

**SZIMBIOTIKUS NITROGÉNKÖTÉSSEN
ÉS LEVÉLFEJLŐDÉSSEN HIBÁS LUCERNA
MUTÁNSOK GENETIKAI ANALÍZISE**

Ph.D. értekezés
tézisei



Készítette: Endre Gabriella

MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézete, 1997

Témavezető: Dr. Kiss György Botond

Kutatócsoportunk a genetikai térképezésen alapuló génizolálási megközelítést alkalmazza a lucerna molekuláris biológiai kutatásában. Ehhez a munkához kiindulásként rendelkezésünkre álltak megfelelő (szimbiotikus nitrogénkötésben hibás, illetve morfológiai) lucerna mutánsok, és az általunk megszerkesztett genetikai térkép.

Genetikai megközelítés: térképezésen alapuló génizolálás

A különböző biológiai funkciók molekuláris hátterének felderítésében igen jelentős szerepe van a genetikai vizsgálatoknak. A molekuláris biológiai technikák forradalmasították a prokarióta szervezeteknél lényegesen bonyolultabb eukarióta szervezetek genetikai analízisét is. Az így azonosított DNS markerek nemcsak „ujjlenyomatként” szolgálhatnak bizonyos egyedek azonosításánál vagy besorolásánál (pl. molekuláris taxonómia, evolúció), hanem öröklődésük követésével részletes kapcsoltsági, genetikai térképek szerkeszthetők.

A korábbi, ún. klasszikus genetikai térképezés során a természetben előforduló morfológiai változatok, polimorfizmusok öröklődését követték nyomon és határozták meg kapcsoltságukat. Ezen morfológiai markerek azonban csak igen korlátozott számban álltak rendelkezésre, legtöbbször recesszív öröklődésűek voltak, illetve sok esetben a fenotípus nem volt egyértelműen kiértékelhető; egyszerűen hosszadalmas és munkaigényes feladat volt egy-egy ilyen térkép készítése. A génsebészeti módszerek bevezetésével azonban olyan DNS-szintű polimorfizmusokat sikerült kimutatni, amelyek bár nem okoznak morfológiai eltérést, a genom meghatározott szakaszainak változataiként mégis léteztek, öröklődésük követhető volt, vagyis használható genetikai markernek bizonyultak. A DNS markerek nagy számban és egyértelműen azonosíthatók, bármely élőlényre alkalmazhatók (akár „át is vihetők”), tehát segítségükkel aránylag rövid időn belül részletes genetikai térképek készíthetők. Egy másik hatalmas előnyük, hogy az azonosított DNS szakaszok konkrét „bójákat” jelentenek a genomban, s ezáltal lehetővé teszik fontos szerepet játszó, ugyanakkor más módszerrel nehezen megközelíthető gének klónozását. Ezt a térképezésen alapuló génklónozási stratégiát már *Arabidopsis* növényen is eredményesen alkalmazták.

A genetikai térképezésen alapuló génklónozás (*map-based cloning*) többféle technikát is felsorakoztat, egymásra épülő lépései a következők:

- a vizsgált biológiai funkcióban hibás, megfelelő mutáns fenotípus azonosítása, öröklődésének meghatározása
- a mutáció helyének meghatározása a kapcsoltsági térképen
- a régió telítése molekuláris markerekkel, szorosan kapcsolt markerek keresése

- a szomszédos markerek genetikai távolságának minél pontosabb meghatározása
- a mutációhoz (a keresett génhez!) legközelebbi molekuláris markerek fizikai távolságának meghatározása
- nagy DNS fragmenteket hordozó genomikus génbank előállítása
- genomsejta, a szomszédos markerektől „elindulva” átfedő klónok azonosítása
- funkcionális komplementációval bizonyítani, hogy a jelölt DNS klónok valamelyike a keresett gént hordozza
- a funkcionális DNS szekvencia molekuláris jellemzése

A vizsgálandó lucerna mutánsok fenotípusa, a mutációk öröklődése

A szimbiotikus lucerna mutáns

Eddig számos, a szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánt írtak le a különböző pillangósvirágú növényekben, a tetraploid *Medicago sativa* növény esetében azonban mindössze öt szimbiotikus mutánsról számoltak be. Közülük négy képes szimbiotikus gümőkialakítására vad típusú *R. meliloti* jelenlétében, ám a folyamat egy későbbi ponton elakad és hatékony nitrogénkötés nem megy végbe - ezek az ún. ineffektív mutánsok. Az ötödik - MnNC-1008(NN), a továbbiakban MN-1008-nak rövidítve - gyökerein azonban a *R. meliloti* baktériumok nem képesek gümőt indukálni, így ez egy gümőképzésben hibás, Nod⁻ mutáns. Keresztezési kísérletekben a szegregációs arányokból azt a következtetést vonták le, hogy ez a tulajdonság két független, egymással nem kapcsolt recesszív gén által meghatározott. Későbbi vizsgálatokban kimutatták, hogy az MN-1008 mutáns *Rhizobium* fertőzésre nem mutatja a legkorábbi növényi válaszreakciókat, vagyis sem gyökérszőr görbülés, sem kéregsejt osztódás kiváltódása nem figyelhető meg. Saját korábbi kísérleteinkben azt is ellenőriztük, hogy *R. meliloti* baktérium tisztított Nod-faktorával történő kezelésre sem mutat gyökérszőr deformációt. Ugyanakkor az is kiderült, hogy ha auxin-analóg 2,4-diklorofenoxiecetsav vegyületet adtunk a táptalajhoz, gümőhöz hasonló kinövések, dudorok keletkeztek a gyökerén ugyanúgy, mint a vad típusú lucerna növényen. A spontán gümőképződést - amit egyébként eddig még csak a lucernán figyeltek meg a pillangósvirágú növények közül - szintén leírták az MN-1008 növényen.

A fenti eredmények azt sugallják, hogy az MN-1008 lucerna mutáns a bakterialis nodulációs jelmolekulák felismerésében vagy a szignáltranszdukciós út egy igen korai szakaszában hibás. Míg a növényben kódolt gümőfejlődési program sértetlenül „végig tud futni” (pl. mesterséges hormonkezelésre), addig a specifikus rhizobialis jelle történő beindítása útja megsérült. Ebből következően az MN-1008 növény igen fontos mutáns, melynek

sokoldalú vizsgálata segíthet a Nod-faktorok által kiváltott specifikus növényi jelfelismerő és -továbbító út korai lépéseinek megértésében. Éppen ezért sokan végeznek különböző biokémiai kísérleteket ezen a növényen, azonban genetikai analíziséhez még mások nem kezdtek hozzá, egyrészt megfelelő háttér (pl. lucerna kapcsoltsági térkép, molekuláris markerek) hiányában, másrészt a tetraploid öröklődés bonyolultsága miatt.

A ragadós levél fenotípus

A lucerna ragadós levél (*sticky leaf*, Stl) elnevezésű, természetes populációban előforduló mutációjának fenotípusát és öröklődési menetét már több mint harminc évvel ezelőtt leírták. A mutáns fenotípus könnyen felismerhető az egymással és önmagukkal is összetapadó levélkékről, melyek feltűnően elütnek a normál, vad típusú sima, egyenes állású levélkéktől. Tetraploid lucernán végzett vizsgálatok a Stl tulajdonság egygénés, recesszív öröklődésére világítottak rá.

A lucerna genetikai térképének elkészítéséhez előállított diploid F2 populációban Stl fenotípusú egyedek megjelenését figyelhettük meg, szintén egygénés, recesszív öröklésmentre utaló szegregálási arányban. Mivel az eredeti keresztezésben részt vevő szülők egyike sem volt mutáns fenotípusú, kérdés volt, hogy melyikük hordozta heterozigóta állapotban a recesszív, mutáns allélt (mely átöröklődött az F1 hibridbe, majd néhány F2 egyedben homozigóta konfigurációba kerülve Stl egyedeket eredményezett). Ennek megállapítására elvégeztük a szülők önbeporzását, s az utódok megmutatták, hogy az apai szülőtől származik a mutáns allél.

Feltételezhető, hogy a Stl fenotípust, vagyis levélmorfológiai elváltozást okozó mutáció egy az egyedfejlődés szabályozásában szerepet játszó gént érintett. Mivel a mutáns fenotípus jól meghatározható, egyértelműen azonosítható bélyeg, melynek megnyilvánulásáért egy recesszív gén felelős, genetikai vizsgálatokra alkalmas. A térképezésen alapuló génizolálás segítségével közelebb juthatunk a sérült funkció feltáráshoz, s ezzel bővíthetjük a növényi egyedfejlődésre vonatkozó molekuláris szintű ismereteinket.

CÉLKITŰZÉSEK

1.) A rendelkezésre álló lucerna szimbiotikus mutánsok közül a gümőképzésre képtelen (Nod⁻) tetraploid MN-1008 jelű növényt választottuk vizsgálatainkhoz. A mutáns fenotípus alapján - a mikroszimbiota partner szignáljára nem indukálódnak be a gümő kialakításához szükséges folyamatok - a mutációban érintett gén(ek) elengedhetetlen funkciót határoz(nak) meg a szimbiózis kialakulásában. A munkafolyamat első részeként a mutáció

térképezéséhez egy szegregáló populáció előállítása szükséges. Egy tetraploid populáción végzett genetikai térképezés azonban a diploidhoz képest nem kétszeres munkát, odafigyelést igényel, hanem - lehet mondani - az allélek kimutatásának, öröklődésük követésének gondjai, problémái meghatványozódnak. Így célul tűztük ki, hogy a Nod⁻ fenotípus térképezéséhez, az MN-1008 mutánsból kiindulva, egy diploid szegregáló populációt állítunk elő.

2.) A másik génizolálási tervünk a lucerna egy levélmorfológiai elváltozását - ragadós levél, *sticky leaf* - okozó mutációt szenvedett génre irányul. A *Stl* recesszív fenotípus a genetikai térkép elkészítéséhez használt diploid lucerna populációban szegregált. A genotípus adatok kiértékelésével a *stl* lokusz a 6-os kapcsoltsági csoportra térképeződött. Mivel ennek a mutációnak a térképhelye már ismert volt, elhatároztuk, hogy a *stl* génen állítjuk be a térképezésen alapuló klónozás lépéseit. A génizolálás érdekében célul tűztük ki, hogy a *stl* lokuszhoz minél szorosabb kapcsoltságú molekuláris markereket azonosítsunk, melyek kiindulási pontként szolgálhatnak a későbbi, a gén izolálásához vezető genomstátához.

EREDMÉNYEK

A tetraploid Nod⁻ lucerna mutánsból a diploid szegregáló populáció előállításáig

Korábbi kísérleti eredmények szerint tetraploid ($2n=4x=32$) lucerna növények diploid kromoszómaszintű ($2n=2x=16$) leszármazottai $4x-2x$ keresztezéssel nyerhetők. A mi kísérleti rendszerünkben a tetraploid ($2n=4x=32$), kék virágú MN-1008 mutáns *M. sativa* virágait poroztuk a diploid ($2n=2x=16$), sárga virágú, gümőképzésre és szimbiotikus nitrogénkötésre képes, vad típusú *M. sativa* ssp. *quasifalcata* k93 (*Mqk93*) növény pollenjeivel. Az önbeporzásból származó tetraploid utódok számának csökkentése érdekében az MN-1008 növény virágait keresztezés előtt alkoholos kezelésnek vetettük alá, hogy saját fertilis pollenjeit eltávolítsuk. A keresztező megporzásokat hozzávetőleg 7000 virágon végeztük el, aminek következtében 72 érett magot gyűjthettünk. E 72 mag közül 22 nem csírázott ki, 24 kicsírázás után nem sokkal, még csíranövényként elpusztult, feltehetőleg extrém aneuploid voltuk, instabil kromoszómáik miatt. 26 magból fejlődött ki életképes, további vizsgálatra alkalmas növény. Ezeknek morfológiai tulajdonságait és növényi tesztben szimbiotikus gümőfejllesztő képességét vizsgáltuk, majd citogenetikai analízis is segített eldönteni, hogy az adott növény melyik utódkategóriába tartozik: 1. tetraploid és triploid hibrid növények; 2. az anyanövény önbeporzásából származó tetraploid utódok; vagy 3. a kívánt diploid leszármazottak közé.

A keresztezésből származó utódpopuláció szimbiotikus tulajdonságait steril körülmények között a szimbiota partner *R. meliloti* baktérium jelenlétében végzett növényi tesztben határoztuk meg. A 26 életképes növény közül hat tudott szimbiotikus gümőt kialakítani (Nod⁺), a többi húsz növény gyökerén nem jelentek meg a gümők (Nod⁻). A gümőképzési, Nod⁺ fenotípus a hibrid utódok jellegzetességei közé tartozik, mivel ezt a tulajdonságot csakis az apai szülőtől örökölhették. E hat növény hibrid voltát támasztotta alá átmeneti, zöld virág színük is, ezen kívül molekuláris szintű, PCR technikán alapuló RAPD módszerrel végzett DNS „ujjlenyomat” (*fingerprint*) mintázatok is. Citogenetika vizsgálattal triploid növényt is azonosítottunk.

A másik húsz növény Nod⁻ fenotípusa és kék színű virágai azt jelezték, hogy ezek genetikai állománya anyai eredetű, de el kellett dönteni, hogy vajon tetraploid vagy diploid kromoszóma készlettel rendelkeznek. A húsból tizenkilenc növény külső megjelenése nem mutatott eltérést a tetraploid szülő felépítésétől sem magasság, sem levélmorfológia vonatkozásában. A fennmaradó egy Nod⁻ növény azonban külső jegyeiben határozottan különbözött a tetraploid lucernától. Feltűnően kisebb méretű levelei és virágai voltak ennek az alacsony növésű utódnak. A levelek alakja szintén eltért a tetraploid növényekétől, és hiányzott a levélszéli fogazottság is. Ezen morfológiai tulajdonságok igen jó megegyezést mutattak a korábban tetraploid lucernavonalak diploid leszármazottaira leírt jellemzőkkel, azt sugallva, hogy ez a növény a tetraploid MN-1008 mutáns diploid származéka lehet. A citogenetikai analízisben e növény minden vizsgált sejtje 16 kromoszómát hordozott, tehát valódi diploid utódnak bizonyult. A perdöntő citogenetikai bizonyíték után a továbbiakban ezt a növényt **DN-1008** névvel jelöltük, utalva mind a ploidiafokára (diploid), mind a szülői tetraploid Nod⁻ lucernára (MN-1008).

A térképezéshez kívánatos diploid F₂ populációt egy megfelelő hibrid növény önbeporzásával nyerhetjük. A diploid hibrid F₁ növény származhat „hagyományos” úton, két diploid növény, az előző kísérletből kapott Nod⁻ fenotípusú DN-1008 és egy vad típusú, Nod⁺ lucerna keresztezéséből; de előállíthatjuk egy - szintén a már ismertetett 4x-2x keresztezésből származó - triploid növény diploid vad típusú lucernával történő keresztezésével is.

Mivel a DN-1008 növény a tetraploid MN-1008 mutáns genomjának redukálásával keletkezett, így homozigóta a feltételezett *nod* recesszív allélekre, ahogy ezt szimbiotikus fenotípusa is jelzi. Az F₁ hibrid előállításához a vad típusú, sárga virágú diploid *Mqk93* egyedet választottuk keresztező partnerül, hisz ez a növény a lucerna genetikai térképének megszerkesztéséhez használt szegregáló populációban is szerepelt szülőként, ami a későbbi térképezésnél előnyt jelenthet. A DN-1008 növény anyai szülőként fertilisnek bizonyult: az *Mqk93* növény pollenjével végzett porzást követően magkezdemények jelentek meg a diploid Nod⁻ növényen. Bár a magképződés határfoka alacsonynak bizonyult (kb. 1 %), eddig hét

magot gyűjthettünk, amelyek közül három csírázott ki. Ezek leveléből még fiatal növények korukban DNS-t tisztítottunk, és RAPD DNS-ujlenyomat, valamint gén-specifikus PCR kísérletekben igazoltuk hibrid voltukat. Így tehát ezek a növények, amennyiben önmegtermékenyítésre képesek, alkalmasak lehetnek a kívánt F2 szegregáló populáció előállítására. Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy a DN-1008 növény a tetraploid genom egy egyedi redukciós eseményével keletkezett, mely során a kapott allél-kombinációk (pl. letális vagy csökkent életképességet meghatározó allélek diploid heterozigóta állapotba kerülése) befolyásolhatják a keresztezése után kapott utódok számát, életképességét. Előfordulhat tehát, hogy ily módon nem tudunk megfelelő egyedszámú életképes diploid szegregáló populációt létrehozni. Éppen ezért triploid hibrideken keresztül is próbálunk diploid F1 növényt előállítani. A tetraploid MN-1008 és diploid lucerna keresztezéséből származó triploid utódnövényt kereszteztük az *Mqk93* növényvel. A triploid anyanövényekről összesen 67 érett magot gyűjtöttünk, melyek közül 57 (85%) csírázott ki. A csírázást követően további 24 egyed még növények korában kipusztult, 33 él és növekszik. Ezek közül 17 már elérte a virágzást, önbeporzásukat megkezdtük. Azt, hogy ezen utódok között ott található-e a kívánt genotípusú heterozigóta allélkonfigurációjú diploid egyed, még nem tudjuk. Az eddig vizsgált 16 egyed mindegyike diploidnak bizonyult, ami növeli annak esélyét, hogy a várt kromoszóma (allél) összetételű növény is keletkezett. Ha találunk olyan diploid egyedet, melynek önbeporzott utódai között a *Nod⁻* fenotípus szegregál, rendelkezni fogunk a térképezésére alkalmas populációval.

A szimbiotikus nitrogénkötésben hibás, Nod⁻ fenotípusért felelős gének térképezésén alapuló klónozásában még a kezdeteknél járunk. Már az is „genetikai előmunkákat” igényelt, hogy megfelelő diploid szegregáló populációt állíthassunk elő, a gének térképezése csak ezután következhetett. Egy másik, levélmorfológiai elváltozást okozó, egygénés mutáció helye már ismert volt a diploid lucernán korábban végzett térképezési munka révén. A mutációt szenvedett gén térképezésén alapuló izolálásának folyamatában következő lépésként telíteni kellett az adott kromoszóma régiót molekuláris markerekkel annak érdekében, hogy a mutáció helyéhez, tehát a génhez minél szorosabban kapcsolt, a kromoszómasátához kiindulási pontul szolgáló markert találjunk.

A *stl* régió finomtérképezése

A ragadós levél (*sticky leaf*, *Stl*) fenotípus recesszív tulajdonságként jelent meg a térképező F2 populáció egyedei között. Az egygénés öröklődésmentű morfológiai bélyeg a lucerna genetikai térképén a 6-os kapcsoltsági csoportra (LG6) térképeződött az UO553 és

OPB20A markerek közé 3.1, illetve 13.5 cM távolságra. A kezdeti adatok ismeretében elkezdhattuk ezen kromoszómális régió molekuláris markerekkel történő telítését, a *stl* lokuszhoz szorosan kapcsolt markerek kiválasztásához.

A kapcsolt markerek keresésének hatékonyságát növelendő, az ún. *Bulked Segregant Analysis*, szabadon fordítva kupacolásos módszerrel kezdtünk a *stl* lokusz közelébe RAPD markereket gyűjteni. Ennek lényege, hogy a PCR reakciókban a primerek tesztelése a kérdéses régióban ellentétes homozigóta genotípusú egyedek DNS-ének kupacolásával (ún. kupac-templáttal) két csőben elvégezhető az egyedi reakciók sokasága helyett. Így azok a markerek, melyek nagy valószínűséggel a régióba térképeződnek a két reakcióban kifejeződő eltérő amplifikációs mintázatuk (fragment jelenléte, ill. hiánya) alapján azonosíthatók.

Első lépésben a régióban homozigóta genotípusú egyedeket kellett kiválogatnunk. Ebben nagy segítségünkre volt a lucerna szintérképe, ahol a különböző genotípusokat eltérő színek jelzik. A hatékony kupac - tesztelésben fontos tényező a kupacok egyedszáma, illetve -összetétele. Az egyedek összességének biztosítása kell azt, hogy csakis a kérdéses kromoszóma szakaszra „nyit homozigóta ablakot”, a genom többi részén mindkét szülői allél jelen van (heterozigóta). Ugyanakkor túl sok egyed együttes jelenléte sem kívánatos, mert ekkor a PCR reakciókban (feltételezhetően kompetíció miatt) megsokasodhatnak az al-polimorfizmust mutató markerek, melyek valójában a kérdéses régió kívül helyezkednek el. A szintérkép használatával azonban minimálisra tudtuk szorítani a két kupacba kerülő egyedek számát, mivel a genom teljes hosszán könnyedén ellenőrizhettük az adott kupacoknak a *stl* lokusz környékén kívüli heterozigótaságát. Így megbizonyosodhattunk róla, hogy az anyai homozigóta kupacba gyűjtött négy egyed együttese már eleget tesz az említett kritériumnak, és az ellentétes kupacot alkotó hat egyedet is kiválasztottuk az apai homozigóták közül. Még egy további előnyünk származott a szintérképes analízisből: kiválaszthattuk azokat a számunkra **érdekes egyedeket**, melyek genotípusainak meghatározását el kell később végeznünk a kupac-templátokkal végzett kísérletekben polimorfizmust mutató markerekre. Ezen egyedeknél a *stl* lokusz környékén (az UO553-*stl*, ill. a *stl*-OPB20A lokuszok között) rekombináció következtében homozigóta - heterozigóta genotípus-átmenet figyelhető meg, s ezáltal a későbbi finomtérképezésben, az új markerek sorrendbe állításakor nagy jelentőséggel bírnak.

A két homozigóta kupac létrehozásával, az egyedek DNS-ének keverékét használva elvégeztük különböző, random 10-mer oligonukleotid primerek tesztelését PCR reakciókban. Ezekben a RAPD reakciókban a használt primertől függően változó számú, eltérő hosszúságú DNS szakaszok amplifikálódtak, s a fragmentek az agaróz gélen történő szétválasztás után jellegzetes sáv-mintázatot mutattak. A két kupac-templáttal sokszorosított fragmenteket egymás mellett futtatva összehasonlítottuk a mintázatokat. Kiválasztottuk azokat a

primereket, melyeknél mintázatbeli különbséget találtunk, azaz a keresett régióba térképeződő RAPD markerrel kecsesgettek, ezért további vizsgálódások tárgyai lettek.

Ez a gyorsított tesztelés lehetővé tette, hogy **610** különböző nukleotid összetételű primer közül kiválogassuk azokat, melyek nagy valószínűséggel szolgáltatnak RAPD marker(ek)e)t a *stl* körüli régióba. A kupac-tesztekkel az első körben több mint kétharmad részük fennmaradt a rostán, míg **188** primerrel készített amplifikáció mutatott polimorfizmust a két fragmentmintázatban, így ezekkel folytattuk a kísérleteket: PCR reakciókban immáron egyedi DNS templátokon kellett bizonyítaniuk a vizsgált térképhelyhez illő szegregálásukat.

A kupac-templátokkal kapott polimorfizmusok valóságát úgy ellenőriztük, hogy a kupacokat alkotó egyedekkel külön-külön elvégeztük a RAPD reakciókat. Ha bebizonyosodott, hogy a kérdéses fragment az egyik kupac összes egyedének amplifikált mintázatában megtalálható, míg a másik kupac egyedeinek egyikében sem, akkor ezen genotípusokkal az új marker azonnal térképezhető volt a *stl* lokusz körüli régióba. Az új markerek pontosabb térképhelyének megállapítására az F2 növények többi egyedével is elvégeztük a PCR reakciókat és meghatároztuk a genotípusukat. Az elvégzett kísérletek összegzéseként elmondhatjuk, hogy **74** különböző RAPD primerrel összesen **86** új markert azonosítottunk a kezdeti marker-korlátok, az UO553 és OPB20A között.

Miként az a RAPD markerekre általában jellemző, a *stl* lokusz környékére betérképezett markerek is főként domináns kiértékelésűek voltak (egy-két kivétellel, pl. OPF20A és B). Ez nagyban megnehezítette a markerek sorba rendezését, hiszen az ellentétes domináns (domináns transz konfigurációs) markerek között lejtátszódtak rekombinációs esemény nem „látszik”, egymáshoz viszonyított elhelyezkedésüket ezért közvetlenül meghatározni nem lehet. Ahhoz, hogy ezt a problémát megoldjuk és felállíthassunk a markerek között egy hozzávetőleges sorrendet, szükség volt a „stabil” viszonyítási pontként szolgáló kodomináns markerekkel történő összevetésre. Kettéválasztottuk tehát a domináns markereket, és a MapMaker nevű számítógépes programmal külön meghatároztuk az apai domináns markerek egymáshoz viszonyított helyzetét és a kodomináns markerektől való távolságát, majd ugyanezt megtettük az anyai domináns markerekkel is. A valós rekombinációs értékek, vagyis a kodomináns markerektől való egyes távolság adatok alapján tudtuk aztán felállítani a kétféle domináns markerek legvalószínűbb összesített sorrendjét. A legközelebbi markerek közti sorrend megállapításához azonban több információt kellett gyűjtenünk a rekombinációk számáról. Ennek érdekében a markerek kodomináns kiértékelésére törekedtünk, illetve a térképező populáció további egyedeit is bevontuk a vizsgálatba.

Két általánosan használt technikai lehetőség állt rendelkezésünkre a RAPD markerek kodomináns kiértékelésüvé változtatásához. Egyrészt a kérdéses amplifikált fragmentet izolálva és próbaként alkalmazva DNS hibridizációval próbáltunk genomi filteren kodominánsan kiértékelhető szegregáló fragmenteket kapni. A másik megközelítés szerint az ún. SCARs módszert vetettük be: a kérdéses RAPD fragmentet visszaizoláltuk, klónoztuk, majd szekvenáltuk, hogy a megismert bázissorozat alapján specifikus primert tervezhessünk. Ilyenkor van rá esély, hogy a specifikus primerpárral arról az allélról is történik amplifikáció, amelyről RAPD primerrel nem kaptunk jelet. Ha pedig a két allélról keletkezett amplifikációs fragment polimorfizmust mutat, máris kodomináns kiértékelésüvé változtattuk az eredetileg domináns RAPD markert.

A felsorolt módszereken kívül a probléma megoldásához az utóanalízist is segítségül kellett hívni. Bár az idegenbeporzású diploid lucernánál az önbeporzás(oka)t követően hamar jelentkezik beltenyésztési leromlás, megpróbálkoztunk az F₂-t követő nemzedék előállításával - a morfológiai *Stl* bélyegnél amúgy is ez az egyedüli járható út a vad fenotípusú egyedeken belüli heterozigóta/homozigóta megkülönböztetésre. Ha egy vad levél fenotípusú F₂ egyed önbeporzott vagy teszt-cross utódai között megjelent recesszív fenotípusú, ragadós levelű leszármazott, az a kérdéses F₂ egyed heterozigótaságát bizonyította a *stl* markerre. Ugyanígy ellenőrizni tudtuk, hogy mely F₂ egyedek utódai között jelent meg a vizsgált RAPD markert nem amplifikáló utód. Ily módon több marker pontosabb genotípus adatahoz jutottunk néhány egyed esetében, amelyek utódai között találtunk recesszív homozigótát. Azon egyedeknél, ahol csak kevés utód állt rendelkezésre és ezek között nem találtunk recesszív homozigótákat, nem lehetett pontosítani a domináns kiértékelést.

Elvégezve tehát a térképező populáció genotípusok lehető legteljesebb meghatározását és kiértékelését az új markerekre, kiderült, hogy a *stl* lokusz mellett van még egy néhány markerből álló szakasz, melyen belül nem tudtunk a vizsgált egyedek között rekombinációt kimutatni. Éppen ezért egy kibővített populáción folytattuk a térképezést, mely összesen 820 egyedet ölelt fel. A finomtérképezés eredményeként három RAPD marker maradt a *stl* lokusszal szoros genetikai kapcsoltságban, vagyis nem játszódott le köztük rekombináció. Ezek igen jó jelöltek a genom séta elkezdésére, ezt megelőzően azonban még fizikai távolságuk meghatározása kulcsfontosságú. Időközben ugyanis kiderült, hogy a *stl* lokusz közelébe térképeződik az rDNS régió is, amely befolyásolhatja a térségben a rekombinációs események gyakoriságát.

A RAPD markerek gyűjtögetése mellett a folyamatos térképbővítés eredményeként újabb RFLP markereket is találtunk a *stl* lokusz körüli régióba. Ezek egyike a riboszómális RNS (rRNS) molekulákat kódoló gén tandem ismétlődésű DNS szakasza, az rDNS régió, mely citológiai helye az ún. NOR régió. Az azonosított genomi klónok és az össz-DNS mintákhoz történő hibridizációs mintázatok alapján lucernában az rDNS régió egy ismétlődő egysége (18S, 5.8S, 25S rRNS és IGS) hozzávetőleg 12 kb hosszúságúnak bizonyult. Kísérletet végeztünk annak megállapítására is, hogy ezek az egységek hány példányban ismétlődnek egymás után az adott kromoszóma szakaszon, és meghatároztuk, hogy a lucerna haploid genomja kb. 2000 kópiát hordoz az rDNS egységekből. A két adatot összegezve elmondhatjuk, hogy a lucernában az rDNS (NOR) régió ~ 24 Mb hosszú szakaszon terül el.

A pontos térképezés érdekében a kibővített térképező populáción (820 egyed) végeztünk a genotípus meghatározásokat az rDNS lokuszra, és összevetettük a *stl* genotípusokkal. A vizsgált kiterjesztett populáció egyetlen egyedében sem volt fellelhető rekombinációs esemény a két marker között. Még mindig bizonytalan volt tehát, vajon a *stl* mutáció az rDNS lokuszon belüli mutációt jelez, vagy azon kívül helyezkedik el. Ezért egy másik populáció, a *stl* mutációt heterozigóta formában hordozó McW2 szülő önbeporzásából származó (S1) populáció egyedeit is megvizsgáltuk. A vizsgált utódok között egy olyan egyedet találtunk, amely homozigóta volt a *stl* allélra és heterozigóta az rDNS-re, vagyis rekombináció játszódott le a két lokusz között. Ez szolgál bizonyítékkal arra, hogy a *stl* mutáció az rDNS lokuszon kívül következett be.

A vizsgált *stl* lokusz környéki régióban a rekombinációs események hiányát magyarázhatja az rDNS lokusz közelsége. A meiózis citológiai vizsgálataiból kiderült, hogy a NOR régiónál nem tapasztalni chizma kialakulást, a rekombináció lejátszódása tehát igen erőteljes gátlás alatt van ebben a régióban. Azt azonban nem tudni, hogy ez a gátlás az rDNS lokusz környezetében meddig, milyen távolságban fejt ki még hatását. Az általunk vizsgált esetben, a *stl* lokuszra, illetve az azonosított közeli molekuláris markerek rekombinációs eseményeire hatással lehet az rDNS közelsége. Ez a tény arra figyelmeztet minket, hogy a régióban a genetikai és fizikai távolság közt fennálló arányosság az átlagos értékhez (1 cM ~ 1500 kb) képest akár nagyságrendekkel is megváltozhatott a fizikai távolság „javára”. Ez viszont azt jelenti, hogy - bár a meghatározott genetikai távolságok alapján elmondhatjuk, hogy van a *stl* lokusszal szoros kapcsolatban lévő molekuláris markerünk (0 rekombináns / 820 egyed, genetikai távolság < 0.12 cM), a valóságban lehet, hogy a várt ~ 100 kb fizikai távolság helyett sokkal nagyobb a markerek között lévő DNS szakasz hossza. Erre a kérdésre a közeljövőre tervezett fizikai térképezés adhat majd választ.

- Baev N, **Endre G**, Petrovics G, Bánfalvi Z, Kondorosi Á. (1991) Six nodulation genes of *nod*-box locus n4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* 228:113-124
- Schultze M, Quiclet-Sire B, Kondorosi É, Virelizier H, Glushka JN, **Endre G**, Gero SD, Kondorosi Á. (1992) *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:192-196
- Csanádi G, Szécsi J, Kaló P, Kiss P, **Endre G**, Kondorosi Á, Kondorosi É, Kiss GB (1994) ENOD12, an early nodulin gene is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Cell* 6: 201-213
- Kiss GB, Csanádi G, **Endre G**, Kaló P. (1994) Mapping alfalfa. *Rice Biotech Quart* 19: 28.
- Endre G**, Kaló P, Hangyel Tárczy M, Csanádi G, Kiss GB (1996) Reducing the tetraploid non-nodulating alfalfa (*Medicago sativa*) MnNC-1008(NN) germ plasm to the diploid level. *Theor. Appl. Genet.* 93:1061-1065.
- Siffelova G, Pavelkova M, Wiesner I, Nasinec V, Kiss GB, Kaló P, Csanádi G, **Endre G**, Felföldi K (1996) Genetic map of diploid alfalfa based on DNA markers. *J. Exp. Botany* 47:31
- Kondorosi Á, Schultze M, Cren M, Buiré M, Pierre M, Hoffmann B, Quiclet-Sire B, Virelizier H, **Endre G**, Baev N, Gero SD, Kondorosi É. (1991) Molecular genetics of root nodule initiation by *Rhizobium*. In: Proc. of the First Thai-French Symposium on Plant Gene Regulation and Expression, Ed. Panichajakul, S., Chulalongkorn University, Bangkok, p.31-39.
- Kondorosi É, Hoffmann B, **Endre G**, Bögre L, Koncz C, Dudits D, Szécsi J, Kiss GB, Kondorosi Á. (1993) Involvement of hormones in nodule initiation: auxin sensitivity and hormone balance affect nodulation of *Medicago*. In: New Horizons in Nitrogen Fixation, eds. Palacios R, Mora J, Newton WE. p357.

- Putnoky P, **Endre G**, Grosskopf E, Kereszt A, Kondorosi Á. (1993) Fix-2 region of *Rhizobium meliloti* is involved in pH regulation. In: New Horizons in Nitrogen Fixation, eds. Palacios R, Mora J, Newton WE. p490.
- Kiss GB, **Endre G** (1994) Proceedings of the "1st European Nitrogen Fixation Conference" and the Workshop on "Safe Application of Genetically Modified Microorganisms in the Environment" (Szeged: Officina Press).
- Kaló P, **Endre G**, Csanádi G, Felföldi K, Kiss GB (1994) An Improved linkage map of *Medicago sativa*. In Proceedings of the "1st European Nitrogen Fixation Conference" and the Workshop on "Safe Application of Genetically Modified Microorganisms in the Environment". G.B. Kiss and G. Endre, eds. (Szeged: Officina Press), pp. 330.
- Kiss GB, Kaló P, **Endre G**, Csanádi G, Felföldi K (1994) An improved linkage map for alfalfa. In Proceedings of the "1st European Nitrogen Fixation Conference" and the Workshop on "Safe Application of Genetically Modified Microorganisms in the Environment". G.B. Kiss and G. Endre, eds. (Szeged: Officina Press), pp. 169-173.
- Endre G**, Kaló P, Csanádi G, Kiss P, Felföldi K, Kiss GB (1995) Generating diploid non-nodulating alfalfa mutant from a tetraploid germplasm. In Nitrogen fixation: fundamentals and applications. I. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, and W.E. Newton, eds. (Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers), pp. 482.
- Kiss GB, Kaló P, Csanádi G, Felföldi K, Kiss P, **Endre G** (1995) Map based cloning system in *Medicago* suitable for isolating genes involved in leaf morphogenesis, nodule formation and effectiveness of nitrogen fixation. In Nitrogen fixation: fundamentals and applications. I. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, and W.E. Newton, eds. (Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers), pp. 437-442.
- Kiss GB, Kaló P, Felföldi K, Kiss P, **Endre G** (1996) An improved linkage map of alfalfa (*Medicago sativa*) and its use to map seed protein genes as well as genes involved in leaf morphogenesis and symbiotic nitrogen fixation. In Grassland and land use systems. G. Parente, J. Frame, and S. Orsi, eds. (Gorizia, Italy: ERSa), pp. 919-923.
- Kiss GB, **Endre G** (1996) Molekuláris markerek alkalmazása a növénygenetikában. Szemelvények a növényi molekuláris biológiából, szerk. Balázs, E., *megjelenés alatt*

- Kiss GB, Kaló P, Felföldi K, Kiss P, **Endre G** (1997) Genetic linkage map of alfalfa (*Medicago sativa*) and its use to map seed protein genes as well as genes involved in leaf morphogenesis and symbiotic nitrogen fixation. In Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Eds. Legocki, A., Bothe, H., Pühler, A. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 279-282.
- Kaló P, **Endre G**, Csanádi G, Felföldi K, Kereszt A, Kiss P, Kiss GB (1997) Construction of an improved genetic map of diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) using a novel linkage analysis for chromosomal regions exhibiting extreme distorted segregation. *Közlésre beküldve*.
- Kiss GB, Kaló P, Kereszt A, Kiss P, **Endre G** (1997) Colormapping: a non-mathematical procedure for genetic mapping. *Közlésre beküldve*
- Putnoky P, Kereszt A, **Endre G**, Grosskopf E, Kiss P, Kondorosi Á (1997) *pha*: a *fix* region of *Rhizobium meliloti* is required for pH adaptation and encodes for proteins homologous to subunits of different proton-translocating systems. *Közlésre beküldve*