

BACILLUS MEGATERIUM GENETIKAI TÉRKÉPEZÉSE
PROTOPLASZT FÚZIÓVAL

Egyetemi doktori értekezés

Írta:

Kósa Edit

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

S z e g e d

1991.

Köszönettel tartozom Alföldi Lajos professzor úrnak, aki figyelemmel kísérte és tanácsaival, észrevételeivel segítette mind a kísérleti munkát, mind a disszertáció írását.

Köszönöm Dr. Csanády Miklósné asszisztensnek azt a sok munkát, amit a kísérletek során végzett.

Végül köszönöm családomnak a biztatást, türelmet és segítséget, mellyel lehetővé tették, hogy ez a dolgozat elkészüljön.

Munkánk célja a *Bacillus megaterium* genetikai térképének elkészítése volt. Mikor kutatócsoportunk ezzel a témával foglalkozni kezdett, semmilyen természetes génátviteli rendszer nem volt ismert erre a baktériumra. Teljesen magától értetődően merült fel a gondolat azokban a kutatókban, akik a protoplaszt fúziót kidolgozták a *Bacillus megaterium*ra, hogy ezzel a módszerrel kellene megpróbálni genetikai analízist végezni. Ebbe a munkába kapcsolódtam be 1985-ben.

Nem sokkal azután, hogy a genetikai kísérletek elkezdődtek, 1979-ben megjelent egy közlemény, mely arról számolt be, hogy *B. megaterium* transzdukáló fágjait fedezték fel (20). Ezek közül egygyel, az MP13 fággal kezdtek kísérleteket Vary és mtsi, de egészen mostanáig csak nagyon kevés eredményről adtak hírt (2, 21).

A kísérletekhez rendelkezésünkre állt számos auxotróf és rezisztencia markerrel jelölt mutáns törzs, melyeket korábban a laboratóriumunkban állítottak elő a vad típusú, AF 100 jelű törzsből.

Módszerünk a következő volt:

a két szülői törzsből, amelyeket keresztezni akartunk, protoplasztokat készítettünk. Ezeket fuzionáltattuk, majd regeneráltattuk. Amikor direkt szelekciót végeztünk, a fuzionált protoplasztokat szelektív táptalajon regeneráltattuk. Amikor indirekt módon szelektáltunk, a protoplasztokat gazdag tápfolyadékban regeneráltattuk, s a benőtt tenyészetet szélesztettük szelektív lemezekre. Ezután a két marker alapján

kiszelektált utódok egyedi genotípusát vizsgáltuk, és a hagyományos módon próbáltuk megállapítani a rekombinációs gyakoriságot, s ez alapján elkészíteni a géntérképet.

Minél több kísérletet végeztünk, annál nehezebb lett egyértelmű génsorrendet megállapítani. Próbálkoztunk más megközelítéssel, de ez sem hozott jobb eredményt. Hosszú ideig tartó próbálkozás után Alföldi Lajos nemrégiben kidolgozott módszerével ellenőriztük a mintáinkat, melyekről kiderült, hogy többségük nem alkalmas genetikai analízisre.

A genetikai térkép, melyet a hagyományos módon készítettünk, inkább "metabolikus térkép"-nek nevezhető, mert a fúziók utódpopulációja valószínűleg sokkal inkább metabolikus eseményeket tükröz, mint genetikaiakat.

Így tehát a protoplaszt fúzió nem tekinthető megbízható módszernek a genetikai térképezéshez.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Baktériumok

A kísérletekhez használt baktériumok: a *Bacillus megaterium* vad típusú, AF 100 jelű törzse, és ennek auxotróf és antibiotikum rezisztens származékai (1. táblázat).

2. Táptalajok

2.1. Ozmotikus tápfolyadék:

1000 ml desztillált vízben tartalmaz:

NH_4Cl	1,000g
TRIS /hydroxymethyl/-aminomethane	12,000g
KCl	0,035g
NaCl	0,058g
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$	0,300g
$\text{MgCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$	4,260g
Szacharóz	68,460g

A pH-t 7,5-re állítjuk 10 %-os 1N HCl-val.

110 °C-on 30 percig sterilezzük.

2.1.1. Protoplasztoló tápfolyadék:

200 µg/ml lizozimet tartalmazó ozmotikus tápfolyadék.

1. TÁBLÁZAT

BACILLUS MEGATERIUM TÖRZSEK

Elnevezés	Arg	Glu	His	Leu	Thr	Thy	Trp	Rif	Str	Ttc
AF 100	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
AF 103	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
AF 320	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
AF 321	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
AF 325	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
AF 323	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
AF 421	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
AF 422	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
AF 426	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
AF 434	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
AF 912	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
AF 901	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
AF 340	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-

Rövidítések:

Arg: arginin, Glu: glutaminsav, His: hisztidin, Leu: leucin,
 Thr: treonin, Trp: triptofán, Thy: timin,
 Rif: rifampycin, Str: streptomycin, Ttc: tetracyclin

+: aminosav prototrófia

-: aminosav auxotrófia

antibiotikum rezisztencia

antibiotikum szenzitivitás

timin prototrófia

timin auxotrófia

2.1.2. Minimál tápfolyadék:

Ozmotikus tápfolyadék, amely tartalmaz:

KH_2PO_4	0,14g/1000 ml
glükóz	2,00g/1000 ml

2.1.2.1. Regeneráltató minimál táptalaj:

Agart tartalmazó minimál tápfolyadék. Az alapagar 1%, a fedőagar 0,4 % koncentrációjú.

2.1.3. Szelektáló tápfolyadék:

Minimál tápfolyadék, amely a kívánt összetételben tartalmazza a megfelelő kiegészítő faktorokat (aminosav, antibiotikum, timin).

2.1.3.1. Regeneráltató szelektáló táptalaj:

Agart tartalmazó szelektáló tápfolyadék. Az alapagar koncentrációja 1%, a fedőagaré 0,4%.

2.3. Normál alap tápfolyadék:

Ozmotikus tápfolyadék szacharóz nélkül.

2.3.1. Normál minimál tápfolyadék baktérium tenyésztéshez:

Normál alap tápfolyadék, amely tartalmaz:

KH_2PO_4	0,14g/1000 ml
glükóz	2,00g/1000 ml

2.4. Komplett tápfolyadék:

1000 ml desztillált vízben tartalmaz:

NaH_2PO_4	3,0 g
K_2HPO_4	5,3 g
NH_4Cl	1,0 g
Bacto trypton	5,0 g
Yeast extract	1,0 g

A pH-t 7,5-re állítjuk 10%-os NaOH-dal.

110 °C-on 30 percig sterilezzük.

2.5. Aminosav és timin koncentráció:

50 µg/ml.

2.6. Antibiotikum koncentráció:

Streptomycin:	50 µg/ml
Rifampycin:	25 µg/ml
Tetracyclin:	20 µg/ml

3. Módszerek

3.1. Protoplaszt készítés:

A baktériumot 50 ml ozmotikus, a megfelelő aminosavakat tartalmazó tápfolyadékba inokuláltuk, s egy éjszakán át rázattuk 30 °C-on. A tenyészetet reggel 4000 rpm-mel, 4 °C-on, 20 percig centrifugáltuk. A baktériumokat 10 ml ozmotikus tápfolyadékban szuszpendáltuk. Hozzáadtunk 1 ml, 2 mg/ml koncentrációjú lizozim oldatot s 20 percig inkubáltuk 37 °C-on.

A protoplaszttá alakulást fáziskontraszt mikroszkóppal követtük nyomon.

3.2. Fúzió

A protoplasztokat 4000 rpm-mel, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, majd óvatosan szuszpendáltuk 1 ml ozmotikus tápfolyadékban. Kémcsőben összemértünk a két szülő protoplasztjaiból 0,1-0,1 ml-t, hozzáadtunk 0,8 ml 40%-os PEG 6000 oldatot, óvatosan összekevertük. 2-4 percig inkubáltuk szobahőn, majd regeneráltattuk.

3.3. Regeneráció

3.3.1. Folyadékban:

300 ml-es Erlenmeyer lombikban a megfelelő aminosavakat tartalmazó regeneráltató minimál táptalaj felületére öntöttünk 10 ml minimál tápfolyadékot, melyet kiegészítettünk a szükséges aminosavakkal, s amely a fuzionált protoplasztokat százszoros hígításban tartalmazta. Ezt lassan rázattuk 30 °C-on 1-1,5 napig.

3.3.2. Fedőagarban:

A protoplasztokat 0,4% agart tartalmazó, aminosavakkal kiegészített, olvasztott regeneráltató minimál táptalajba mértük. Ezt alapagar felületére rétegeztük Petri csészében. 30⁰C-on 2-3 napig inkubáltuk.

3.4. Szelekció

3.4.1. Direkt módon szelektáltunk különböző rekombináns kategóriákra úgy, hogy csak ezeket engedték regenerálódni, tehát a fúzió után a protoplasztokat regeneráltató szelektáló táptalaj felületére rétegeztük.

3.4.2. A regeneráltató táptalajba az összes olyan növekedési faktort beletettük, melyet a szülők igényeltek, így minden létrejött rekombináns regenerálódhatott. A regenerálódott baktériumokat szelektív táptalajokra szélesztettük.

A direkt és nem direkt módon izolált rekombináns baktériumokat egyenként vizsgáltuk tovább replica plating eljárással.

2. TÁBLÁZAT

A KÍSÉRLETEK ÖSSZEFOGLALÓ TÁBLÁZATA

Sor- szám	Markerek száma	Szelekció	Vizsgált telepek száma	Lehetséges genotípusok száma	Kapott genotípusok száma	FC* érték
1		Str, His	529	8	8	1,00
2		Str, Thy	491		8	1,00
3		Rif, Thy	265		6	0,75
4		Rif, Thy	217		7	0,87
5		Rif, Thy	270		7	0,87
6		Rif, His	275		5	0,62
7		Rif, His	250		7	0,87
8		Rif, Trp	275		4	0,50
9		Rif, Trp	221		5	0,62
10		Arg, Rif	265		8	1,00
11		Arg, Rif	535		8	1,00
12	6	Str, Thr	453	16	7	0,43
13		His, Glu	394		12	0,75
14		Arg, Str	453		8	0,50
15	7	Rif, His	448	32	4	0,12
16		Thr, Glu	403		7	0,21
17	8	Arg, Trp	494	64	16	0,25
18		Leu, Trp	695		42	0,65
19		Arg, Thr	223		22	0,34
20		Thr, Leu	219		16	0,25
21		His, Thy	242		13	0,20
22		Trp, Thy	347		12	0,18
23		His, Thy	322		10	0,15
24		Trp, Thy	275		15	0,23
25		His, Thr	303		21	0,32
26		Thr, Leu	409		27	0,42
27		Rif, Str	109		13	0,20
28		Arg, Trp	458		16	0,25
29		Trp, Thy	458		16	0,25
30		Trp, Thy	313		10	0,15
31		Arg, Trp	314		16	0,25
32		Leu, Trp	440		28	0,43
33		Leu, Trp	411		27	0,42
34		His, Leu	405		17	0,26
35		His, Ttc	201		12	0,18
36		Ttc, Trp	208		9	0,14
37		Arg, Ttc	331		23	0,35
38	9	His, Leu	170	128	30	0,23
39		Rif, His	246		21	0,16
40		His, Leu	212		30	0,23
41		Arg, Ttc	284		14	0,10
42		Ttc, His	297		16	0,12

FC = komplettségi faktor: a kapott és a várt genotípusok aránya

BEVEZETÉS

1. A GÉNTÉRKÉPEZÉS ELMÉLETI ALAPJAI

A gének elrendeződését a kromoszómán az adott kromoszóma géntérképének, ennek meghatározását pedig géntérképezésnek nevezzük. A géntérképezés alapja a rekombináció.

A diploid szervezetek meiózisa során az apai és anyai eredetű kromoszómák véletlenszerűen oszlanak meg a leánysejtek között. Ha pl. az anyai eredetű kromoszóma egy bizonyos gén a alléljét hordozza, az apai ugyanazon gén a⁺ alléljét, 50% a valószínűsége annak, hogy az utód az a allélt örökli, s ugyanígy 50% az esély az a⁺ allél öröklésére. Ha két olyan gén alléljeit figyeljük, melyek különböző kromoszómán találhatók, ezek kombinálódása az utódsejtben független. Pl. nézzük A gén a/a⁺ és B gén b/b⁺ alléljeit. Az utódsejtek egyenlő arányban fogják tartalmazni a különböző kombinációkat: ab, a⁺b⁺, ab⁺, a⁺b.

Ha azt tapasztaljuk, hogy az utódnemzedékben a megfigyelt két gén alléljei nem 1:1:1:1 arányban kombinálódnak, hanem a szülői típusok túlsúlyban vannak az új genotípusokkal, a rekombinánsokkal szemben, ez azt jelenti, hogy a két gén nagy gyakorisággal együtt öröklődik, tehát azonos kromoszómán lokalizálódnak. Az egy kromoszómán található géneket kapcsoltnak nevezzük. Ezek is előfordulhatnak új kombinációkban az ivarsejtekben, mivel a meiózis során a homológ kromoszómák között crossing over játszódik le,

mely rekombinánsok kialakulásához vezet. A crossing over lényege, hogy mindkét kromoszóma ugyanazon a ponton eltörik és keresztben újra összekapcsolódik. Így olyan rekombináns kromoszómák jönnek létre, amelyek részben anyai, részben apai eredetű génekkel rendelkeznek.

A crossing over, illetve ennek eredménye, a rekombináció teszi lehetővé a genetikai térkép elkészítését. Ennek során meghatározzuk az egy kromoszómán elhelyezkedő géneket, ezek sorrendjét és egymástól való távolságát. Diploid szervezeteknél az F_1 nemzedék tesztelő keresztezésével tudunk a gaméták genotípusára következtetni. Haploid szervezetek esetében az F_1 nemzedék fenotípusa a genotípust tükrözi.

A genetikai térképezés alapgondolatait Sturtevant dolgozta ki. Képzeljünk el két különböző allélpárt bizonyos távolságra egymástól. A meiózis során random módon jelennek meg crossing overek a párosodott homológ kromoszómák különböző pontjain. Néhány meiotikus osztódásban véletlenszerűen abban a régióban is megjelenik cross over, amely a két gén között van, s ezekből a meiózisokból rekombináns termék jön létre. Más meiotikus osztódásokban ebben a régióban nem zajlik le cross over - ezekből nem származik rekombináns utód. Sturtevant feltételezte, hogy minél nagyobb a távolság a kapcsolt gének között, annál nagyobb az esély arra, hogy cross over jelenjen meg köztük, ennél fogva annál nagyobb azon meiózisok aránya, amelyekben ebben a régióban crossing over zajlott le rekombinánst eredményezve. Így a rekombinánsok gyakoriságának

mérésével a génpárok közötti távolság is mérhető.

1 térképegységnek (map unit; m.u.) nevezte azt a távolságot, amelynél 100 meiózis végtermékéből 1 rekombináns. Másképp:

1 m.u. = 1% rekombinációs gyakoriság (RF).

A rekombinációs gyakoriság kiszámítása:

$$\text{Rekombinációs gyakoriság} = \frac{\text{rekombináns utód}}{\text{összes utód}}$$

A rekombinációs gyakoriságból nemcsak az allélek egymástól való távolságára, hanem sorrendjére is következtethetünk.

Legyen A, B, C három különböző gén ugyanazon a kromoszómán.

A megfelelő allélek: a/a^+ , b/b^+ , c/c^+ . Végezzük el a következő két keresztezést:

$ab \times a^+b^+$ és $bc \times b^+c^+$. Mindegyik keresztezés utódnemzedékében számoljuk meg a szülői és rekombináns genotípusokat és határozzuk meg a rekombinációs gyakoriságokat.

$$R_{ab} \% = \frac{a^+b + ab^+}{a^+b + ab^+ + a^+b^+ + ab}$$

$$R_{bc} \% = \frac{b^+c + bc^+}{b^+c + bc^+ + b^+c^+ + bc}$$

Legyen pl. $R_{ab}=5\%$, $R_{bc}=3\%$. Az allélek sorrendje kétféle lehet:

$$\begin{array}{c} + & & + & & + \\ | & & | & & | \\ a & \text{---} & b & \text{---} & c \end{array} \quad \text{vagy:} \quad \begin{array}{c} + & & + & & + \\ | & & | & & | \\ a & \text{---} & c & \text{---} & b \end{array}$$

Ahhoz, hogy el tudjuk dönteni, melyik a helyes, el kell végeznünk az $ac \times a^+c^+$ keresztezést. Ha R_{ac} értéke 8%, akkor az első sorrend a jó, ha 2%, akkor a második. Általánosabban:

ha $R_{ab} < R_{ac}$ és $R_{bc} < R_{ac}$, akkor a sorrend a,b,c.

A hárompontos keresztezéssel egy lépésben meghatározható a sor-

rend. Az $abc \times a^+b^+c^+$ keresztezésből a következő utódokat kapjuk:

$a^+b^+c^+$, abc ,	] szülői genotípusok
a^+bc , ab^+c^+ ,	
a^+b^+c , abc^+ ,	
a^+bc^+ , ab^+c .	

rekombináns genotípusok

A rekombinánsok közül az a^+bc , ab^+c^+ , a^+b^+c , abc^+ egyszeres crossing overrel jött létre, az a^+bc^+ , ab^+c kétszeressel.

Könnyen belátható, hogy egy adott távolságon belül két crossing over létrejötte sokkal ritkább, mint egyé. Ezért a kétszeres cross overrel keletkezett rekombinánsok száma észrevehetően kisebb, mint az egyszeres crossing overrel létrejötteké.

Ennek ismeretében könnyű meghatározni a három gén sorrendjét. Miután megállapítottuk, melyik két (reciprok) rekombináns kategória van jelen a legkisebb egyedszámmal, a géneket úgy rendezzük el lineárisan, hogy ennek a két genotípusnak a létrejöttéhez két crossing overre legyen szükség.

A rekombinációs gyakoriság értékeken kívül kapcsoltságot is szoktak számolni. Ekkor kiemelik az egyik allélt, és megnézik, hogy az ezt hordozó utódok között milyen arányban vannak azok, amelyekben együtt öröklődött a két szülői allél.

A kapcsoltság is leírható egyenlettel:

$$L_{ab} = \frac{a^+b^+}{a^+b^+ + a^+b}$$

A kapcsoltság és a rekombinációs gyakoriság a két marker közötti viszonyt különböző szemszögből mutatja meg. Közöttük a következő összefüggés áll fenn:

$$L/a,b/ + R/a,b/ = 1$$

A kapcsoltság számolásával szintén megállapítható a markerek sorrendje:

$$L_{ab} = \frac{a^+b^+}{a^+b^+ + ab^+}$$

$$L_{bc} = \frac{b^+c^+}{b^+c^+ + bc^+}$$

$$L_{ac} = \frac{a^+c^+}{a^+c^+ + ac^+}$$

Ha $L_{ab} \rhd L_{ac}$ és $L_{bc} \rhd L_{ac}$, akkor a sorrend: a b c .

A genetikai térképezés csak egymáshoz közel lévő gének esetében használható. Ha a markerek olyan távol vannak egymástól, hogy $R\% = 50$, akkor ugyanúgy kombinálódnak, mintha külön kromoszómán lennének, sorrendjük nem határozható meg.

2. A GENETIKAI ANALÍZIS JELLEMZŐ SAJÁTSÁGAI BAKTÉRIUMOK ESETÉBEN

Ha baktériumokkal dolgozunk, nem tudjuk az utódokat különválasztani a szülőktől. Ezért szelekciót alkalmazunk, mellyel elimináljuk a szülőket. Általában kettős szelekciót hajtunk végre, vagyis mindkét szülőből 1-1 markerre szelektálunk. Így viszont nemcsak a szülők tűnnek el a populációból, hanem a szülői típusú utódok és a rekombináns kategóriák egy része is.

Ezzel minden kutató tisztában van, de az irodalom tanulmányozásakor azt vehetjük észre, hogy nincs egységes követelményrendszer arra vonatkozóan, hogy egy szelektált minta mikor alkalmas genetikai analízisre. Erre a problémára Alföldi hívta fel a figyelmet nemrégiben. Genetikai analízisünk az általa kidolgozott modellen alapul. Ennek lényege röviden a következő:

A kettős szelekció eltorzítja a mintát. Ebben az esetben az összes lehetséges genotípusnak csak a negyedét kapjuk meg: $2^n/4$. Ennek következtében genotípusok vesznek el - minden szelekcióban mások. Ha létrehozunk egy modell populációt, ezen le lehet vezetni, hogy milyen utódokat kell kapnunk különböző szelekciók esetén.

A szelektált markerek háromféle pozícióban lehetnek egymáshoz képest. Lehetnek szomszédosak, szélsők, és elhelyezkedhetnek úgy, hogy mindkét oldalukon található nem-szelektált marker. A modell populációval végzett gondolat kísérletek alapján bebizonyosodott,

hogy ehhez a háromféle pozícióhoz az utódokban meghatározott cross over eloszlás tartozik. Ha a szelektált markerek szomszédosak, a kapott mintában egy rekombináns osztály jött létre egyszeres crossing overrel, kettő kétszeressel és egy háromszorossal. Ugyanígy meghatározott a cross over mintázat (pattern) minden más lehetséges pozícióra; ezeket foglalja össze a 3. táblázat.

A legfontosabb konklúzió az, hogy egy szelekció után kapott utódpopuláció cross over mintázatát a szelektált markerek egymáshoz viszonyított helyzete határozza meg.

2.1. A MINTA ALKALMASSÁGA

A kutatók eddig nem sok figyelmet fordítottak arra, hogy megnézzék, a kapott minta egyáltalán alkalmas-e genetikai analízisre. Már maga a szelekció is torzítja a mintát, mivel az összes genotípusnak csak a negyede kapható meg, ezenkívül pedig számos fiziológiai faktor is befolyásolja azt, hogy milyen lesz egy keresztezés utódpopulációjának összetétele. Tehát egy kettős szelekció után kapott minta nemcsak a genetikai eseményeket tükrözi, metabolikus hatások torzítják azt - főleg regenerálódott protoplasztok esetében..

Éppen ezért, ha genetikai analízist akarunk végezni, legelőször azt kell megvizsgálnunk, a mintánk, amit fel akarunk használni, alkalmas-e analízisre.

Az első kérdés, hogy megkaptuk-e az összes lehetséges genotípust ($2^n/4$). Ha igen, a mintát komplettnek nevezzük, és analizálhatjuk a hagyományos módon. A komplett mintákban a genotípus mintázatok függetlenek a nem-szelektált markerek pozíciójától. Ha nincs meg az összes lehetséges genotípus, a minta inkomplett. A komplettséget a komplettégi faktorról (FC) lehet jellemezni, ez a kapott genotípusok és az elméletileg várt genotípusok számának aránya.

Inkomplett minta esetében meg kell vizsgálnunk, hogy a minta szabályos-e vagy sem. Szabályos minták esetében a pattern sokszoros cross over vége csonkított, vagyis innen hiányoznak genotípusok. Ezt leszámítva a mintázat megfelel az elméletileg várhatónak, vagyis szabályos. Ha nemcsak a sokszoros cross over régiókból hiányoznak genotípusok, hanem random módon bárhol, akkor a pattern szabálytalan, és genetikai analízisre nem alkalmas. Ha csak szabálytalan patterneket találunk, az egész utódpopuláció alkalmatlan az analízisre. A minták kiértékelését számítógéppel végezzük. A szelektált markereket rögzítjük egy pozícióban, a nem-szelektált markerek sorrendjét változtatjuk. A gép kiírja az összes lehetséges sorrendet a szelektált markerek minden pozíciójában, az elméleti cross over mintázatot, minden sorrendhez azt, hogy a kapott rekombinánsok közül hány osztály tartozik az egyszeres, stb. cross over osztályokhoz, és az egyes rekombináns osztályok hány kolóniát tartalmaznak.

Így több olyan sorrendet is kaphatunk, amely kielégíti a feltéte-



leket, s így helyes lehet a mintázat alapján. Hogy ezek közül megkapjuk az egy valóban helyes sorrendet, újabb szelekciókat kell végeznünk, mindegyik esetben végigcsinálni az előbbi vizsgálatot és összehasonlítani a lehetséges helyes sorrendeket. Még egy szempont van, amit ennél a vizsgálatnál figyelembe kell vennünk, és ami könnyebbé teheti a választást. Nemcsak azt nézzük meg, hogy hány rekombináns kategória tartozik a különböző crossing over osztályokba, hanem azt is, hogy ezek milyen egyedszámot képviselnek. Hiszen itt is érvényes az a törvényszerűség, hogy legnagyobb gyakorisággal az egyszeres crossing over jön létre, ennél kisebb valószínűséggel a kétszeres, stb. Ennek megfelelően egy adott utódpopulációban legnagyobb számban azok az egyedek vannak jelen, amelyek egyszeres crossing overrel jöttek létre, legkisebb számban azok, amelyek létrejöttéhez a legtöbb crossing over kell.

Ha az elméleti és a kapott cross over mintázat megegyezik, akkor megnézzük, hogy a kolóniaszámok alapján ez a sorrend jó lehet-e, és ha igen, akkor elfogadjuk mint lehetséges sorrendet. Ha a markerek sorrendjét sikerült így megállapítani, akkor számolhatunk térképtávolságot a rekombinációs gyakoriságok vagy a kapcsoltsági értékek alapján.

Ezt a módszert pattern analízisnek nevezzük.

Tapasztalataink alapján minél több a marker, annál kevésbé található olyan mintázat, ami egyezik az elméletivel.

3. TÁBLÁZAT

A REKOMBINÁNS OSZTÁLYOK MINTÁZATA KETTŐS SZELEKCIÓ UTÁN

szelektált	4 ^a :2 ^b :4 ^c			5:3:8				6:4:16					
markerek	Rekombináns osztályok												
pozíciója	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	5	
	törésponttal												
* *	1	2	1	1	3	3	1	1	4	6	4	1	
1	2	2	0	2	4	2	0	2	6	6	2	0	
2	3	0	1	3	3	1	1	3	6	4	2	1	
3				4	0	4	0	4	4	4	4	0	
4								5	0	10	0	1	
	7:5:32						8:6:64						
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
* *	1	5	10	10	5	1	1	6	15	20	15	6	1
1	2	8	12	8	2	0	2	10	20	20	10	2	0
2	3	9	10	6	3	1	3	12	19	16	9	4	1
3	4	8	8	8	4	0	4	12	16	16	12	4	0
4	5	5	10	10	1	1	5	10	15	20	11	2	1
5	6	0	20	0	6	0	6	6	20	20	6	6	0
6							7	0	35	0	21	0	1

Jelölések: a: A keresztezésben résztvevő allélpárok száma

b: A nem-szelektált markerek száma

c: A genotípus osztályok száma a szelektált mintában

A csillagok közötti szám azt jelzi, hány nem-szelektált marker van a szelektált allélek között.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

GENETIKAI ANALÍZIS PROTOPLASZT FÚZIÓVAL

A sejtfúziót mint módszert, ma már rutinszerűen használják mikrobiális (gomba, baktérium), növényi és állati sejtek esetében is. A növények és mikrobák sejtfúzióját protoplaszt fúziónak nevezik, mivel itt nem a teljes sejtet használják, azt előbb megfosztják sejtfalától, vagyis protoplasztot készítenek belőle.

Baktérium protoplasztok spontán fúziójáról először Stähelin számolt be 1954-ben (18). Kísérleti objektuma a *Bacillus anthracis* volt. Az első indukált mikrobiális protoplaszt fúziót Ferenczy Lajos és munkatársai valósították meg *Geotrichum candidum* gombával (5).

Ezt követően fellendültek az ilyen irányú kutatások a baktériumokkal foglalkozó munkacsoportokban is. Egy magyar és egy francia kutatócsoport egyszerre, de egymástól függetlenül végezte kísérleteit. Eredményeiket a PNAS ugyanazon számában jelenttették meg. Fodor Katalinnak és Alföldi Lajosnak a *Bacillus megaterium*, Pierre Schaeffernek és csoportjának a *Bacillus subtilis* indukált fúzióját sikerült megvalósítania (7, 17).

1977-ben a Nature-ben jelent meg Hopwood és mtsi. cikke *Streptomyces* fajok protoplaszt fúziójáról (11).

Később számos baktérium fajra dolgozták ki a módszert; az intra- és interspecifikus fúziókat különféle célok elérésére használják.

A sikeres fúziók új lehetőséget csillantottak fel: talán olyan fajok genetikai analízisét is el lehet végezni, melyeknek nincs természetes génátviteli rendszere. Ilyen volt például a *Bacillus megaterium*. 1976-ban semmilyen, más baktériumoknál alkalmazott módszerrel nem tudták térképezni.

Az indukált protoplaszt fúzió kidolgozása után azonnal megkezdődtek a genetikai kísérletek mind a három baktériummal. A *Bacillus subtilis* és a *Streptomyces* fajok esetében már rendelkezésre álltak transzformációval, transzdukcióval, konjugációval készített géntérképek, a fúzióval kapott adatokat ezekkel összevetve ellenőrizni lehetett az eredményeket.

Nagyon gyorsan kiderült, hogy a fúziós térképezés, az adatok kiértékelése egyáltalán nem egyszerű.

Fodor és Alföldi már az első fúziós cikkben leírja, hogy a keresztezés után heterogén utódpopulációt kaptak, melyet genetikailag analizálni nagyon nehéz. Schaefferék első fúziós közleményükben már genetikai analízisről is beszámolnak, s azt írják, a fúzióval kapott adatok jól megegyeznek az ismert genetikai térkép alapján várt eredményekkel (17).

A következő évek során, bármelyik baktériumnál próbálták meg alkalmazni a fúziós módszert a genetikai analízisben, mindenhol akadtak problémák, anomáliák.

*Streptomyces*eknél azt tapasztalták, hogy a fúzió utáni analízisnél "elvész" a kapcsoltság. A cross overek nagyjából random módon oszlanak meg, a többszörös cross over osztályok száma kb.

10-15-ször több, mint konjugációban. Ezt azzal magyarázzák, hogy egyrészt a fúziós termékekben szinte teljes a diploiditás (konjugációban részleges), így nagyobb a valószínűsége annak, hogy a térképen egymástól távol lévő markerek rekombináldjanak. Másrészt a regeneráció alatt lehetőség van arra, hogy több rekombinációs kör játszódjon le (11, 12, 13). A kapott rekombináns kolóniák itt is gyakran keverték (12).

A rekombinánsok számát az utódpopulációban fiziológiai tényezők is befolyásolják. Sok *Streptomyces* faj esetében "öngátlást" figyeltek meg, amely azt jelenti, hogy azokon a regenerációs lemezeken, melyekre sok protoplasztot szélesztettek, a gyorsan regenerálódó sejtek gátolják a többiek regenerációját. Nagyon fontos a regeneráció és így a rekombináció szempontjából a protoplasztok általános fiziológiai állapota, például az, hogy milyen hőmérsékleten nőttek a baktériumok, és hogy a növekedési görbe mely fázisában voltak közvetlenül a protoplaszttá alakítás előtt (1).

Vannak bizonyos auxotróf markerek is, amelyek szelektív hátrányt jelentenek.

A kutatók mégis arra a következtetésre jutnak, hogy bizonyos megszorításokkal a protoplaszt fúzió használható a genetikai analízisben *Streptomyces*eknél. Úgy vélik, a módszer génsorrend megállapítására alkalmas, távolság meghatározására nem. Az adatok kiértékelésénél allélarányt használnak rekombinációs frekvencia helyett (13, 14). Minden fajnál meg kell állapítani azokat az

optimális feltételeket, amelyek mellett a legnagyobb a regenerációs és rekombinációs gyakoriság. A legkevesebb anomáliát akkor tapasztalták, amikor szelekció nélkül regeneráltatták a protoplasztokat, majd a spórákat analizálták (11, 14).

A Streptomyceseknél azonban a fúciónak elsősorban nem a géntérképezésben, hanem más területeken, például a törzsnemesítésben van gyakorlati jelentősége.

Néhány más baktériummal is végeztek hasonló kísérleteket. Ezek eredményei röviden:

Providencia alkalifaciens (1979): öt lókuszt lehetséges sorrendjét határozták meg, és ez megfelel a közeli rokon *Proteus mirabilis* kromoszómáján lévő sorrendnek. Ebben az esetben is kevert kolóniákat kaptak, és megállapították, hogy a rekombinációs gyakoriság erősen függött a markerek számától (3).

Staphylococcus aureus (1983): itt is anomáliákat figyeltek meg. Fúzió után a protoplasztokat komplett lemezekon regeneráltatták, ezután kettős szelekciót végeztek majd az utódokat analizálták. Ugyanúgy "öngátlást" figyeltek meg, mint a Streptomyceseknél, s ez torzítja az eredményeket. Néhány auxotróf marker csak ritkán jelent meg a rekombinánsok között. A rekombinációs gyakoriságok $\pm 50\%$ -kal változtak a kísérletek során, de a nem-szelektált markerek megoszlása $\pm 5\%$ -on belül reprodukálható volt. Így az "együttöröklődési gyakoriságok" (coinherence frequencies = CIF) a markerpárok közötti relatív távolságokat tükrözik.

A kiértékelést számítógéppel végezték. A kapott kapcsoltsági ada-

tok megfelelnek a transzformációval megállapított értékeknek, de a szerzők felhívják a figyelmet arra, hogy ha genetikai analízisre használjuk a protoplaszt fúziót, óvatosnak kell lennünk (19).

Bacillus stearothermophilus (1986): a protoplasztokat szelekció nélkül regeneráltatták, majd szelektív lemezekre szélesztették és vizsgálták a nem-szelektált markereket. Az aberráns termékeket kizárták az analízisből. A kiértékelést a *Staphylococcus aureus*-ra kidolgozott számítógépes program módosított formájával végezték. Itt is találtak kevert, többféle rekombinánst tartalmazó telepeket. Néhány fúzióban nem kapták meg az összes lehetséges rekombinánst. Csak azokat a CIF értékeket vették figyelembe, amelyek 10%-nál kisebb mértékben szórtak. 7 marker sorrendjét állapították meg. Közülük 3 egymáshoz viszonyított sorrendjét transzdukcióval megerősítették. (4)

Bacillus subtilis (1976): nem szelektíven regeneráltatták a protoplasztokat, az egyedi kolóniákat replikázással vizsgálták. Az "öngátlást" itt is megfigyelték. A fúziós termékek hozama nemcsak a szelekcióban résztvevő markerek számától, hanem maguktól a markerpároktól is függ. Bizonyos markereket hordozó rekombinások gyakorisága nagyon alacsony volt. Az ismert kromoszómaterképpel összehasonlítva a fúzióból származó eredményeket, jó egyezést kaptak. (17) A továbbiakban genetikai analízissel nem foglalkoztak, kutatásaikat más irányban folytatták. A fúziós folyamatokat és a létrejött termékeket tanulmányozták.

A fúzió elsődleges terméke egy diploid sejt, amely két teljes kromoszómát hordoz, és amelyben minden sejtalkotó duplán van jelen. Ez teljesen új és természetellenes a baktériumok világában. Az ismert génátviteli rendszereknél mindig csak részleges diploid, merozigóta jön létre. Az egyik sejt donorként, a másik recipiensként viselkedik. A recipiens sejt a donor nukleinsavát (plazmidját vagy kromoszómájának egy részét) fogadja be, más sejtalkotók nem kerülnek át. A részleges diploid állapot sem marad fenn sokáig. Az új kromoszóma-darab vagy beépül reciprok rekombinációval, vagy az osztódások során kiszegregál.

A genetikusok úgy gondolták, hogy a protoplaszt fúzióval létrejött sejtek diploiditása sem marad fenn, a regeneráció alatt helyreáll az eredeti haploid állapot. A *B. subtilis*-szel végzett kísérletek azonban nem ezt bizonyítják. A fúzióval létrejött sejt megőrzi mind a két kromoszómát (hogy a többi sejtalkotóval mi történik, nem tudjuk), de csak az egyik aktív, a másik csendes.

A *B. subtilis* protoplaszt fúziója után háromféle kolóniát lehet elkülöníteni fenotípus alapján:

1. Parciálisan auxotróf, stabil rekombinánsok, melyek mind szelektív, mind nem-szelektív regeneráló táptalajon létrejöhetnek.
2. Komplementáló diploidok. Ezek instabil prototrófok, melyek néhány átoltás után stabilizálódnak, auxotróf rekombinánsokat hozva létre. Ez a típus elsősorban szelektív minimál regeneráló táptalajon detektálható.
3. Nem-komplementáló diploidok, melyek nem-szelektív körülmények

között jelennek meg, csak az egyik szülő fenotípusát mutatják, szelektív körülmények között szaporítva azonban utódaik között megjelennek a másik szülő markerei.

Alapos vizsgálat után C. Sanchez-Rivas a következő hipotézist állította fel (16):

Fúzió után a diploid protoplasztokban komplementáció zajlik, majd a két kromoszóma rekombinálódik és ezután az egyik inaktiválódik. Több rekombinációs kör jelenhet meg, és nincs szükség a *recE4* gén aktivitására. Közvetlenül a fúzió után a rekombináció főleg a terminális és az origo régióban jelenik meg és stabil (de diploid!) rekombinánsokat hoz létre. Az instabil diploid sejtekben már a regeneráció után játszódik le a rekombináció, és ezután stabilizálódnak a sejtek. A nem-komplementáló diploidok esetében először az egyik szülői kromoszóma inaktivációja következik be, majd szelektív körülmények között a két kromoszóma rekombinálódik, így jönnek létre a szegregánsok (9).

A kromoszóma inaktivációja Guillén szerint (10) egy reverzibilis és egy ezt követő irreverzibilis lépésből állhat, és valószínűleg a nucleoidban lezajló konformációs változásokkal van kapcsolatban.

Karmazin-Campelli szerint az inaktivációhoz szükség van a sejtfalra (15). Az inaktiválódott kromoszóma a sejtosztódások során replikálódik és rekombinációban is részt vehet.

Ezt a hipotézist felállító kutatók egy laboratóriumhoz tartoztak, eredményeiket mások nem erősítették meg.

Bacillus megaterium: Fodor és Alföldi a sikeres indukált protoplaszt fúzió után kapott utódpopuláció analízisekor megállapította, hogy a minimál táptalajon regenerálódott elsődleges kolóniák nem egységesek. 3 csoportot tudtak elkülöníteni:

1. Kevert populációkat tartalmazó telepek, melyek több átoltság után is instabilak voltak.
2. Különböző stabil sejttípusokból álló kevert kolóniák.
3. Egyféle genotípusú, stabil telepek.

Az 1.-és 2. csoportba tartozó kolóniák mindkét szülői típust és a legtöbb lehetséges rekombináns típust tartalmazták. (7)

Miután a protoplaszt fúzió rutinszerűvé vált laboratóriumunkban, a kutatók megpróbálták a módszer segítségével térképezni a *B. megaterium*-ot. A munka során azonban nagyon sok probléma merült fel. Hamarosan kiderült, hogy a felnövekvő utódpopuláció nem annyira a genetikai eseményeket, mint inkább a fiziológiai hatásokat tükrözi (8).

Az egyes rekombináns osztályokban nem mindig kapták meg az elméletileg várható egyedszámot. Feltűnt, hogy ezek az anomáliák bizonyos aminosavak jelenlétéhez vagy hiányához kapcsolhatók. Például a szerin erősen gátolta a rekombinánsok növekedését, ezt a hatást a treonin képes volt ellensúlyozni. Arginin, triptofán, hisztidin is gátló hatást fejtett ki a növekedésre. A szülők fiziológiai állapota is erősen befolyásolta a rekombinánsok számát. A protoplasztta alakítás előtti növesztési körülmények nyilvánvalóan befolyásolják a citoplazma és a membrán összetételét, s ez

hatással van a regenerációra. Mindezek miatt még azonos szülői törzsek használatakor, azonos szelekcióban is különböző eredményt kaphatunk két független kísérletben.

A klasszikus génátviteli rendszerekkel ellentétben a protoplaszt fúzióban a szülők egyenlő partnerekként viselkednek. Nincs donor és recipiens szülő, illetve egy kísérleten belül is változó, melyik szülői sejt viselkedik donorként, melyik recipiensként. Fodor és mtsi megpróbálták hő- illetve streptomycin-kezeléssel egyirányúvá tenni az információ-átadást, de ezekben a kísérletekben is anomáliákat tapasztaltak, az eredmények nem voltak reprodukálhatók (Fodor K.: Kandidátusi disszertáció).

A laboratóriumunkban megfigyelt anomáliákat Fleischer és Vary is tapasztalta (6). Abban az időben kezdték az MP13 transzdukáló fágot használni *B. megaterium* térképezésére, amikor Fodorék már közölték első fúziós kísérleteiket. Néhány markerre sikerült kapcsoltságot megállapítaniuk. Ezután a protoplaszt fúziós módszerrel próbálkoztak, de így nem kaptak kapcsoltságot ugyanezekre a markerekre.

Mindezek alapján mindkét kutatócsoport felhívta a figyelmet arra, hogy a fúzióval kapott eredményeket nagyon óvatosan kell kezelni.

KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

Mint láttuk, protoplaszt fúziós keresztezéseknél újabb problémák merültek fel a szelekció okozta gondok mellett. Hogy ezeket minél jobban redukáljuk, különböző módosításokat vezettünk be.

Kutatócsoportunk az első kísérleteknél direkt szelekciót alkalmazott, minimál, vagy aminosavakkal kiegészített szelekciós táptalajokon regeneráltatták a fuzionált protoplasztokat. A későbbiek során indirekt szelekciót is alkalmaztunk. Fúzió után a szülők által igényelt összes növekedési faktorra kiegészített tápfolyadékban, agarfelszínen regeneráltattunk, majd ebből a mintából szélesztettünk különböző szelekciós lemezekre. Az izolált kolóniákat egyenként szuszpendáltuk foszfát pufferben (pH 7,2), különböző szelekciós lemezekre cseppentettük, hogy egyedi genotípusukat megállapíthassuk. Így kiküszöböltük azt a hatást, amelyet a szelekciós lemezekben található aminosavak fejtenek ki a regenerációra.

A 2. táblázat adatai a laboratóriumunkban végrehajtott keresztezéseket mutatják.

Eleinte úgy gondoltuk, minél több markert használunk egy keresztezésben, annál több információhoz jutunk, ezért a sokfaktoros keresztezéseket részesítettük előnyben. Azonban azt figyeltük meg, hogy a szelektált mintákban a genotípusok száma mindig kevesebb az elméletileg várható értéknél. Miután csökkentettük a markerek számát, a minták komplettebbekké váltak.

4. TÁBLÁZAT

AZ ÖTFAKTOROS KERESZTEZÉSEK ALLÉLARÁNYAI

No.	FC	P	arg	rif	his	trp	thy
3	0,75	P1	<u>0,966</u>	<u>1,000</u>	0,502	0,075	0,000
		P2	0,034	0,000	0,498	<u>0,925</u>	<u>1,000</u>
*							
4	0,87	P1	<u>0,880</u>	<u>1,000</u>	0,171	0,055	0,000
		P2	0,120	0,000	<u>0,829</u>	<u>0,945</u>	<u>1,000</u>
*							
5	0,87	P1	<u>0,830</u>	<u>1,000</u>	0,307	0,033	0,000
		P2	0,170	0,000	<u>0,693</u>	<u>0,967</u>	<u>1,000</u>
*							
6	0,62	P1	<u>0,930</u>	<u>1,000</u>	0,000	0,011	0,004
		P2	0,070	0,000	<u>1,000</u>	<u>0,989</u>	<u>0,996</u>
*							
7	0,87	P1	<u>0,864</u>	<u>1,000</u>	0,000	0,036	0,052
		P2	0,136	0,000	<u>1,000</u>	<u>0,964</u>	<u>0,948</u>
*							
8	0,50	P1	<u>0,938</u>	<u>1,000</u>	0,527	0,000	0,000
		P2	0,052	0,000	0,437	<u>1,000</u>	<u>1,000</u>
*							
9	0,62	P1	<u>0,869</u>	<u>1,000</u>	0,081	0,000	0,063
		P2	0,131	0,000	<u>0,919</u>	<u>1,000</u>	<u>0,937</u>
*							
10	1,00	P1	0,000	<u>1,000</u>	0,155	0,223	0,200
		P2	<u>1,000</u>	0,000	<u>0,845</u>	<u>0,777</u>	<u>0,800</u>
*							
11	1,00	P1	0,000	<u>1,000</u>	0,351	0,166	0,101
		P2	<u>1,000</u>	0,000	<u>0,648</u>	<u>0,834</u>	<u>0,899</u>
*							

Az aláhúzás az egy kapcsoltsági csoportot alkotó markereket jelöli, a csillag a szelektált alléleket.

1. HAGYOMÁNYOS KIÉRTÉKELÉS

1.1. ÖTFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

A markerek elrendezéséhez az ötmarkeres keresztezések eredményeit vettük alapul. A hagyományos kapcsoltsági analízissel próbálkoztunk, vagyis kiszámoltuk, hogy a nem-szelektált markerek milyen gyakorisággal állnak szülői konfigurációban valamelyik szelektált markerrel. Így tulajdonképpen az allélarány értékeket kaptuk.

11 ötfaktoros keresztezésünk van (2. táblázat), az 1. és 2. sor-számúval azonban nem foglalkozunk, mivel ezekben hármas szelekciót alkalmaztunk.

A 3-11. keresztezésben a szülők megegyeznek:

P1: arg-, thy-, his-, trp-, rif+;

P2: arg+, thy+, his+, trp+, rif-.

A 10. és 11. keresztezésben az összes várható genotípust megkaptuk, a többiben nem.

A szelektált markereket a 2. táblázat mutatja.

Az adatokból levezethető markersorrendek:

3. his-arg-rif-thy-trp;
4. his-arg-rif-(thy-trp);
5. his-arg-rif-(thy-trp);
6. his-rif-arg-(thy-trp);
7. his-rif-arg-thy-trp;
8. his-arg-rif-(thy-trp);
9. his-arg-rif-(trp-thy);

10. his-arg-rif-trp-thy;

11. his-rif-arg-thy-trp.

Az eredményekből levonható következtetések:

1. az arginin és a rifampycin erősen kapcsoltak;

2. a timin és a triptofán is erősen kapcsoltak;

3. ha a kromoszómát cirkulárisnak fogadjuk el, az eredmények jól megfelelnek egymásnak.

Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy az allélek sorrendje valószínűleg:

his-(arg-rif)-(thy-trp).

Ezt nevezzük el A sorrendnek.

1.2. HATFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

Három hatfaktoros keresztezésünk van:

12. P1:Leu-Glu-Str-Arg+Thr+Thy+ X P2:Leu+Glu+Str+Arg-Thr-Thy-

13. P1:Leu-Glu-Rif-His+Thr+Trp+ X P2:Leu+Glu+Rif+His-Thr-Trp-

14. P1:Leu-Glu-Str-Arg+Thr+Thy+ X P2:Leu+Glu+Str+Arg-Thr-Thy-

Az allélarányok a következők:

No.	FC	P	arg	glu	str	thr	leu	thy
12	0,43	P1	0,031	0,000	0,000	[*] 1,000	0,974	0,638
		P2	<u>0,969</u>	1,000	<u>1,000</u>	0,000	0,026	0,362
		[*]						
14	0,50	P1	[*] <u>1,000</u>	0,009	0,000	0,026	0,031	0,143
		P2	<u>0,000</u>	<u>0,991</u>	<u>1,000</u>	0,974	0,969	0,857
		[*]						
13	0,75		rif	his	thr	leu	trp	glu
		P1	0,076	0,000	0,089	0,122	0,195	[*] <u>1,000</u>
		P2	0,924	1,000	0,911	0,878	0,805	<u>0,000</u>

(A * a szelektált markereket, az aláhúzás az egy kapcsoltsági csoportot alkotó értékeket jelöli.)

A 12.keresztezésből megtudjuk, hogy egy kapcsoltsági csoportban van a thr, leu és a thy, másokban pedig a str, glu és az arg. Kör alakú kromoszómát feltételezve a sorrend:

12. (leu-thr)-(glu,str)-arg-thy.

A 13. kísérlet adatai alapján a glu semmihez se kapcsolt, a his, rif, thr, leu, trp egy kapcsoltsági csoportban van. A sorrend:

13.a his-rif-thr-leu-trp-glu.

A rifampycin azonban a szelektált hisztidin másik oldalára is tehető, így a következő sorrendet kapjuk:

13.b rif-his-thr-leu-trp-glu.

A 14. keresztezésből az derül ki, hogy a streptomycinhez kapcsolt a glu, a thr, leu és a thy, az arginin pedig független tőlük. A levezethető markersorrend ugyanaz, mint a 12. kísérletben:

14.(leu-thr)-(glu,str)-arg-thy.

A kapott sorrendek egymással jól összhangba hozhatók.

A 12. és a 14. keresztezésből levezethető sorrend egyforma /a:leu-thr-(glu,str)-arg-thy; b:leu-(glu,str)-arg-thy-thr/.

A 13.-ban más allélek is szerepelnek; próbáljuk meg az ebből kapott sorrendet

/a. leu-thr-rif-his-glu-trp; b. leu-thr-his-rif-glu-trp/

összeegyeztetni az előzővel! A 12. és 14. kísérletből kapott két változat közül az a-t fogadjuk el, mert ezt erősíti meg a 13. keresztezés alapján levezetett leu-thr-glu-trp sorrend. Ha a 13.a sorrenddel dolgozunk, a következő eredményre jutunk:

H1. leu-thr-rif-his-(glu,str)-arg-thy-trp.

A b sorrendet véve a következő szekvenciát kapjuk:

H2. leu-thr-his-rif-(glu,str)-arg-thy-trp.

A kísérletek alapján a treonin egyik szomszédja a leucin, amely a thy-trp csoport mellett helyezkedik el; másik szomszédja vagy a hisztidin, vagy a rifampycin. Némi támpontot adhat az ötfaktoros keresztezésekből kapott A szekvencia. Ebben a timin-triptofán csoport egyik oldalán a rifampycin, másik oldalán a hisztidin áll. Vagyis a sorrend (thy,trp)-his-(arg)-rif. Ez alapján a 13. kísérletben a b sorrendet kell elfogadnunk, vagyis a treonin valószínűleg a leucin és hisztidin között található. A hatfaktoros kísérletekből eszerint a

leu-thr-his-rif-(glu,str)-arg-thy-trp

szekvencia a valószínű.

Az ötfaktoros kísérletekben kilencből hat esetben az arginin a hisztidin és a rifampycin között áll. Ez nem egyezik az itt kapott eredménnyel. Ha elfogadjuk, hogy a sorrend his-rif-arg, akkor az öt-és hatfaktoros kísérletek adatait összevetve felállítható egy alap szekvencia, amit nevezzünk el B szekvenciának:

leu-thr-his-rif-(str-glu)-arg-(thy-trp).

A továbbiakban ehhez hasonlítjuk a kapott eredményeket.

Ez a sorrend némi bizonytalansággal, de végülis ellentmondás nélkül állítható fel, ezért vesszük standard szekvenciának.

Azt azonban semmiképpen sem mondhatjuk, hogy ez az eredmény támadhatatlan, inkább csak egy valószínű sorrend.

1.3. HÉTFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

A 15. és a 16. keresztezésben 7 markerrel dolgoztunk. A szülők azonosak, csak a szelektált markerek változtak. A szülők:

P1: leu-glu-rif-ttc-his+thr+trp+;

P2: leu+glu+rif+ttc+his-thr-trp-.

Az allélarányok:

No.	FC	P	rif	his	thr	leu	trp	ttc	glu
				*					
15	0,12	P1	0,000	<u>1,000</u>	1,000	1,000	0,995	0,912	0,018
		P2	<u>1,000</u>	0,000	0,000	0,000	0,005	0,087	<u>0,982</u>
			*						
					*				
16	0,21	P1	1,000	0,923	1,000	1,000	0,958	0,295	0,000
		P2	0,000	0,077	0,000	0,000	0,042	<u>0,705</u>	<u>1,000</u>
									*

Milyen következtetéseket vonhatunk le ezekből az adatokból?

A 15. keresztezésből az derül ki, hogy a rif és a glu kapcsoltak, a his, thr, leu, trp, ttc pedig egy másik kapcsoltsági csoportot alkotnak. A felállítható sorrend:

(his,thr,leu,trp)-ttc-glu-rif.

A 16. keresztezésben a gluhoz a ttc van kapcsolva. A sorrend:

(thr,leu,rif)-trp-his-ttc-glu.

Itt már ellentmondással találkozunk, a hisztidint sehoggy sem tudjuk egyértelműen elhelyezni. A zárójelben lévő markerek pozíciójának változtatásával 30 sorrend állítható fel:

15. 1. his-thr-leu-trp-ttc-glu-rif

2. his-thr-trp-leu-ttc-glu-rif

3. his-leu-thr-trp-ttc-glu-rif

4. his-leu-trp-thr-ttc-glu-rif

5. his-trp-leu-thr-ttc-glu-rif

6. his-trp-thr-leu-ttc-glu-rif

7. thr-his-leu-trp-ttc-glu-rif
 8. thr-his-trp-leu-ttc-glu-rif
 9. thr-leu-his-trp-ttc-glu-rif
 10. thr-leu-trp-his-ttc-glu-rif
 11. thr-trp-his-leu-ttc-glu-rif
 12. thr-trp-leu-his-ttc-glu-rif
 13. leu-his-thr-trp-ttc-glu-rif
 14. leu-his-trp-thr-ttc-glu-rif
 15. leu-thr-his-trp-ttc-glu-rif
 16. leu-thr-trp-his-ttc-glu-rif
 17. leu-trp-his-thr-ttc-glu-rif
 18. leu-trp-thr-his-ttc-glu-rif
 19. trp-his-leu-thr-ttc-glu-rif
 20. trp-his-thr-leu-ttc-glu-rif
 21. trp-leu-his-thr-ttc-glu-rif
 22. trp-leu-thr-his-ttc-glu-rif
 23. trp-thr-his-leu-ttc-glu-rif
 24. trp-thr-leu-his-ttc-glu-rif
-
- 16.25. rif-thr-leu-trp-his-ttc-glu
 26. rif-leu-thr-trp-his-ttc-glu
 27. thr-leu-rif-trp-his-ttc-glu
 28. thr-rif-leu-trp-his-ttc-glu
 29. leu-thr-rif-trp-his-ttc-glu
 30. leu-rif-thr-trp-his-ttc-glu

Ha elfogadjuk azt, hogy a glu és a rif kapcsoltak, akkor elvethetjük a 27-30. variációkat. A 16. keresztezés szerint a rif mellett vagy leu vagy thr áll. Ez alapján figyelmen kívül hagyhatjuk az 1-7. és a 20-24. variációt és így 14 lehetséges sorrendünk marad:

15. 7. thr-his-leu-trp-ttc-glu-rif

8. thr-his-trp-leu-ttc-glu-rif

9. thr-leu-his-trp-ttc-glu-rif

10. thr-leu-trp-his-ttc-glu-rif

11. thr-trp-his-leu-ttc-glu-rif

12. thr-trp-leu-his-ttc-glu-rif

13. leu-his-thr-trp-ttc-glu-rif

14. leu-his-trp-thr-ttc-glu-rif

15. leu-thr-his-trp-ttc-glu-rif

16. leu-thr-trp-his-ttc-glu-rif

17. leu-trp-his-thr-ttc-glu-rif

18. leu-trp-thr-his-ttc-glu-rif

16.25. rif-thr-leu-trp-his-ttc-glu

26. rif-leu-thr-trp-his-ttc-glu

A 16. keresztezésből kapott két változat szerint leu vagy thr után a sorrend egyértelmű: trp-his-ttc-glu. Akkor a 15. kísérlet variációi közül kiesik a 7., 8., 9., 12., 13., 14., 15., 18. A 10. és a 25. megegyezik, így végül öt lehetséges sorrend marad:

11. rif-thr-trp-his-leu-ttc-glu

16. rif-leu-thr-trp-his-ttc-glu

17. rif-leu-trp-his-thr-ttc-glu

5. TÁBLÁZAT

AZ ÖT-, HAT- ÉS HÉTFAKTOROS KÍSÉRLETEKBŐL KAPOTT SORRENDEK

Sorszám	sorrend	szelekció
3.	his-arg-rif-thy-trp	rif+,thy+
4. 1.	his-arg-rif-thy-trp	rif+,thy+
2.	his-arg-rif-trp-thy	
5. 1.	his-arg-rif-thy-trp	rif+,thy+
2.	his-arg-rif-trp-thy	
6.	his-rif-arg-thy-trp	rif+,his+
2.	his-rif-arg-trp-thy	
7.	his-rif-arg-thy-trp	rif+,his+
8. 1.	his-arg-rif-thy-trp	rif+,trp+
2.	his-arg-rif-trp-thy	
9. 1.	his-arg-rif-thy-trp	rif+,trp+
2.	his-arg-rif-trp-thy	
10.	his-arg-rif-trp-thy	rif+,arg+
11.	his-rif-arg-thy-trp	rif+,arg+
A:	his-(arg-rif)-(thy-trp)	
12.1.	leu-thr-glu-str-arg-thy	thr+,str+
2.	leu-thr-str-glu-arg-thy	
3.	leu-glu-str-arg-thy-thr	
4.	leu-str-glu-arg-thy-thr	
	<u>leu-thr-(glu,str)-arg-thy</u>	
13.1.	leu-thr-rif-his-glu-trp	his+,glu+
2.	<u>leu-thr-his-rif-glu-trp</u>	
14.1.	leu-thr-glu-str-arg-thy	arg+,str+
2.	leu-thr-str-glu-arg-thy	
3.	leu-glu-str-arg-thy-thr	
4.	leu-str-glu-arg-thy-thr	
	<u>leu-thr-(glu,str)-arg-thy</u>	
15.1.	leu-his-trp-thr-rif-glu-ttc	rif+,his+
2.	leu-thr-trp-his-ttc-glu-rif	
3.	leu-trp-his-thr-ttc-glu-rif	
16.	rif-thr-leu-trp-his-ttc-glu	thr+,glu+
	rif-leu-thr-trp-his-ttc-glu	
B:	leu-thr-his-rif-(str-glu)-arg-ttc-(trp-thy)	

25. rif-thr-leu-trp-his-ttc-glu

26. rif-leu-thr-trp-his-ttc-glu

A hétfaktoros kísérletekből nem tudjuk megmondani, mi lehet az allélek sorrendje.

A korábbi keresztezések alapján a
leu-thr-his-rif-(str-glu)-arg-(trp-thy)
sorrendet fogadtuk el. Másképp felírva:
rif-(str-glu)-arg-(trp-thy)-leu-thr-his

Ha kihagyjuk azokat a markereket, melyek a hétfaktorosoknál nem szerepelnek, és bele vesszük a tetracyclint, amelynek a pozíciója itt teljesen egyértelmű, akkor ezt kapjuk:

rif-his-thr-leu-trp-ttc-glu.

A lehetséges szekvenciák közül a 25. felel meg legjobban a standardnak, csak a hisztidin van más pozícióban.

1.4. NYOLCFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

Összesen 21 nyolcfaktoros keresztezést végeztünk azt remélve, hogy ezekből sok információhoz jutunk (2. táblázat). Az allél-arány értékeket a 6. táblázat foglalja össze. Elemezzük végig ezeket a keresztezéseket!

A 17.-34. crossban a szülők:

P1: arg- leu- thy- thr+ his+ trp+ rif+ str-;

P2: arg+ leu+ thy+ thr- his- trp- rif- str+.

A 17.crossban arg+ trp+ szelekciót végeztünk. A lehetséges 64

6. TÁBLÁZAT

A NYOLCFAKTOROS KERESZTEZÉSEK ALLÉLARÁNYAI

No.	P	arg	rif	str	his	thr	leu	trp	thy
17.	P1	<u>* 0,000</u>	0,842	0,878	0,927	0,931	0,905	1,000	0,925
	P2	<u>1,000</u>	0,158	0,121	0,073	0,069	0,095	0,000	0,075
									*
18.	P1	0,158	0,276	0,329	0,196	0,355	0,000	<u>* 1,000</u>	0,793
	P2	<u>0,842</u>	0,724	0,671	0,804	0,645	<u>1,000</u>	0,000	0,207
									*
19.	P1	<u>* 0,000</u>	0,632	0,668	0,906	1,000	0,695	0,677	0,587
	P2	<u>1,000</u>	0,368	0,332	0,094	0,000	0,305	0,323	0,415
									*
20.	P1	0,694	0,616	0,639	0,744	<u>* 1,000</u>	0,000	0,456	0,310
	P2	<u>0,306</u>	0,384	0,361	0,256	0,000	<u>1,000</u>	0,543	0,689
									*
21.	P1	0,979	0,975	0,901	<u>* 1,000</u>	0,913	0,963	0,756	0,000
	P2	<u>0,021</u>	0,025	0,099	0,000	0,087	0,037	0,244	<u>1,000</u>
									*
22.	P1	0,778	0,781	0,798	0,844	0,841	0,824	<u>* 1,000</u>	0,000
	P2	<u>0,222</u>	0,219	0,202	0,156	0,159	0,176	0,000	<u>1,000</u>
									*
23.	P1	0,944	0,960	0,963	<u>* 1,000</u>	1,000	0,984	0,932	0,000
	P2	<u>0,056</u>	0,040	0,037	0,000	0,000	0,016	0,068	<u>1,000</u>
									*
24.	P1	0,804	0,869	0,895	0,913	0,953	0,015	<u>* 1,000</u>	0,000
	P2	<u>0,196</u>	0,131	0,105	0,087	0,047	<u>0,985</u>	0,000	<u>1,000</u>
									*
25.	P1	0,710	0,756	0,967	<u>* 1,000</u>	0,983	0,551	0,475	0,000
	P2	<u>0,290</u>	0,244	0,033	0,000	0,017	0,449	<u>0,525</u>	<u>1,000</u>
									*
26.	P1	0,628	0,758	0,914	0,961	<u>* 1,000</u>	0,000	0,616	0,469
	P2	<u>0,372</u>	0,242	0,086	0,039	0,000	<u>1,000</u>	<u>0,384</u>	<u>0,531</u>
									*

No.	P	arg	rif	str	his	thr	leu	trp	thy
27.	P1	<u>0,550</u>	[*] 0,000	<u>1,000</u>	0,780	0,789	0,587	0,578	0,642
	P2	0,450	<u>1,000</u>	0,000	0,220	0,211	0,413	0,422	0,358
				[*]					
28.	P1	[*] <u>0,000</u>	0,886	0,926	0,891	0,924	0,895	1,000	0,959
	P2	<u>1,000</u>	0,114	0,074	0,109	0,076	0,105	0,000	0,041
								[*]	
29.	P1	0,939	0,948	0,956	0,941	0,965	0,954	[*] <u>1,000</u>	0,000
	P2	0,061	0,052	0,044	0,059	0,035	0,046	0,000	<u>1,000</u>
									[*]
30.	P1	0,879	0,962	0,965	0,955	0,965	0,939	[*] <u>1,000</u>	0,000
	P2	0,121	0,038	0,035	0,045	0,035	0,061	0,000	<u>1,000</u>
									[*]
31.	P1	[*] <u>0,000</u>	0,889	0,901	0,885	0,898	0,898	1,000	0,930
	P2	<u>1,000</u>	0,111	0,099	0,115	0,102	0,102	0,000	0,070
								[*]	
32.	P1	0,541	0,598	<u>1,000</u>	0,430	0,386	[*] 0,000	<u>1,000</u>	0,836
	P2	0,459	0,402	0,000	<u>0,570</u>	0,614	<u>1,000</u>	0,000	0,164
								[*]	
33.	P1	0,839	0,898	0,917	0,698	0,628	[*] 0,000	<u>1,000</u>	0,920
	P2	0,161	0,102	0,083	0,302	0,372	<u>1,000</u>	0,000	0,080
								[*]	
34.	P1	0,923	0,993	0,998	[*] <u>1,000</u>	0,810	0,000	0,519	0,523
	P2	0,077	0,007	0,002	0,000	0,190	<u>1,000</u>	0,481	0,477
							[*]		
		<u>arg</u>	<u>ttc</u>	<u>rif</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>leu</u>	<u>trp</u>	<u>thy</u>
35.	P1	0,915	[*] 0,000	<u>1,000</u>	<u>1,000</u>	0,975	0,965	0,786	0,692
	P2	0,085	<u>1,000</u>	0,000	0,000	0,025	0,035	0,214	0,308
				[*]					
36.	P1	0,947	[*] 0,000	0,995	0,938	0,933	0,986	1,000	0,668
	P2	0,053	<u>1,000</u>	0,005	0,063	0,067	0,014	0,000	0,332
								[*]	
		<u>arg</u>	<u>ttc</u>	<u>str</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>leu</u>	<u>trp</u>	<u>thy</u>
37.	P1	[*] 0,000	<u>1,000</u>	0,532	0,616	0,619	0,420	0,637	0,616
	P2	<u>1,000</u>	0,000	0,460	0,384	0,381	<u>0,580</u>	0,363	0,384
			[*]						

genotípusból mindössze 16-ot kaptunk meg. Egy kapcsoltsági csoportot találunk, az arginin egyedül áll. Az arg, rif, str egymás közelében van, ez megfelel az eddigi eredményeknek. A thr, his, trp egymáshoz viszonyított pozícióját nem lehet egyértelműen megállapítani, mivel az allélarányok közti különbségek nagyon kicsik, nem vehetők szignifikánsnak. Az értékek alapján levezethető sorrend:

leu-(thr, his, thy)-trp-arg-rif-str.

Vagyis a következő variációk lehetségesek:

1. leu-thr-his-thy-trp-arg-rif-str;
2. leu-thr-thy-his-trp-rif-arg-str;
3. leu-his-thy-thr-trp-arg-rif-str;
4. leu-his-thr-thy-trp-arg-rif-str;
5. leu-thy-his-thr-trp-arg-rif-str;
6. leu-thy-thr-his-trp-arg-rif-str;

Az eddigi eredmények alapján a leu-thr-his sorrendet fogadjuk el, vagyis az 1. variációt.

A legkomplettebb mintát a 18. sorszámú kísérlet adta. A lehetséges 64 genotípusból itt 42-t kaptunk meg. Leucinra és triptofánra szelektáltunk. Az egyik kapcsoltsági csoportba a trp és a thy tartozik, a másikba az összes többi allél. A felállítható sorrend:

1. leu-arg-his-rif-str-thr-thy-trp,

vagy:

2. leu-his-rif-str-thr-thy-trp-arg.

Az eddigi adatoknak megfelel, hogy egymás mellett található a trp és a thy, valamint a his-rif-str. Az arginin és a treonin azonban máshol található, mint a standard sorrendben. A két variáció közül nem tudunk választani.

A 19. crossban treoninra és argininre szelektáltunk. 22 genotípust kaptunk az utódpopulációban. Az adatok alapján az arginin független, a többi marker egy kapcsoltsági csoportba tartozik. Az allélek sorrendje:

1. leu-his-thr-arg-thy-rif-str-trp;
2. leu-thr-his-arg-thy-rif-str-trp;

Mindkét sorrend nagyon különbözik a standard szekvenciától.

A 20. keresztezésben thr+, leu+ szelekciót végeztünk, 16 genotípust kaptunk meg. Két kapcsoltsági csoport van: a treoninhoz kapcsolt a hisztidin, a streptomycin, a rifampycin és az arginin, a leucinhez pedig a timin és a triptofán. A felállítható sorrendek:

1. leu-thr-his-arg-str-rif-trp-thy;
2. leu-his-thr-arg-str-rif-trp-thy.

Az első változat tűnik megfelelőbbnek, ahol a leu-thr-his és a trp-thy sorrend megegyezik a standard szekvenciával, valamint az is hasonló, hogy ezen két csoport között található az arg, rif, str; egymáshoz viszonyított sorrendjük azonban más.

A 21. crossban hisztidinre és timinre szelektáltunk, 13 genotípust kaptunk. Egy kapcsoltsági csoport van, a timin külön áll. Az

arginin és a rifampycin AR értékek között elenyészően kicsi a különbség, ez alapján nem lehet őket sorba rakni. A felállítható sorrend:

leu-thr-str-trp-thy-his-(rif,arg).

A variációk:

1. leu-thr-str-trp-thy-his-arg-rif;
2. leu-thr-str-trp-thy-his-rif-arg;

Ez a kísérlet is megerősíti, hogy az arg és a rif erősen kapcsol-
tak. A hisztidin a standard sorrendnek megfelelően az arg-rif
csoport közelében található, a trp a thy, a leu pedig a thr mel-
lett. Eddig azt mondtuk, a rif a his és az arg között helyezkedik
el, ennek megfelelően a 2. sorrendet fogadhatjuk el. Azonban,
ahogy az eddigiek, úgy ez sem egyezik az alapszekvenciával.

A 22. crossban timinre és triptofánra szelektáltunk, 12 genotí-
pust kaptunk. Egy kapcsoltsági csoportunk van, a timin külön áll.
A hisztidin és a treonin, valamint a rifampycin és az arginin AR
értékei között gyakorlatilag nincs differencia. A felállítható
sorrend:

leu-(thr,his)-trp-thy-(arg,rif)-str

A variációk:

1. leu-thr-his-trp-thy-arg-rif-str;
2. leu-thr-his-trp-thy-rif-arg-str;
3. leu-his-thr-trp-thy-arg-rif-str;
4. leu-his-thr-trp-thy-rif-arg-str;

Ha összehasonlítjuk ezeket B standard szekvenciánkkal, a 3. és 4. variációt elvethetjük, mivel ezekben a leucin a hisztidin mellett van, míg B-ben a treonin mellett. A standard szekvenciában rif-arg a sorrend, ez alapján a 2. változatot fogadhatjuk el. A szokásos 3 csoport megtalálható itt is (trp-thy, rif-arg-str és leu-thr-his), de egymáshoz viszonyított pozíciójuk más, mint amit eddig elfogadtunk.

A 23. keresztezésben his+, thy+ szelekciót végeztünk, 10 genotípust kaptunk. Ez a kísérlet ismét a his-thr erős kapcsoltságát bizonyítja. A következő sorrendbe rakhatjuk az alléleket:

leu-(thr,his)-thy-trp-arg-(rif,str).

A lehetséges variációk:

1. leu-thr-his-thy-trp-arg-rif-str;
2. leu-thr-his-thy-trp-arg-str-rif;
3. leu-his-thr-thy-trp-arg-rif-str;
4. leu-his-thr-thy-trp-arg-str-rif.

Ebből az első az, ami nagyon jól egyezik az előző crossból kapott egyik szekvenciával, viszont különbözik a másik his+, thy+ szelekcióból kapott eredménytől, és a standardtól is.

A 24. sorszámú keresztezésben timin, triptofán szelekciót alkalmaztunk, 15 genotípust találtunk. Két kapcsoltsági csoportunk van, az egyikbe tartozik a trp, thr, his, str, rif, arg, a másikba a thy és a leu. A következő sorrendeket állíthatjuk fel:

1. leu-thy-trp-thr-his-str-rif-arg,
2. leu-trp-thy-thr-his-str-rif-arg.

Megtaláljuk a szokásos csoportokat: trp-thy, thr-his, str-rif-arg, de a markerek pozíciói egymáshoz viszonyítva megváltoztak B-hez képest. A leucin a thy-trp és az arginin között helyezkedik el, ez sem egyezik a standard szekvenciával. A 22. keresztezésben szintén trp+, thy+ szelekciót alkalmaztunk, de a két kísérletből kapott sorrend nem egyezik.

A 25. crossban a szelekció his+, thy+ volt, a kapott rekombináns típusok száma 21.

Két kapcsoltsági csoportba oszthatók a markerek, az egyikben van a timin és a triptofán, a másikban a hisztidin, streptomycin, rifampycin, arginin, treonin és leucin. Itt két sorrendet állíthatunk fel:

1. leu-trp-thy-his-thr-str-rif-arg,
2. leu-trp-thy-thr-his-str-rif-arg.

A leu-...thr-his sorrend miatt a másodikat fogadjuk el. Ez meg egyezik az előző keresztezésből kapott 2. sorrenddel, de nem azonos a másik két his+,thy+ szelekcióból kapott szekvenciákkal, sem a standarddal.

A 26. crossban treoninra és leucinra szelektáltunk, 27-féle rekombináns kaptunk. A timin a leucinhoz kapcsolt, a triptofán, hisztidin, streptomycin, arginin és rifampycin pedig a treonin-



hoz. A markerek sorrendje ebben a kísérletben:

leu-(thr,his)-str-rif-arg-trp-thy.

A két variáció:

1. leu-thr-his-str-rif-arg-trp-thy;

2. leu-his-thr-str-rif-arg-trp-thy.

Az első szekvencia nagyon jó egyezést mutat a standarddal, csak a str pozíciója más. A 20. cross is leu+, thr+ szelekció volt, a két kísérletből kapott sorrend hasonló, csak annyi a különbség, hogy az arg áthelyeződött a trp mellől a his mellé.

A 27. keresztezésben rifampycinre és streptomycinre szelektáltunk, 13 genotípust kaptunk. A rif egyedül áll, a többi marker egy kapcsoltsági csoportot alkot. A markersorrend a számok alapján:

1. leu-trp-arg-rif-str-thr-his-thy;

2. leu-trp-arg-rif-thr-str-his-thy.

Mivel a leu és a trp AR értékei között kicsi a különbség, felcserélhetjük őket, így egy olyan szekvenciát kapunk, amely jobban hasonlít a standardhoz:

3. leu-arg-rif-str-thr-his-thy-trp

Az arg-rif-str, a thr-his és thy-trp csoportok itt is megvannak, de egymáshoz viszonyított helyzetük nem felel meg a standard szekvenciának; a leu is máshol található. Az arg csoporton belüli sorrend sem egyezik az alap szekvenciával.

A 28. keresztezésben arg^+ , trp^+ szelekciót alkalmaztunk, a megkapott genotípusok száma 16. Egy kapcsoltsági csoport van, az arginin egyedül áll. A str és a thr , valamint a rif , his és leu AR értékei között nincs szignifikáns különbség, ezek alapján nem lehet sorba rakni ezeket a markereket. A levezethető sorrend:

$(leu, his, rif) - arg - trp - thy - (str, thr)$.

Ebből sokféle variációt állíthatunk fel:

1. $leu - his - rif - arg - trp - thy - str - thr$;
2. $leu - his - rif - arg - trp - thy - thr - str$;
3. $leu - rif - his - arg - trp - thy - str - thr$;
4. $leu - rif - his - arg - trp - thy - thr - str$;
5. $rif - leu - his - arg - trp - thy - str - thr$;
6. $rif - leu - his - arg - trp - thy - thr - str$;
7. $rif - his - leu - arg - trp - thy - str - thr$;
8. $rif - his - leu - arg - trp - thy - thr - str$;
9. $his - rif - leu - arg - trp - thy - str - thr$;
10. $his - rif - leu - arg - trp - thy - thr - str$;
11. $his - leu - rif - arg - trp - thy - str - thr$;
12. $his - leu - rif - arg - trp - thy - thr - str$;

A 11. variáció hasonlít legjobban ahhoz, amit eddig elfogadtunk, de a str és a leu pozíciója más. A str elszakadt az arginin csoporttól, helyet cserélt a leucinnal. Ez a sorrend így is felírható:

$leu - his - thr - str - thy - trp - arg - rif$.

Ez hasonlít a másik arg^+ , trp^+ szelekcióból kapott sorrendekhez, de egyikkel sem egyezik meg.

A 29. crossban trp+, thy+ szelekciót végeztünk, 16-féle rekombinánsst kaptunk. Egy kapcsoltsági csoportunk van, a timin egyedül áll. Az AR értékek között olyan kicsi a differencia, hogy kérdéses, komolyan vehetjük-e őket, azaz ezekre támaszkodva sorba rakhatjuk-e a markereket. Ha szigorúan csak a számokat nézve mégis megpróbáljuk az eredményeket felhasználni, a következő szekvenciát kapjuk:

(leu,str)-(thr-trp)-thy-arg-his-rif.

Variációk:

1. leu-thr-trp-thy-arg-his-rif-str;
2. leu-str-thr-trp-thy-arg-his-rif;
3. leu-trp-thr-thy-arg-his-rif-str;
4. leu-str-trp-thr-thy-arg-his-rif;

Eddigi tapasztalataink szerint a timin és a triptofán szorosan kapcsolt, ezért a 3.-4. változattal nem foglalkozunk. Az első variációban a thr a leu mellett marad, s így jobban hasonlít az alapszekvenciához, mint a 2. Megtaláljuk az eddigi kapcsoltsági csoportokat (leu-thr; trp-thy; arg-his-rif-str;), de egymáshoz viszonyított helyzetük, valamint az arginin csoporton belüli sorrend nem egyezik a B szekvenciával. A kapott sorrend különbözik az eddigi trp+, thy+ szelekciókból kapottaktól is.

A 30. keresztezés ismét egy trp+, thy+ szelekció, a lehetséges rekombinánsok 15%-át kaptuk meg, összesen 10 genotípust. A thr, str, his és rif AR értékek között megint nincs szignifikáns

különbség. Ha ettől eltekintünk, a számok alapján a következő sorrend adható:

leu-his-rif-(thr,str)-trp-thy-arg.

Ennek megfelelően két változat közül választhatunk:

1. leu-his-rif-thr-str-trp-thy-arg;

2. leu-his-rif-str-thr-trp-thy-arg.

Eddigi tapasztalataink alapján tegyük egymás mellé a streptomycint és a rifampycint, akkor a 2. szekvenciát fogadjuk el. A standardhoz képest más pozícióban van az arg és a thr; a trp és a thy itt is kapcsolt. A többi trp+, thy+ szelekcióból származó sorrenddel nem egyezik ez a szekvencia.

A 31. keresztezésben arg+, trp+ a két szelektált marker, 16 genotípust kaptunk. Egy kapcsoltsági csoport van, az arginin külön áll. A thr és a leu AR értékei megegyeznek, nem különbözik tőlük szignifikánsan a streptomycinhez tartozó érték sem. A rif és a his között is elhanyagolható a különbség. Ismét tekintsünk el ettől, és csak a számokat nézve próbáljuk meg sorba rakni az alléleket! A következő szekvenciát kapjuk:

(leu,thr)-str-(thy,trp)-arg-his-rif.

Négy változat írható fel:

1. leu-thr-str-thy-trp-arg-his-rif;

2. thr-leu-str-thy-trp-arg-his-rif;

3. leu-thr-str-trp-thy-arg-his-rif;

4. thr-leu-str-trp-thy-arg-his-rif.

Egyik sem egyezik a standarddal, sem a másik arg+, trp+ szelekcióból kapott sorrenddel. Támpontot sem találunk annak eldöntéséhez, melyik változatot fogadjuk el. A trp-thy azonban itt is egymás mellett található.

A 32. kísérletben leu+, trp+ szelekciót alkalmaztunk, 28 genotípust kaptunk. Két kapcsoltsági csoport van, az egyikbe a leu, thr, his tartozik, a másikba a trp, thy, arg, rif, str. A felállítható markersorrend:

leu-thr-his-arg-rif-thy-(str,trp).

A timint és a triptofánt egymás mellé rakhatjuk:

leu-thr-his-arg-rif-thy-trp-str.

A B szekvenciához viszonyítva arg-rif és trp-thy helyet cserélt, str pedig kilépett az arginin csoportból és új pozícióban található. A másik leu+, trp+ szelekció sorrendjével ez a szekvencia nem egyezik.

A 33. keresztezésben ismét leu+, trp+ szelekciót alkalmaztunk, 27-féle rekombináns kaptunk. Itt csak egy kapcsoltsági csoport van, a leu szabadon áll. A str és a thy értékek között elhanyagolható a különbség, így a levezethető sorrend:

leu-thr-his-arg-rif-(thy,str)-trp.

A két variáció:

1. leu-thr-his-arg-rif-thy-str-trp; és
2. leu-thr-his-arg-rif-str-thy-trp.

A második az, amely jobban megfelel korábbi tapasztalatainknak. B-hez viszonyítva csak annyi a különbség, hogy arg-rif és trp-thy helyet cserélt a csoporton belül. Hasonlítsuk össze a másik két leu+, trp+ szelekcióval! A 18. keresztezésből kapott szekvenciától jelentősen különbözik, a 32.-ből kapottal viszont majdnem megegyezik, csak a str van más pozícióban.

A 34. kísérletben hisztidinre és leucinra szelektáltunk, 17 genotípust kaptunk meg a 64-ből. Egy kapcsoltsági csoport van, a leu egyedül áll. A rif és a str, valamint a trp és a thy AR értékei között nagyon kicsi a különbség. A felállítható sorrend:

leu-(trp,thy)-thr-arg-(rif,str,his).

Ebből a következő variációkat írhatjuk fel:

1. leu-trp-thy-thr-arg-rif-str-his;
2. leu-trp-thy-thr-arg-rif-his-str;
3. leu-trp-thy-thr-arg-str-rif-his;
4. leu-trp-thy-thr-arg-str-his-rif;
5. leu-trp-thy-thr-arg-his-rif-str;
6. leu-trp-thy-thr-arg-his-str-rif,
7. leu-thy-trp-thr-arg-rif-str-his;
8. leu-thy-trp-thr-arg-rif-his-str;
9. leu-thy-trp-thr-arg-str-rif-his;
10. leu-thy-trp-thr-arg-str-his-rif;
11. leu-thy-trp-thr-arg-his-rif-str;
12. leu-thy-trp-thr-arg-his-str-rif.

A timin-csoport itt a leucin és a treonin közé került. A thr másik oldalán az arginin található, ez sem egyezik a standarddal. Az arginin-csoporton belüli sorrend alapján az 5. és a 11. változat a leginkább elfogadható.

A 35. kísérletben a str helyett a ttc marker lép be; a szülők:

P1: arg- leu- thy- thr+ his+ trp+ rif- ttc-;

P2: arg+ leu+ thy+ thr- his- trp- rif+ ttc+.

Hisztidinre és tetracyclinre szelektáltunk, a kapott genotípusok száma csupán 12. Egy kapcsoltsági csoport van, a ttc külön áll. A his és a rif erősen kapcsoltak. A sorrend:

leu-thr-(his,rif)-ttc-thy-trp-arg.

Két variációt írhatunk le:

1. leu-thr-his-rif-ttc-thy-trp-arg;

2. leu-thr-rif-his-ttc-thy-trp-arg.

Az 1. hasonlít legjobban a standard szekvenciára, mindössze annyi a különbség, hogy az arg kilépett a csoportjából és áthelyeződött a trp és a leu közé.

A 36. crossban a szülők ugyanazok, mint a 35.-ben, a szelekció trp+, ttc+. Mindössze 9 genotípust kaptunk. Egy kapcsoltsági csoport van, a ttc egyedül áll. A his és thr, valamint a trp és a rif AR értékei között nagyon kicsi a különbség. A felállítható sorrend:

leu-arg-(his,thr)-thy-ttc-(trp-rif).

A variációk:

1. leu-arg-his-thr-thy-ttc-trp-rif;
2. leu-arg-thr-his-thy-ttc-trp-rif;
3. leu-arg-his-thr-thy-ttc-rif-trp;
4. leu-arg-thr-his-thy-ttc-rif-trp.

A standardhoz képest eléggé összekuszálódott a sorrend, a trp és a thy elszakadt egymástól, arg is a rif-től és leu a his-thr csoporttól.

A 37. kísérlet az utolsó nyolcfaktoros keresztezés, a szülők:

P1: arg- leu- thy- thr+ his+ trp+ str- ttc+;

P2: arg+ leu+ thy+ thr- his- trp- str+ ttc-.

Argininre és tetracyclinre szelektáltunk, 23 genotípust kaptunk. Két kapcsoltsági csoport van, az argininhez kapcsolt a leucin, a tetracyclinhez a többi marker. A his és a thy AR értékei megegyeznek, nem különbözik tőlük szignifikánsan a treoninhoz tartozó érték sem. A felállítható sorrend:

leu-str-(thr,his,thy)-trp-ttc-arg.

A lehetséges variációk:

1. leu-arg-ttc-trp-thr-his-thy-str;
2. leu-arg-ttc-trp-thr-thy-his-str;
3. leu-arg-ttc-trp-his-thr-thy-str;
4. leu-arg-ttc-trp-his-thy-thr-str;
5. leu-arg-ttc-trp-thy-thr-his-str;
6. leu-arg-ttc-trp-thy-his-thr-str.

Az arg-ttc-trp-thy szekvencia megfelel a standardnak, ez alapján kiesik az első négy változat; az alapszekvenciában leu-thr-his a sorrend, ez alapján az 5. változat a legelfogadhatóbb.

A nyolcfaktoros keresztezések kiértékelése nem volt könnyű feladat. Minden esetben segítségül kellett hívnunk az öt- és hatmarkeres kísérletekből kapott alapszekvenciát. Enélkül nem tudtunk volna választani a lehetséges variációk közül. Ez viszont azt jelenti, hogy ezek a keresztezések nem szolgáltatottak új információkat. A keresztezésben résztvevő allélek számának növelésével tehát nem értük el a kívánt célt, a korábban megállapított marker-sorrend nem vált egyértelműbbé, sőt a bizonytalanság tovább nőtt.

Mindegyik kísérletből legalább két sorrend vezethető le. A 29. és 30. keresztezést teljesen figyelmen kívül hagyhatjuk, mert az allélarány értékek közti különbségek nagyon kicsik. Sajnos, a legtöbb nyolcfaktoros keresztezésre igaz az, hogy az AR értékek közti különbségek nem elég nagyok ahhoz, hogy szignifikánsnak mondhassuk őket.

Az összes nyolcfaktoros keresztezés összehasonlításakor csak néhány egyforma szekvenciát találunk:

17.1. (arg+,trp+ szelekció) = 23. 1. (thy+,his+ szelekció)

17.4. (arg+,trp+ szelekció) = 23. 3. (thy+,his+ szelekció)

18.2. (leu+,trp+ szelekció) = 28.12. (arg+,trp+ szelekció)

24.2. (thy+,trp+ szelekció) = 25. 2. (thy+,his+ szelekció)

25.1. (thy+,his+ szelekció) = 27. 3. (rif+,str+ szelekció)

28.2. (arg+,trp+ szelekció) = 31. 1. (arg+,trp+ szelekció)

32.1. (leu+,trp+ szelekció) = 33. 1. (leu+,trp+ szelekció)

A hét párból mindössze kettő olyan van, ahol az egyforma szekvenciák azonos szelekcióból származnak. Be kell látnunk, hogy ezekből a kísérletekből nem vonhatunk le olyan következtetéseket, melyek kellőképpen alá lennének támasztva.

1.5. KILENCFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

Öt kilencfaktoros keresztezésünk van.

A 38. keresztezésben a szülők:

P1: arg- leu- thy- thr+ his+ trp+ str+ ttc+ rif-;

P2: arg+ leu+ thy+ thr- his- trp- str- ttc- rif+.

His+, leu+ szelekciót végeztünk, a lehetséges 128-ból 30 genotípust kaptunk meg. Két kapcsoltsági csoport van: a hisztidinhez kapcsolt a treonin, a leucinhez a triptofán, timin, arginin, tetracyclin, rifampycin. A streptomycin független. A felállítható sorrend:

(leu,ttc)-trp-thy-arg-rif-str-thr-his.

A két lehetséges változat:

1. leu-ttc-trp-thy-arg-rif-str-thr-his;

2. ttc-leu-trp-thy-arg-rif-str-thr-his.

Az első változatban egy csoportban maradt a thr-his-leu, ezért inkább ezt a sorrendet fogadjuk el. Megtalálható a másik két

7. TÁBLÁZAT

A NYOLCFAKTOROS KERESZTEZÉSEKBŐL KAPOTT SORRENDEK

Sorszám	sorrend	szelekció
A:	his-(rif-arg)-(trp-thy)	
B:	leu-thr-his-rif-(str,glu)-arg-ttc-(thy,trp)	
17.	leu-(thr,his,thy)-trp-arg-rif-str	arg+,trp+
1.	<u>leu-thr-his-thy-trp-arg-rif-str</u>	
2.	leu-thr-thy-his-trp-rif-arg-str	
3.	leu-his-thy-thr-trp-arg-rif-str	
4.	leu-his-thr-thy-trp-arg-rif-str	
5.	leu-thy-his-thr-trp-arg-rif-str	
6.	leu-thy-thr-his-trp-arg-rif-str	
18.	(leu,arg)-his-rif-str-thr-thy-trp	leu+,trp+
1.	leu-arg-his-rif-str-thr-thy-trp	
2.	leu-his-rif-str-thr-thy-trp-arg	
19.	leu-(his,thr)-arg-thy-rif-str-trp	arg+,thr+
1.	leu-his-thr-arg-thy-rif-str-trp	
2.	leu-thr-his-arg-thy-rif-str-trp	
20.	leu-(thr,his)-arg-str-rif-trp-thy	leu+,thr+
1.	<u>leu-thr-his-arg-str-rif-trp-thy</u>	
2.	leu-his-thr-arg-str-rif-trp-thy	
21.	leu-thr-str-trp-thy-his-(rif,arg)	his+,thy+
1.	leu-thr-str-trp-thy-his-arg-rif	
2.	<u>leu-thr-str-trp-thy-his-rif-arg</u>	
22.	leu-(thr,his)-trp-thy-(arg,rif)-str	trp+,thy+
1.	leu-thr-his-trp-thy-arg-rif-str	
2.	<u>leu-thr-his-trp-thy-rif-arg-str</u>	
3.	leu-his-thr-trp-thy-arg-rif-str	
4.	leu-his-thr-trp-thy-rif-arg-str	
23.	leu-(thr,his)-thy-trp-arg-(rif,str)	his+,thy+
1.	<u>leu-thr-his-thy-trp-arg-rif-str</u>	
2.	leu-thr-his-thy-trp-arg-str-rif	
3.	leu-his-thr-thy-trp-arg-rif-str	
4.	leu-his-thr-thy-trp-arg-str-rif	

Sorszám	sorrend	szelekció
24.	leu-(trp,thy)-thr-his-str-rif-arg	trp+,thy+
1.	<u>leu-thy-trp-thr-his-str-rif-arg</u>	
2.	leu-trp-thy-thr-his-str-rif-arg	
25.	leu-trp-thy-(his,thr)-str-rif-arg	his+,thy+
1.	leu-arg-rif-str-thr-his-thy-trp	
2.	<u>leu-trp-thy-thr-his-str-rif-arg</u>	
26.	leu-(thr,his)-str-rif-arg-trp-thy	leu+,thr+
1.	<u>leu-thr-his-str-rif-arg-trp-thy</u>	
2.	leu-his-thr-str-rif-arg-trp-thy;	
27.	leu-thy-his-(str,thr)-rif-arg-trp	rif+,str+
1.	leu-thy-his-thr-str-rif-arg-trp	
2.	leu-thy-his-str-thr-rif-arg-trp	
3.	<u>leu-trp-thy-his-thr-str-rif-arg</u>	
28.	(leu,his,rif)-arg-trp-thy-(str,thr)	arg+,trp+
1.	leu-thr-str-thy-trp-arg-rif-his	
2.	leu-thr-str-thy-trp-arg-his-rif	
3.	leu-rif-his-thr-str-thy-trp-arg	
4.	leu-rif-his-arg-trp-thy-thr-str	
5.	leu-rif-thr-str-thy-trp-arg-his	
6.	leu-his-rif-thr-str-thy-trp-arg	
7.	leu-his-rif-arg-trp-thy-thr-str	
8.	leu-his-thr-str-thy-trp-arg-rif	
9.	leu-his-arg-trp-thy-thr-str-rif	
10.	leu-his-str-thr-thy-trp-arg-rif	
11.	<u>leu-rif-his-str-thr-thy-trp-arg</u>	
12.	leu-his-rif-str-thr-thy-trp-arg	
29.	(leu,str)-(thr-trp)-thy-arg-his-rif	trp+,thy+
1.	<u>leu-thr-trp-thy-arg-his-rif-str</u>	
2.	leu-str-thr-trp-thy-arg-his-rif	
3.	leu-trp-thr-thy-arg-his-rif-str	
4.	leu-str-trp-thr-thy-arg-his-rif	
30.	leu-his-rif-(thr,str)-trp-thy-arg	trp+,thy+
1.	leu-his-rif-thr-str-trp-thy-arg	
2.	<u>leu-his-rif-str-thr-trp-thy-arg</u>	
31.	(leu,thr)-str-(thy,trp)-arg-his-rif	arg+,trp+
1.	leu-thr-str-thy-trp-arg-his-rif	
2.	leu-thr-rif-his-arg-trp-thy-str	

Sorszám	sorrend	szelekció
	3. leu-thr-str-trp-thy-arg-his-rif	
	4. leu-thr-rif-his-arg-thy-trp-str	
32.	leu-thr-his-arg-rif-thy-(str,trp)	leu+,trp+
	1. leu-thr-his-arg-rif-thy-str-trp	
	2. <u>leu-thr-his-arg-rif-thy-trp-str</u>	
33.	leu-thr-his-arg-rif-(thy,str)-trp	leu+,trp+
	1. leu-thr-his-arg-rif-thy-str-trp	
	2. <u>leu-thr-his-arg-rif-str-thy-trp</u>	
34.	leu-(trp,thy)-thr-arg-(rif,str,his)	his+,leu+
	1. leu-trp-thy-thr-arg-rif-str-rif	
	2. leu-trp-thy-thr-arg-rif-his-str	
	3. leu-trp-thy-thr-arg-str-his-rif	
	4. leu-trp-thy-thr-arg-str-his-rif	
	5. <u>leu-trp-thy-thr-arg-his-rif-str</u>	
	6. leu-trp-thy-thr-arg-his-str-rif	
	7. leu-thy-trp-thr-arg-rif-str-his	
	8. leu-thy-trp-thr-arg-rif-his-str	
	9. leu-thy-trp-thr-arg-str-rif-his	
	10. leu-thy-trp-thr-arg-str-his-rif	
	11. leu-thy-trp-thr-arg-his-rif-str	
	12. leu-thy-trp-thr-arg-his-str-rif	
35.	leu-thr-(his,rif)-ttc-thy-trp-arg	his+,ttc+
	1. <u>leu-thr-his-rif-ttc-thy-trp-arg</u>	
	2. leu-thr-rif-his-ttc-thy-trp-arg	
36.	leu-arg-(his,thr)-thy-ttc-(trp-rif)	trp+,ttc+
	1. leu-arg-his-thr-thy-ttc-trp-rif	
	2. leu-arg-thr-his-thy-ttc-trp-rif	
	3. leu-arg-his-thr-thy-ttc-rif-trp	
	4. leu-arg-thr-his-thy-ttc-rif-trp	
37.	leu-arg-ttc-trp-(thr,his,thy)-str	arg+,ttc+
	1. leu-arg-ttc-trp-thr-his-thy-str	
	2. leu-arg-ttc-trp-thr-thy-his-str	
	3. leu-arg-ttc-trp-his-thr-thy-str	
	4. leu-arg-ttc-trp-his-thy-thr-str	
	5. <u>leu-arg-ttc-trp-thy-thr-his-str</u>	
	6. leu-arg-ttc-trp-thy-his-thr-str	

8. TÁBLÁZAT

A KILENCFAKTOROS KERESZTEZÉSEK ALLÉLARÁNYAI

No.	P	arg	ttc	rif	str	his	thr	leu	trp	thy
38.										
	P1	0,253	0,041	0,318	0,500	<u>1,000</u>	0,635	0,000	0,206	0,235
	P2	<u>0,747</u>	<u>0,959</u>	<u>0,682</u>	0,500	0,000	<u>0,365</u>	<u>1,000</u>	0,794	<u>0,765</u>
39.										
	P1	0,138	0,126	0,000	0,004	<u>1,000</u>	0,748	0,622	0,553	0,513
	P2	<u>0,862</u>	<u>0,874</u>	<u>1,000</u>	<u>0,996</u>	0,000	0,252	0,378	0,447	0,488
40.										
	P1	<u>0,840</u>	<u>0,623</u>	<u>0,920</u>	<u>0,943</u>	<u>1,000</u>	0,948	0,000	0,759	0,571
	P2	0,160	0,377	0,080	0,057	0,000	<u>0,052</u>	<u>1,000</u>	0,241	0,429
41.										
	P1	0,000	<u>1,000</u>	0,996	0,993	0,972	0,982	0,810	0,880	0,109
	P2	<u>1,000</u>	0,000	0,004	0,007	0,028	0,018	0,190	0,120	<u>0,891</u>
42.										
	P1	<u>0,751</u>	0,000	<u>0,956</u>	<u>0,983</u>	<u>1,000</u>	0,939	0,498	0,354	0,007
	P2	0,249	<u>1,000</u>	0,044	0,017	0,000	0,061	0,502	<u>0,646</u>	<u>0,993</u>

kapcsoltsági csoport is, de a csoportok egymáshoz viszonyított pozíciója más, mint a standard. A ttc egyik szomszédja a trp, mint B-ben, de a másik szomszéd rif helyett a leu.

A 39. keresztezésben a szülők ugyanazok, mint a 38.-ban, de itt hisztidinre és rifampycinre szelektáltunk. 21-féle rekombinánt kaptunk. Itt is két kapcsoltsági csoport van, a rifampycinhez kapcsolt a str, ttc, arg; a hisztidinhez a thr, leu, trp, thy. Valójában a timin olyan közel áll a 0,500-as értékhez, hogy függetlennek is vehető. Az arg-ttc és a rif-str AR értékei közötti különbség sem tekinthető szignifikánsnak. A következő sorrendet tudjuk felállítani:

leu-(thr,his)-(rif,str)-ttc-arg-thy-trp.

Négy variációt írhatunk fel:

1. leu-thr-his-rif-str-ttc-arg-thy-trp;
2. leu-thr-his-str-rif-ttc-arg-thy-trp;
3. thr-leu-his-rif-str-ttc-arg-thy-trp;
4. thr-leu-his-str-rif-ttc-arg-thy-trp.

Az 1. változat majdnem tökéletesen megegyezik a standard szekven-
ciával, csupán a ttc található más pozícióban.

A 40. crossban a szülők megegyeznek az előző két kilencfaktoros kísérletben használtakkal, a szelekció his+, leu+. 30 genotípust kaptunk az utódnemzedékben. Itt egy kapcsoltsági csoport van, a leucin külön áll. A streptomycin és a treonin AR értékei között

elhanyagolhatóan kicsi a különbség. A felállítható sorrend:

leu-his-(str,thr)-rif-arg-thy-trp-ttc.

Az alapszekvencia szerint a streptomycint a rif mellé kell tenni, így a sorrendünk:

leu-his-thr-str-rif-arg-thy-trp-ttc.

A treonin lehet a hisztidin másik oldalán is, ez a sorrend jobban megfelel a standardnak, a különbség a str és a ttc pozíciójában van:

leu-thr-his-str-rif-arg-thy-trp-ttc.

A 41. keresztezésben a szülők változatlanok, a szelekció arg+, ttc+. 14 genotípust kaptunk. A timin az argininhez kapcsolt, a többi marker a tetracyclinhez. A ttc-rif és a rif-str közötti különbségek elhanyagolhatóak. Szigorúan a számok alapján a következő sorrend állítható fel:

leu-trp-his-thr-(rif,str)-ttc-arg-thy.

Akár a streptomycint tesszük a treonin mellé, akár a rifampycint, azt látjuk, hogy a standardhoz képest a markersorrend teljesen összezavarodott.

A 42. keresztezés az utolsó. Itt a szülők:

P1: arg- leu- thy- thr+ his+ trp+ str+ ttc- rif-;

P2: arg+ leu+ thy+ thr- his- trp- str- ttc+ rif+.

Tetracyclinre és hisztidinre szelektáltunk, 16 genotípust kaptunk. Két kapcsoltsági csoport van, a tetracyclinhez kapcsolt a

triptofán és a timin, a hisztidinhez a rif, str, thr, arg, a leucin pedig független. A következő sorrendet állíthatjuk fel:

leu-arg-thr-rif-(str,his)-ttc-thy-trp.

Ez a sorrend is, mint az előző, nagymértékben eltér a standard szekvenciától.

A kilencfaktoros keresztezésekben kapott sorrendek között két egyformát találunk:

38.1. (his+,leu+ szelekció) = 40.2. (his+,leu+ szelekció)

Ez a két szekvencia azonos szelekcióból származik, de nem egyezik meg a standarddal. A kilencfaktoros keresztezésekről ugyanazt mondhatjuk el, mint a nyolcfaktorosokról: a viszonyító szekvenciákra szükség volt az elemzésnél; új információkat nem szereztünk, és az allélarány értékek közötti különbségek sok helyen nagyon kicsik.

9. TÁBLÁZAT

A KILENCFAKTOROS KERESZTEZÉSEKBŐL KAPOTT SORRENDEK

Sorszám	sorrend	szelekció
A:	his-rif-arg-(trp-thy)	
B:	leu-thr-his-rif-(str,glu)-arg-ttc-(trp,thy)	
38.	(leu,ttc)-trp-thy-arg-rif-str-thr-his	his+,leu+
1.	<u>leu-ttc-trp-thy-arg-rif-str-thr-his</u>	
2.	leu-trp-thy-arg-rif-str-thr-his-ttc	
39.	leu-(thr,his)-(rif,str)-ttc-arg-thy-trp	rif+,his+
1.	<u>leu-thr-his-rif-str-ttc-arg-thy-trp</u>	
2.	leu-thr-his-str-rif-ttc-arg-thy-trp	
3.	leu-his-rif-str-ttc-arg-thy-trp-thr	
4.	leu-his-str-rif-ttc-arg-thy-trp-thr	
40.	leu-his-(str,thr)-rif-arg-thy-trp-ttc	his+,leu+
1.	leu-his-str-thr-rif-arg-thy-trp-ttc	
2.	leu-his-thr-str-rif-arg-thy-trp-ttc	
3.	<u>leu-thr-his-str-rif-arg-thy-trp-ttc</u>	
41.	leu-trp-his-thr-(rif,str)-ttc-arg-thy	arg+,ttc+
1.	leu-trp-his-thr-rif-str-ttc-arg-thy	
2.	leu-trp-his-thr-str-rif-ttc-arg-thy	
42.	leu-arg-thr-rif-(str,his)-ttc-thy-trp	his+,ttc+
1.	leu-arg-thr-rif-str-his-ttc-thy-trp	
2.	leu-arg-thr-rif-his-str-ttc-thy-trp	

2. PATTERN ANALÍZIS

Kísérleteink kiértékelése a hagyományos módon nem hozott egyértelmű eredményt. Megpróbáltuk a donor-recipiens megközelítést használni, de ez sem bizonyult hatékonyabbnak. Ekkor vetődött fel az a kérdés, hogy egyáltalán megfelelőek-e a mintáink? Két kivételtől eltekintve mindig kevesebb rekombinánst kaptunk az elméletileg várhatónál. Lehet-e egy ilyen csonkított mintát analízisre használni? Mikor tekinthetünk egy mintát megfelelőnek? Erre a problémára ad választ a pattern-analízis elmélete.

Nézzük meg, milyen eredményre jutunk, ha mintáinkat ezzel a módszerrel vizsgáljuk!

Az analízis logikája a következő: változtassuk teljesen önkényesen a szelektált markerek pozícióját. Mint tudjuk, a cross over mintázatot vagy más szóval patternt a nem-szelektált markerek pozíciója nem befolyásolja. Vegyük pl. azt az esetet, amikor a két szelektált allél egymás mellett van. Ekkor egy rekombináns osztálynak kell létrejönnie egyszeres crossing overrel, háromnak kétszeressel, háromnak háromszorossal és egynek négyszeressel (3. táblázat). Mivel a követelmény csak annyi, hogy egymás mellett legyenek a szelektált markerek, sok olyan sorrendet írhatunk le, amelyben ez a feltétel teljesül. Vegyünk ezek közül egyet. Nézzük meg, hogy ha ez lenne az allélek szekvenciája, akkor az adott kísérletben kapott rekombináns utódok közül melyeknek kellett egyszeres, kétszeres, stb. crossing overrel létrejönniük. Ezután

számoljuk meg, hány rekombináns osztály tartozik a különböző cross over osztályokba és hasonlítsuk össze az így kapott mintázatot az elméletivel. Ha azzal teljesen megegyezik, akkor a mintánk komplett. Ha a többszörös cross over részről hiányoznak rekombinánsok, de a többi cross over osztály mintázata megegyezik az elméletivel, akkor a minta inkomplett, de szabályos és analízisre használható. Ha random módon hiányoznak genotípusok a különböző cross over osztályokból, akkor a minta nem szabályos, nem foglalkozunk vele tovább.

Ha azt kapjuk, hogy a sorrendhez tartozó pattern szabályos, akkor továbbléphetünk és megnézhetjük, hogy a kísérleti adatok alapján hány egyed tartozik az egyes cross over osztályokba. Mivel legnagyobb gyakorisággal az egyszeres crossing overrel létrejövő rekombinánsok találhatók egy keresztezés utódnemzedékében, az egyszeres cross over osztályba tartozó rekombinánsoknak kell a legnagyobb egyedszámot képviselniük, ennél lényegesen kevesebb egyednek kell lenni a kétszeres, még kevesebbnek a háromszoros cross over osztályban, és így tovább. Ha az egyedszámok nem felelnek meg ennek a követelménynek, akkor ez a sorrend nem lehet helyes. Miután eldöntöttük, hogy a sorrend helyes lehet-e vagy sem, vesszük a következő szekvenciát, ugyanígy megvizsgáljuk, és így tovább az összes lehetséges variációt.

Egy-egy kísérlet esetén olyan sok variáció létezik (öt marker esetén pl. már 120), hogy a számítógéppel csak azokat nyomtattuk ki, amelyeknél a kísérleti adatokból kapott cross over mintázat a legjobban megfelel az elméletinek. Így a dolgozatban is csak ezekkel foglalkozom.

10. TÁBLÁZAT

AZ ÖTFAKTOROS KERESZTEZÉSEK UTÓDPOPULÁCIÓI

Szülők	ARG	RIF	HIS	TRP	THY	
P1	-	+	-	-	-	
P2	+	-	+	+	+	
Rekombinánsok	ARG	RIF	HIS	TRP	THY	Egyedszám
3. CROSS						
1.	-	+	+	+	+	121
2.	-	+	-	+	+	115
3.	-	+	-	-	+	17
4.	-	+	+	-	+	3
5.	+	+	-	+	+	1
6.	+	+	+	+	+	8
Összesen:						265
4. CROSS						
1.	-	+	+	+	+	153
2.	-	+	-	+	+	28
3.	-	+	-	-	+	4
4.	-	+	+	-	+	7
5.	+	+	-	-	+	1
6.	+	+	-	+	+	4
7.	+	+	+	+	+	21
Összesen:						217
5. CROSS						
1.	-	+	+	+	+	154
2.	-	+	-	+	+	63
3.	-	+	-	-	+	7
4.	+	+	-	-	+	1
5.	+	+	-	+	+	12
6.	+	+	+	-	+	1
7.	+	+	+	+	+	32
Összesen:						270

Rekombinánsok	ARG	RIF	HIS	TRP	THY	Egyedszám
---------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----------

6. CROSS

1.	-	+	+	+	+	254
2.	-	+	+	-	+	1
3.	-	+	+	-	-	1
4.	+	+	+	-	+	1
5.	+	+	+	+	+	18
Összesen:						275

7. CROSS

1.	-	+	+	+	+	203
2.	-	+	+	-	+	5
3.	-	+	+	+	-	8
4.	+	+	+	-	-	3
5.	+	+	+	-	+	1
6.	+	+	+	+	-	2
7.	+	+	+	+	+	28
Összesen:						250

8. CROSS

1.	-	+	+	+	+	119
2.	-	+	-	+	+	139
3.	+	+	-	+	+	6
4.	+	+	+	+	+	11
						275

9. CROSS

1.	-	+	+	+	+	162
2.	-	+	-	+	+	18
3.	-	+	+	+	-	12
4.	+	+	+	+	-	2
5.	+	+	+	+	+	27
Összesen:						221

Rekombinációk	ARG	RIF	HIS	TRP	THY	Egyedszám
---------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----------

10. CROSS

1.	+	+	+	+	+	171
2.	+	+	-	-	+	11
3.	+	+	-	+	-	3
4.	+	+	+	-	-	15
5.	+	+	-	-	-	15
6.	+	+	+	+	-	20
7.	+	+	+	-	+	18
8.	+	+	-	+	+	12

Összesen:						265
-----------	--	--	--	--	--	-----

11. CROSS

1.	+	+	+	+	+	288
2.	+	+	-	-	+	36
3.	+	+	-	+	-	3
4.	+	+	+	-	-	15
5.	+	+	-	-	-	15
6.	+	+	+	+	-	21
7.	+	+	+	-	+	23
8.	+	+	-	+	+	134

Összesen:						535
-----------	--	--	--	--	--	-----

2.1. ÖTFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

A 3. táblázatból láthatjuk, hogy 5 marker esetén 4 cross over osztályt kell kapnunk: az egyszeres, kétszeres, háromszoros és négyszeres crossing over osztályokat. Attól függően, hogy a két szelektált marker között hány nem-szelektált található, ezekben az osztályokban különböző számú rekombináns típusoknak kell jelenlenniük. Az egyes szekvenciákhoz tartozó számsorok közül az első mindig az elméletileg várható, a második az adott szekvenciához tartozó kísérleti értékeket mutatja, a harmadik pedig azt, hogy az adott cross over osztályokba ilyen sorrend esetén hány darab kolónia tartozik. Az aláhúzás a szelektált markereket jelöli.

Az ötfaktoros keresztezésekben a szülők:

P1: arg-, thy-, his-, trp-, rif+;

P2: arg+, thy+, his+, trp+, rif-.

A 10. táblázat a genotípusok megoszlását mutatja az ötfaktoros keresztezések utódpopulációiban.

3. CROSS

Rifampicinre és timinre szelektáltunk, az elméletileg várható 8 genotípusból hatot kaptunk meg.

A 3. táblázat mutatja, hogy 5 marker és komplett minta esetén a genotípusok milyen megoszlása várható. Nézzük meg, hogyan módosul ez, ha két rekombináns osztály hiányzik:

Szelektált	8 genotípus				6 genotípus			
markerek	SCO	DCO	TCO	QCO	SCO	DCO	TCO	QCO
pozíciója	osztály				osztály			

* *	1	3	3	1	1	3	2	0
1	2	4	2	0	2	4	0	0
2	3	3	1	1	3	3	0	0
3	4	0	4	0	4	0	2	0

Rövidítések:

SCO=egyszeres cross over

DCO=kétszeres cross over

TCO=háromszoros cross over

QCO=négyszeres cross over

Ha a megoszlás eltér attól, amit a táblázat mutat, akkor a pattern szabálytalan.

Látni fogjuk, hogy ebben a keresztezésben csak szabályos mintázatok vannak.

Nézzük először azt a pozíciót, ahol a szelektált markerek egymás mellett vannak.

1. arg <u>rif</u> <u>thy</u> trp his	1	3	3	1
	1	3	2	0
	121	140	4	0

A mintázat szabályos; a kétszeres cross over osztályban nagyjából ugyanannyi egyed található, mint az egyszeres cross over osztályban, ezért nem fogadhatjuk el a sorrendet.

2. <u>rif</u> <u>thy</u> trp arg his	1	3	3	1
	1	3	2	0
	8	133	124	0

3. arg trp <u>thy</u> <u>rif</u> his	1	3	3	1
	1	3	2	0
	1	140	124	0

Ez a két szekvencia sem fogadható el, mivel az egyszeres cross over osztályban van a legkevesebb telep.

4. his arg <u>rif</u> <u>thy</u> trp	1	3	3	1
	1	3	2	0
	115	146	4	0

Itt az első két cross over osztályban kb. megegyezik a telepek száma, így ez a sorrend sem jó.

5. his arg trp <u>thy</u> <u>rif</u>	1	3	3	1
	1	3	2	0
	8	133	124	0

6. his <u>rif</u> <u>thy</u> trp arg	1	3	3	1
	1	3	2	0
	1	140	124	0

7. his trp arg <u>rif</u> <u>thy</u>	1	3	3	1
	1	3	2	0
	17	132	116	0



Ezeknél a sorrendeknél az SCO osztályban a legkisebb az egyedszám, ez nem felel meg az elvárásoknak.

8. his trp <u>thy</u> <u>rif</u> arg	1	3	3	1
	1	3	2	0
	121	140	4	0

Az egyszeres és kétszeres cross over osztályokban nagyjából egyforma az egyedszám, ezért ez a sorrend sem jó.

9. his <u>thy</u> <u>rif</u> arg trp	1	3	3	1
	1	3	2	0
	3	146	116	0

10. trp arg <u>rif</u> <u>thy</u> his	1	3	3	1
	1	3	2	0
	3	146	116	0

Az SCO osztályban a legkisebb az egyedszám, tehát ezeket is el kell vetnünk.

11. trp <u>thy</u> <u>rif</u> arg his	1	3	3	1
	1	3	2	0
	115	146	4	0

Az első két cross over osztályba tartozó egyedszám megegyezik, a szekvencia nem fogadható el.

12. <u>thy</u> <u>rif</u> arg trp his	1	3	3	1
	1	3	2	0
	17	132	116	0

Az egyedszámok miatt ez a sorrend sem megfelelő.

Most vizsgáljuk meg azokat a lehetőségeket, amelyek a *1* pozícióhoz tartoznak, vagyis ahol a szelektált markerek között egy nem-szelektált allél található.

13.arg <u>rif</u> his <u>thy</u> trp	2	4	2	0
	2	4	0	0
	236	29	0	0

A mintázat szabályos. A kolóniaszámok megfelelnek az elvárásoknak, az egyszeres cross over osztályba egy nagyságrenddel több telep tartozik, mint a kétszeres cross over osztályba. Ez a sorrend tehát megfelelő lehet.

14.trp arg <u>rif</u> his <u>thy</u>	2	4	2	0
	2	4	0	0
	20	245	0	0

A DCO osztályban egy nagyságrenddel több kolónia van, mint az SCO-ban, ezért elvethetjük ezt a sorrendet.

15.trp <u>thy</u> his <u>rif</u> arg	2	4	2	0
	2	4	0	0
	236	29	0	0

A pattern alapján ez a szekvencia elfogadható.

16. <u>thy</u> his <u>rif</u> arg trp	2	4	2	0
	2	4	0	0
	20	245	0	0

17.arg trp <u>thy</u> his <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	0	0
	9	256	0	0

18. <u>rif</u> his <u>thy</u> trp arg	2	4	2	0
	2	4	0	0
	9	256	0	0

Ez a három sorrend nem lehet jó, mert a kétszeres cross overrel létrejött telepek száma szignifikánsan több, mint az egyszeres Cross overrel létrejötteké.

Most nézzük azokat a sorrendeket, ahol két nem-szelektált marker található a szelektáltak között (*2* pozíció).

19. <u>rif</u> arg trp <u>thy</u> his	3	3	1	1
	3	3	0	0
	132	133	0	0

20.his <u>rif</u> arg trp <u>thy</u>	3	3	1	1
	3	3	0	0
	133	132	0	0

21.his <u>thy</u> trp arg <u>rif</u>	3	3	3	1
	3	3	0	0
	132	133	0	0

22. <u>thy</u> trp arg <u>rif</u> his	3	3	1	1
	3	3	0	0
	133	132	0	0

Ezeknél a sorrendeknél az egyszeres és kétszeres cross over osztályokba tartozó egyedszámok megegyeznek, ezért nem fogadhatjuk el őket.

A következőkben azokat a variációkat vizsgáljuk meg, ahol a szelektált markerek a szekvencia két végén találhatók (*3*).

23. <u>rif</u> arg his trp <u>thy</u>	4	0	4	0
	4	0	2	0
	261	0	4	0

Az egyszeres és háromszoros cross over osztályokba tartozó egyed-számok között két nagyságrend a különbség, ez megfelel az elvárásoknak, tehát ez a sorrend elfogadható.

24. <u>rif</u> arg trp his <u>thy</u>	4	0	4	0
	4	0	2	0
	149	0	116	0

25. <u>rif</u> his arg trp <u>thy</u>	4	0	4	0
	4	0	2	0
	141	0	124	0

26. <u>thy</u> his trp arg <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	2	0
	149	0	116	0

27. <u>thy</u> trp arg his <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	2	0
	141	0	124	0

Ezeknél a patterneknél az SCO és TCO osztályokhoz tartozó egyed-számok között nincs szignifikáns különbség, tehát nem fogadhatók el.

28. <u>thy</u> trp his arg <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	2	0
	261	0	4	0

Ez a sorrend megfelelő, mivel az egyszeres cross over osztályban két nagyságrenddel több kolónia található, mint a háromszoros cross over osztályban.

A következő sorrendeket találtuk megfelelőnek:

13. arg rif his thy trp

15. trp thy his rif arg

23. rif arg his trp thy

28. thy trp his arg rif

Az első kettő és a második kettő azonos, ha a kromoszóma cirkuláris, így végülis a 3. keresztezésből két elfogadható sorrendet kaptunk:

1. his-rif-arg-trp-thy;

2. his-arg-rif-thy-trp.

4.CROSS

Rifampicinre és timinre szelektáltunk, a 11. táblázat mutatja a patterneket.

A legjobb sorrendek a következők:

1. arg rif thy trp his

3. his trp thy rif arg

4. arg rif his thy trp

8. trp thy his rif arg

11. TÁBLÁZAT

A 4. CROSS PATTERNJEI

* * pozíció

1. arg <u>rif</u> <u>thy</u> trp his	1	3	3	1
	1	3	3	0
	152	53	12	0

2. his trp arg <u>rif</u> <u>thy</u>	1	3	3	1
	1	3	3	0
	4	180	33	0

3. his trp <u>thy</u> <u>rif</u> arg	1	3	3	1
	1	3	3	0
	152	53	12	0

1 pozíció

4. arg <u>rif</u> his <u>thy</u> trp	2	4	2	0
	2	4	1	0
	180	36	1	0

5. <u>rif</u> arg <u>thy</u> trp his	2	4	2	0
	2	4	1	0
	173	37	7	0

6. his <u>rif</u> arg <u>thy</u> trp	2	4	2	0
	2	4	1	0
	32	178	7	0

7. his trp <u>thy</u> arg <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	1	0
	173	37	7	0

8. trp <u>thy</u> his <u>rif</u> arg	2	4	2	0
	2	4	1	0
	180	36	1	0

2 pozíció

9. <u>thy</u> trp his <u>rif</u> arg	3	3	1	1
	3	3	1	0
	184	26	7	0

10. arg <u>rif</u> his trp <u>thy</u>	3	3	1	1
	3	3	1	0
	184	26	7	0

3 pozíció

11. <u>rif</u> arg his trp <u>thy</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	205	0	12	0

12. <u>rif</u> arg trp his <u>thy</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	184	0	33	0

13. <u>rif</u> his arg trp <u>thy</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	57	0	160	0

14. <u>rif</u> his trp arg <u>thy</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	30	0	187	0

15. <u>thy</u> arg trp his <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	30	0	187	0

16. <u>thy</u> his trp arg <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	184	0	33	0

17. <u>thy</u> trp his arg <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	205	0	12	0

12. TÁBLÁZAT

AZ 5. CROSS PATTERNJEI

* * pozíció

1. arg his <u>rif</u> <u>thy</u> trp	1	3	3	1
	1	3	3	0
	63	51	156	0

2. arg his trp <u>thy</u> <u>rif</u>	1	3	3	1
	1	3	3	0
	32	224	14	0

3. arg <u>thy</u> <u>rif</u> his trp	1	3	3	1
	1	3	3	0
	1	51	218	0

1 pozíció:

4. <u>rif</u> arg <u>thy</u> trp his	2	4	2	0
	2	4	1	0
	186	83	1	0

5. <u>rif</u> trp <u>thy</u> arg his	2	4	2	0
	2	4	1	0
	33	83	154	0

6. his trp <u>thy</u> arg <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	1	0
	186	83	1	0

7. <u>thy</u> trp <u>rif</u> his arg	2	4	2	0
	2	4	1	0
	70	46	154	0

2. pozíció:

8. trp <u>thy</u> arg his <u>rif</u>	3	3	1	1
	3	3	1	0
	107	9	154	0

3 pozíció:

9. <u>rif</u> arg his trp <u>thy</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	256	0	14	0

10. <u>thy</u> arg trp his <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	52	0	218	0

11. <u>thy</u> trp arg his <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	114	0	156	0

12. <u>thy</u> trp his arg <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	3	0
	256	0	14	0

9. thy trp his rif arg

10. arg rif his trp thy

11. rif arg his trp thy

17. thy trp his arg rif

Végülis csak három sorrendünk van, mivel ezek közül több egyforma, ha kör alakú kromoszómát feltételezünk. A szekvenciák:

1. his-arg-rif-thy-trp (1., 3., 11., 17.)

2. his-rif-arg-thy-trp (9., 10.)

3. his-rif-arg-trp-thy (4., 8.)

5. CROSS

Ez is rif+, thy+ szelekció, mint az előző kísérletek. A 12. táblázatban láthatók a mintázatok. Összesen négy megfelelő sorrendet találtunk:

4. rif arg thy trp his

6. his trp thy arg rif

9. rif arg his trp thy

12. thy trp his arg rif

Ezek közül az első kettő és a második kettő egyforma:

1. his-rif-arg-thy-trp;

2. his-arg-rif-thy-trp.

6. CROSS

A 6. sorszámú keresztezésben rifampicinre és hisztidinre szelektáltunk, a patterneket a 13. táblázat mutatja. Az elfogadható

13. TÁBLÁZAT

A 6. CROSS PATTERNJEI

* * pozíció

1. arg <u>rif</u> <u>his</u> thy try	1	3	3	1
	1	3	1	0
	254	20	1	0

2. trp arg thy <u>his</u> <u>rif</u>	1	3	3	1
	1	3	1	0
	18	3	254	0

3. trp <u>rif</u> <u>his</u> thy arg	1	3	3	1
	1	3	1	0
	1	20	254	0

4. trp thy <u>his</u> <u>rif</u> arg	1	3	3	1
	1	3	1	0
	254	20	1	0

1 pozíció

5. arg <u>rif</u> trp <u>his</u> thy	2	4	2	0
	2	3	0	0
	255	20	0	0

6. arg thy <u>his</u> trp <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	3	0	0
	19	256	0	0

7. <u>rif</u> arg <u>his</u> thy trp	2	4	2	0
	2	3	0	0
	272	3	0	0

8. trp thy <u>his</u> arg <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	3	0	0
	272	3	0	0

9. thy <u>his</u> trp <u>rif</u> arg	2	4	2	0
	2	3	0	0
	255	20	0	0

2 pozíció

10.arg <u>rif</u> trp thy <u>his</u>	3	3	1	1
	3	2	0	0
	256	19	0	0

11. <u>his</u> thy arg <u>rif</u> trp	3	3	1	1
	3	2	0	0
	3	272	0	0

12. <u>his</u> thy trp <u>rif</u> arg	3	3	1	1
	3	2	0	0
	256	19	0	0

13.trp <u>rif</u> arg thy <u>his</u>	3	3	1	1
	3	2	0	0
	3	272	0	0

3 pozíció

14. <u>rif</u> arg trp thy <u>his</u>	4	0	4	0
	4	0	1	0
	274	0	1	0

15. <u>his</u> thy trp arg <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	1	0
	274	0	1	0

sorrendek:

1. arg rif his thy trp
4. trp thy his rif arg
5. arg rif trp his thy
7. rif arg his thy trp
8. trp thy his arg rif
9. thy his trp rif arg
10. arg rif trp thy his
12. his thy trp rif arg
14. rif arg trp thy his
15. his thy trp arg rif

Ezek között is találunk egyformákat, így végülis a következő szekvenciákat kaptuk:

1. his-rif-arg-trp-thy (1., 4., 14., 15.)
2. his-arg-rif-trp-thy (7., 8., 10., 12.)
3. his-trp-rif-arg-thy (5., 9.)

7. CROSS

Itt is rifampicinre és hisztidinre szelektáltunk. A számítógép egyetlen szabályos mintázatot sem talált, ez azt jelenti, hogy ennek a kísérletnek az utódpopulációja nem használható genetikai analízisre. Nézzünk meg néhány patternt a 118 közül!

A * * pozícióhoz tartoznak például a következők:

1. arg <u>his</u> <u>rif</u> trp thy	1	3	3	1
	1	2	3	1
	3	29	210	8

2. arg trp thy <u>rif</u> <u>his</u>	1	3	3	1
	0	3	3	1
	0	33	216	1

Az elsőnél a kétszeres cross over osztályból, a másodiknál az egyszeresből hiányzik rekombináns osztály, míg a többszörös cross over osztályok teljeseek.

A *1* pozícióhoz tartoznak a következő sorrendek:

3. arg <u>rif</u> trp <u>his</u> thy	2	4	2	0
	2	3	2	0
	208	37	5	0

4. arg thy <u>rif</u> trp <u>his</u>	2	4	2	0
	1	4	2	0
	8	34	208	0

Hasonló szekvenciák találhatók a többi pozícióhoz is, tehát ezt a kísérletet kihagyhatjuk az értékelésből.

8. CROSS

Rifampicinre és triptofánra szelektáltunk, a 14. táblázat mutatja a legjobb mintázatokat. Négy szabálytalan patternt találtunk, ezek: 1., 5., 6., 7.

Összesen 2 szekvenciát kaptunk:

2. arg rif his trp thy

4. thy trp his rif arg

Ezek egyformák, így a sorrend:

1. his-rif-arg-thy-trp;

14. TÁBLÁZAT

A 8. CROSS PATTERNJEI

* * pozíció

1. thy <u>trp</u> <u>rif</u> his arg	1	3	3	1
	1	2	1	0
	139	17	119	0

1 pozíció

2. arg <u>rif</u> his <u>trp</u> thy	2	4	2	0
	2	2	0	0
	258	17	0	0

3. thy <u>trp</u> arg <u>rif</u> his	2	4	2	0
	2	2	0	0
	145	130	0	0

4. thy <u>trp</u> his <u>rif</u> arg	2	4	2	0
	2	2	0	0
	258	17	0	0

5. thy his <u>trp</u> arg <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	0	2	0
	130	0	145	0

2 pozíció:

6. thy <u>trp</u> his arg <u>rif</u>	3	3	1	1
	3	0	1	0
	269	0	6	0

3:

7. <u>trp</u> thy his arg <u>rif</u>	4	0	4	0
	3	0	1	0
	269	0	6	0

15. TÁBLÁZAT

A 9. CROSS PATTERNJEI

1 pozíció

1. arg <u>rif</u> thy <u>trp</u> his	2	4	2	0
	2	3	0	0
	174	47	0	0

2. arg his <u>trp</u> thy <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	3	0	0
	29	192	0	0

3. <u>rif</u> thy <u>trp</u> his arg	2	4	2	0
	2	3	0	0
	29	192	0	0

4. his <u>trp</u> thy <u>rif</u> arg	2	4	2	0
	2	3	0	0
	174	47	0	0

2 pozíció

5. <u>rif</u> arg his <u>trp</u> thy	3	3	1	1
	3	2	0	0
	207	14	0	0

6. thy <u>trp</u> his arg <u>rif</u>	3	3	1	1
	3	2	0	0
	207	14	0	0

9. CROSS

Ez is rif+, trp+ szelekció. Az első és az utolsó pozícióhoz nem írt ki sorrendet a gép. A többi a 15. táblázat mutatja.

4 szekvenciát kaptunk:

1 arg rif thy trp his

4. his trp thy rif arg

5. rif arg his trp thy

6. thy trp his arg rif

Ezek egyformák, ha a kromoszóma kör alakú. Tehát ebből a kísérletből azt kapjuk, hogy a markerek sorrendje:

his-arg-rif-thy-trp.

10. CROSS

Rifampicinre és argininre szelektáltunk. Ebben a kísérletben komplett mintát kaptunk. 120 sorrendet írt ki a számítógép, ezek közül azokat vizsgáljuk meg, amelyek a legjobban közelítik az elméleti mintázatokat (16. táblázat).

A legjobb szekvenciák:

5. rif thy arg his trp

7. trp his arg thy rif

10. rif trp his arg thy

13. thy arg his trp rif

15. arg his trp thy rif

Ezek közül a 5., 7., 10., 13. egyforma:

1. his-arg-thy-rif-trp.



16. TÁBLÁZAT

A 10. CROSS PATTERNJEI

* * pozíció

1. <u>rif</u> <u>arg</u> thy his trp	1	3	3	1
	1	3	3	1
	171	44	35	15

2. thy trp his <u>arg</u> <u>rif</u>	1	3	3	1
	1	3	3	1
	171	50	41	3

1 pozíció

3. <u>rif</u> his <u>arg</u> trp thy	2	4	2	0
	2	4	2	0
	183	53	29	0

4. <u>rif</u> trp <u>arg</u> thy his	2	4	2	0
	2	4	2	0
	189	41	35	0

5. <u>rif</u> thy <u>arg</u> his trp	2	4	2	0
	2	4	2	0
	191	59	15	0

6. <u>rif</u> thy <u>arg</u> trp his	2	4	2	0
	2	4	2	0
	191	41	33	0

7. trp his <u>arg</u> thy <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	2	0
	191	59	15	0

8. his thy <u>arg</u> trp <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	2	0
	189	41	35	0

2 pozíció

9. <u>rif</u> his trp <u>arg</u> thy	3	3	1	1
	3	3	1	1
	194	38	18	15

10. <u>rif</u> trp his <u>arg</u> thy	3	3	1	1
	3	3	1	1
	200	50	12	3

11. <u>rif</u> trp thy <u>arg</u> his	3	3	1	1
	3	3	1	1
	204	38	20	3

12. trp <u>arg</u> his thy <u>rif</u>	3	3	1	1
	3	3	1	1
	194	48	12	11

13. thy <u>arg</u> his trp <u>rif</u>	3	3	1	1
	3	3	1	1
	200	50	12	3

14. thy <u>arg</u> trp his <u>rif</u>	3	3	1	1
	3	3	1	1
	194	38	18	15

3 pozíció

15. <u>arg</u> his trp thy <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	221	0	4	0

16. <u>arg</u> thy trp his <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	209	0	56	0

17. <u>rif</u> his trp thy <u>arg</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	209	0	56	0

18. <u>rif</u> his thy trp <u>arg</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	201	0	64	0

A 15. így írható fel:

2. his-arg-rif-thy-trp

Ebből a kísérletből tehát három sorrendet kaptunk.

11. CROSS

Ebben a kísérletben is rifampicinre és argininre szelektáltunk, a minta itt is teljes. A 17. táblázat mutatja a legjobb patterneket. A következő szekvenciákat fogadhatjuk el :

1. rif arg thy trp his
2. his trp thy arg rif
4. rif his arg thy trp
5. rif trp arg thy his
9. trp thy arg his rif
11. rif trp thy arg his
12. his arg thy trp rif
15. arg thy trp his rif
16. rif his try thy arg

Itt is találunk egyformákat:

1. his-rif-arg-thy-trp (1., 2., 15., 16.)
2. his-arg-thy-trp-rif (4., 9., 11., 12.)
3. his-rif-trp-arg-thy (5.)

Végül tehát három szekvenciánk maradt.

17. TÁBLÁZAT

A 11. CROSS PATTERNJEI

* * pozíció

1. <u>rif</u> <u>arg</u> thy trp his	1	3	3	1
	1	3	3	1
	288	185	59	3

2. his trp thy <u>arg</u> <u>rif</u>	1	3	3	1
	1	3	3	1
	288	185	59	3

3. his thy trp <u>arg</u> <u>rif</u>	1	3	3	1
	1	3	3	1
	288	152	59	36

1 pozíció

4. <u>rif</u> his <u>arg</u> thy trp	2	4	2	0
	2	4	2	0
	422	89	24	0

5. <u>rif</u> trp <u>arg</u> thy his	2	4	2	0
	2	4	2	0
	311	188	36	0

6. <u>rif</u> thy <u>arg</u> trp his	2	4	2	0
	2	4	2	0
	303	188	38	0

7. his trp <u>arg</u> thy <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	2	0
	309	188	38	0

8. his thy <u>arg</u> trp <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	2	0
	311	188	36	0

9. trp thy <u>arg</u> his <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	2	0
	422	89	24	0

10.thy trp <u>arg</u> his <u>rif</u>	2	4	2	0
	2	4	2	0
	422	54	59	0

2 pozíció

11. <u>rif</u> trp thy <u>arg</u> his	3	3	1	1
	3	3	1	1
	326	185	21	3

12.his <u>arg</u> thy trp <u>rif</u>	3	3	1	1
	3	3	1	1
	326	185	21	3

3 pozíció

13. <u>arg</u> trp his thy <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	327	0	208	0

14. <u>arg</u> trp thy his <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	440	0	95	0

15. <u>arg</u> thy trp his <u>rif</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	473	0	62	0

16. <u>rif</u> his trp thy <u>arg</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	473	0	62	0

17. <u>rif</u> his thy trp <u>arg</u>	4	0	4	0
	4	0	4	0
	440	0	95	0

Az ötfaktoros keresztezésekből kapott sorrendeket összegzi a 18. táblázat.

A következő szekvenciák csak egyszer fordulnak elő:

his-trp-rif-arg-thy (6.3.)

his-arg-thy-rif-trp (10.1.)

his-rif-trp-arg-thy (11.3.)

his-arg-rif-trp-thy (6.2.)

his-arg-thy-trp-rif (11.2.)

Háromszor találkozunk ezzel a sorrenddel:

his-rif-arg-trp-thy (3.1., 4.3., 6.1.)

Négyszer fordul elő a következő szekvencia:

his-rif-arg-thy-trp (4.2., 5.1., 8. 11.1.)

A leggyakoribb sorrend:

his-arg-rif-thy-trp (3.2., 4.1., 5.2., 9., 10.2.)

Azt a következtetést vonhatjuk le az eredményekből, hogy a legvalószínűbb sorrend:

his-(arg,rif)-(thy,trp)

Vagyis mindössze annyit mondhatunk, hogy az arginin és a rifampicin kapcsoltak és a hisztidin mellett található, mellettük helyezkedik el az ugyancsak kapcsolt timin és triptofán. Ez pontosan az az eredmény, amit a hagyományos analízissel is kaptunk.

Az ötfaktoros keresztezéseknél leírt módon analizáltuk a többi kísérletből kapott utódpopulációt is. A továbbiakban nem mutatom be a részletes elemzést, csak az eredményt.

18. TÁBLÁZAT

AZ ÖTFAKTOROS KERESZTEZÉSEK PATTERN-ANALÍZISÉVEL KAPOTT SORRENDEK

Sorszám	sorrend	szelekció
3. 1.	his-rif-arg-trp-thy	rif+,thy+
2.	his-arg-rif-thy-trp	
4. 1.	his-arg-rif-thy-trp	rif+,thy+
2.	his-rif-arg-thy-trp	
3.	his-rif-arg-trp-thy	
5. 1.	his-rif-arg-thy-trp	rif+,thy+
2.	his-arg-rif-thy-trp	
6. 1.	his-rif-arg-trp-thy	rif+,his+
2.	his-arg-rif-trp-thy	
3.	his-trp-rif-arg-thy	
8.	his-rif-arg-thy-trp	rif+,trp+
9.	his-arg-rif-thy-trp	rif+,trp+
10.1.	his-arg-thy-rif-trp	rif+,arg+
2.	his-arg-rif-thy-trp	
11.1.	his-rif-arg-thy-trp	rif+,arg+
2.	his-arg-thy-trp-rif	
3.	his-rif-trp-arg-thy	

2.2. HATFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

A 12. és 14. keresztezés szabálytalan mintát adott.

13. CROSS

A szülők:

P1: leu-, glu-, his+, thr+, trp+, rif-;

P2: leu+, glu+, his-, thr-, trp-, rif+.

Hisztidinre és glutaminsavra szelektáltunk, a legjobb szekvenciák a következők:

1. leu-rif-his-thr-trp-glu;

2. leu-rif-thr-his-glu-trp.

Egyik sorrend sem egyezik a hagyományos kiértékeléssel kapott szekvenciákkal.

2.3. HÉTFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

15. CROSS

A szülők:

P1: leu-, glu-, his+, thr+, trp+, rif-, ttc-;

P2: leu+, glu+, his-, thr-, trp-, rif+, ttc+.

Rifampycinre és hisztidinre szelektáltunk. A lehetséges 32-ből mindössze négy genotípust kaptunk. Úgy gondoljuk, ez annyira csonkított minta, hogy nincs értelme foglalkozni vele.

16. CROSS

Szabálytalan minta.

2.4. NYOLCFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

A nyolcfaktoros kísérletek között csak négy analizálható mintát találtunk: a 21., 25., 32. és 38. keresztezést. Ezekből a következő sorrendeket kaptuk:

20. leu-thr-his-arg-str-rif-thy-trp

24. leu-thy-trp-thr-his-str-rif-arg

31. leu-thr-his-arg-trp-thy-str-rif

37. leu-thr-his-str-thy-trp-ttc-arg

A többi 17 kísérlet utódpopulációja szabálytalan patternt adott.

A 25. azonos azzal a sorrenddel, amit a hagyományos kiértékeléssel állapítottunk meg. A 21. majdnem teljesen megegyezik, a 32. is hasonlít, a 38. viszont teljesen eltér a korábban megállapított sorrendtől.

Ebből a négy sorrendből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a thy-trp kapcsolt, a thr-his szintén. Valószínűleg a leucin is ez utóbbiakhoz van közel. A 3. kapcsoltsági csoport a str-rif-arg. Ez a konklúzió megegyezik azzal, amit a hagyományos kiértékeléskor kaptunk.

2.5. KILENCFAKTOROS KERESZTEZÉSEK

Láthattuk, hogy minél több markert használunk, annál csonkítottabbak a patternek. A kilencfaktoros kísérleteknél már minden minta szabálytalan.

A pattern analízis alapján tehát arra a következtetésre jutottunk, hogy mintáink nagy része szabálytalan, genetikai analízisre nem alkalmas. Így nem az a meglepő, hogy a független kísérletekben azonos szülők, sőt azonos szelekció esetén is eltérő sorrendeket kaptunk, hanem az, hogy ezekben a sorrendekben megfigyelhető bizonyos azonosság, és az allélek egyértelműen kapcsoltsági csoportokba oszthatók.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

40 keresztezés utódpopulációját analizáltam a hagyományos módon és egy új eljárással, a pattern-analízissel. Egyértelmű genetikai térképet egyik módszerrel sem sikerült megállapítani. Ahogy nőtt a kísérletekben alkalmazott allélek száma, úgy nőtt az eredmények bizonytalansága is.

A markersorrend megállapítására az ötfaktoros kísérletek bizonyultak a legalkalmasabbnak. A kapcsoltsági analízis során mind a 9 kísérletből kaptunk egy vagy két sorrendet. Ezek között több azonos volt. Az eltérő szekvenciák is csak kismértékben különböztek egymástól. Hogy melyik az egyetlen igazi sorrend - azt nem sikerült eldönteni. Mindegyiket figyelembe véve a következő szekvenciát fogadtuk el:

his-(rif,arg)-(trp,thy).

A zárójelen belül nem tudjuk megadni az allélek pontos helyzetét. A pattern-analízissel ugyanerre az eredményre jutottunk.

Ezt a sorrendet kiegészítettük a hat- és hétfaktoros kísérletek alapján néhány más markerrel, melyek pozíciója többé-kevésbé egyértelműen meghatározható volt. Így végülis azt mondjuk, hogy a *Bacillus megaterium* genetikai térképe az általunk használt markerekre valószínűleg a következő:

leu-thr-his-rif-(str,glu)-arg-ttc-(thy,trp).

A nyolcfaktoros keresztezésekből sokféle sorrendet kaptunk. Hogy közülük melyik a helyes, és hogy egyáltalán köztük van-e,

azt nem tudjuk eldönteni. Minden esetben a fentebb leírt marker-sorrendhez hasonlítottuk az eredményeket, de ezzel nem nyertünk újabb információkat, mindössze a korábban megállapított kapcsoltságai csoportok összetételét erősítette meg ez az eljárás.

Láthatjuk, hogy 40 kísérlet kiértékelése után sem tudtuk meghatározni négy marker pozícióját. Térképünk tehát bizonytalan. Néhány konklúzió azonban határozottan levonható a sok szekvenciából:

1. a timin és a triptofán erősen kapcsoltak;
2. egy kapcsoltsági csoportot alkot a leucin, hisztidin és a treonin;
3. az arginin, rifampycin és streptomycin szintén egymáshoz kapcsoltak.

MEGVITATÁS

Egy genetikai keresztezés utódnemzedékében elméletileg 2^n genotípusnak kell jelen lenni (n az allélek száma). Ha két markerre szelektálunk, mint általában a baktériumok esetében, akkor a várható genotípuszám $2^n/4$. Azt a mintát, amely ennyi genotípust tartalmaz, komplettnek nevezzük. Ha a genotípusok száma az elméleti értéknél kevesebb, a minta inkomplett.

A komplett minták összetételét a két szelektált marker genombeli pozíciója határozza meg. A szelektált markerek minden pozíciójára felírható egy elméleti genotípus-megoszlás, ami teljesen független a nem-szelektált allélek sorrendjétől. Ha egy populáció genotípus-megoszlása megfelel ennek az ideális mintázatnak (pattern-nek), akkor az szabályos minta és genetikailag analizálható. Az inkomplett minták akkor szabályosak, ha a hiányzó genotípusok a sokszoros cross over osztályokba tartoznak.

Ha a különböző cross over osztályokból random módon hiányoznak rekombináns kategóriák, a pattern szabálytalan. Azok a minták, melyekből csak szabálytalan patternek hozhatók létre, nem alkalmasak genetikai analízisre.

Miután kísérleteink kiértékelése a hagyományos módon nem adott egyértelmű eredményt, mintáinkat ellenőriztük a pattern-analízissel. Kiderült, hogy többségük nemcsak inkomplett, de szabálytalan is, vagyis nem analizálható. Mi lehet ennek az oka?

Három fő tényező játszhat szerepet abban, hogy egy minta inkomplett:

1. Elégtelen mintavétel - túl kevés utódot vizsgáltunk meg.
2. Bizonyos genotípusok nem jöttek létre.
3. Egyes rekombináns osztályok túlnövik a többieket, így a kapott minta nem a genetikai, hanem a metabolikus eseményeket tükrözi.

Magyarázható-e ezekkel mintáink szabálytalansága is?

1. Öt marker esetén 8, hatnál 16, hétnél 32, nyolcnál 64, kilencnél 128 genotípus jön létre az utódnemzedékben. A sokszoros crossing overrel keletkezett genotípusok gyakorisága nagyon kicsi, tehát ahhoz, hogy pl. nyolcfaktoros keresztezésnél az összes létrejött genotípust megtaláljuk, rengeteg egyedet kell megvizsgálnunk. Technikai okok miatt egy-egy keresztezésből nem lehetett annyi kolóniát megvizsgálni, amennyi szükséges lett volna.

Elégtelen mintavétel esetén azonban a minták inkomplettek ugyan, de szabályosak, mivel a legkisebb gyakoriságú genotípusok hiányoznak belőlük.

2. Elképzelhető, hogy a hiányzó genotípusok eleve létre sem jöttek - ezt egyelőre sem cáfolni, sem bizonyítani nem tudjuk.

3. A fiziológiai hatások azok, amelyek szerintünk a protoplaszt fúzióból származó minták szabálytalanságáért elsősorban felelősek. A protoplasztok rendkívül érzékenyek, regenerálódásukat számos fiziológiai tényező befolyásolja. Nem is tudjuk, pontosan hogy történik a regeneráció, a jelenleg ismert faktorokon kívül is sokminden hatással lehet rá. Tudjuk, hogy befolyásolják a külső körülmények, pl. a közeg oxigéntartalma, a jelenlévő aminosavak, stb. Fontos tényező lehet a membrán állapota is. Óriási

eltérések vannak a különböző auxotróf mutánsok viselkedése között is. Néhány törzzsel egyáltalán nem tudtunk dolgozni, mert többszöri próbálkozással sem kaptunk néhány tíz kolóniánál többet egy-egy keresztezés során. Bizonyos szelekciók után szintén nagyon kevés utódot kaptunk. S ahogy már az első fúziós cikkekben leírták, bizonyos aminosavak hiánya vagy jelenléte a táptalajban, erősen befolyásolta a regenerációt és a növekedést. Ezek a megfigyelések mind arra utalnak, hogy a fúzió után kapott utódnemzedék összetétele erősen függ metabolikus hatásoktól, s így nem tükrözi a valós genetikai eseményeket. Ezért az általunk meghatározott térképet inkább "metabolikus térkép"-nek tekinthetjük, nem genetikainak.

A kérdés ezekután az, hogy akkor miért van mégis hasonlóság a különböző kísérletekből kapott sorrendek között? Miért lehet mégis bizonyos következtetéseket levonni belőlük? Nyilvánvalóan azért, mert a kísérleteket igyekeztünk azonos körülmények között végezni, a főbb fiziológiai hatások mindig hasonlóak voltak.

IRODALOMJEGYZÉK

1. BALTZ,R.H. & MATSUSHIMA,P., 1981.: Protoplast fusion in *Streptomyces*: Conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J.Gen.Microbiol.* **127**: 137-146.
2. CALLAHAN,J.P., CRAWFORD,I.P., HESS,G.F. & VARY,P.S., 1983.: Cotransductional mapping of the *trp* - *his* region of *Bacillus megaterium*. *J. Bact.* **154**:1455-1458.
3. COETZEE,J.N., SIRGEL,F.A. & LECATSAS,G., 1979.: Genetic recombination in fused spheroplasts of *Providencia alcalifaciens*. *J.Gen.Microbiol.* **114**:313-322.
4. CHEN,Z., WOJCIK,S.F. & WELKER,N.E., 1986.: Genetic analysis of *Bacillus stearothermophilus* by protoplast fusion. *J.Bact.* **165**:994-1001.
5. FERENCZY,L., KEVEI,F. & ZSOLT,J., 1974.: Fusion of fungal protoplasts. *Nature, London*, **248**:793-794.
6. FLEISCHER,E. & VARY,P.S., 1985. Genetic analysis of fusion recombinants and presence of noncomplementing diploids in *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:919-926.
7. FODOR,K. & ALFÖLDI,L., 1976.: Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *PNAS.* **73**:2147-2150.
8. FODOR,K. & ALFÖLDI,L., 1979.: Polyethylene-glycol induced fusion of bacterial protoplasts. *MGG.* **168**:55-59.

9. GABOR, M.H. & HOTCHKISS, R.D., 1983.: Reciprocal and nonreciprocal recombination in diploid clones from *Bacillus subtilis* protoplast fusion: Association with the replication origin and terminus. *PNAS*. 80.: 1426-1430.
10. GUILLÉN, N. AMAR., N. & HIRSCHBEIN, L., 1985.: Stabilized non-complementing diploids (Ncd) from fused protoplast products of *Bacillus subtilis*. *EMBO Journal* **4**: 1333-1338.
11. HOPWOOD, D.A., WRIGHT, H.M., BIBB, M.J. & COHEN, S.N., 1977.: Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature, London*, **268**: 171-174.
12. HOPWOOD, D.A. & WRIGHT, H.M., 1978.: Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *MGG*. **162**: 307-317.
13. HRANUELLI, D., PIGAC, J., SMOKVINA, T., ALAČEVIČ, M., 1983.: Genetic interaction in *Streptomyces rimosus* mediated by conjugation and protoplast fusion. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1415-1422.
14. ILLING, G.T., NORMANSELL, I.D., PEBERDY, J.F., 1989.: Genetic mapping in *Streptomyces clavuligerus* by protoplast fusion. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2299-2305.
15. KARMAZYN-CAMPELLI, C., SAVELLI, B., ROGERS, H.J., SCHAEFFER, P., 1985.: Inverse relationship between formation of phenotypically recombinant clones and cell wall regeneration after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1635-1638.

16. SANCHEZ-RIVAS,C. KARMAZYN-CAMPELLI,C. & LÉVI-MEYRUEIS,C., 1988.: Further studies on recombination in diploid clones from *Bacillus subtilis* protoplast fusion. MGG. **214**:321-324.
17. SCHAEFFER,.P., CAMI,B & HOTCHKISS,R.D., 1976.: Fusion of bacterial protoplasts. PNAS. **73**:2151-2155.
18. STÄHELIN,H., 1954.: Über osmotisches Verhalten und Fusion nahter Protoplasten von *Bacillus anthracis*. Schweiz. Z. delg. Path. Bacteriol. **17**:296.
19. STAHL,M.,L. & PATTEE,P.A., 1983.: Computer-assisted chromosome mapping by protoplast fusion in *Staphylococcus aureus*. J. Bact. **154**:395-405.
20. VARY,P.S.,1979.: Transduction in *Bacillus megaterium*. B.B. Res.Com. **88**: 1119-1124.
21. VARY,P.S., GARBE,J.C., FRANZEN,M. & FRAMPRON,E.W., 1982.: MP13:a generalized transducing bacteriophage for *Bacillus megaterium*. J. Bact. **149**: 1112-1119.

TARTALOMJEGYZÉK

Oldal

CÉLKITŰZÉS	2.
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	4.
BEVEZETÉS	9.
1. A géntérképezés elméleti alapjai	9.
2. A genetikai analízis jellemző sajátosságai baktériumok esetében	14.
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	18.
KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	27.
1. Hagyományos kiértékelés	28.
1.1. Ötfaktoros keresztezések	28.
1.2. Hatfaktoros keresztezések	29.
1.3. Hétfaktoros keresztezések	32.
1.4. Nyolcfaktoros keresztezések	35.
1.5. Kilencfaktoros keresztezések	50.
2. Pattern analízis	54.
2.1. Ötfaktoros keresztezések	56.
2.2. Hatfaktoros keresztezések	70.
2.3. Hétfaktoros keresztezések	70.
2.4. Nyolcfaktoros keresztezések	71.
2.5. Kilencfaktoros keresztezések	72.
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	73.
MEGVITATÁS	75.
IRODALOMJEGYZÉK	78.