1995). Az így kiválasztott 6G diszómás addíciós genetikai anyagot bekeresztettük a szintén Martonvásáron előállított 'Rannaja' 6B monoszómás búza vonallal (génbanki tételszám: MVGS1117), amellyel célunk 6B/6G monoszómás szubsztitúció létrehozása volt.

Vizsgáltuk a *T. timococcum* természetben előforduló megfelelőjét, a *T. zhukovskyi* fajt is, amelyhez az MVGB650 génbanki tételt használtuk.

A molekuláris citogenetikai vizsgálatoknál használt teljes genomi DNS-t a *Triticum urartu* – MVGB115 (A genom), valamint az *Aegilops speltoides* – MVGB905 (S genom, a B és G genom öse) génbanki tételek leveleiből vontuk ki.

3.1.1 Keresztezési kombinációk

A fent ismertetett növényi anyag felhasználásával a következő hibrideket hoztuk létre:

- *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* (MVGB845) × *Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum* '1T-1', *Triticum timococcum* néven jelölt hibridje. A hibrid triploid genomját kolhicinkezeléssel dupláztuk meg, ezért az amfiploid további n-edik generációját 'F_n' helyett 'C_n' jelzéssel láttuk el. Vizsgáltuk a C₂ (a genomduplázott F₁ nemzedék utódjai), C₃, C₄ és C₅ nemzedéket,
- Keresztezhetőségi vizsgálat során egyéb *T. timopheevii* × *T. monococcum* '1T-1' kombinációkat állítottunk elő szelektált *T. timopheevii* génbanki tételekből (MVGB132, MVGB306, MVGB530, MVGB533, MVGB573, MVGB577, MVGB848, MVGB849, MVGB1174), melyek szelekciója a C₄ nemzedéknél tart,

- *T. aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timococcum*, majd ennek az 'Mv9kr1' búzatörzsszel történt többszöri visszakeresztezésének eredményeül kapott utódnemzedékei (BC₁, BC₂, BC₃),
- *T. timococcum* × *T. aestivum* genotípusok ('Mv9kr1', 'Mv Marsall', 'Mv Nádor', 'Mv Suba') egyikével alkotott hibridek,
- *T. zhukovskyi* MVGB650 × *T. timococcum* kombináció utódnemzedéke az F₄ nemzedéknél tart,
- *T. aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timopheevii* MVGB845, majd ennek keresztezési kombinációja három martonvásári őszi búzafajta ('Mv Marsall', 'Mv Nádor', 'Mv Suba') egyikével, és visszakeresztezése 'Mv9kr1'-gyel (BC₂ nemzedék),
- *T. timopheevii* MVGB845 × *T. aestivum* genotípusok ('Mv9kr1', 'Mv Karizma', 'Mv Marsall', 'Mv Nádor', 'Mv Suba') egyikével létrehozott utódai,
- *T. aestivum* 'Rannaja' 6B monoszóma MVGS1117 × *T. aestivum* 6G diszómás addíció.

3.2 Fajhibridek előállítása

3.2.1 Megporzás

A keresztezés anyai partnerének kiválasztott növényegyedek izolált kalászait a kasztrálásukat (kalászkák csúcsi felének levágása, a középső virág kiemelése, és a 2 szélső virág 3-3 zöld színű portokjának eltávolítása) követően 2-4 nappal poroztuk meg szántóföldi (egyed *T. timopheevii* és *T. timococcum* anya használatakor) vagy fitotroni körülmények között. A pollenadóként használt, levágott kalászból származó polleneket pörgetéssel juttattuk a kasztrált kalászokra. Ezt követően a levágott tetejű izolátort újra lezártuk, majd a többi kalász érésével egy időben begyűjtöttük a hibrid szemeket tartalmazó izolált kalászokat is. A keresztezési partnerek kalászolása közötti körülbelül 2 hetes eltérés áthidalására a búzával végzett keresztezéseket fitotronban, klimatizált növénynevelő kamrában végeztük, melyben a búzaszülő későbbi kiültetésével tudtuk a kalászolását annak keresztezési partnereivel (*T. timopheevii*, *T. timococcum*, illetve ezek búzával létrehozott kombinációi) szinkronizálni. A kasztrálás és porzás a növénynevelő kamrában is a szántóföldivel azonos módon történt (Convion PGR-15: 21 °C nappali és 16 °C éjszakai hőmérséklet, 16 órás megvilágítás, 70% relatív páratartalom).

3.2.2 Növénynevelés

A szántóföldi növénynevelési- és felvételezési munkát a Martonvásár Gabona Génbank martonvásári tenyészkertjében végeztük. Az egymástól 20 cm-re lévő 1 m hosszú sorokba 20-20 szemet vetettünk el októberben. A fitotroni kísérletben az előcsíráztatott szemeket 33 mm

átmérőjű, 40 mm magas Jiffy-7 tőzeg táphengerbe (Jiffy International AS, Kristiansand, Norvégia) helyeztük, és az első levelek kifejlődését követően a növényeket 6 héten keresztül állandó 4 °C-os hőmérsékleten vernalizáltuk. Ezt követően a növényeket földdel töltött, 2 l-es műanyag (11cm átmérőjű és 18 cm magas) cserepekbe egyesével kiültettük. A klímaszerekényekben Tischner *et al.* (1997) által búzára kidolgozott programot használva neveltük a növényeket. Eszerint a cserépbe ültetést követően körülbelül 4 héten keresztül 10 °C / 15 °C (éjszakai/nappali) hőmérsékleten, 12 órás, 250-300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitású megvilágítással és 70-80% relatív páratartalommal segítettük elő a bokrosodást. A későbbi fenológiai fázisok (szárba indulás, kalászás, tejes érés) elérésekor az éjszakai és nappali hőmérsékletet 2-2 °C-kal növeltük, miközben a megvilágítás hosszát a bokrosodás után 14 órára, majd a szárbaindulástól érésig tartó időszakban 16 órára növeltük.

Az aratást követően a szemkötést a feldolgozás során számolt, egy kalászban lévő szemek és a megporzott bibék számának hányadosával határoztuk meg.

3.2.3 Genomduplázás

A tetraploid *T. timopheevii* és a diploid *T. monococcum* keresztezéséből származó utódok triploidok ($2n=3x=21$), ezért sterilek. Fertilis utódok előállítására az F_1 növényeket 3-5 leveles állapotban 0,04%-os kolhicin-oldattal kezeltük, amely a genomuk megduplázódásához vezetett (4. ábra). A jól bokrosodott fiatal növények gyökerét lemostuk, majd 4 órára kolhicin oldatba helyeztük, és az ezt követő 12 órás folyóvízes átmosás végeztével visszaültettük őket a cserepekbe és folytattuk a fitotroni növénynevelést (Convion PGR-15) a korábban ismertetett „búza” programmal.



4. ábra Kolhicin kezelés F_1 növényeken (Martonvásár, 2011)

3.3 Molekuláris citogenetikai vizsgálatok

3.3.1 Kromoszómapreparátum készítése

A Petri-csészékben 16 órára beáztatott, majd nedves szűrőpapírra helyezett búzaszemeket a csíra felpattanását követően minimum 48 órára 4 °C-os hűtőben tároltuk, hogy a gyökérmerisztémákban az osztódás teljesen leálljon. Ezt követően a szemeket 25 °C-os termosztátba helyeztük és 26 óra múlva a leszedett (1-1,5 cm hosszú) gyökércsúcsokat jeges vízzel telt fiolákban 24 órán át tároltuk. A gyökereket ezt követően abszolút etil alkohol : 100%-os ecetsav 3:1 arányú keverékében 5 napig 37 °C-on fixáltuk, majd kárminecetsav 1%-os

oldatában 2 órán keresztül festettük és a további felhasználásig 3:1 arányú alkohol:ecetsav oldatban, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A mitotikus kromoszómapreparátum készítéséhez a fagyasztóban minimum 72 órát tárolt, festett gyökereket 1 órára 45%-os ecetsavba helyeztük, majd a gyökércsúcs 0,5-1 mm-es végének levágását követően a belső szöveti állományt kinyomtuk a tárgylemezre, ahol 1-2 csepp 45%-os ecetsavat cseppentettünk rá. A fedőlemez ráhelyezése után a sejteket óvatos kocogtatással szétválasztottuk, majd a tárgylemezt 1-2 másodpercig láng fölé helyezve az ecetsav többségét elpárologtattuk, és egy ezt követő erősebb nyomással fixáltuk a kromoszómák helyzetét a tárgylemezen. Fáziskontrasztos mikroszkóppal kerestük meg a megfelelő sejteket (összes kromoszóma megtalálható, azok átfedése minimális és a citoplazma mennyisége elhanyagolható) a preparátumokon, melyeket a tárgylemez folyékony N_2 -ben ($-195\text{ }^{\circ}\text{C}$) történt fagyasztásával (és a fedőlemez eltávolításával) fixáltuk. A tárgylemezeket etanolsorozatot (5 perc 70%, 5 perc 90%, 30 perc abszolút etanol) használva víztelenítettük, majd az *in situ* hibridizációig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A nagyobb mennyiségű utódnövény kromoszómaszámának precíz meghatározásához a Feulgen-módszert alkalmaztuk. A kromoszómapreparátum készítéséhez az előzőleg leírt módon előkezelt gyökereket használtuk, azonban a kárminecetsavas festés helyett a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fixált gyökereket 12-14 percig 1N sósavban $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hidrolizáltuk, majd fukszinnal (0,5 g/100 ml) 8 percig festettük. A jól festődő gyökércsúcsokból az előzőleg ismertetett módon készítettük el a preparátumokat, amelyekben a kromoszómák könnyebben voltak számolhatók.

3.3.2 Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

3.3.2.1 DNS próbák

A fluoreszcens *in situ* hibridizációt első lépésben három, széleskörben használt repetitív DNS próbával végeztük el (FISH), melyeket előzőleg PCR készüléken (Eppendorf MasterCycler5333, Eppendorf AG, Hamburg, Németország) szaporítottunk fel:

- Az Afa-family próba egy, az *Ae. tauschii* fajtól izolált, 260 bp hosszúságú repetitív DNS szekvenciát hordozó szakasz (Nagaki *et al.* 1995), melyet az *Ae. tauschii* teljes genomi DNS-éből szaporítottunk fel a Nagaki *et al.* (1995) által ismertetett PCR reakció segítségével, majd digoxigenin-11-dUTP-vel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) jelöltünk nick transzlációval (Roche nick transzlációs mix) a gyártó által megadott protokoll szerint,

- A pSc119.2 elnevezésű, rozból izolált, 120 bp hosszú repetitív DNS szakaszt (Bedbrook *et al.* 1980) a rozs genomi DNS-éből állítottuk elő a Contento *et al.* (2005) által publikáltakat követve, majd biotin-16-dUTP-vel (Roche) jelöltük nick translációval (Roche protokollja szerint),
- A pTa71 jelölésű, 9,05 kb hosszúságú DNS klón a búza riboszómális génjeinek (18S-5.8S-25S rDNS) egy-egy szakaszát hordozza (Gerlach és Bedbrook, 1979), melyet rizs genomi DNS-éből szaporítottuk fel Chang *et al.* (2010) módszere alapján, majd jelölését 50% biotin-16-dUTP-vel és 50% digoxigenin-11-dUTP-vel végeztük el nick transláció alkalmazásával (Roche protokollja szerint).

A FISH-t követően elvégzett genomi *in situ* hibridizációhoz (GISH) szükséges tiszta DNS-t Sharp *et al.* (1988) által leírt fenol-kloroform módszerrel, a QuicKGene-Mini80 DNS-izoláló készülékkel (FujiFilm, Tokyo, Japán), az ahhoz tartozó kité és protokollt használva nyertük ki, majd a következő próbákat állítottuk elő:

- Az A genomi próba előállítása során *T. urartu* DNS-t jelöltünk biotin-16-dUTP-vel nick translációval (Roche protokollja szerint),
- Az S genomi próba előállítása során *Ae. speltoides* DNS-t jelöltünk digoxigenin-11-dUTP-vel nick transláció használatával (Roche protokollja szerint).

Emellett a GISH optimalizálása során fordított kombinációban jelölt A- és S genomi próbával is dolgoztunk. A GISH eljárásban blokkolóként jelöletlen *Ae. speltoides* DNS-t is használtunk. A fagyasztóban tárolt teljes genomi próba- és blokkoló DNS-eket közvetlenül az *in situ* hibridizáció előtt 4,5 percig 100 °C-on elődenaturáltuk (egyszálúvá tettük).

3.3.2.2 Preparátumok előkezelése

A fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH és GISH) megelőzően szükséges a preparátumokról eltávolítani a próbák hibridizációját gátló, illetve a kiértékelést zavaró RNS-t és citoplazmát. A preparátumok RNS tartalmát egy 37 °C-os vízfürdőben végrehajtott, 45 perces RNase (ribonukleáz enzim) kezeléssel (10 mg/ml RNase 2× SSC-ben (saline sodium citrate: nátrium-citrát és nátrium-klorid 1:2,135 arányú keverékének 2,577%-os vizes oldata) oldva 0,05%-os oldattá) távolítottuk el. Egy mosási lépés (2 × 2 perc 2× SSC-ben 37 °C-on) közbeiktatása után, a preparátumokon lévő citoplazmát frissen készített pepszinoldat (MQ (Milli-Q víz: desztillált víz ultratiszta változata) és 1N HCl 99:1 arányú keverékében 1%-osan oldott, 1mg/ml sűrűségű pepszin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)) segítségével 37 °C-on, 1 percig emésztettük. Az ezt követő újabb mosási lépés (2 × 2 perc 2× SSC-ben 37 °C-on) után a kromoszómák

utófixálását célzó, 10 perces paraformaldehides kezelést (MQ, PBS (phosphate-buffered saline: foszfátos sóoldat; pH7,4) és 8M NaOH 6300:260:1 arányú keverékében oldva 4%-osan oldott paraformaldehid) hajtottunk végre szobahőmérsékleten. A kezelést követő további mosási lépéseket (3 × 2 perc 2× SSC-ben) szobahőmérsékleten hajtottuk végre, majd a preparátumokat - 20 °C-os etanolsorozatban (3 perc 70%, 3 perc 90%, 5 perc abszolút etanol) dehidratáltuk.

Azonos preparátumon végzett FISH és GISH esetén az első hibridizációt követően, a hibridizációs jelek dokumentálása után a tárgylemezeket szobahőmérsékleten 4× SSC-Tween-ben (0,2% polioxietilén-szorbitán-monolaurát 4× SSC-ben (dupla töménységű 2× SSC) oldva) 3 × 30 percig, majd 2× SSC-ben 2 × 5 percig mostuk, végül etanolsorozatban (3 perc 70%, 3 perc 90%, 5 perc abszolút etanol) történt dehidratálásukat követően újrahibridizáltuk.

3.3.2.3 *In situ* hibridizáció

A 30 µl/preparátum mennyiségű hibridizációs keverék törzsoldata (~28 µl) formamidot, 25 v/v%-os dextranszulfátot, 20× SSC-t (tízszeres töménységű 2× SSC) és 10 v/v%-os SDS-t (sodium dodecyl sulfate: nátrium-lauril-szulfát) 50:33:10:1 arányban tartalmazott, melyhez blokkoló DNS-ként FISH esetén hozzáadtunk még 5 ng lazac sperma DNS-t (50 ng/µl sűrűségű, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), illetve GISH esetén 2 µg S genomi DNS-t (2793 ng/µl sűrűségű, a jelölt S genomi próba 50-szeres mennyisége). A GISH próbák mennyiségének optimalizálását követően preparátumonként a következő mennyiségben adtuk hozzá a jelölt próbákat a törzsoldatokhoz:

- FISH: 20 ng (0,4 µl) Afa-family, 30 ng (0,6 µl) pSc119.2 és 30 ng (0,6 µl) pTa71
- GISH: 40 ng (0,8 µl) jelölt A genomi próba és 40 ng (0,8 µl) jelölt S genomi próba

Az összeállított hibridizációs keverékben lévő DNS láncokat 85 °C-on 12 percig (FISH), illetve 99 °C-on 10 percig (GISH) denaturáltuk PCR készülékkel, majd a keveréket a preparátumokra juttatva, a kromoszómákat a próba jelenlétében denaturáltuk 75 °C-on 6 percig (FISH), illetve 80 °C-on 2 percig (GISH) a PCR készülék tárgylemez feltétjét használva. A denaturációt követően a preparátumokat 16 órán keresztül 37 °C-on (FISH), illetve 42 °C-on (GISH) inkubáltuk. Az inkubációt követően a nem-specifikusan hibridizált szekvenciák lemosása több lépésben történt 42 °C-os vízfürdő használatával: 2 × 5 perc 2× SSC-vel, majd 2 × 5 perc 0,1× SSC-vel, végül 2 × 5 perc 2× SSC-vel. A mosási eljárás végeztével a tárgylemezeket tartó üveg festőkádat szobahőmérsékletre helyeztük és 4× SSC-Tween-nel töltöttük fel.

3.3.2.4 Fluoreszcens jelek detektálása

A digoxigenin-11-dUTP-vel jelölt próbák hibridizációs helyeit vörös fluoreszcens jelet adó anti-digoxigenin-rhodamine Fab (antigénköötő) fragmentekkel (Roche), míg a biotin-16-dUTP-vel jelölt próbákét zöld fluoreszcens jelet adó streptavidin-fluorescein isothiocyanate (streptavidin-FITC) Fab fragmentekkel (Roche) jelöltük egy 20 perces, 37 °C-os hibridizáció során. E detektálási folyamat előtt mindkét színanyagot 5-5%-os arányban feloldottuk TNB (1M TrisHCl, 3M NaCl és a Roche által gyártott speciális blokkoló reagens 20:10:1 arányú keveréke MQ vízben 15%-osra hígítva) pufferben (50 µl/preparátum). A detektálást követően 5 percig sötétben, szobahőmérsékleten mostuk a preparátumokat 4× SSC-Tween-ben, majd Vecta Shield, MQ és 2 mg/ml sűrűségű, kéken fluoreszkáló DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) 100:50:1 arányú oldatával kontrasztfestést végeztünk (20 µl/preparátum).

A hibridizációt követően a preparátumokat Plan Neofluar 100× NA 1.3 olajos objektívvel (ezerszeres nagyítás) felszerelt Zeiss AxioImager.M2 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk. A hibridizációs jeleket a FITC (Zeiss filter set 38), a rhodamine (Zeiss filter set 20) és a DAPI (Zeiss filter set 49) gerjesztési és emissziós spektrumaira érzékeny szűrőkön keresztül Zeiss AxioCam MRm CCD fényképezőgéppel fotóztuk. A fotók kiértékeléséhez AxioVision 4.8.2 szoftvert használtunk.

3.4 Fiatalkori rezisztencia-vizsgálat

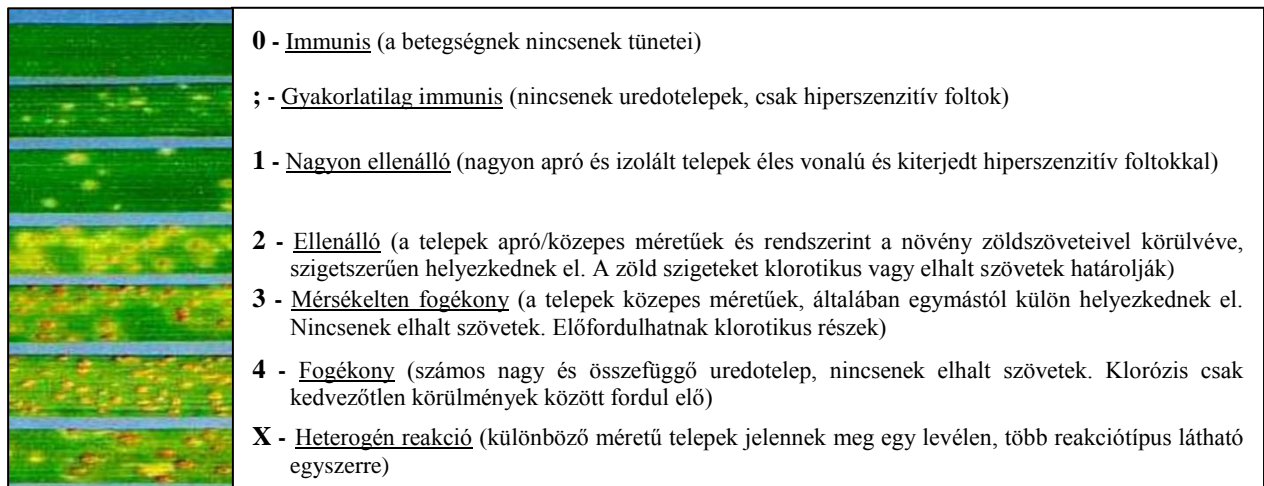
A levélrozsdaival és lisztaharmattal szembeni fiatalkori rezisztencia a növények vernalizálását megelőzően üvegházi körülmények között tesztelhető. A levélrozsda fertőzéséhez optimális körülményeket (90-100% relatív páratartalom) az inokulációt követő két napban polietilén fóliás borítással biztosítottuk. A lisztharmat vizsgálat üvegfalú izolátor dobozokban történt. A növénynevelés során a hőmérséklet 20-22 °C, a megvilágítás hossza (természetes + mesterséges) 16 óra volt. Mindkét esetben a mesterséges inokulációhoz a gombafajok előzetesen felszaporított fertőzőképleteit (levélrozsda uredospórát, illetve lisztharmat konídiumot) használtuk.

3.4.1 Mesterséges levélrozsda-fertőzés

A *T. timococcum* szülőjeként használt *T. timopheevii* és féltörpe alakor genotípusok mellett az amphiploidot és annak búzával alkotott és visszakeresztezett utódjait, valamint különböző *T. timopheevii* kromoszómákat hordozó addíciós búza vonalakat több kísérletben fertőztünk levélrozsda uredospóra szuszpenzióval. Az uredospórákat az 'Alcedo' fogékony búzafajtán szaporítottuk fel, melyet a kísérleteink fogékony kontrolljaként is használtunk. A fertőzés

levélrozsa populációval történt, melynek pontos rasszösszetétele nem ismert. A közel-izogén vonalak több éves vizsgálati eredményei alapján az általunk is használt fertőzőanyag ellen az *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29* és *Lr35* rezisztenciagének hatásosak (Vida *et al.* 2011).

A táphengerben nevelt kétleveles növények levelére ujjbeggyel vittük fel a fertőző szuszpenziót, majd a 48 órán keresztül tartó fóliaborítás alatti nevelést követően, a fertőzés utáni 10. napon értékeltük a növények fertőzöttségét Stakman *et al.* (1962) által javasolt skála alapján (5. ábra).

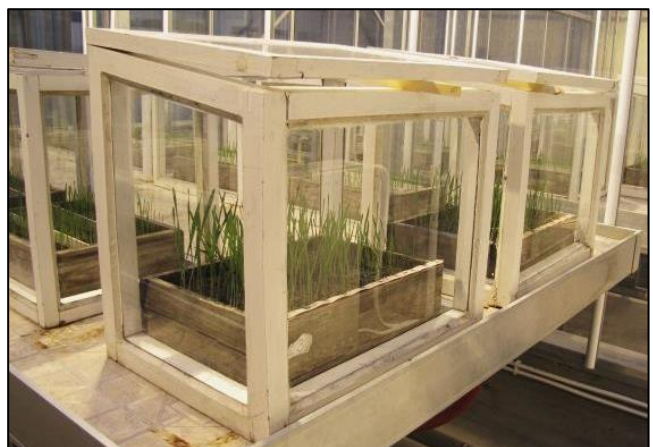


5. ábra A búza levélrozsa-fertőzöttségének értékelési skálája

(Stakman *et al.* 1962 és McIntosh *et al.* 1995 nyomán)

3.4.2 Mesterséges lisztharmat-fertőzés

A *T. timococcum*, annak szülői genotípusai, egy *T. zhukovskyi* genotípus (MVGB650), valamint fogékony ('Carstens V.') és rezisztens ('Nannong 02Y23', 'Mv Alkor' alakorfajta) kontrollok búzalisztharmattal szembeni ellenállóságát vizsgáltuk mesterséges inokulációs körülmények között. Első lépésben a *T. timococcum* növényeket 28 különböző lisztharmat-izolátummal teszteltük (6. ábra). A fertőzéshez használt izolátumok a Nover (1958) által leírt tesztszortimenttel végzett meghatározás alapján a 10-es, 47-es, 51-es, 76-os és 77-es lisztharmatrasszba tartóztak. A következő lépésben a patogén populációban gyakran előforduló 51-es és 76-os rassz izolátumaival inokuláltuk a



6. ábra Üvegházi mesterséges lisztharmat-fertőzési kísérlet (Martonvásár, 2014)

vizsgálatba vont genotípusokat, 2014-ben két ismétlésben. A kísérletekhez 15 cm magas faládát töltöttünk meg földdel, és abba közvetlenül vetettünk el 1-1 sorba 20-20 szemet a vizsgálandó genotípusokból. A ládák fölé helyezett üvegfalú izolátor alatt a növények gyorsan keltek és a vetést követő 6. napon megtörtént az inokuláció, melynek során az előzőleg fogékony növényeken felszaporított fertőzőanyagot rázással juttattuk a vizsgált növények levelére. A konídiumok nagy száma és az izolátor alatt kialakuló, a fertőzéshez kedvező körülmények között extrém nagy kórokozó nyomás mellett vizsgálhattuk a genotípusokat.

3.4.2.1 *Lisztharmat-fogékonyság megállapítása*

A lisztharmatfertőzést követő 7. napon a növények fertőzött első levelén kialakult tünetek alapján osztályoztuk a genotípusok ellenállóságát Nover (1958) által leírt, Szunics és Szunics (1970) által honosított skála szerint:

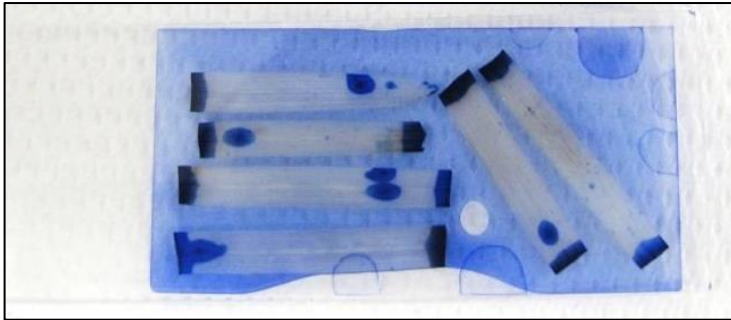
- 0 – immunis (a betegségnek nincsenek tünetei)
- 1 – ellenálló (néhány kisebb telep figyelhető meg szigetszerűen, de nem sporulálnak, konídiumtartót és konídiumokat nem képeznek)
- 2 – mérsékelten ellenálló (közepes méretű telepek szigetszerűen elhelyezkedve, néhány konídiumtartó és klorózis kialakulhat)
- 3 – mérsékelten fogékony (kis vagy közepes méretű, sporuláló telepek)
- 4 – fogékony (sok és nagyméretű, erősen sporuláló telep)

Amennyiben a rezisztens növényeken a hiperszenzitív reakció apró, tűszúráshoz hasonló tünetei megfigyelhetőek voltak, ezt pontosvesszővel (;) jelöltük.

3.4.2.2 *Lisztharmat – növény interakció vizsgálata*

A lisztharmat-ellenállóság vizsgálatával párhuzamosan a kórokozó konídiumai, micéliumai és a gazdanövény közötti interakciók időbeni alakulását is elemeztük levélpreparátumokon. Ehhez az inokulációt követően 9 alkalommal (8, 16, 24, 32, 40, 48, 72, 96 és 168 órával a fertőzés után) mind a 7 genotípus 1-1 fertőzött levelét (5-8 cm-es csúcsi rész) szedtük le, majd 2 ml-es eppendorf csövekben DAB (diamino-benzidin) festékkel infiltráltuk és 8 órán keresztül sötétben festettük. A DAB a növényi sejt elsődleges stresszjelzőjeként ismert hidrogén-peroxid (H_2O_2) jelenlétében barna, oldhatatlan csapadékot képez, így ezzel a módszerrel a lisztharmat behatolására adott reakció is vizsgálható. A DAB festés után a leveleket vízben áztattuk 10 percig, majd abszolút etanol : 100%-os ecetsav 1:1 arányú keverékében 24 órán át kezeltük. Ezt követően a kifehéřített leveleket anilinkék festékben 8 órán keresztül festettük, mely a gomba

képleteit kékre színezte a levél fehérén hagyása mellett, és az előzetesen elvégzett DAB festés detektálhatóságát sem korlátozta.



7. ábra Lisztharmattal fertőzött búzalevél fehérített és anilinkékkel festett preparátuma (Martonvásár, 2015)

A kékre festett levelekből preparátumot készítettünk, melynek gyors kiszáradása ellen glicerolt cseppentettünk a tárgy- és a fedőlemez közé (7. ábra). A preparátumokat N-Achroplan 40× objektívvel (négy százszoros nagyítás) felszerelt Zeiss AxioScope.A1

fénymikroszkóppal (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk és a mikroszkópra rögzített Canon PowerShot G6 digitális fényképezőgéppel (Canon Inc., Japán) fotóztuk.

3.5 Kalászfuzárium rezisztencia vizsgálata

A *Triticum timococcum* és szülői genotípusainak kalászfuzáriummal szembeni ellenállóságát mesterségesen fertőzött tenyészkertben vizsgáltuk 2015-ben Martonvásáron. A fertőzéshez használt két *Fusarium* faj, a *F. graminearum* 'IFA-66' és a *F. culmorum* 'IFA-104' izolátumát permetezéssel (5×10^4 makrokonídium/ml koncentrációban 200 ml/m^2) és kalászkainjektálásos (5×10^5 makrokonídium/ml koncentrációban kalásonként $2 \times 5 \mu\text{l}$ egyetlen kalászka alsó 2 virágja) módszerrel külön-külön juttattuk ki virágzás idején. A kalászfuzáriummal szembeni I. és II. típusú rezisztencia, azaz a fuzárium behatolása és a kalászsorson keresztüli terjedése hatékonyan vizsgálható a permetezéssel inokulációval (szántóföldi rezisztencia), kiegészítve azt a II. típusú rezisztencia elkülönített, kalászkainjektálásos technikával történő vizsgálatával (Puskás 2013).

A permetezéssel inokulációnál a 2 m hosszú, 2 soros parcellák első felét az 'IFA-66', második felét pedig az 'IFA-104' izolátummal kezeltük, majd 26 nappal később értékeltük a kalászfertőzöttséget (%).

A kalászkainjektálásos eljárással a II. típusú kalászfuzárium-ellenállóságot külön is vizsgáltuk a genotípusokból vetett 1-1 db 2 m hosszú sorban. A *F. graminearum* és a *F. culmorum* izolátummal 5-5 kalászt kezeltünk, majd 21 nappal később a fertőződött kalászkák összes kalászkához viszonyított aránya alapján, százalékosan értékeltük a kalászkák fertőzöttségét.

3.6 Fenotípusos tulajdonságok meghatározása

3.6.1 *Triticum timopheevii* génbanki tételek szántóföldi felvételezése

A *T. timopheevii* génbanki tételek szántóföldi felvételezését a Martonvásár Gabona Génbank tenyészkertjében végeztük. Minden génbanki tétel legalább két évben volt vizsgálva, így küszöbölve ki az évjáratok eredménytorzító hatását.

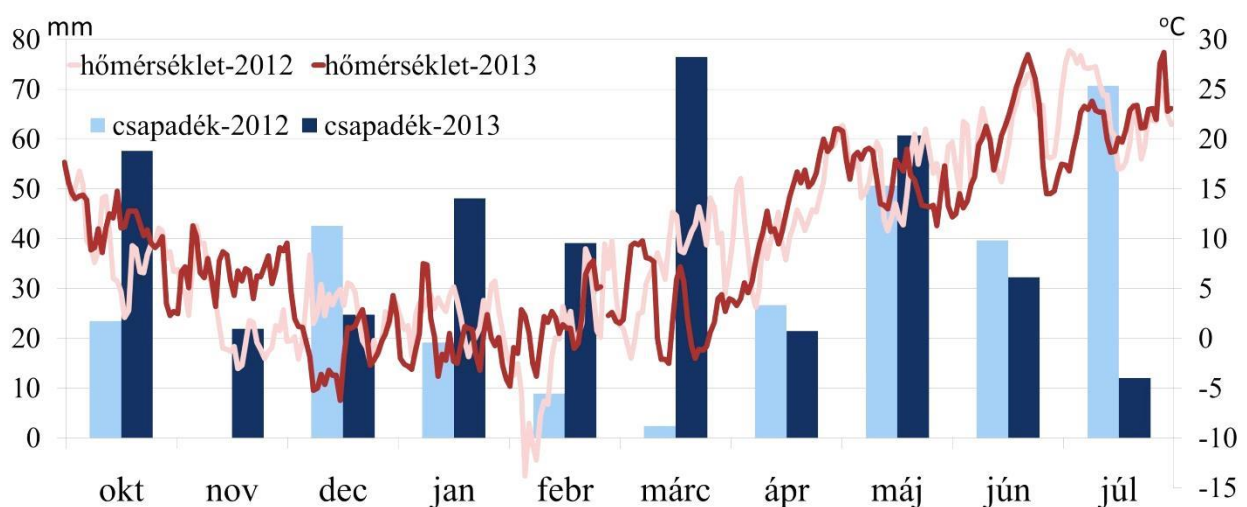
A következő fenotípusos tulajdonságokat vizsgáltuk:

- életforma (őszi, tavaszi, fakultatív),
- növekedési típus (felálló vagy elterülő),
- kalászolási idő (dátum),
- virágzási idő (dátum),
- maximális növénymagasság (cm),
- ezerszem tömeg – nem minden tételnél (g).

A gyakran előforduló búzabetegségekkel (lisztharmat, levélrozsa, vírus fertőzöttség) szembeni szántóföldi ellenállóságot is vizsgáltuk néhány évben, amikor e betegségek tünetei megjelentek. Vizsgálati eredményeinket korábbi martonvásári felvételezési adatokkal is kiegészítettük.

3.6.2 *Triticum timococcum* és szülői genotípusainak fenotípusos és agronómiai jellemzése

A *T. timococcum* részletes szántóföldi jellemzését a Martonvásár Gabona Génbank martonvásári tenyészkertjében végeztük 2012-ben és 2013-ban. E két, őszi kalászos termesztési szezonban mért napi középhőmérsékletet és havi csapadékmennyiséget a 8. ábra mutatja.



8. ábra A 2011/2012-es és 2012/2013-as őszi kalászos szezonban, októbertől júliusig mért napi középhőmérséklet és havi csapadékösszeg alakulása Martonvásáron (Forrás: MTA ATK)

A tenyészedőszak kilenc hónapja alatt (október 15 – július 15) lehullott csapadék 2012-ben 238 mm, 2013-ban 371 mm volt.

A szántóföldi vizsgálatokkal párhuzamosan a hibridet és szülőitörzseit fitotron kamrában (Convion PGR-15 klímaszekrény) is vizsgáltuk mindkét évben Martonvásáron a 3.2.2 pontban leírt növénynevelési programot használva.

A 2011/2012-es szezonban 6-6 szülői sor mellé 53 izolált *T. timococcum* kalászt vetettünk el kalásonként külön sorba a szántóföldön, míg a fitotronban a szabadföldi 53 izolált kalász közül kiválasztott 7 kalászból származó szemekből nevelt 31 *T. timococcum* és 4-4 szülői növényegyedet ültettünk. A 2012/2013-as szezonban 56 sor *T. timococcum* (C₃ generáció) és 10-10 szülői növényegyed felvételezését végeztük el, amellyel párhuzamosan 31 *T. timococcum* növényt vizsgáltunk (szülők nélkül) fitotroni körülmények között. Ahol nem kalászutódsort vizsgáltunk, ott mindkét év októberében az egymástól 20 cm-re lévő 1 m hosszú sorokba 20-20 szemet vetettünk el. Egy 2013-as tavaszi vetéssel a genotípusok növekedési típusát (őszi, tavaszi, fakultatív) is vizsgáltuk. Ezen kívül felvételeztük a kalászosolási időt (csak szabadföldön), a növénymagasságot és a növényenkénti hajtásszámot is.

A két év során vizsgáltuk a kalázmorfológiai és fertilitási tulajdonságokat is, melynek keretében elemeztük a fitotroni növényi anyag összes kalászát és a szántóföldi kísérletben szereplő genotípusok 30-30 kalászát. Ez alól csak a 2012-es év volt kivétel, amikor a hibrid 146 szántóföldről származó kalászát vizsgáltuk. Aratás után kalásonként meghatároztuk a kalász hosszát (szálkák nélkül), a kalász tömörségét (kalászkák száma 1 cm kaláshosszon), valamint a kalásonkénti virágszámot és szemszámot. Mindkét évben a *T. timococcum* kalászokat celofánzacskóval izoláltuk (kivéve a 2013-as szabadföldi kísérletet), míg a szülők kalászait nem izoláltuk.

A fontosabb búza gombabetegségekkel (lisztharmat, levélrozsa, sárgarozsa) szembeni fogékonyt természetes kórokozó nyomás mellett, 0-9 skálán pontozva (0 = tünetmentes, 9 = fogékony), szántóföldön vizsgáltuk 2013 és 2015 között a fogékony 'Mv9kr1' búzatörzset használva kontrollként.

3.7 Fenotípusos- és rezisztencia-tulajdonságok statisztikai kiértékelése

Az adatokat egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztük SPSS 16.0 statisztikai szoftverrel (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), az alábbi statisztikai modellt használva:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

ahol X_{ij} az i -edik genotípus X tulajdonságának j -edik mért értéke (függő változó), μ a becsült várható érték (konstans), α_i az i -edik genotípus faktorhatása (független változó) és ε_{ij} a mért értékhez tartozó hibateg.

A genotípusonként és tulajdonságonként vizsgált alapsokaságok hibategjainak eloszlását normalitás vizsgálattal igazoltuk: 2 esetben D'Agostino teszttel (D'Agostino *et al.* 1990) $p > 0,05$ szignifikancia szint mellett (*T. timopheevii* kalászolási idő szántóföldön: $p=0,079$; *T. timococcum* növénymagasság fitotronban: $p=0,100$), a többi esetben pedig a ferdeség és csúcsosság vizsgálatával (Tabachnick és Fidell 2013). Az alapsokaságok többségének Levene teszttel kapott szórás inhomogenitása következtében Games-Howell post hoc tesztet használtunk a genotípusok egyes tulajdonságaira vonatkozó szignifikáns különbség ($p < 0,05$) egyidejű kimutatására.

A mesterséges fuzáriumfertőzés eredményét szintén egytényezős ANOVA-val elemeztük, azonban a Levene teszt által igazolt szóráshomogenitás teljesülése miatt Tukey post hoc tesztet használtunk.

4 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1 *Triticum timococcum* előállítása

4.1.1 *Triticum timopheevii* génbanki tételek jellemzése

A *T. timococcum* előállításához felhasznált, már meglévő féltörpe alakor törzs ('1T-1') keresztezési partnere a szintén hasonlóan kiemelkedő rezisztenciájú *T. timopheevii*. A minél sikeresebb keresztezés, illetve a minél jobb agronómiai értékekkel bíró fajhibrid előállítása érdekében, első lépésként a Martonvásár Gabona Génbankban fenntartott *T. timopheevii* tételek részletes jellemzését is szükséges volt elvégeznünk a keresztezést megelőzően.

Az 56 *T. timopheevii* génbanki tétel elmúlt évekbeli, átfogó szántóföldi megfigyelésekből származó adatai mellett korábbi évekből származókat is felhasználtunk. A vizsgált tételekről összesen 2100 felvételezési adatot gyűjtöttünk és értékeltünk ki. Az elemzések során az egyes taxon-csoportok értékeit tulajdonságokként átlagoltuk, így minimalizáltuk az évjáráthatást. A tételleket két alakkörbe (*timopheevii* és *armeniaccum*) tartozó 12 taxon-csoportba soroltuk, és a taxon-csoportonként számított átlagértékeket hasonlítottuk össze (2. táblázat).

A vizsgált 56 *T. timopheevii* tétel 14%-a tavaszi életformájú, míg több mint 40%-uk vernalizációs időtől függetlenül is szárba indul, ami jól szemlélteti a génbankunkban tárolt tételleink genetikai sokszínűségét. Ez a heterogenitás megmutatkozott a növénymagasság és kalászolási idő nagyfokú szórásában is.

A *T. timopheevii* subsp. *armeniaccum* génbanki tételek több mint fele mutatott vírusfertőzöttségre utaló tüneteket, míg az alapfajhoz és a subsp. *timopheevii* alfajhoz tartozó tételek 81,6%-a tünetmentes volt. Néhány kivételtől eltekintve az összes *T. timopheevii* tétel ellenálló volt a lisztharmattal és a levélrozsdával szemben szántóföldi természetes kórokozó nyomás mellett.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy agronómiailag a legcélszerűbb a termesztett alfajhoz (subsp. *timopheevii*) tartozó 38 génbanki tétel (*timopheevii* alakkör) közül kiválasztani az új amfiploid anyai szülőpartnerét. A vad alfajhoz (subsp. *armeniaccum*) tartozó 18 génbanki tétel többsége elterülő növekedési típusú volt, és a megfigyelések alapján minimálisan érzékenyebbek voltak a gombás (lisztharmat, levélrozsda) és vírusos fertőzésekre is. Az *armeniaccum* alakkörbe tartozó génbanki tételek az előnyös korai kalászolási- és virágzási idejük ellenére, a törékeny kalászorsójuk és a viszonylag kis ezerszemtömegük miatt nehezebben használhatók fel az előnemesítésben (3. táblázat).

2. táblázat A Martonvásár Gabona Génbankban fenntartott *Triticum timopheevii* génbanki tételek fontosabb tulajdonságai taxon-csoportonként több év átlagában (n = a felvételezett adatok száma; betegség-fogékonyság: 0 = tünetmentes, 9 = nagyon fogékony) (Martonvásár, 2004-2010)

<i>Triticum timopheevii</i> Zhuk. taxon-csoportok (génbanki tételek száma)	Kalászolási idő (n; szórás)	Virágzási idő (n; szórás)	Növényma- gasság cm (n; szórás)	Ezerszem- tömeg g (n; szórás)	Növekedési típus (tételszám)		Életforma (tételszám)			Betegség-fogékonyság			
					felálló	elterülő	őszi	tavaszi	fakul- tatív	Levél- rozsdá (0-9)	Liszt- harmat (0-9)	vírusfertőzöttség (génbanki tételek száma)	
												fertőződött	tünetmentes
Alapfaj (19)	Június 9. (68; ±4,98)	Június 13. (68; ±5,00)	103 (62; ±32,34)	35,29 (12; ±3,20)	18	1	6	2	11	0	0	3	16
var. <i>nigrum</i> (1)	Június 9. (6; ±5,17)	Június 14. (6; ±5,17)	92 (5; ±38,42)	30,35 (1; -)	1	0	0	0	1	0	0	0	1
var. <i>rubiginosum</i> (1)	Június 3. (9; ±6,22)	Június 7. (9; ±6,62)	112 (5; ±18,65)	33,38 (2; ±2,23)	1	0	0	0	1	0	0	0	1
var. <i>timopheevii</i> (5)	Június 6. (20; ±2,98)	Június 10. (20; 3,23)	111 (17; ±20,32)	35,92 (5; ±2,60)	4	1	4	0	1	0	0	2	3
var. <i>typicum</i> (3)	Június 10. (6; 7,50)	Június 15. (6; ±8,67)	124 (4; ±33,26)	35,55 (1; -)	3	0	2	1	0	0	0	0	3
var. <i>viticulosum</i> (1)	Június 10. (6; 2,56)	Június 15. (6; ±3,62)	110 (5; ±30,21)	-	1	0	0	0	1	0	0	0	1
subsp. <i>timopheevii</i> (5)	Június 5. (28; 5,58)	Június 9. (28; ±5,41)	96 (18; ±35,30)	33,00 (4; ±4,81)	4	1	3	1	1	0	0	2	3
subsp. <i>timopheevii</i> f. <i>militinae</i> (3)	Június 22. (4; ±3,86)	Június 26. (4; ±3,56)	43 (4; ±5,00)	-	3	0	1	2	0	0	0	0	3
subsp. <i>armeniicum</i> (13)	Június 3. (42; ±8,66)	Június 7. (42; ±8,71)	88 (33; ±26,24)	22,23 (2; ±11,07)	4	9	6	2	5	1 db: 8 1 db: 5 11 db: 0	1 db: 3 12 db: 0	7	6
subsp. <i>armeniicum</i> var. <i>araxacum</i> (3)	Május 29. (15; ±8,52)	Június 2. (15; ±8,46)	98 (8; ±29,87)	16,73 (3; ±4,44)	0	3	1	0	2	0	0	2	1
subsp. <i>armeniicum</i> var. <i>nachitacheromicum</i> (1)	Június 2. (2; ±3,54)	Június 6. (2; ±0,00)	108 (2; ±53,03)	-	0	1	1	0	0	0	0	1	0
subsp. <i>armeniicum</i> var. <i>tumaniani</i> (1)	Május 31. (1; -)	Június 7. (1; -)	105 (1; -)	-	1	0	1	0	0	0	0	0	1
ÖSSZESEN					40	16	25	8	23	2	1	17	39

3. táblázat A Martonvásár Gabona Génbankban fenntartott *Triticum timopheevii* alakkörök közötti különbségek a szelekció szempontjából fontos, a két típus között jelentős eltérést mutató tulajdonságok kiemelésével (dőlt betű) (Martonvásár, 2004-2010)

Tulajdonság	<i>timopheevii</i> alakkör (38 tétel)	<i>armeniacum</i> alakkör (18 tétel)
Életforma	42% téli, 42% fakultatív, 16% tavaszi	50% téli, 40% fakultatív, 10% tavaszi
Növekedési típus	<i>többségük felálló (92%)</i>	többségük elterülő (72%)
Lisztharmat rezisztencia	rezisztens (100%)	rezisztens (94%)
Levéltrozda rezisztencia	rezisztens (100%)	rezisztens (89%)
Vírus fertőzöttség	<i>többségük tünetmentes (82%)</i>	többségük fertőződött (56%)
Kalászolási idő	később (június eleje-közepe)	<i>korábban (május vége)</i>
Növénymagasság	magasabb (átlagosan 95 cm)	<i>alacsonyabb (átlagosan 88 cm)</i>
Ezerszemtömeg	<i>nagyobb (átlagosan 31,4g)</i>	kisebb (átlagosan 14,3g)

4.1.2 Szülőpartnerek keresztezhetőségi vizsgálata

A 2. táblázat eredményeinek tükrében az amfiploid előállítását megelőző keresztezhetőségi vizsgálatba a *timopheevii* alakkörbe tartozó tételeket vontuk be. Ezek hátránya a viszonylag nagy növénymagasság és a késői kalászás, azonban e két tulajdonság sikeresen javítható az alakokkal alkotott hibridekben, ha a pollenadó alakoknak egy korai kalászású, alacsony törzset választunk. A Martonvásáron előállított *T. monococcum* subsp. *monococcum* '1T-1' alakor törzs ezeknek a feltételeknek tökéletesen megfelelt, ráadásul korábbi kísérletek is igazolták, hogy ezzel a törzssel nagyobb mértékű szemkötés érhető el a nemzetségéhez tartozó fajokon, mint a hagyományos típusú alakokkal való megporzás során (Megyeri *et al.* 2011).

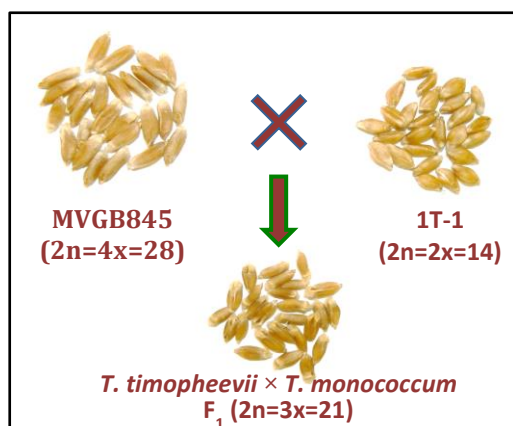
A keresztezhetőségi vizsgálatot szántóföldi körülmények között végeztük el, ezért az '1T-1' kalászolási idejéhez legközelebb eső, tehát a legkorábbi génbanki tételeket választottuk ki a *timopheevii* alakkörből. Kísérletünk alapanyagául 11, különböző életformájú tételt választottunk ki, melyek mindegyike felálló növekedésű és a vizsgált betegségekre tünetmentes volt (4. táblázat).

4. táblázat Keresztezhetőségi vizsgálatra kiválasztott *Triticum timopheevii* génbanki tételek főbb tulajdonságai és a *T. monococcum* '1T-1' alakor törzzsel végrehajtott keresztezés eredménye (n = a felvételezett adatok száma)(Martonvásár, 2010)

<i>Triticum timopheevii</i> génbanki tétel (génbanki azonosító szám)	Kalászoslási idő (n; szórás)	Virágzási idő (n; szórás)	Ezerszem- tömeg (g) (n; szórás)	Növény- magasság cm (n; szórás)	Életforma			Alakorral megporzott virágok száma	Szem- szám	Szem- kötés %
					őszi	tava- szi	fakul- tatív			
<i>T. timopheevii</i> var. <i>rubiginosum</i> (MVGB845)	Június 3. (9; ±6,22)	Június 7. (9; ±6,62)	33,38	112 (5; ±18,65)			x	226	36	15,93
<i>T. timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i> (MVGB1174)	Június 4. (1; -)	Június 9. (1; -)	33,36	115 (1; -)		x		144	3	2,08
<i>T. timopheevii</i> (MVGB121)	Június 4. (5; ±5,50)	Június 8. (5; ±5,40)	34,00	110 (4; ±32,91)			x	224	3	1,34
<i>T. timopheevii</i> (MVGB306)	Június 4. (4; ±4,35)	Június 8. (4; ±2,75)	35,28	108 (4; ±32,79)			x	224	17	7,59
<i>T. timopheevii</i> var. <i>timopheevii</i> (MVGB849)	Június 5. (4; ±3,70)	Június 9. (4; ±2,83)	33,71	115 (3; ±8,66)	x			172	8	4,65
<i>T. timopheevii</i> var. <i>timopheevii</i> (MVGB848)	Június 5. (3; ±1,53)	Június 9. (3; ±1,15)	39,23	117 (3; ±2,89)	x			92	14	15,22
<i>T. timopheevii</i> var. <i>timopheevii</i> (MVGB850)	Június 5. (3; ±3,51)	Június 10. (3; ±4,73)	33,62	125 (3; ±13,23)	x			120	0	0,00
<i>T. timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i> (MVGB573)	Június 5. (9; ±6,25)	Június 9. (9; ±5,71)	31,02	92 (5; ±37,68)	x			116	2	1,72
<i>T. timopheevii</i> (MVGB530)	Június 5. (5; ±2,88)	Június 9. (5; ±2,00)	37,96	120 (5; ±32,98)			x	206	17	8,25
<i>T. timopheevii</i> (MVGB122)	Június 8. (4; ±3,37)	Június 12. (4; ±2,75)	38,84	99 (4; ±37,05)			x	174	0	0,00
<i>T. timopheevii</i> (MVGB533)	Június 9. (6; ±3,92)	Június 13. (6; ±2,71)	38,05	113 (4; ±34,03)	x			70	7	10,00

A legjobb szemkötést (és a legtöbb hibrid szemet) eredményező, viszonylag jó agronómiai értékekkel bíró génbanki tételt választottuk ki az '1T-1' alakor törzs keresztezési partnereként az új amfiploid előállításához. Ez a génbanki tétel a *Triticum timopheevii* Zhuk. subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* (MVGB845) volt, melyet, mint előszelektált génforrást nemcsak az amfiploid előállításánál tudtuk a későbbiekben keresztezési partnerként használni, hanem a búzával végrehajtott közvetlen keresztezéseknél is.

4.1.3 *Triticum timopheevii* × *Triticum monococcum* amfiploid előállítása



9. ábra *Triticum timopheevii* MVGB845, *T. monococcum* '1T-1' és F₁ hibridjük szemtermése (Martonvásár, 2011)

A felvételezési és keresztezési kísérletek eredménye alapján kiválasztott *T. timopheevii* MVGB845 jelzésű génbanki tétellel indítottuk el a *T. timococcum* előállítási programot, melynek során 255 hibrid szemet sikerült előállítani (9. ábra). Ez az eredmény az előkísérlethez képest rosszabb, de még így is kiemelkedő, 13,3%-os szemkötést jelent. Az F₁ hibrid szemek 91,1%-a csírázott ki, majd miután elérték a 3-5 leveles állapotot, az időközben kromoszómavizsgálatnak alávetett és triploidként azonosított növényegyedeket kolhicinnel kezeltük. Így állítottuk elő a duplázott genomú, immár

fertilis hexaploid amfiploid, a *Triticum timococcum* első generációját (C₁), melynek izolált kalászain közel 1500 C₂ szemet kaptunk (5. táblázat).

5. táblázat *Triticum timopheevii* MVGB845 × *T. monococcum* '1T-1' előállításának főbb adatai

Keresztezési kombináció		Kiindulási növény-szám (F ₁)	Kolhicinezés utáni növény-szám (C ₁)	Mortalitás (%)	Izolált C ₁ kalászok száma	Izolált C ₁ virágok száma	C ₂ szemek száma	Szemkötés (%)
anya (♀)	pollenadó (♂)							
<i>Triticum timopheevii</i> var. <i>rubiginosum</i> (MVGB845)	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i> '1T-1'	173	140	19,08	948	35824	1497	4,18

Emellett a keresztezési kísérlet során létrejött, 7 másik *T. timopheevii* tételből származó hibrid kombinációból is hasonló *T. timococcum* amfiploidokat állítottunk elő, azonban ezeket, két másik *T. timopheevii* subsp. *armeniicum* × *T. monococcum* '1T-1' amfiploiddal közösen, több generáción át tartó természetes szelekciónak tesszük ki mielőtt a búza előnemesítési programba bevezetnénk.

4.1.4 *Triticum timococcum* előállításának megvitatása

A legtöbb, a *T. timopheevii* hasznosítását célzó kutatás során a fajt közvetlenül keresztezték a búzával (Leonova *et al.* 2011, Peusha *et al.* 1996, Badaeva *et al.* 1995). Emellett azonban néhány új mesterséges amfiploidot is előállítottak belőle különböző ploidszintű keresztezési partner,

mint például a *T. monococcum* L. (diploid) és a *T. carthlicum* Nevski (tetraploid) felhasználásával (Zhebrak 1944, Rajháthy 1955, Goncharov *et al.* 2007). A *T. timopheevii* fajból először Kostov (1936) állított elő amfiploidot a *T. monococcum* felhasználásával, melynek, a két szülő fajnevének összevonásával, a *Triticum timococcum* Kost. nevet adták (Goncharov *et al.* 2009). A hasznos gének keresztezés útján búzába történő átvitelét megkönnyíti az azonos, hexaploid ploid szint (bridge-keresztezés), ezért előnyös egy diploid keresztezési partner alkalmazása a *T. timopheevii* alapú amfiploid előállításánál. Az első *T. timopheevii* × *T. monococcum* hexaploid hibrid előállításánál egy hagyományos alakor genotípust használtak, és az azóta előállított hasonló hibridek sem tudtak elterjedni a búzanemesítési programokban, mert számos előnytelen agronómiai tulajdonságot is hordoztak (pl. az alakor magassága és gyenge szárszilárdsága) (Goncharov *et al.* 2007). Ezzel ellentétben a jelen kutatásban szereplő hibridet egy körültekintően szelektált *T. timopheevii* génbanki tétel és egy féltörpe előnemesített alakor törzs keresztezésével állítottuk elő, amely a korábbi *T. timococcum* előállítások során tapasztalt nagyon gyenge szemkötéshez viszonyítva (Belea *et al.* 2005) sokkal hatékonyabbnak bizonyult, és arra is rávilágított, hogy az amfiploidok előállításához csak szigorúan szelektált, előnemesített növényi anyagot érdemes használni. A *T. timococcum* felhasználásával új alakor eredetű géneket is bevihetünk búzába, ezzel javítva annak betegség-ellenállóságát valamint technológiai minőségi tulajdonságait (magas tokol- és karotinoid tartalom) (Brandolini *et al.* 2008).

A martonvásári *Triticum timopheevii* génbanki tételek átfogó vizsgálatát követően megállapítottuk, hogy az MVGB845 azonosítójú tételen kívül vannak még más tételek is, amelyeket célszerű lehet bevonni a búza előnemesítési programokba. Ílymódon, akár újabb típusú *T. timococcum* törzsek előállításán keresztül, szélesíthető a búzanemesítés genetikai bázisa. A dolgozatban részletesen jellemzett amfiploiddal együtt összesen 10 különböző *T. timopheevii* genotípusból származó *T. timococcum* fajhibridet állítottunk elő, melyek negyedik generációja (C₄) jelenleg szántóföldi szelekciós programban szerepel. A szelektált utódjaik bevonása a búza előnemesítési programokba a közeljövőben várható. A *T. timopheevii* × *T. monococcum* amfiploid szülői fajnevekből alkotott elnevezése (*Triticum timococcum*) még nem teljesen elfogadott, mert hivatalos botanikai leírása ezidáig nem készült el. Ezért a tudományos publikációkban első említésénél *Triticum timococcum* Kost., nom. nud. elnevezéssel szükséges jelölni ezt a szintetikus fajt.

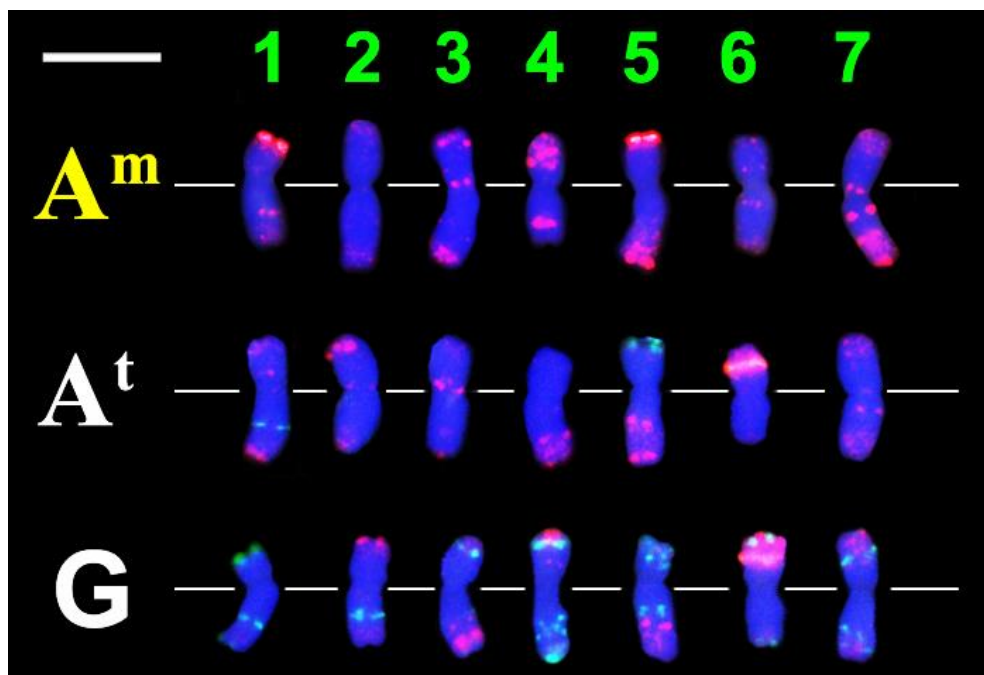
4.2 *Triticum timococcum* molekuláris citogenetikai jellemzése

4.2.1 Szülői genomok kariotipizálása

Az amfiploid genomszerkezetének meghatározásának első lépéseként a szülői genomok FISH kariotípusát készítettük el, hogy a kromoszómáik nagy biztonsággal azonosíthatóak legyenek a

keresztezésükkel előállított *T. timococcum* utódokban. A kromoszómák azonosításához olyan repetitív DNS próbákat használtunk (Afa-family, pTa71 és pSc119.2), amelyek széleskörben elterjedtek a búza rokonsági köréhez tartozó gabonafélék genomanalízisében.

Három színnel végzett fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) alkalmaztunk a hibrid szülői genotípusain, hogy létrehozhassuk az A^m, A^t és G genomok kariogramját. A különböző színnel jelölt repetitív DNS szekvenciákat egyidőben hibridizáltuk a vizsgált preparátum DNS-éhez, majd az így jelölt metafázisos kromoszómákat lefotóztuk. Ezt követően egy képszerkesztő program segítségével a kromoszómákat egyesével kivágtuk és genomjuk szerint sorba rendeztük. A kariogramok alapján a hexaploid hibrid, a *T. timococcum* összes kromoszómája azonosíthatóvá vált a későbbiekben (10. ábra).



10. ábra Az A^m, A^t és G genomok FISH kariogramja: a *Triticum monococcum* subsp. *monococcum* '1T-1' (A^m) és a *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* MVGB845 (A^t és G) kromoszómáin pSc 119.2 (zöld), Afa-family (piros) és pTa71 (narancssárga) repetitív DNS próbákkal kapott fluoreszcens *in situ* hibridizációs mintázat. A kromoszómák genomok és homeológ-csoportok szerint rendezve (Skála = 10 µm)

Az említett FISH eljárással jelölt kromoszómák homeológ-csoportonkénti azonosításában Jiang és Gill (1994b) és Uhrin *et al.* (2012) (*T. timopheevii*), valamint Megyeri *et al.* (2012) (*T. monococcum*) munkája segített. A két A genom kromoszómáinak jelölődése közötti különbséget a 6. táblázat részletezi.

6. táblázat A digoxigeninnel (piros) jelölt Afa-family (és egyéb) repetitív DNS szekvenciák hibridizációs helyei a *Triticum timococcum* különböző A genomjainak kromoszómáin

Homeológ kromoszóma	<i>Triticum monococcum</i> L. subsp. <i>monococcum</i> '1T-1' eredetű A ^m kromoszómák Afa-family (és egyéb FISH) jelölődése		<i>Triticum timopheevii</i> Zhuk. subsp. <i>timopheevii</i> var. <i>rubiginosum</i> MVGB845 eredetű A ^t kromoszómák Afa-family (és egyéb FISH) jelölődése	
	Rövidkar (és centroméra)	Hosszú kar	Rövidkar (és centroméra)	Hosszú kar
1	Néhány telomérás jel; (erős pTa71 jel [narancssárga] a teloméra régióban)	2 interkaláris jel; gyenge jelek a teloméra régióban	Néhány gyenge telomérás jel	2 telomérás jel; (pSc119.2 sáv [zöld] az interkaláris régióban)
2	Nagyon gyenge telomérás jelek	Nagyon gyenge telomérás jelek	2 telomérás jel; 2 gyenge jel a centroméra régióban	Gyenge telomérás jelek
3	2 telomérás jel; 2 pericentromérás jel	Néhány telomérás jel	Néhány gyenge telomérás jel; 2 pericentromérás jel	Néhány gyenge telomérás jel
4	Sok erős jel	2 szubtelomérás jel	Nincs jelölődés	Telomérás jelek
5	(erős pTa71 jel [narancssárga] a teloméra régióban)	2 erős és néhány gyenge jel a teloméra régióban	(2 erős pSc119.2 jel [zöld] a teloméra régióban)	2 telomérás és 2 interkaláris jel; gyenge jelek e két terület között
6	Gyenge jelek a teloméra és pericentroméra régióban	Gyenge jelek a teloméra régióban	Néhány telomérás jel; (erős pTa71 sáv [narancssárga] a szubteloméra régióban)	Nincs jelölődés
7	Gyenge telomérás jelek; 2 jel a centroméra régióban	Sok jel a teloméra régióban; 2 jel a pericentroméra régióban	Gyenge telomérás jelek; gyenge jelölődés a centroméra régióban	2 gyenge interkaláris jel; gyenge telomérás jelek

A 6G, 6A^t, 1A^m és 5A^m kromoszómák erős pTa71 jelet (narancssárga) mutattak, miközben a zölden fluoreszkáló pSc119.2 próba erős jelet adott az összes G kromoszómán, valamint halványabban 2 *T. timopheevii* eredetű A kromoszómán (1A^t és 5A^t). Ezt az eredményt az Afa-family jelölődéssel (piros) együtt felhasználva az összes G kromoszómát el tudtuk különíteni egymástól. Az Afa-family hibridizációs próba főként az A^m és A^t kromoszómákhoz hibridizált.

4.2.2 *Triticum timopheevii* genomokon végzett mcGISH optimalizálása

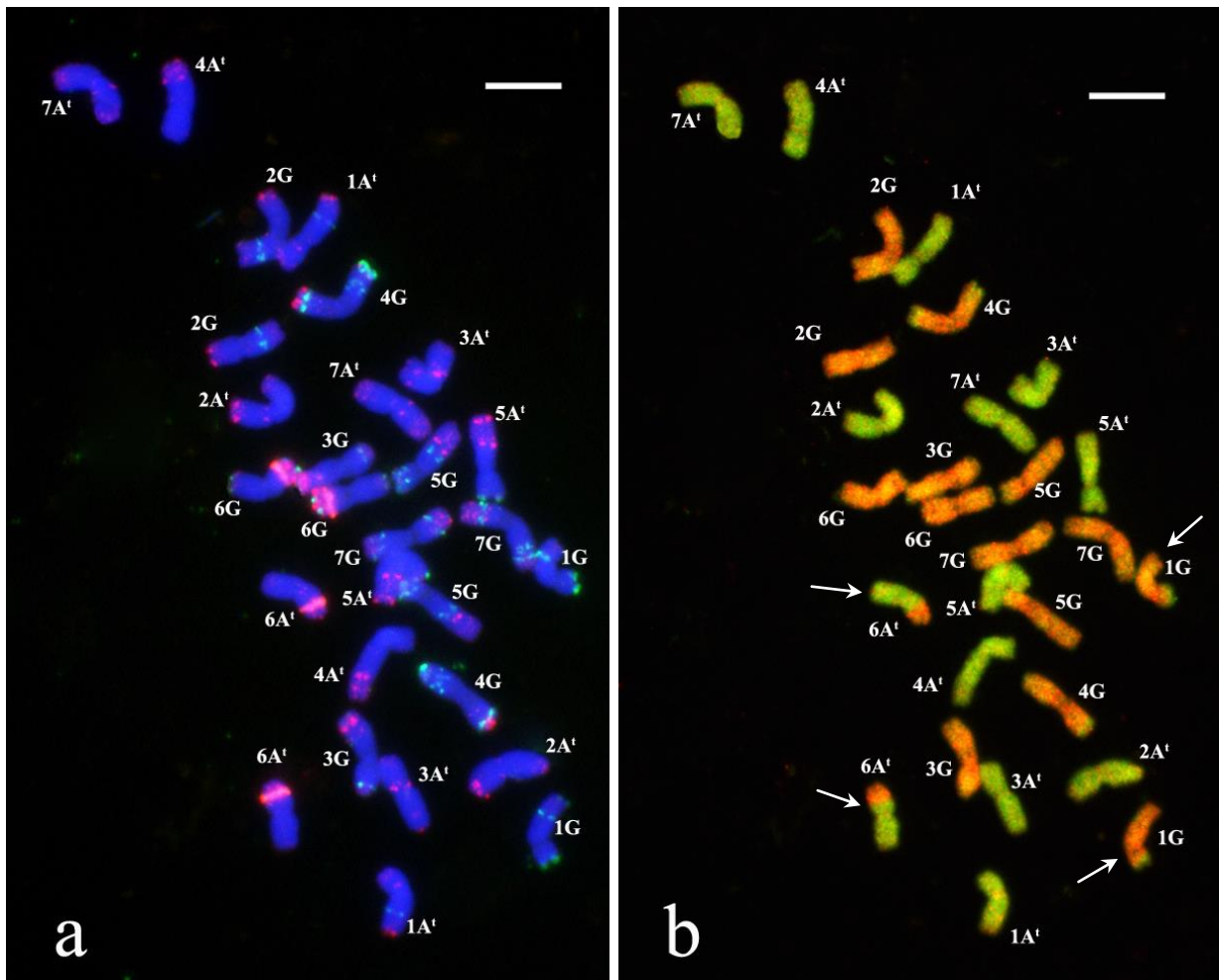
Az amfiploidban lévő kromoszómák és a későbbi előnemesítési munka során várhatóan létrejövő kromoszóma-átépülések azonosíthatóságának megkönnyítése érdekében a G és A genomot is szükséges volt elkülöníteni egymástól. Ehhez a búzából és annak harmadlagos génforrásaiból előállított hibrideknél széleskörűen alkalmazott genomi *in situ* hibridizációt (GISH) alkalmaztuk, melynek során jelölt, teljes genomi DNS próbákat hibridizáltunk. A két, különböző színnel jelölt próba (mcGISH) előállításához egy *T. urartu* (MVGB115; A^u genom) és egy *Ae. speltoides* (MVGB905; S genom) genotípus növényeinek leveleiből izoláltunk teljes genomi DNS-t. A próbák különböző jelölését követően a *T. timopheevii* MVGB845 genotípus mitotikus kromoszómapreparátumain végeztük el lépésről lépésre haladva a mcGISH során használt próbák és blokkoló DNS mennyiségének és arányának optimalizálását (7. táblázat).

7. táblázat A *Triticum timopheevii* A^t és G genomjának mcGISH technikával történő elkülönítésének optimalizálása 11 különböző próba valamint blokkoló DNS kombináció használatával (Martonvásár, 2012)

Vizsgálatok sorrendje	Jelölt próba DNS összetétel (mennyiség/tárgylemez)	Blokkoló genom mennyisége a próba DNS-hez viszonyítva										
		<i>T. urartu</i> A ^u genomi DNS			<i>Aegilops speltoides</i> S genomi DNS							
1.	digoxigeninnel jelölt A ^u genom (70ng)	0×	18×	63×	150×	-	-	-	-	-	-	-
	biotinnal jelölt S genom (70ng)											
2.	digoxigeninnel jelölt A ^u genom (60ng)	-	-	-	-	50×	100×	200×	-	-	-	-
	biotinnal jelölt S genom (60ng)											
3.	biotinnal jelölt A ^u genom (60ng)	-	-	-	-	-	-	-	50×	100×	200×	-
	digoxigeninnel jelölt S genom (60ng)											
4.	biotinnal jelölt A ^u genom (40ng)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50×
	digoxigeninnel jelölt S genom (40ng)											

Az 1. és a 2. vizsgálat eredménye rávilágított arra, hogy nem lehet sikeresen elkülöníteni az A^t és a G genomot egymástól, ha az előbbi digoxigenin-11-dUTP-vel (vörös), míg az utóbbi biotin-16-dUTP-vel (zöld) van jelölve, továbbá az S genom blokkolóként való használata is indokolt. E megfigyelést erősítette meg a 3. vizsgálat eredménye is, ahol a fordított jelölés mellett jól detektálható fluoreszcens jeleket kaptunk. A blokkoló DNS mennyiségének beállítása, és a

próbák mennyiségének finomhangolása után a 4. vizsgálatban már kontrasztosan elkülöníthető A^t és G kromoszómákat tudtunk azonosítani a *T. timopheevii* preparátumokon, melyet a kariotipizáláshoz korábban elvégzett FISH eredménye is igazolt (11. ábra).

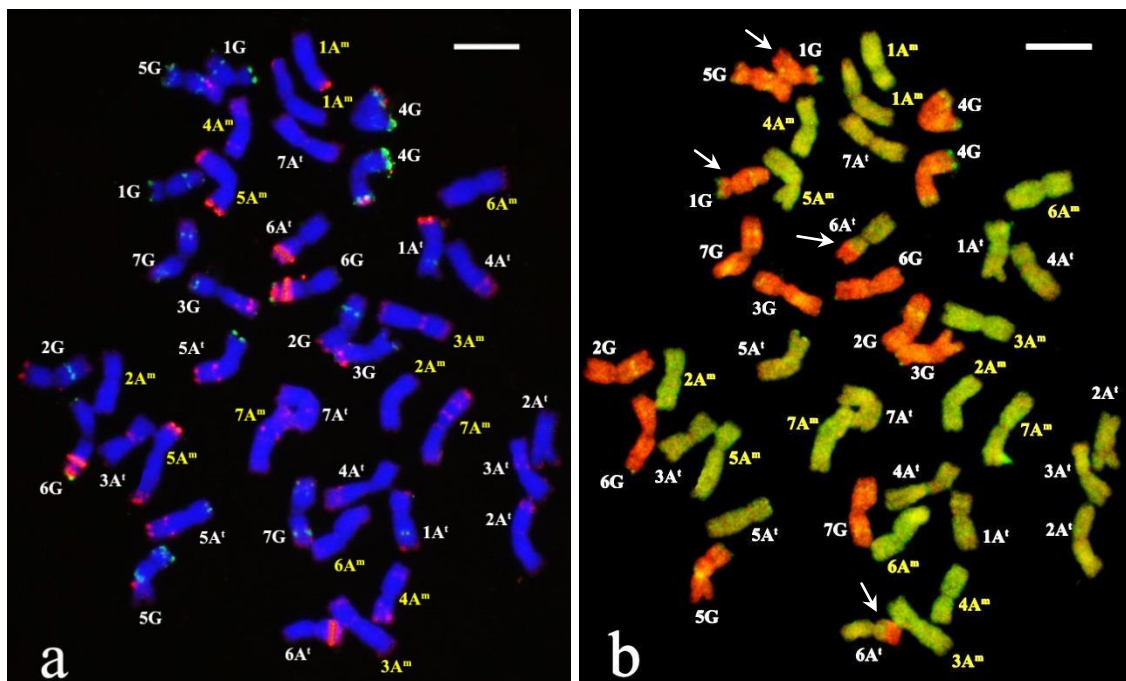


11. ábra A *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* MVGB845 genotípus mitotikus kromoszómáinak jelölt repetitív DNS szekvenciákkal (a), illetve teljes genomi DNS próbákkal (b) készített FISH (a) és mcGISH (b) mintázata. A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) eredményeként az Afa-family próba jelei pirosan, a pTa71 próbáé sárgán és a pSc119.2 próbáé zölden fluoreszkálnak, míg az azonos sejten végzett multicolour genomi *in situ* hibridizáció (mcGISH) eredményeként az A^t kromoszómák zölden (*T. urartu* genomi próba), a G kromoszómák vörösen (*Ae. speltoides* genomi próba) jelölődtek. A *T. timopheevii* eredetű, fajspecifikus 6A^tS/1GS intergenomikus transzlokáció nyíllal jelölve (Skála = 10 µm)

A 11. ábra mcGISH mintázata alapján jól megfigyelhető az A^t és G genomok kromoszómái között a *T. timopheevii* fajra jellemző, korábbi irodalmi forrásokból (Rodríguez *et al.* 2000, Uhrin *et al.* 2012) már ismert, fajspecifikus intergenomikus átrendeződés is a 6A^t és 1G kromoszómák között (T6A^tS/1GS).

4.2.3 *Triticum timococcum* genom szerkezete

A *T. timopheevii* preparátumokon végzett előkísérletek bizonyították, hogy az A és G kromoszómák nagy pontossággal elkülöníthetők egymástól a FISH és mcGISH technikák egymást követő használatával. A szintetikus amfiploid szülő genotípusaira kidolgozott FISH módszerrel kimutattuk, hogy a szelektált *T. timococcum* C₂ generáció növényei 42 kromoszómával rendelkeznek, amely a kolhicin kezelést követő normál genomduplázódást bizonyítja. A korábban kidolgozott kariotípusok segítségével az összes *T. timopheevii* és *T. monococcum* eredetű kromoszóma elkülöníthető volt egymástól a hibridben (12. ábra).



12. ábra A *Triticum timococcum* mitotikus kromoszómáinak jelölt repetitív DNS szekvenciákkal (a), illetve teljes genomi DNS próbákkal (b) készített FISH (a) és mcGISH (b) mintázata. A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) eredményeként az Afa-family próba jelei pirosan, a pTa71 próbáé sárgán és a pSc119.2 próbáé zölden fluoreszkálnak, míg az azonos sejten végzett multicolour genomi *in situ* hibridizáció (mcGISH) eredményeként az A^t és A^m kromoszómák zölden (*T. urartu* genomi próba), a G kromoszómák vörösen (*Ae. speltoides* genomi próba) jelölődtek. A *T. timopheevii* szülőből származó kromoszómák fehérrel, a *T. monococcum* eredetű kromoszómák sárgával vannak feltüntetve. A *T. timopheevii* eredetű, fajspecifikus 6A^t/1GS intergenomikus transzlokáció nyíllal jelölve (Skála = 10 µm)

A kariotípusok (10. ábra) és a 6. táblázat alapján, FISH módszerrel mind a hét A^m és hét A^t kromoszómapár is azonosítható volt az amfiploidban, főként az Afa-family próba hibridizációs mintázata alapján.

Csupán az A^m genom 2. és 6. kromoszómája volt nehezen megkülönböztethető egymástól, habár a 6A^m kromoszómán kevésbé több, gyenge piros színű Afa-family jelet lehetett megfigyelni.

A zöld fluoreszcens festékkel jelölt pSc119.2 próba főként a G kromoszómákhoz hibridizált, melyek alapján azok mindegyike azonosíthatóvá vált. Emellett ez a próba az 1A^t (interkaláris sáv a hosszú karon) és 5A^t (2 telomérás jel a rövid karon) kromoszómákon is adott hibridizációs jelet.

A pTa71 próba narancssárga színű hibridizációs jelet eredményezett az 1A^m és az 5A^m kromoszóma rövid karjának teloméra régiójában, valamint a 6A^t és a 6G kromoszóma rövid karjának szubteloméra régiójában.

A FISH technikával vizsgált *Triticum timococcum* preparátumokat mosási sorozatot követően újra megvizsgáltuk mcGISH technikával, melynek során a *T. timopheevii* preparátumokon végzett előkísérlet alapján kialakított protokollt használtuk. Az optimalizált hibridizációs keverék jól azonosítható, kontrasztos jelet adott a *T. timococcum* preparátumokon is.

A mcGISH során a zöld színnel jelölt *T. urartu* teljes genomi DNS az A (A^t és A^m) kromoszómákhoz, míg a piros színnel jelölt *Ae. speltoides* teljes genomi DNS a G kromoszómákhoz hibridizált, így a 28 A és 14 G kromoszóma jól láthatóan elkülöníthető volt egymástól (12. ábra).

Megállapítottuk továbbá, hogy az anyai szülő fajspecifikus transzlokációját (6A^tS/1GS) hordozza a *T. timococcum* is. A mcGISH-sel ugyancsak kimutattuk, hogy a 4G kromoszóma rövid karjának végén egy A^t kromoszóma eredetű szegmentum található. Ez valószínűleg a 4A^t kromoszóma hosszú karjáról származó (T4A^tL/4GS), konzerváltan öröklődő 5A^t kromoszóma hosszú karjának terminális része, mivel ez utóbbi kromoszómaszakasz az evolúció során már korábban átépült a 4A^t kromoszóma hosszú karjára (Rodríguez *et al.* 2000). Azonban, mivel a 4G kromoszóma rövid karjának teloméra régiójában egy korábbi transzlokáció során beépült 6A^t szakasz volt, ezért a 4A^tL/4GS transzlokáció eredményeként a 4A^t kromoszómára átépült szakasz A^t kromoszóma eredetű, így a mcGISH nem tudta kimutatni ezt a transzlokációt (lásd még 3. ábra).

A fenti eredmények alapján megállapítottuk, hogy az újonnan előállított szintetikus amfiploid, a *Triticum timococcum* hexaploid genommal rendelkezik, mely a következőképpen írható fel: $2n=6x=42, GGA^tA^tA^mA^m$.

4.2.4 *Triticum timococcum* molekuláris citogenetikai elemzésének megvitatása

Számos kutatás foglalkozott már G genomot tartalmazó, újszerű genomszerkezettel rendelkező szintetikus amfiploidokkal (pl. Badaeva *et al.* 1995; Cao *et al.* 2000; Laikova *et al.* 2004; Belea *et al.* 2005; Goncharov *et al.* 2007), azonban a hexaploid *Triticum timococcum* ezidáig csak

néhányuk vizsgálatának tárgyát képezte, és fluoreszcens *in situ* hibridizációs technikákkal (FISH, mcGISH) is csak a jelen kutatásban elemezték a genomját. *Triticum timopheevii* testi sejtjeinek kromoszómáit korábban N-sávozással (Jiang és Gill 1994b) és C-sávozással (Hutchinson és Miller 1982; Badaeva *et al.* 1994b; Rodríguez *et al.* 2000) azonosították, azonban a fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) eljárás is hasonlóan részletes leírással tud szolgálni a *T. timopheevii* kromoszómáiról, ahogy azt Jiang és Gill (1994b), Rodríguez *et al.* (2000), Uhrin *et al.* (2012), valamint a jelen kutatás is jól szemléltette. A *T. monococcum* kromoszómák FISH technikával történő azonosítását Megyeri *et al.* (2012) végezte el korábban. Az itt felsorolt kutatómunkák eredményeiből kiindulva készítettük el a *T. timopheevii* (A^t és G) és a *T. monococcum* (A^m) genomjainak FISH kariogramját a pSc119.2, pTa71 és Afa-family repetitív DNS próbákkal. A FISH mintázaton kívül az A kromoszómák elkülönítését kromoszóma morfológiai tulajdonságok is segítik, ugyanis a Rodríguez *et al.* (2000) által ismertetett 4A^tL/3A^tL transzlokáció következtében (lásd 3. ábra) jellegzetesen metacentrikus képet mutató 3A^t és a szubmetacentrikus 4A^t jól elkülöníthető egymástól és a velük homeológ A^m kromoszómáktól, melyek kararánya kevésbé eltérő.

Vizsgálataink igazolták, hogy a két fajból előállított hexaploid *Triticum timococcum* kromoszómái, azonos próbák hibridizálásával egyértelműen azonosíthatók FISH mintázatok alapján. Mind a hét A^t és hét A^m kromoszómapárt is el tudtuk különíteni egymástól. Csak a 2A^m és 6A^m kromoszómák FISH mintázata volt nagyon hasonló. Elkülönítésüket segítheti a kromoszómák különböző mérete, illetve egy másik repetitív DNS szekvencia, a (GAA)_n mikroszatellit marker (SSR) próbaként való alkalmazása, amely a 2A^m kromoszómán erős specifikus telomérás, míg a 6A^m kromoszómán centromérás jelet ad (Megyeri *et al.* 2012).

A multicolour genomi *in situ* hibridizációval (mcGISH) nagy biztonsággal el tudtuk különíteni a hexaploid *T. timococcum* G genomját a két A genomjától. Továbbá a mcGISH módszerrel az amfiploidban is kimutattuk a *T. timopheevii* két genomja közötti fajspecifikus transzlokációkat (T6A^tS/1GS és T4A^tL/4GS). Ezeket a transzlokációkat Uhrin *et al.* (2012) is kimutatták egyszínű GISH technikával (az A genomot jelölve és a G genomot blokkolva), azonban az általunk használt mcGISH a genomok még kontrasztosabb elkülönítését is lehetővé tette.

Az A^t és A^m kromoszómák közötti legnagyobb különbséget a pTa71 jelek (1A^m és 5A^m) poliploidizáció során végbement inaktivitása (1A^t) illetve eltűnése (5A^t) okozza. Ennek magyarázata, hogy a diploid *T. monococcum* 1A^m és 5A^m kromoszómáinak rövid karján 1-1 nukleolusz-organizáló régió (NOR) található, melyek szerepét a poliploidizáció során az ősi S genom 1S és 5S kromoszómájának (később a tetra- és hexaploid búza 1B és 6B kromoszómájának) hasonló régiója vette át (Gerlach *et al.* 1980, Miller *et al.* 1983). A *T. timopheevii* kialakulása során lejátszódott 6A^tS/1GS transzlokáció következtében azonban ennél

a fajnál a domináns NOR régiók a 6A^t és a 6G kromoszómák rövid karján találhatóak, melyeket a pTa71 próbával könnyen lehet azonosítani. Ezek az eredmények az allopoliploidizáció során bekövetkező specifikus, repetitív DNS szakaszok gyors eliminációját is igazolják, amely a citológiai diploidizációnak nevezett folyamat során az egyes genomok asszimmetriájához is vezet. A 7A^t kromoszóma 7A^m kromoszómához viszonyított valamint a 3A^t kromoszóma 3A^m kromoszómához viszonyított Afa-family mintázatának intenzitásbeli csökkenése is ezt az eliminációs folyamatot támasztja alá. Ezáltal biztosított a homológ kromoszómapárok jobb felismerése, ami a búzában a *Ph*-rendszer működését kiegészítve, a meiózis folyamán kiegyensúlyozott diploid-szerű öröklődést tesz lehetővé (Ozkan *et al.* 2001, Han *et al.* 2005).

A poliploidizáció során végbement kromoszóma átrendeződések következtében a *T. monococcum* kromoszómájával nagyobb hasonlóságot mutató, A genom donor *T. urartu* 4A^u és 5A^u kromoszómájából eltérő kromoszómák alakultak ki (pSc119.2 jelek megjelenése). Ez a folyamat feltehetően a 4A kromoszómán végbement 4AS és 4AL kromoszómakarok pericentrikus inverziójának következménye (Hernandez *et al.* 2012). Az ezt követő, 5AL és 7BS kromoszómaszakaszok közötti átépülést B genommal rendelkező tetraploid *Triticum turgidum* alfajokban (subsp. *durum*, subsp. *dicoccoides*) is azonosították (Devos *et al.* 1995), illetve az rRNS génlokuszok elhelyezkedéséből kikövetkeztethetően ugyanez megtalálható a *T. timopheevii*-ben is (Jiang és Gill 1994a). A B és G genommal rendelkező tetraploid *Triticum* fajok különböző evolúciós útját támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy a *T. timopheevii* 4A^tL kromoszómakarjának terminális részén nem sikerült a *T. turgidum* (és a *T. aestivum*) 4A kromoszómáján meglévő pSc119.2 jeleket (Megyeri 2014) detektálnunk a FISH során, mely hiányzó szakasz valószínűleg a 4A^tL/4GS transzlokáció során kerülhetett át a 4G kromoszóma rövid karjának terminális részére. Ugyancsak ennek a transzlokációnak a következménye, hogy a 4GS terminális részén erős Afa-family FISH jeleket is detektáltunk.

Ezek a folyamatok nem érintették az ősi diploid *T. monococcum* fajt, ezért az A^m kromoszómák nagy biztonsággal megkülönböztethetők az A^t kromoszómáktól azok FISH mintázata alapján. Ettől eltérően azonban a hexaploid búza A^u kromoszómái és a *T. timopheevii* A^t kromoszómái már kevésbé különíthetők el egymástól. Eredményeinket Megyeri (2014) által, hasonló FISH próbákkal készített kariotípussal összevetve, leginkább a *T. timopheevii* kialakulása során végbement fajspecifikus transzlokációk eredményeként létrejött A^t kromoszómák különböztethetők meg homeológ A^u párjuktól. Ezek az 1A^t, a 3A^t, a 4A^t és a 6A^t kromoszómák, míg a 2A^t, 5A^t és 7A^t kromoszómák hasonlóan jelölődtek A^u homeológ párjukhoz viszonyítva. A G kromoszómákról készített kariotípusunkat Horváthné Uhrin (2013) eredményeivel összevetve megállapítottuk, hogy a legtöbb G kromoszóma nagy biztonsággal elkülöníthető a hexaploid búza megfelelő homeológ B kromoszómájától.

Vizsgálataink eredményeként a *T. timococcum* és *T. timopheevii* búza előnemesítési programba való bevezetését követő utóvizsgálatok alkalmával a búza genetikai háttérben megfelelő hatékonysággal azonosíthatóvá vált az átépült idegen kromatin. A kariotipizálási munkánk eredményét nemcsak a búza előnemesítési programokban lehet hasznosítani, hanem segítheti a gének térképezését és izolációját, valamint az áramlásos (flow) citometriai eljárás során a szeparált kromoszómák és kromoszómacsoportok azonosítását is (Vrána *et al.* 2000). A kromoszómákból előállított szuszpenzió végzett FISH (FISHIS) pedig a dupla csatornás áramlásos citometria során nemcsak az alap, kontrasztfestésnek használt fluoreszcens jel (DAPI) erőssége szerint tudja szétválogatni a kromoszómákat (tehát méret szerint), hanem a használt próba által kisugárzott fluoreszcens jelek intenzitása alapján is, mellyel a válogatás hatékonysága és pontossága is növelhető. Ennek alapja a kromoszómák egyes repetitív DNS, illetve SSR próbákkal előállított kariotípusának pontos ismerete (Giorgi *et al.* 2013).

4.3 A *Triticum timococcum* fenotípusos és agronómiai jellemzése

4.3.1 Morfológiai jellemzők

A *T. timococcum* és szülői genotípusainak morfológiai tulajdonságait két egymást követő évben vizsgáltuk részletesen. Eredményeink összefoglalását a 8. táblázat (szántó föld) és a 9. táblázat (fitotron) tartalmazza.

A 2011/2012-es szezonban a *T. timococcum* C₂ nemzedék szemeinek 50,5%-a csírázott ki a szántóföldi őszi vetést követően, melyek 80,8%-a bizonyult télállóknak. Ezek a növények a 2012-ben jelentkező, februári erős fagyokat (-10 °C körüli átlaghőmérséklet esetenként -20 °C körüli napi minimummal) is jól túrték, ezért a belőlük származó utódnemzedékek télállóságát is megfelelőnek tekinthetjük, annak ellenére, hogy a következő években nem mértünk ehhez hasonló alacsony hőmérsékleteket. A kalászolási időszak mindkét évben (2012 és 2013) körülbelül egy hónapon át tartott. Megállapítottuk, hogy a *T. timococcum* átlagosan a vetést követő 238. napon kalászol.

A felvételezési adatokból számított eredmények alapján levonható a következtetés, hogy a *T. timococcum* kalászolási idejére kisebb hatással vannak a különböző évjáratok, mint a *T. timopheevii* kalászolási idejére, és ebben a tulajdonságában inkább a pollenadó szülőtörzshöz, a féltörpe alakorhoz hasonlít.

8. táblázat A *Triticum timococcum* és szülői genotípusainak morfológiai tulajdonságai szántóföldi körülmények között (Martonvásár, 2012 és 2013)

Genotípus	Év	Vizsgált növények / kalászek száma	Kalászképzési idő	Növénymagasság (cm)	Hajtásszám (kalász/növény)	Kaláshossz (cm)	Kalásonkénti virágszám	Kalásonkénti szemszám	Kalásztömöttség (kalászkák átlagos száma kalász cm-enként)
<i>T. timopheevii</i> MVGB845	2012	10 / 30	Május 28 ***	109,30***###	9,40**	5,48***##	42,00***###	29,67***	3,84***###
	2013	10 / 30	Június 13 ###	96,90###	12,40***	6,47***	45,33*###	33,40***###	3,52***###
<i>T. monococcum</i> '1T-1'	2012	10 / 30	Május 24 ***	64,70***	11,80***	4,85***	23,25***	8,53*### □	4,80***
	2013	10 / 30	Május 21 ***	67,50***	7,00*#	6,83***	30,42***	47,73*** □	4,48***
<i>T. timococcum</i>	2012	294 / 146	Június 11	71,93	4,60	6,40	33,17	13,03	2,61
	2013	458 / 30	Június 14	82,06	4,33	8,40	41,39	9,73	2,47

A *, ** és *** a megfelelő szülői genotípus és a *T. timococcum* közötti szignifikáns különbséget jelöli az adott évben p=0,05, p=0,01 és p=0,001 valószínűségi szint mellett (csak a szülőnél jelölve). Ehhez hasonlóan, a két szülő közötti szignifikáns különbség #, ## és ### jelölést kapott (csak az egyik szülőnél jelölve).

□: 2012 aszályos év volt, amely termékenyülési problémát okozott a féltörpe alakornál.

□□: A féltörpe alakor törzs kalászkáinak 30-50%-ában nem 1 hanem 2 szem fejlődik kedvező termesztési feltételek között.

72

9. táblázat A *Triticum timococcum* és szülői genotípusainak morfológiai tulajdonságai fitotroni körülmények között (Martonvásár, 2012 és 2013)

Genotípus	Év [□]	Vizsgált növények / kalászek száma	Növénymagasság (cm)	Hajtásszám (kalász/növény)	Kaláshossz (cm)	Kalásonkénti virágszám	Kalásonkénti szemszám	Kalásztömöttség (kalászkák átlagos száma kalász cm-enként)
<i>T. timopheevii</i> MVGB845	2012	3 / 14	114,50	5,67*	5,23***	40,00 [#]	22,33***	4,13***###
<i>T. monococcum</i> '1T-1'	2012	4 / 20	70,63***	5,00	6,88###	34,75***	36,25***	5,43***
<i>T. timococcum</i>	2012-2013	62 / 155	101,20	4,03	6,71	42,19	11,55	3,24

A *, ** és *** a megfelelő szülői genotípus és a *T. timococcum* közötti szignifikáns különbséget jelöli p=0,05, p=0,01 és p=0,001 valószínűségi szint mellett (csak a szülőnél jelölve). Ehhez hasonlóan, a két szülő közötti szignifikáns különbség #, ## és ### jelölést kapott (csak az egyik szülőnél jelölve).

□: A fitotronban beállított kontrollált körülmények között nem számoltunk évjáráthatással.

A kétéves szántóföldi kísérletben a *Triticum timococcum* a legtöbb vizsgált tulajdonságban szignifikánsan eltért a szülői genotípusoktól. Az első évben csak a növénymagasságban nem különbözött szignifikánsan a féltörpe alakor szülőtől. Ettől eltérően, 2013-ban a *T. timococcum* már mindkét szülőtől szignifikánsan eltérő növénymagasságú volt, amely a tenyészidőszakban hullott 55%-kal nagyobb csapadékmennyiséggel magyarázható.

A fitotroni összehasonlító vizsgálatban (2012-ben) kevesebb szignifikáns különbséget találtunk a szülői genotípusok és a *T. timococcum* között, sőt a szántóföldi eredményekkel ellentétben a *T. timococcum* növénymagassága nagyobb hasonlóságot mutatott a *T. timopheevii* szülővel, mint a féltörpe alakor törzzsel (13(a). ábra).



13. ábra Fitotronban nevelt *Triticum monococcum* subsp. *monococcum* '1T-1' (balra), *Triticum timococcum* (középen) és *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* MVGB845 (jobbra) növény (a). Szántóföldről gyűjtött *T. monococcum* '1T-1' (bal), *T. timococcum* (középen) és *T. timopheevii* MVGB845 (jobbra) kalászkák (b). *T. timococcum* C₃ generáció dupla kalászcúcsú (balra) és enyhén csavarodott (jobbra) kalászkái a szántóföldön (c) 2013-ban, Martonvásáron

A *T. timococcum* kalázmorfológiai vizsgálata kimutatta, hogy kalázkái átmeneti típust képviselnek a szülői genotípusok kalázkáformái között, mivel szélességük és hosszuk is a két szülő ezen értékei közé estek. A *T. timopheevii* szülőhöz hasonlóan, a *T. timococcum* kalászkái is szálkások és oldalról lapítottak, azonban a kalász szélessége inkább a pollenadó alakor törzséhez hasonlít (13(b). ábra). Ezen kívül a korai generációk egyes *T. timococcum* kalászkái a hosszanti tengelyük mentén spirálisan enyhén csavarodottak, és 1-2%-uk dupla kalászcúccsal rendelkezik (13(c). ábra). A kalázmorfológiai tulajdonságok tekintetében a *T. timococcum* hosszabb és

kevésbé tömött kalászokat fejlesztett a szüleihez képest, mely tulajdonság a későbbi generációkban méginkább megnyilvánult (14. ábra). Mivel a *T. timococcum* a citoplazmával együtt a *T. timopheevii* szülőpartnertől (részleges) hímsterilitást is örökölt, ezért viszonylag alacsony fertilitással rendelkezik (szemkötés \approx 30%), melyet szelekcióval folyamatosan javítunk. A C₄ generáció ezerszemtömege 2014-ben jóval meghaladta a szüleiét: 44,14 g (MVGB845: 30,88 g; '1T-1': 21,64 g).

A *T. timococcum* életformáját tavaszi vetésben vizsgáltuk 2013-ban, melynek eredményeként megállapítottuk, hogy a szülői genotípusokhoz hasonlóan az amfiploid is fakultatív jelleget mutat, tehát

őszi és tavaszi vetésben, a vernalizáció idejétől függetlenül is képes generatív fázisba lépni.

A szőrözöttség tekintetében a hibrid a *T. timopheevii* szülőhöz hasonlít, mivel az egész növényt sűrű szőr borítja, ami e szülőpartner egyik legjellegzetesebb tulajdonsága. Kiemelendő, hogy a *T. timococcum* növények egységnyi felületén több és vastagabb szőrt találtunk, mint a *T. timopheevii* genotípuson (15. ábra).



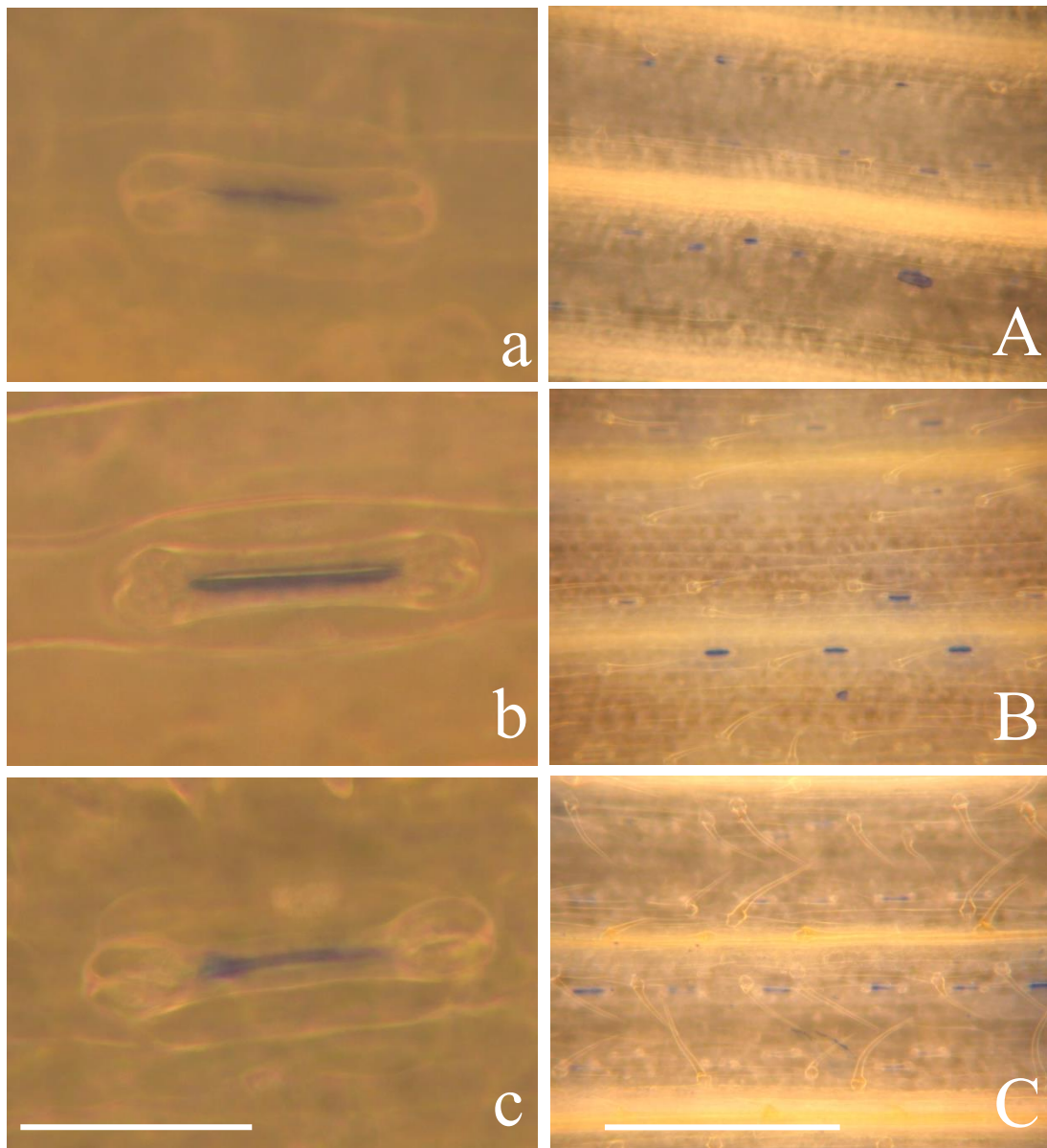
14. ábra *Triticum timopheevii* MVGB845 (bal), *T. monococcum* '1T-1' (közép) és *T. timococcum* C₅ generáció (jobb) szántóföldről gyűjtött kalásza (Martonvásár, 2015; Skála = 1 cm)



15. ábra A *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* MVGB845 (a) és a *Triticum timococcum* (b) leveles hajtásai közötti szőrözöttségbeli különbség (Martonvásár, 2013)

A levélszőrök közelebbi, fénymikroszkópos vizsgálata során nemcsak ez a szőrözöttségbeli különbség nyert megerősítést, hanem a megduplázott genomú hibrid növény és szülőinek eltérő ploidszintjét jól jellemző gázcsereenyílások (sztómák) zárósejtjeinek méretbeli különbsége is. A hexaploid *T. timococcum* rendelkezett a legnagyobb sztóma zárósejttekkel (hossz: 100 μ m),

melynek vizsgálatát nagymértékben segítette a lisztharmat vizsgálatnál használt fehérítési eljárás és anilinkék festés (16. ábra). Az anyai szülő sztóma zárósejtjeit 85 μm , míg a féltörpe alakor sztóma zárósejtjeit 70 μm hosszúnak mértük.



16. ábra A diploid *Triticum monococcum* subsp. *monococcum* '1T-1' (a; A), a tetraploid *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* MVGB845 (b; B) és a hexaploid *Triticum timococcum* (c; C) gázcserenyílása (a-c; skála = 50 μm) és levélfonákja (A-C; skála = 0,5 mm). Az ecetsavval fehérített levelek anilinkékkel lettek festve

4.3.2 Betegség-ellenállóság

4.3.2.1 Levél- és sárgarozsda rezisztencia

A szélsőségesen aszályos 2012-es év nem kedvezett a gombabetegségek elterjedésének a szántóföldön, ezért 2012/2013 telén mesterséges levélrozsda fertőzés mellett vizsgáltuk a szülői

genotípusokat és a *T. timococcum* C₃ generációjának fiatal növényeit. A vizsgálat kimutatta, hogy a szintetikus amfiploid, a szüleikhez hasonlóan nagyfokú ellenállósággal rendelkezik a levélrozsdával szemben (értékelés: 0 vagy ;), míg a kontrollként használt 'Alcedo' búzafajta nagyon fogékony (értékelés: 4) volt. Ez az eredmény a fiatalkori rezisztenciára vonatkozik,



17. ábra *Triticum timopheevii* MVGB845 (a), *T. monococcum* '1T-1' (b), *T. timococcum* (c) és *T. aestivum* 'Mv9kr1' (d) levélrozsdafogékonysága szántóföldi körülmények között (Martonvásár, 2013)

melyet jól kiegészítenek a 2013 és 2015 között vizsgált szántóföldi felnőttkori rozsdafertőzöttségi értékek, ahol fogékony kontrollként az 'Mv9kr1' búzatörzset használtuk. Ebben a kísérletben az 'Mv9kr1' fogékonyságát a maximális 9 pontból mindhárom évben 6-ra bonitáltuk, míg a szomszédos parcellán lévő *T. timococcum* növények és a szülői genotípusok teljesen ellenállóak voltak a levélrozsdával szemben (értékelés: 0) (17. ábra). A kísérletbe vetett genotípusok a 2014-ben és 2015-ben sem fertőződtek sárgarozsdával (értékelés: 0). Összehasonlításképpen a 2014-ben fellépett rendkívül erős, természetes eredetű sárgarozsda járvány hatására az 'Mv9kr1' őszi búzatörzs fogékonyságát a maximális 9 pontból 8 pontra, 2015-ben pedig 6 pontra értékeltük.

4.3.2.2 Lisztharmat rezisztencia

A 2013-as szántóföldi megfigyelések során a rozsdabetegségek mellett a lisztharmatfertőzöttséget is tudtuk vizsgálni, melynek eredményeként megállapítottuk, hogy sem a *T. timococcum*, sem annak szülői genotípusai nem fertőződtek természetes kórokozó nyomás mellett (értékelés: 0), míg a kontrollként használt 'Mv9kr1' búzatörzs fogékonyságát a maximális 9 pontból 5 pontra értékeltük.

A lisztharmat gomba terjedését az időjárás és a növényállomány sűrűsége (általunk használt széles sortáv esetén kisebb a növényállomány páratartalma) jelentősen befolyásolhatja, ezért 2014/2015 telén mesterséges fertőzési körülmények között is teszteltük a genotípusaink fiatalkori lisztharmat-rezisztenciáját többféle lisztharmat izolátummal szemben.

Első lépésben csak a *T. timococcum* C₄ generációjának növényeit vizsgáltuk, differenciáló búza fajtassal együtt 28 különböző izolátummal, így az inokulációra használt lisztharmat patotípusokat is azonosíthattuk. E vizsgálat eredményeként megállapítottuk, hogy bár a *T. timococcum* felnőttkori rezisztenciát mutatott szántóföldi körülmények között, rendkívül erős

kórokozó nyomás mellett a csiranövényei fogékonynak bizonyultak a búzalisztharmattal szemben (10. táblázat).

10. táblázat A *Triticum timococcum* fiatalkori lisztharmat-fogékonysága mesterséges fertőzési körülmények között (Martonvásár, 2014)

<i>T. timococcum</i> üvegházi lisztharmat fertőzése	Lisztharmat rasz besorolási száma				
	10	47	51	76	77
Izolátumok száma (értékelt növényszám)	1 (1)	6 (9)	4 (10)	16 (25)	1 (1)
Fogékonyság* (átlag ± szórás)	3	3,11 ± 0,33	3,4 ± 0,52	3,2 ± 0,71**	3

*Lisztharmat fogékonyság 0-4 skálán pontozva: 0=immunis, 4=fogékony.

**Két egyed a 25-ből ellenállónak bizonyult.

A közel 50 értékelt növényegyed az esetek többségében (67%) mérsékelten fogékony volt, miközben a 76-os lisztharmat razzal szemben egy növény ellenállóságot (értékelés: 1), egy másik növény pedig mérsékelt ellenállóságot (értékelés: 2) mutatott. Az eredmények alapján általánosan elmondható, hogy mesterséges fertőzési körülmények között a *T. timococcum* fiatal növényegyedei fogékonynak a lisztharmattal szemben, mely megállapítás hatására, többek között a szülői genotípusokat is bevonva, egy részletesebb vizsgálatot indítottunk el 2015 elején két elterjedtebb lisztharmat rasz felhasználásával. Az 51-es és a 76-os razzal történt fertőzés eredményeként az amfiploid mellett annak szülői genotípusai is fogékonynak bizonyultak a lisztharmattal szemben mesterséges körülmények között (18. ábra).



18. ábra *Triticum timopheevii* MVGB845 (a), *T. monococcum* '1T-1' (b), *T. timococcum* (c), *T. aestivum* 'Carstens V.' (d), *T. zhukovskyi* MVGB650 (e), *T. monococcum* 'Mv Alkor' (f) és *T. aestivum* 'Nannong 02Y23' (g) fiatalkori lisztharmat fogékonysága mesterséges fertőzési körülmények között (51-es lisztharmat razzal inokulálva) (Martonvásár, 2015)

Mindkét rasszal elvégzett kísérlet azt igazolta, hogy a szántóföldi körülmények között immunisnak mutakozó *T. timopheevii* és *T. monococcum* fiatal növényei is fertőződnek lisztharmattal erős kórokozó nyomás mellett. Az előbbi faj részben erőteljes hiperszenzitiv reakcióval válaszolt, míg az apai '1T-1' féltörpe alakor törzs levelei csak enyhébben fertőződtek, mely tünetek még mérsékeltebbek voltak a hagyományos típusú alakor (Mv Alkor) esetében (11. táblázat). A *T. timopheevii* és az '1T-1' alakor keresztezésével előállított *T. timococcum* hasonló fogékonyságot mutatott, mint a fogékony kontrollként használt 'Carstens V.' búzafajta. A szülői fajokból természetes körülmények között kialakult *T. zhukovskyi* növényein a *T. timopheevii* egyedeken megjelenő, de annál mérsékeltebb hiperszenzitiv reakciót is megfigyeltünk (18. ábra).

11. táblázat Különböző *Triticum* genotípusok különböző rasszokkal szembeni, fiatalkori lisztharmat-fogékonysága mesterséges fertőzési körülmények között (Martonvásár, 2015)

Genotípus	Fertőzéshez használt lisztharmat rasszal szembeni fogékonyság*	
	76	51
<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i> var. <i>rubiginosum</i> MVGB845	3	3
<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i> '1T-1'	3	2
<i>Triticum timococcum</i>	4	4
<i>Triticum aestivum</i> 'Carstens V.'	4	4
<i>Triticum zhukovskyi</i> MVGB650	4	4
<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i> 'Mv Alkor'	2	1
<i>Triticum aestivum</i> 'Nannong 02Y23'	0	0

*Lisztharmat fogékonyság 0-4 skálán pontozva: 0=immunis, 4=fogékony.

A lisztharmat-ellenállóság vizsgálata mellett a kórokozó konídiumai, micéliumai és a gazdanövény közötti interakciók időbeni alakulását is elemeztük, melyhez az inokulációt követően 9 alkalommal gyűjtöttünk mintát. A kísérlet során a gomba fejlődését és terjedését (anilinkék), valamint a növény esetleges védekező válaszreakcióját (hidrogén-peroxid (H₂O₂) felhalmozódás, papilla képződés) vizsgáltuk.

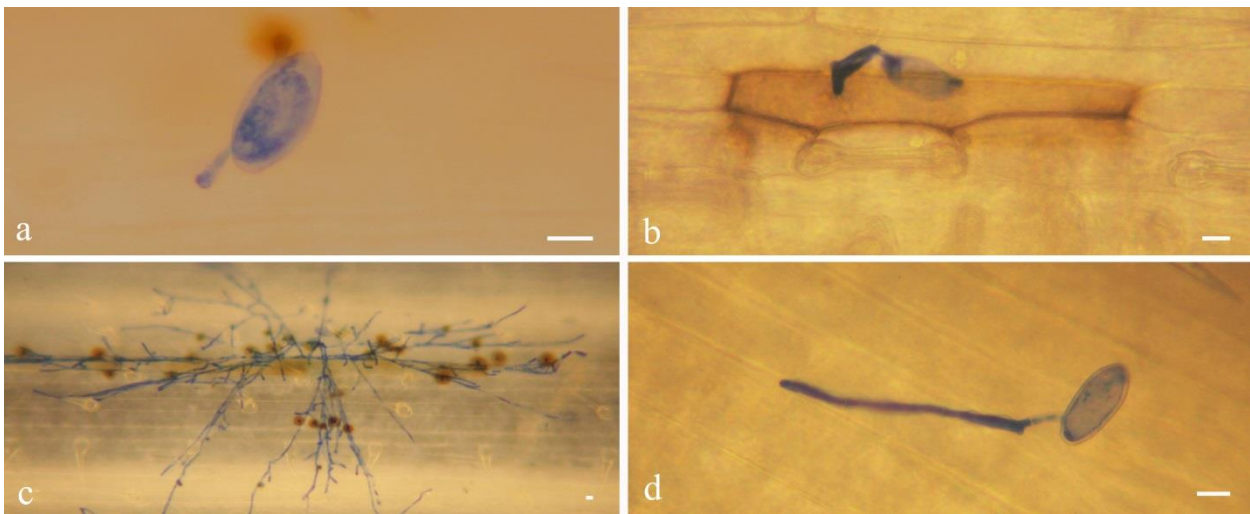
A lisztharmat konídiumok csírázását követően az apreszóriális csíratömlők a legközelebbi epidermisz sejtbe próbáltak bejutni, melyre mind a 7 genotípus lokális sejtfalvastagodással (papilla képzéssel) reagált. Öt genotípusnál, genotípusonként változó lefolyású, kompatibilis kórokozó-gazdanövény interakciót figyeltünk meg, míg az 'Mv Alkor' és a *Pm21* rezisztenciagént hordozó 'Nannong 02Y23' genotípusok esetében ellenállóságot tapasztaltunk (12. táblázat).

12. táblázat Különböző *Triticum* genotípusok 51-es lisztharmat rasszal szembeni mesterséges fiatalkori fertőződésének időbeli lefolyása és a fertőzésre adott válaszreakciója a kórokozó fejlődési stádiumainak tükrében (Martonvásár, 2015)

Konídium eredetű búzalisztharmat fejlődési stádiuma	Az adott genotípus fertőzésétől eltelt órák száma						
	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i> var. <i>rubiginosum</i> MVGB845	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i> '1T-1'	<i>Triticum timococcum</i>	<i>Triticum aestivum</i> 'Carstens V.'	<i>Triticum zhukovskyi</i> MVGB650	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i> 'Mv Alkor'	<i>Triticum aestivum</i> 'Nannong 02Y23'
Elsődleges csíratömlő kialakulása	8	8	8 ⁺	8	8	8	8
Apresszóriális csíratömlő kialakulása	16 ⁺	16	8 ⁺	8	8 ⁺	16	16-168 ⁺
Penetráció	24 ^{+, ++}	32 ^{+, ++}	24	24 ⁺	16 ⁺	24-32 ⁺	40(atipikus)
Hausztórium kialakulása	24	40 ^{+, ++}	24	24 ⁺	24 ^{+, ++}	40 ^{+, ++}	40(atipikus)
Telepek kialakulása	40	48 ^{+, ++}	32 ⁺	32 ⁺	32 ^{+, ++}	48(atipikus)	-
Konídiumtartók kialakulása	96	96-168	96	72	96-168	96-168	-
Sporuláció	168	168	168	96	168	168	-

Megjegyzés: a csíratömlők behatolási helyénél minden genotípusnál papilla képződés (lokális sejtfalvastagodás) is megfigyelhető volt, mint a kórokozóval szembeni elsődleges növényi válaszreakció

Legérzékenyebbnek a fogékony kontroll fajta ('Carstens V.') bizonyult, hiszen már 3 nap elteltével kifejlett gombafonalak és konídiumtartók alakultak ki rajta és a következő napon a lisztharmat már sporulált a levelein. Hasonló fogékonyságot mutatott a *T. timococcum* és annak természetes változata, a *T. zhukovskyi*, azonban a gomba fejlődése kissé vontatottabb volt és csak a 7. napon figyeltünk meg nagyobb fokú sporulációt. Emellett ez a két genotípus már a fertőzés legkorábbi szakaszában is lokális H₂O₂ termeléssel próbált ellenállni a gomba behatolásának, sőt a *T. zhukovskyi* esetében egész sejtre kiterjedő DAB festődést is megfigyeltünk a későbbiekben (19(a-b). ábra).



19. ábra Különböző genotípusok csírákori levelén búzalisztharmat konídium csírázására bekövetkezett hidrogén-peroxid felhalmozódás diamino-benzidinnel festve (barna): *Triticum timococcum* korai, lokális hidrogén-peroxid termelése (a), *T. zhukovskyi* MVGB650 korai, egész sejtre kiterjedő festődése (b), illetve a *Triticum monococcum* subsp. *monococcum* '1T-1' későbbiekben is fennmaradó, lokális jelölődése (c). *Triticum monococcum* subsp. *monococcum* 'Mv Alkor' fajtán az inkompatibilis interakció következtében a gomba atipikus csíratömlőt fejleszt (d). Az ecetsavval fehéritett leveleken a gomba képletei anilinkékkel festődtek (Skála = 10 µm) (Martonvásár, 2015)

Az amfiploid szülői genotípusai kevésbé voltak fogékonyak a lisztharmat 51-es rasszával szemben, azonban a hetedik napra mindkét genotípusnál eljutott a gomba a konídiumok képzéséig. Míg a *T. timopheevii* esetében a hidrogén-peroxid felhalmozódás a papillában vagy az érintett egész sejtben ott volt csak megfigyelhető, ahol a gomba nem jutott el a hausztórium kialakulásáig, addig a féltörpe alakor esetében ez a lokális vagy egész sejtes válaszreakció ott is megfigyelhető volt, ahol a gomba eljutott a hausztórium és a telepek kialakulásáig, amely jól mutatja ez utóbbi faj nagyobb fokú lisztharmat-ellenállóságát is (19(c). ábra).

Ezt a megállapítást támasztja alá, hogy a hagyományos típusú alakorfajta ('Mv Alkor') volt a leginkább ellenálló a rezisztens kontroll után. Az 'Mv Alkor' búzalisztharmattal inokulált levelein az interakciók többsége inkompatibilis volt, mivel a sokszor egész sejtre kiterjedő H₂O₂ felhalmozódás mellett csak néhány fiatal telep volt megfigyelhető, amelyek olykor hosszú, vékony, atipikus appresszoriális csíratömlőből alakultak ki, és egy hausztóriummal rendelkeztek (19(d). ábra). Ezért, annak ellenére, hogy egy hét után néhány sporuláló telep kifejlődött a levelein, a fajta ellenállónak tekinthető. A rezisztens kontrollként használt búza genotípuson is eljutott a gomba a behatolásig és a hausztórium képzéséig. A kórfolyamat ebben az esetben is atipikusnak tekinthető, mivel a konídiumok döntő többségének fejlődése leállt az apresszoriális csíratömlő fejlesztése közben, és a hetedik napra a konídiumok elhaltak. Az a pár sejt, amelybe az apresszoriális csíratömlő megpróbált behatolni, lokális vagy egész sejtre kiterjedő H₂O₂ válaszreakciót mutatott a 'Nannong 02Y23' genotípus esetében.

4.3.2.3 Kalászfuzárium rezisztencia

A 2015-ben végzett mesterséges fuzáriumfertőzés eredménye alapján megállapítottuk, hogy a *T. timopheevii* MVGB845 szülői genotípus mindkét vizsgált fuzáriumfajjal (*F. graminearum* és *F. culmorum*) szemben figyelemreméltó szántóföldi toleranciával rendelkezik. Ezzel ellentétben a pollenadóként használt féltörpe alakor fogékonyak bizonyult a provokációs kísérletben (13. táblázat). E két genotípus keresztezéséből előállított *T. timococcum* növények kalászaik (C₅ generáció) a *T. timopheevii*-hez hasonló ellenállóságot figyeltünk meg.

Mindkét fuzárium izolátum esetében a *T. timococcum* a kontrollként használt mérsékelt rezisztens búzatörzsnél ('Mv213-11') jelentősen jobb szántóföldi ellenállóságot mutatott. Azonban a II. típusú rezisztencia vizsgálata során szignifikáns különbséget nem sikerült kimutatni e búzatörzssel szemben.

Az amfiploid a virulensebbnek számító kórokozó fajjal (*F. culmorum*) szemben kiemelkedő II. típusú rezisztenciát mutatott: az esetek 80%-ában a fertőzött kalászkáról nem tudott továbbterjedni a gomba (20. ábra). A *T. timopheevii* esetében ez az arány 40%, az 'Mv213-11' esetében pedig mindössze 20% volt. A *T. timococcum* fuzárium-ellenállósága ígéretessé teheti ezt a szintetikus fajt az ilyen irányú előnemesítési programban történő hasznosításra.



20. ábra *Triticum timococcum* II. típusú kalászfuzárium-ellenállósága (Martonvásár, 2015)

13. táblázat *Triticum timococcum* és szülői genotípusainak, valamint egy mérsékelt rezisztens (MR) és egy fogékony (F) búzatörzsnek két izolátummal szembeni kalászfuzárium-ellenállósága (Martonvásár, 2015)

Genotípus	Szántóföldi rezisztencia (fertőzöttség mértéke: %)		II. típusú rezisztencia* (fertőzöttség mértéke: %)	
	<i>Fusarium graminearum</i> 'IFA-66'	<i>Fusarium culmorum</i> 'IFA-104'	<i>Fusarium graminearum</i> 'IFA-66'	<i>Fusarium culmorum</i> 'IFA-104'
<i>Triticum timococcum</i>	5	15	15,23 ^a	5,28 ^A
<i>T. timopheevii</i> MVGB845	5	25	11,93 ^a	12,30 ^A
<i>T. monococcum</i> '1T-1'	100	100	53,50 ^b	53,48 ^B
<i>T. aestivum</i> 'Mv213-11' (MR)	15	60	11,37 ^a	14,59 ^A
<i>T. aestivum</i> 'Mv222-13' (F)	70	90	71,05 ^b	49,68 ^B

* Az 5 ismétlésben mért fogékonyság alapján Tukey post hoc teszttel meghatározott, egymástól szignifikánsan ($p < 0.05$) eltérő fertőzöttséggel rendelkező csoportok a *F. graminearum* (a-b) és a *F. culmorum* (A-B) esetében.

4.3.3 *Triticum timococcum* fenotípusos és agronómiai jellemzésének megvitatása

A *Triticum timococcum* szintetikus amfiploidot elsőként Kostov (1936) hozta létre nemesítetlen, vad *T. timopheevii* és *T. monococcum* génbanki tételek felhasználásával. Ezzel ellentétben a jelen kutatásban szereplő hibridet egy körültekintően kiválasztott *T. timopheevii* génbanki tétel és egy előnemesített féltörpe alakor törzs keresztezésével állítottuk elő, amely eltérő tulajdonságokat mutat a korábban előállított *T. timococcum* genotípusokhoz képest. A korábbi *T. timococcum* előállítás eredményeként Belea *et al.* (2005) által közölt nagyon gyenge szemkötés is rávilágít arra, hogy az amfiploidok előállításához csak szigorúan szelektált, előnemesített növényi anyagot érdemes használni. Ezzel az új keresztezési kombinációval értékes alakor-eredetű géneket is beépítettünk a hibridbe, melyek segítenek annak rezisztenciáját és minőségét javítani, emellett fenotípusos tulajdonságai is jobbak a korábbi genotípusokénál.

A *T. timococcum* morfológiai felépítésében átmenetet képvisel a szülői genotípusok között. Kalászkáinak átmeneti formája megegyezik egy korábban előállított *T. timococcum* genotípusával (Belea *et al.* 2005), azonban növénymagassága kisebb annál. Ennek oka, hogy a korábbi *T. timococcum* előállítására hagyományos típusú, magas (143 cm) alakort használtak, míg munkánk során féltörpe (66 cm) típussal dolgoztunk. Az általunk létrehozott alacsony (80 cm) *T. timococcum* genotípus magasságából eredően jobban ellenáll a megdőlésnek. A vírusvektor rovarok és a szárazság elleni védekezőképességet növelheti a *T. timopheevii* szülőtől örökölt sűrű szőrözöttség, amely a hasznos rezisztenciagének mellett szintén beépíthető lenne a búzafajtákba. A különböző ploidszintű kalászosok gázcserenyülésének ismert méretbeli különbsége (Borrino és Powell 1988) a hexaploid *T. timococcum* esetében is igazolódott, mivel

nagyobb méretű sztómákat képez, mint annak tetraploid vagy diploid szülői. Ez a méretbeli növekedés azonban a sztómák sűrűségével fódítottan arányos (Khazaei *et al.* 2010), így az amfiploid vízhasznosítási képessége és szárazságtűrése valószínűsíthetően nem különbözik a szülői genotípusokétól, amelyet a szántóföldi megfigyelések is alátámasztottak. Kutatásaink során nagyobb fertilitásra, kalásméretre és ezerszemtömegre szelektáltunk, melynek eredményeként a C₅ generációban több mint 50%-kal sikerült növelni a *T. timococcum* növények produktivitását a szülőkéhez viszonyítva.

Az amfiploid levélrozsdával szembeni immunitása annak mindkét szülői genotípusa által hordozott nagyhatású rezisztenciagéneknek köszönhető, amit Tyryshkin *et al.* (2006) is igazolt egy korábban előállított *T. timococcum*, valamint több *T. timopheevii* és *T. monococcum* génbanki tétel fiatalkori rozsdarezisztenciájának vizsgálata során. Az ide vonatkozó szakirodalomban azonban nem található adat sem a *T. timopheevii*, sem pedig a *T. monococcum* lisztharmattal szembeni fiatalkori fogékonyságáról. Ilyen típusú vizsgálatot valószínűleg e fajok szántóföldön mutatott nagyfokú ellenállósága miatt nem végeztek. Ezek a fajok és a belőlük előállított amfiploid valószínűleg más gének által vezérelt, felnőttkori rezisztenciával is rendelkeznek, melyet az általunk megfigyelt lassú lefolyású (az alakor esetében atipikus csírázást mutató) lisztharmat fertőződés is igazol. Fiatalkori mesterséges lisztharmat fertőzési kísérleteink eredményeként megállapítható volt továbbá, hogy mind a *T. timopheevii*, mind pedig a *T. timococcum* szántóföldi, normál erősségű kórokozó nyomás melletti ellenállóságát valószínűleg a növények felületének sűrű szőrözöttsége is javíthatja, hiszen ez a levélfelületre jutó konídiumok számát nagymértékben csökkentheti. Az amfiploid viszonylag korai generációjának lisztharmat-rezisztencia vizsgálata során ellenálló egyedeket is szelektáltunk a populációból, melyeket, a felnevelésüket követően a 2015/2016-os szezonban tovább szaporítjuk.

A *T. timopheevii* és *T. monococcum* kalászfuzáriummal szembeni ellenállóságával kapcsolatban korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy számos *T. timopheevii* genotípus mellett néhány alakor genotípus is rendelkezik rezisztenciával (Cai *et al.* 2005, Masár *et al.* 2010). Azonban az általunk végzett fuzáriumteszt eredményeként csak a *T. timopheevii* genotípus (MVGB845) bizonyult ellenállónak, míg a pollenadóként használt féltörpe alakor genotípus ('1T-1') nem. A szakirodalmi adatok szerzői feltehetően a hagyományos típusú alakor genotípusok között találtak ellenállókat, amelyről mi is meggyőződhattünk egy mérsékelt fogékonyságot mutató, martonvásári hagyományos alakorfajta ('Mv Alkor') vizsgálata alkalmával. A két fajból előállított amfiploid jó ellenállóságot mutatott mind a szántóföldi, mind a II. típusú fertőződéssel szemben, amelyet bizonyosan az anyai szülőtől örökölt, mivel pollenadóként a féltörpe alakort használtuk. Reményeink szerint a *T. timococcum* kalászfuzárium-ellenállósága is beépíthető lesz búza genotípusokba, amelyet célzó előnemesítési munka már elkezdődött.

A *Triticum timopheevii* hasznosítását vizsgáló kutatások többsége során közvetlen keresztezést hajtottak végre e rezisztenciaforrás és a búza között (Badaeva *et al.* 1995, Peusha *et al.* 1996, Timonova *et al.* 2012), azonban a *T. timococcum* előállításán keresztül is átvihetünk *T. timopheevii* (és *T. monococcum*) géneket a búzába (bridge-keresztezés), amely keresztezés az azonos ploidiás szint miatt feltételezhetően jobb hatásokkal hajtható végre.

4.4 *Triticum timopheevii* kromatint hordozó búza előnemesítési anyag előállítása

Kutatásaink következő lépése a *Triticum timococcum* és a *T. timopheevii* genetikai anyagának, búza előnemesítési programban történő hasznosítása volt. E tevékenység kivitelezése során visszakeresztezéses (BC) módszerrel állítunk elő minél jobb agronómiai tulajdonságokkal rendelkező hibrideket, és ezzel párhuzamosan a ploidiás szint szerinti keresztezés hatékonyságára is választ kerestünk. Munkánk legfontosabb célja a *Triticum timopheevii* fajban rejlő hasznos tulajdonságok (betegség-ellenállóság) kiaknázása mind közvetlen, mind közvetett úton. Mindkét előnemesítési eljárás során, az F₁ hibrid előállítását követően többszöri visszakeresztezéssel kívánjuk csökkenteni az idegen kromatin arányát az utódnemzedékekben. A hasznos gének búzába történő közvetett beépítését a hídként használt *T. timococcum* alapú keresztezések útján kívánjuk elérni, melynek során az amfiploid másik szülői genotípusából, a *T. monococcum*-ból is számíthatunk hasznos gének átépülésére. A *T. timococcum* szülőjeként kiválasztott *T. timopheevii* genotípust (MVGB845) felhasználva közvetlen génátviteli programot is indítottunk. Emellett egy másik *T. timopheevii* genotípus kromatinját tartalmazó, korábban előállított 6G diszómás addíciós búzatörzset kereszteztük egy 6B monoszómás búza vonallal monoszómás szubsztitúciós genetikai anyag előállítására céljából, melyek utódjaiban később transzlokációk kialakulása és 6G eredetű hasznos gének beépülése várható.

4.4.1 *Triticum timococcum* amfiploiddal végzett keresztezések

A 2010/2011 telén előállított amfiploid utódnemzedékének felnevelése során a *T. timococcum* C₂ generáció növényeivel indítottunk el 2012 nyarán egy előnemesítési programot, melyben az 'Mv9kr1' búzatörzset használtuk fő keresztezési partnerként. Ugyanezzel a búzatörzsszel végzett visszakeresztezések eredményeként 2015 nyarára már a hibridek háromszor visszakeresztezett nemzedékének (BC₃) felszaporítása is megtörtént a következő évi szántóföldi tesztekhez. Ezzel párhuzamosan az amfiploiddal azonos genomszerkezetű *T. zhukovskyi* (MVGB650) faj genetikai diverzitásának szélesítését, továbbá az általunk előállított, kilenc egyéb *T. timococcum* genotípus tesztelését és szelekcióját is folyamatosan végezzük.

A *T. timococcum* amfiploidra alapozott búza előnemesítési program és a vele végzett egyéb keresztezések évenkénti alakulását a 14. táblázatban foglaltuk össze.

14. táblázat *Triticum timococcum* amfiploidra alapozott előnemesítési program folyamata (fehér cella: fitotron/üvegház, szürke cella: szántó föld; LR-levélrozsda, LH-lisztharmat)

Időszak	Előnemesítési program során végzett feladat						
2010 nyár	<i>T. timopheevii</i> × <i>T. monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i> '1T-1' tesztkereszteszések						
	<i>T. timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i> var. <i>rubiginosum</i> (MVGB845) kiválasztása						
2010/11 tél	<i>T. timopheevii</i> MVGB845 × <i>T. monococcum</i> '1T-1' kereszteszések						
2011 nyár	genomduplikálás (fitotron) -> <i>T. timococcum</i> C ₁ nemzedék						
2011/12 tél	<i>T. timococcum</i> C ₂ fitotroni vizsgálata				9 egyéb <i>T. timopheevii</i> × '1T-1' genomduplikálása		
2012 nyár	<i>T. aestivum</i> 'Mv9kr1' × C ₂	C ₂ × 'Mv9kr1'	<i>T. timococcum</i> C ₂			<i>T. zhukovskyi</i> MVGB650 × <i>T. timococcum</i> C ₂	
2012/13 tél	F ₁ × 'Mv9kr1'	F ₁ × 'Mv9kr1'	<i>T. timococcum</i> C ₃ fitotroni vizsgálata			F ₁	
			<i>T. timococcum</i> C ₃ LR teszt				
2013 nyár	<i>T. timococcum</i> C ₃ , <i>T. timococcum</i> C ₄ tavaszi életforma kísérlete				C ₂ generáció szelekciója		
2013/14 tél	BC ₁ × 'Mv9kr1'	BC ₁ × 'Mv9kr1'	<i>T. timococcum</i> C ₅ × 'Mv9kr1'	<i>T. timococcum</i> C ₅ × Mv búzafajták	<i>T. timococcum</i> C ₅	F ₂	
2014 nyár	BC ₂ LR teszt (tavasz)	BC ₂ LR teszt (tavasz)	Utódok többsége nem csírázott és a felnevelteken sem lett szem		C ₆ LR teszt (tavasz)	F ₃ LR teszt (tavasz)	
					<i>T. timococcum</i> C ₄	F ₃	
2014/15 tél	BC ₂ × 'Mv9kr1'	BC ₂ × 'Mv9kr1'				<i>T. timococcum</i> C ₆	
						<i>Timococcum</i> C ₅ LH teszt	
2015 nyár	BC ₃ üvegházi szaporítása	BC ₃ üvegházi szaporítása				<i>T. timococcum</i> C ₅ (kalászfuzárium teszt)	F ₄
						C ₄ generáció szelekciója	

4.4.1.1 F₁ hibridek előállítása

A *Triticum timococcum* és búza keresztezésével F₁ hibrideket hoztunk létre két évben, mindkét kombinációban (15. táblázat).

15. táblázat *Triticum timococcum* és *Triticum aestivum* F₁ hibridek előállítása (Martonvásár)

Év	Anyja	Pollenadó	Megporzott virágok száma	F ₁ szemek száma	Szemkötés
2012	<i>Triticum timococcum</i>	<i>T. aestivum</i> 'Mv9kr1'	472	32	6,78%
	<i>T. aestivum</i> 'Mv9kr1'	<i>Triticum timococcum</i>	939	183	19,49%
2013	<i>Triticum timococcum</i>	<i>T. aestivum</i> 'Mv9kr1'	572	14	2,45%
	<i>Triticum timococcum</i>	<i>T. aestivum</i> búzafajták (Mv Marsall, Mv Suba)	54	2	3,85%

A 2012 nyarán végrehajtott keresztezések alkalmával a recesszív keresztezhetőségi allélt hordozó, jól keresztezhető 'Mv9kr1' búzatörzs növényeit fitotronban neveltük, melyhez a *T. timococcum* keresztezési partnert a szántóföldről biztosítottuk, mivel e két genotípus több hetes eltéréssel virágzott. Az 'Mv9kr1' búzatörzset a tenyészkertben gyűjtött virágzó *T. timococcum* kalászokkal poroztuk be a fitotronban, míg a fordított kombináció esetén a fitotronban levágott, virágzó búzakaralászokkal poroztunk a tenyészkertben. Mindkét kombinációban végzett keresztezés eredményeként megállapítottuk, hogy a hibridelőállítás közel háromszor hatékonyabbá tehető, ha a búza partnert anyaként használjuk, melynek háttérében a *T. timococcum* virágok részleges sterilitása állhat. A következő év telén fitotronban neveltük mindkét keresztezési partnert, de ekkor, a hagyományos búzafajtákkal végzett porzás eredményéhez hasonlóan gyenge szemkötést (2,45%) sikerült csak elérnünk. Ez a több mint 2,5-szeres hatékonyságcsökkenés jól mutatja, hogy az amfiploidot anyai keresztezési partnerként szababföldön érdemes használni.

4.4.1.2 Hibridek visszakeresztezése búzával

Fitotroni körülmények között, 2012/2013 telétől kezdve az F₁ hibrid növényeket több generáción át visszakereszteltük a keresztezési partnerként használt 'Mv9kr1' búzatörzssel, melynek eredményét a 16. táblázat ismerteti.

16. táblázat *Triticum timococcum* és búza F₁ hibridjeinek *T. aestivum* 'Mv9kr1' búzatörzssel történt többszöri visszakeresztezésének eredménye (BC₁₋₃ = első, második illetve harmadik visszakeresztezett nemzedék)

Generáció	Anya	Pollen-adó	Megporzott virágok száma	Kötött szemek száma	Szemkötés
BC ₁	'Mv9kr1' × <i>T. timococcum</i>	'Mv9kr1'	417	9	2,16%
	<i>T. timococcum</i> × 'Mv9kr1'	'Mv9kr1'	157	1	0,64%
BC ₂	('Mv9kr1' × <i>T. timococcum</i>) × 'Mv9kr1'	'Mv9kr1'	473	33	6,98%
	(<i>T. timococcum</i> × 'Mv9kr1') × 'Mv9kr1'	'Mv9kr1'	32	3	9,38%
BC ₃	(('Mv9kr1' × <i>T. timococcum</i>) × 'Mv9kr1') × 'Mv9kr1'	'Mv9kr1'	1276	238	18,65%
	((<i>T. timococcum</i> × 'Mv9kr1') × 'Mv9kr1') × 'Mv9kr1'	'Mv9kr1'	44	2	4,55%

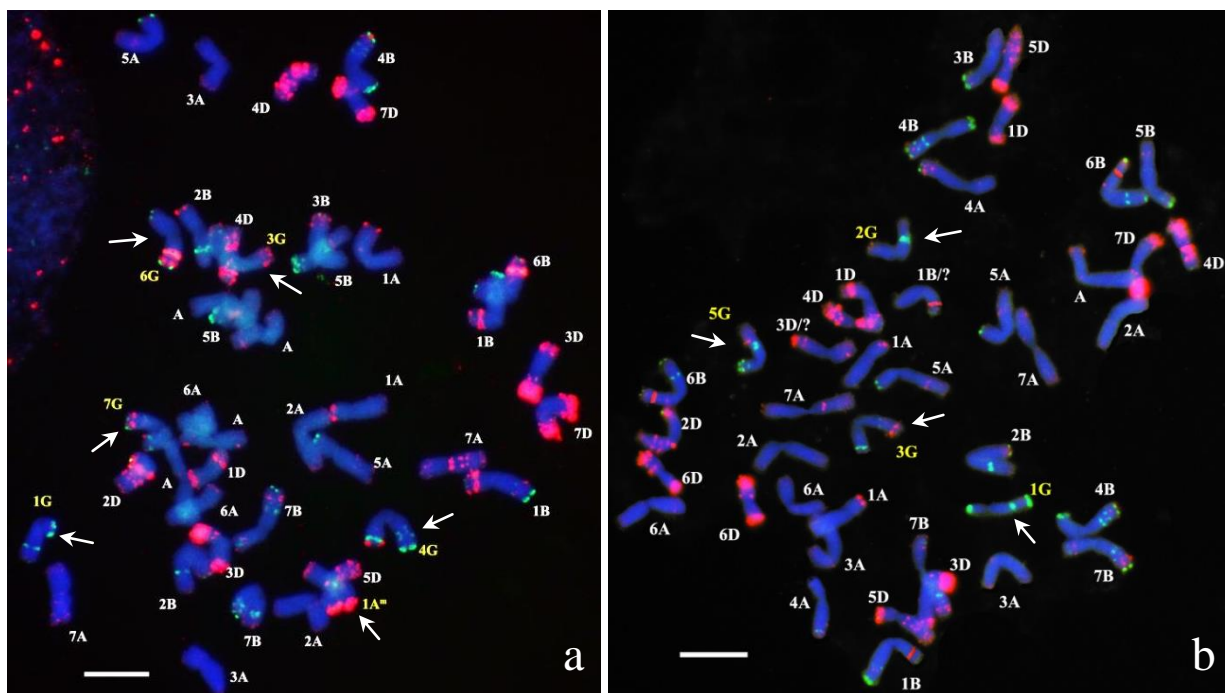
Az első visszakeresztezéssel (BC₁) párhuzamosan, 2013-ban előállított 16 db új F₁ növényen nem kaptunk szemet és azok visszakeresztezése sem járt sikerrel, ezért a 16. táblázatban csak a 2012-ben indított visszakeresztezéses program eredményei szerepelnek.

A *T. timococcum* amfiploidra alapozott előnemesítési programban az F₁ növények első visszakeresztezése bizonyult a legnehezebbnek, elsősorban akkor, ha az amfiploidot használtuk anyai szülőpartnerként. Ebben az esetben a beporzott virágok csupán 0,64%-a termékenyült meg, azonban ez az arány a következő visszakereszteзések alkalmával többszörösére nőtt, igaz így is csak néhány szemet eredményezett. Lényegesen hatékonyabbnak bizonyult a búza citoplazmával rendelkező F₁ hibridek visszakeresztezése. Az első generációban, ebben az esetben is rossz volt a szemkötés, azonban a harmadik visszakereszteзést követően ez az érték már a 18%-os értéket is meghaladta. A programból származó utódokat üvegházban szaporítottuk fel 2015 nyarára, így a közeljövőben sorra kerülő szántóföldi tesztelésükhöz elegendő szem áll majd rendelkezésre.

4.4.1.3 Utódnemzedékek genomvizsgálata

A keresztezési munkával párhuzamosan elvégeztük az utódnemzedékek molekuláris citogenetikai elemzését is, melynek során a preparátumok FISH mintázata alapján értékeltük azok genomszerkezetét.

A búza és az amfiploid keresztezéséből származó F₁ hibrid szemek csíráztatásakor készített mitotikus gyökérsúcs-preparátumok vizsgálatával megállapítottuk, hogy mindkét irányú kombináció esetén a hibrid növények 75%-a 42 kromoszómával rendelkezett, míg 17%-uknál 40 kromoszómát és a maradék néhány növényenél az instabilnak tekinthető 39 vagy 41 kromoszómát számoltunk. A továbbiakban, az 'Mv9kr1' búzatörzsszel végzett első visszakereszteзésnél a 42 kromoszómás F₁ hibrideket használtuk csak fel, hogy lehetőleg stabil genomú utódokat kapjunk. A búza citoplazmát hordozó BC₁ növények FISH vizsgálatánál sikerült azonosítani több *T. timopheevii* eredetű G kromoszómát, továbbá egy *T. monococcum* eredetű kromoszómát (1A^m) is. Leggyakrabban az 1G, 2G és 6G kromoszómák fordultak elő a BC₁ utódokban, azonban egyes növényekben ezek mellett egyéb G kromoszómákat is azonosítottunk. A G kromoszómák minden esetben pár nélkül álltak, és a legtöbb esetben a velük homeológ egyik B kromoszóma helyére épültek be (monoszómás szubsztitúció). A *T. timococcum* A kromoszómái és a búza A kromoszómái közötti nagyobb fokú hasonlóság miatt csak a specifikus FISH mintázattal rendelkező A^t és A^m kromoszómákat lehetett biztosan idegenként azonosítani, amelyre csupán néhány növény esetében találtunk példát (21(a). ábra).



21. ábra *Triticum aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timococcum* hibrid 'Mv9kr1'-gyel visszakeresztezett BC₁ (a) és BC₂ (b) utódjainak kromoszómái fluoreszcens *in situ* hibridizációval vizsgálva, pSc119.2 (zöld), Afa-family (piros) és pTa71 (sárga) DNS próbákkal jelölve. A 42 kromoszómás sejtekben a *T. timococcum* kromoszómák sárgával és nyíllal jelölve (Skála = 10 µm)

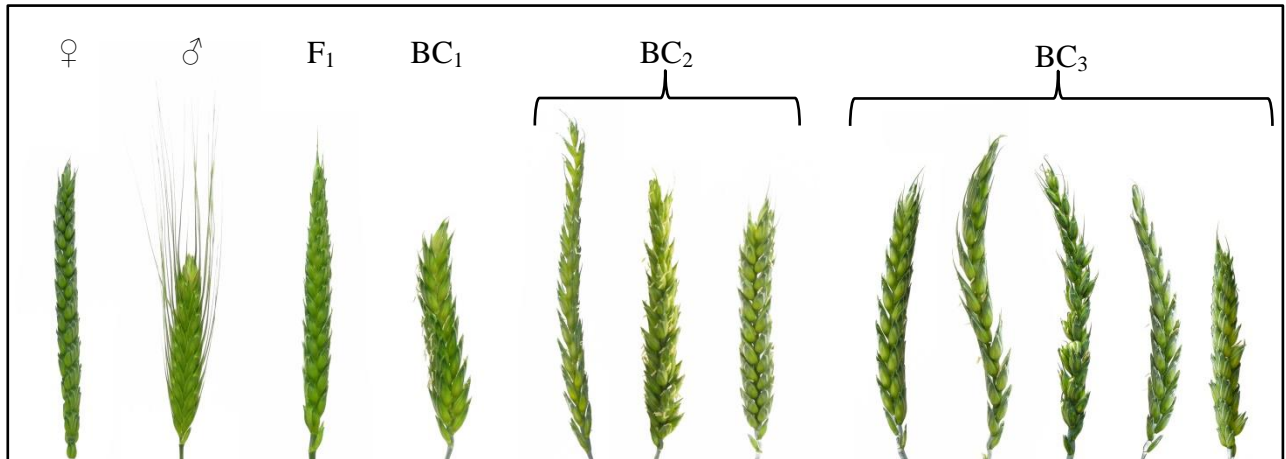
A BC₁ növények 'Mv9kr1'-gyel történt keresztezése eredményeként a BC₂ utódok körülbelül 30%-a lett normál 42 kromoszómás, míg sok aneuploid növény is keletkezett 38 és 44 közötti kromoszómaszámmal, ami a viszonylag nagy arányú idegen kromatin normál sejtosztódást zavaró hatásával magyarázható. Az előző generációhoz hasonlóan, G kromoszómák monoszómás szubsztitúcióját azonosítottuk, azonban egy növényben átlagosan már kevesebb idegen kromoszóma fordult elő, mint a BC₁ generáció növényeiben (21(b). ábra).

A harmadik visszakeresztetés eredményeként a BC₃ növényekben transzlokációk előfordulását feltételeztük a monoszómás szubsztitúciókat alkotó, egymással homeológ B és G kromoszómák között, amit egy izolált körülmények között végzett öntermékenyítéssel stabilizáltunk. Ez a felszaporítás 2015 nyarára valósult meg, melyet az utódokban (BC_{3i1} nemzedék) létrejövő esetleges transzlokációk azonosítása és az utódok szántóföldi rezisztenciavizsgálata fog követni.

4.4.1.4 Utódnemzedékek fenotípusos vizsgálata és üvegházi rozsdafertőzése

Az első keresztezéssel előállított *T. aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timococcum* F₁ hibridek 100 cm körüli magassága több mint 30%-kal haladta meg a búza szülő magasságát, és inkább a pollenadó amfiploidhoz volt hasonló, miközben kalászaik inkább a tar kalászú 'Mv9kr1' bélyegeit mutatták. A búzával végzett többszöri visszakeresztetés eredményeként a

növénymagasságot eredményesen csökkentettük: a BC₃ növényeken 40 cm és 60 cm közötti magasságokat mértünk. A homogén megjelenésű F₁ kalászkok után a visszakeresztezett utódnemzedékek kalászfelépítésében nagyobb mértékű variabilitást tapasztaltunk, ami a növényekben lévő idegen kromatin könnyen ellenőrizhető indikátora (22. ábra).



22. ábra *Triticum aestivum* 'Mv9kr1' (♀) és *Triticum timococcum* (♂) F₁ hibridjének és annak 'Mv9kr1' búzatörzsszel többször visszakeresztezett utódnemzedékeinek (BC₁-BC₃) kalászai

A *T. timococcum* citoplazmával rendelkező F₁ hibrid visszakeresztezett generációi abnormális, csökkent fertilitású kalászkokat fejlesztettek, és növénymagasságuk sem haladta meg a 40 cm-t. Az első visszakeresztezésből (BC₁) származó összes utódnövényt felneveltük, majd a BC₂ generáció növényeit csíranövény korban levélrozsdával fertőztük üvegházi körülmények között, 2014 tavaszán. A *T. timococcum* szülőhöz hasonlóan a levélrozsdával szemben a vizsgált 28 BC₂ növény 55%-a bizonyult immunisnak vagy a hiperszenzitív reakció jellegzetes tünetét hordozta (értékelés: 0 vagy ;), míg 25%-uk különböző mértékben állt ellen a kórokozó támadásának (értékelés: 1 vagy 2) (23. ábra).



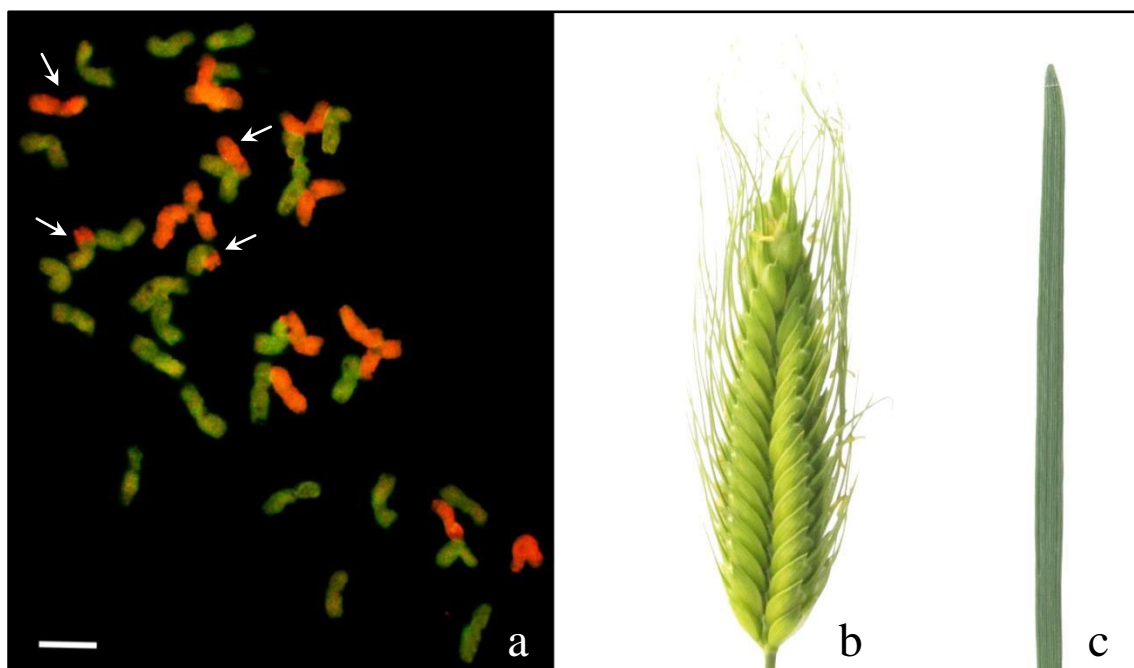
23. ábra *Triticum timococcum* (balra) és *Triticum aestivum* 'Mv9kr1' (jobbra) hibridjének 'Mv9kr1' búzatörzsszel kétszer visszakeresztezett generációjából (BC₂) származó fiatal növények (középső három) levélrozsdával szembeni fogékonysága (Martonvásár, 2014)

A többi növénynél a búza szülőhöz hasonló mérsékelt fogékonyságot (értékelés: 3) figyeltünk meg, mely alapján ezeket a növényeket nem használtuk a következő visszakeresztezésnél.

A fordított kombinációjú, *T. timococcum* × *T. aestivum* 'Mv9kr1' BC₂ növényekből kettő csíranövénykori levelein sem találtunk uredotelepeket (a harmadik szem nem csírázott).

4.4.1.5 *Triticum zhukovskyi* genetikai diverzitásának szélesítése

A természetben fellelhető *Triticum zhukovskyi* a *T. timopheevii* és a *T. monococcum* spontán hibridizációja révén alakult ki. Kialakulásából és elterjedési területének kis méretéből adódóan e faj genetikai diverzitása erősen korlátozott, amit hatékonyan lehet bővíteni az általunk előállított szintetikus amfiploiddal. Ebből a célból keresztezéseket végeztünk 2012-ben egy *T. zhukovskyi* génbanki tétel (MVGB650) és a *T. timococcum* felhasználásával, melynek eredményeként sikerült 4 db F₁ hibrid szemet előállítani (szemkötés: 5,26%). A generációk előrehaladtával a szemkötés fokozatosan növekedett, és az F₃ növényeken elérte a 26,6%-ot. A kísérleti évek során az izolált kalászkokról aratott szemeket vetettük el újra, majd az F₃ nemzedék genomszerkezetét és morfológiai felépítését vizsgáltuk (24. ábra).



24. ábra *Triticum zhukovskyi* MVGB650 × *T. timococcum* F₃ kromoszómapreparátumának multicolour genomi *in situ* hibridizációs mintázata (a), ahol az A¹ és A^m kromoszómák zölden (*T. urartu* genomi próba), a G kromoszómák vöröses színnel (*Ae. speltoides* genomi próba) jelölődtek. A *T. timopheevii* eredetű, fajspecifikus 6A¹S/1GS intergenomikus transzlokáció nyíllal jelölve (Skála = 10 µm). Az F₃ utód kalásza (b) leginkább a *T. timopheevii* kalászához hasonlít. Mesterséges levélrozsdafertőzésből származó csíranövénykori levele (c) pedig teljes immunitást mutat e betegséggel szemben (Martonvásár, 2014)

McGISH vizsgálattal bizonyítottuk, hogy a szüleihez hasonlóan az F₃ utódok is 14 G kromoszómával és 28 A kromoszómával rendelkeznek (24(a). ábra). Továbbá kimutattuk, hogy ez a genetikai anyag is hordozza a *T. timopheevii* eredetű, fajspecifikus 6A¹S/1GS intergenomikus transzlokációt (az ábrán nyíllal jelölve).

Egy átlagos F₃ növény 5 hajtást fejlesztett, magassága 63 cm volt, és 5,6 cm hosszú, szálkás kalászinak felépítése leginkább a *T. timopheevii* kalászhoz hasonlított (24(b). ábra). Üvegházi rezisztenciavizsgálata eredményeként megállapítottuk, hogy fiatalkori levélrozsa-ellenállósága kiemelkedő (értékelés: 0) volt (24(c). ábra).

4.4.2 A *Triticum timopheevii* fajjal végzett keresztezések

A *T. timococcum* előállítása, vizsgálata és nemesítésben való hasznosítása mellett 2012/2013 telén a korábban kiválasztott *T. timopheevii* génbanki tétellel (MVGB845) is megkezdtuk az előnemesítési munkát, amelyet évenkénti bontásban a 17. táblázatban foglaltunk össze.

17. táblázat *Triticum timopheevii* genotípusra (MVGB845) alapozott előnemesítési program folyamata (fehér cella: fitotron/üvegház, szürke cella: szántóföld; LR-levélrozsa)

Idő- szak	Előnemesítési program során végzett feladat			
2010 nyár	<i>T. timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i> var. <i>rubiginosum</i> (MVGB845) kiválasztása			
2012/13 tél	<i>T. aestivum</i> 'Mv9kr1' × MVGB845			
2013 nyár				MVGB845 × <i>T. aestivum</i> 'Mv Karizma'
2013/14 tél	F ₁ × 'Mv9kr1'	F ₁ × Mv búzafajták	MVGB845 × 'Mv9kr1' MVGB845 × Mv búzafajták	F ₁ × Mv búzafajták
2014 nyár	BC ₁ LR teszt (tavasz)		Utódok nem csíráztak, de van mindkét kombinációból tartalék F ₁ szem	Nem lett hibrid szem, de van tartalék szem az F ₁ és F ₂ nemzedékből
2014/15 tél	BC ₁ × 'Mv9kr1'			
2015 nyár	BC ₂ üvegházi szaporítása			

Az előnemesítési program eredményeként nemcsak új genetikai anyagokat kívántunk előállítani, hanem az első keresztezések hatékonyságát is össze kívántuk vetni az amfiploidokkal végzett keresztezések hatékonyságával. Az összehasonlíthatóság érdekében keresztezési partnernek ugyanazt az 'Mv9kr1' búzatörzset, illetve martonvásári búzafajtákat használtuk fel (kiegészítve az 'Mv Karizma' fajttal), és a keresztezéseket mindkét kombinációban elvégeztük. A búza

citoplazmával rendelkező, búzával kétszer visszakeresztett F₁ nemzedék (BC₂) növényeinek felszaporítása 2015 nyarára megtörtént, és szántóföldi tesztelésüket a közeljövőben végezzük el. A *T. timopheevii* citoplazmát tartalmazó utódok felhasználásával hímsteril törzsek előállítását is megkezdjük, amelyek a későbbiekben felhasználhatók lesznek hibridbúza előállítására.

4.4.2.1 Búzával alkotott F₁ hibridek előállítása és visszakeresztésük búzával

A *T. timopheevii* felhasználásával fitotronban indított F₁ hibrid előállítás eredménye jól mutatja, hogy a recesszív kereszttezhetőségi allélpárt (*kr1kr1*) hordozó 'Mv9kr1' búzatörzsszel közel 40%-os hatékonysággal lehet hibrid szemet előállítani (18. táblázat). A szemkötések gyakorisága az első visszakeresztés (BC₁) során nagymértékben csökkent, azonban a BC₂ nemzedékben már nagyszámú utódot kaptunk, melyek üvegházi felszaporítását 2015 nyarára végeztük el, és izolált termésüket (BC_{2i1} nemzedék) a közeljövőben tervezett szabadföldi vizsgálatok során fogjuk felhasználni.

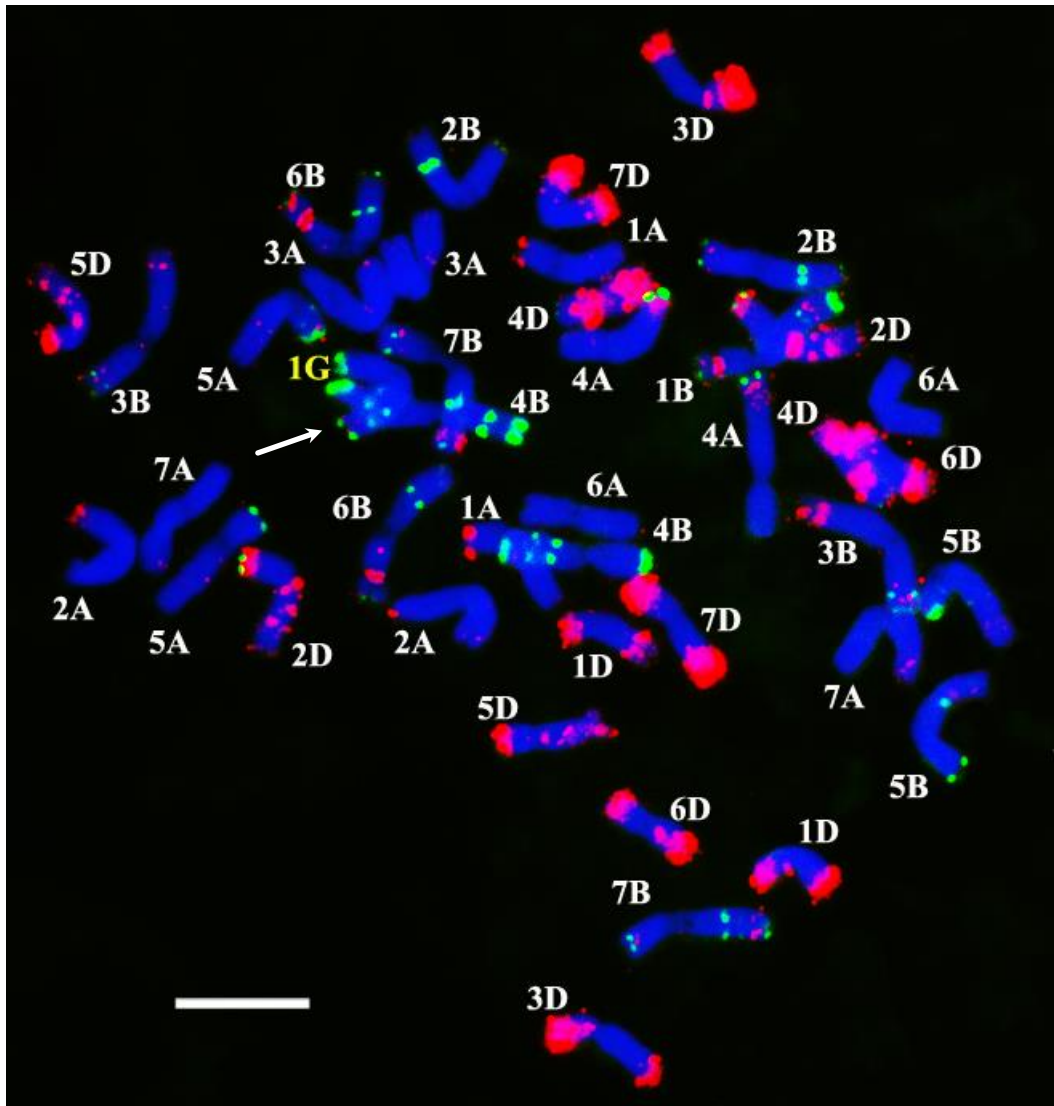
18. táblázat *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* MVGB845 visszakeresztéses program eredménye

Generáció	Anya	Pollenadó	Megporzott virágok száma	F ₁ szemek száma	Szemkötés
F ₁	<i>T. aestivum</i> 'Mv9kr1'	<i>T. timopheevii</i> MVGB845	529	210	39,70%
BC ₁	'Mv9kr1' × MVGB845	'Mv9kr1'	364	17	4,67%
		<i>T. aestivum</i> búzafajták ('Mv Marsall', 'Mv Nádor', 'Mv Suba')	985	48	4,87%
BC ₂	('Mv9kr1' × MVGB845) × 'Mv9kr1'	'Mv9kr1'	260	22	8,46%
	('Mv9kr1' × MVGB845) × <i>T. aestivum</i> búzafajták ('Mv Marsall', 'Mv Nádor')	'Mv9kr1'	324	132	40,74%

4.4.2.2 Visszakeresztett utódnemzedék genomvizsgálata

A hexaploid búza és a tetraploid *T. timopheevii* eltérő kromoszómaszáma miatt az első visszakeresztést követően végeztük el a hibridek molekuláris citogenetikai elemzését FISH módszerrel. Ennek során megállapítottuk, hogy a vizsgált BC₁ utódok többsége a stabilabbnak tekinthető páros kromoszómaszámmal rendelkezett, melyek közel 30%-át 42 kromoszómaszámnak azonosítottuk. Emellett a leggyakrabban a 40 és a 38 kromoszómaszámú utódok fordultak elő. Legnagyobb gyakorisággal az 1G kromoszómát tudtuk azonosítani, amely az egyik 1B kromoszóma helyére épült be (25. ábra). Ezen kívül azonosítottunk 2G, 6G és 5A^t kromoszómát

hordozó utódokat is, melyek az 1G kromoszómához hasonlóan, leginkább monoszómás szubsztitúció formájában fordultak elő.

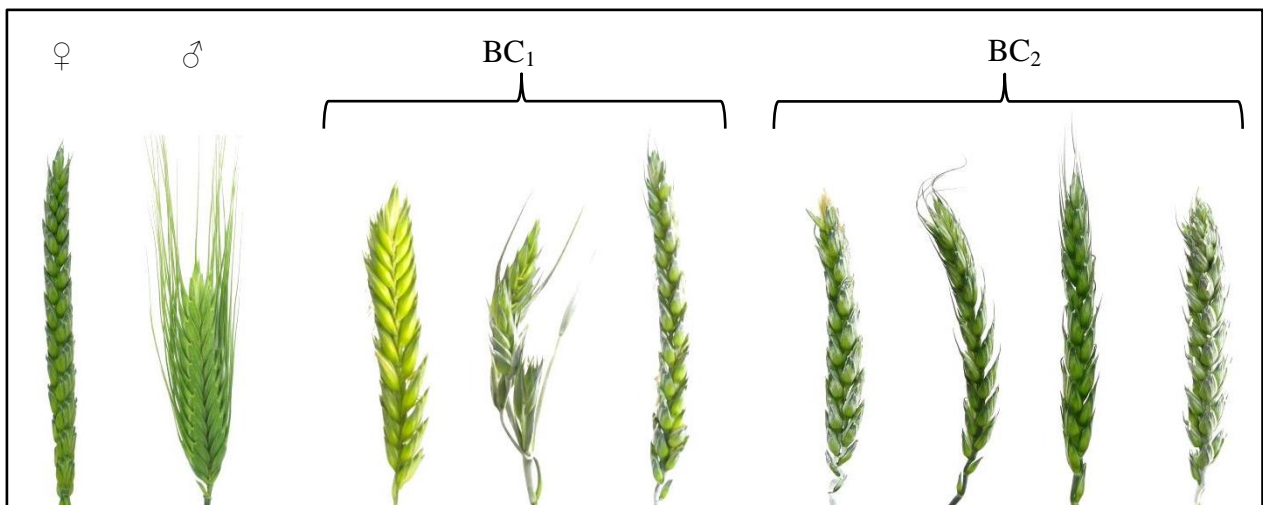


25. ábra *Triticum aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timopheevii* MVGB845 'Mv9kr1'-gyel visszakeresztezett BC₁ utódjának mitotikus kromoszómái fluoreszcens *in situ* hibridizációval vizsgálva, pSc119.2 (zöld), Afa-family (piros) és pTa71 (sárga) repetitív DNS próbákkal jelölve. A 42 kromoszómás sejtben a *T. timopheevii* eredetű 1G kromoszóma sárgával és nyíllal jelölve (Skála = 10 μm)

Az 'Mv9kr1' búzatorzzsel végzett második visszakeresztelésnél a 42 kromoszómás növényeket használtuk fel, hogy lehetőleg stabil genomú utódokat kapjunk. A felszaporított BC₂_i₁ generációban, illetve a közeljövőben előállítandó BC₃ nemzedékben feltételezhetően már a *T. timopheevii* kromatin transzlokációját is tudjuk majd azonosítani.

4.4.2.3 Utódnemzedékek fenotípusos vizsgálata és üvegházi rozsdafertőzése

A *T. aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timopheevii* MVGB845 hibrideket 'Mv9kr1' búzatörzsszel visszakeresztezve kapott BC₁ utódok magassága átlagban 51 cm volt, mely 17%-os csökkenést jelent az F₁ hibrid átlagos magasságával (61 cm) szemben. A BC₁ növények kalászaik alakja változatos volt, ami az idegen kromatin jelenlétére utal. A növények néhány esetben abnormális, elágazó kalászokat is fejlesztettek, ami valószínűleg az aneuploid genom jelenlétének eredménye. A második visszakeresztezést követően a BC₂ növények már nemcsak a magasságukban hasonlítottak a búza szülőjükhöz, hanem kalászfelépítésükben is (26. ábra).



26. ábra *Triticum aestivum* 'Mv9kr1' (♀) és *T. timopheevii* MVGB845 (♂) hibridjének 'Mv9kr1'-gyel többször visszakeresztezett utódnemzedékeinek (BC₁-BC₂) különböző kalászaik

Az 'Mv9kr1'-gyel visszakeresztezett utódnemzedékek növényei átlagosan 7,4 kalászt fejlesztettek, ez 20%-kal haladta meg a martonvásári búzafajtával visszakeresztezett utódok bokrosodóképességét. Ezek a BC₁-jellegű utódnövények 43 cm-es átlagos magasságúak voltak. A tisztán 'Mv9kr1' alapú BC₁ utódokat, valamint martonvásári búzafajtákat is a pedigréjükben hordozó BC₁-jellegű utódokat csíranövény korban levélrozsdával fertőztük (19. táblázat).

19. táblázat *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* MVGB845 BC₁ utódjain végzett fiatalkori levélrozsdafertőzés eredménye növény számonkénti bontásban (Martonvásár, 2014)

BC ₁ növények szülői genotípusai		csíranövénykori levélrozsdafertőzés érzékenysége						Nem csírázott
Anyja	Pollenadó	0	;	1	2	3	4	
<i>T. aestivum</i> 'Mv9kr1' × <i>T. timopheevii</i> MVGB845	'Mv9kr1'	4	0	1	1	1	0	10
	'Mv Marsall'	1	0	0	0	0	1	2
	'Mv Nádor'	3	2	1	0	0	0	7

A BC₁ szemek csírázóképesége gyenge volt, amelynek következtében csak az utódnövények 45%-át tudtuk felnevelni, illetve levélrozda-ellenállóságra tesztelni. Eredményeink szerint a vizsgált növények kétharmada immunis volt vagy hiperszenzitív módon reagált a levélrozda fertőzésre (értékelés: 0 vagy ;), amit az immunis *T. timopheevii* szülőitől örökölhettek. A további 5 növény a levélrozsdával szembeni érzékenység különböző fokozataival volt jellemezhető, melyek közül a mérsékelt fogékonyat és a fogékonyat (értékelés: 3 illetve 4) nem használtuk fel a következő visszakeresztezésnél. Kísérletünkben az 'Mv9kr1' mérsékelt fogékony volt (értékelés: 3).

4.4.2.4 *Triticum timopheevii* citoplazmát hordozó búzatörzsek előállítása

A *T. aestivum* citoplazmával rendelkező BC utódok mellett a fordított kombinációjú, *T. timopheevii* MVGB845 citoplazmával rendelkező hibridek búzával való visszakeresztezését is elindítottuk, hogy citoplazmás hímsteril (CMS) búzatörzseket állítsunk elő martonvásári búzafajták felhasználásával. Fitotronban 44 F₁ szemet, üvegházban 26 F₁ szemet, a 2013 tavaszán vetett 'Mv Karizma' búzafajta felhasználásával, szántóföldi körülmények között 183 F₁ szemet állítottunk elő (20. táblázat).

20. táblázat *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* MVGB845 × *Triticum aestivum* F₁ hibridek előállításának eredménye (Martonvásár, 2013)

Keresztezés helye	Anya	Pollenadó	Megporzott virágok száma	F ₁ szemek száma	Szemkötés
Fitotron	<i>Triticum timopheevii</i> MVGB845	<i>T. aestivum</i> 'Mv9kr1'	220	44	20,00%
Üvegház		<i>T. aestivum</i> búzafajták ('Mv Marsall', 'Mv Nádor', 'Mv Suba')	398	26	6,53%
Szabadföld		<i>T. aestivum</i> 'Mv Karizma'	1130	183	16,19%

A *T. timopheevii* és búza felhasználásával végzett F₁ hibrid előállítás eredménye jól mutatja, hogy a recesszív keresztezhetőségi allélpárt (*kr1kr1*) hordozó 'Mv9kr1' búzatörzssel porozva be a *T. timopheevii* anyát több mint háromszoros hatékonysággal lehet hibrid szemet előállítani, mint a normál, homozigóta domináns *Kr1Kr1* allélpárral rendelkező martonvásári búzafajtákkal. A *T. timopheevii* MVGB845 × *T. aestivum* 'Mv Karizma' kombináció is viszonylag jó szemkötést eredményezett, azonban az első visszakeresztezésre elindított 73 F₁ szemből csak kettő csírázott ki (2,7%). A felnevelt két F₁ növényen 2014-ben beporzott 126 virágon nem kaptunk hibrid BC₁ szemet, azonban az itt előállított 37 izolált F₂ szemmel és az előző évről megmaradt 110 F₁ szemmel folytatjuk a programot. Az üvegházban előállított 26 F₁ szemből

első körben elvetett 14 szemből csak egy csírázott, és az is elpusztult, ezért a megmaradt 12 db *T. timopheevii* MVGB845 × *T. aestivum* 'Mv Suba' F₁ szemet is kísérletbe állítjuk a közeljövőben.

A *T. timopheevii* és a *T. timococcum* keresztezhetőségi hatékonyságának vizsgálata (15., 16. és 20. táblázat) során előállított *T. timopheevii* citoplazmát hordozó, 'Mv9kr1' búzatörzsszel előállított hibrideket is bevonjuk ebbe a CMS búzatörzs előállítási programba a közeljövőben.

4.4.3 6B/6G monoszómás szubsztitúciós búza vonal (20^{II}+1^I6B+1^I6G) előállítása

Az előző fejezetekben ismertetett visszakeresztezéses programok kezdeti eredményeként kapott monoszómás kromoszóma-szubsztitúciókhoz (21. és 25. ábra) hasonló szubsztitúciót lehet indukálni egy idegen kromoszómára diszómás addíciós búzatörzs és egy monoszómás búza vonal felhasználásával. Egy Martonvásáron több évtizede előállított *T. aestivum* 'Rannaja' 6B monoszómás (20^{II}+1^I6B) vonalat (génbanki szám: MVGS1117) használtunk anyaként, melyet egy 6G diszómás addíciós búzatörzsszel (21^{II}+1^{II}6G) poroztunk be (21. táblázat). Ennek eredményeként olyan 42 kromoszómás hibrideket kaptunk, melyek 1 db 6B és 1 db 6G kromoszómát hordoznak (20^{II}+1^I6B+1^I6G). A pollenadóként használt diszómás addíció idegen kromatinja a *T. timopheevii* vad alfajának egyik génbanki tételéből (*T. timopheevii* subsp. *armeniacum* 'Iraq' (rövidített jelzése: TG28)) származik, melyet Prof. Sutka József épített be több mint egy évtizede *T. aestivum* 'Mv9kr1' búzatörzsbe.

21. táblázat 6B/6G monoszómás szubsztitúciót hordozó búza vonal előállításának folyamata

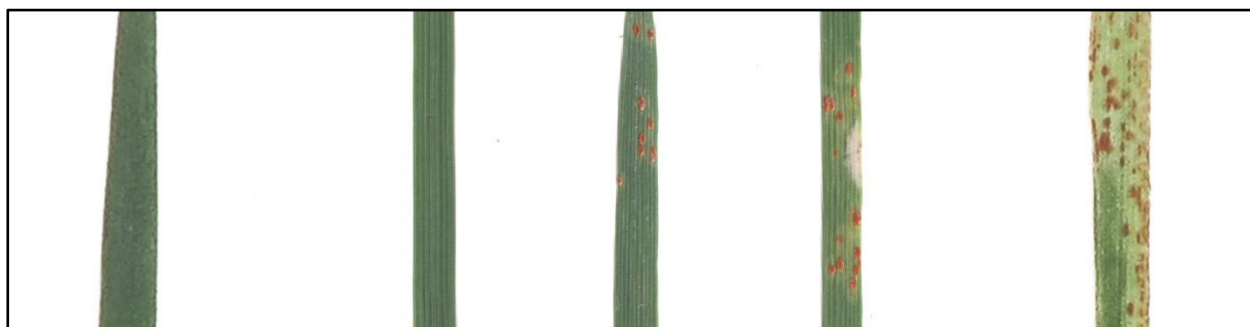
Időszak	Elvégzett feladat
2012/13 tél	<i>Triticum aestivum</i> 'Mv9kr1' × <i>T. timopheevii</i> subsp. <i>armeniacum</i> BC _{3i3} (TG jelzésű génbanki tételek) felszaporítása (2001. évi szemekből)
	'Mv9kr1' × <i>T. timopheevii</i> subsp. <i>armeniacum</i> BC _{3i3} levélrozda-tesztje
	'Mv9kr1' × TG28 (<i>T. timopheevii</i> subsp. <i>armeniacum</i> 'Iraq') BC _{3i3} (háromszor visszakeresztezett, majd háromszor izolált) kiválasztása és genomvizsgálata
2013/14 tél	'Mv9kr1' × TG28 BC _{3i4} felszaporítása
2014/15 tél	<i>T. aestivum</i> 'Rannaja' 6B monoszóma (MVGS1117) × ('Mv9kr1' × TG28 BC _{3i4})
2015 nyár	F ₁ növények izolálása, 42 kromoszómások (20 ^{II} +1 ^I 6B+1 ^I 6G) azonosítása és izolált felnevelése

A diszómás addíciós búzatörzs azonosítását, és molekuláris citogenetikai vizsgálatát követően választottuk ki a *T. aestivum* 'Rannaja' monoszómás sorozatból az addíciónak megfelelő homeológ kromoszómára monoszómás vonalat. E két szelektált genetikai anyag F₁ hibridjei között azonosítottunk olyan növényeket, melyek 41 normál búzakromoszómájuk mellett az egyik 6B kromoszóma helyett 6G kromoszómát tartalmaznak (monoszómás szubsztitúció). A 2015. év

nyarára befejezett felszaporításukat követően az F₂ utódok felnevelésekor már a 6B és a 6G kromoszómák párosodása és transzlokációk kialakulása is bekövetkezhet.

4.4.3.1 *Triticum timopheevii* kromoszómás búza vonalak levélrozsdá-rezisztencia vizsgálata

A Martonvásáron, Prof. Sutka József által közel 20 éve előállított *T. aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* hibridek háromszor visszakeresztezett majd háromszor izolált (BC₃i₃ nemzedék) utódjairól, a 2001. évből származó szemeket 2012/2013 telén vetettük el azzal a céllal, hogy folytassuk az akkor abbahagyott előnemesítési munkát. A 2001-ben feljegyzett kormoszómaszám-vizsgálat eredménye alapján kiválogattuk a 44 kromoszómásként nyilvántartott vonalakat, és csíráztatásukat követően teszteltük a levélrozsdával szembeni ellenállóságukat. Ez a rezisztencia-tulajdonság a hasznos *T. timopheevii* kromatin jelenlétének kimutatására alkalmas, jól használható indikátornak bizonyult. Összesen három vad *T. timopheevii* génbanki tétel felhasználásával előállított 28 BC₃i₃ búza vonalat választottunk ki. A rajtuk elvégzett csíranövénykori mesterséges levélrozsdá-fertőzés eredményeként 72,2%-ban fogékony (értékelés: 4), 19,4%-ban mérsékelten fogékony (értékelés: 3), 2,8%-ban ellenálló (értékelés: 2) egyedeket azonosítottunk, míg 2 növény gyakorlatilag immunis minősítést (értékelés: ;) kapott. A vonalak fiatalkori levélrozsdá-fogékonyságának vizsgálata során immunis kontrollként a *T. timopheevii* MVGB845 génbanki tételt, míg fogékonyként a *T. aestivum* 'Alcedo' búzafajtát használtuk (27. ábra).

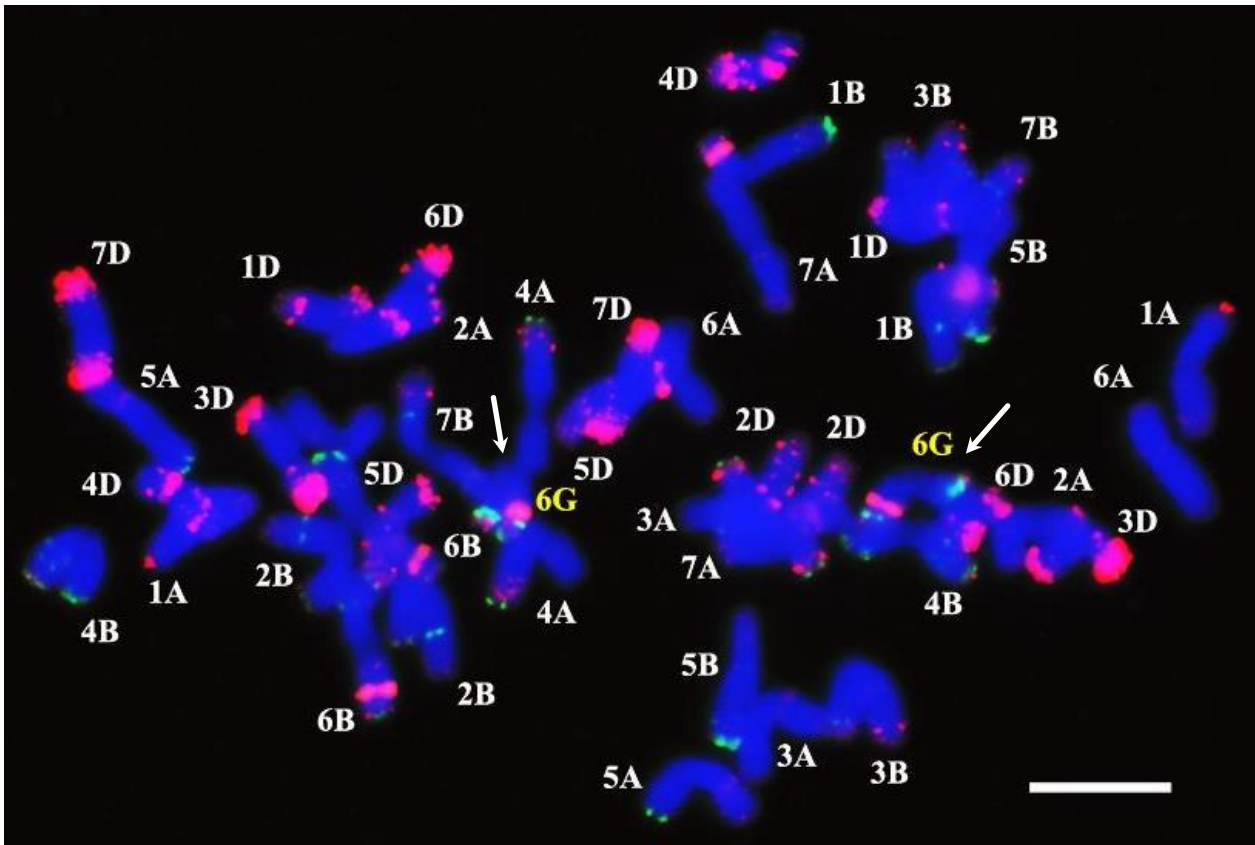


27. ábra *Triticum aestivum* 'Mv9kr1' × *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum* különböző BC₃ vonalainak (középső három) fiatalkori mesterséges levélrozsdá-fertőződési tünetei, összehasonlításban az immunis *T. timopheevii* MVGB845 (balra) és a fogékony *T. aestivum* 'Alcedo' (jobbra) tüneteivel (Martonvásár, 2013)

4.4.3.2 6G diszómás addíció molekuláris citogenetikai azonosítása

A mesterséges levélrozsdá-fertőzés eredményei alapján kiválasztott két immunis búzatörzset tovább vizsgáltuk molekuláris citogenetikai eszközökkel, ugyanis feltételezésünk szerint a rezisztenciájukat okozó *T. timopheevii* eredetű kromatint hordozták. A növények gyökeréből

készített mitotikus kromoszómapreparátum felhasználásával, FISH technikával mindkét növényben sikerült azonosítanunk a 42 búzakromoszóma mellett 1 pár 6G kromoszómát is (28. ábra). Ezeket a törzseket a TG28 jelzésű *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* 'Iraq' genotípus felhasználásával állították elő.

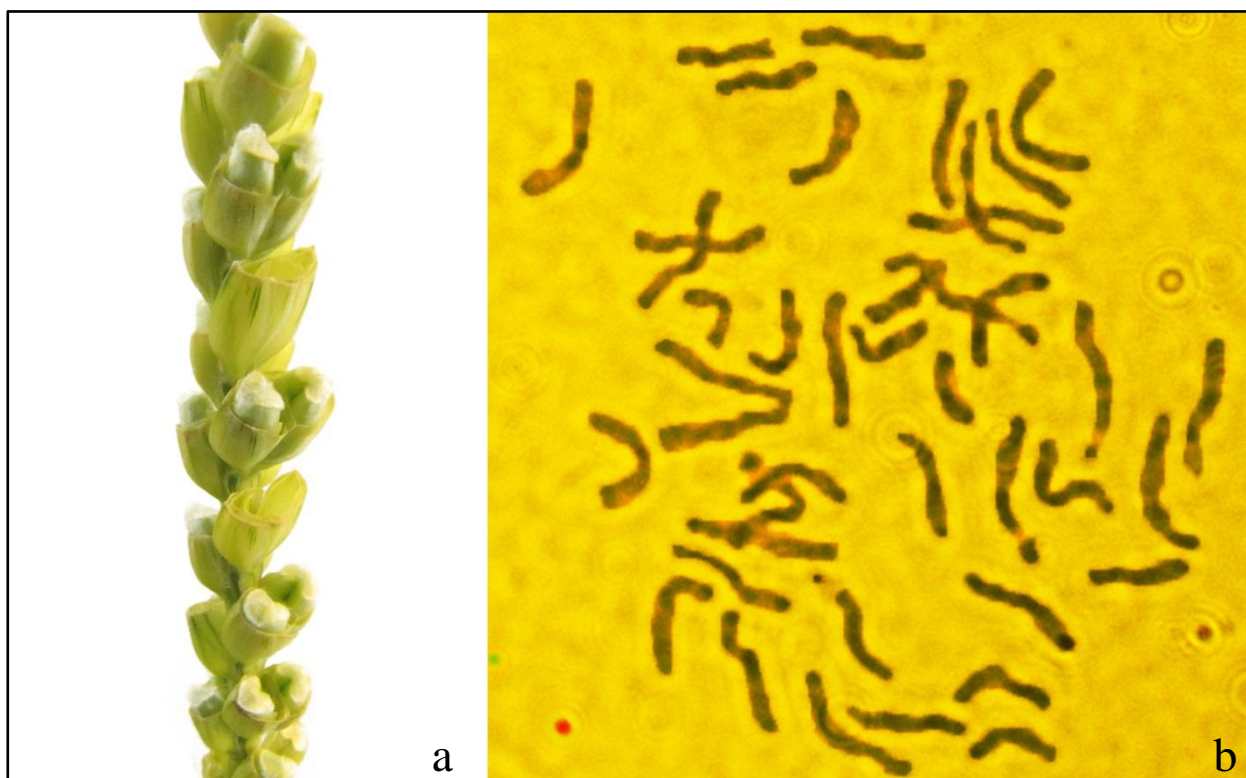


28. ábra *Triticum aestivum* 'Mv9kr1' × *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum* 'Iraq' (TG28) 'Mv9kr1'-gyel háromszor visszakeresztezett és háromszor izolált (BC_3i_3), 44 kromoszómás utódjának mitotikus kromoszómái fluoreszcens *in situ* hibridizációval vizsgálva, pSc119.2 (zöld), Afa-family (piros) és pTa71 (sárga) repetitív DNS próbákkal jelölve. A 42 búzakromoszóma mellett azonosított *T. timopheevii* eredetű 6G kromoszómapár sárga színnel és nyíllal jelölve (Skála = 10 μ m)

4.4.3.3 'Rannaja' 6B monoszómás búza vonal ellenőrzése és F_1 hibridek létrehozása

A Martonvásár Gabona Génbank által fenntartott genetikai anyagok között a 'Rannaja' őszi búzafajtára épülő monoszómás sorozatot is fenntartják, melynek aneuploid genomösszetétele (41 kromoszóma: $20^{II} + 1^I$) következtében az utódokat minden generációban vizsgálni szükséges, hogy a 40 és 42 kromoszómás egyedeket ne vigyük tovább a következő nemzedékbe. A pontos és hatékony kromoszómaszám-ellenőrzésre legjobban a Feulgen módszer használható, melyet mi is alkalmaztunk a 6B monoszómák kiválogatása céljából.

A 'Rannaja' 6B monoszómás genetikai anyag egyetlen, 2010-ben izolált kalászáról származó 46 szemet csíráztattunk és Feulgen módszer alkalmazásával 34-et választottunk ki a keresztezés anyai partnerének. A 6G diszómás addícióval 2014/2015 telén beporzott 'Rannaja' 6B monoszómás búza vonal 1404 virágján összesen 129 szemet kaptunk (szemkötés: 9,2%), melyek közül, szintén Feulgen módszert használva válogattuk ki a 42 kromoszómás egyedeket (29. ábra).

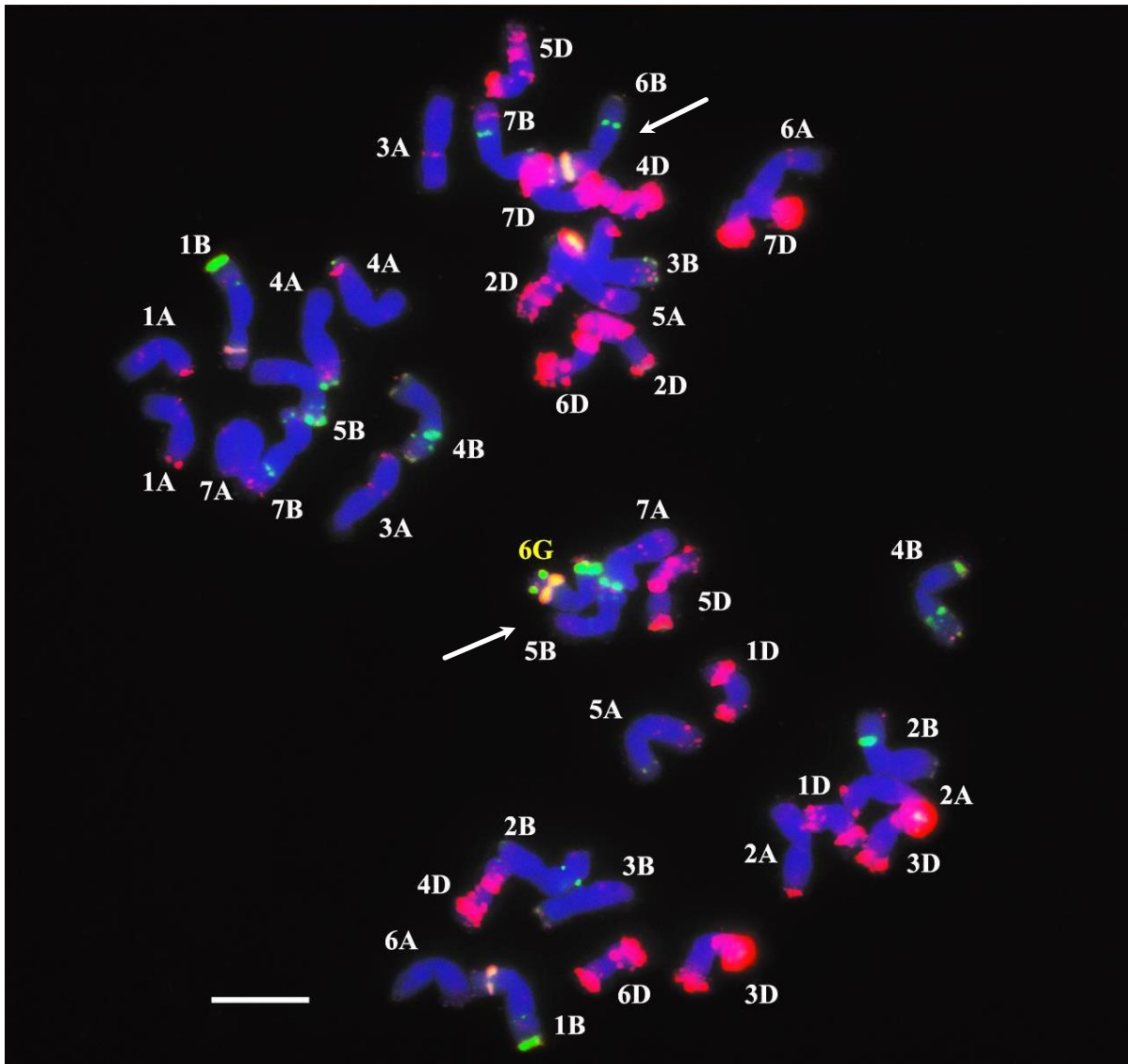


29. ábra *Triticum aestivum* 'Rannaja' 6B monoszóma (MVGS1117) × (*T. aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* 'Iraq' BC_{3i4}) fejlődő F₁ szemei (a) és azok közül a 42 kromoszómások kiválogatása Feulgen módszerrel (b)

Az F₁ szemek 81,4%-a csírázott ki (105 szem), melyekből gyökéresúcs-preparátumot készítettünk a kromoszómaszám meghatározásához. Összesen 29 növényről állapítottuk meg, hogy 42 kromoszómával rendelkezik. Ezek izolált felnevelését 2015 nyarán kezdtük el mesterséges növénynevelési körülmények között fitotronban.

4.4.3.4 6B/6G monoszómás szubsztitúciós ($20^{II} + I^I 6B + I^I 6G$) F₁ hibridek FISH azonosítása

Az általunk kiválasztott 29 db 42 kromoszómás egyed az egyik 6B kromoszóma helyett egy 6G kromoszómát hordoz potenciálisan, azonban a monoszómás növényegyedek esetleges téves azonosításából eredő hibát csak FISH használatával tudtuk kizárni, amelyet a kiválasztott F₁ növények felnevelésével párhuzamosan végeztünk el (30. ábra).



30. ábra *Triticum aestivum* 'Rannaja' 6B monoszóma (MVGS1117) × (*T. aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* 'Iraq' BC_{3i4}) F₁ hibrid mitotikus kromoszómái fluoreszcens *in situ* hibridizációval vizsgálva, pSc119.2 (zöld), Afa-family (piros) és pTa71 (sárga) repetitív DNS próbákkal jelölve. A 42 kromoszómás sejtben egy 6B és egy *T. timopheevii* eredetű 6G kromoszóma található (nyíllal jelölve), mely utóbbi sárga színnel van jelölve (Skála = 10 µm)

A preparátumok FISH mintázatát kiértékelve 19 olyan növényt azonosítottunk, melyek hordozzák a 6B/6G monoszómás kromoszóma-szubsztitúciót. Ezeknek a növényeknek a fitotroni kamrában történő felnevelése 2015 őszén fejeződött be, és a belőlük származó izolált szemekből nagy valószínűséggel már transzlokációt hordozó F₂ növényeket is sikerül a közeljövőben azonosítanunk.

4.4.4 *Triticum timopheevii* fajra alapozott génátvitel lehetőségének megvitatása

Munkánk során háromféle módszerrel építettünk be *T. timopheevii* eredetű kromatint őszi búzába. A *T. timopheevii* fajjal végzett közvetlen keresztezés mellett egyrészt a hexaploid *T. timococcum*, másrészt egy 6G diszómás addíciós búzatörzs génátviteli hídként való felhasználásával első lépésben monoszómás kromoszóma-szubsztitúciókat alakítottunk ki. E háromirányú előnemesítési munka megkezdése mellett választ kaptunk a tetraploid *T. timopheevii* és a hexaploid *T. timococcum* búzával való keresztezhetőségében fennálló különbségekre is. Eredményeink alapján a *T. timopheevii* szülővel végzett keresztezést követően a szemkötés közel kétszerese volt a hexaploid szinten véghezvitt hibridizációéhoz viszonyítva (15. és 18. táblázat). A *T. timococcum* szülővel létrehozott kombinációknál tapasztalt gyengébb szemkötés a második A genom és a D genom közötti kromoszóma-asszociációs zavar okán fellépő abnormális endospermium-fejlődés hatásával magyarázható, ahogy arra Belea (1986) is utalt *Triticum* fajhibridek interspecifikus keresztezés utáni genomviszonyainak alakulását értékelve. A keresztezhetőségi hatékonyság kiértékelése mindkét genotípus esetében jól szemléltette egyúttal a homozigóta recesszív *kr1* allélt hordozó búzagenotípus ('Mv9kr1') jobb keresztezhetőségét a normál búzafajtákkal szemben, mely megfelel Molnár-Láng *et al.* (1996) által leírtaknak. Farshadfar *et al.* (1994) korábbi eredményeivel összhangban, a kísérleteinkben használt *T. timopheevii* genotípus és búza között, mindkét irányban elvégzett keresztezés eltérő hatékonyságú volt. Az 'Mv9kr1' búzatörzset anyaként használva a szemkötés kétszerese volt, mint azokban a kombinációkban, amelyekben ugyanez a szülő pollenadóként szerepelt. A hexaploid *T. timococcum* és az 'Mv9kr1' közötti keresztezés hatékonysága hasonlóan alakult a keresztezési irány függvényében, azonban a szemkötések közötti különbség még nagyobb mértékű volt, mint a *T. timopheevii* esetében. A recesszív *kr1* allélpárt nem hordozó búzafajtákkal végzett keresztezések során 50%-kal nagyobb szemkötést (6,53%) értünk el, mint Belea (1986), amely valószínűleg az általunk használt eltérő genotípusok jobb kombinálódó képességének a következménye. Ez megfelel Sharma (1995) megállapításának is, mely szerint azonos fajok különböző genotípusai is mutathatnak eltérő szemkötési hatékonyságot.

Előnemesítési programunk egyik legfontosabb célja, hogy a *T. timopheevii* betegség-rezisztencia génjeit építsük be a búzába, lehetőség szerint minél kisebb idegen kromatinnal kapcsolatban, amelynek eléréséhez a visszakeresztezéses (BC) módszert alkalmaztuk. Az első keresztezést követően termelt F₁ szemek számához viszonyítva körülbelül 10%-os hatékonysággal tudtuk csak elvégezni az első visszakeresztezést, azonban a szemkötés gyakorisága a további visszakeresztezések során nagymértékben és fokozatosan növekedett. Hasonló eredményekről számoltak be tetraploid *Triticum* fajokon (Belea 1986) vagy alakoron (Megyeri 2014) alapuló, búzával végzett visszakeresztezéses programokkal kapcsolatban.

Az idegen kromatin beépülését eltérő morfológiai felépítés (pl. kalászalak, szőrözöttség, kalász szálkássága) is jelezheti (O'Mara 1940, Driscoll 1975, Szakács és Molnár-Láng 2010), amelyet a különböző BC nemzedékek gyors ellenőrzésére is használtunk (22. és 26. ábra). Emellett az utódok levélrozda-rezisztenciája is jól mutatja, hogy a betegségre érzékeny búzatörzs ('Mv9kr1') genetikai hátterébe beépült-e egy rezisztenciát hordozó idegen kromoszómaszegmens. A *T. timopheevii* és *T. timococcum* alapú BC növények, illetve a 6G diszómás addíciós búzatörzs levélrozda-ellenállóságát mesterséges csíranövénykori fertőzéssel vizsgáltuk, mivel a több mint 60 levélrozdarezisztenciáért felelős *Lr* gén nagy többsége csíranövénykorban megnyilvánul (Dakouri *et al.* 2013). E szelekció létjogosultságát támasztja az is alá, hogy a felnőttkori rezisztencia csak a kifejlett növényeken jelenik meg, míg a csíranövénykori rezisztencia legtöbbször a növény egész élete során kifejeződik (Singh *et al.* 2001). Munkánk során a vizsgált BC utódnemzedékek növényei között több mint 50%-ban azonosítottunk immunis vagy közel immunis egyedeket, melyeket (felszaporításuk után) a közeljövőben tervezzük szántóföldi körülmények között vizsgálni.

Az idegen kromatin, a BC utódokban történő pontosabb kimutatására és nyomonkövetésére molekuláris citogenetikai módszert használtunk, melynek során a *T. timococcum* 3 genomjára, általunk kidolgozott FISH kariotípust, valamint a G és A genom általunk optimalizált mcGISH alkalmazásával történő elkülönítését eredményesen használtuk. Ezekben a BC utódokban több idegen kromoszómát is azonosítottunk a búza kromoszómák mellett, utóbbiakat Sepsi *et al.* (2008) által publikált búza kariotípus segítségével határoztuk meg. A FISH technikával hasonló eredményességgel lehetett azonosítani az idegen kromoszómákat, mint azt korábban C-sávzással *T. aestivum* × *T. timopheevii* hibridekben érték el (Badaeva *et al.* 1986, Lángné Molnár *et al.* 1996). Az egymást követő *T. aestivum* × *T. timococcum* BC utódnemzedékek vizsgálata során az idegen kromoszómák számának kisebb mértékű csökkenését tapasztaltuk, mely összhangban áll korábbi kutatások eredményeivel (Lángné Molnár 2006). A vizsgált utódnövények nagy többségében idegen fajú monoszómás kromoszómaszubsztitúciót találtunk, ami FISH technikával jól azonosítható. A következő nemzedékekben a monoszómás szubsztitúciót alkotó, egymással homeológ kromoszómák közötti transzlokációk kialakulása várható.

A 6G diszómás addíciós búzatörzs előállítását eredményező, Prof. Sutka József által koordinált előnemesítési program több mint egy évtizede befejeződött Martonvásáron. Ennek eredményét sikeresen használtuk fel az újraindított előnemesítési program következő lépésében, ahol 6B/6G monoszómás szubsztitúciót hordozó *T. aestivum* 'Rannaja' 6B monoszóma (MVGS1117) × (*T. aestivum* 'Mv9kr1' × *T. timopheevii* subsp. *armeniacum* 'Iraq' BC_{3i4}) F₁ növényeket sikerült előállítanunk 15% körüli hatékonysággal. Ezekben a növényekben mind a 6B, mind a 6G

kromoszóma pár nélkül van jelen, ezért ezek nagy valószínűséggel egymással fognak párosodni a következő meiózis során, így hozva létre transzlokációkat az F₂ nemzedékben. A következő nemzedékekben Horváthné Uhrin (2013) által kidolgozott SSR marker alapú eljárást használva nagy biztonsággal lesz meghatározható az átépült 6G kromoszómaszakasz, annak hossza és elhelyezkedése a 6B kromoszómán. Továbbá, amennyiben nem jön létre az összekapcsolódás, a két univalens a centroméránál eltörhet, és a kromoszómakarok a homeológ párjukkal, egymást kompenzálva centrikus fúziót is létrehozhatnak, ahogy erre Lukaszewski (2000) és Friebe *et al.* (2005) is rámutattak.

Az átépült idegen *T. timopheevii* kromoszómarészek kimutatása molekuláris markerekkel munka- és költséghatékony módon végezhető el (Timonova *et al.* 2012), melyben az A^t és G kromoszómák búza SSR markerekre alapozott térképe is segítségre lehet (Salina *et al.* 2006). Az utódnemzedékek további szelekcióját segítheti, hogy az ismert rezisztenciagént hordozó kromoszómaszakasz hatékonyan azonosítható az adott rezisztenciagénekre alapozott marker alapú szelekció (MAS) során (Vida *et al.* 2009).

A *T. timopheevii* citoplazmával előállított hibridek szemkötési aránya viszonylag jónak tekinthető, azonban a hibrid szemek csírázási százaléka nagyon alacsony volt. Ez megfelel Belea (1986) korábbi kutatási eredményeinek, mely a keresztezési hatékonyság genotípus-függését írja le, illetve a nagyobb ploidszintű szülő anyaként való alkalmazását ajánlja. A citoplazmás hímsteril (CMS) búzatörzs előállításának kezdeti lépései jól tükrözik az ebben a technikában rejlő nehézségeket (Longin *et al.* 2012), azonban az időigényes CMS törzselőállítást kompenzálhatja a hibridkombináció pollenadó törzsének előállítása során, a fertilitást visszaállító génekre alapozott MAS használata (Zhou *et al.* 2005, Sinha *et al.* 2013).

Az előnemesítési munkánk során használt *T. timococcum* genotípus mellett előállított kilenc különböző *T. timopheevii* tételen alapuló *T. timococcum* törzs is számos kiaknázásra váró tulajdonsággal rendelkezik, melyek a közeljövőben nemcsak a nemesítők hasznára lehetnek, hanem segíthetnek a természetben előforduló, azonos genomszerkezetű *T. zhukovskyi* erősen beszűkült genetikai diverzitásának szélesítésében is.

4.5 Új tudományos eredmények

1. Felmértük és jellemeztük a Martonvásár Gabona Génbankban fenntartott *Triticum timopheevii* búza vad rokon faj génbanki tételeinek főbb fenotípusos és agronómiai tulajdonságait, valamint alakorral való kombinálódó képességét. Az eredmények alapján kiválasztottunk egy genotípust (*Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* – MVGB845), melyet célszerű felhasználni a búza-előnemesítésben. Eredményeink hasznos információt biztosítanak a martonvásári *T. timopheevii* génbanki tételek jövőbeli célzott felhasználásához is.
2. *Triticum timococcum* Kost., nom. nud. néven szintetikus amfiploidot hoztunk létre a kiválasztott *T. timopheevii* genotípus (MVGB845) és Martonvásáron Dr. Kovács Géza által, korábban nemesített féltörpe alakor törzs (*T. monococcum* subsp. *monococcum* '1T-1') felhasználásával. A keresztezhetőségi vizsgálatok eredményeként további 9 *T. timococcum* törzset állítottunk elő, és szaporítottuk tovább szántóföldön, mely eredmény világviszonylatban is kiemelkedő.
3. Részletesen jellemeztük a *T. timococcum* és szülői genotípusainak fenotípusos és rezisztencia tulajdonságait. Megállapítottuk, hogy a *T. timopheevii* és a *T. monococcum* egyes tételeinek csíranövényei mesterséges lisztharmat fertőzés során fogékonyak, ezért a szántóföldi rezisztenciájukat valószínűleg felnőttkori rezisztencia is biztosítja.
4. Fejlesztettük és optimalizáltuk a *T. timopheevii* kromatinjának kimutatására alkalmas fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) eljárást, mellyel elkészítettük a G és A^t genomok, pSc119.2, Afa-family és pTa71 repetitív DNS próbákon alapuló FISH kariotípusát. A kariotípusokat eredményesen használtuk a *T. timococcum* genomvizsgálatánál, illetve e fajok búzával alkotott hibridjeiben az idegen kromatin azonosításánál.
5. Többszínű genomi *in situ* hibridizációs (mcGISH) eljárást dolgoztunk ki, mellyel a G genom és az A genomok elkülöníthetővé váltak egymástól. Ennek segítségével azonosítottuk a *T. timopheevii* fajspecifikus intergenomikus átrendeződését az új amfiploidban és annak a *T. zhukovskyi* fajjal alkotott hibridjében is. Az egymást követő FISH és mcGISH eljárás alkalmazásával hatékonyabbá tettük az új amfiploid kromoszómáinak azonosítását az utódnemzedékekben.

6. Keresztezhetőségi vizsgálattal igazoltuk, hogy a tetraploid *T. timopheevii* eredményesebben keresztezhető mindkét irányban a búzával, mint a hexaploid *T. timococcum*. A recesszív keresztezhetőségi allélpárt hordozó búza genotípus ('Mv9kr1') hagyományos búzafajtákkal szembeni kiemelkedő keresztezhetőségét is igazoltuk.
7. Búza előnemesítési programot indítottunk visszakeresztezéses (BC) módszerrel a *T. timopheevii* MVGB845 és a *T. timococcum* felhasználásával elsősorban azok kiemelkedő betegség-ellenállóságának hasznosítása céljából. A *T. aestivum* 'Mv9kr1' genotípuson alapuló BC program során csíranövénykorban levélrozsdá-ellenálló utódokat szelektáltunk.
8. Folytattuk a Prof. Sutka József által megkezdett *T. timopheevii* génátviteli előnemesítési programot. A korábban előállított aneuploid anyagok között azonosítottunk egy 6G diszómás addíciót hordozó genotípust (*T. aestivum* 'Mv9kr1' háttérben), mely az általunk végzett csíranövénykori levélrozsdá tesztben rezisztensnek bizonyult. Ebből az addícióból és a *T. aestivum* 'Rannaja' 6B monoszómás búza vonalból (MVGS1117) 6B/6G monoszómás szubsztitúciós növényeket állítottunk elő. Az 1 db 6B és 1 db 6G kromoszómát hordozó növények kromoszóma-összetételét FISH technikával is igazoltuk.
9. *T. timopheevii* citoplazmát hordozó hibrideket hoztunk létre martonvásári búzafajtákkal hímsteril búzatörzs előállítására céljából, mely egy hibridbúza nemesítési program számára fontos kiindulási anyag lehet.
10. A *T. timococcum* amfiploiddal azonos genomszerkezetű, természetes faj, a *T. zhukovskyi* beszűkült genetikai diverzitásának szélesítése érdekében sikeresen hoztuk létre e faj MVGB650 jelzésű génbanki tétele és a *T. timococcum* közötti hibridet, majd jellemeztük annak utódjait.

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 *Triticum timococcum* előállítása

Különböző ploidszintű *Triticeae* fajok és a *Triticum timopheevii* felhasználásával korábban is állítottak elő amfiploidokat, azonban a hexaploid búza előnemesítésére legalkalmasabb a vele azonos ploidszintű amfiploid lehet. Ezért a Martonvásár Gabona Génbankban tárolt több mint 50 *T. timopheevii* tétel részletes jellemzése mellett, kiválasztottunk egy, a korábbi eredmények alapján jó agronómiai- és keresztezhetőségi tulajdonsággal rendelkező, előnemesített, féltörpe alakor törzset (*T. monococcum* subsp. *monococcum* '1T-1'), mint pollenadó keresztezési partnert. Hibridizációjukból és az utódok genomduplikálásából állítottuk elő a szintetikus *T. zhukovskyi*-t, melyet *Triticum timococcum* Kost. nom. nud. néven ismer az irodalom.

A génbanki *T. timopheevii* tételek több éves vizsgálata eredményeként a génbankban sok értékes információ halmozódott fel, ami hasznos lehet a jövőbeni keresztezéseknél a megfelelő partner célzott kiválasztásához. Ezeket a fenotípusos és rezisztencia eredményeket azonban a jövőben mindenképpen javasolt kiegészíteni a különböző abiotikus stresszérzékenységi mutatókkal.

Megállapítottuk, hogy az amfiploid előállításához kiválasztott MVGB845 azonosítójú *T. timopheevii* tételen kívül van még néhány, amelyet célszerű bevonni a búza előnemesítési programokba, így növelve a nemesítési alapanyagok genetikai bázisát, akár újabb típusú *T. timococcum* törzsek előállításán keresztül. A dolgozatban részletesen jellemzett amfiploiddal együtt összesen 10 különböző *T. timopheevii* genotípusból származó *T. timococcum*-ot állítottunk elő, melyek negyedik generációja (C₄) jelenleg szántóföldi szelekciós programban vesz részt, és utódaik búza előnemesítési programokba történő bevonása a közeljövőben várható. Ezek az új amfiploidok számos kiaknázására váró tulajdonsággal rendelkezhetnek és hozzájárulhatnak a búzanemesítési bázis genetikai hátterének további bővítéséhez, valamint segíthetnek a természetben előforduló, azonos genomszerkezettel bíró *T. zhukovskyi* erősen beszűkült genetikai diverzitásának szélesítésében is. Ez utóbbi célból előállított *T. zhukovskyi* × *T. timococcum* hibrid jelenleg F₅ nemezedéknél tart és szaporítását a jövőben is folytatjuk.

Triticum timococcum szintetikus amfiploidot már korábban is előállítottak, azonban azokat minden esetben vad *T. timopheevii* és hagyományos típusú *T. monococcum* genotípusok felhasználásával hozták létre. E szülők több hátrányos tulajdonságot (pl. kalásztörékenység, gyenge szárszilárdság) is átörökítettek az utódaikba. Ezzel ellentétben a jelen dolgozatban ismertetett kutatás során előállított amfiploidot egy körültekintően kiválasztott *T. timopheevii* génbanki tétel (MVGB845) és egy féltörpe, jó kombinálódó képességű, előnemesített alakor törzs keresztezésével hoztuk létre. Eredményeink meggyőzően bizonyították, hogy az

amfiploidok előállításához csak részletesen ismert, előzetesen szigorú szelekción átesett növényi anyagot érdemes használni.

5.2 *Triticum timococcum* molekuláris citogenetikai jellemzése

Munkánk során elkészítettük a *T. timopheevii* (A^t és G) és a *T. monococcum* (A^m) genomjainak FISH kariotípusát a pSc119.2, pTa71 és Afa-family repetitív DNS próbák használatával. Az amfiploid molekuláris citogenetikai vizsgálata pedig igazolta, hogy kromoszómái azonos próbák hibridizálásával egyértelműen azonosíthatók FISH mintázatuk alapján. Mind a hét G, hét A^t és hét A^m kromoszómapárt el tudtuk különíteni egymástól. Az általunk optimalizált többszínű (multicolour) genomi *in situ* hibridizációval (mcGISH) nagy biztonsággal el tudtuk különíteni a hexaploid *T. timococcum* G genomját a két A genomjától.

Vizsgálataink eredményeként a *T. timococcum* és *T. timopheevii* búza előnemesítési programba való bevezetését követő utóvizsgálatok alkalmával, a búza genetikai háttérben is nagy biztonsággal azonosíthatók az átépült idegen kromoszómák. A kariotipizálási munkánk eredményét nemcsak a búza előnemesítési programokban lehet hasznosítani, hanem az általunk kidolgozott kariotípusok elősegíthetik a gének térképezését, izolálását, kromoszómaspecifikus markerek tervezését, valamint az áramlásos (flow) citometriai eljárás során a szeparált kromoszómák azonosítását is.

5.3 *Triticum timococcum* fenotípusos és agronómiai jellemzése

Az amfiploid megjelenésében átmenetet képvisel a szülői genotípusok között, azonban felszínének sűrű szőrözöttsége értékes morfológiai bélyeg, mely a hasznos rezisztenciagének mellett szintén beépíthető a búzafajtákba vírusvektor rovarok és a szárazság elleni védekezőképesség javítása céljából.

A *T. timococcum* nagyfokú rozsdarezisztenciája (levélrozsa, sárgarozsa) mellett kiemelkedően ellenálló volt a lisztharmattal szemben is. Ennek háttérében felnőttkori rezisztencia kialakításáért felelős gének jelenlétét feltételezzük, mivel csíranövénykori mesterségesen fertőzött kísérletben – az irodalomban eddig rezisztensként nyilvántartott szülői genotípusokhoz hasonlóan – fogékonynak bizonyult. Megfigyelésünk szerint a szántóföldi lisztharmat-rezisztenciát a levelek sűrű szőrözöttsége is növelheti. A hasonló témájú kutatások hiánya miatt e feltételezések igazolásához további vizsgálatok elvégzése szükséges. Az amfiploid viszonylag korai generációjának lisztharmat-rezisztencia tesztelését követően lehetőségünk nyílt arra is, hogy ellenálló egyedeket szelektáljuk ki a populációból, melyeket felnevelünk és továbbszaporítunk. Reményeink szerint a *T. timococcum* általunk megfigyelt kalászfuzárium-ellenállósága is beépíthető lesz búza genotípusokba. Az ezirányú előnemesítési munka már elkezdődött, és a

többszörösen visszakeresztezett utódok fuzárium-ellenállóságának tesztelése a közeljövőben várható.

Gázcserenyílások eloszlásának vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy az amfiploid vízhasznosítási képessége és szárazságtűrése valószínűsíthetően nem különbözik a jó szárazságtűréssel rendelkező szülői genotípusokétól, azonban ennek célirányos tesztelése is még jövőbeni feladat.

A *T. timococcum* fenntartó nemesítése során, évente elvégzett szelekció látványos eredménye (pl. produktivitás 50%-os növekedése) tükrében mindenképpen érdemes folytatni a C₅ generáció növényeinek további szelekcióját, hogy pár éven belül egy agronómiai szempontból is kiemelkedő, egyöntetű genetikai anyag álljon a nemesítők rendelkezésére.

5.4 *Triticum timopheevii* kromatint hordozó búza előnemesítési anyag előállítás

A *Triticum timopheevii* hasznosítását célzó kutatások többsége során e rezisztenciaforrást közvetlenül keresztelték a búzával, azonban a *T. timococcum* előállítása révén közvetett úton is átvihetünk *T. timopheevii* (és *T. monococcum*) géneket a *T. aestivum* fajba (bridge-keresztelés). Ezért egy többirányú előnemesítési programot indítottunk, mely során visszakereszteléses (BC) módszerrel állítunk elő minél jobb tulajdonságokkal rendelkező hibrideket. Emellett a korábban előállított, martonvásári genetikai anyagok közül sikerült azonosítanunk egy 6G diszómás addíciós búzatörzset, melyet a *T. timococcum*-hoz hasonlóan génátviteli hídként használtunk fel, és hoztunk létre (monoszómás búza genetikai anyagot használva) 6B/6G monoszómás kromoszóma-szubsztitúciót hordozó genotípust. Kiemelendő továbbá, hogy a *T. timococcum* felhasználásával új alakor eredetű géneket is bevihetünk búzába, ezzel javítva annak betegség-ellenállóságát, valamint egyes minőségi tulajdonságait (tokol- és karotinoid tartalom) is. Előzetes méréseink alapján a *T. timopheevii* MVGB845 genotípus kiemelkedő α -tokoferol-, α -tokotrienol- és mikroelem (Se, Mn, K) tartalommal rendelkezik a búzához képest, mely részletes vizsgálata és a búzába való átvitele a jövőbeli feladatok egyik kiemelt részét fogja képezni.

A ploidiaszint szerinti keresztelés hatékonyságára is választ kaptunk, mely szerint a *T. timopheevii* eredményesebben keresztelhető mindkét irányban a búzával, mint a *T. timococcum*, mely jelenség háttérében a ploidiaszint-azonosságot felülíró, eltérő genomok közötti párosodási zavar és fertilitási problémák állhatnak.

Az előnemesítés során végzett többszörös visszakeresztelés megfelelő módszernek bizonyult az idegen kromatin átvitelére. E munka végső eredménye azonban csak évek múlva realizálódhat olyan búza genotípusokban, melyek csak a hasznos gén(ek)e)t tartalmazó kromoszómaszakaszt hordozzák. Ehhez az időigényes folyamathoz azonban egy PhD munkára fordítható idő nem elegendő. Azonban a kezdeti eredmények mindképpen biztatóak, és a BC generációk jövőbeni

szántóföldi tesztelése további eredményeket ígér. A *T. timopheevii* és *T. timococcum* felhasználásával előállított BC búzahibridek, illetve a 6G diszómás addíciót hordozó búzatörzs levélrozsda-ellenállóságát mesterséges csíranövénykori fertőzéssel is vizsgáltuk és a vizsgált BC utódnemzedékek növényei között több mint 50%-ban azonosítottunk immunis vagy hiperszenzitív reakciót mutató egyedeket. A felszaporított rezisztens BC₂ (*T. timopheevii*), illetve BC₃ (*T. timococcum*) nemzedékek tesztelését a közeljövőben szántóföldön folytatjuk.

Az idegen kromatin BC utódokban történő pontosabb kimutatására és nyomonkövetésére általunk kidolgozott *T. timococcum* FISH kariotípus hatékony eszköznél bizonyult és ajánlható a *T. timopheevii* alapú egyéb búzanemesítési programok molekuláris citogenetikai értékeléséhez is. A vizsgált utódnövények nagy többségében idegen fajú monoszómás kromoszóma-szubsztitúciót találtunk, ezért a további visszakeresztezések hatására egyre növekvő számú transzlokáció kialakulása várható a monoszómás szubsztitúciót alkotó homeológ kromoszómák között. A jövő feladata még a B és G kromoszómák, valamint a különböző eredetű A kromoszómák elkülönítése, ami az intergenomikus transzlokációk azonosítását segítheti. Ezért fontos jövőbeli feladat a *T. timopheevii*-specifikus (polimorf) molekuláris markerek kiválogatása, melynek egy konkrét példáját már jelenleg is módunkban áll használni. A 6B/6G szubsztitúciós növényeink öntermékenyítése eredményeként a közeljövőben vélhetően idegen transzlokációt hordozó utódnövényeket tudunk majd vizsgálni a Martonvásáron kidolgozott mikroszatellit marker alapú eljárással (MAS), amely során meghatározható lesz az átépült 6G kromoszómaszakasz, annak hossza és elhelyezkedése a 6B kromoszómán.

A *T. timopheevii* alapú hímsteril búzatörzs előállításának kezdeti lépéseit megtettük, azonban még hosszú időt igényel a hibridbúza-nemesítésben használható, martonvásári búzafajtákra alapozott törzsek előállítása, mely hatékonyságának egyik feltétele a közelmúltban azonosított, a fertilitást visszaállító génekre alapozott marker-alapú szelekció használata.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Az egyre növekvő népesség biztonságos ellátásának érdekében az emberiség legfontosabb haszonnövényeinek folyamatos nemesítése szükséges. E folyamat eredményességének javítása érdekében az egyes fajokon belül rejlő genetikai diverzitást az idegen fajok bevonásával is célszerű növelni. Ez a kitétel igaz a mérsékelt égöv legfontosabb, emberi fogyasztásra szánt haszonnövényére, a búzára (*Triticum aestivum* L.) is, ahol a vele rokon vad fajok elsősorban az abiotikus és biotikus rezisztenciájának növelésén keresztül járulhatnak hozzá a termésbiztonság növeléséhez. Az egyik legígéretesebb vad rokon faj, a *Triticum timopheevii* Zhuk., mely kiemelkedően ellenáll a búzát fertőző jelentős gombabetegségeknek (levélrozsa, sárgarozsa, szárrozsa, lisztharmat és fuzárium). Közeli rokonsága miatt hagyományos keresztezés útján is eredményesen építhetők át hasznos génjei a búzába, ehhez azonban egy előnemesítési programot szükséges elindítani. Az előnemesítés során történik a génforrásként leginkább alkalmas genotípus kiválasztása, melyet az interspecifikus hibridizáció és az utódnemzedékek szelekciója követ. A közvetlen keresztezés mellett közvetett úton is átépíthetők a *T. timopheevii* kívánt hasznos tulajdonságai. Ehhez először köztes növényi anyagot szükséges előállítani a *T. timopheevii* felhasználásával, amely a későbbi hibridizáció során génátviteli hídként funkcionál. A búzanemesítés gyakorlatában elterjedten használnak amfiploidokat erre a célra, ezért kutatásunk első lépéseként megfelelő szülőpartnereket kerestünk. Az MTA ATK Martonvásár Gabona Génbankjában fenntartott *T. timopheevii* tételek közül – részletes fenotípusos és agronómiai jellemzést követően – kiválasztottunk egy kedvező tulajdonságokkal rendelkező genotípust (*T. timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* – MVGB845). Keresztezési partnernek egy Martonvásáron korábban előállított, kiemelkedő betegség-ellenállóságú, jó agronómiai- és keresztezhetőségi tulajdonságú, féltörpe alakor törzset (*T. monococcum* L. subsp. *monococcum* '1T-1') választottunk. E két genotípus keresztezéséből és az utódok genomduplikálásából létrehoztunk egy $GGA^tA^tA^mA^m$ genomszerkezetű amfiploidot, melyet *Triticum timococcum* Kost., nom. nud. néven mind morfológiai, mind agronómiai szempontból részletesen jellemeztünk. Eredményeink alapján elmondható, hogy a morfológiájában a szülei közötti átmenetet képviselő *T. timococcum* a szüleihez hasonló kiváló szintű rezisztenciával rendelkezik a főbb kórokozókkal szemben. A kalásméretre és ezerszemtömegre végzett szelekció eredményeként az utódok produktivitása 50%-kal haladta meg a szülői genotípusokét. Az előnemesítési folyamat hatékonyságát jelentősen növelheti az idegen kromoszómák vagy kromoszóma-szegmentumok nyomkövetése az utódnemzedékekben. Erre a célra a molekuláris citogenetika eszköztárába tartozó fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) használtuk. Kutatásaink eredményeként a búzánál széleskörűen használt repetitív DNS szakaszok (pSc119.2,

Afa-family, pTa71) próbaként való használatával kidolgoztuk az amfiploid mindhárom genomjának FISH kariotípusát. A kromoszómaspecifikus mintázatnak köszönhetően a hét G, hét A^l és hét A^m kromoszómapár megkülönböztethetővé vált egymástól. A munkánk során optimalizált többszínű (multicolour) genomi *in situ* hibridizációval (mcGISH) nagy biztonsággal el tudtuk különíteni a hexaploid *T. timococcum* G genomját a két A genomjától. Vizsgálataink eredményeként a *T. timococcum* és *T. timopheevii* eredetű genetikai anyag beépítésére irányuló búza-előnemesítési programban, a búza genetikai háttérben is nagy biztonsággal azonosíthatóvá váltak az átépült idegen kromoszómák az utódokban.

Előnemesítési programunk egyik kiemelt célja a *T. timopheevii* betegség-rezisztencia génjeinek beépítése a búzába, lehetőség szerint minél kevesebb idegen kromatinnal kapcsolatban. Célunk eléréséhez a visszakeresztezéses (BC) módszert alkalmaztuk. Összesen háromféle eljárással építettünk be *T. timopheevii* eredetű genetikai anyagot őszi búzába: 1.) *T. timopheevii* genotípussal (MVGB845) végzett közvetlen keresztezéssel; 2.) előzetesen előállított, hexaploid *T. timococcum* amfiploiddal, mint génátviteli híddal végzett keresztezés útján; 3.) egy levélrozsdá-rezisztensként azonosított 6G diszómás addíciót hordozó búzatörzs génátviteli hídként való felhasználásával. Első lépésben monoszómás kromoszóma-szubsztitúciókat hoztunk létre, ahol a búza kromoszómapárok egyikének helyére vele homeológ *T. timopheevii* (vagy ritkán alakor) eredetű kromoszóma épült be. Ezekben a hibridekben, a közeljövőben tervezett öntermékenyítések és további visszakeresztezések hatására transzlokációk kialakulása várható.

E háromirányú előnemesítési munka megkezdése mellett igazoltuk a tetraploid *T. timopheevii* és a hexaploid *T. timococcum* búzával való keresztezhetőségében fennálló különbséget is, amely szerint a *T. timopheevii* fajjal végzett keresztezés közel kétszeres szemkötési arányt eredményezett a hexaploid szinten véghezvitt hibridizációhoz képest.

A *T. timopheevii* és *T. timococcum* növényi anyaggal előállított BC növények levélrozsdá-ellenállóságát csíranövénykorban mesterséges fertőzési körülmények között is vizsgáltuk, melynek eredményeként a vizsgált BC utódnemzedékek növényei között több mint 50%-ban azonosítottunk immunis vagy hiperszenzitív reakciót mutató egyedeket. A *T. aestivum* 'Mv9kr1' genotípuson alapuló BC program során felszaporított levélrozsdá-rezisztens BC₂ (*T. timopheevii*), illetve BC₃ (*T. timococcum*) növények vizsgálatát szántóföldön folytatjuk.

T. timopheevii citoplazmára épülő hibridbúza előnemesítési programot is indítottunk, melynek során *T. timopheevii* × *T. aestivum* és *T. timococcum* × *T. aestivum* hibrideket hoztunk létre martonvásári fajtákon alapuló citoplazmás hímsteril búzatörzs előállítására céljából.

A 6G diszómás addícióból és a *T. aestivum* 'Rannaja' 6B monoszómás búza vonalból (MVGS1117) 6B/6G monoszómás szubsztitúciót hordozó növényeket állítottunk elő, mely eredményt FISH segítségével igazoltuk.

7 SUMMARY

Continued breeding of the most important crops for the ever growing human global population is of great importance, and to maintain this the introduction of crop wild relatives to increase the genetic diversity of a given species is recommended in order to support effective and successful breeding programs. This is especially true for bread wheat (*Triticum aestivum* L.), the most important crop for human consumption in the temperate zone, whose wild relatives could contribute to the improvement of its yield security, primarily through the improvement of its resistance to abiotic and biotic stress. One of the most promising wheat wild relatives is *Triticum timopheevii* Zhuk., which has outstanding resistance to the most important wheat fungal diseases (leaf rust, stripe rust, stem rust, powdery mildew and *Fusarium*). Due to its close relationship to bread wheat, genes expressing these useful traits could also be translocated into wheat using common direct crossing. This procedure has to be initiated through a prebreeding program, where the most useful genotypes as a gene source are selected, followed by interspecific hybridization and selection in the offspring generations. In addition to direct hybridization, the useful traits of *T. timopheevii* could be also transferred into wheat in an indirect way which necessitates, as a first step, the development of intermediate plant material from *T. timopheevii* that will function as a bridge for gene transfer during hybridization. Amphiploids are widely used for this purpose in wheat breeding. Therefore, as the initial stage of our research, the parental lines were selected. A *T. timopheevii* genotype (*T. timopheevii* subsp. *timopheevii* var. *rubiginosum* – MVGB845) with good characteristics was selected from the *T. timopheevii* accessions of the Martonvásár Cereal Genebank of MTA ATK after a detailed phenotypic and agronomic evaluation. As a crossing partner, a semi-dwarf einkorn line (*T. monococcum* L. subsp. *monococcum* '1T-1') bred previously in Martonvásár, which has outstanding resistance to disease and good agronomic traits and crossing ability, was selected. The genome of their hybrid was duplicated to develop an amphiploid with the genome composition $GGA^tA^tA^mA^m$ and was named as *Triticum timococcum* Kost., nom. nud.. This was characterised in detail for both morphological and agronomic traits. Based on our results, *T. timococcum* has intermediate morphological characteristics compared to its parents and shows high resistance to the main fungal diseases in common with its parents. Selection of the amphiploid based on seed and spike size resulted in more than 50% increase in productivity compared to its parents.

The success of the prebreeding procedure is influenced by the alien chromosomes and chromosome segments in the offspring generations. Monitoring these was achieved by using a molecular cytogenetic method, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in our research. FISH karyotypes of all the three genomes of the amphiploid were developed using repetitive DNA

segments widely used in wheat research (pSc119.2, Afa-family, pTa71) as probes. Due to their chromosome specific patterns, all the seven G, seven A^t and seven A^m chromosome pairs could be distinguished from each other. In addition, the G genome of the hexaploid *T. timococcum* could clearly be distinguished from the two A genomes with the help of multicolour genomic *in situ* hybridization (mcGISH) optimised during our research work. As a result of our research, introgressed alien chromosomes were clearly discriminated in the wheat genetic background of the offspring generations resulting from the wheat prebreeding program based on *T. timococcum* and *T. timopheevii*.

One of the most important aims of our prebreeding program is the introgression into bread wheat of disease resistance genes of *T. timopheevii*, associated with the least possible amount of alien chromatin; this was ensured with a back cross (BC) procedure. Altogether three procedures for transferring *T. timopheevii* chromatin into bread wheat were used: 1) a direct cross with a *T. timopheevii* genotype (MVGB845); 2) a cross with a hexaploid *T. timococcum* amphiploid developed as bridge material for alien gene transfer; 3) a cross with a leaf rust resistant 6G disomic addition wheat line as bridge material. As a first step, monosomic chromosome substitutions were induced through these crossings, where one part of a wheat chromosome pair was substituted with a chromosome of *T. timopheevii*, or rarely einkorn, homoeologues. Translocations are expected in these hybrids due to selfing and the further back-crossing planned in the near future.

In addition to launching this prebreeding work with three directions, differences were also found in the crossing ability with bread wheat of the tetraploid *T. timopheevii* and the hexaploid *T. timococcum*. Based on our results, crossing *T. timopheevii* with bread wheat almost doubled seed set compared to the hybridization carried out at the hexaploid level.

Artificial leaf rust inoculation was used to examine the leaf rust resistance of the seedlings of BC plant material developed with using *T. timopheevii* and *T. timococcum*. This resulted in the identification of plants showing immunity or a hypersensitive reaction to leaf rust in more than 50% of the BC plants examined. After a propagation cycle, examination of the leaf rust resistant BC₂ (*T. timopheevii*) and BC₃ (*T. timococcum*) plants based on crossings with the wheat genotype *T. aestivum* 'Mv9kr1' will be continued in field tests.

A *T. timopheevii* cytoplasm-based hybrid wheat breeding program was also initiated, where *T. timopheevii* × *T. aestivum* and *T. timococcum* × *T. aestivum* hybrids were developed in order to provide cytoplasmic male sterile wheat lines based on varieties from Martonvásár.

Plants carrying a 6B/6G monosomic substitution were developed from the crossing of the 6G disomic addition wheat line and *T. aestivum* 'Rannaja' 6B monosomic wheat line (MVGS1117), which was shown using FISH.

8 MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ABUGALIEVA A.I., SAVIN T.V., CAKMAK I., KOZHAHMETOV K.K., SULEYMENOVA M.S., SHEGEBAYEV G.O., YERZHEBAYEVA R.S. (2011): A wild relative to improve wheat nutrition attributes. In: AMIRASLANOV A., MUSAYEV A., AKPAROV Z. (Szerk.): *International conference on diversity, characterization and utilization of plant genetic resources for enhanced resilience to climate change – Abstracts*. Baku, 2011.10.03-04., *Elm Poliqrafiya Mərkəzində*, 151-152. p.
- AGARWAL M., SHRIVASTAVA N., PADH H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 27 617-631. p.
- ALLARD R.W. (1949): A cytogenetic study dealing with transfer of genes from *Triticum timopheevii* to common wheat by backcrossing. *J Agr Res*, 78 33-64. p.
- ALLARD R.W., SHANDS R.G. (1954): Inheritance of resistance to stem rust and powdery mildew in cytologically stable spring wheats derived from *Triticum timopheevii*. *Phytopathology*, 44 266-274. p.
- BADAEVA E.D., BADAEV N.S., ENNO T.M., ZELLER F.J., PEUSHA H.O. (1995): Chromosome substitution in progeny of hybrids *Triticum aestivum* x *Triticum timopheevii*, resistant to brown rust and powdery mildew. *Russ J Genet*, 31 75-77. p.
- BADAEVA E.D., BADAEV N.S., GILL B.S., FILATENKO A.A. (1994b): Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum*. *Plant Syst Evol*, 192(1) 117-145. p.
- BADAEVA E.D., BUDASHKINA E.B., BILINSKAYA E.N., PUKHALSKIY V.A. (2010): Intergenomic chromosome substitutions in wheat interspecific hybrids and their use in the development of a genetic nomenclature of *Triticum timopheevii* chromosomes. *Russ J Genet*, 46 769-785. p.
- BADAEVA E.D., DEDKOVA O.S., GAY G., PUKHALSKIY V.A., ZELENIN A.V., BERNARD S., BERNARD M. (2007): Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*, 50 907-926. p.
- BADAEVA E.D., FILATENKO A.A., BADAEV N.S. (1994a): Cytogenetic investigation of *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. and related species using the C-banding technique. *Theor Appl Genet*, 89 622-628. p.
- BADAEVA E.D., PROKOFIEVA Z.D., BILINSKAYA E.N., OBOLENKOVA L.A., SOLOMATIN D.A., ZELENIN A.V., PUKHALSKIY V.A. (2000): Cytogenetic analysis of hybrids resistant to yellow rust and powdery mildew obtained by crossing common wheat

- (*Triticum aestivum* L., AABBDD) with wheats of the Timopheevi group (A¹A¹GG). *Russ J Genet*, 36(12) 1663-1673. p.
- BADAEVA E.D., SHKUTINA F.M., BOGDEVICH I.N., BADAEV N.S. (1986): Comparative study of *Triticum aestivum* and *T. timopheevii* genomes using C-banding techniques. *Plant Syst Evol*, 154 183-194. p.
- BAHL P.N., MAAN S.S. (1973): Chromosomal location of fertility-restoring genes in six lines of common wheat. *Crop Sci*, 13 317-320. p.
- BAI G.H., SHANER G. (2004): Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu Rev Phytopathol*, 42 135-161. p.
- BEDBROOK J., JONES J., O'DELL M., THOMPSON R.D., FLAVELL R.B. (1980): A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*, 19 525-560. p.
- BEDŐ Z., BALLA L., SZUNICS L., LÁNG L., KRAMARIKNÉ KISSIMON J. (1993): A martonvásári 1B/1R transzlokációs búzafajták agronómiai tulajdonságai. *Növénytermelés*, 40 79-87. p.
- BEIJERINCK N.W. (1884): Über die Bastarde zwischen *Triticum monococcum* × *Triticum dicoccum*. *Nederl Krüt Arch*, XI. 4 p.
- BELEA A. (1986): Faj- és nemzetségkeresztezések a növényvilágban. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 235 p.
- BELEA A., VÖRÖSVÁRY G., HOLLY L. (2005): Fajkeresztezések az alakor (*Triticum monococcum*) és más búzafajok között (*Triticum* spp.). *Növénytermelés*, 54 101-109. p.
- BELEA A., FEJÉR O. (1980): Evolution of wheat (*Triticum* L.) in respect to recent research. *Acta Agron Hung*, 20 306-315. p.
- BENNETT F.G.A. (1984): Resistance to powdery mildew in wheat: a review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathology*, 33 279-300. p.
- BENNETT M.D., KALTSIKES P.J. (1973): The duration of meiosis in a diploid rye, a tetraploid wheat and the hexaploid triticale derived from them. *Can J Genet Cytol*, 15 671-679. p.
- BERTIN I., FISH L., FOOTE T. N., KNIGHT E., SNAPE J., MOORE G. (2009): Development of consistently crossable wheat genotypes for alien wheat gene transfer through fine-mapping of the *Kr1* locus. *Theor Appl Genet*, 119 1371-1381. p.
- BLAKESLEE A.F., AVERY A.G. (1937): Methods for inducing doubling chromosomes in plants by treatment with colchicine. *J Hered*, 28 393-411. p.
- BLARINGHAM L. (1914): Sur la production d'hybrides entre l'Engrain (*T. monococcum* L.) et différents Blés cultivés. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 346-349. p.

- BÓNA L. (2004): Triticale in Hungary. 119-121. p. In: MERGOUM M., GÓMEZ-MACPHERSON H. (szerk.): *Triticale improvement and production*. [Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.] (Plant Production and Protection Paper 179.) 154 p.
- BORRINO E.M., POWELL W. (1988): Stomatal guard cell length as an indicator of ploidy in microspore-derived plants of barley. *Genome*, 30(2) 158-160. p.
- BRANDOLINI A., HIDALGO A., MOSCARITOLO S. (2008): Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour. *J Cereal Sci*, 47 599-609. p.
- BROWN-GUEDIRA G.L., BADAIEVA E.D., GILL B.S., COX T.S. (1996): Chromosome substitutions of *Triticum timopheevii* in common wheat and some observations on the evolution of polyploid wheat species. *Theor Appl Genet*, 93 1291-1298. p.
- BROWN-GUEDIRA G.L., SINGH S., FRITZ A.K. (2003): Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum*. *Phytopathology*, 93 784-789. p.
- CAI X., CHEN P.D., XU S.S., OLIVER R.E., CHEN X. (2005): Utilization of alien genes to enhance Fusarium head blight resistance in wheat – A review. *Euphytica*, 142 309-318. p.
- CAO W., ARMSTRONG K., FEDAK G. (2000): A synthetic zhukovskyi wheat. *Wheat Inf Serv*, 91 30-32. p.
- CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G.E., KUDYNOWSKI J., MODEST E.J., SIMONSSON E., WAGH U., ZECH L. (1968): Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*, 49 219-222. p.
- CASTAGNA R., BORGHI B., HEUN M., SALAMINI F. (1996): Integrated approach to einkorn wheat breeding. 183-192. p. In: PADULOSI S., HAMMER K., HELLER J. (Szerk.): *Hulled wheats*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 263 p.
- CHANG K.D., FANG S.A., CHANG F.C., CHUNG M.C. (2010): Chromosomal conservation and sequence diversity of ribosomal RNA genes of two distant *Oryza* species. *Genomics*, 96 181–190. p.
- CHANTRET N., SOURDILLE P., RÖDER M., TAVAUD M., BERNARD J.M., DOUSSINAULT G. (2000): Location and mapping of the powdery mildew resistance gene *MIRE* and detection of a resistance QTL by bulked segregant analysis (BSA) with microsatellites in wheat. *Theor Appl Genet*, 100 1217-1224. p.
- CHARMET G. (2011): Wheat domestication: Lessons for the future. *CR Biol*, 334 212-220. p.

- CHEN P.D., TSUJIMOTO H., GILL B.S. (1994): Transfer of *Ph¹* genes promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat. *Theor Appl Genet*, 88 97-101. p.
- CIFFERI R. (1955): The first interspecific wheat hybrids. *J Hered*, 46(2) 81-83. p.
- CONTENTO A., HESLOP-HARRISON J. S., SCHWARZACHER T. (2005): Diversity of a major repetitive DNA sequence in diploid and polyploid *Triticeae*. *Cytogenet Genome Res*, 109 34-42. p.
- CUADRADO A., CARDOSO M., JOUVE N. (2008): Physical organisation of simple sequence repeats (SSRs) in *Triticeae*: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenet Genome Res*, 120 210-219. p.
- D'AGOSTINO R.B., BELANGER A., D'AGOSTINO R.B. JR. (1990): A suggestion for using powerful and informative tests of normality. *Am Stat*, 44(4) 316-321. p.
- DAKOURI A., MCCALLUM B.D., RADOVANOVIC N., CLOUTIER S. (2013): Molecular and phenotypic characterization of seedling and adult plant leaf rust resistance in a world wheat collection. *Mol Breeding*, 32 663-677. p.
- DAVOYAN R.O., TERNOVSKAYA T.K. (1996): Use of a synthetic hexaploid *Triticum miguschovae* for transfer of leaf rust resistance to common wheat. *Euphytica*, 89 99-102. p.
- DEVOS K. M., DUBCOVSKY J., DVORAK J., CHINOY C. N., GALE M. D. (1995): Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination. *Theor Appl Genet*, 91 282-288. p.
- DOBROVOLSKAYA O.B., SURDII P., BERNARD M., SALINA E.A. (2009): Chromosome synteny of the A genome of two evolutionary wheat lines. *Russ J Genet*, 45(11) 1368-1375. p.
- DOEBLEY J. F., GAUT B.S., SMITH B.D. (2006): The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127 1309-1321. p.
- DOIG R.I., DONE A.A., ROGERS D.F. (1975): Pre-harvest sprouting in bread wheat (*Triticum aestivum*) as influenced by cytoplasmic male-sterility derived from *T. timopheevi*. *Euphytica*, 24 229-232. p.
- DRISCOLL C.J. (1975): First compendium of wheat–alien chromosome lines. *Ann Wheat Newslet*, 21 16-32. p.
- DVORAK J. (1972): Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting homoeologous pairing in wheat. *Can J Genet Cytol*, 14 371-380. p.
- DVORAK J. (1983): The origin of wheat chromosomes 4A and 4B and their genome reallocation. *Can J Genet Cytol*, 25 210-214. p.
- DVORAK J., APPELS R. (1982): Chromosome and nucleotide sequence differentiation in genomes of polyploid *Triticum* species. *Theor Appl Genet*, 63 349-360. p.

- DVORAK J., ZHANG H.B. (1990): Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(24) 9640-9644. p.
- DYCK P.L. (1992): Transfer of a gene for stem rust resistance from *Triticum araraticum* to hexaploid wheat. *Genome*, 35 788-792. p.
- DYCK P.L., KERBER E.R. (1970): Inheritance in hexaploid wheat of adult-plant leaf rust resistance derived from *Aegilops squarrosa*. *Can J Genet Cytol*, 12 175-180. p.
- EMPILI S., CASTAGNA R., BRANDOLINI A. (2000): Morpho-agronomic variability of the diploid wheat *Triticum monococcum* L. *Plant Genet Resour Newslet*, 124 36-40. p.
- ENDO T.R. (1988): Induction of chromosomal structural changes by a chromosome of *Aegilops cylindrica* L. in common wheat. *J Hered*, 79 366-370. p.
- ENGERT N., HONERMEIER B. (2011): Characterization of grain quality and phenolic acids in ancient wheat species (*Triticum* sp.). *J Appl Bot Food Qual*, 84 33-39. p.
- EUROPEAN WHEAT DATABASE: <http://genbank.vurv.cz/ewdb/>. Lekérdezés: 2015.09.29.
- FAO (2010): The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 370 p.
- FARIS J.D., FELLERS J.P., BROOKS S.A., GILL B.S. (2003): A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus *Q* in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics*, 164 311-321. p.
- FARSHADFAR M. (1995): Transfer of alien genes from wild species into wheat (*Triticum aestivum* L.). Ph.D. Thesis. Gödöllő: Hungarian Academy of Sciences. 112 p.
- FARSHADFAR M., MOLNÁR-LÁNG M., SUTKA J. (1994): The crossability of different wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes with *Triticum timopheevi* Zhuk. under two types of conditions. *Cereal Res Commun*, 22 15-20. p.
- FEDAK G., CAO W., HAN F., SAVARD M., GILBERT J., XUE A. (2004): Germplasm enhancement for FHB resistance in spring wheat through alien introgression. In: CANTY S.M., BORING T., VERSDAHL K., WARDWELL J., WARD R.W. (Szerk.): *Proceedings of the 2nd international symposium on Fusarium head blight*. Orlando, 2004.12.11-15., Michigan State University, 56-57. p.
- FEDAK G., KIM N.S. (2008): Tools and methodologies for cytogenetic studies of plant chromosomes. *Cyt Genet*, 42 189-203. p.
- FELDMAN M. (1966): Identification of unpaired chromosomes in F1 hybrids involving *T. aestivum* and *T. timopheevii*. *Can J Genet Cytol*, 8 144-151. p.

- FELDMAN M. (1988): Cytogenetic and molecular approaches to alien gene transfer in wheat. In: MILLER T.E., KOEBNER R.M.D. (Szerk.): *Proceedings of the 7th International Wheat Genetics Symposium*. Cambridge, 1988.07.13-19., Cambridge University Press, 23-32. p.
- FELDMAN M., LEVY A.A. (2005): Allopolyploidy: a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenet Genome Res*, 109 250-258. p.
- FELDMAN M., LEVY A.A. (2009): Genome evolution in allopolyploid wheat—a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. *J Genet Genomics*, 36 511-518. p.
- FELDMAN M., LIU B., SEGAL G., ABBO S., LEVY A.A., VEGA J.M. (1997): Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, 147 1381-1387. p.
- FRIEBE B., JIANG J., RAUPP W.J., McINTOSH R.A., GILL B.S. (1996): Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*, 71 59-87. p.
- FRIEBE B., ZHANG P., LINC G., GILL B.S. (2005): Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenet Genome Res*, 109 293-297. p.
- GALE M.D., MILLER T.E. (1987): The introduction of alien genetic variation into wheat. 173-210. p. In: LUPTON F.G.H. (Szerk.): *Wheat breeding: Its scientific basis*. [London: Chapman and Hall Ltd.] (Tertiary Level Biology) 566 p.
- GALIBA G., TÓTH B. (2006): A búzagének térképezése: molekuláris markerek és kvantitatív tulajdonságokért felelős kromoszóma régiók (QTLs). 44-56. p. In: DUDITS D. (Szerk.): *A búza nemesítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft., 334 p.
- GALL J.G., PARDUE M.L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63(2) 378-383. p.
- GERLACH W.L., BEDBROOK J.R. (1979): Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res*, 7 1869–1885. p.
- GERLACH W.L., MILLER T.E., FLAVELL R.B. (1980): The nucleolus organizers of diploid wheats revealed by *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet*, 58 97-100. p.
- GIAMBANELLI E., FERIOLI F., KOÇAOĞLU B., JORJADZE M., ALEXIEVA I., DARBINYAN N., D'ANTUONO L.F. (2013): A comparative study of bioactive compounds in primitive wheat populations from Italy, Turkey, Georgia, Bulgaria and Armenia. *J Sci Food Agric*, 93 3490-3501. p.
- GILL B.S., CHEN P.D. (1987): Role of cytoplasm-specific introgression in the evolution of the polyploid wheats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(19) 6800-6804. p.

- GILL B.S., LI W., SOOD S., KURAPARTHY V., FRIEBE B. R., SIMONE K.J., ZHANG Z., FARIS J. D. (2007): Genetics and genomics of wheat domestication-driven evolution. *Isr J Plant Sci*, 55 223–229. p.
- GILL B.S., WAINES J.G. (1978): Parental regulation of seed development in wheat hybrids. *Theor Appl Genet*, 51 270-295. p.
- GILL R.S., DHALIWAL H. S., MULTANI D. S. (1988): Synthesis and evaluation of *Triticum durum* –*T. monococcum* amphiploids. *Theor Appl Genet*, 75 912–916. p.
- GIORGI D., FARINA A., GROSSO V., GENNARO A., CEOLONI C., LUCRETTI S. (2013): FISHIS: fluorescence *in situ* hybridization in suspension and chromosome flow sorting made easy. *PLoS One* 8(2) e57994. DOI: 10.1371/journal.pone.0057994
- GOLOVNINA K.A., GLUSHKOV S.A., BLINOV A.G., MAYOROV V.I., ADKISON L.R., GONCHAROV N.P. (2007): Molecular phylogeny of the genus *Triticum* L.. *Plant Syst Evol*, 264 195-216. p.
- GONCHAROV N.P., BANNIKOVA S.V., KAWAHARA T. (2007): Wheat artificial amphiploids involving the *Triticum timopheevii* genome: their studies, preservation and reproduction. *Genet Resour Crop Ev*, 54 1507-1516. p.
- GONCHAROV N.P., GOLOVNINA K.A., KONDRATENKO E.Y. (2009): Taxonomy and molecular phylogeny of natural and artificial species. *Breeding Sci*, 59(5) 492-498. p.
- GORDEEVA E.I., LEONOVA I.N., KALININA N.P., SALINA E.A., BUDASHKINA E.B. (2009): Comparative cytological and molecular analysis of common wheat introgression lines containing genetic material of *Triticum timopheevii*. *Russ J Genet*, 45(12) 1428-1437. p.
- GUSTAFSON P., RASKINA O., MA X., NEVO E. (2009): Wheat evolution, domestication, and improvement. 5-30. p. In: CARVER B.F. (Szerk.): *Wheat science and trade*. Ames (USA): Wiley-Blackwell, 569 p.
- HAMMER K., FILATENKO A.A., PISTRICK K. (2011): Taxonomic remarks on *Triticum* L. and \times *Triticosecale* Wittm.. *Genet Resour Crop Ev*, 58 3-10. p.
- HAMMER K., NEUMANN M., KISON H.U. (1996): Pre-breeding work on einkorn-Cooperation between genebank and breeders. 200-204. p. In: PADULOSI S., HAMMER K., HELLER J. (Szerk.): *Hulled wheats*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 263 p.
- HAN F., FEDAK G., GUO, W., LIU B. (2005): Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids. *Genetics*, 170 1239-1245. p.
- HART H. (1943): Stem rust on *Triticum timopheevi*. *Phytopathology*, 33 335-337. p.

- HERNANDEZ P., MARTIS M., DORADO G., PFEIFER M., GÁLVEZ S., SCHAAF S., JOUVE N., ŠIMKOVÁ H., VALÁRIK M., DOLEŽEL J., MAYER K.F.X. (2012): Next-generation sequencing and syntenic integration of flow-sorted arms of wheat chromosome 4A exposes the chromosome structure and gene content. *Plant J*, 69 377-386. p.
- HESZKY L. (1970): Fajkeresztevések a *Lolium* és *Festuca* nemzetségeken belül és a nemzetségek között. I. A nemzetséghibridek vizsgálata. *Agrobotanika*, 12 71-86. p.
- HEUN M., HALDORSEN S., VOLLAN K. (2008): Reassessing domestication events in the Near East: Einkorn and *Triticum urartu*. *Genome*, 51 444-451. p.
- HORVÁTHNÉ UHRIN A. (2013): Őszi búza × *Triticum timopheevii* hibrid utódainak jellemzése. Doktori (Ph.D) értekezés. Gödöllő: Szent István Egyetem. 148 p.
- HUANG S., SIRIKHACHORNKIT A., SU X., FARIS J., GILL B., HASELKORN R., GORNICKI P. (2002): Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(12) 8133-8138. p.
- HUSSIEN T., BOWDEN R.L., GILL B.S., COX T.S. (1998): Chromosomal locations in common wheat of three new leaf rust resistance genes from *Triticum monococcum*. *Euphytica*, 101 127-131. p.
- HUTCHINSON J., MILLER T.E. (1982): Comparison of the chromosomes of *Triticum timopheevii* with related wheat using the techniques of C-banding and *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet*, 64 31-40. p.
- JAKOBSON I., PEUSHA H., TIMOFEJEVA L., JÄRVE K. (2006): Adult plant and seedling resistance to powdery mildew in a *Triticum aestivum* × *Triticum militinae* hybrid line. *Theor Appl Genet*, 112 760-769. p.
- JAKOBSON I., REIS D., TIIDEMA A., PEUSHA H., TIMOFEJEVA L., VALÁRIK M., KLADIVOVÁ M., ŠIMKOVÁ H., DOLEŽEL J., JÄRVE K. (2012): Fine mapping, phenotypic characterization and validation of non-race-specific resistance to powdery mildew in a wheat-*Triticum militinae* introgression line. *Theor Appl Genet*, 125 609-623. p.
- JÄRVE K., JAKOBSON I., ENNO T. (2002): Tetraploid wheat species *Triticum timopheevii* and *Triticum militinae* in common wheat improvement. *Acta Agron Hung*, 50 463-477. p.
- JÄRVE K., PEUSHA H.O., TSYMBALOVA J. (2000): Chromosomal location of a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat. *Genome*, 43 377-381. p.
- JAUHAR P.P. (2003): Formation of 2n gametes in durum wheat haploids: Sexual polyploidization. *Euphytica*, 133 81-94. p.

- JIANG J., GILL B.S. (1994a): New 18S·26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. *Chromosoma*, 103 179-185. p.
- JIANG J., GILL B.S. (1994b): Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats, *Chromosome Res*, 2 59–64. p.
- JIANG J., GILL B.S. (1994c): Non-isotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome*, 37 105-111. p.
- JIN Y., PRETORIUS Z.A., SINGH R.P. (2007): New virulence within race TTKS (Ug99) of the stem rust pathogen and effective resistance genes. *Phytopathology*, 97 (Special Issue) S137. p.
- JØRGENSEN J.H., JENSEN C.J. (1972): Genes for resistance to wheat powdery mildew in derivatives of *Triticum timopheevi* and *T. carthlicum*. *Euphytica*, 21 121-128. p.
- KATTERMANN G. (1938): Über konstante, halmbehaarte Stämme aus Weizenroggenbastardierung mit 2n=42 Chromosomen. *Z Indukt Abstamm Vererbungs L*, 74 354-375. p.
- KEPHART S.R. (1990): Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Am J Bot*, 77 693-712. p.
- KHAZAEI H., MONNEVEUX P., HONGBO S., MOHAMMADY S. (2010): Variation for stomatal characteristics and water use efficiency among diploid, tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces. *Genet Resour Crop Evol*, 57 307-314. p.
- KILIAN B., MAMMEN K., MILLET E., SHAMA R., GRANER A., SALAMINI F., HAMMER K., ÖZKAN H. (2007): *Aegiplos*. 1-76. p. In: KOLE C. (Szerk.): *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources – Cereals*. [New York: Springer.] (Wild crop relatives: Genomic and breeding resources) 497 p.
- KILIAN B., ÖZKAN H., POZZI C., SALAMINI F. (2009): Domestication of the *Triticeae* in the Fertile Crescent. 81-90. p. In: FEUILLET C., MUEHLBAUER G.J. (Szerk.): *Genetics and Genomics of the Triticeae*. [New York: Springer.] (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 7.) 757 p.
- KIMBER G., SALLEE P.J. (1976): A hybrid between *Triticum timopheevii* and *Hordeum bogdanii*. *Cereal Res Commun*, 4(1) 33-37. p.
- KISS Á. (1968): *Triticale*, a homok új gabonája. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 179 p.
- KISS Á., RÉDEI GY. (1952): Kísérletek búza-rozs hibridek (*Triticale*) előállítására. *Növénytermelés*, 1 67-84. p.
- KNÜPFER H. (2009): *Triticeae* genetic resources in *ex situ* genebank collections. 31-80. p. In: FEUILLET C., MUEHLBAUER G.J. (Szerk.): *Genetics and Genomics of the Triticeae*. [New York: Springer.] (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 7.) 757 p.

- KOLMER J., CHEN X., JIN Y. (2009): Diseases which challenge global wheat production – the wheat rusts. 89-124. p. In: CARVER B.F. (Szerk.): *Wheat science and trade*. Ames (USA): Wiley-Blackwell, 569 p.
- KOMÁROMI J., VIDA G., PUSKÁS K., SZUNICS L., VEISZ O. (2006): Identification of wheat genotypes with adult plant resistance to powdery mildew. *Cereal Res Commun*, 34(2-3) 1051-1058. p.
- KOMÁROMI J., ZENGYAN Z., DE PACE C., VEISZ O., VIDA G., (2014): *Dasypyrum villosum* eredetű lisztharmat-rezisztencia beépítése martonvásári búzafajtákba markerszelekcióval. In: Veisz O. (Szerk.): *Növénynevelés a megújuló mezőgazdaságban: XX. Növénynevelési Tudományos Nap*. Budapest, 2014.03.18., MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Tudományos Bizottsága, 249-253. p.
- KOMUGI – Wheat Genetic Resources Database. *National BioResource Project*, Japan:
<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/quickSearchAction.do>. Lekérdezés: 2015.10.25.
- KOSTOV D. (1936): Investigation of polyploid plants. XI. Amphiploid *T. timopheevii* Zhuk. × *T. monococcum* L.. *Dokl Acad Sci*, 1 32-36. p.
- KOVÁCS G., MEGYERI M., MIKÓ P., RAKSZEGI M., LÁNG L. (2012): Organic breeding of einkorn (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum*): Development of semi-dwarf variety and its possible use in evolutionary plant breeding. In: BEDŐ Z., LÁNG L. (Szerk.): *Proceedings of the 19th EUCARPIA General Congress*. Budapest, 2012.05.21-24., Agricultural Institute, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, 444. p.
- KŐSZEGI B., LINC G., JUHÁSZ A., LÁNG L., MOLNÁR-LÁNG M. (2000): Occurrence of the 1RS/1BL wheat-rye translocation in Hungarian wheat varieties. *Acta Agron Hung*, 48 227-236. p.
- KRUPPA K., SZAKÁCS É., SEPSI A., LÁNGNÉ MOLNÁR M. (2012): Az *Agropyron glael* és búza×*A. glael* hibrid utódvonalak genom-összetételének vizsgálata mcGISH technikával. In: VEISZ O. (Szerk.): *XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok – Összefoglalók*. Budapest, 2012.03.06., MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Bizottsága, Magyar Növénynevelők Egyesülete, MAE Genetikai Szakosztálya, 41. p.
- LAIKOVA L.I., ARBUZOVA V.S., EFREMOVA T.T., POPOVA O.M. (2004): Resistance to fungi diseases in hybrid progenies from crosses between common wheat variety Saratovskaya 29 on amphidiploid *Triticum timopheevii/Triticum tauschii* (AAGGDD). *Russ J Genet*, 40 1046-1050. p.
- LÁNG L., BEDŐ Z. (2006): A hazai búzanemesítés stratégiai jelentősége. 19-25. p. In: DUDITS D. (Szerk.): *A búza nemesítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft., 334 p.

- LÁNGNÉ MOLNÁR M. (2006): Idegen fajú addíciók, szubsztitúciók és transzlokációk létrehozása a búzában. 33-43. p. In: DUDITS D. (Szerk.): *A búza nemesbítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft., 334 p.
- LÁNGNÉ MOLNÁR M., KŐSZEGI B., LINC G., SUTKA J. (1996): Búza (*Triticum aestivum* L.)/ *Triticum timopheevii* Zhuk. addíció, szubsztitúció és búza/rozs transzlokáció kimutatása C-sávozással és *in situ* hibridizációval. *Növénytermelés*, 45 237-245. p.
- 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. p.
- LEIN A. (1943): Die Genetische Grundlage der Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. *Z Induct Abstamm Vererbungsl*, 81 28-61. p.
- LEITCH A.R., SCHWARZACHER T., JACKSON D., LEITCH I.J. (1994): *In situ* hybridization: a practical guide. Oxford: Bios Scientific Publishers. 118 p.
- LEONOVA I.N., BÖRNER A., BUDASHKINA E.B., KALININA N.P., RÖDER M.S., SALINA E.A. (2004): Identification of microsatellite markers for leaf rust resistance gene introgressed into common wheat from *Triticum timopheevii*. *Plant Breeding*, 123 93-95. p.
- LEONOVA I.N., BUDASHKINA E.B., FLATH K., WEIDNER A., BÖRNER A., RÖDER M.S. (2010): Microsatellite mapping of a leaf rust resistance gene transferred to common wheat from *Triticum timopheevii*. *Cereal Res Commun*, 38 211-219. p.
- LEONOVA I.N., BUDASHKINA E.B., KALININA N.P., RÖDER M.S., BÖRNER A., SALINA E.A. (2011): *Triticum aestivum*-*Triticum timopheevii* introgression lines as a source of pathogen resistance genes. *Czech J Genet Plant Breed*, 47 (Special Issue) S49-S55. p.
- LEVAN A. (1938): Effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*, 24 471-486. p.
- LI W., GILL B.S. (2006): Multiple genetic pathways for seed shattering in the grasses. *Funct Integr Genomics*, 6 300–309. p.
- LI X., ZHANG Y., GAO L., WANG A., JI K., HE Z., APPELS R., MA W., YAN Y. (2007): Molecular cloning, heterologous expression and phylogenetic analysis of a novel y-type HMW glutenin subunit gene from G genome of *Triticum timopheevi*. *Genome*, 50 1130-1140. p.
- LINC G., FRIEBE B.R., KYNAST R.G., MOLNÁR-LÁNG M., KŐSZEGI B., SUTKA J., GILL B. (1999): Molecular cytogenetic analysis of *Aegilops cylindrica* Host.. *Genome*, 42 497-503. p.

- LINC G., LÁNGNÉ MOLNÁR M. (2003): Búza/árpa diszómás addíciók előállítása őszibúza-fajtákban kétféle módszerrel és azonosításuk molekuláris citogenetikai technikákkal. *Növénytermelés*, 52 3-13. p.
- LINC G., SEPSI A., MOLNÁR-LÁNG M. (2012): A FISH karyotype to study chromosome polymorphisms for the *Elytrigia elongata* E genome. *Cytogenet Genome Res*, 136 138-144. p.
- LIU B., SEGAL G., RONG J.K., FELDMAN M. (2003): A chromosome-specific sequence common to the B genome of polyploid wheat and *Aegilops searsii*. *Plant Syst Evol*, 241 55-66 p.
- LIU S., GRIFFEY C.A., SAGHAI MAROOF M.A. (2001): Identification of molecular markers associated with adult plant resistance to powdery mildew in common wheat cultivar Massey. *Crop Sci*, 41 1268-1275. p.
- LONGIN C.F.H., MÜHLEISEN J., MAURER H.P., ZHANG H., GOWDA M., REIF J.C. (2012): Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theor Appl Genet*, 125 1087-1096. p.
- 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. p.
- LUKASZEWSKI A.J. (2000): Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci*, 40(1) 216-225. p.
- MA H., HUGHES G.R. (1995): Genetic control and chromosomal location of *Triticum timopheevii*-derived resistance to *Septoria nodorum* blotch in durum wheat. *Genome*, 38 332-338. p.
- MA H., SINGH R.P., MUJEEB-KAZI A. (1997): Resistance to stripe rust in durum wheats, A-genome diploids, and their amphiploids. *Euphytica*, 94 279-286. p.
- MAESTRA B., NARANJO T. (1999): Structural chromosome differentiation between *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* and *T. aestivum*. *Theor Appl Genet*, 98 744-750. p.
- MASÁR Š., BOJNANSKÁ K., GUBIŠ J., PASTIRČÁK M. (2010): Recurrent and simple selection of wheat hybrids partially resistant to *Fusarium culmorum*. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, 56(3) 84-89. p.
- MATSUOKA Y., NASUDA S. (2004): Durum wheat as a candidate for the unknown female progenitor of bread wheat: an empirical study with a highly fertile F1 hybrid with *Aegilops tauschii* Coss. *Theor Appl Genet*, 109 1710-1717. p.
- MAXWELL J.J., LYERLY J.H., COWGER C., MARSHALL D., BROWD-GUEDIRA G., MURPHY J.P. (2009): *MLAG12*: a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene in common wheat on chromosome 7AL. *Theor Appl Genet*, 119 1489-1495. p.
- McFADDEN E.S., SEARS E.R. (1946): The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J Hered*, 37 107-116. p.

- McINTOSH R.A. (1983): Genetic and cytogenetic studies involving *Lr18* for resistance to *Puccinia recondita*. In: SAKAMOTO S. (Szerk.): *Proceedings of the 6th International Wheat Genetics Symposium*. Kyoto, 1983.11.28-12.03., Maruzen Co. Ltd., 777-783. p.
- McINTOSH R.A. (1988): Catalogue of gene symbols for wheat. In: MILLER T.E., KOEBNER R.M.D. (Szerk.): *Proceedings of the 7th International Wheat Genetics Symposium*. Cambridge, 1988.07.13-19., Cambridge University Press, 1225-1323. p.
- McINTOSH R.A., BAKER E.P. (1970): Cytogenetical studies in wheat IV. Chromosome location and linkage studies involving the *Pm2* locus for powdery mildew resistance. *Euphytica*, 19 71-77. p.
- McINTOSH R.A., DYCK P.L. (1975): Cytogenetical studies in wheat VII. Gene *Lr23* for reaction to *Puccinia recondita* in Gabo and related cultivars. *Aust J Biol Sci*, 28 201-212. p.
- McINTOSH R.A., GYARFAS J. (1971): *Triticum timopheevii* as a source of resistance to wheat stem rust. *Z Pflanzenzücht*, 66 240-248. p.
- McINTOSH R.A., WELLINGS C.R., PARK R.F. (1995): Wheat rusts: An atlas of resistance genes. Melbourne: CSIRO Australia, 205 p.
- MEGYERI M. (2014): Génbanki *Triticum monococcum* tételek molekuláris citogenetikai elemzése és kiaknázása a búzanemesítés számára. Doktori (Ph.D) értekezés. Gödöllő: Szent István Egyetem. 116 p.
- MEGYERI M., FARKAS A., VARGA M., KOVÁCS G., MOLNÁR-LÁNG M., MOLNÁR I. (2012): Karyotypic analysis of *Triticum monococcum* using standard repetitive DNA probes and simple sequence repeats. *Acta Agron Hung*, 60(2) 87-95. p.
- MEGYERI M., MIKÓ P., MOLNÁR I., KOVÁCS G. (2011): Development of synthetic amphiploids based on *Triticum turgidum* × *T. monococcum* crosses to improve the adaptability of cereals. *Acta Agron Hung*, 59 267-274. p.
- MENTEWAB A., REZANOOR H.N., GOSMAN N., WORLAND A.J., NICHOLSON P. (2000): Chromosomal location of Fusarium head blight resistance genes and analysis of the relationship between resistance to head blight and brown foot rot. *Plant Breeding*, 119 15-20. p.
- MESTERHÁZY Á. (2006): A kalászfuzárium-rezisztens fajták jelentősége az egészségkímélő élelmiszerek megteremtésében. 259-284. p. In: DUDITS D. (Szerk.): *A búza nemesítésének tudomány. A funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft., 334 p.
- MIKÓ P., MEGYERI M., FARKAS A., MOLNÁR I., MOLNÁR-LÁNG M. (2015): Molecular cytogenetic identification and phenotypic description of a new synthetic amphiploid, *Triticum timococcum* (A^tA^tGGA^mA^m). *Genet Resour Crop Evol*, 62(1) 55-66. p.

- MIKÓ P., MEGYERI M., MOLNÁR-LÁNG M., KOVÁCS G. (2013): Characterization of *Triticum timopheevii* Zhuk. gene bank accessions for the development of synthetic amphiploid wheat lines. *Acta Agron Hung*, 61(2) 113-121. p.
- MILLER T.E., HUTCHINSON J., READER C.M. (1983): The identification of the nucleolar organizer chromosomes of diploid wheat. *Theor Appl Genet*, 65 145–147. p.
- MOLNÁR I., BENAVENTE E., MOLNÁR-LÁNG M. (2009): Detection of intergenomic chromosome rearrangements in irradiated *Triticum aestivum* – *Aegilops biuncialis* amphiploids by multicolour genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 52 156-165. p.
- MOLNÁR I., CIFUENTES M., SCHNEIDER A., BENAVENTE E., MOLNÁR-LÁNG M. (2011): Association between simple sequence repeat-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. *Ann Bot*, 107 65–76. p.
- MOLNÁR I., KUBALÁKOVÁ M., ŠIMKOVÁ H., FARKAS A., CSEH A., MEGYERI M., VRÁNA J., MOLNÁR-LÁNG M., DOLEŽEL J. (2014): Flow cytometric chromosome sorting from diploid progenitors of bread wheat, *T. urartu*, *Ae. speltoides* and *Ae. tauschii*. *Theor Appl Genet*, 127 1091-1104. p.
- MOLNÁR I., LINC G., DULAI S., NAGY E.D., MOLNÁR-LÁNG M. (2007): Ability of chromosome 4H to compensate for 4D in response to drought stress in a newly developed and identified wheat-barley 4H(4D) disomic substitution line. *Plant Breeding*, 126 369-374. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., CSEH A., SZAKÁCS É., MOLNÁR I. (2010): Development of a wheat genotype combining the recessive crossability alleles *kr1kr1kr2kr2* and the 1BL.1RS translocation, for the rapid enrichment of 1RS with new allelic variation. *Theor Appl Genet*, 120 1535-1545. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., KRUPPA K., CSEH A., BUCSI J., LINC G. (2012): Identification and phenotypic description of new wheat- six-rowed winter barley disomic additions. *Genome*, 55(4) 302-311. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., D.NAGY E., SCHNEIDER A., MOLNÁR I. (2002): Molecular cytogenetic analysis of wheat-alien hybrids and derivatives. *Acta Agron Hung*, 50 303-311. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., FRIEBE B.R., SUTKA J. (2000b): Detection of wheat-barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro*. *Euphytica*, 112 117-123. p.
- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., LOGOJAN A., SUTKA J. (2000a): Production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) × winter barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, 43 1045-1054. p.

- MOLNÁR-LÁNG M., LINC G., SUTKA J. (1996): Transfer of the recessive crossability allele *kr1* from Chinese Spring into the winter wheat variety Martonvásári 9. *Euphytica*, 90 301-305. p.
- MONNEVEUX P., ZAHARIEVA M., REKIKI D. (2000): The utilization of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. 71-81. p. In: ROYO C., NACHIT M., DI FONZO N., ARAUS J.L. (Szerk.): *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges*. Zaragoza, 2000.04.12., CIHEAM, 620 p.
- MOORE G. (2005): How to date the correct partner? – Role of the *Ph1* locus. 49-57. p. In: TSUNEWAKI K. (Szerk.) *Frontiers of Wheat Bioscience. The 100th Memorial Issue of Wheat Information Service*. Yokohama: Kihara Memorial Foundation For the Advancement of Life Sciences, 256 p.
- MUJEEB-KAZI A., HETTEL G. P. (1995): Utilizing wild grass biodiversity in wheat improvement: 15 years of wide cross research at CIMMYT. [Mexico: CIMMYT.] (CIMMYT Research Report No. 2) 140 p.
- MUKAI Y., NAKAHARA Y., YAMAMOTO M. (1993): Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolour fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, 36 489-494. p.
- NAGAKI K., TSUJIMOTO H., ISONO K., SASAKUMA T. (1995): Molecular characterization of a tandem repeat, Afa family, and its distribution among *Triticeae*. *Genome*, 38 479-486. p.
- NATH J., THOMPSON J.P., GULATI S.C. (1983): Identification of the G-genome donor *Triticum timopheevii* by DNA:DNA hybridizations. *Biochem Genet*, 23 125-137. p.
- NESBITT M., SAMUEL D. (1996): From stable crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats. 41-100. p. In: PADULOSI S., HAMMER K., HELLER J. (Szerk.): *Hulled wheats*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 263 p.
- NOVER I. (1958): Sechsjährige Beobachtungen über die physiologische Spezialisierung des echten Mehltaus (*Erysiphe graminis* DC.) von Weizen und Gerste in Deutschland. *Phytopathologische Zeitschrift*, 31 85-107. p.
- O'MARA J.G. (1940): Cytogenetic studies on triticales. I. A method for determining the effects of individual *Secale* chromosomes on *Triticum*. *Genetics*, 25(4) 401-408. p.
- OGIHARA T., TSUNEWAKI K. (1988): Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theor Appl Genet*, 76 321-332. p.
- OZKAN H., LEVY A.A., FELDMAN M. (2001): Alloploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell*, 13 1735-1747. p.

- PATTERSON F.L., GALLUN R.L., ROBERTS J.J. (1974): Registration of Arthur wheat. *Crop Sci*, 14 910. p.
- PATTERSON F.L., GALLUN R.L., ROBERTS J.J., FINNEY R.E. (1975): Registration of Arthur 71 and Abe wheat. *Crop Sci*, 15 736. p.
- PEDERSEN C., LANGRIDGE P. (1997): Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome*, 40 589-593. p.
- PEDERSEN C., RASMUSSEN S.K., LINDE-LAURSEN I. (1996): Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the *Triticeae* (*Poaceae*) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome*, 39 93-104. p.
- PENG J.H., SUN D., NEVO E. (2011): Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol Breeding*, 28 281-301. p.
- PERUGINI L.D., MURPHY J.P., MARSHALL D., BROWN-GUEDIRA G. (2008): *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii*. *Theor Appl Genet*, 116 417-425. p.
- PEUSHA H.O., ENNO T.M., PRIILINN O. (1996): Genetic analysis of disease resistance in wheat hybrids, derivatives of *Triticum timopheevii* and *Triticum militinae*. *Acta Agron Hung*, 44 237-244. p.
- PLAMENOV D., BELCHEV I., KIRYAKOVA V., SPETSOV P. (2009): Fungal resistance of *Triticum durum* –*T. monococcum* ssp. *aegilopoides* amphiploid. *J Plant Dis Protect*, 116 60-62. p.
- PRETORIUS Z.A., SINGH R.P., WAGOIRE W.W., PAYNE T.S. (2000): Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr36* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Phytopathology*, 84 203. p.
- PRIDHAM J. T. (1939): A successful cross between *Triticum vulgare* and *Triticum timopheevii*. *J Aust Inst Sci*, 5 160-161. p.
- PURNHAUSER L. (2006): Molekuláris markerek a rezisztenciagének nyomon követéséhez. 289-299. p. In: DUDITS D. (Szerk.): *A búza nemesítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft., 334 p.
- PURNHAUSER L., BÓNA L., LÁNG L. (2011): Occurrence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation and of *Sr36/Pm6* resistance gene in wheat cultivars registered in Hungary. *Euphytica*, 179 287-295. p.
- PUSKÁS K. (2013): Búza genotípusok kalászfuzárium-ellenállósága és a rezisztencia genetikai hátterének vizsgálata. Doktori (Ph.D) értekezés. Gödöllő: Szent István Egyetem. 142 p.

- PUSKÁS K., VARGA-LÁSZLÓ E., VEISZ O., VIDA G., (2014): Búza kalászfuzárium-rezisztenciaforrások azonosítása kalászkainjektálásos inokulációs módszerrel. In: Veisz O. (Szerk.): *Növénynevelés a megújuló mezőgazdaságban: XX. Növénynevelési Tudományos Nap*. Budapest, 2014.03.18., MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Tudományos Bizottsága, 369-373. p.
- RAI B., TAKAHASHI H., KATO K., SATO Y., NAKAMURA I. (2012): Single-copy nuclear *PolA1* gene sheds light on the origin of S genome with relationships to B and G genomes of polyploid wheat species. *Genet Resour Crop Evol* 59 1713-1726. p.
- RAJHÁTHY T. (1954): Genetic investigation of interspecific wheat hybrids. *Acta Agron Hung*, 4 203-237. p.
- RAJHÁTHY T. (1955): Faj- és nemzetségkeresztezések. 271-323. p. In: LELLEY J., RAJHÁTHY T. (Szerk.): *A búza és nevelése*. Budapest: Akadémiai Kiadó. 544 p.
- RAYBURN A.L., GILL B.S. (1985): Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered*, 76 78-81. p.
- RAYBURN A.L., GILL B.S. (1986): Molecular identification of the D genome chromosomes of wheat. *J Hered*, 77 253-255. p.
- RILEY R., CHAPMAN V. (1958): Genetic control of cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature*, 182 713-715. p.
- RILEY R., CHAPMAN V. (1967): The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genet Res*, 9 259-267. p.
- RILEY R., CHAPMAN V., KIMBER G. (1959): Genetic control of chromosome pairing in intergeneric hybrids with wheat. *Nature*, 183 1244-1246. p.
- RILEY R., KIMBER G. (1966): The transfer of alien genetic variation to wheat. *Annual Report of Plant Breeding Institute Cambridge*, 6-36. p.
- RILEY R., LAW C.N. (1965): Genetic variation in chromosome pairing. *Adv Genet*, 13 57-114. p.
- ROBERTS M.A., READER S.M., DALGLIESH C., MILLER T.E., FOOTE T.N., FISH L.J., SNAPE J.W., MOORE G. (1999): Induction and characterisation of *Ph1* wheat mutants. *Genetics*, 153 1909-1918. p.
- RODRÍGUEZ S., PERERA E., MAESTRA B., DÍEZ M., NARANJO T. (2000): Chromosome structure of *Triticum timopheevii* relative to *T. turgidum*. *Genome*, 43 923-930. p.
- SAKAMURA T. (1918): Kurze Mitteilung über die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der *Triticum*-Arten. *Bot Mag*, 32 151-154. p.

- SALAMINI F., OZKAN H., BRANDOLINI A., SCHAFER-PREGL R., MARTIN W. (2002): Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nat Rev Genet*, 3 429-441. p.
- SALINA E.A., LEONOVA I.N., EFREMOVA T.T., RÖDER M.S. (2006): Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. *Funct Integr Genomics*, 6 71-80. p.
- SÁNCHEZ-MORÁN E., BENAVENTE E., ORELLANA J.(2001): Analysis of karyotypic stability of homoeologous-pairing (ph) mutants in allopolyploid wheats. *Chromosoma*, 110(5) 371-377. p.
- SARKAR P., STEBBINS G.L. (1956): Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am J Bot*, 43 297-304. p.
- SCHNEIDER A., LINC G., MOLNÁR I., MOLNÁR-LÁNG M. (2005): Molecular cytogenetic characterization of *Aegilops biuncialis* and its use for the identification of five derived wheat/*Aegilops biuncialis* disomic addition lines. *Genome*, 48 1070-1082. p.
- SCHNEIDER A., LINC G., MOLNÁR-LÁNG M. (2003): Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) polymorphism with two repetitive DNA clones (pAs1, pSc119.2) in different wheat cultivars. *Plant Breeding*, 122 396-400. p.
- SCHWARZACHER T. (2003): DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome*, 46 953-962. p.
- SCHWARZACHER T. (2009): Fluorescent *in situ* hybridization to detect transgene integration into plant genomes. 227-246. p. In: JONES H.D., SHEWRY P.R. (Szerk.): *Transgenic Wheat, Barley and Oats. Production and Characterization Protocols*. [New York: Humana Press.] (Methods in Molecular Biology. Springer Protocols 478.) 349 p.
- SCHWARZACHER T., ANAMTHAWAT-JONSON K., HARRISON G. E., ISLAM A., JIA J.Z., KING I. P., LEITCH A. R., MILLER T. E., READER S. M., ROGERS W. J., SHI M., HESLOP-HARRISON J.,S. (1991): Genome *in situ* hybridization to identify alien chromosome segments in wheat. *Theor Appl Genet*, 84 778-786. p.
- SCHWARZACHER T., LEITCH A.R., BENNETT M.D., HESLOP-HARRISON J.S. (1989): *In-situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot*, 64 315-324. p.
- SEARS E.R. (1953): Nullisomic analysis in common wheat. *Am Nat*, 87 245-252. p.
- SEARS E.R. (1976): Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Ann Rev Genet*, 10 31-51. p.
- SEARS E.R. (1977): An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can J Genet Cytol*, 19 585-593. p.

- SEARS E.R. (1981): Transfer of alien genetic material to wheat. 75-89. p. In: EVANS L.T., PEACOCK W.J. (Szerk.): *Wheat science – Today and Tomorrow*. Cambridge: Cambridge University Press, 290 p.
- SEPSI A., MOLNÁR I., SZALAY D., MOLNÁR-LÁNG M. (2008): Characterization of a leaf rust resistant wheat–*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1 using sequential multicolor GISH and FISH. *Theor Appl Genet*, 116 825-834. p.
- SHANDS H., KIMBER G. (1973): Reallocation of the genomes of *Triticum timopheevii* Zhuk. In: SEARS E.R., SEARS L.M.S. (Szerk.): *Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium*. Columbia (USA), 1973.08.01-06., *University of Missouri Press*, 101-108. p.
- SHANDS R.G. (1941): Disease resistance of *Triticum timopheevii* transferred to common winter wheat. *Am Soc Agron Jour*, 33 709-712. p.
- SHARMA H.C. (1995): How wide can a wide cross be? *Euphytica* 82 43-64. p.
- SHARMA H.C., GILL B.S. (1983): Current status os wide hybridization in wheat. *Euphytica*, 32 17-31. p.
- SHARP P.J., KREIS M., SHEWRY P.R., GALE M.D. (1988): Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor Appl Genet*, 75 286-290. p.
- SHCHERBAN A.B., KHLESTKINA E.K., SALINA E.A. (2004): Analysis of the DNA marker specific to the wheat G genome. *Russ J Genet*, 40(3) 288-294. p.
- SHEPHERD K.W., ISLAM A.K.M.R. (1981): Wheat:barley hybrids – the first eighty years. 107-128. p. In: EVANS L.T., PEACOCK W.J. (Szerk.): *Wheat science – Today and Tomorrow*. Cambridge: Cambridge University Press, 290 p.
- SHI A.N., LEATH S. MURPHY J.P. (1998): A major gene for powdery mildew resistance transferred to common wheat from wild einkorn wheat. *Phytopathology*, 88 144-147. p.
- SHULEMBAYEVA K.K., TOKUBAYEVA A.A. (2014): Genetic analysis of resistance to leaf rust in introgressive lines obtained by interspecific hybridization. *Int J Biol Chem*, 7(1) 33-35. p.
- SINGH D., PARK R.F., MCINTOSH R.A. (2001): Inheritance of seedling and adult plant resistance to leaf rust of selected Australian spring and English winter wheat varieties. *Plant Breeding*, 120 503-507. p.
- SINGH S.K., CHATRATH R., MISHRA B. (2010): Perspective of hybrid wheat research: a review. *Indian J Agric Sci*, 80 1013-1027. p.
- SINGH S.P., SRIVASTAVA R., KUMAR J. (2015): Male sterility systems in wheat and opportunities for hybrid wheat development. *Acta Physiol Plant*, 37 1713-1725. p.

- SINHA P., TOMAR S.M.S., VINOD, SINGH V.K., BALYAN H.S. (2013): Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene *Rf8* for *Triticum timopheevi* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Genetica*, 141 431-441. p.
- SIRRKA A.T. I., VARUGHESE W.H., PFEIFFER W. H., MUJEEB-KAZI A. (1993): Crossability of tetraploid and hexaploid wheats with ryes for primary triticale production. *Euphytica*, 65 203-210. p.
- SITCH L.A., SNAPE J.W., FIRMAN S.J. (1985): Intrachromosomal mapping of crossability genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet*, 70 309-314. p.
- SNAPE J.W., CHAPMAN V., MOSS J., BLANCHARD C.E., MILLER T.E. (1979): The crossability of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. *Heredity*, 42 291-298. p.
- SORMACHEVA I., GOLOVNINA K., VAVILOVA V., KOSUGE K., WATANABE N., BLINOV A., GONCHAROV N.P. (2015): *Q* gene variability in wheat species with different spike morphology. *Genet Resour Crop Evol*, 62 837-852. p.
- STAKMAN E.C., STEWART D.M., LOEGERING W.Q. (1962): Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Washington DC: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service E617. 53 p.
- STEBBINS G.L. (1947): Types of polyploids: their classification and significance. *Adv Genet*, 1 403-420. p.
- STOJAŁOWSKI S., BOBROWSKA A., HANEK M., MYŚKÓW B. (2013): The importance of chromosomes from the sixth homeologic group in the restoration of male fertility in winter triticale with *Triticum timopheevii* cytoplasm. *J Appl Genet*, 54 179-184. p.
- STOYANOV H.P. (2014): Analysis and assessment of amphiploids of *Triticum-Aegilops* group as a source of genetic diversity. *Bulg J Agric Sci*, 20 173-178. p.
- SUTKA J. (2004): Növényi citogenetika. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 232 p.
- SZAKÁCS É., MOLNÁR-LÁNG M. (2010): Identification of new winter wheat – winter barley addition lines (6HS and 7H) using fluorescence *in situ* hybridization and the stability of the whole ‘Martonvásári 9 kr1’ – ‘Igri’ addition set. *Genome*, 53 35-44. p.
- SZUNICS L., SZUNICS L. (1970): A búzalisztharmat fiziológiai specializációja. *Növényvédelem*, 6 558-562. p.
- SZUNICS L., SZUNICS L. (2010): Rezisztencia vizsgálatok búzanemesítési tenyészkertekben. Martonvásár: Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézet. 286 p.
- TABACHNICK B.G., FIDELL L.S. (2013): Using Multivariate Statistics (6th Edition). Boston: Pearson. 1024 p.

- TAKAHASHI H., RAI B., KATO K., NAKAMURA I. (2010): Divergent evolution of wild and cultivated subspecies of *Triticum timopheevii* as revealed by the study of *PolA1* gene. *Genet Resour Crop Ev*, 57 101-109. p.
- TIMONOVA E.M., LEONOVA I.N., RÖDER M.S., SALINA E.A. (2012): Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome. *Mol Breeding*, 31 123-136. p.
- TISCHNER T., KÖSZEGI B., VEISZ O. (1997): Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron Hung*, 45 85-104. p.
- TIXIER M.H., SOURDILLE P., CHARMET G., GAY G., JABY C., CADALEN T., BERNARD S., NICOLAS P., BERNARD M. (1998): Detection of QTLs for crossability in wheat using a doubled-haploid population. *Theor Appl Genet*, 97 1076-1082. p.
- TOMAR S.M.S., KOCHUMADHAVAN M., NAMBISAN P.N.N. (1988): Evaluation of *timopheevi* wheats for resistance to rusts and powdery mildew. *Indian J Genet*, 48 69-73. p.
- TRETHOWAN R.M., VAN GINKEL M. (2009): Synthetic wheat – An emerging genetic resource. 369-385. p. In: CARVER B.F. (Szerk.): *Wheat science and trade*. Ames (USA): Wiley-Blackwell, 569 p.
- TSUNEWAKI K. (2009): Plasmon analysis in the *Triticum-Aegilops* complex. *Breeding Sci*, 59 455-470. p.
- TYRYSHKIN L.G., GASHIMOV M.E., KOLESOVA M.A., ANPHILOVA N.A. (2006): Juvenile resistance to diseases in samples of *Triticum* L. species from VIR World Collection. *Cereal Res Commun*, 34(2-3) 1073-1079. p.
- UHRIN A., SZAKÁCS É., LÁNG L., BEDŐ Z., MOLNÁR-LÁNG M. (2012): Molecular cytogenetic characterization and SSR marker analysis of a leaf rust resistant wheat line carrying a 6G(6B) substitution from *Triticum timopheevii* (Zhuk.). *Euphytica*, 186 45-55. p.
- UNRAU J., PERSON C., KUSPIRA J. (1956): Chromosome substitution in hexaploid wheat. *Can J Bot*, 34 629-640. p.
- UPADHYA M.D., SWAMINATHAN M.S. (1963): Genome analysis in *Triticum zhukovskyi*, a new hexaploid wheat. *Chromosoma*, 14 589-600. p.
- VALKOUN J., KUCEROVA D., BARTOS P. (1989): Transfer of a new gene for stem rust resistance from *T. monococcum* L. to hexaploid wheat, *T. aestivum* L.. *Proceedings of the Agricultural Department, Czechoslovakian Academy of Sciences – Genetic and Breeding (Sbornik ÚVTIZ – Genetika a Šlechtění)*, 25 209-214. p.
- VAN SLAGEREN M.W. (1994): Wild wheats: A monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub and Spach) Eig (*Poaceae*). *Wageningen Agricultural University Papers*, 513 p.

- VIDA G., CSÉPLŐ M., GULYÁS G., KARSAI I., KISS T., KOMÁROMI J., LÁSZLÓ E., PUSKÁS K., WANG Z.L., DE PACE C., BEDŐ Z., LÁNG L., VEISZ O. (2011): Effectiveness of major resistance genes and identification of new sources for disease resistance in wheat. *Acta Agron Hung*, 59 241-248. p.
- VIDA G., GÁL M., UHRIN A., VEISZ O., SYED N.H., FLAVELL A.J., WANG Z., BEDŐ Z. (2009): Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica*, 170 67-76. p.
- VRÁNA J., KUBALÁKOVÁ M., SIMKOVÁ H., ČÍHALÍKOVÁ J., LYSÁK M.A., DOLEŽEL J. (2000): Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, 156 2033-2041. p.
- WAN Y., WANG D., SHEWRY P.R., HALFORD N.G. (2002): Isolation and characterization of five novel high molecular weight subunit of glutenin genes from *Triticum timopheevi* and *Aegilops cylindrica*. *Theor Appl Genet*, 104 828-839. p.
- WANG R.R.C., LU B. (2014): Biosystematics and evolutionary relationships of perennial *Triticeae* species revealed by genomic analyses. *J Syst Evol*, 52 (6) 697-705. p.
- WATSON I.A., LUIG N.H. (1958): Timvera - A Steinwedel × *Triticum timopheevi* derivative. *Agron J*, 50 644. p.
- WHITFORD R., FLEURY D., REIF J.C., GARCIA M., OKADA T., KORZUN V., LANGRIDGE P. (2013): Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production. *J Exp Bot*, 64(18) 5411-5428. p.
- WILSON J.A., ROSS W.M. (1962): Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevii* cytoplasm. *Wheat Inf Serv*, 14 29-30. p.
- XU S.S., DUNDAS I.S., PUMPHREY M.O., JIN Y., FARIS J.D., CAI X., QI L.L., FRIEBE B.R., GILL B.S. (2008): Chromosome engineering to enhance utility of alien-derived stem rust resistance. 12-15. p. In: APPELS R., EASTWOOD R., LAGUDAH E., LANGRIDGE P., MACKAY M., MCINTYRE L., SHARP P. (Szerk.): *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium*. Brisbane, 2008.08.24-29., *Sydney University Press*, 12-15. p.
- ZHANG M.Y., WANG K., WANG S.L., LI X.H., ZELLER F.J., HSAM S.L.K., YAN Y.M. (2010): Molecular cloning, function prediction and phylogenetic analysis of LMW glutenin subunit genes in *Triticum timopheevii* (Zhuk.). *Plant Breeding*, 129 622-629. p.
- ZHEBRAK A. (1944): Synthesis of new species of wheats. *Nature*, 153(3888) 549-551. p.
- ZHENG Y., LUO M., YEN C., YANG J. (1992): Chromosome location of a new crossability gene in common wheat. *Wheat Inf Serv*, 75 36-40. p.

- ZHOU W., KOLB F.L., DOMIER L.L., WANG S. (2005): SSR markers associated with fertility restoration genes against *Triticum timopheevii* cytoplasm in *Triticum aestivum*. *Euphytica*, 141 33-40. p.
- ZHUKOVSKY P.M. (1923): *Triticum dicoccum* Schrank. *dicoccoides* Körn. in Georgia. *B App Bot Genet Breeding (Труды по Прикладной Ботанике, Генетике и Селекции)*, 13 91-94. p.
- ZHUKOVSKY P.M. (1928): A new species of wheat. *B App Bot Genet Breeding (Труды по Прикладной Ботанике, Генетике и Селекции)*, 19 59-66. p.
- ZOHARY D. (1999): Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genet Resour Crop Evol*, 46 133-142. p.
- ZOHARY D., HOPF M., WEISS E. (2012): Domestication of plants in the Old World. Oxford: Oxford University Press. 264 p.
- ZOSHCHUK S.A., BADAIEVA E.D., ZOSHCHUK N.V., ADONINA I.G., SHCHERBAN A.B., SALINA E.A. (2007): Intraspecific divergence in wheats of the Timopheevi group as revealed by *in situ* hybridization with tandem repeats of the Spelt1 and Spelt52 families. *Russ J Genet*, 43(6) 771-788. p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetének, hogy biztosította azokat a szellemi, tárgyi és anyagi feltételeket, amelyek elengedhetetlenek voltak a PhD kutatómunkám elvégzéséhez. Ezért a segítségért és a bizalomért kiemelt köszönetemet fejezem ki a kutatóközpont volt és jelenlegi főigazgatójának, Dr. Bedő Zoltán és Dr. Balázs Ervin akadémikusoknak.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Lángné dr. Molnár Mártának, és az intézet organikus nemesítési kutatásait megalapító, 2012-ben elhunyt, egykori génbank kurátornak, Dr. Kovács Gézának, akik 2010-ben meglátták bennem a kutatót, és pályafutásomat elindították, támogatták.

Köszönettel tartozom a Kalászos Gabona Nemesítési Osztály volt és jelenlegi vezetőjének, Dr. Láng Lászlónak és Dr. Vida Gyulának a szántóföldi kísérletek kivitelezéséhez nélkülözhetetlen infrastruktúra biztosításáért, valamint a nemesítéshez és a rezisztenciavizsgálatokhoz nyújtott szakmai segítségükért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Megyeri Máriának a kutatói életbe való beilleszkedéshez és a mindennapi munkámhoz nyújtott önzetlen segítségéért. Köszönet illeti meg közvetlen munkatársaimat, akik nagy segítséget jelentettek a kísérletek kivitelezésében. Bencze Ágnesnek, Miklósi Dórának és Timár Gergelynek külön köszönöm áldozatos munkáját, ahogy azt a nyugdíjas éveiket töltő Lévay Józsefnek és Kiss György Gyulánénak is, akik a munkám kezdeti lépéseit segítették. A Génmegőrzési Osztály munkatársainak pedig köszönöm, hogy a molekuláris citogenetikával és az idegen fajú keresztezésekkel kapcsolatos ismereteiket megosztották velem. A teljesség igénye nélkül szeretném kiemelni közülük Dr. Molnár István és Farkas András kollégáimat a laboratóriumi munkámhoz adott tanácsaikért, segítségükért.

Köszönet illeti meg a Kalászos Gabona Nemesítési Osztály munkatársait, akik segítettek a szántóföldi és üvegházi munkáimat. Külön köszönöm Dr. Jankovics Tündének, Komáromi Juditnak és Dr. Puskás Katalinnak, hogy segítségük révén a rezisztenciakutatás gyakorlati ismereteit is elsajátíthattam.

Köszönöm családomnak, hogy mindig mellettem állnak, szeretetükkel és támogatásukkal segítik pályafutásomat. Feleségemtől, Spirk Hajnalkától kapott szeretet mindig erőt és megnyugtató háttérrel biztosít a mindennapi munkámhoz, ezért neki és fiunknak, Dánielnek is külön köszönettel tartozom.

Az alábbi kutatási pályázatok nélkül nem valósulhatott volna meg a PhD kutatómunkám, mivel ezek biztosították a kísérletek kivitelezéséhez és a konferencia-látogatásokon keresztüli szakmai fejlődésemhez szükséges anyagi források jelentős részét:

- TECH_08-A3/2-2008-0423 – ALKOBEEER (2008-2014): Organikus egészségvédő alakor sörfélék kifejlesztése és gyártása
- TECH_08-A3/2-2008-0397 – CONFU_08 (2009-2014): Célorientált organikus nemesítés felhasználása új, magas minőségű organikus tejtermékek kifejlesztésére
- EU FP7-KBBE 245058 – SOLIBAM (2010-2014): Strategies for Organic and Low-input Integrated Breeding and Management; és annak kiegészítő pályázata (EU_BONUS_12-1-2012-0032)
- AGR_P1AC_13-1-2013-0074 (2013-2016): Régi búza genotípusok minőségének jellemzése és felhasználása a piacorientált nemesítésben