

**A diploid lucerna (*Medicago sativa*) továbbfejlesztett
genetikai térképének megszerkesztése, összehasonlítása a
borsó genetikai térképével, és egy szimbiotikus
nitrogénkötésben hibás lucerna mutáns genetikai
térképezése**

Ph.D. értekezés

Készítette: Kaló Péter

Témavezető: Dr. Kiss György Botond

MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet, 1999

TARTALOMJEGYZÉK

	oldalszám
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	5.
1. BEVEZETÉS	7.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9.
2.1. A <i>Medicago</i> nemzetség	9.
2.1.1. A <i>Medicago sativa</i> komplex	10.
2.2. A szimbiotikus nitrogénkötés	13.
2.2.1. A szimbiotikus gümő kialakulása	13.
2.2.2. Az érett gümő működése	16.
2.3. Genetikai megközelítés a biológiai folyamatok vizsgálatában	17.
2.4. Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás növényi mutánsok	20.
2.5. A genetikai térképezés	22.
2.5.1. A genetikai térképezés alapjai	23.
2.5.2. A rekombinációs gyakoriság becslése maximum-likelihood módszerrel	26.
2.5.3. A genetikai térképek megszerkesztésének menete	28.
2.6. Rokon fajok genetikai térképének összehasonlítása	30.
3. ELŐZMÉNYEK	33.
3.1. Egy ineffektív lucerna mutáns izolálása és jellemzése	33.
3.2. A diploid <i>Medicago sativa</i> genetikai alaptérképének megszerkesztése	34.
3.3. A <i>fix1 (in₆)</i> mutáns gén térképezése	35.
4. CÉLKITÚZÁS	36.
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	38.
5.1. A szegregáló populációk előállítása, a növények fenntartása	38.
5.2. A szimbiotikus nitrogénkötés hatékonyságának meghatározása	39.
5.3. A DNS-analízis módszerei	39.
5.3.1. DNS-izolálás friss levélből, Southern-hibridizáció	39.
5.3.2. DNS-izolálás lucernamagokból és csíranövényekből	40.
5.3.3. PCR amplifikáció	41.
5.3.4. PCR-termékek klónozása és szekvenálása	42.
5.3.5. Az egyszálú DNS konformációján alapuló genotípus meghatározás (SSCP)	42.
5.4. A markerek nevezéktana, származása	43.
5.5. A genetikai kapcsoltság meghatározása, az adatok analízise	44.

	oldalszám
5.5.1. A genetikai térkép elkészítése a Mapmaker számítógépes programmal	45.
5.5.2. A torzult szegregációs arány vizsgálata χ^2 -próbával	47.
5.5.3. Specifikus maximum-likelihood egyenletek használata	48.
5.5.3.1. Életképességi értékek meghatározása	48.
5.5.3.2. A rekombinációs gyakoriságok kiszámítása specifikus maximum likelihood egyenletekkel	49.
5.5.4. A markerek sorrendjének megállapítása színtérkép segítségével	50.
6. EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	52.
6.1. A diploid lucerna alaptérképének további markerekkel történő bővítése	52.
6.2. A vázmarkerek csoportokba osztása	55.
6.3. Nyolc kapcsoltsági csoport kialakítása	61.
6.3.1. Torzult szegregációs arány a térképezett markereknél	61.
6.3.2. A torzult szegregációs arány hatása a kapcsoltsági értékekre	62.
6.3.3. Az erősen torzult szegregációs arányt mutató markereket tartalmazó kapcsoltsági csoportok meghatározása	66.
6.3.4. Az erősen torzult szegregációs arányt mutató markerek kapcsoltsági viszonyainak vizsgálata színtérkép segítségével	69.
6.4. A genetikai térkép elkészítése, kiegészítő markerek illesztése a váztérképbe	73.
6.5. A diploid lucerna genetikai térképének jellemzése	85.
6.6. A torzult szegregációs arány okainak vizsgálata	94.
6.7. Diploid lucerna genetikai térképek összehasonlítása	101.
6.8. A lucerna és a borsó genetikai térképének összehasonlítása	105.
6.9. A <i>fix1 (in₆)</i> mutáns gént tartalmazó régió finomtérképezése	109.
7. ÖSSZEFOGLALÁS	113.
8. IRODALOMJEGYZÉK	115.
9. FÜGGELÉK	129.
9.1. A genotípusok szegregációs arányának tesztelése	129.
9.2. Életképességi értékek kiszámítása	130.
9.3. A térképező populáció 137 egyedének a 121 vázmarkerre meghatározott genotípusa	133.
10. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK	138.
11. SUMMARY	140.

	oldalszám
11.1. Introduction	140.
11.2. Results and discussion	142.
11.2.1. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	142.
11.2.2. Comparative mapping between <i>Medicago sativa</i> and <i>Pisum sativum</i>	146.
11.2.3. Saturation of the region containing the <i>fix1</i> mutant gene	147.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozat témájául szolgáló munkát a MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Lucerna Genetikai Csoportjában végeztem. Köszönettel tartozom a Szegedi Biológiai Központ, a Genetikai Intézet és a csoport valamennyi dolgozójának, akik munkám során segítségemre voltak és biztosították a megfelelő háttérrel az eredményes kutatómunkához.

Köszönöm Dr. Alföldi Lajosnak, a Genetikai Intézet volt igazgatójának, hogy a Nitrogénkötési Csoporthoz történő csatlakozásomat lehetővé tette, és Dr. Raskó Istvánnak, az intézet jelenlegi igazgatójának, hogy munkámat támogatta és biztosította a kutatáshoz szükséges feltételeket az intézetben.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kiss György Botondnak, aki szakdolgozó korom óta tudományos munkámat irányította, és akitől a molekuláris biológiában szükséges szemléletmódból a legtöbbet tanulhattam. Hasznos tanácsaival és észrevételeivel a dolgozat és a dolgozat alapjául szolgáló közlemények elkészítésében igen nagy segítségemre volt.

A dolgozatban közölt eredményeket csak csoportmunkában végzett kutatómunka eredményeképpen érhattük el, ezért köszönöm régi és jelenlegi kollégáimnak, Dr. Csanádi Gyulának, Dr. Endre Gabriellának, Felföldi Klárának, Kevei Zoltánnak, Dr. Kereszt Attilának, Kiss Péternek és Ökrész Lászlónak, akik a lucerna genetikai térkép elkészítésének hosszan tartó folyamatában segítségemre voltak. Köszönettel tartozom Dr. Zimányi Lászlónak és Jávorfi Tamásnak, akik matematikai ismereteikkel a genetikai analízisekben segítettek. Köszönöm Dr. Nagy Béla, a GATE Kompolti Kutató Intézet tudományos főmunkatársának a lisztharmat rezisztencia kísérletben nyújtott segítségét.

Külön köszönöm a csoport asszisztenseinek, Jenei Sándornak, Katonáné Lehoczky Klárinak, Liptay Zsuzsának, Molnár Jánosnénak (Klárinak), Somkúti Pálnénak (Gyöngyinek) és Tóth Lászlónénak (Marinak) nélkülözhetetlen és segítőkész munkáját.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani szüleimnek és feleségemnek, hogy mindennapi kutatómunkámhoz és a dolgozat elkészítéséhez szükséges nyugodt családi háttérrel biztosították számomra.

1. BEVEZETÉS

Az élő szervezetek egyik nélkülözhetetlen alkotóeleme a nitrogén. A Föld szinte kimeríthetetlen mennyiségben tartalmaz nitrogént, ennek nagyobb része azonban a legtöbb élőlény számára közvetlenül nem hozzáférhető, inert gázként van jelen a légkörben. Az eukarióta élőlények által hasznosítható kötött nitrogén viszont csak korlátozott mértékben áll rendelkezésre.

Az ökoszisztéma nitrogén-körforgalma igen szerteágazó folyamat. A nitrogéntartalmú szerves vegyületek lebomlása során keletkező ammónia közvetlenül hasznosítható a növények számára, ill. nitríté és nitráttá történő átalakulás után (nitrifikáció) szintén hasznosulhat, másrészt a nitrogén egy része visszajut a légkörbe (denitrifikáció). Az ökoszisztéma nitrogénegyensúlyának fenntartásához tehát a kötött nitrogén pótlására, azaz folyamatos nitrogénkötésre van szükség. A nitrogénkötés történhet kémiai úton (villámlás során keletkező nitrogén-oxidok, ammóniagyártás) és a mennyiségi szempontból sokkal jelentősebb biológiai úton.

A légkört 78%-ban alkotó nitrogéngázt csak néhány mikroorganizmus képes nitrogénforrásként hasznosítani. A biológiai nitrogénkötés háromféle módon valósul meg a természetben, aszerint, hogy a mikroorganizmusok (1) szabadon élve (pl. *Klebsiella*) vagy pedig valamilyen típusú növény-mikroba kapcsolat keretein belül, (2) asszociatív (pl. *Azospirillum*) vagy (3) szimbiotikus kapcsolatban (pl. *Rhizobium*) végzik a nitrogén ammóniává történő redukálását. A biológiai nitrogénkötés leghatékonyabb módja az endoszimbiózis. Ennek során két evolúciósan távol eső szervezet, egy prokarióta (mikroszimbionta) és egy magasabbrendű, eukarióta élőlény (makroszimbionta vagy gazdanövény) között többszörös jelcserét követően egy egyedülálló kölcsönhatás jön létre. Ennek során a baktériumok a légköri nitrogén asszimilációját követően nitrogénnel látják el gazdanövényüket, amely viszonzásként különböző

széntartalmú vegyületeket és a szabad oxigéntől való védelmet biztosítja a mikroszimbionta partner számára. Ezért az olyan gazdanövények termesztése, mint a pillangósvirágú takarmánynövények, nem igényel költséges és környezetkárosító műtrágyázást, valamint vetésforgóban való alkalmazásuk növeli a talaj nitrogéntartalmát.

A szimbiotikus nitrogénkötés intenzív kutatások tárgya a világ számos laboratóriumában, egyrészt mert a több kommunikációs lépést követően kialakuló együttélés, mint különleges biológiai jelenség felkeltette a kutatók érdeklődését, másrészt gazdasági jelentősége miatt. E kutatások célja a két partner közötti kommunikáció molekuláris szintű megismerése, a szimbiózisban résztvevő gének jellemzése és funkciójuk megismerése. A kezdeti kutatások az egyszerűbb szerveződésű baktériumra irányultak, ezért számos, a szimbiózist kialakító és fenntartó bakteriális gén ismert már. A kölcsönhatásban résztvevő növényi génekről azonban keveset tudunk, ezek megismerése még a kezdeti lépéseknél tart.

Az MTA SzBK Genetikai Intézetének Lucerna Genetikai Csoportja ezért a *Rhizobium meliloti* és a lucerna (*Medicago sativa*) gazdanövény közötti szimbiózis kialakításáért és fenntartásáért felelős növényi gének megismerését és jellemzését tűzte ki célul, genetikai és molekuláris biológiai módszerek felhasználásával. A genetikai megközelítéssel történő vizsgálatokhoz szükség volt egy részletes genetikai térkép elkészítésére. Egy lucerna kapcsoltsági térkép a szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő gének vizsgálatában, azok térképezésén alapuló izolálásában, illetve a lucerna agronómiai tulajdonságaiért felelős lókuszok azonosításában, és így a lucerna nemesítésében nagy segítséget jelent. Csoportunk ezért elkészítette a lucerna genetikai alaptérképét (Kiss és mtsai 1993), melyet azóta folyamatosan továbbfejlesztünk. Dolgozatom témája a részletes genetikai térkép elkészítése és alkalmazása, a borsó (*Pisum sativum*) kapcsoltsági térképével történő összehasonlítása, és egy szimbiotikus nitrogénkötésben hibás lucerna mutáns genetikai térképezése.



2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Ebben a fejezetben több, egymástól talán távolabb eső biológiai témakört szeretnék érinteni. Ezen látszólag egymástól távol álló biológiai témák rövid ismertetésére azért van szükség, mert ezek kapcsolódási pontjai szolgáltak elméleti alapul kutatási témáinkhoz és ezek határozták meg az általunk alkalmazott vizsgálati módszereket. Először a *Medicago* nemzetségről szeretnék áttekintést nyújtani, amely remélhetőleg segíti a dolgozatban leírt eredmények közötti eligazodást. Ezt követően a csoportunk által vizsgált biológiai folyamatot mutatom be röviden, majd pedig a genetikai térképezés elméleti háttéréről és a növényi genetikai térképek dolgozatom eredményeihez kapcsolódó területéről szólok.

2.1. A *Medicago* nemzetség

A lucerna (*Medicago sativa* L.) a kétszikűek (*Dicotyledonae*) osztályába, a hüvelyesek rendjébe (*Fabales*), a pillangósvirágúak családjába (*Papilionaceae*) és a *Medicago* nemzetségbe tartozó gazdasági haszonnövény. A *Medicago* nemzetségbe több mint 60 különböző faj tartozik, melyek eredetileg a mediterrán régióban honosak, de Spanyolországtól Kínáig, Szibériától Jemenig az Óvilágban igen széles körben, természetes módon fordulnak elő. A nemzetség elsődleges gécenctruma a Kaukázus vidékén, Ény-Irán és ÉK-Törökország területén található. A nemzetségbe tartozó fajok alap kromoszómaszáma $x=8$, kivéve négy évelő fajt, melyeknél $x=7$. Három természetes előfordulású ploidiaszint figyelhető meg: diploidok ($2n = 2x = 16$), tetraploidok ($2n = 4x = 32$) és néhány faj esetén hexaploid ($2n = 6x = 48$) formák. A tetraploidok spontán módon keletkeztek a diploid formákból, amikor a gamétaképződés során a kromoszómák megkettőződését nem követte sejtosztódás. Általánosságban elmondható, hogy a tetraploid *Medicago*-változatok életerősebbek, jobban képesek alkalmazkodni a környezeti

feltételekhez mint diploid rokonaik, melyek általában csak elzárt területeken fordulnak elő (Quiros és Bauchan 1988, és Lesins és Lesins 1979a).

A *Medicago* nemzetségbe tartozó fajok kétharmada egynyári, melyeknél a magképződés önmegtermékenyítést követően zajlik le (autogámia). Az önmegtermékenyítés miatt a fajok nagyfokú egyöntetűsége (uniformitása) figyelhető meg. E csoport egyik jellegzetes, a Földközi-tenger vidékén honos faja a *Medicago truncatula*, amely napjainkra a szimbiotikus nitrogénkötés vizsgálatának egyik modellnövényévé vált (Barker és mtsai 1990, Cook és mtsai 1997). A fajok maradék harmada évelő, náluk különböző fokú öninkompatibilitás figyelhető meg. Az évelő fajoknál a szíromlevelek felnyílását rovarok (földi poszméh, lucerna-földiméh, stb.) indukálják, így ezek idegentermékenyítők (allogámia), bár kis gyakorisággal önmegtermékenyítés is előfordulhat. Az idegenbeporzás következményeként heterozigótaság és nagyfokú polimorfizmus jellemzi őket.

2.1.1. A *Medicago sativa* komplex

A termesztett lucerna más diploid és tetraploid *Medicago*-változatokkal együtt a *Medicago sativa* komplexbe tartozik. A komplex tagjai valamennyien évelők, szíromleveleik sárga, ibolya vagy a kettő közötti átmeneti színűek. A hüvelytermés alakja csigavonalban feltekeredő vagy egyenes is lehet, bennük egy vagy több mag helyezkedik el. A komplex tagjai egymással keresztezhetők, az azonos ploidiaszintű változatok kariotípusa azonos, közöttük a génkicserélődés akadályá egyedül a különböző ploidiaszint. Ez a gát is átjárható azonban, mivel a diploid változatoknál, ritka esetekben, a meiózis során szét nem vált kromoszómákat tartalmazó gaméták is keletkezhetnek, így nincs keresztezési akadály a diploid és tetraploid változatok között. A fenti ismérvek és egyéb citológiai és genetikai adatok alapján a rendszertannal foglalkozó kutatók a komplexbe tartozó összes változatot a *Medicago sativa* alfajainak tekintik, és valamennyit az ún. *Medicago* komplexbe sorolják (Quiros és Bauchan

1988; Lesins és Lesins 1979b). Mivel az alfajok kereszteződhetnek egymással, ezért sokféle morfológiai tulajdonsággal bíró hibridváltozat figyelhető meg, melyek a növények rendszerezését megnehezítik (Quiros és Bauchan 1988).

Csoportunkban a lucerna genetikai térképének elkészítéséhez használt térképező populációt a *Medicago sativa* komplexbe tartozó két diploid alfaj, a *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* és *Medicago sativa* ssp. *coerulea* utódai alkották. Ennek a két alfajnak néhány morfológiai ismérve nagyon különböző. A *falcata* alfajnak mind diploid, mind tetraploid változatai ismertek, jellemzője a sárga virágszirom, és az egyenes és a sarlóalak között több átmeneti formával jellemezhető hüvelyforma. Sok változatát tartják számon, a *quasifalcata* elnevezés is a *falcata* alfaj egy diploid változatát jelöli (Quiros és Bauchan 1988). A diploid és tetraploid változatok a tizedik (Németország) és a nyolcvanadik (Szibéria) hosszúsági fokok, a negyvenedik (a Fekete-tenger partvidéke) és a hatvanadik (É-Oroszország) szélességi körök által határolt területen őshonosak (Quiros és Bauchan 1988; Lesins és Lesins 1979b). A *falcata* alfaj előnyben részesíti a száraz sztyeppe nyújtotta feltételeket, hüvelytermése is az ilyen körülmények közötti elterjedéshez alkalmazkodott. Az ibolyaszínű virágú *M. sativa* diploid formáját *M. sativa* ssp. *coerulea*, tetraploid változatát pedig *M. sativa* ssp. *sativa* névvel illetjük. Elterjedési területe magában foglalja a Földközi-tenger vidékét, a Közel-Keletet, Kis-Ázsiától kezdődően a Kaukázus vidékén át egészen Közép-Ázsiát, ahol meleg, száraz, félsivatagos környezetben tenyészik. A nyílt területeken a szél által görgetve terjed jellegzetesen feltekeredett hüvelytermése (Quiros és Bauchan 1988; Lesins és Lesins 1979b).

A származástani kutatások alapján a komplex diploidjainak közös őse a Kaukázus vidékén élt, és nagyon hasonló lehetett egy mai, szintén a *Medicago sativa* komplexbe tartozó diploid alfajhoz, a *M. sativa* ssp. *glomerata*hoz. E sárga virágú, felcsavarodott formájú hüvelyterméssel rendelkező növény populációiból térbeli izolációt (ami valószínűleg a Fekete-tengert a Kaszpi-tengerrel összekötő kapcsolat lehetett) követően alakult ki a két alfaj. A déli populáció tagjai elvesztették xantofilltermelő képességüket, sárga flavonoid molekulái

halványsárga molekulákká alakultak, melyek később a kék virágszínt okozó antocianin prekursorai lettek. Ebből a populációból alakult ki a *coerulea* alfaj. Az északi populáció hüvelytermése az egyenes formájú termés irányába mutató szelekción esett át, ami jobban megfelelt a füves síkságokon történő terjedésnek. Ennek a populációnak az egyedei megtartották sárga virágszínüket, és ez vezetett a *falcata* alfaj keletkezéséhez (Quiros és Bauchan 1988; Lesins és Lesins 1979b). Nagy valószínűséggel a két diploid alfaj hibridje a zöldes, átmeneti virágszínnel rendelkező *M. sativa* ssp. *x hemicycla*, amely a természetben is előfordul azokon a területeken, ahol a két alfaj egymással érintkezik. A diploid *coerulea* és *falcata* alfajok nagyobb méretű virággal, levélzettel és terméssel rendelkező tetraploid változatai is keresztezhetők egymással, amely a *M. sativa* ssp. *x varia* alfajhoz nagyon hasonló egyedeket eredményez (Quiros és Bauchan 1988).

A lucerna a mérsékelt égöv országaiban a legrégebben, kizárólag takarmányozási céllal termesztett, fehérjében igen gazdag szálastakarmány. Az évelő, kék virágú, csavarodott terméshüvelyű tetraploid termesztett lucerna (*Medicago sativa* L.) a *M. sativa* ssp. *sativa* nemesítésének eredménye, de genetikai állományához minden bizonnyal a *M. sativa* ssp. *falcata* is hozzájárult, ahogy azt néhány izoenzimmal végzett vizsgálat mutatta (Michaud et al. 1988). A lucernát Kis-Ázsiában, a Kaukázus körüli régióban vonták termesztésbe kb. 8000-9000 éve, és manapság már szinte az egész világon, Kínától az amerikai kontinensig, Skandináviától Ausztráliáig termesztik (Michaud et al. 1988, Quiros és Bauchan 1988). Magyarországon Tessedik Sámuel honosította meg a XVIII. sz. végén. Hosszú karógyökerei több méter mélyre hatolnak a talajba, és így hasznosítani tudja a talaj alsóbb rétegeinek vízkészletét, ezért a hosszan tartó száraz időszakot is elviseli (Bálint 1966). Nagy előnye, hogy a *Rhizobium meliloti* talajlakó baktériummal szimbiotikus kapcsolatot képes kialakítani, s ez a talaj nitrogéntartalmától való függőségét csökkentette.

2.2. A szimbiotikus nitrogénkötés

Az élővilágban nagy változatosságban fordulnak elő növények és mikroorganizmusok között kialakuló patogén, szaprofita és szimbiotikus kölcsönhatások. Az egyik legintenzívebben vizsgált kölcsönhatás a *Rhizobium* baktériumok pillangósvirágú növényekkel létrehozott nitrogénkötő szimbiózisa. A szimbiotikus nitrogénkötés kialakításáért és fenntartásáért felelős biológiai folyamatokkal számos részletes összefoglaló munka kimerítően foglalkozik (Nap és Bisseling 1990, Franssen és mtsai 1992, Verma 1992, Vijn és mtsai 1993, Schultze és mtsai 1994, Mylona és mtsai 1995, Geurts és Franssen 1996, Long 1996).

2.2.1. A szimbiotikus gümő kialakulása

A *Rhizobium* baktérium és pillangósvirágú gazdanövénye (*Medicago*, *Pisum*, *Melilotus* fajok, stb.) között sorozatos, molekuláris szintű jelcserét követően mindkét partnerben morfológiai és fiziológiai változások következnek be, melynek végén egy kölcsönös előnyökön alapuló együttélés jön létre. A szimbiotikus nitrogénkötés kialakulása során a gazdanövény gyökerén a baktérium által indukált új szervek, gyökérgümők jelennek meg, amelyekben a baktériumok által végzett nitrogénredukció és asszimiláció folyik.

A szimbiózis jelcserével és a partnerek kölcsönös felismerésével kezdődik. A pillangósvirágú növények folyamatosan olyan molekulákat (flavon és izoflavon vegyületeket) bocsátanak a rizoszférába, melyeket a talajlakó *Rhizobium* baktériumok speciális jelmolekulaként érzékelnek. A kibocsátott gazdaspecifikus összetételű flavonoid molekulák egyrészt a növényi gyökér irányába vonzzák a baktériumokat, másrészt egy, a baktériumban állandóan termelődő fehérjével, a *NodD* fehérjével kapcsolatba kerülve a szabadon élő baktériumban át nem íródó, ún. gümőképzési (nodulációs vagy *nod*) gének transzkripciósz aktivátoraként működnek. A *nod* gének termékei válaszként egy molekulát, az ún. Nod-faktort

termelik a baktériumban, ami a tápközegbe kijutva a gazdanövényben elindítja azokat a specifikus fiziológiai és morfológiai folyamatokat, melyek a gümőfejlődéshez vezetnek. A tisztított Nod-faktor a szerkezeti analízis alapján D-glükózamin β -1,4-tetraszaharidnak bizonyult (ritkábban előfordulhatnak három vagy öt tagból álló molekulák is), amelynek három aminocsoportjához acetyl csoportok kapcsolódnak, a nem redukáló végen lévő glükózon található negyedik aminocsoport pedig egy 16 vagy 18 szénatomszámú telítetlen zsírsavlánchoz kötődik (Lerouge és mtsai 1990). Ez utóbbi szénláncossza és telítetlen kötéseinek száma, a glükóz molekulákhoz kapcsolódó egyéb csoportok [pl. szulfát a *Rhizobium meliloti*-nál, más fajoknál acetyl-, fukozil-, stb. csoportok (Schultze és mtsai 1994, Mylona és mtsai 1995)] határozzák meg a Nod-faktor gazdaspecificitását.

A *Rhizobium*-mal kontaktusba lépő gazdanövényen az első mikroszkóppal is látható válaszreakció a gyökérszőrgömbösödés. A mikroba megtapad a gyökérszőr felszínén, amely pásztorbatszerű begömbösödésével magába zárja a baktériumot. A baktériumok a gazdanövényben egy sejtfalelemekből álló, a gyökér központja felé folyamatosan épülő ún. infekciós fonál képződését indítják el, amelyben az osztódó baktériumok a gyökér szövetei felé vándorolnak. Az infekciós fonál képződésével egyidőben a gyökér kérgében néhány, már differenciálódott sejt mitotikusan újra aktiválódik, és osztódásával létrehozza a gümőkezdeményt, vagy más néven primordiumot. Az osztódó kéregsejtek nyugalmi fázisból osztódási fázisba lépését feltehetően a sejtekben a specifikus jelre bekövetkező hormonegyensúly (citokinin/auxin arány) megváltozása idézi elő (Hirsch és Fang 1994). A kéregsejtek mitotikus aktiválódása mesterségesen is kiváltható az auxintranszportot gátló vegyületekkel (Hirsch és mtsai 1989) és a citokinin szintézisében szerepet játszó zeatin gént hordozó *Escherichia coli* baktériummal (Cooper és Long 1994), aminek következtében gümőszerű képződmények indukálhatók a növény gyökerén. Ebből egy másik következtetés is levonható, mégpedig az, hogy a növény rendelkezik a gümő kialakításának képességével, a folyamatot a *Rhizobium* specifikus jelemolekulája indítja el.

A Nod-faktor elengedhetetlen a gümőképződés kezdeti lépéseihez, és a növényi válaszreakciók közül jó néhányat a tisztított vagy szintetizált Nod-faktorok is képesek kiváltani. Nod-faktor hozzáadás után néhány perccel a gyökér epidermisz sejtjein plazmamembrán depolarizáció mérhető (Ehrhardt és mtsai 1992), majd azt követően a citoplazmában sorozatos kalciumszint-változás figyelhető meg (Ehrhardt és mtsai 1996). Ezután gyökérszőrgömbülés, majd pár óra múlva néhány növényi gén (*ENOD12*, Scheres és mtsai 1990a, *ENOD40*, Crespi és mtsai 1994, peroxidáz gén, Cook és mtsai 1995) expressziója és a kéregsejtek fent említett mitotikus aktiválódása figyelhető meg Nod-faktor hatására. Az a szignál transzdukciós út, amelyen a baktériumtól induló jel eljut azokhoz a pontokhoz, amelyek kiváltják a fent említett válaszreakciókat, eddig még felderítetlen.

A gyökérszőr sejtjeit elhagyva az infekciós fonál növekedése a gümőkezdemény felé irányul, ahol az infekciós fonalak elágaznak és annak sejtjeibe hatolnak. Az infekciós fonálból a baktériumok endocitózissal a citoplazmába jutnak, ahol egy növényi eredetű, ún. peribakteroid membránnal (PBM) határolódnak körül, amely így megakadályozza a sejten belül található *Rhizobium*mal szembeni növényi patogén reakciók kialakulását. A fertőzött növényi sejtekben a baktériumok addig osztódnak, amíg szinte teljesen ki nem töltik azt, miközben fokozatosan megkezdődik bakteroiddá, a *Rhizobium* baktérium nitrogénkötésre képes, endoszimbiotikus formájává történő átalakulásuk.

A gümő kialakulása során egy sor, csak a gümőben, vagy ott intenzívebben kifejeződő növényi gén (ún. nodulin gén) aktiválódik (Delauney és Verma 1988, Nap és Bisseling 1990, Sánchez és mtsai 1991, Franssen és mtsai 1992, Verma 1992, Schultze és mtsai 1994, Mylona és mtsai 1995). A baktérium és a növény közötti kölcsönhatás korai szakaszában, és a gümő kialakulása során indukálódó géneket korai nodulin (*early nodulin*; *enod*) géneknek nevezzük. Ezek közül számos ismert, aktiválódásuk pontos helyéről és időpontjáról viszonylag sok információ áll rendelkezésre, azonban funkciójukról még keveset tudunk. Az eddig izolált korai nodulin gének egy része nagy valószínűséggel sejtfal szerkezeti fehérjét (*ENOD2*, *ENOD5*,

ENOD12) kódol, vagy eddig pontosan meg nem határozott funkcióval rendelkezik (ENOD8, ENOD10, ENOD40).

2.2.2. Az érett gümő működése

Az állandó osztódású (indeterminált) gümővel rendelkező növényeknél a baktériumok kiszabadulásával egyidőben a gümőkezdemény néhány, a gyökér központjától távolabb eső sejtrétege átalakul kicsiny, citoplazmadús sejtekké, melyek később a gümő merisztémáját alkotják (Nap és Bisseling 1990). A merisztéma folyamatos osztódással és differenciálódással hozza létre a kifejlett gümő különböző szöveteit. Az indeterminált gümő központi szövetében a merisztémától a gümő alapi része felé haladva, párhuzamosan a gümőt alkotó sejtek életkorával, öt különböző zónát különböztetnek meg (Franssen és mtsai 1992). A legkívül eső, baktériummentes osztódási zónában (1) állandó merisztematikus aktivitás figyelhető meg, az infekciós zónában (2) történik a baktériumok infekciós fonalakból történő kiszabadulása, endocitózisa és körülöttük a peribakteroid membrán kialakulása. A korai szimbiotikus zóna (3) fertőzött sejteiben zajlik a baktériumok osztódása és bakteroiddá történő differenciálódása. A következő, az ún. nitrogénkötési zónában (4) zajlik a légköri nitrogén ammóniává alakítása, melyet a bakteroidok nitrogenáz enzime katalizál. A gümő alapi részéhez legközelebb eső öregedési zónában (5) a növényi sejtek és a bennük lévő bakteroidok fokozatos elhalása figyelhető meg.

A gümő metabolizmusában résztvevő késői nodulinok működését a korai nodulinoknál jobban ismerjük. A késői nodulin gének egy része a szimbiotikus gümőn kívül a növény egyéb szerveiben is kifejeződik, de a gümőben megnövekedett expressziót mutat, vagy gümőspecifikus formával is rendelkezik. A nitrogén asszimilációjában résztvevő enzimek közül eddig a glutamin szintetázt (GS), glutamát szintázt (GOGAT), aszpartát aminotranszferázt (AAT) és az urikázt; a gümő szénanyagcseréjében szereplő enzimek közül a malát

dehidrogenázt (MDH), a foszfoenolpiruvát karboxilázt (PEPC) és a szaharóz szintázt (SH) azonosították. A késői nodulinok közé tartoznak még a peribakteroid membránnal (PBM) kapcsolatban lévő fehérjék, például a szója nodulin-26, mely valószínűleg a PBM ioncsatornáinak felépítésében vesz részt. A működő gümő szolubilis fehérjéinek 25%-át is kitevő leghemoglobin (Lb) biztosítja a gümő középső részében a *Rhizobium* számára a mikroaerob környezetet és az energiaigényes nitrogénkötés számára szükséges oxigénmennyiséget. Számos késői nodulin funkciója még nem ismert, ezek közé tartozik a csoportunkban korábban lucernából izolált nodulin-25 gén terméke is (Kiss és mtsai 1990).

2.3. Genetikai megközelítés a biológiai folyamatok vizsgálatában

A molekuláris biológiai kutatások célja az élővilágban lejátszódó folyamatok és jelenségek molekuláris szintű feltárása. Ehhez nélkülözhetetlen a vizsgált folyamatban résztvevő fehérjék, illetve az azokat kódoló gének ismerete. Növényi gének izolálására több lehetőség is kínálkozik, ezek közül talán a legegyszerűbb módszer a génkönyvtárakban heterológ hibridizációs próbákkal végzett keresés. A baktérium és élesztő mutánsokon növényi cDNS-bankokkal végzett komplementálási kísérletekkel, kimerítéses hibridizáció módszerével, transzpozon vagy T-DNS inszerció segítségével is izoláltak már növényi géneket (Gibson és Somerville 1993), azonban ezen módszereknek különféle korlátai vannak, nem mindig használhatók sikeresen. Random cDNS szekvenálással több száz gént azonosítottak *Medicago truncatula* növényből (Covitz és mtsai 1998). A leggyakrabban a gének eltérő expresszióján (a mRNS vagy a fehérje eltérő megjelenésén) alapuló módszerekkel azonosítottak egy adott biológiai folyamatban feltételezhetően résztvevő géneket. Ilyen elvek alapján működik a differenciál hibridizáció módszere, és az ún. „differential display” technika (Liang és mtsai 1992 és 1993). E módszerek szerint kétféle, valamilyen tulajdonság vagy kritérium alapján megkülönböztethető mintából tisztítanak mRNS-t. A különbség lehet kétféle szövet, eltérő

fejlődési fázis, környezeti feltétel, stb. A szimbiotikus nitrogénkötés során kifejeződő gének izolálásához általában Nod-faktorral vagy baktériummal kezelt növényekből készített cDNS könyvtárból izolálják azokat a klónokat, amelyek a nem kezelt növényből készített génkönyvtárban nincsenek jelen.

A gének eltérő expressziós mintázatán alapuló biokémiai módszerekkel izolálták a szimbiotikus nitrogénkötés folyamán csak a gümőben kifejeződő eddig azonosított gének nagy részét (Delauney és Verma 1988 és a 2.2.1. és a 2.2.2. fejezetben felsorolt gének). Az ily módon izolált génekről azonban csak annyit tudunk, hogy a vizsgált folyamat során kifejeződnek, de arra nincs bizonyíték, hogy abban részt is vesznek, és működésük elengedhetetlen a biológiai folyamat normális lezajlásához. Jó példa erre a differenciálhibridizációval azonosított ENOD12 korai nodulin gén (Scheres és mtsai 1990a). Az elvégzett biokémiai és citológiai vizsgálatok szerint az ENOD12 gén már a szimbiózis kezdeti lépéseinél a gümőprimordium sejteiben és az infekciós fonal befogadására felkészülő gyökérsejtekben is kifejeződik, expressziója tisztított NOD-faktorral is kiváltható volt (Scheres és mtsai 1990a). Ezek alapján az ENOD12 korai nodulin génnek kulcsszerepet tulajdonítottak a szimbiózis kialakításában. A világ számos laboratóriumában intenzív kutatások tárgyát képezte szerepének pontos tisztázása. Genetikai vizsgálatokból azonban kiderült, hogy az ENOD12 gént nem hordozó növények szimbiotikus nitrogénkötő képessége nem különbözött a vad típusú egyedekétől, ami azt jelenti, hogy a gén nem szükséges a szimbiotikus gümő létrehozásához (Csanádi és mtsai 1994). Ez a példa is rávilágít arra, hogy egy biológiai folyamat feltárásához nagy segítséget nyújtanak a vizsgált folyamatban hibás mutánsok és azok genetikai vizsgálata.

A mutációt szenvedett gén izolálására a térképezésen alapuló génizolálás („map-based cloning”) nyújt lehetőséget. Ennek során a mutáció helyét a kapcsoltsági térképen meghatározzák, és a szorosan kapcsolt molekuláris markereket használják hibridizációs próbaként azon klónok azonosítására, melyek a mutáns gén és a szorosan kapcsolt marker közötti DNS szakaszokat tartalmazzák. Ennek a módszernek elengedhetetlen feltétele, hogy

rendelkezésre álljon egy genetikai térkép, és a növény genomját jól reprezentáló, nagy DNS-szakaszokat tartalmazó könyvtár, melyeket különböző klónozó vektorokban hoznak létre (Monaco és Larin 1994). A módszer egyik kulcsponja a minél közelebbi marker megtalálása, mert különben több száz kilobázis hosszúságú DNS-szakaszon kell „genomsétával” átjutnunk, hogy elérjünk a kívánt génhez. Az izolált gén vad típusú alléljának a mutáns egyed genomjába való visszajuttatásával (genetikai komplementáció) bizonyíthatjuk, hogy valóban a mutációért felelős gént izoláltuk. Ezzel a módszerrel már növényi géneket is azonosítottak árpa, paradicsom és *Arabidopsis thaliana* növényből (Giraudat és mtsai 1992, Martin és mtsai 1993, Bent és mtsai 1994, Leung és mtsai 1994, Meyer és mtsai 1994, Pepper és mtsai 1994, Grant és mtsai 1995, Büschges és mtsai 1997, stb.). A mutációt szenvedett gén azonosítása genetikai megközelítéssel hosszú és fáradságos folyamat, viszont biztosak lehetünk abban, hogy az izolált gén valóban nélkülözhetetlen a kérdéses biológiai folyamatban. Csoportunk ezért a térképezésen alapuló génklónozás módszerét alkalmazza a szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő gének azonosítására.

Ehhez a stratégiához tehát elengedhetetlenek a szimbiotikus nitrogénkötés kialakítására nem képes mutáns növények. Manapság már száz felett van ezen növényi mutánsok száma, de ezekből a mai napig egyetlen mutációt szenvedett gént sem sikerült azonosítani. Az egyik legrészletesebben jellemzett szimbiotikus nitrogénkötő kapcsolat a lucerna (*M. sativa*) és a *Rhizobium meliloti* között létrejövő együttélés, ennek ellenére kevés szimbiotikus mutáns ismert eddig a lucernában (Peterson és Barnes 1981, Kiss 1987). A termesztett lucerna idegenbeporzó tetraploid növény, ami megnehezíti az indukált mutagenézissel történő mutánsok előállítását, valamint a rajta végzett genetikai kísérleteket nagyon bonyolulttá teszi. Ezért az utóbbi években a világ számos laboratóriumában az egynyári, önbeporzó *Medicago truncatula*-val kezdtek kísérletekbe, ami szintén a *Rhizobium meliloti*-val képes szimbiózist kialakítani. Számos szimbiotikus mutánst is jellemeztek ebből a növényből (Bénaben és mtsai 1995, Sagan és mtsai 1995, Penmetsa és Cook 1997).

2.4. Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás növényi mutánsok

A szimbiotikus gümő létrehozása egy több lépésből álló összetett folyamat, amely mind a gazdanövény, mind pedig a baktérium genom számos génjének összehangolt működését feltételezi. Ha a szimbiotikus gümő kialakításában résztvevő valamelyik gén mutáció (ami lehet természetesen előforduló vagy mutagenézissel indukált) következtében funkcióját nem képes ellátni, akkor ezt a szimbiotikus folyamatban bekövetkező fenotípusos változásból észlelhetjük. A megakadt gümőfejlődésből következtethetünk arra, hogy a folyamat mely lépéseiben vehet részt a mutációt szenvedett gén. Ezek alapján a szimbiotikus nitrogénkötésben hibás növényi mutánsokat - melyeket több összefoglaló munka is részletesen tárgyal (Rolfe és Gresshoff 1988, Caetano-Anollés és Gresshoff 1991, Phillips és Teuber 1992, Schultze és mtsai 1994) - három nagy kategóriába oszthatjuk.

Az egyik csoportba azok tartoznak, amelyeknél a fertőzési folyamatban bekövetkező hiba következtében egyáltalán nem indul el, vagy igen korai stádiumban gátolt a gümőképződés. Ezeket nevezzük Nod^- mutánsoknak, melyek az eddig megfigyelt esetekben recesszív módon öröklődtek. A gümőfejlődés kezdeti lépéseinél két folyamat figyelhető meg; gyökérszőrgömbülés és a belső kéregsejtekből a gyökérgümő-primordium keletkezése. A Nod^- mutánsok között találunk olyanokat, melyeknél egyik vagy másik, esetleg mindkét folyamat hibát szenved [szója *nod139*-es (Mathews és mtsai 1989) és *nod49* és *nod772* indukált mutánsai (Rolfe és Gresshoff 1988), a borsó *sym2* (Geurts és mtsai 1997), a lucerna MnNC-1008 (Peterson és Barnes 1981), a borsó *sym8* és *sym9* (Markwei és LaRue 1992), és a *Melilotus alba sym3* (Utrup és mtsai 1993) mutánsai].

A szimbiotikus nitrogénkötésben mutáns növények következő kategóriáját azok a növények alkotják, amelyek képesek gümők kialakítására, de ezekben vad típusú *Rhizobium* jelenlétében sem megy végbe hatékony szimbiotikus nitrogénkötés. Ezek a szimbiotikus nitrogénkötés szempontjából „ineffektív” (In^- vagy Fix^-) mutánsok, melyeknek jellemző

fenotípusos tulajdonsága a vad típusú növényeken található gümők számánál jóval több fehér, leghemoglobin-hiányos gümő, a nitrogénhiányból adódó klorotikus fenotípus (gyenge növekedés, sárgás levelek) és a virágzás elmaradása. Minden vizsgált makroszimbiota partner esetében leírtak már Fix⁻ mutánsokat, melyek részletes jellemzése Kneen és LaRue (1988), Duc és Messenger (1989), Kneen és mtsai (1990), Utrup és mtsai (1993), Park és Buttery (1994), Sagan és mtsai (1995), Bénaben és mtsai (1995), Imaizumi-Anraku és mtsai (1997), valamint Caetano-Anollés és Gresshoff (1991) és Phillips és Teuber (1992) összefoglaló munkáiban található meg. Az ineffektív mutánsok egy része tumorszerű, nem funkcionáló gümőt képez, más részénél pedig a gümők korai öregedése figyelhető meg (Sánchez és mtsai 1991). Tetraploid lucernavonalakban azonosították az *in*₁, *in*₂, *in*₃, *in*₄*in*₅ mutánsokat (Peterson és Barnes 1981), melyek mindegyike recesszív öröklődésűnek bizonyult. Dr. Kiss György és munkatársai mutagenizálást követően azonosítottak diploid *Medicago sativa* ssp. *coerulea* populációban egy gümőfunkcióban hibás növényt (Kiss 1987), melyet Fix1-nek, majd később a *M. sativa* nevezéktant követve McIN6-nak, a mutációt szenvedett gént pedig *fix1*-nek illetve *in*₆-nak nevezték el. E mutáció részletesebb jellemzése a 3.1. fejezetben található.

A gümőfejlődés során a növény szabályozza a keletkező gümők számát. Ez alól a szabályozás alól felszabaduló növények alkotják a mutánsok harmadik csoportját. Ezeken a mutáns növényeken a vad típusnál lényegesen nagyobb számú funkcionáló gümő fejlődik ki (ún. szuper gümőzők vagy Nod⁺⁺ mutánsok), még a tápközeg egyébként gátló hatású, magas nitráttartalma esetén is (Caetano-Anollés és Gresshoff 1991). Több pillangósvirágú növényben is azonosítottak már ilyen, a gümőszámot szabályozó autoregulációs mechanizmus sérülése miatt keletkező mutánsokat (Jacobsen és Feenstra 1984, Carroll és mtsai 1985a és 1985b, Duc és Messenger 1989, Sagan és mtsai 1995, Szczyglowski és mtsai 1998).

Csoportunkban két, a szimbiotikus nitrogénkötésben hibás lucerna mutáns részletes vizsgálata folyik (Endre és mtsai 1996, 3.1. és 3.3. fejezet). Mindkét mutánst részletesen jellemezték már fény- és elektronmikroszkópos, valamint fiziológiai vizsgálatokkal (Peterson és

Barnes 1981, Dudley és Long 1989, Caetano-Anollés és mtsai 1993, Kiss 1987 és 1997), de ezek nem szolgáltatnak elegendő információt a mutációt szenvedett gén funkciójáról, ehhez a gén izolálására van szükség. A mutáns gén azonosítását térképezésen alapuló génizolálással tervezzük megoldani. Ennek végrehajtásához azonban szükségünk volt a lucerna részletes genetikai térképének elkészítésére. A genetikai térképezés alapjait, és a kapcsoltsági térképek elkészítésének menetét a következő fejezetekben ismertetem.

2.5. A genetikai térképezés

A diploid élőlények minden egyes ivarsejtje egy teljes haploid kromoszómakészletet hordoz. A kromoszómákon a magasabbrendű élőlények több tízezer génje lineárisan helyezkedik el, és így csoportokba rendeződve jutnak át az utódokba. E kapcsoltsági csoportok fizikai megjelenése tehát a kromoszómakészlet, így a kapcsoltsági csoportok száma megegyezik az adott élőlény alap kromoszómaszámaival. A kapcsoltsági csoportokon belül a gének lineáris sorrendje genetikailag meghatározható, ezt nevezzük genetikai térképezésnek.

A genetikai térképek nagy elméleti és gyakorlati jelentőséggel bírnak. Az eukarióta genomok komplexitásuk miatt molekuláris módszerekkel ugyanis nehezen kezelhetők, a genetikai térképek azonban jelentősen megkönnyítik ezek vizsgálatát, pl. lehetőséget biztosítanak a térképezésen alapuló génizoláláshoz (ld. 2.3. fejezet). Habár rövid időn belül az emberiség rendelkezésére fog állni néhány eukarióta modellélőlény teljes szekvenciája (az *Arabidopsis thaliana* 120 Mb nagyságú genomjából 50 Mb-nyi rész szekvenciája már ismert, és előreláthatóan 2000 végére a teljes genom szekvenciája az adatbankokban lesz; Meinke és mtsai 1998), a genetikai térképek a genomokban való tájékozódáshoz továbbra is nélkülözhetetlenek lesznek. A genetikai térképek segítségével meghatározhatók a mennyiségi tulajdonságok (quantitative trait loci, QTL) kialakításáért felelős lókuszok (Tanksley 1993), valamint a gazdasági és agronómiai szempontból fontos tulajdonságokért felelős gének térképhelye. A

különböző rokonsági viszonyban lévő élőlények részletes genetikai térképeinek összehasonlításából pedig azok genomszerveződéséről kaphatunk információt, s ez származástani kérdésekre is választ adhat.

2.5.1. A genetikai térképezés alapjai

A genetikai analízis alapjait Gregor Mendel tette le a múlt század közepén végzett borsókeresztezési kísérleteivel (Rédei 1987 és Griffith és mtsai 1993a és 1993b). Ma már tudjuk, hogy az általa megállapított szabályszerűségek egy része csak függetlenül öröklődő markerekre vonatkozik. Különböző borsótulajdonságok öröklődésének követése során Mendel megállapította, hogy egy tulajdonság (pl. a borsó maghéjszíne) kialakításáért felelős "öröklődési faktor" (ma már tudjuk, hogy ez a gén) párosával található a szervezet testi sejtjeiben, az egyik apai, a másik anyai eredetű. Azt is megállapította, hogy az ivarsejtekbe a tulajdonságot meghatározó génpárból csak az egyik jut be, az ivarsejtek pedig véletlenszerűen egyesülhetnek zigótákká. Két eltérő, domináns-recesszív viszonyban lévő tulajdonságot hordozó homozigóta egyed keresztezését követően létrejött első utódnemzedék tagjai egyöntetű tulajdonságúak voltak, ezek keresztezéséből származó második utódnemzedékben pedig azt figyelte meg, hogy mindkét szülői tulajdonság megjelent 3:1 fenotípusos arányban. Két vagy több génpár a második nemzedékben egymástól függetlenül, szabadon kombinálódott, és a szülői elrendezés mellett nem szülői elrendezésben is kapott tulajdonságpárokat. Két génpár esetén a négyféle fenotípusos kategóriába eső egyedek száma 9:3:3:1 arányban oszlott el.

A XX. század első éveiben W. Bateson és R.C. Punnett illatos lednekkal és cukorborsóval végzett kísérleteik során azt tapasztalták, hogy bizonyos tulajdonságok öröklődése során a második utódnemzedékben az egyes fenotípus-kategóriákba eső egyedek aránya jelentősen eltért a 9:3:3:1 aránytól. A vizsgált esetekben az eredeti szülői gamétatípusoknak megfelelő fenotípus-osztály nagyobb volt az elméletileg vártnál, a nem szülői

kategória pedig kisebb. Azt tapasztalták tehát, hogy a tulajdonságok szabad szétválását valami akadályozza, de a jelenség okát nem tudták megmagyarázni. A magyarázatot századunk 10-es éveiben T. H. Morgan és A. Sturtevant adta meg, akik *Drosophilán* végzett kísérleteik során hasonló jelenségre, azaz bizonyos gének alléljeinek együttes előfordulási gyakoriságának növekedésére figyeltek fel az utódokban. Magyarázatuk szerint a vizsgált gének kapcsoltan helyezkedtek el ugyanazon a kromoszómán, ezért együtt öröklődtek, és így lett a szülői allélkombinációk száma magas. Kísérleteikből arra következtettek, hogy a tulajdonságok szabad kombinálódása csak a független kromoszómákon, vagy egy kromoszóma nagyon távoli pontjain lévő lókuszokra igaz. A kapcsolt gének együtt öröklődése viszont nem magyarázza meg a nem szülői allélkombinációk jelenlétét. A morgani elképzelés szerint a nem szülői allélkombinációk a meiózis során keletkeznek, amikor a homológ kromoszómapárok párosodnak egymással. Ekkor kromoszómadarabok cserélődhetnek ki esetenként az átkereszteződésnek (crossing-over) nevezett folyamat során, aminek következtében a kapcsolt gének alléljainak elrendeződése megváltozik. Ennek az eredménye a létrejövő új, nem szülői kombinációk, vagy más szóval a rekombinánsok létrejötte. Az átkereszteződés megvalósulására a homológ kromoszómapárok párosodása során egy citológiai is látható szerkezetben, a kiazmában látták a bizonyítékot. Több génpár öröklődését vizsgálva azt találták, hogy a rekombináns utódok száma igen változó volt attól függően, hogy milyen géneket vizsgáltak. Egy adott génpár esetében viszont a rekombinánsok száma közel állandónak adódott. Sturtevant dolgozta ki (Sturtevant 1913), hogy a rekombinánsok százalékos értéke, mint mennyiségi tulajdonság, miként alkalmazható két gén egymástól való távolságának mérésére. Két gén együttöröklődésének gyakorisága a köztük bekövetkező rekombinációk gyakoriságától, tulajdonképpen az átkereszteződések gyakoriságától függ. Két pont között bekövetkező átkereszteződések előfordulásának valószínűsége pedig a pontok közti távolsággal arányos. Azaz, ha két gén közel van egymáshoz, akkor a köztük fellépő rekombináció gyakorisága kisebb, vagyis nagyobb gyakorisággal öröklődnek együtt; míg azok, amelyek távolabb helyezkednek el egymástól, ritkábban



öröklődnek együtt, mivel köztük a rekombinációs gyakoriság nagyobb. A rekombinánsok gyakorisága tehát az aktuálisan vizsgált gének távolságát tükrözi. Ezt a távolságot az úgynevezett térképtávolsággal fejezik ki, melynek mértékegysége T. H. Morgan tiszteletére a centimorgan (cM). Megállapodás szerint 1 térképegység (1 cM) két marker között a genetikai távolság, ha köztük a rekombinációs gyakoriság 0,01 (1%). A nagyobb távolságra lévő lókuszok esetén a rekombinációs gyakoriság alapján történő távolságbecslés pontatlan, mert a két lókusz között bekövetkező kettős átkereszteződések révén létrejövő, szülői allélkombinációval rendelkező egyedek nem kerülnek be a rekombinánsok kategóriájába. Emiatt a rekombinációs gyakoriságot mégsem lehet közvetlenül távolságmeghatározásra használni, helyett egy ún. térképfüggvénnyel határozzák meg a rekombinációs gyakoriságból az átkereszteződések számát, és abból a térképtávolságot. A leggyakrabban használt átszámítási módszerek a Kosambi vagy pedig a Haldane térképfüggvények (Crow 1990).

Rekombinációs gyakoriságon tehát a két vizsgált lókuszra nézve rekombináns gaméták százalékos arányát értjük az összes gamétára vonatkoztatva. A rekombináns és nem rekombináns gaméták számának meghatározására legtöbbször nem nyílik lehetőség, hanem a gaméták találkozásából létrejövő utódoknak a vizsgált lókuszokra meghatározott genotípusaiból következtethetünk azok számára. Rekombináns gaméták egy másik rekombináns, vagy nem rekombináns gamétával történő egyesüléséből ugyanis rekombináns utód keletkezik, és így az utódnemzedék vizsgált lókuszainak genotípusából, azaz a kísérleti adatokból határozható meg a rekombinációs gyakoriság.

Két vizsgált lókuszra heterozigóta egyed keresztezését követően a rekombináns és nem rekombináns gaméták találkozása az utódokban kilenc különböző allélkombinációt eredményez (Allard 1956, Ritter és mtsai 1990 és Kiss és Endre). A rekombinációs gyakoriság figyelembevételével a keletkező gaméták gyakorisága meghatározható, a gaméták gyakoriságából pedig az egyes allélkombinációk létrejöttének valószínűsége is kiszámolható. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy mindkét lókuszra heterozigóta

fenotípust eredményezhet nem rekombináns ivarsejtek, valamint két nem azonos genotípusú rekombináns ivarsejt találkozása is, azaz a heterozigóta konfigurációról további kísérletek nélkül nem dönthető el, hogy rekombinációs esemény, vagy nem rekombinációs esemény következtében jöttek-e létre (cisz vagy transz heterozigóták-e). Ezért a gyakorlatban a rekombinációs gyakoriságot úgy határozzák meg, hogy az egyes allélkombinációk gyakoriságát számítják ki a kísérlet során kapott különböző utódkategóriákba eső egyedszámok alapján, és ezekből határozzák meg a rekombinációs gyakoriságot.

Két marker közötti kapcsoltság valószínűségének mérésére az ún. LOD-értéket használják (Lander és Botstein 1986). Ez az érték azon valószínűségek arányának a tízesalapú negatív logaritmus, amikor a két markert kapcsoltnak, illetve nem kapcsoltnak vesszük. Ennek megfelelően $LOD = 3$ érték azt jelenti, hogy a két marker megfigyelt genotípus-adatai ezerszer nagyobb valószínűséggel fordulnak elő akkor, ha a két marker kapcsolt, mintha nem lennének kapcsoltak.

2.5.2. A rekombinációs gyakoriság becslése maximum-likelihood módszerrel

A rekombinációs gyakoriságot általában a maximum-likelihood (legnagyobb valószínűség) módszer alkalmazásával becsülik meg (Allard 1956 és Ritter és mtsai 1990). A maximum-likelihood módszer használható annak a becslésére, hogy egy konkrét adatsorozat előfordulása milyen változó megvalósulása esetén a legvalószínűbb (Press és mtsai 1989). Ez a rekombinációs gyakoriság esetére lefordítva azt jelenti, hogy egy kísérlet során azt a rekombinációs gyakoriságot fogadjuk el két lókuszt közötti rekombinációs gyakoriság valódi értékének becslésére, amely esetén a megfigyelt konkrét adatok bekövetkezésének a valószínűsége a legnagyobb. Ilyenkor az adatokon egy keresztezést követően létrejövő egyes genotípus-kategóriákba eső egyedek számát értjük.

A fent említett heterozigóta egyedek keresztezésének példáját folytatva, ha a keletkezett genotípus kategóriákba eső egyedszámot $a_1, a_2, a_3, \dots, a_9$ -cel jelöljük (Ritter és mtsai 1990), az egyes genotípus kategóriák létrejöttének valószínűségét pedig $p_1, p_2, p_3, \dots, p_9$ -cel (Kiss és Endre), akkor annak a valószínűsége, hogy az a_1 egyedszámú genotípus kategória a_1 -szer forduljon elő, a kategória valószínűségének (p_1) az a_1 -dik hatványával egyenlő; annak a valószínűsége pedig, hogy az a_2 egyedszámú genotípus kategória a_2 -szer következzen be, a kategória valószínűségének (p_2) az a_2 -dik hatványával egyenlő, és így tovább. Annak a valószínűsége (L) tehát, hogy egy kísérlet során egy konkrét adatsorozatot kapjunk meg, egyenlő az

$$L = p_1^{a_1} \times p_2^{a_2} \times p_3^{a_3} \times p_4^{a_4} \times p_5^{a_5} \times p_6^{a_6} \times p_7^{a_7} \times p_8^{a_8} \times p_9^{a_9}$$

szorzattal (Kiss és Endre). Az L valószínűségi függvény maximumának megkeresésével megkapjuk a rekombinációs gyakoriságnak azt az értékét, mely mellett az adott kísérleti adatok megvalósulásának a legnagyobb a valószínűsége. Mivel egy nagyszámú minta esetén a kitevőben igen nagy értékek szerepelnének, és így az egyenlet kezelése is nehezkesebb lenne, ezért először az egyenlet tízes alapú logaritmusát számoljuk ki. Az így kapott függvény maximumhelye nem változik. A $\log(L)$ valószínűségi függvény RF szerinti deriváltját nullával egyenlővé téve ki lehet számolni a függvény maximumát, és így a rekombinációs gyakoriság legvalószínűbb értékét. Ez persze kézi számolással nehéz és fáradságos munka, ezért számítógépes programok (Mapmaker, Joinmap, Linkage) segítségével határozzák meg a rekombinációs gyakoriságot.

2.5.3. A genetikai térképek megszerkesztésének menete

Morgan és Sturtevant munkáiból tehát kiderült, hogy az azonos kromoszómán található gének a köztük lévő távolságtól függően bizonyos gyakorisággal együtt öröklődnek. A gondolatmenetet megfordítva, az együttöröklődés gyakoriságából, illetve a rekombinációs gyakoriságból következtethetünk két gén közötti távolságra. Sok gén egymáshoz viszonyított távolságát meghatározva felállítható az adott gének közötti sorrend. A markerek ily módon kapcsoltsági csoportokat alkotnak, reprezentálva a szervezet haploid kromoszómakészletét. A kapcsoltsági csoportok grafikus ábrázolása a kapcsoltsági, vagy genetikai térkép.

Egy faj genetikai térképének elkészítése elméleti és gyakorlati szempontból is igen nagy jelentőséggel bír. A genetikai térképek alkalmazása nagy segítséget jelent az eukarióta genomok vizsgálatánál, mert komplexitásuk miatt fizikailag nehezen kezelhetők. Egy genetikai térkép elkészítése három fő szakaszra bontható:

- (1) a szegregáló populáció előállítása
- (2) az egyedek genotípusainak meghatározása a különböző markerekre
- (3) az adatok analízisével végzett térképszerkesztés

(1) A térképezés első lépése a térképező populáció előállítása a két kiválasztott szülői vonal keresztezésével. Genetikai térképezésre csak a térképező populáció készítéséhez felhasznált két szülői egyed közötti genetikai különbségek (polimorfizmusok) használhatók, mert csak ezek öröklésmenete vizsgálható. Ezért célszerű olyan egyedeket választani a térképező populáció előállítására, melyek a lehető legtöbb polimorfizmust szolgáltatják. Lényeges azonban, hogy a szülők keresztezéséből életképes utódgeneráció keletkezzen, ugyanis genetikailag távol álló szülők esetén genomátrendeződési- és rekombinációs zavarok léphetnek fel. A térképezés F_1 , F_2 szegregáló, visszakeresztett populáción, vagy pedig rekombináns beltenyésztett vonalakon végezhető (Kiss és Endre).

(2) A genetikai térkép elkészítésének következő lépése a térképező populációt alkotó egyedek genotípusainak meghatározása minél több markerre nézve. Mint említettem, egy térképező populációban markerként csak a polimorfizmust mutató tulajdonságok jöhetnek számításba. Ezek a markerek lehetnek morfológiai és molekuláris markerek.

Hosszú ideig csak különböző természetes előfordulású, vagy mutagén kezeléssel előállított morfológiai különbségeket (pl. virág-, termésszín, levélforma, stb.) tudtak térképezni. Mivel ezek száma korlátozott, és térképezésük nehézkes (esetenként több populáció szükséges), ezért a klasszikus genetikai térképek megszerkesztése hosszú ideig vontatottan haladt. Az utóbbi 10-15 évben a különböző, DNS-polimorfizmusokon alapuló molekuláris markerek (RFLP - Botstein és mtsai 1980, RAPD - Williams és mtsai 1990, SCARs - Paran és Michelmore 1993, AFLP - Vos és mtsai 1995, SSCP - Orita és mtsai 1989, stb.) elterjedésének köszönhetően a genetikai térképek készítése nagy fordulatot vett, és mára szinte kivétel nélkül elkészült az összes, tudományos vagy gazdasági szempontból jelentős élőlény többé-kevésbé részletes genetikai térképe. Legrészletesebb kapcsoltsági térképpel a növények között a genetikai vizsgálatok modellnövényévé vált *Arabidopsis thaliana* rendelkezik.

A molekuláris markerek számtalan előnnyel rendelkeznek a klasszikus markerekkel szemben, alkalmazásukkal részletes genetikai térképek készíthetők. A molekuláris markerek által azonosítható lókuszok száma megegyezik a genomban található gének számával, illetve meg is haladhatja azt, mert alkalmazásukkal lehetőség nyílt géneket nem tartalmazó kromoszómaregiók térképezésére is. Sok molekuláris marker térképezéséhez elegendő egy térképező populáció használata, azaz egy új marker térképezéséhez nincs szükség újabb keresztezésre és térképező populáció előállítására. Molekuláris markerek használatánál nincs környezeti hatás a markerekre nézve, és a mutáns gének kölcsönhatási problémái is elkerülhetők. A molekuláris markerek egy része (pl. az RFLP markerek) kodomináns kiértékelésű, szemben a morfológiai bélyegekkal, melyek általában domináns kiértékelésűek. Nem elhanyagolható előnyük még, hogy a molekuláris markerek lehetőséget biztosítanak a

környezetükben lévő, valamilyen szempontból érdekes gén(ek) klónozására is (térképezésen alapuló génizolálás).

(3) Az adatok analízise során az egyedek genotípusadatait markerpáronként összehasonlítják, és meghatározzák a két marker közötti rekombinációs gyakoriságot (melyet mint említettem, általában a maximum-likelihood módszer alkalmazásával végeznek el). A markerek egymáshoz viszonyított helyzete a köztük meghatározott rekombinációs gyakoriságok figyelembevételével állapítható meg. A különböző markereket tartalmazó kapcsoltsági csoportrészek a közös markerek alapján egybecsúszthatók, így jönnek létre a kapcsoltsági csoportok. A bonyolult rekombinációs gyakoriság meghatározása, a markerek egymáshoz viszonyított helyzetének megállapítása számítógépes programokkal történik. Ezt követően a kapcsoltsági csoportokban a szomszédos markerek közötti rekombinációs gyakorisági értékeket a megfelelő térképfüggvény alkalmazásával térképtávolságokká alakítják, és a kapcsoltsági csoportok megrajzolásával elkészítik a genetikai térképet.

2.6. Rokon fajok genetikai térképének összehasonlítása

A molekuláris markerek kifejlesztésének köszönhetően a nyolcvanas évektől kezdődően felgyorsult a részletes genetikai térképek készítése, és jelenleg már rendelkezésre áll a legtöbb, az emberiség számára valamilyen szempontból fontos növény- és állatfaj kapcsoltsági térképe. A molekuláris markerek lehetőséget adnak különböző rokonsági fokú fajok genetikai térképének összehasonlítására. Az összehasonlításhoz olyan markerekre van szükség, melyek egyértelműen azonosíthatók a vizsgált genomokban, kópiaszámuk alacsony, és kevésbé változékonyak. Ezeknek a feltételeknek a géneket kódoló DNS-szakaszok felelnek meg legjobban, ezért elsősorban az ismert funkcióval rendelkező gének, és cDNS-bankok klónjainak (EST, expressed sequence tag) térképezésével valósítható meg a genomok összehasonlítása. Természetesen alacsony kópiaszámú, nem kódoló DNS-szakaszok is használhatók a vizsgálatokhoz annak

figyelembevételével, hogy ezek változékonysága nagyobb, mint a kódoló DNS-részeké. Az összevetéshez használt DNS-szakaszok azonosítására a DNS-szakasz szekvenciáját használják (STS, sequence-tagged sites, Olson és mtsai 1989), ami alapján az adott marker egyértelműen felismerhető és jellemezhető a világ különböző laboratóriumaiban.

Az összehasonlítások a növényi genomok szerveződésének sokkal konzerváltabb tulajdonságairól árulkodtak, mint azt régebben gondolták (Gale és Devos 1998). A térképösszehasonlító vizsgálatok választ adhatnak rokon és kevésbé rokon élőlények genom szerveződésének azonosságára, illetve azok változására az evolúció folyamán, és az így megállapított rokonsági fokok összevethetők a klasszikus rendszertani eredményekkel. Számos, többé-kevésbé rokon növényfaj genom szerveződése között mutattak már ki hasonlóságot (Schwarzacher 1994, Gale és Devos 1998 összefoglaló munkái), és az egér és az emberi genom hasonlóságáról is közöltek eredményeket (Eppig és Nadeau 1995). Az egyre több élőlény mind jobb megismerésére indított genomprogramok olyan nagy mennyiségű adatot termelnek, melyek hamarosan áttörést hoznak, és kiszélesítik az élőlények genomszerveződéséről és evolúciójáról eddig rendelkezésünkre álló ismeretanyagot.

A növényi genetikai térképek összehasonlításának egyik első példája a *Solanaceae* családba tartozó paradicsom, paprika és burgonya vizsgálata volt. Mindhárom növényfaj haploid kromoszómaszáma 12, és közös RFLP-próbákkal készített genetikai térképeiknek összevetéséből kiderült, hogy a paradicsom és a burgonya kapcsoltsági csoportjai nagyfokú hasonlóságot mutattak, eltérésként csupán négy paracentrikus inverziót találtak (Bonierbale és mtsai 1988; Gebhardt és mtsai 1991, Tanksley és mtsai 1992). A paradicsom, és a szintén a *Solanaceae* családba tartozó paprika kapcsoltsági térképe szintén sok azonos markersorrendű kromoszómaszegmentet tartalmazott, de az összehasonlításból az is kiderült, hogy sokkal több genetikai átrendeződés következett be evolúciós elválásuk óta, mint a paradicsom és a burgonya esetében (Prince és mtsai 1992).

A káposztafélék kapcsoltsági csoportjainak összehasonlítása során nagy kiterjedésű konzervált markersorrendű kromoszómarészeket azonosítottak (Lagercrantz és Lydiate 1996). A vizsgálatok arra a következtetésre vezettek, hogy egy hat alapkromoszómaszámú ősből különféle duplikációs eseményeket követően alakultak ki az eltérő kromoszómaszámú *Brassica nigra* ($n = 8$), *B. oleracea* ($n = 9$) és *B. rapa* ($n = 10$) fajok. Az egyaránt a keresztesvirágúak közé tartozó *Arabidopsis* és *Brassica* fajok genomjainak hasonlóságáról is közöltek már adatokat (Lagercrantz és mtsai 1996 és Lagercrantz 1998). Feltételezésük szerint az *Arabidopsis* genom szerkezetében és komplexitásában nagyon hasonlít a *Brassica* fajok ősének feltételezett diploid ősi növényhez. Eredményeik alapján arról számoltak be, hogy a diploid *Brassica* genomok valószínűleg egy ősi *Arabidopsis* növény génkészletének megháromszorozódásával, majd azt követően annak különféle genetikai átrendeződésével keletkeztek.

Az egyszikű növények genomösszehasonlítása talán gazdasági jelentősége miatt a legintenzívebben vizsgált terület. Homológ markerek konzervált sorrendjét mutatták ki búza és árpa (Van Deynze és mtsai 1995), kukorica és *Sorgum* fajok (Pereira és mtsai 1994) és több gabonaféle (Ahn és Tanksley 1993, Ahn és mtsai 1993; Kurata és mtsai 1994; Moore 1995; Devos és Gale 1997, Foote és mtsai 1997) között.

3. ELŐZMÉNYEK

3.1. Egy ineffektív lucerna mutáns izolálása és jellemzése

Kiss György és mtsai szimbiotikus nitrogénkötésben mutáns diploid lucerna növények izolálása céljából *Medicago sativa* ssp. *coerulea* magpopulációt kobalt izotóp (^{60}Co) sugárzásának vetettek alá (Kiss 1987). A magpopulációból felnevelt növényeket önbeporozták, és az így keletkezett növényeket szimbiotikus nitrogénkötési képességükre tesztelték. Izoláltak egy mutációt (Fix1) hordozó növényt, amely kötött nitrogént nem tartalmazó tápközegben és gazdabaktérium (AK631; Putnoky és mtsai 1990) jelenlétében mutatta a nitrogénhiány jellegzetes tüneteit (klorózis; lsd. 2.2.5. fejezet). Kötött nitrogént tartalmazó tápközegben (virágföld) a mutáns növény a vad típusú növényekhez hasonló, normális fenotípust mutatott, azaz a mutáció nem a nitrogén-anyagcsere valamely enzimét érintette, hanem valóban a nitrogénkötő gümő működésében keletkezett zavar. Vegetatív szaporítást követően a növény Fix⁻ tulajdonságát megtartotta, keresztezési kísérletekből pedig kiderült, hogy a monogénes tulajdonságú mutációt recesszív módon örököltette (Kiss 1997).

A fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint az infekciós fonalak csökkent hatékonysággal lépnek be a növényi sejtekbe, a vad típusúhoz viszonyítva kevesebb a fertőzött sejt. A baktériumok bakteroiddá alakulása látszólag rendben lezajlik, azonban a bakteroidok száma gümőnként kevesebb, mint a vad típusú gümőben. A vizsgálatok alapján a Fix1 mutáns fenotípusa hasonlított a tetraploid lucernában leírt in_2 és in_3 mutánsokhoz (Vance és Johnson 1983), amelyek szintén a gümő sejtjeinek korai öregedését mutatták (Kiss 1997).

A különböző vizsgálatok azonban nem vezettek a mutációt szenvedett gén (*fix1*, ill. később in_6) funkciójának alapos megismeréséhez, amiben a gén klónozása, szekvenciájának ismerete nagyban segíthet. A gén klónozásához a genetikai térképezésen alapuló génizolálás

tűnt megoldásnak, amihez az első lépés a diploid lucerna genetikai térképének megszerkesztése volt.

3.2. A diploid *Medicago sativa* genetikai alaptérképének megszerkesztése

A növényi partner szimbiotikus nitrogénkötésben betöltött szerepének alaposabb megismerésére - a genetikai megközelítés jelentőségét felismerve - csoportunk már évekkel ezelőtt megkezdte egy lucerna kapcsoltsági térkép megszerkesztését. A MTA SzBK Genetikai Intézetének Nitrogénkötő Csoportjában a szimbiotikus nitrogénkötés tanulmányozása a termesztett lucerna (*M. sativa* ssp. *sativa*) és a *Rhizobium meliloti* partnereken folyt. A termesztett lucerna idegenbeporzó, tetraploid növény, és ilyen populáción egy genetikai térkép megszerkesztése nagyon bonyolult, ezért más megoldást kellett keresni. Legmegfelelőbbnek a *Medicago sativa* komplexbe tartozó diploid növények alkalmazása tűnt, melyek közeli rokonai a tetraploid lucernának (Lesins és Lesins 1979b; Quiros és Bauchan 1988), azzal és egymással keresztezhetők, és működő szimbiózist adnak a csoportban már régóta használt *Rhizobium meliloti* 41 és AK631 gazdabaktériumokkal (Kiss 1987). A térképező populáció létrehozásához szükséges két szülő kiválasztása során a döntés egy diploid, kék virágú *M. sativa* ssp. *coerulea* (a termesztett lucerna legközelebbi rokona) (Mcw2) és egy szintén diploid, sárga virágú *M. sativa* ssp. *quasifalcata* egyedre (Mqk93) esett. A két, a *Medicago sativa* komplexbe tartozó alfajokhoz tartozó egyed keresztezhető volt egymással, a köztük lévő evolúciós távolság viszont biztosította a térképezéshez szükséges genetikai különbözőségeket (polimorfizmusokat). A két szülő keresztezéséből előállított F₁ generáció tagjai zöldes, átmeneti virágszínűek voltak. Az F₁ generáció egy tagjának, az F_{1/1} jelű növénynek az önbeporzásával hoztuk létre az F₂ szegregáló populációt (alaptérképező populáció). A szegregáló populáció egyedeinek 89 morfológiai, izoenzim, RFLP és RAPD markerre meghatározott genotípusa alapján számolt kapcsoltsági értékek figyelembevételével készült el a diploid lucerna genetikai alaptérképe (Kiss és mtsai 1993). A genetikai térképet nyolc kapcsoltsági csoport alkotta, ami megfelelt a *Medicago sativa*

komplexbbe tartozó lucernák alapkromoszóma számának. A kapcsoltsági csoportok 659 cM genetikai távolságot fedtek le a diploid lucerna genomjából. A haploid genom méretet ($1n = 1x = 1.0 \times 10^9$ bp) figyelembe véve 1 cM genetikai távolságra átlagosan így 1500 kb hosszúságú fizikai távolság jutott. Az alap kapcsoltsági térkép lehetőséget biztosított számos gümőspecifikus, vagy gümőben intenzíven kifejeződő gén térképhelyének megállapítására is (Kiss és mtsai 1993).

3.3. A *fix1* (*in₆*) mutáns gén térképezése

A *fix1* mutáns gén térképhelyének meghatározásához a genetikai kísérleteket csoportunkban Csanádi Gyula kezdte el. A mutáns gén térképhelyének azonosításához egy szegregáló populációt hoztunk létre a kék virágú, ineffektív *Fix1* növény és a sárga virágú, vad típusú *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* k93 (Mqk93) növények keresztezésével, és a keletkezett F_1 populáció $F_{1/19}$ és $F_{1/51}$ jelű tagjainak önbeporzásával. A szegregáló populáció egyedeit teszteltük nitrogénkötési hatékonyságukra, ami alapján kiválasztottunk 10-10 Fix^- és Fix^+ fenotípusú egyedet. A 10-10 egyed össz DNS-ét elegyítettük, ún. „kupacokat” hoztunk létre. A két „kupac” DNS-eivel és tíz nukleotid hosszúságú primerekkel PCR reakciókat végezve (Bulked Segregant Analysis; Michelmore és mtsai 1991) a Fix^- tulajdonsághoz szorosan kapcsolt RAPD markereket kerestünk. Az így kapott OE7X RAPD marker fragmentjét hibridizációs próbaként használva, az alap térképező populáción az OE7X marker a hetedik kapcsoltsági csoport (LG 7) L285 és L83 RFLP markerei közé térképeződött (Kiss 1997 és Dr. Csanádi Gyula személyes közlés).

4. CÉLKITŰZÉS

Az MTA SzBK Genetika Intézetének Lucerna Genetikai Csoportjában zajló kutatások célja a szimbiotikus nitrogénkötésben szerepet játszó növényi gének megismerése és jellemzése. Ehhez a munkához csoportunk elengedhetetlennek tartotta egy részletes lucerna genetikai térkép elkészítését. Ezért a dolgozat témáját képező vizsgálatok elindításakor a következő feladatokat tűztük magunk elé:

1. A már elkészült lucerna genetikai alaptérkép (Kiss és mtsai 1993) további telítése molekuláris markerekkel.
2. A szimbiotikus nitrogénkötésben szerepet játszó, illetve annak során kifejeződő gének térképhelyének megállapítása. Ezzel választ kaphatunk ezen gének kópiaszámáról, és elhelyezkedésükről a genomban. A szimbiotikus nitrogénkötés során specifikusan kifejeződő gének felhasználhatók a pillangós virágú növények genomjának összehasonlítására.
3. Minél több ismert funcióval rendelkező gén térképhelyének megállapítása, amelyek a lucerna kapcsoltsági térképét a későbbiekben alkalmassá tehetik más rokon és kevésbé rokon fajok genetikai térképével való összehasonlításra.
4. Rendelkezésünkre álltak olyan DNS-klónok, melyek térképhelyét más diploid lucerna térképező populációkon szintén meghatározták. Ezek segítségével terveztük az eddig közölt lucerna kapcsoltsági térképek összehasonlítását.
5. Mivel részletes lucerna genetikai térkép nem állt korábban rendelkezésre, ezért nem volt lehetőség a lucerna és egyik közeli rokona, a borsó genomjának összehasonlítására. Ezért az általunk elkészített diploid *Medicago sativa* térkép segítségével terveztük azonos markersorrendű régiók azonosítását a lucerna és a borsó kapcsoltsági csoportjain.

6. Csoportunk a *fix1* mutáns gén azonosítását térképezésen alapuló génizolálással tervezi végrehajtani. Ennek kezdeti lépéseit a korábban betérképezett *fix1* mutáns gén térképhelyének pontosítása, további kapcsolt markerek keresése, a mutáció finomtérképezése jelenti, melyek elvégzését szintén tervbe vettük.

A genetikai térkép markerekkel történő telítése során hamarosan azzal a jelenséggel találtuk magunkat szembe, hogy néhány újonnan térképezett marker különböző kapcsolsági csoporton elhelyezkedő markerekhez mutatott erős kapcsolságot [pl. az újonnan térképezett U286 marker kapcsolsága az alaptérkép (Kiss és mtsai 1993) hatos (LG VI) és hetes (VII) kapcsolsági csoportján található GS és L589 markerekhez]. Ezen különböző kapcsolsági csoporton lévő, és a hozzájuk kapcsolódó új markereknél a heterozigóta genotípusok erőteljes túlsúlyát tapasztaltuk. Feltételezésünk szerint a genotípusok jelentősen torzult szegregációs aránya torzította a kapcsolsági értékeket, aminek következtében a heterozigóta egyedek túlsúlyával jellemezhető új markerek több kapcsolsági csoportba voltak sorolhatók. Ezért a következő további kérdésekre kerestünk választ:

7. Befolyásolja-e a torzult szegregációs arány (a heterozigóta genotípusok túlsúlya) a kapcsolsági értékeket, és ha igen, akkor hogyan lehet a zavaró hatást kiküszöbölni?
8. A korábban megállapított kapcsolsági csoportok (Kiss és mtsai 1993) azonosak-e az újból elvégzett genetikai analízis során kapott kapcsolsági csoportokkal?
9. A növényi egyedfejlődés melyik fázisában történik meg a heterozigóta genotípusú egyedek feldúsulása?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A szegregáló populáció előállítása, a növények fenntartása

Az diploid lucerna genetikai alaptérképének elkészítéséhez használt szegregáló populáció tagjai két diploid ($2n=2x=16$) *Medicago sativa* alfaj keresztezéséből származnak. Egy kék virágú *Medicago sativa* ssp. *coerulea* (Mcw2) egyed pollenjeivel megtermékenyített sárga virágú *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* (Mqk93) egyed utódai alkották az átmeneti, zöldes virágszínű F_1 nemzedéket. Az $F_{1/1}$ egyedi növény önbeporzásával előállított egyedek képezték a második (F_2) utódnemzedéket, melynek 137 egyede szolgált térképező populációként. A növényeket üvegházi körülmények között 22-27 °C-on napi 16 órás megvilágítás mellett, virágföldet tartalmazó cserepekben neveltük.

Az ineffektív szimbiotikus nitrogénkötést okozó *fix1* (*in*₆) mutáns gén térképezését a kék virágú, *Medicago sativa* ssp. *coerulea* alfajhoz tartozó, szimbiotikus nitrogénkötésben hibás *Fix1* (McIN6) mutáns (Kiss 1987) és a sárga virágú, szimbiotikus nitrogénkötésben vad típusú Mqk93 egyedek keresztezéséből létrehozott $F_{1/19}$ és $F_{1/51}$ egyedek önbeporzásából származó szegregáló populáción végeztük el. A lucernamagok csíráztatását és a növények nevelését kezdetben steril körülmények között végeztük. Ezért a magok felszínét először alkoholos öblítéssel, és 5 perces, 0.1%-os higanyklorid oldatban történő mosással sterilizáltuk. Ezt követően a magokat steril desztillált vízzel többször mostuk, majd steril vízben hagyva duzzasztottuk. A csíráztatáshoz a magokat desztillált vizes 1%-os agar lemezre helyeztük, a csírázó magokat pedig 1 % agart tartalmazó nitrogénmentes Gibson (Gibson 1980) tápközeget tartalmazó csövekbe tettük. A fent leírt üvegházi körülmények között neveltük 3-4 hétig a növénykéket, melyeket ezután virágföldbe ültettünk át.

5.2. A szimbiotikus nitrogénkötés hatékonyságának meghatározása

A *fix1* allélt tartalmazó szegregáló populáció egyedeinek szimbiotikus nitrogénkötési hatékonyságát növényi testben határoztuk meg. A populáció egyedeiből 4-4 hajtásrész levágásával, és azok nitrogénmentes tápközegben (perlit) történő gyökereztetésével vegetatív szaporítást készítettünk. A hajtásokat AK631 (Putnoky és mtsai 1990) baktériumtörzsszel inokuláltuk kétszer a teszt első két hetében. A TA táptalajon, és 30 °C-on felnevesztett baktériumot Gibson tápfolyadékban (Gibson 1980) felfuszpendáltuk (10^8 - 10^9 sejt/ml), és ebből a szuszpenzióból pár cseppet adtunk a gyökerező hajtásokhoz. A perlitben lévő vegetatív klónokat desztillált vízzel, illetve hetente egyszer nitrogénmentes Gibson tápfolyadékkal locsoltuk. A növényi tesztet két hónap után értékeltük ki, a szimbiotikus nitrogénkötésben hibás egyedeket a klorotikus (2.2.5. fejezet) fenotípus megjelenése alapján különböztettük meg a vad típusú egyedektől.

5.3. A DNS-analízis módszerei

A következő fejezetekben ismertetett módszereken kívül használt egyéb DNS-technikákat a Maniatis és mtsai (1982) által leírt útmutatások alapján hajtottuk végre.

5.3.1. DNS-izolálás friss levélből, Southern-hibridizáció

A totál növényi DNS-t friss, fiatal hajtásokból izoláltuk a Dellaporta és munkatársai (1983) által kidolgozott módszer szerint. Növényi egyedenként 10-15 µg izolált DNS-t négy különböző restrikciós endonukleázzal (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* és *DraI*) emésztettünk az enzimet forgalmazó cégek (Amersham, Fermentas és Promega) által biztosított pufferben. Az emésztett DNS-fragmenteket 1.1 %-os agaróz gélben választottuk el Tris-acetát puffer

jelenlétében (Maniatis és mtsai 1982). Az elválasztott DNS-fragmenteket kapilláris módszer (Southern 1975) alkalmazásával Hybond-N membránra (Amersham) transzferáltuk. A restriktációs endonukleázzal történő emésztéssel, vagy polimeráz-láncreakcióval (PCR) készített DNS-fragmenteket Feinberg és Vogelstein (1983) által kidolgozott módszerrel α -[^{32}P]dCTP izotóppal jelöltük. A prehibridizációs és hibridizációs oldatként is szolgáló C + G pufferben (Church és Gilbert 1984) végeztük a hibridizációt 12-16 órán keresztül a próbaként használt fragmenttől (heterológ vagy homológ) függően 55 vagy 60 °C-on. A filtereket a hibridizáció hőmérsékletén mostuk háromszor húsz percig, először 0,1 % SDS-t és 1,0 % SSPE-t, aztán 0,1 % SDS-t és 0,5 % SSPE-t, végül pedig 0,1 % SDS-t és 0,1 % SSPE-t tartalmazó oldatban. A filtereket 1-10 napig autoradiografáltuk -70 °C-on, vagy pedig „phosphor image analyser” (PIA) kazettában exponáltuk.

5.3.2. DNS-izolálás lucernamagokból és csíranövényekből

Az $F_{1/1}$ növény további önbeporzásából keletkező magvakból és csíranövénykékből (amelyek így tulajdonképpen a térképező populáció kiterjesztését alkották) össz DNS-t izoláltunk Chelex[®] 100 (Bio-Rad, Richmond, CA) gyanta segítségével a Walsh és mtsai (1991) által kidolgozott módszer kis módosításával. A magvakat és a fiatal növénykéket egyenként kvarchomok és 300 μl 5%-os Chelex[®] 100 jelenlétében eldörzsöltük, vortexes keverés után a felülúszót átszívtuk egy másik csőbe, és 56 °C-on tartottuk egy éjszakán át. Másnap vortexelés után 10' forralás következett, melyet újabb keverés, majd 3' centrifugálás követett 15000 rpm fordulatszámon. A felülúszót másik csőbe mértük, és ebből 5-5 μl -eket használtunk templátként az alábbiakban ismertett specifikus polimeráz láncreakciós kísérletekben.

5.3.3. PCR amplifikáció

Genomikus DNS-szakaszok polimeráz-láncrekció (PCR) segítségével történő amplifikálásához a fent említett DNS-izolálási módszerekkel készült növényi DNS-t használtuk templátként. Random amplifikált polimorf DNS (RAPD) markerek (Williams és mtsai 1990) előállítása a következő 25 µl térfogatú reakcióelegyben történt: 1 x Taq polimeráz puffer (Promega); 2.4 mM MgCl₂; 200 µM dATP, dCTP, dGTP és dTTP; 1ng/µl templát DNS; 0.2 pmol/µl primer és 1 U Taq polimeráz (Promega). A reakcióelegyet 20 µl ásványolajjal (Sigma) fedtük le a párolgás megakadályozására. A programozható termosztátban (LEP Scientific, MJ Research és Hybaid Omn-E) a következő hőmérsékleti ciklusokat 35-ször ismételve végeztük az amplifikációt: 94 °C 5 másodperc; 37 °C 1 perc és 72 °C 1 perc. A RAPD markerek azonosításához nagyrészt az Operon cégtől (Operon Technologies, Alameda, California, USA) vásárolt 10 bázis hosszúságú oligonukleotidokat használtuk. Ezeken kívül az AP8B (5' TCGTCACTGA 3') és AP8E (5' TGGTGACTGA 3') primerek alkalmazásával állítottunk elő RAPD markereket.

A specifikus körülmények között végzett PCR-hoz ugyanezt a reakcióelegyet használtuk, kivéve, hogy a MgCl₂ koncentráció 1.5 mM volt. Az amplifikációkat az alábbi idő- és hőmérsékleti paraméterekkel hajtottuk végre: 94 °C 30 másodperc; majd a primerektől függően 55, 60 vagy 65 °C 1 perc és 72 °C 1 vagy 2 perc. A 35-ször ismételt ciklusok után a reakciókat egy 4 perces polimerizációs lépéssel zártuk 72 °C-on. A specifikus amplifikációval detektált polimorfizmusok előállításához használt primerek listája a 5. táblázatban található.

Az amplifikációk termékeit 2.0 %-os, 0.5 µg/ml EtBr-ot tartalmazó agaróz gélben választottuk el, a DNS-t UV-megvilágítással tettük láthatóvá, és Fortepan 200 filmekken dokumentáltuk a kapott mintázatot.

5.3.4. PCR-termékek klónozása és szekvenálása

A 2.0 %-os gélben elválasztott PCR termékeket agaróz kockával kivágtuk és QIAEX (Qiagen GmbH, Németország) fragment izoláló módszerrel tisztítottuk. Mivel a *Taq* polimerázzal készült PCR fragmentek 3' végeiken nagy gyakorisággal hordoznak egy túlnyúló adenin bázist tartalmazó nukleotidot (Mead mtsai 1991), ezért nukleotidok jelenlétében a Klenow fragment 3'→5' exonukleáz aktivitását kihasználva tompa végűvé alakítottuk a fragmenteket (Maniatis és mtsai 1982). Az így kezelt fragmenteket *HincII* restrikciós enzimmel emésztett M13mp19 fág vektorba ligáltuk. A szekvenálást Sanger és mtsai (1977) szerint leírt módszer szerint végeztük.

5.3.5. Az egyszálú DNS konformációján alapuló genotípus meghatározás (SSCP)

Néhány esetben az egyszálú DNS konformációjában rejlő különbségeket igyekeztünk felhasználni az ún. SSCP (single-stranded conformation polymorphism) technikával (Orita és mtsai 1989). Ezzel a módszerrel határoztuk meg a CalmodB, a Myo-β és néhány egyednél a CycMs4 markerek esetében a genotípusokat. Az analizálandó fragmentet, általában a PCR reakció 1/20-ad részét vízzel 100 µl-re hígítottuk, ammóniumacetáttal és etanollal (0,5 tf 7.5M NH₄acetát és 2,5 tf 96 % etanol) kicsaptuk, majd 7 µl ún. stop pufferben (95% formamid, 20mM EDTA, 2% xilencianol és 2% brómfenolkék) felvettük. Az oldatban lévő DNS-t 90 °C-on denaturáltuk, majd a mintát rögtön jégre tettük, és a géltre való felvitelig ott is tároltuk. A mintákat 10%-os natív poliakrilamid gélen (akril:bisakril 50:1) futtatuk hidegszobában a vizsgált fragment méretétől függően 150 és 280 V feszültség között 10-24 óra időtartamig.

A gélen megfuttatott DNS-fragmenteket ezüsfestéssel tettük láthatóvá a következő módszer szerint: a gélét először egy órán keresztül fixáltuk 50% metanolt, 12 % ecetsavat és 0,02 % formaldehidet tartalmazó oldatban. Ezt 3 x 20' 50%-os etanolban történő mosás, majd

0,02 %-os Na-tioszulfát oldatban történő két perces elokezelés követte. A gél után háromszor öblítettük desztillált vízben, 20 percig festettük 0,2%-os AgNO_3 -oldatban, újból öblítettük desztillált vízben, majd 3-5 percig 200 ml elohívó oldatban (12 g Na_2CO_3 , 100 ml 37% formaldehid, 80 ml 1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) kezeltük. A desztillált vízben történő mosást követően 10 perces fixálás következett 50% metanolt és 12 % ecetsavat tartalmazó oldatban. A gél után 1 óráig 10%-os glicerinolddal áztattuk, majd két celofán között buborékmentesen megszárítottuk.

5.4. A markerek nevezéktana, származása

Morfológiai markerek: A kék virágszín meghatározó markert *ant* (antocianin), a sárga virágszín meghatározó markert pedig *xant* (xantofill) rövidítéssel jelöltük. Az *ind* (indigókék) a kék virágszín egy jellegzetes színárnyalatát jelöli, *pmr* (powdery-mildew resistance) pedig a lisztharmatrezisztenciát. Az ezenkívül térképezett négy másik morfológiai bélyegre, a törpenövekedés és a ragadós levél fenotípusra a *dw* és *stl* (sticky leaves) rövidítéseket, a hüvelytermés alakját és színét befolyásoló lókuszosokra pedig a *ps* (pod shape) és a *pc* (pod colour) jelöléseket használtuk.

RFLP markerek: Restrikciós fragmenthossz polimorfizmusok (RFLP) azonosítására ismert (6. táblázat) és nem ismert funkciójú lucerna vagy borsó cDNS- és genomi DNS-fragmenteket használtunk. Azokat a cDNS-fragmenteket, melyeket Brummer és mtsai (1991) ill. Györgyey és mtsai (1991) készítették, U ill. L előtaggal jelöltük. Az Echt és mtsai (1994) által térképezésre használt klónokat, melyek egy genomi génbankból származtak W, azon klónokat pedig, melyeket egy, a csoportunkban korábban készített genomi génbankból (Kiss et al. 1993) válogattunk, CG rövidítéssel jelöltük. Az IT26-74/1, IT26-74/2 és GR1 markereket az IT26-74, illetve a GR1 jelű borsóklónokkal (Ellis és mtsai 1992 és 1993) azonosítottuk. A Tip1 és 2 markereket egy lucerna kiméra cDNS-klónnal térképeztük, amely a szekvenciaanalízis alapján

egy tonoplaszt fehérjét (Tip; tonoplast intrinsic protein) és egy hősokkfehérjét kódol (hsp80) (Kevei Zoltán személyes közlés). Az ismert funkciójú fehérjét kódoló cDNS-klónokat több laboratóriumból kértük el, ezek hivatkozása a 6. táblázatban található (87-88. o.).

Számos olyan ismert funkciójú gént is térképeztünk RFLP-vel, melyekhez specifikus amplifikációval készített próbákat használtunk. A próbakészítéshez használt primerek az 5. táblázatban (86. o.) vannak felsorolva.

PCR markerek: A legtöbb random amplifikált polimorfikus markerek (RAPD) (Williams és mtsai 1990) azonosításához - melyeket O előtaggal jelöltünk - Az Operon cégtől vásárolt 10 bázis hosszúságú oligonukleotidokat használtuk. Az ezeken kívül azonosított RAPD markerek nevei a megfelelő primerekre (AP8B - 5' TCGTCACTGA 3' és AP8E - 5' TGGTGACTGA 3') utalnak.

Néhány RAPD fragmentnek meghatároztuk a szekvenciáját, és a szekvencia alapján specifikus, 18-20 nukleotid hosszúságú primereket szintetizáltattunk. Az ezekkel a primerekkel végzett amplifikáció során az egyik marker (AP8B12 - LG 2) kodominánsnak bizonyult (5. táblázat). Ezt a módszert (SCARs - sequence characterized amplified regions) Paran és mtsai (1993) használták először, és egyrészt alkalmas lehet domináns RAPD markerek kodominánssá tételére, másrészt bizonytalan kiértékelésű RAPD markerek genotípusának egyértelműbb meghatározására.

5.5. A genetikai kapcsoltság meghatározása, az adatok analízise

A komputerrel történő genetikai analízishez az egyes genotípus-kategóriákat karakterekkel kódoltuk. Az anyai, ill. apai homozigótákat 1-sel, ill. 3-sal, a heterozigótákat 2-sel jelöltük. Az anyai domináns (azaz a nem apai homozigóta) ill. az apai domináns (nem anyai homozigóta) genotípusoknak az 5, ill. 4 számok feleltek meg, a nem ismert genotípusokat pedig 0-val jelöltük. A meghatározott genotípusok adatait Excel-táblázatban tároltuk, oly módon, hogy

a táblázat oszlopaiban a térképező populáció egy-egy egyedének genotípusait tüntettük fel, a táblázat sorai pedig a térképezett markerekhez tartozó genotípusokat tartalmazták. Ennek megfelelően egy bizonyos oszlop és egy bizonyos sor metszéspontjában a megfelelő növényi egyed genotípusát találhattuk meg az adott markerre nézve. Ez a táblázat kezelhető volt a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program számára, valamint ezt használtuk a szintérkép elkészítéséhez is (Kiss és mtsai 1998 és 5.5.4. fejezet).

5.5.1. A genetikai térkép elkészítése a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes programmal

A genetikai markerek közötti kapcsoltsági viszonyok vizsgálatára, és genetikai térképek szerkesztésére széles körben alkalmazzák a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes programot (Lander és mtsai 1987, Lincoln és mtsai 1992). Csoportunkban is ezt a programot használtuk az alap és részben a továbbfejlesztett genetikai térkép elkészítéséhez (Kiss és mtsai 1993). A markerek analízise során kiderült, hogy a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program önmagában nem használható a lucerna nyolc kapcsoltsági csoportjának kialakításához, azonban az EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA c. fejezetben leírt vizsgálatok nagy mértékben támaszkodnak erre a programra, ezért használatának menetét a következőkben részletesebben taglalom.

Első lépésként a genotípusadatokból egy a Mapmaker/Exp 3.0 program (Lincoln és mtsai 1992) számára olvasható fájl kellett készíteni, mely tartalmazta a szegregáló populáció egyedeinek genotípusadatait (a már ismertetett számkarakterekkel, 5.4. fejezet) a vizsgálandó markerekre nézve. Ezt követően az összes vizsgálandó markerrel ún. kétpontos analízist végeztünk („two-point” parancs), azaz páronként ütköztettük az összes markert a többivel, és meghatároztuk a program segítségével a markerek közötti rekombinációs gyakoriságokat (recombination fraction; RF), valamint az egyes RF-értékekhez tartozó, a markerek kapcsoltságának valószínűségét jellemző, ún. LOD értékeket (ld. 2.3.1. fejezet). A program az

RF-értékeket a maximum-likelihood módszer (Allard 1956 és 2.3.2. fejezet) alkalmazásával határozza meg, ezt a módszert neveztük a későbbiekben „klasszikus” maximum-likelihood szerinti RF-számításnak. Következő lépésként a markereket csoportokba osztottuk („group” parancs) különböző csoportosítási (maximális RF vagy genetikai távolság és LOD) határértékek megadásával. A program azokat a markereket rakja egy csoportba, melyek között a számolt RF és/vagy LOD értékek a megadott RF és LOD határértéken belül esnek. A csoportosítás „áthidaló” jellegű, ami azt jelenti, hogy ha „A” marker kapcsolt „B” markerhez az adott határértékek esetén, „B” marker pedig „C” markerhez, akkor az „A”, „B” és „C” markerek egyaránt egy kapcsoltsági csoportba kerülnek, még ha az adott csoportosítási határértékek esetén az „A” és „C” markerek nem is bizonyultak kapcsoltak. Általánosan elfogadott csoportosítási határérték nincs, mert ez a vizsgált rendszertől függően változhat, de a növényi genetikai térképek szerkesztése során a leggyakrabban használt értékek a RF=0.3 vagy 40 cM genetikai távolság, az indulási LOD-alapérték pedig általában 3. Miután a markereket csoportokba osztottuk, a markerek sorrendjének megállapítása következett a csoportokon belül a program „compare” és „order” parancsaival. A számítógépes program a megadott markerek minden lehetséges sorrendjére megad egy maximum-likelihood módszerrel számolt valószínűségi értéket, melyek közül természetesen a legvalószínűbbet fogadtuk el a markerek lehetséges sorrendjeként. Gyakorlati szempontból érdemes volt hat és tíz közötti számú markert vizsgálni, mert több marker esetén a nagyszámú adatot nehezen kezelte a számítógép (N számú markernek N!/2 sorrendje lehetséges). Egy csoport markereit tehát kisebb alcsoportokra osztottuk, melyeken belül meghatároztuk a markersorrendet, majd pedig átfedő markerek segítségével az alcsoportok markereiből összeállítottuk a kapcsoltsági csoport markereinek sorrendjét. Végül a szomszédos markerek közötti RF-értékeket a Haldane térképfüggvény segítségével átszámítottuk genetikai távolságokká, és ezek alapján megrajzoltuk a kapcsoltsági csoportokat a CorelDraw 4.0 számítógépes program segítségével.

5.5.2. A torzult szegregációs arány vizsgálata χ^2 -próbával

A genetikai kísérletekben gyakran használt statisztikai módszer a χ^2 -próba a kísérleti és a várt adatok eltéréseinek vizsgálatára. A χ^2 -próbával megállapítható, hogy mi a valószínűsége egy megfigyelt esemény várt értéktől való eltéréseinek a véletlennek köszönhetően (Griffiths és mtsai 1993a). Kísérleteinkben a genotípusok szegregálási arányát és azok eltéréseinek okait teszteltük. A nullhipotéziseinket a várt elméleti értékeknek megfelelően állítottuk fel: kodomináns markerek esetén a genotípusok 1:2:1 elméleti szegregálási aránya, 1:1 allélgyakoriság és az allélgyakoriságok $p^2:2pq:q^2$ arány szerinti véletlen találkozása (ld. lentebb). A χ^2 értékeket a tényleges adatokból számoltuk a következő általános képlet szerint:

$$\chi^2 = \sum \frac{(K-V)^2}{V}, \text{ ahol } K = \text{a kapott érték, } V = \text{a várt értékeket jelentette.}$$

Szükség volt még egy adat, a szabadságfok(ok) (df) ismeretére is. Ez a következőképpen határozható meg: $df = (\text{a számításhoz használt osztályok száma} - 1)$. A χ^2 értékek és a szabadságfokok ismeretében χ^2 táblázat (pl. Korn és Korn 1975) alkalmazásával megbecsültük annak a valószínűségét (p), hogy a kapott eredmények milyen valószínűséggel fordulnak elő, ha nullhipotézisünk jó. Szignifikancia-szintként $p = 0.01$ (1%) valószínűségi értéket használva az ez alatti valószínűségi értékek előfordulása esetén nullhipotézisünket elvetettük, és szignifikáns eltérésnek fogadtuk el a bekövetkezett eseményt.

Először azt vizsgáltuk, hogy a genotípusok szegregálási aránya mennyire tér el az elméleti 1:2:1 hasadási arányoktól. Ekkor az F_2 generációban az összes egyed $\frac{1}{4}$ -ének anyai homozigóta, másik $\frac{1}{4}$ -ének apai homozigóta, felének pedig heterozigóta genotípusúnak kellene lennie egy kodomináns marker öröklődését figyelve. Az 1:2:1 szegregálási arányt a χ^2_{segr} próbával teszteltük, amelyet a Függelékben (9.1. fejezet) tüntettünk fel.

Annak eldöntésére, hogy a torzult szegregációs arányok a gaméták különböző életképességének, és ennek következtében az allélek nem egyenlő megjelenési gyakoriságának (gametikus szelekció), vagy pedig a keletkező zigóták (és később a növényi egyedek) nem egyenlő életképességének (zigotikus szelekció) a következménye-e, további χ^2 -próbákat végeztünk Pham és mtsai (1990) elgondolásai alapján. Egyenlő allélgyakoriság esetén az összes gaméták egyik fele „A”, a másik fele pedig „a” genotípusú. A gametikus szelekció tesztelésére a χ^2_{gam} próbát használtuk (9.1. fejezet).

A genotípus-gyakoriságok $p^2:2pq:q^2$ arány szerinti eloszlásának (random találkozásának) tesztelésével kaphatunk információt a zigotikus szelekció meglétéről, ahol p az „A” allél, q pedig az „a” allél gyakorisága (Pham és mtsai 1990). Az allélgyakoriságok számításához használt képletek és a zigotikus szelekció tesztelésére használt próba (χ^2_{zyg}) szintén a 9.1. fejezetben található.

Azokban az esetekben, amikor mind a gametikus, mind a zigotikus szelekcióra végzett χ^2 -próbák szignifikáns eltérést mutattak (pl. LG 5 néhány markere), Lorieux és mtsai (1995) gondolatmenete alapján a szelekciót zigotikus típusúnak tekintettük.

5.5.3. Specifikus maximum-likelihood egyenletek használata

5.5.3.1. Életképességi értékek meghatározása

Lorieux és mtsai (1995) specifikus maximum-likelihood (ML) egyenleteket dolgoztak ki különböző szelekciótípusok előfordulása esetén domináns és/vagy kodomináns markerek közötti rekombinációs gyakoriságok (RF) meghatározására. A különböző genotípusú egyedek egymáshoz viszonyított életképességének meghatározásához szintén ML-egyenleteket fejlesztettek ki. A szelekció típustól és a vizsgált markertől függően az RF-et és az életképességi értékeket az egyes genotípus-kategóriákba eső egyedek számából becsülő három, négy vagy öt

ML-egyenletet megoldási módszerük szerint egyidejűleg kell megoldani (Lorieux és mtsai 1995). Kodomináns markerek és zigotikus szelekció esetén az egyidejűleg öt egyenlet megoldása azonban meghaladta az alkalmazott algoritmus (5.5.3.2. fejezet) és a számítógép kapacitását. Néhány markerpár esetén ugyanis az egyenletek egyidejű megoldásával az egyes markerekre kiszámolt életképességi értékek nagy szórást mutattak. Ezért a könnyebb kezelhetőség kedvéért egyszerűsítést vezettünk be, és az életképességi értékeket nem a ML-módszer szerint számoltuk ki, hanem azokat először markerpáronként határoztuk meg a rendelkezésre álló egyedek genotípusadatai alapján. Az egyszerűsített számolással kapott életképességi értékek viszont nagy pontossággal közelítették a ML-egyenletekkel számolt, szórást nem mutató életképességi értékeket. Ezt követően a megfelelő életképességi értékek behelyettesítése után oldottuk meg a rekombinációs gyakoriság meghatározására kidolgozott speciális maximum-likelihood egyenleteket. Az életképességi értékek kiszámításához használt képleteket a Függelékben (9.2. fejezet) tüntettük fel.

5.5.3.2. A rekombinációs gyakoriságok kiszámítása specifikus maximum-likelihood egyenletekkel

A markerek közötti rekombinációs gyakoriságok (RF) meghatározását speciális maximum-likelihood (ML) egyenletek (A.6, A.7, A.8 és A.9 egyenletek; Lorieux és mtsai 1995) felhasználásával is elvégeztük. Az egyenletekbe a markerekre kiszámított életképességi értékeket behelyettesítettük, és ezután számoltuk ki a rekombinációs gyakoriságot a ML-függvény maximumának meghatározásával. A megfelelő RF megtalálásához először kezdeti becslést végeztünk. A kezdeti becsült értéktől elindulva az iteratív Nelder-Mead (simplex) algoritmus alkalmazásával jutottunk el a pontos maximumhoz. A folyamat végrehajtásához a Matlab (The MathWorks, Inc. Natick, Mass. USA) számítógépes programot használtuk.

Adataink vizsgálata során a kettes kapcsoltsági csoport (*B* csoport vagy LG 2) markereinél kerültünk szembe azzal a problémával, hogy olyan markerek között kellett rekombinációs gyakoriságot (RF) becsülnünk a specifikus ML-egyenletekkel, amikor az egyik marker genotípusainak aránya gametikus, a másik pedig zigotikus szelekció következtében szenvedett torzulást. Lorieux és mtsai (1995) közleményükben nem adtak megoldást az ilyen esetekre, ezért ezekben az esetekben a markersorrend meghatározáshoz a „klasszikus” ML alapján (Allard 1956) számolt rekombinációs gyakoriságokat használtuk. A megállapított markersorrend után pedig a szomszédos markerek között a genetikai távolságokat a szelekciótípusoknak megfelelő speciális ML-egyenletekkel számoltuk ki. Ha két szomszédos marker genotípusainak szegregálási aránya különböző szelekciótípusoknak köszönhetően torzult (pl. L591 - W170 és W170 - U107), akkor mindkét szelekciótípusra kidolgozott speciális ML-egyenletekkel kiszámoltuk az RF-okat (ezek között kis eltérés volt), és ezek átlagából számolt értékkel határoztuk meg a köztük lévő genetikai távolságot.

5.5.4. A markerek sorrendjének megállapítása színtérkép segítségével

A szegregáló populáció egyedein térképezett több száz marker sorrendjének megállapítására, és az adatok vizsgálatára egy, a csoportunkban kifejlesztett módszert, a színtérképezést (Kiss és mtsai 1998) használtuk. Ehhez az Excel táblázatban elhelyezett (5.5. fejezet) térképezendő markerek genotípusadatait színekkel kódoltuk. Az anyai homozigóta (1-es) genotípust sárga, az apai homozigóta (3-as) genotípust pedig bíbor színnel helyettesítettük, a *M. sativa* ssp. *quasifalcata* és *M. sativa* ssp. *coerulea* szülők sárga és kék virágszínének megfelelően. A heterozigóták színe sötétzöld, a nem apai homozigótáké (5-ös) világoszöld, a nem anyai homozigóta genotípusoké (4-es) pedig acélszürke lett. A hiányzó genotípusokat (0) világosszürkével jeleztük. Ezek után az Excel táblázat sorait egymás alá rendeztük a lehető legkevesebb rekombináció feltételezésével, és így megkaptuk a színtérképet.

A színtérképbe új lókuszok behelyezését könnyedén, matematikai számítások nélkül végezhetjük azon markerek közé, ahová a térképezendő új lókuszt a lehetséges legkevesebb rekombinációs eseménnyel tudtuk beilleszteni (Kiss és mtsai 1998). A színtérképezés a génrend megállapítására alkalmas, a genetikai távolságok becslése a látható rekombinánsok megszámlálásával végezhető el. Közeli markerek esetén a genetikai távolság viszonylag jól becsülhető az észlelt rekombinációk számával. A pontos genetikai távolság kiszámításához továbbra is szükség volt a markerek közötti rekombinációs gyakoriságok meghatározására, és a térképfüggvények alkalmazására. A színtérképezést használtuk hibás adatbevitel, és kísérleti hibák kiszűrésére is, valamint olyan genetikai kísérletekhez, ahol a megfelelő genotípusú egyedek kiválogatására volt szükség.

6. EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A diploid lucerna alaptérképének további markerekkel történő bővítése

A diploid lucerna első genetikai térképe (alaptérkép) csoportunkban készült el 89 morfológiai, izoenzim és molekuláris bélyeg felhasználásával (Kiss és mtsai 1993). Célunk egy részletes genetikai térkép létrehozása volt, ezért a térképezési munkát tovább folytattuk, és egyre több molekuláris marker helyét határoztuk meg a már elkészített kapcsoltsági térképen.

A térképező populáció egyedeinek cDNS- és genomi DNS-próbákkal DNS-DNS hibridizáció során, polimeráz láncreakcióval történő amplifikálással vagy SSCP módszerrel több száz markerre nézve meghatároztuk a genotípusát. A markereket genotípusadataik alapján a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program segítségével helyeztük el (5.4.1. fejezet) az alaptérkép nyolc kapcsoltsági csoportján. Az új markerek térképezése során felfigyeltünk arra a jelenségre, hogy bizonyos markerek az alaptérkép különböző kapcsoltsági csoportjain elhelyezkedő lokuszokhoz egyaránt erős kapcsoltságot mutattak [pl. az U286 marker és az alaptérkép (Kiss és mtsai 1993) hatos (LG VI) kapcsoltsági csoportján lévő GS markere között a kapcsoltsági értékek $RF=0.106$ és $LOD\ 11.2$, a hetes (VII) kapcsoltsági csoporton található L589 marker esetében pedig $RF=0.077$ és $LOD\ 16.38$ voltak (3. táblázat)]. Ezért felvetődött annak a lehetősége, hogy néhány korábban megállapított kapcsoltsági csoport markerösszetételében pontatlanságok fordulnak elő. A jelenség tisztázása érdekében a markerek genotípusadatait és kapcsoltsági viszonyait alaposabb vizsgálatnak vetettük alá. Kiválasztottunk 121 kodomináns kiértékelésű markert (1. táblázat) - melyeket a későbbiekben vázmarkereknek nevezünk - és ezekkel előről kezdtük a térképezési munkát. Olyan RFLP markereket szemeltünk ki, melyek között rekombináció volt, és azért választottunk kodomináns kiértékelésű markereket, mert ezek több információt szolgáltatnak a rekombinációs eseményekről, mint a domináns markerek. A térképező populáció egyedeinek

genotípuskiértékeléseit a 121 vázmarkernél újra ellenőriztük, az esetleges hibás (színtérkép; 5.5.4. fejezet) vagy kétértelmű genotípusokat újra megállapítottuk, majd az adatok analízisével határoztuk meg a kapcsoltsági csoportok számát. A 121 vázmarker genotípus adatait a Függelékben (9.3.fejezet) tüntettük fel.

1. táblázat. A kiválasztott 121 kodomináns vázmarker és azok genotípusainak szegregációs aránya.

A markereket a kapcsoltsági csoportokon belül megállapított sorrendjük szerint tüntettük fel. A kapcsoltsági csoportok (LG 1, LG 2, LG 3, LG 4, LG 5, LG 6, LG 7 és LG 8) megegyeznek az 1. ábrán jelölt *A, B, G, H, F, C, D* és *E* csoportokkal. Az a_1a_1 genotípus az anyai homozigótákat, az a_1a_2 genotípus a heterozigótákat, az a_2a_2 genotípus pedig az apai homozigótákat jelöli. A χ^2_{zyg} oszlopban a zigotikus szelekcióra, χ^2_{gam} oszlopban a gametikus szelekcióra, χ^2_{segr} oszlopban pedig a genotípusok szegregációjának torzulására végzett χ^2 -teszttel kapott értékeket soroltuk fel. * = 1% szignifikancia szint

LG 1 (A csoport)						LG 2 (B csoport)						LG 3 (G csoport)						LG 4 (H csoport)					
Vázmarker száma	Vázmarker neve	Szegregációs arány $a_1a_1:a_1a_2:a_2a_2$	χ^2_{zyg}	χ^2_{gam}	χ^2_{segr}	Vázmarker száma	Vázmarker neve	Szegregációs arány $a_1a_1:a_1a_2:a_2a_2$	χ^2_{zyg}	χ^2_{gam}	χ^2_{segr}	Vázmarker száma	Vázmarker neve	Szegregációs arány $a_1a_1:a_1a_2:a_2a_2$	χ^2_{zyg}	χ^2_{gam}	χ^2_{segr}	Vázmarker száma	Vázmarker neve	Szegregációs arány $a_1a_1:a_1a_2:a_2a_2$	χ^2_{zyg}	χ^2_{gam}	χ^2_{segr}
1	AAT2	24:74:39	1.20	3.28	4.17	20	U212D	28:47:42	4.00	3.35	7.87	39	U515A	29:45:44	6.13	2.86	9.51 *	50	NOD22B	40:63:24	0.01	4.03	4.04
2	LbMSII	23:65:37	0.35	3.14	3.34	21	EST3	23:50:43	1.44	6.90 *	9.10	40	L313	29:47:45	5.47	3.24	9.26 *	51	L408AC	45:68:24	0.04	6.44	6.45
3	U237	22:61:37	0.44	2.09	2.40	22	AP8B12	23:68:46	0.06	7.72 *	7.73	41	U28	30:66:44	0.35	2.06	2.51	52	β -tubulin	48:58:23	0.56	9.69 *	11.00 *
4	U80	24:61:33	0.19	1.37	1.51	23	U73	23:68:45	0.10	7.12 *	7.12	42	LAP2	27:69:41	0.04	2.86	2.87	53	NOD1G	46:61:22	0.05	8.93 *	9.31 *
5	W151	25:66:30	1.04	0.41	1.41	24	U68A	20:66:40	0.70	6.35	6.63	43	CG11	26:71:40	0.31	2.86	3.04	54	U466	47:68:18	0.72	12.65 *	12.71 *
6	U779	28:82:27	5.32	0.01	5.34	25	PRX	20:77:40	3.02	5.84	7.95	44	OD3E	25:78:34	2.83	1.18	3.82	55	U131	48:63:19	0.05	12.94 *	13.06 *
7	CG5	28:79:25	5.15	0.14	5.26	26	L591	15:81:32	10.64 *	4.52	13.55 *	45	U587	24:63:35	0.21	1.98	2.11	56	W157A	49:58:19	0.07	14.29 *	15.08 *
8	CG8	28:81:23	6.92	0.38	7.20	27	W170	12:58:35	2.70	10.08 *	11.23 *	46	GSb	25:60:35	0.01	1.67	1.67	57	L23	54:70:13	2.05	24.54 *	24.61 *
9	CG1	32:74:20	4.33	2.29	6.13	28	U107	10:75:35	11.29 *	10.42 *	17.92 *	47	OR5I	26:77:31	3.05	0.37	3.36	58	OA17A	55:67:11	2.29	29.11 *	29.12 *
10	U502	35:71:20	2.58	3.57	5.60	29	U212A	7:87:34	22.87 *	11.39 *	27.92 *	48	NMs25	23:80:27	6.99	0.25	7.17	59	SKDH1	47:78:12	6.52	17.88 *	20.52 *
11	Med1	30:80:21	6.76	1.24	7.66	30	U305	4:87:26	34.33 *	8.27 *	36.04 *	49	LAP1	23:89:25	12.29 *	0.06	12.33 *	60	U84	45:68:14	2.44	15.13 *	15.77 *
12	Enod2	28:82:21	8.55	0.75	9.06	31	L408BD	3:109:24	56.07 *	6.49	55.93 *							61	OQ3B	45:73:14	3.84	14.56 *	16.05 *
13	OQ5B	29:74:22	4.41	0.78	5.02	32	NOD22A	11:96:19	35.39 *	1.02	35.59 *							62	U40A	44:78:15	5.06	12.28 *	14.91 *
14	L234	29:82:19	9.41	1.54	10.43 *	33	PEPC	11:99:21	35.46 *	1.53	35.79 *							63	U68B	44:73:14	4.07	13.74 *	15.46 *
15	NOD14	32:78:20	5.75	2.22	7.42	34	U599	12:81:21	21.08 *	1.42	21.63 *												
16	L391	32:86:19	9.76 *	2.47	11.41 *	35	CG6	16:95:18	28.89 *	0.06	28.91 *												
17	CAD5A	31:79:15	10.16 *	4.10	12.81 *	36	U189A	17:84:19	19.24 *	0.07	19.27 *												
18	L56	32:89:16	13.79 *	3.74	16.01 *	37	CAD5B	17:87:21	19.35 *	0.26	19.46 *												
19	Chi	32:86:17	11.35 *	3.33	13.47 *	38	L295	18:94:19	24.81 *	0.02	24.82 *												

LG 5 (F csoport)						LG 6 (C csoport)						LG 7 (D csoport)						LG 8 (E csoport)					
Vázmarker száma	Vázmarker neve	Szegregációs arány $a_1a_1:a_1a_2:a_2a_2$	χ^2_{zyg}	χ^2_{gam}	χ^2_{segr}	Vázmarker száma	Vázmarker neve	Szegregációs arány $a_1a_1:a_1a_2:a_2a_2$	χ^2_{zyg}	χ^2_{gam}	χ^2_{segr}	Vázmarker száma	Vázmarker neve	Szegregációs arány $a_1a_1:a_1a_2:a_2a_2$	χ^2_{zyg}	χ^2_{gam}	χ^2_{segr}	Vázmarker száma	Vázmarker neve	Szegregációs arány $a_1a_1:a_1a_2:a_2a_2$	χ^2_{zyg}	χ^2_{gam}	χ^2_{segr}
64	U89A	27:80:25	5.95	0.06	6.00	80	W284	21:86:17	18.72 *	0.26	18.84 *	94	U829	22:72:30	3.42	1.03	4.26	111	L590	26:83:22	9.43 *	0.24	9.60 *
65	U584B	23:88:24	12.46 *	0.01	12.47 *	81	OY16E	20:94:16	26.04 *	0.25	26.12 *	95	U235	19:75:30	5.96	1.95	7.40	112	U161	27:80:21	8.18	0.56	8.56
66	F3OH	19:79:22	12.10 *	0.15	12.18 *	82	U58	6:109:12	65.91 *	0.57	65.77 *	96	L500	15:73:31	7.41	4.30	10.43 *	113	CG19	29:86:11	19.51 *	5.14	21.94 *
67	CyclIIIms	18:90:20	21.16 *	0.06	21.19 *	83	GSa	6:121:10	80.79 *	0.23	80.71 *	97	L59	14:86:31	14.74 *	4.41	17.24 *	114	U594	30:83:10	18.3 *	6.50	21.54 *
68	U224	13:93:18	31.30 *	0.40	31.40 *	84	OW13B	6:115:8	79.16 *	0.06	79.14 *	98	U291	7:107:17	54.19 *	1.53	54.11 *	115	L482	21:103:2	57.06 *	5.73	56.52 *
69	CG13	9:98:24	34.89 *	3.44	35.69 *	85	OAD16A	3:124:4	104.52	0.02	104.51 *	99	U62	1:112:6	93.35 *	0.42	93.07 *	116	U281	20:107:4	56.77 *	3.91	56.50 *
70	Enod40	11:101:22	35.91 *	1.81	36.31 *	86	U553	4:107:5	82.82 *	0.02	82.81 *	100	U286	2:121:6	99.39 *	0.25	99.23 *	117	U119	22:108:4	55.15 *	4.84	55.01 *
71	U202	6:90:32	27.89 *	10.56 *	31.69 *	87	OF20A	9:114:9	69.82 *	0.00	69.82 *	101	U745B	4:102:7	73.52 *	0.16	73.44 *	118	OG8A	25:93:18	18.75 *	0.72	19.10 *
72	ALD	6:87:33	25.22 *	11.57 *	29.86 *	88	U328A	21:90:14	24.70 *	0.78	24.98 *	102	U56	5:106:7	74.98 *	0.07	74.95 *	119	U336	26:81:20	9.85 *	0.57	10.21 *
73	U70	7:95:27	33.44 *	6.20	35.05 *	89	U1294	24:80:18	12.08 *	0.59	12.43 *	103	OC13B	6:113:9	75.22 *	0.14	75.17 *	120	U515B	28:70:24	2.70	0.26	2.92
74	GSa	8:93:27	30.22 *	5.64	31.92 *	90	L27A	23:96:18	22.29 *	0.36	22.45 *	104	OQ3M	5:115:9	79.42 *	0.25	79.33 *	121	U86A	28:80:29	3.86	0.01	3.88
75	LbMSI	7:97:30	32.40 *	7.90 *	34.76 *	91	U1208	28:84:18	11.70 *	1.54	12.65 *	105	L589	6:120:10	79.85 *	0.24	79.76 *						
76	U151	8:87:29	24.52 *	7.11 *	27.27 *	92	U63	23:99:15	27.77 *	0.93	28.09 *	106	U88	9:100:13	50.14 *	0.26	50.13 *						
77	U26	4:94:32	34.68 *	12.06 *	37.94 *	93	U784A	21:89:15	22.82 *	0.58	23.05 *	107	L285	10:110:16	52.41 *	0.53	52.41 *						
78	CG9	4:92:33	32.54 *	13.04 *	36.49 *							108	Med2	16:89:18	24.84 *	0.07	24.66 *						
79	CalmodA	3:96:33	37.61 *	13.64 *	40.91 *							109	U69	18:93:18	25.19 *	0.00	25.19 *						
												110	L83	29:90:14	18.29 *	3.38	19.99 *						

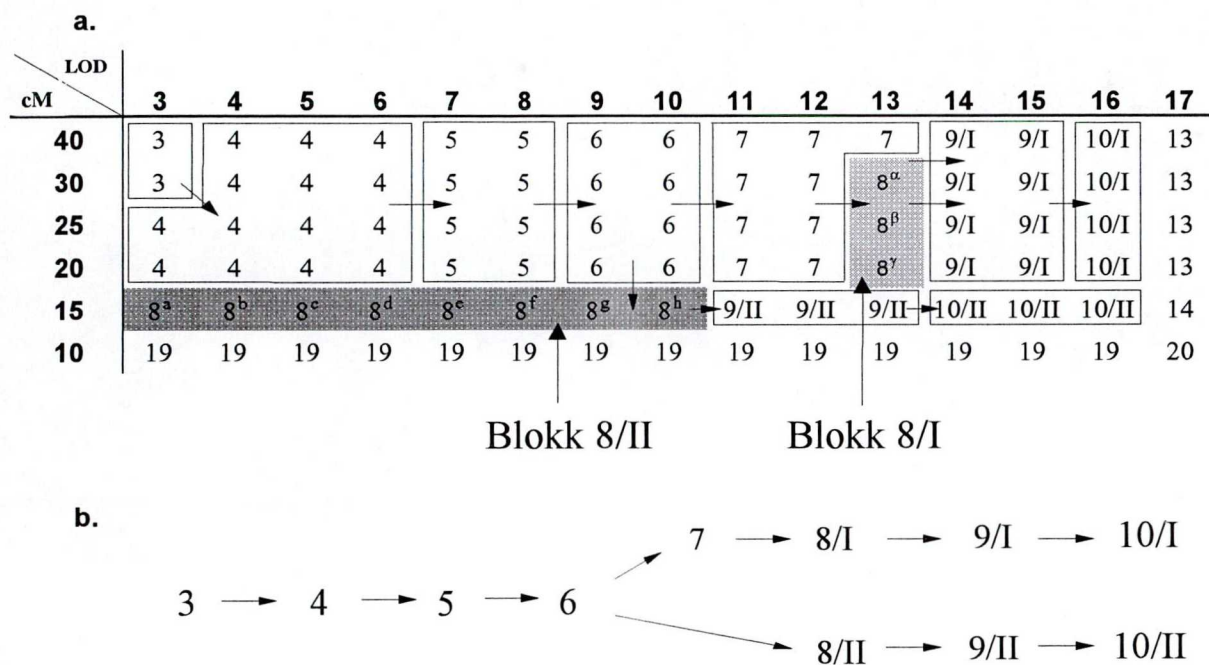
1. táblázat.

6.2. A vázmarkerek csoportokba osztása

A 121 vázmarker genetikai analízisét a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes programmal (Lander és mtsai 1987 és Lincoln és mtsai 1992) kezdtük el. A kapcsoltsági csoportok elkészítéséhez először kétpontos analízist végeztünk a 121 vázmarker esetében, ami 7260 rekombinációs gyakoriságot (RF) és hozzájuk tartozó LOD-értéket eredményezett. Ezen kapcsoltsági értékek alapján a 121 vázmarker csoportokba osztását többször elvégeztük a számítógépes programmal a csoportosítási paraméterek, a LOD-érték 3 és 17, és a maximális genetikai távolság 10 és 40 cM közötti változtatásával (2/a. táblázat). Indulásként (LOD 3 és max. genetikai távolság 40 cM) három csoportot kaptunk, majd a paraméterek szigorításával az analízis - a vártak megfelelően - egyre több csoportot eredményezett. A csoportosítási kritériumok szigorítását LOD 17 és 10 cM max. genetikai távolságnál fejeztük be, amelyek alkalmazásával a 121 vázmarker húsz csoportot alkotott.

Egy bizonyos maximális genetikai távolsági és LOD-értéknél végzett csoportosítás esetén keletkezett csoportok összessége adja a táblázat egy elemét. Mivel a lucerna haploid kromoszómaszáma nyolc, ezért azokat az elemeket vizsgáltuk meg részletesebben, amelyeknél a vázmarkerek csoportokba osztása nyolc csoportot eredményezett. Az alkalmazott kapcsoltsági határértékeknél három ($8^{\alpha-\gamma}$), illetve nyolc (8^{a-h}) esetben kaptunk nyolc-nyolc csoportot; háromszor a LOD 13 és 20-30 cM maximális genetikai távolsági határértékek használata esetén (Blokk 8/I; világosszürke árnyékolás a 2/a. táblázatban), nyolcszor pedig 15 cM max. genetikai távolságnál és LOD 3 és 10 közötti értékeknél (Blokk 8/II; sötétszürke árnyékolás a 2/a. táblázatban). A két blokkban található elemek nyolc-nyolc csoportját részletesen analizáltuk, és kiderült, hogy az egy blokkba tartozó elemek csoportjaiban a markerösszetétel megegyező volt, azaz a 8^{α} , 8^{β} és 8^{γ} jelű csoportok, valamint a 8^a , 8^b , 8^c , 8^d , 8^e , 8^f és 8^h csoportok markerösszetételben egymással megegyeztek. A két blokk elemeiben lévő csoportok összehasonlításakor viszont kiderült, hogy az egyik blokk elemeinek csoportjai csak részben

egyeztek meg markerösszetételben a másik blokk elemeinek csoportjaival, néhány csoport markerösszetétele eltérő volt (1. ábra). Mivel a kapott nyolc-nyolc csoport markerösszetétele részben nem volt azonos, ezért nem lehetett megállapítani, hogy a Blokk 8/I vagy Blokk 8/II elemeinek (1. ábra) nyolc csoportja, vagy egyik sem képviselte a lucerna nyolc kapcsoltsági csoportját.



2.táblázat. A vázmarkerek csoportokba osztása a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program „group” parancsával.

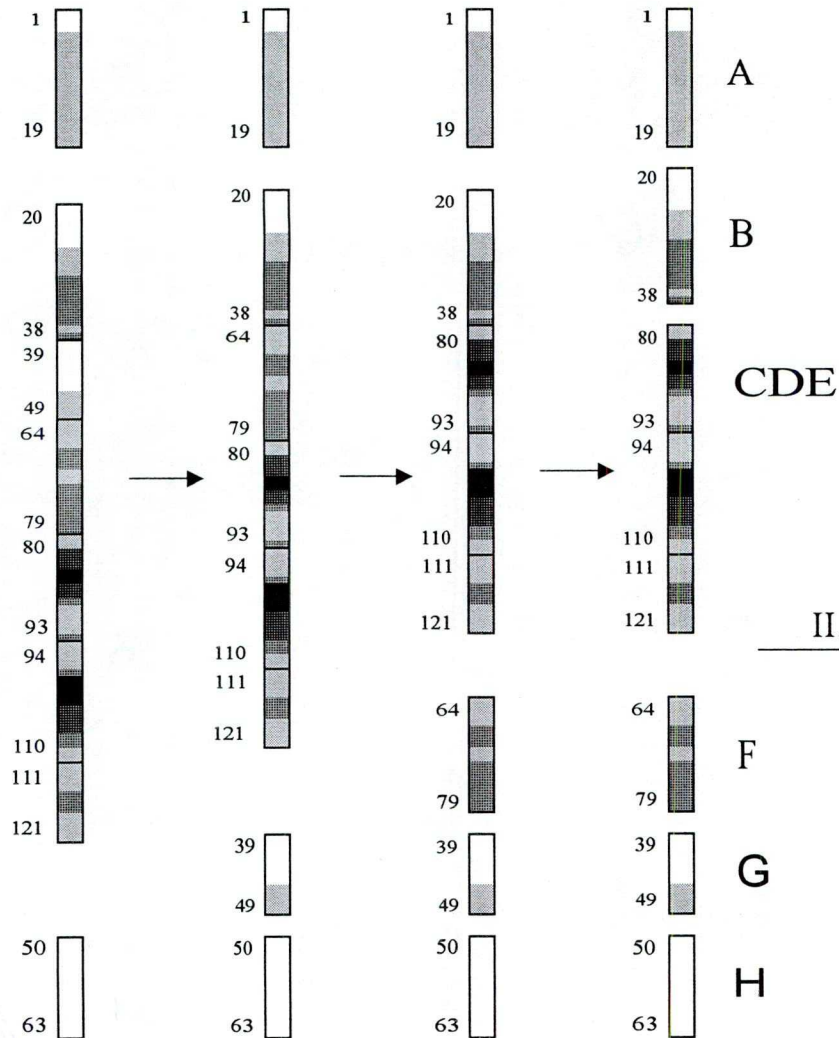
a. A csoportokat a „group” parancs paramétereinek (LOD-értékek és a markerek közti maximális távolságok) lépésenkénti változtatásával alakítottuk ki. A különböző paraméterek esetén létrejött azonos markerösszetételű nyolc csoportot tartalmazó elemeket világos- és sötétszürke színekkel árnyékoltuk (Block 8/I és Block 8/II). A rövid nyilak a csoportok egymásból való képződésének irányát jelölik.

b. A csoportok egymásból való alakulásának (a. rész) egyszerűsített sémája. A 9/I, 10/I és a 9/II, 10/II jelű csoportok a 8/I-es illetve a 8/II-es blokk csoportjaiból kialakuló csoportokat jelzik.

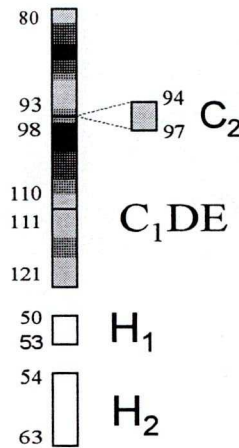
Következő lépésként megvizsgáltuk a létrejött csoportok markerösszetételét minden egyes csoportosítási határértéknél (1. ábra és 2/b. táblázat). Az 1. ábrán a könnyebb követhetőség kedvéért a csoportokon belül a markereket a későbbiekben megállapított markersorrend alapján sorakoztattuk fel. A LOD-érték növelésével és a maximális genetikai távolság csökkentésével a markerek egyre több csoportot alkottak. A három csoportot

tartalmazó elemektől a hat csoportot tartalmazó elemekig a csoportok száma vagy nem változott, vagy pedig eggyel nőtt a csoportosítási feltételek lépésenkénti szigorításával (1. ábra és 2/b táblázat). Ezekben az esetekben az azonos számú csoportot tartalmazó elemekben a csoportok markerösszetétele mindig azonos volt. Új csoport minden esetben a legnagyobb markerszámú csoportból való kiválással keletkezett. A csoportosítási feltételek további szigorításakor a hat csoport kétféleképpen oszlott tovább a csoportosítási küszöbértékektől függően. Ha a LOD-értéket növeltük 20 és 40 cM közötti maximális genetikai távolság esetén, akkor először hét, majd nyolc csoport (Blok 8/I) keletkezett (I. jelű út az 1. ábrán), és mint az előzőekben kiderült, ez a nyolc csoport (8^a , 8^b és 8^c) minden esetben egyforma összetételű volt. Ha a maximális genetikai távolságot 15 cM-ra csökkentettük, akkor közvetlenül nyolc csoport keletkezett (II. jelű út az 1. ábrán). Az 8^a , 8^b , 8^c , 8^d , 8^e , 8^f és 8^g jelű elemek alkották a Blokk 8/II-t, amelyekben a csoportok azonos markerösszetétellel rendelkeztek. A kétféle módon keletkezett nyolc-nyolc csoport markereit összehasonlítva kiderült, hogy míg az A , B , F , G és C_2 jelű csoportok azonos voltak, addig a többi csoport eltérő összetételű volt, mert a Blokk 8/I esetében C_1D , E és H csoportok, a Blokk 8/II esetében viszont C_1DE , H_1 és H_2 csoportok keletkeztek (1. ábra). Érdekes módon mindkét esetben megfigyelhető volt egy négy markerből álló kis csoport (C_2) létrejötte, amelyik a CD vagy pedig CDE csoportból vált ki (1. ábra). Emellett egy-egy nagyszámú markert tartalmazó csoport is keletkezett (C_1D és C_1DE), ezért merült fel a gyanú, hogy esetleg a létrejött nyolc csoportot tartalmazó elemek egyike sem reprezentálja a lucerna valódi nyolc kapcsoltsági csoportját.

3 csoportot tartalmazó elemek 4 csoportot tartalmazó elemek 5 csoportot tartalmazó elemek 6 csoportot tartalmazó elemek

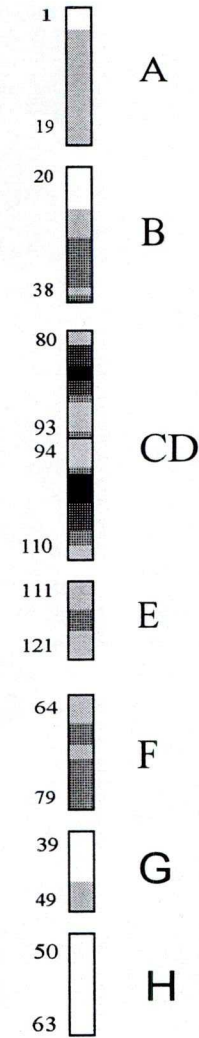


I.
8/II csoportot tartalmazó elemek

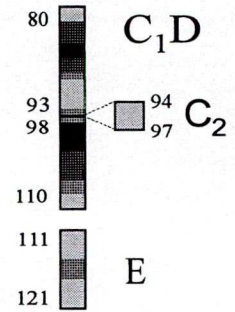


+ A, B, F, G

7 csoportot tartalmazó elemek

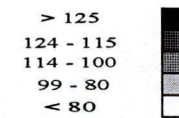


8/I csoportot tartalmazó elemek



+ A, B, F, G, H

Heterozigóták száma
137 egyedből



1. ábra.

1. ábra. A Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program „group” parancsával különböző csoportosítási paramétereknél azonosított csoportok markerösszetétele.

Az oszlopok egy adott LOD-értéknél és maximális távolságnál megállapított vázmarkerek csoportjait ábrázolják. A csoportok kialakításához használt csoportosítási paraméterek a 2/a táblázatban találhatók. A csoportok jelölései (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* és *H*) a későbbiekben a speciális ML egyenletekkel (Lorieux és mtsai 1995) kialakított nyolc kapcsoltsági csoportot jelentik (ld. 6.2.3. fejezet). A kétféle módon létrejövő nyolc kapcsoltsági csoportot tartalmazó elemek útját a nyilakon lévő I és II számozások jelzik. Az oszlopok árnyékolásának intenzitása az adott régióban található markerek genotípusainak torzult szegregációs arányát (a heterozigóták túlsúlyát) tükrözi (ld. még 1. táblázat). A vázmarkerek számozása az 1. táblázatban található sorszámoknak felel meg.

Mivel nem lehetett egyértelműen nyolc kapcsoltsági csoportot kialakítani a Mapmaker/Exp 3.0 program „group” parancsával, ezért visszatértünk azokhoz az elemekhez, amelyekben a kapott hat csoport (*A*, *B*, *CDE*, *F*, *G* és *H*) markerösszetétele azonos volt a csoportosítás paramétereitől függetlenül. Ezeken a csoportokon belül igyekeztünk meghatározni a Mapmaker/Exp 3.0 program megfelelő parancsaival a markerek sorrendjét. Amíg az *A*, *B*, *F*, *G* és *H* csoportok esetén a markersorrend egyértelműen megállapítható volt, addig a *CDE* csoport esetében ellentmondásba ütköztünk a markersorrend meghatározásakor. A *CDE* csoportba tartozó markerek közötti kapcsoltsági értékek a 3. táblázat jobb felső háromszögében találhatók. A számolt kapcsoltsági értékeket nem tüntettük fel abban az esetben, amikor az RF egyenlő vagy nagyobb volt mint 0.3, ezekben az esetekben gondolatjel szerepel a kapcsoltsági értékek helyett. A jobb átláthatóság kedvéért a 3. ábrán a *CDE* csoport markerei a későbbiekben megállapított sorrend szerint vannak feltüntetve. Az adatokat analizálva jól látható, hogy néhány marker (pl. U286, U62, U553, OF20A, stb.) nagyon sok markerhez, mások (pl. U829, U336, stb.) pedig kevés markerhez mutattak kapcsoltságot. A *CDE* csoporton belül a sok marker között megfigyelt alacsony kapcsoltsági és magas LOD-értékek alapján arra gyanakodtunk, hogy valamilyen eddig figyelembe nem vett tényező, és nem a markerek közötti nagy genetikai távolság lehetett az oka annak, hogy nem tudtunk ellentmondásmentesen nyolc kapcsoltsági csoportot kialakítani.

3. táblázat. A *CDE* csoport (ld. 1. ábra) vázmarkereinek kapcsoltsági értékei.

A vázmarkerek függőleges és vízszintes találkozási pontjaiban a köztük lévő rekombinációs gyakoriságokat tüntettük fel. A klasszikus maximum-likelihood (Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program) egyenlet alapján számolt rekombinációs gyakoriságok (RF; a cellákban lévő felső értékek) a hozzájuk tartozó LOD-értékekkel (a cellákban lévő alsó adatok) a táblázat felső háromszögében találhatók. A 0,3-nél nagyobb RF és 3-as LOD-értéknél kisebb érték esetén az adatok nincsenek jelölve (dupla gondolatjelek). A zigotikus szelekcióra kifejlesztett speciális ML egyenletekkel (Lorieux és mtsai 1995) számolt rekombinációs gyakoriságok a táblázat alsó háromszögében vannak felsorolva. A táblázatban a markereket a kapcsoltsági csoportokon belül megállapított sorrendjük szerint tüntettük fel.

A korábbi genetikai térképen (Kiss és mtsai 1993) szereplő markerek alapján az *A*, *B*, *F*, *G* és *H* csoportok megfeleltek a lucerna egyes (LG 1), kettes (LG 2), hármás (LG 3), négyes (LG 4) és ötös (LG 5) kapcsoltsági csoportjainak. Ebből következően a sok markert tartalmazó *CDE* csoport rejthette a többi hiányzó kapcsoltsági csoportot, amelyek valamilyen oknál fogva nem váltak szét.

6.3. Nyolc kapcsoltsági csoport kialakítása

6.3.1. Torzult szegregációs arány a térképezett markereknél

A diploid térképező populáción korábban térképezett markerek egy részénél már megfigyelhető volt a genotípusok szegregációs arányának a várt elméleti 1:2:1 aránytól való jelentős eltérése (Kiss és mtsai 1993). A torzult szegregáció jellemzője, hogy egy markerre nézve a homozigóta vagy a heterozigóta genotípusú egyedek aránya jelentősen megváltozik az elméleti arányhoz képest. Az utódpopuláció egyedeinek egyes markerek esetén tapasztalt torzult szegregációs aránya a szülői gaméták, vagy a belőlük létrejövő zigóták megváltozott életképességének a következménye, ami így bizonyos utódok kisselektálódásához vezet. Attól függően, hogy a szelekció mikor következik be, megkülönböztetünk gaméta vagy zigóta szinten lezajló szelekciót. Egy adott markerre a szelekció típusa számszerűen is meghatározható két egymást követő χ^2 -tesztből (Pham és mtsai 1990; Lorieux és mtsai 1995), ahol a gametikus

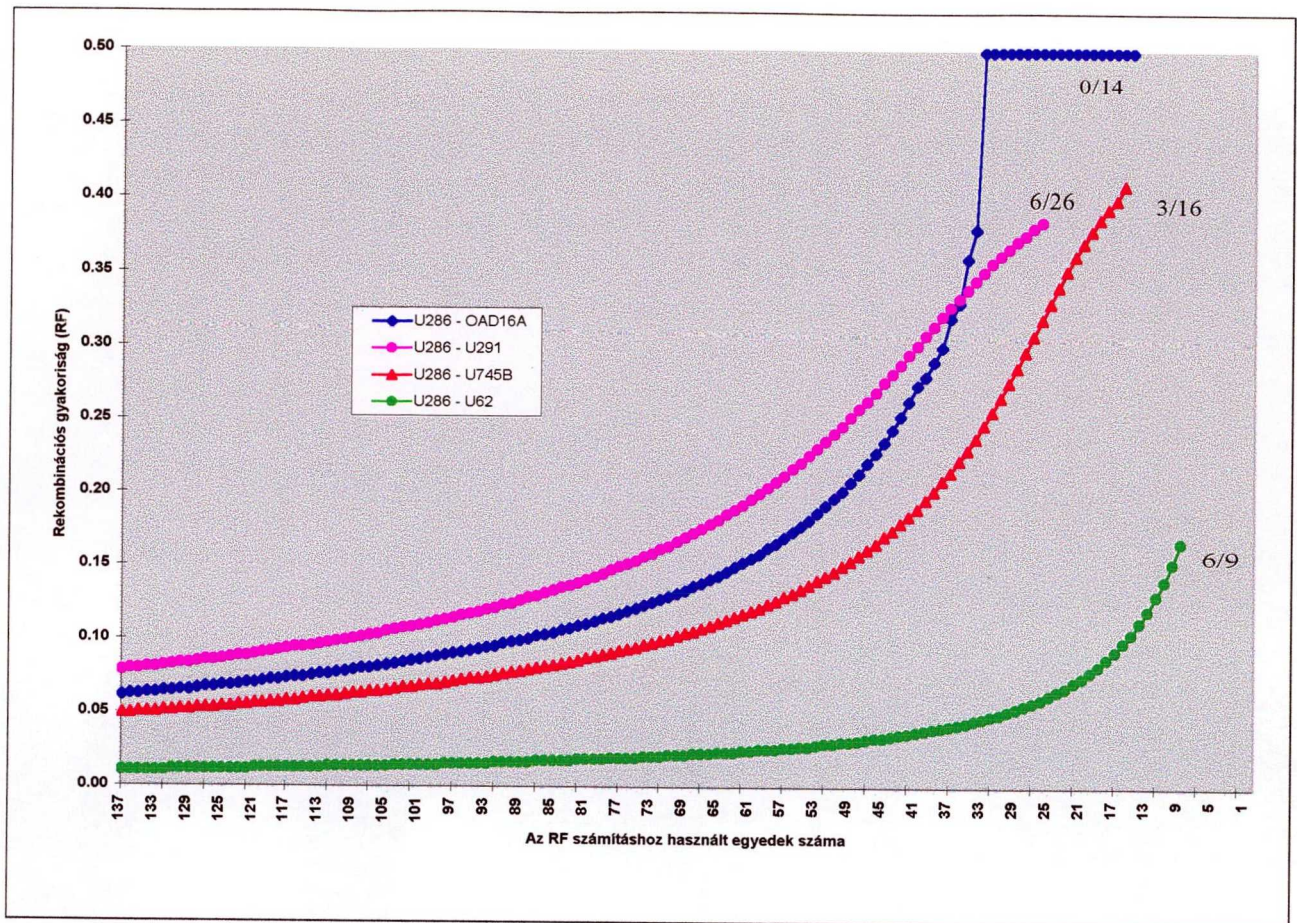
szelekció bekövetkeztét az allélek gyakoriságának egyenlőségével, a zigotikus szelekció lezajlását pedig az allélek független kombinálódásával tesztelik (ld. Függelék 9.1. fejezet).

A térképezett 121 vázmarkernél is elvégeztük a szegregáció torzulását tesztelő χ^2 -próbát, ami alapján megállapítható volt, hogy a vázmarkerek egy része is jelentősen torzult szegregációs arányt mutat (1. táblázat). A bekövetkezett szelekció típusának meghatározásakor az is kiderült, hogy a torzult szegregáció a négyes kapcsoltsági csoportban (LG 4; *H* csoport) található markerek kivételével zigotikus szelekció következménye (1. táblázat). A négyes kapcsoltsági csoportban található markereknél megfigyelt szegregációs arány torzulása a számítások szerint gametikus szelekció eredménye. A megfigyelt zigotikus szelekciók esetén a heterozigóta genotípusú egyedek az elméletileg vártnál nagyobb megjelenési aránya, azaz jobb életképessége volt jellemző. A legkifejezettebb szegregációs aránytorzulást a *CDE* csoportba sorolt markerek esetében tapasztaltuk (1. ábra és 1. táblázat), ahol szinte az összes markernél a heterozigóta genotípusú egyedek elméletinél jelentősen nagyobb aránya volt megfigyelhető. A megfigyelt jelenség felvetette annak lehetőségét, hogy a genotípusok erősen torzult szegregációs aránya összefüggésbe hozható azzal a problémával, hogy a markereket nem tudtuk egyértelműen nyolc valódi kapcsoltsági csoportba sorolni, illetve a *CDE* csoporton belül egyértelmű markersorrendet nem lehetett megállapítani.

6.3.2. A torzult szegregációs arány hatása a kapcsoltsági értékekre

Azon tények alapján, hogy a *CDE* csoporton belül nem lehetett megállapítani egyértelmű markersorrendet, és a genotípusok erősen torzult szegregációs arányát mutató markerek jelentős része a *CDE* csoportban gyűlt össze, arra gyanakodtunk, hogy a heterozigóta genotípusok túlsúlya befolyásolja a kapcsoltsági értékeket. Megvizsgáltuk néhány, a *CDE* csoportba tartozó marker kapcsoltsági viszonyait oly módon, hogy azoknak az egyedeknek a számát lépésenként eggyel csökkentettük, amelyek a két vizsgált markerre heterozigóta genotípusúak voltak (ún.

„heterozigóta kapcsolat”). Minden egyes lépésnél a MapMaker/Exp 3.0 programmal („klasszikus” ML-beclés) meghatároztuk a markerpárok között a rekombinációs gyakoriságot, amelyeket néhány markerpár esetében a számoláshoz használt egyedszám függvényében ábrázoltunk (2. ábra). A vizsgálathoz az egymáshoz igen erős kapcsoltságot mutató (3. táblázat) U286, U291, U62, U745B és OAD16A markereket használtuk, melyeknél csak nyolc, huszonnégy, hét, tizenegy és hét homozigóta genotípusú egyedeket azonosítottunk (1. ábra). A vizsgálat kezdetekor, amikor az összes egyedeket használtuk a rekombinációs gyakoriság meghatározásához, 0.06, 0.08, 0.065 és 0.013 RF-értékeket kaptunk az U286/OAD16A, U286/U291, U286/U745B és U286/U62 markerpárok esetében. A „heterozigóta kapcsolat”-ok csökkentését addig folytattuk, amikor már csak a két markerre megegyező homozigóta genotípusú (ún. „homozigóta kapcsolat”) és az eltérő genotípusú egyedek adatai maradtak az adatsorban. Az U286/OAD16A markerpár kapcsoltsága teljesen megszűnt ($RF=0.5$), amikor az egyedszám elért egy bizonyos határértéket (tizenkilenc „heterozigóta kapcsolat” harminchárom egyedből). Az RF-meghatározást tizennégy egyednél hagytuk abba, amikor már több „heterozigóta kapcsolat”-tal rendelkező egyed nem tudtunk kivenni az adatsorból. Az U286/U291, U286/U745B és U286/U62 markerpárok esetében az RF meghatározást huszonhat ($RF=0.37$), tizenhat ($RF=0.41$) és kilenc ($RF=0.17$) egyednél fejeztük be (2. ábra). Ezekben az esetekben tehát az összes „heterozigóta kapcsolat” kivétele után is kapcsoltságot maradtak a markerpárok. A fenti eredmények alapján feltételezésünk szerint az U286/U291, U286/U745B és U286/U62 markerpárok kapcsoltságot, az U286/OAD16A markerpár pedig valószínűleg nem kapcsoltságot, csak a heterozigóta genotípusok túlsúlya torzította a rekombinációs gyakoriság „klasszikus” ML-becléssel meghatározott értékét. Feltételeztük, hogy ezen torzult RF-értékek következtében genetikailag egyébként nem kapcsoltságot markerek is kerülhettek a *CDE* csoportba.



2. ábra. Az U286/OAD16A (sötétkék négyzettel jelölve), U286/U291 (világoskék kör), U286/U745B (piros háromszög) és U286/U62 (zöld kör) markerpárok között számolt rekombinációs gyakoriságok ábrázolása a „heterozigóta kapcsolatok” lépésenkénti elhagyása után. Az azonos homozigóta genotípusú egyedek („homozigóta kapcsolat”) számát a görbék melletti első szám jelzi. A vizsgálat végére a különböző markerpárok esetében tizennégy, huszonhat, tizenhat és kilenc egyed maradt csak, amelyek azonos homozigóta, vagy eltérő genotípusúak (homozigóta-homozigóta; homozigóta-heterozigóta) voltak (görbék melletti második szám). A rekombinációs gyakoriságokat a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes programmal határoztuk meg.

A fent leírt eredmények alapján feltételezésünk szerint a *CDE* csoporton belül a kapcsoltsági viszonyok tisztázhatók olyan módszerrel, amely a torzító hatást kiküszöböli. Ezért az irodalomban utánanéztünk olyan lehetséges módszernek, amely feltételezésünk szerint precíz és szabatos megoldást jelenthet a probléma kezelésére. Számos vizsgálat irányult már a torzult szegregációs arálynak a kapcsoltsági értékekre gyakorolt hatásának felderítésére. Bailey (1949) zigotikus szelekció esetén tanulmányozta domináns markerek között a kapcsoltsági viszonyokat, Heun és Gregorius (1987) pedig szintén domináns markerek esetén vizsgálta a torzult szegregációs arány hatását a kapcsoltsági értékekre mind gametikus, mind zigotikus szelekció

esetén. Lorieux és mtsai (1995) azonban speciális maximum-likelihood (ML) egyenleteket dolgoztak ki a rekombinációs gyakoriság (RF) és az életképességi faktorok becslésére torzult szegregációs arányt mutató domináns és kodomináns markerek esetén mindkét szelekciótípusnál F_2 szegregáló populációban. Közleményük szerint szükség van a RF és az életképességi értékek egyidejű figyelembevételére a vizsgálat során, mert az egyes rekombinációs kategóriákba eső egyedszám (a mért adat) egyaránt függ a rekombinációs gyakoriságtól és az életképességi értékektől. A fent említett vizsgálatok rámutattak, hogy a torzult szegregációs arány erős befolyással lehet a rekombinációs gyakoriság becslésére, ezért a 121 vázmarkert további alaposabb vizsgálatnak vetettük alá.

Lorieux és mtsai (1995) meghatározták zigotikus szelekció esetén egy elméleti populációra a klasszikus ML-becsléssel (Allard 1956) kiszámolt rekombinációs gyakoriság eltérését az általuk kidolgozott speciális ML-becsléssel számolt rekombinációs gyakoriságoktól. Olyan életképességi értékek esetén, amikor egy adott markernél a heterozigóta egyedek életképessége tízszerese volt a homozigóta egyedekének (amely megközelítőleg azonos a *CDE* csoport legtorzultabb szegregációs arányt mutató markereinél előforduló életképességi értékekkel), a klasszikus módon történő RF becslések jelentősen kisebb értéket eredményeztek, azaz a markerpárok viszonya a szorosabb kapcsoltság felé tolódott el. Ezek alapján arra gyanakodtunk, hogy a *CDE* csoportban található, a heterozigóta genotípusok dominanciájával jellemezhető torzult szegregációs arányt mutató markerek között (azaz amikor a „heterozigóta kapcsolatok” száma igen nagy volt) a kapcsoltsági értékek a valósnál nagyobb kapcsoltságot (kisebb rekombinációs gyakoriságokat) mutattak, és ezek a kisebb rekombinációs gyakoriságok zavarták a valós kapcsoltsági csoportok kialakítását, illetve a markersorrend meghatározását.

6.3.3. Az erősen torzult szegregációs arányt mutató markereket tartalmazó kapcsoltsági csoportok meghatározása

Azért, hogy az erősen torzult szegregációs arány rekombinációs gyakoriságra gyakorolt zavaró hatását kiküszöböljük, a Lorieux és mtsai (1995) által zigotikus szelekcióra és kodomináns markerekre kidolgozott egyenletek segítségével becsültük meg a *CDE* csoport markerei között a rekombinációs gyakorisági értékeket. Az így kiszámolt RF-értékek a 3. táblázat bal alsó háromszögében találhatók. A rekombinációs gyakoriság határértékét 0.3-nél meghúzva, a *CDE* csoport markereit egyértelműen három különálló kapcsoltsági csoportra (*C*, *D* és *E*) tudtuk szétosztani. Összehasonlítva a *CDE* csoport markereinek az 1. táblázatban felsorolt χ^2 értékeit a markerek között a klasszikus ML-módszerrel számolt RF-értékekkel (3. táblázat), jól látható, hogy a különböző kapcsoltsági csoportokban lévő, szélsőségesen sok heterozigóta genotípusú egyeddel jellemezhető markerek között alacsony rekombinációs gyakorisági értékeket kaptunk a klasszikus ML-módszerrel történő számolás esetén. Ezek a közeli kapcsoltságot jelentő rekombinációs gyakoriságok mesterségesen összetartották a genetikailag egyébként nem kapcsolt markereket, és ezeken keresztül a különálló kapcsoltsági csoportokat.

A specifikus ML-egyenletek (Lorieux és mtsai 1995) azokban az esetekben is használhatók, amikor a torzult szegregációs arány nem annyira jelentős, hanem közelebb van az elméleti szegregációs arányhoz. Ilyen esetekben az életképességi értékek is az egyhez közelítenek, vagy ideális esetben eléri azt, és így a számolt rekombinációs gyakoriságok is kisebb eltérést mutatnak (vagy megegyező értéket adnak) a klasszikus ML-egyenletekkel számoltakhoz képest. A többi csoport (*A*, *B*, *F*, *G* és *H*) esetében is, ahol lehetett (ld. 5.4.3.2. fejezet), meghatároztuk a vázmarkerek közötti RF-értékeket a χ^2 tesztekkel megállapított szelekció típusnak (1. táblázat) megfelelő specifikus ML-egyenletek alkalmazásával. Azt találtuk, hogy e csoportok markerei együtt maradtak, nem estek szét további csoportokra. Példaként az ötös kapcsoltsági csoport (LG 5) vázmarkerei között a zigotikus szelekcióra

kidolgozott specifikus ML-egyenletekkel számolt rekombinációs gyakoriságok vannak feltüntetve a 4. táblázat bal alsó háromszögében. Az előzőekben meghatározott *A*, *B*, *F*, *G* és *H* csoportok tehát valós kapcsoltsági csoportoknak bizonyultak, a speciális ML-dal számolva a vázmarkerek közötti rekombinációs gyakoriságok csak kis mértékben változtak meg. A *CDE* csoportból létrejött három, valamint az előzőleg meghatározott öt kapcsoltsági csoporttal így nyolc kapcsoltsági csoportot (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*) azonosítottunk, melyek valószínűleg a lucerna nyolc haploid kromoszómájának felelnek meg. A vázmarkerek sorrendjét a csoportokon belül a közöttük a szelekciótípusnak (1. táblázat) megfelelő specifikus ML-egyenletek alkalmazásával kiszámolt rekombinációs gyakoriságok alapján határoztuk meg.

4. táblázat. Az *F* csoport (LG 5) vázmarkereinek kapcsoltsági értékei.

A klasszikus maximum-likelihood (Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program) egyenletek szerint számolt rekombinációs gyakoriságok (RF; felső értékek) a hozzájuk tartozó LOD-értékekkel (alsó adatok) a táblázat felső háromszögében találhatók. A 0,3-nél nagyobb RF és 3-as LOD-értéknél kisebb értékeket a 3. táblázathoz hasonlóan nem jelöltük. A zigotikus szelekcióra kifejlesztett speciális maximum-likelihood egyenletekkel (Lorieux et al. 1995) számolt rekombinációs gyakoriságok a táblázat alsó háromszögében vannak feltüntetve. A 3. táblázathoz hasonlóan a markereket a kapcsoltsági csoportokon belüli sorrendjüknek megfelelően helyeztük el a táblázatban.

LG 5	U89A	U584B	F3OH	CyclIIMs	U224	CG13	Enod40	U202	ALD	U70	GSc	LbMSI	U151	U26	CG9	Calmod
U89A		0.027 41.40	0.068 26.93	0.077 25.51	0.127 15.87	0.200 8.24	0.212 7.42	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
U584B	0.031		0.035 34.84	0.045 32.82	0.097 20.01	0.159 11.65	0.170 10.58	0.285 3.42	0.274 3.70	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
F3OH	0.076	0.042		0.013 39.44	0.066 23.81	0.135 13.28	0.138 12.84	0.237 5.05	0.231 5.23	0.247 4.03	0.274 2.51	0.294 2.08	0.280 2.31	- -	- -	- -
CyclIIMs	0.089	0.057	0.017		0.048 28.34	0.117 15.73	0.123 15.08	0.215 6.12	0.209 6.34	0.229 4.88	0.264 2.83	0.285 2.33	0.280 2.40	- -	- -	- -
U224	0.150	0.125	0.088	0.070		0.070 22.82	0.088 19.62	0.154 10.43	0.160 9.77	0.182 7.62	0.207 5.56	0.232 4.08	0.241 3.62	0.267 2.35	0.275 1.94	0.276 2.15
CG13	0.231	0.200	0.174	0.163	0.110		0.016 40.13	0.088 20.51	0.092 19.80	0.106 17.06	0.128 13.72	0.141 12.18	0.138 11.87	0.161 9.71	0.169 8.84	0.171 9.03
Enod40	0.245	0.215	0.179	0.172	0.137	0.026		0.099 19.02	0.106 17.74	0.118 15.36	0.140 12.43	0.153 11.00	0.161 9.77	0.175 8.51	0.176 8.23	0.183 8.05
U202	- -	- -	0.283	0.273	0.216	0.130	0.144		0.004 44.16	0.034 33.25	0.075 23.21	0.099 19.32	0.107 17.40	0.139 13.07	0.156 11.18	0.146 12.45
ALD	- -	- -	0.274	0.263	0.219	0.134	0.151	0.006		0.039 31.32	0.080 22.20	0.106 18.03	0.109 16.99	0.136 13.44	0.153 11.29	0.144 12.58
U70	- -	- -	- -	- -	0.262	0.162	0.180	0.051	0.058		0.039 31.25	0.062 26.33	0.077 22.21	0.112 16.32	0.128 14.11	0.119 15.45
GSc	- -	- -	- -	- -	0.294	0.191	0.207	0.109	0.115	0.060		0.033 34.33	0.045 29.17	0.079 22.07	0.099 18.39	0.092 19.73
LbMSI	- -	- -	- -	- -	- -	0.211	0.227	0.144	0.151	0.096	0.050		0.008 43.42	0.053 29.26	0.076 23.83	0.078 23.46
U151	- -	- -	- -	- -	- -	0.199	0.229	0.150	0.150	0.113	0.066	0.012		0.048 28.94	0.071 23.84	0.074 23.45
U26	- -	- -	- -	- -	- -	0.243	0.260	0.203	0.198	0.170	0.119	0.081	0.072		0.021 37.89	0.024 37.10
CG9	- -	- -	- -	- -	- -	0.251	0.259	0.22598	0.220	0.191	0.146	0.114	0.104	0.033		0.004 45.64
Calmod	- -	- -	- -	- -	- -	0.258	0.273	0.216	0.210	0.183	0.139	0.120	0.110	0.039	0.006	

4. táblázat.

A *C*, *D*, és *E* csoportok és az előző genetikai térkép (Kiss és mtsai 1993) kapcsoltsági csoportjainak közös markereit összehasonlítva kiderült, hogy ezek a csoportok a lucerna hatos, hetes és nyolcas kapcsoltsági csoportjainak felelnek meg (LG 6, LG 7 és LG 8). Néhány marker másik kapcsoltsági csoportba került, ugyanis az előző térkép VI-os kapcsoltsági csoportjába tartozó hat marker (L590, L482, CG19, TMs2, ASN és U82) a nyolcas (LG 8), az előző VIII-as kapcsoltsági csoport három markere (L500, L59 és AP8b4) pedig a genetikai térkép hetes kapcsoltsági csoportjának (LG 7) lett tagja. A korábban meghatározott kapcsoltsági csoportok (Kiss és mtsai 1993) hibás markerösszetételét a torzult szegregációs arányok rekombinációs gyakoriságot befolyásoló hatása, és a markertelítettség hiánya okozta.

A vázmarkerek kapcsoltsági adatainak vizsgálatából tehát kiderült, hogy a heterozigóta genotípusok túlsúlyával rendelkező vázmarkerek között a klasszikus ML szerint számolt rekombinációs gyakoriságok az erősebb kapcsoltságot jelentő értékek felé tolódtak el. Ezek a kapcsoltsági értékek olyan mértékben torzulhatnak, hogy az egyébként nem kapcsolt, de jelentős számú heterozigóta genotípussal rendelkező markerek között is szoros kapcsoltságot találunk. Ezt a hamis kapcsoltságot is eredményező hatást ki lehetett küszöbölni azokkal a speciális ML-egyenletekkel (Lorieux és mtsai 1995), melyek figyelembe veszik a vizsgált markerekre különböző genotípusú zigóták életképességét, és így alkalmazásukkal pontosabb rekombinációs értékek határozhatók meg.

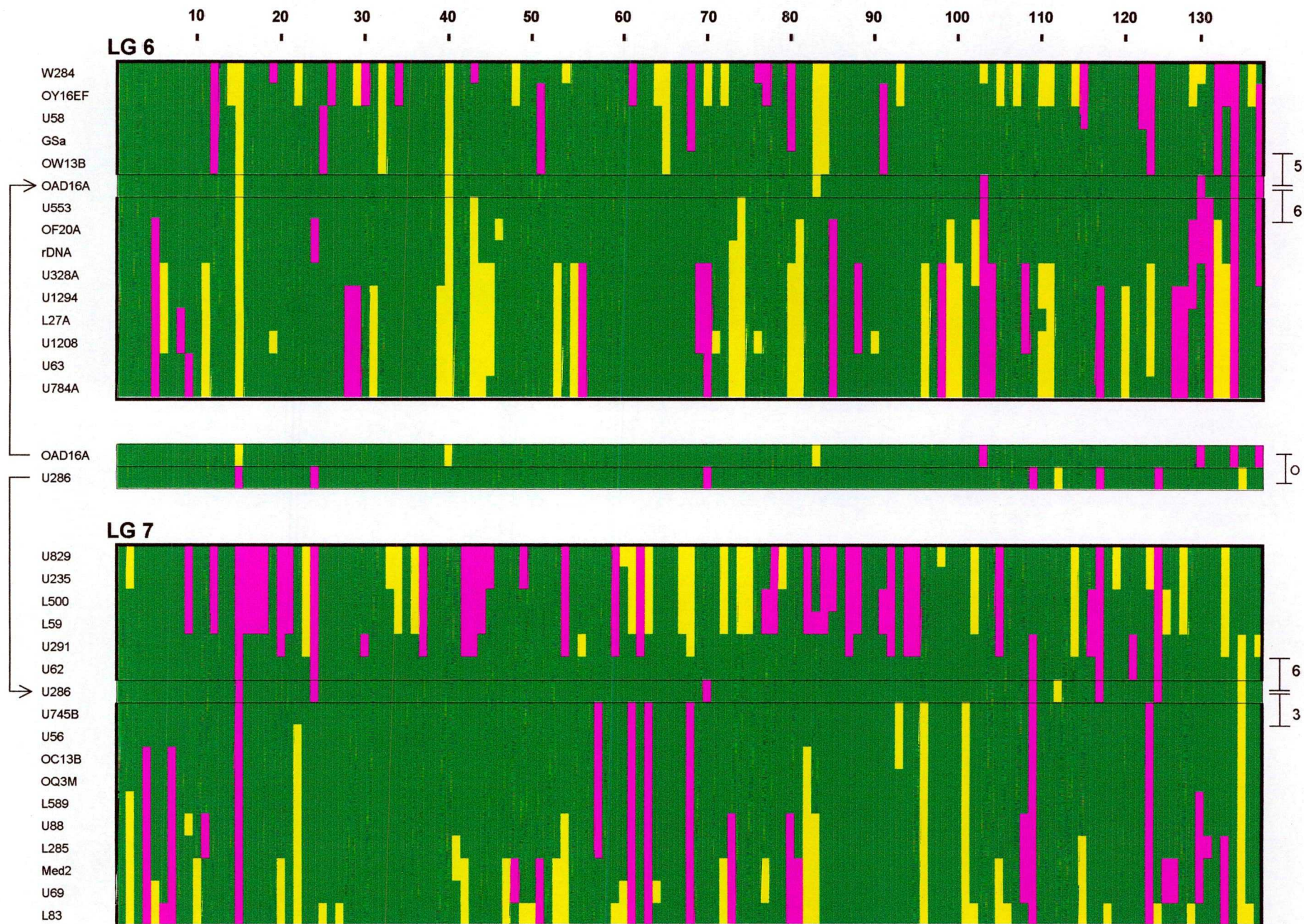
6.3.4. Az erősen torzult szegregációs arányt mutató markerek kapcsoltsági viszonyainak vizsgálata színtérkép segítségével

A *CDE* csoportban található markerek közötti kapcsoltsági viszonyokat egy harmadik módszerrel, az úgynevezett színtérképezéssel (Kiss és mtsai 1998) is vizsgáltuk. A 3. ábra közepén található U286 és OAD16A markerek a heterozigóta genotípusok erőteljes dominanciájával jellemezhető torzult szegregációs arányt mutattak (1. táblázat). A két marker a

klasszikus módon számolt kapcsoltsági értékek alapján erős kapcsoltságot mutatott ($RF=0.122$, LOD 10.01; Mapmaker/Exp 3.0; 3. táblázat), a „heterozigóta kapcsolatok” csökkentésével végzett vizsgálat (2. ábra) és a zigotikus szelekcióra kidolgozott képlet alapján számolt rekombinációs gyakoriság szerint viszont nem kapcsoltnak bizonyultak. A szintérképezés szintén cáfolja a két marker kapcsoltságát, mivel a két marker esetében egyetlenegy megegyező homozigóta genotípusú egyed (ún. „homozigóta kapcsolat”) sem figyelhető meg a térképező populációban. Ugyanakkor ezeket a markereket a megfelelő kapcsoltsági csoportokba helyezve (LG 6 és LG 7) a markerek számos „homozigóta kapcsolata” (U286-U62, U286-U745B és OAD16A-OW13B, OAD16A-U553) igazolja a valós kapcsoltságot, és így ezen markerek megfelelő helyzetét a kapcsoltsági csoportokon belül. A szintérképezés tehát lehetőséget adott arra, hogy a „homozigóta kapcsolatok” kihangsúlyozásával gyorsan és hatékonyan tisztázzuk azon markerek kapcsoltsági viszonyát, amelyek között a nagyszámú heterozigóta genotípusú egyed torzította a klasszikus ML-módszer alapján meghatározott rekombinációs gyakoriságokat. A torzító hatás kiküszöbölésével a markerek kapcsoltsági viszonyainak meghatározására a szintérkép gyorsabb, egyszerűbb és látványosabb analízist biztosított, mint a speciális ML-egyenletekkel végzett rekombinációs gyakoriság meghatározásán alapuló vizsgálatok.

Az U286, U62 és U745B vázmarkerek kapcsoltsági viszonyainak vizsgálatában szintén a szintérképezés (Kiss és mtsai 1998) nyújtott segítséget. Az U286 és U745B markerek között a „klasszikus” ML-egyenlettel számolt rekombinációs gyakoriság $RF=0.065$, a speciális ML-egyenlettel számolva pedig $RF=0.295$. Azonban az U286 marker két szomszédos markere (U62 és U745B) egymással erősebben kapcsolt (a „klasszikus” ML egyenlet szerint $RF=0.06$, a speciális ML-egyenlet szerint pedig $RF=0.277$), mint az U286 és az U745B markerek (3. táblázat). A Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program „compare” parancsával végzett markersorrend-meghatározás alapján viszont az U62 - U286- U745B markersorrend tűnt legvalószínűbbnek akkor, ha a szomszédos markerek genotípusadatait is használtuk a markerek sorrendjének megállapításához. Mivel a speciális ML-egyenletekkel számolt RF-ok alapján a

markerek sorrendjének meghatározását nem tudtuk számítógéppel automatikusan elvégezni, ezért a jelenséget a színtérképezés módszerével alaposabban megvizsgáltuk. Kiderült, hogy az U62 - U745B - U286 markersorrend esetén tizenegy, míg az U62 - U286- U745B markersorrend esetén a 70-es és 113-as számú növényeknél megfigyelhető két „sziget” létét kellett feltételeznünk. A „szigetek” kialakulása vagy egy nem rekombináns és egy, a szélső markerek között bekövetkezett kettős rekombinációs eseményből keletkezett gaméta, vagy a szélső markerek között két különböző helyen bekövetkezett rekombinációs eseményből származó gaméták találkozásával magyarázható. Azaz a „szigetek” létrejöttéhez mindenképpen két rekombinációs eseménynek kellett bekövetkeznie. A kétszeres rekombinációk előfordulása egy adott additív szakaszon ritkább, mint az egyszeres rekombinációk előfordulása (Orosz 1979), és a kettős rekombinációs események következtében keletkező rekombináns egyedek a legritkább rekombináns kategóriába tartoznak. Az U62 - U745B - U286 markersorrend esetén a tizenegy kettős rekombinációs esemény feltételezése mellett csak három egyszeres rekombinációs eseményt azonosíthattunk, míg az U62 - U286- U745B markersorrend esetén a két kettős rekombinációs esemény mellett tizenkettő egyszeres rekombinációs eseményt figyelhattunk meg, ami alapján az U62 - U286- U745B markersorrend tűnt a legvalószínűbbnek (3. ábra). A ritka kettős rekombinációs eseményeket a „szigetek” kívül eső markerek maximum-likelihood módszerrel (két pontos térképezés) történő analízisekor nem vesszük észre, a színtérképpel történő analízis azonban lehetőséget biztosít három (vagy több) marker egyidejű vizsgálatára (hárompontos térképezés), és így azok kapcsoltsági viszonyainak tisztázására.



3. ábra.

3. ábra. A legtorzultabb szegregációt mutató vázmarkerek térképezése színtérkép (Kiss és mtsai 1998) segítségével. Az ábrán a térképező populáció 137 növényének hatos és hetes kapcsoltsági csoportok (LG 6 és LG 7) vázmarkereire meghatározott genotípusait tüntették fel különböző színekkel jelölve. A sárga, a zöld és ibolya színek az anyai homozigóta, heterozigóta és apai homozigóta genotípusokat jelölik. A mátrix felső részén a szegregáló populáció egyedeinek sorszáma látható. A színtérkép jobb szélén található számok a kérdéses két marker közötti azonos homozigóta genotípusú egyedek számát („homozigóta kapcsolat”) jelzik. Az ábra részletesebb magyarázata a 6.2.4. fejezetben található.

6.4. A genetikai térkép elkészítése, kiegészítő markerek illesztése a váztérképbe

A következő lépés egy részletes, markerekkel sűrűn telített genetikai térkép létrehozásához további markerek illesztése az elkészült, nyolc kapcsoltsági csoportot tartalmazó váztérképbe. Ezért a következőkben több, mint 800, főleg domináns kiértékelésű marker (későbbiekben további marker) helyét határoztuk meg a térképen. Ezek a markerek nemcsak egy részletesebb genetikai térkép létrehozását tették lehetővé, hanem segítségükkel arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy a 121 vázmarkerrel létrehozott kapcsoltsági csoportok valóban a lucerna nyolc kapcsoltsági csoportját képviselik-e, vagy esetleg a további markerek térképezése megváltoztatja a kapcsoltsági viszonyokat.

Azt tapasztaltuk az előző lucerna genetikai térkép (Kiss és mtsai 1993) megszerkesztésénél, hogy a torzult szegregációs arányt mutató markerekhez szorosan kapcsolt markereknél is bizonyos fokú torzult szegregációs arány volt megfigyelhető. Ezt a jelenséget feltételezhettük a továbbfejlesztett térkép esetén is, ezért az előzőekben vázolt nehézségek a kapcsoltsági viszonyok tisztázásában a LG 6, LG 7 és LG 8 vázmarkereihez kapcsolódó további markerek térképezésénél is problémát jelentettek volna. Ezért a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program így nem volt használható önállóan a kiegészítő markerek kapcsoltsági csoportokba osztására, a megoldást jelentő speciális ML-egyenletekkel pedig nem tudtunk automatizáltan nagyszámú markert csoportosítani, így egy köztes megoldást választottunk.

Az előzőekben leírt analízisből kiderült, hogy a speciális ML-képletekkel (Lorieux és mtsai 1995) számolt kapcsoltsági értékek alapján meghatározott *A*, *B*, *F*, *G* és *H* csoportok

egyértelműen valós kapcsoltsági csoportokat alkottak. Ugyanezeket a markerösszetételű csoportokat kaptuk meg a klasszikus módon, a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program „group” parancsával 20-40 cM maximális genetikai távolság, és LOD 9 és 10 határértékek használata esetén is. A számítógépes program segítségével a markersorrend is egyértelműen megállapítható volt az így létrejött csoportokon belül. Ezekben a csoportokban a genotípusok szegregációja tehát nem olyan mértékben torzult, hogy zavarta volna a markerek csoportokba osztását, azaz az *A*, *B*, *F*, *G* és *H* csoportok esetében a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program önmagában is használhatónak bizonyult a kapcsoltsági csoportok kialakítására, a megfelelő csoportosítási határértékek alkalmazásával. A *CDE* csoport - mint az előzőekben kiderült - három kapcsoltsági csoportból állt, mely csoportok magasabb LOD-értéknél és viszonylag alacsony maximális genetikai távolságnál is együtt maradtak, ugyanis a *CDE* csoport markerei között klasszikus módon számolt rekombinációs gyakorisági értékeket a heterozigóta genotípusok túlsúlya a nagyobb kapcsoltság (kisebb kapcsoltsági értékek) irányába módosította. A *CDE* csoport markerei között a kapcsoltsági viszonyokat csak a speciális ML-egyenletek és a szintérkép segítségével tudtuk egyértelműen tisztázni.

A fenti eredmények figyelembevételével ezért a további több, mint 800 további markert először a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program „group” parancsával osztottuk csoportokba azoknak a csoportosítási paramétereknek a használatával (LOD 9 és 20 cM maximális genetikai távolság, 1. táblázat), amelyek az *A*, *B*, *CDE*, *F*, *G* vagy *H* csoportokat eredményezték. Az *A*, *B*, *F*, *G* és *H* csoportok esetében meghatároztuk a markerek sorrendjét a számítógépes programmal. Ezt követően a pontosabb rekombinációs gyakoriság meghatározása érdekében a szomszédos markerek közötti rekombinációs gyakoriságokat a közeli vázmarkerre jellemző szelekciótípusnak megfelelő speciális ML-egyenletek (Lorieux és mtsai 1995) segítségével számoltuk ki.

Azokban az esetekben, amikor a kérdéses marker a *CDE* csoportba került, először azt kellett eldöntenünk, hogy a marker a *CDE* csoportot alkotó valódi *C*, *D* és *E* kapcsoltsági

csoportok közül melyikbe tartozik. Ezért a *CDE* csoportba került összes váz- és kiegészítő marker között, a zigotikus szelekcióra kidolgozott speciális ML-egyenletek segítségével meghatároztuk a markerek közötti rekombinációs gyakoriságokat, és ezek alapján osztottuk szét a markereket a *C*, *D* és *E* kapcsoltsági csoportokba. A szétosztás után pedig a számolt RF-értékek alapján felállítottuk a legvalószínűbb markersorrendet a kapcsoltsági csoportokon belül.

A kiegészítő markerek térképezését színtérképezéssel (Kiss és mtsai 1998) is elvégeztük, és az így létrehozott kapcsoltsági csoportok és a megállapított markersorrend teljes egyezést mutatott a fentebb vázolt módon elkészített genetikai térképpel. A kétféle módszerrel elvégzett genetikai analízisből kiderült, hogy minden egyes új marker a 6.3.3. fejezetben kialakított nyolc kapcsoltsági csoport valamelyikébe került, azaz új kapcsoltsági csoport nem jött létre. A tény, hogy mindkét módszerrel elvégzett genetikai analízis ugyanazokat a kapcsoltsági csoportokat és markersorrendet eredményezte, egyrészt alátámasztja azt, hogy mindkét módszer alkalmas a torzult szegregációs arányú genotípusokkal rendelkező markerek kapcsoltsági viszonyainak tisztázására, másrészt megerősítik, hogy a létrehozott kapcsoltsági csoportok valóban a lucerna nyolc kapcsoltsági csoportját reprezentálják.

Meghatároztuk mind a 804 kiegészítő marker térképhelyét a fent vázolt kétféle módon. Ezt követően a speciális ML egyenletekkel (Lorieux és mtsai 1995) a szomszédos markerek között számolt rekombinációs gyakoriságokat a Haldane térképfüggvény segítségével alakítottuk át genetikai távolsági adatokká. Az így kiszámolt genetikai távolságok felhasználásával szerkesztettük meg a 4/a-h. ábrán látható nyolc kapcsoltsági csoportot, amelyeken a 121 vázmarkert vastag karakterekkel emeltük ki.

A kiegészítő markereket két csoportba lehetett osztani:

- (1) azokat a markereket, melyek rekombinációt mutattak ($RF > 0$) a vázmarkerekkel, beillesztettük a 121 vázmarker közé (4/a-h. ábra)
- (2) a vázmarkerekkel rekombinációt ($RF=0$) nem mutató markereket a megfelelő vázmarkerek mellett helyeztük el (4/a-h. ábra)

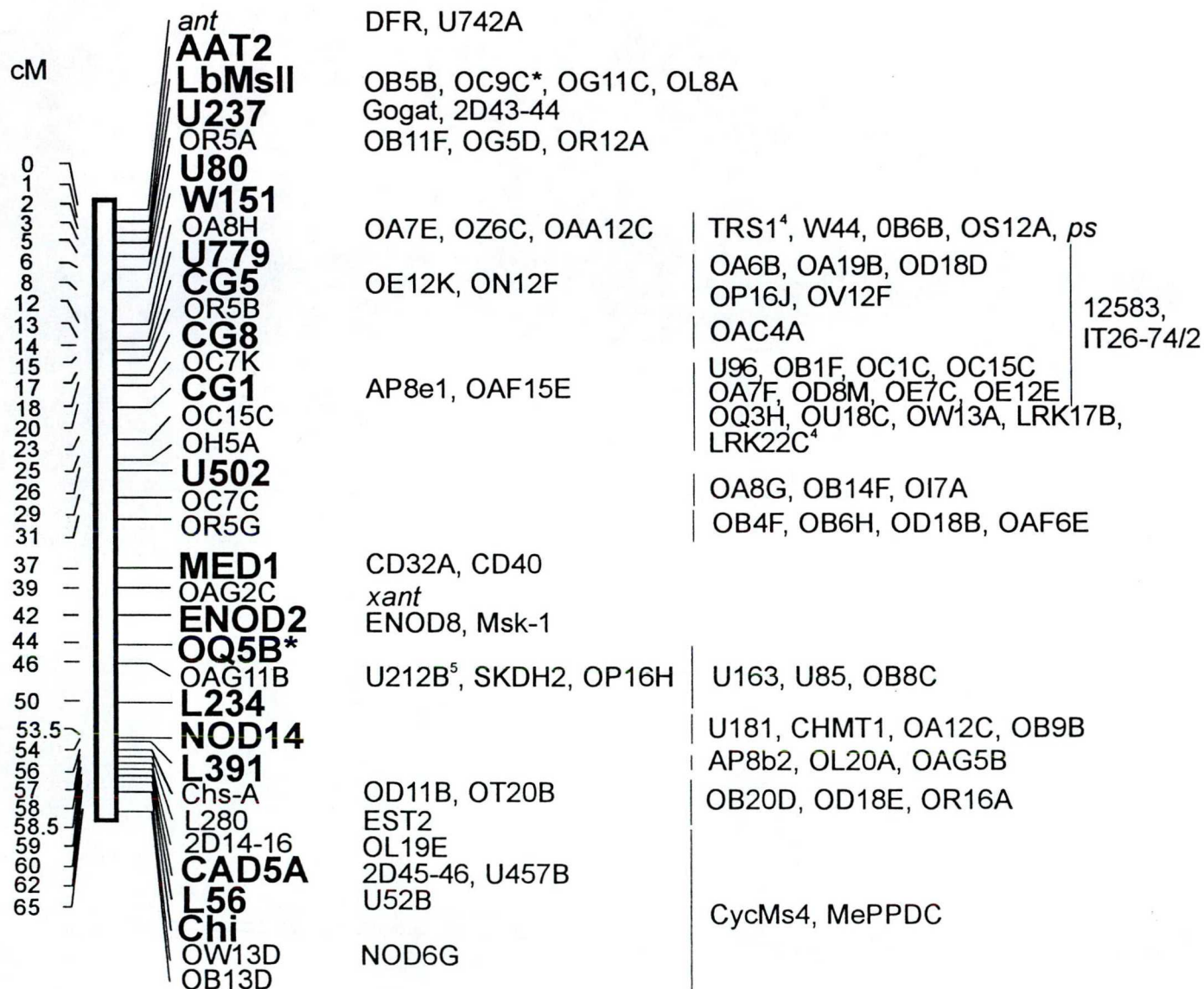
Ez utóbbiak közül azokat, amelyek több, mint egy vázmarkerhez voltak kapcsoltak, azaz térképhelyük nem volt pontosan megállapítható, egy függőleges vonal mellett tüntettük fel, amely azt a régiót jelöli, amelyen belül az adott marker elhelyezkedik. Az a tény, hogy számos marker pontos térképhelyét nem lehetett meghatározni, a markerek domináns jellegével, illetve a térképező populáció néhány egyedének hiányzó genotípus adatával magyarázható.

A kiegészítő markerek térképhelyének meghatározása során minden markert egyértelműen el tudtunk helyezni a kapcsoltsági csoportokon, azok térképezése nem változtatta meg a kapcsoltsági viszonyokat. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a 121 vázmarker segítségével kialakított kapcsoltsági csoportok valóban a diploid lucerna nyolc kapcsoltsági csoportját képviselik.

4/a-h ábra. A diploid lucerna nyolc kapcsoltsági csoportja.

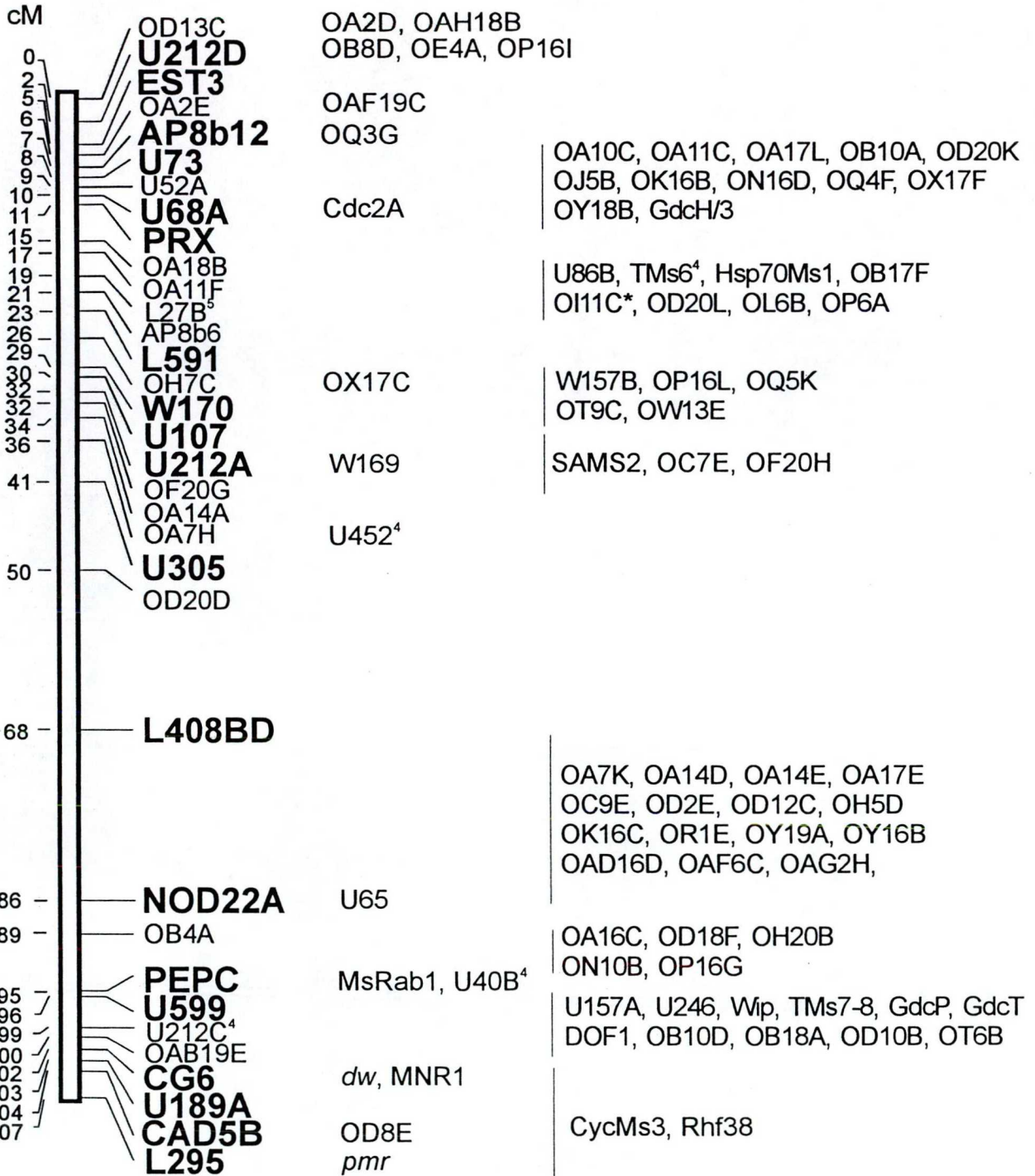
A kapcsoltsági csoportokon a 121 vázmarkert vastag és nagyobb karakterrel jelöltük. A kiegészítő markereket a kapcsoltsági csoportokat jelentő oszlopok mellett helyeztük el. Azokat a markereket, melyek teljes kapcsoltságot mutattak egy vázmarkerhez, vagy egy, a vázmarkerek közé helyezett egyéb kiegészítő markerhez, a megfelelő marker mellett helyeztük el. Azokat a kiegészítő markereket, melyek több, mint egy vázmarkerhez, vagy pedig a vázmarkerek közé helyezett egyéb kiegészítő markerekhez mutattak kapcsoltságot, egy függőleges vonal mentén helyeztük el, amely azt a régiót szemlélteti, amelyhez 100%-os kapcsoltságot mutat a kérdéses marker. A kodomináns kiértékelésű RAPD markereket csillaggal jelöltük, a domináns kiértékelésű RFLP markereknél a felső indexben elhelyezett 5-sel és 4-sel jelöltük, hogy az anyai, illetve az apai szülőből származik-e a térképezett fragment. A speciális ML-egyenletekkel kiszámolt rekombinációs gyakoriságokat a Haldane térképfüggvény alkalmazásával számoltuk át genetikai távolsági adatokká.

LG 1



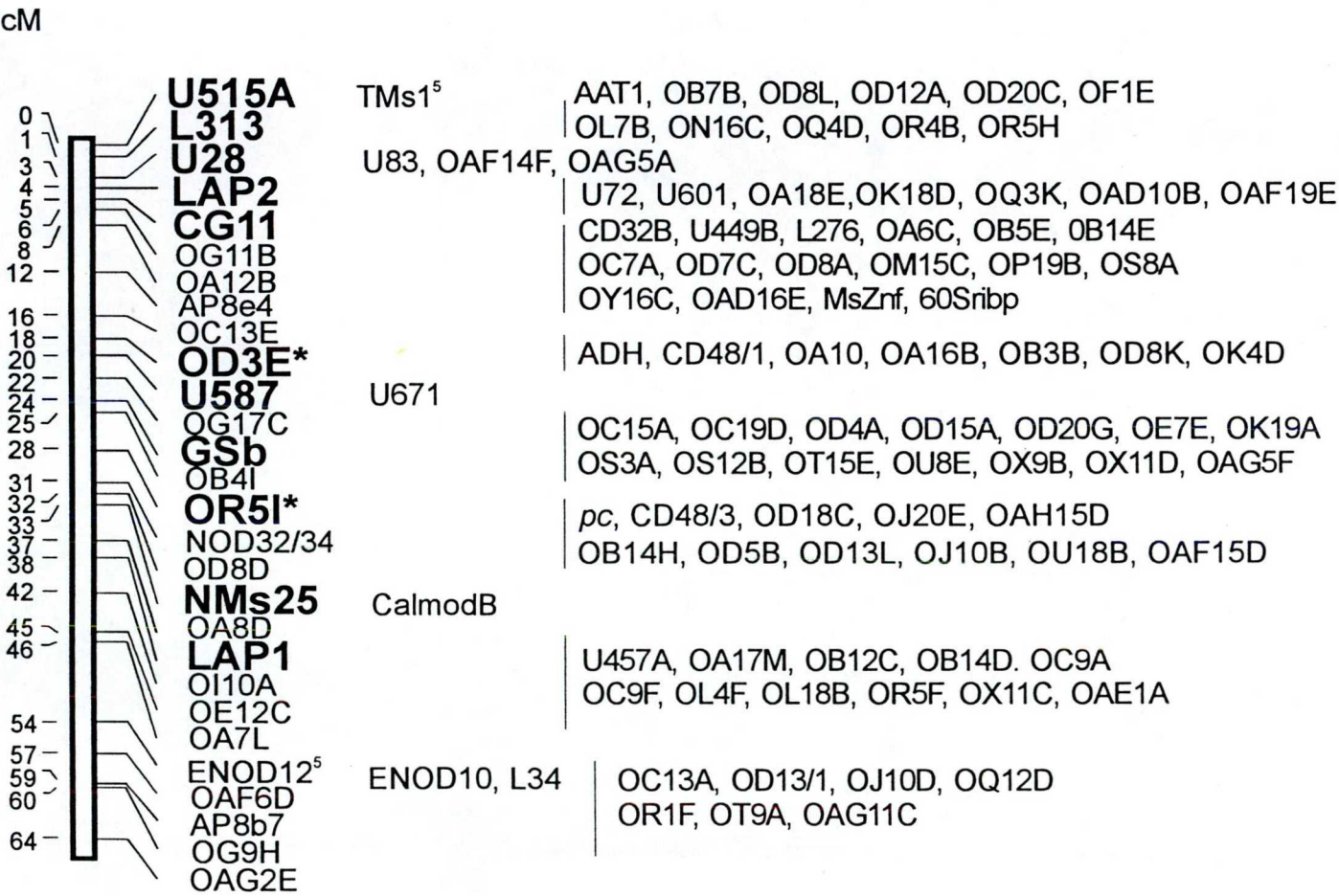
4/a. ábra.

LG 2



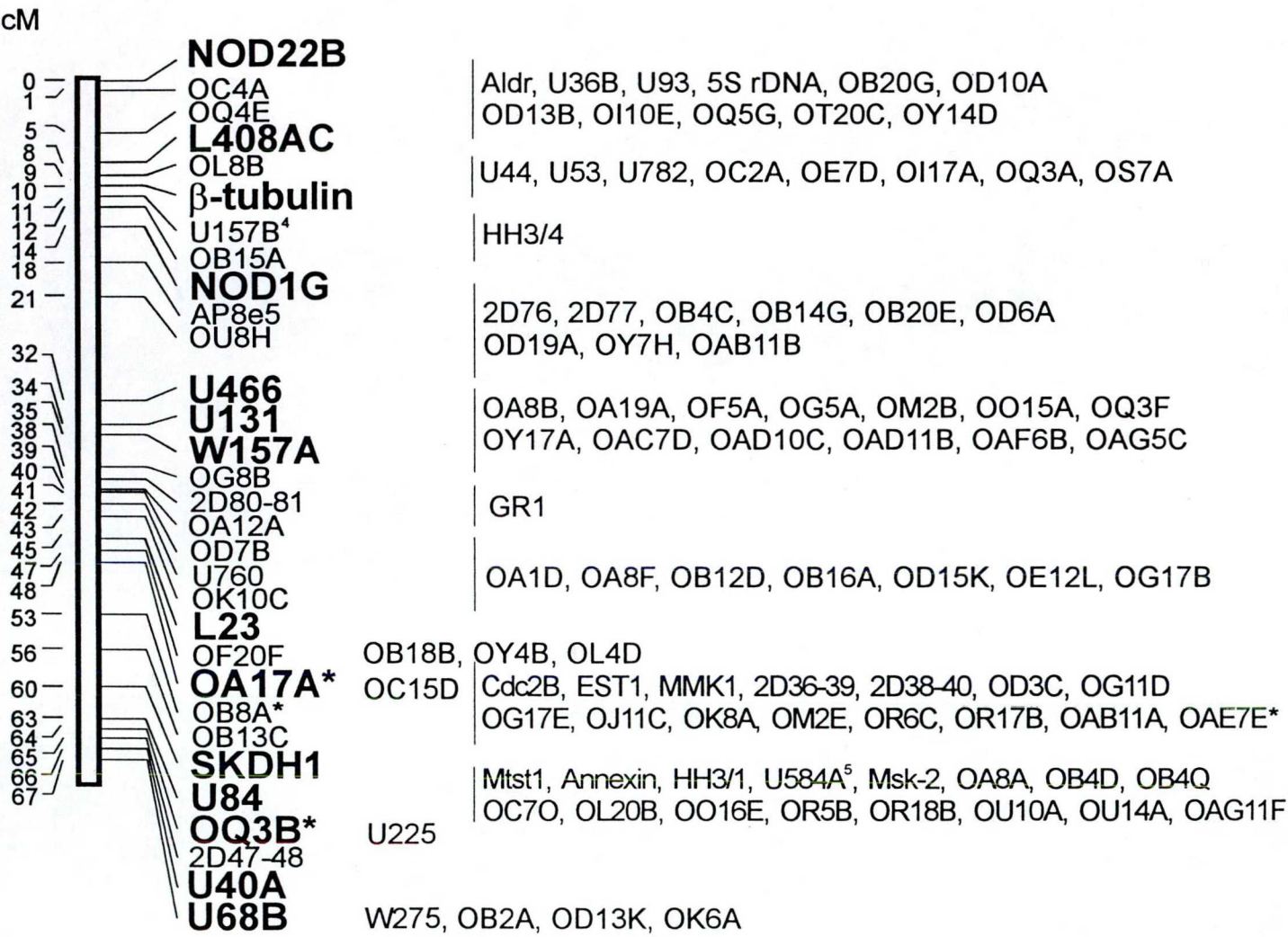
4/b. ábra.

LG 3



4/c. ábra.

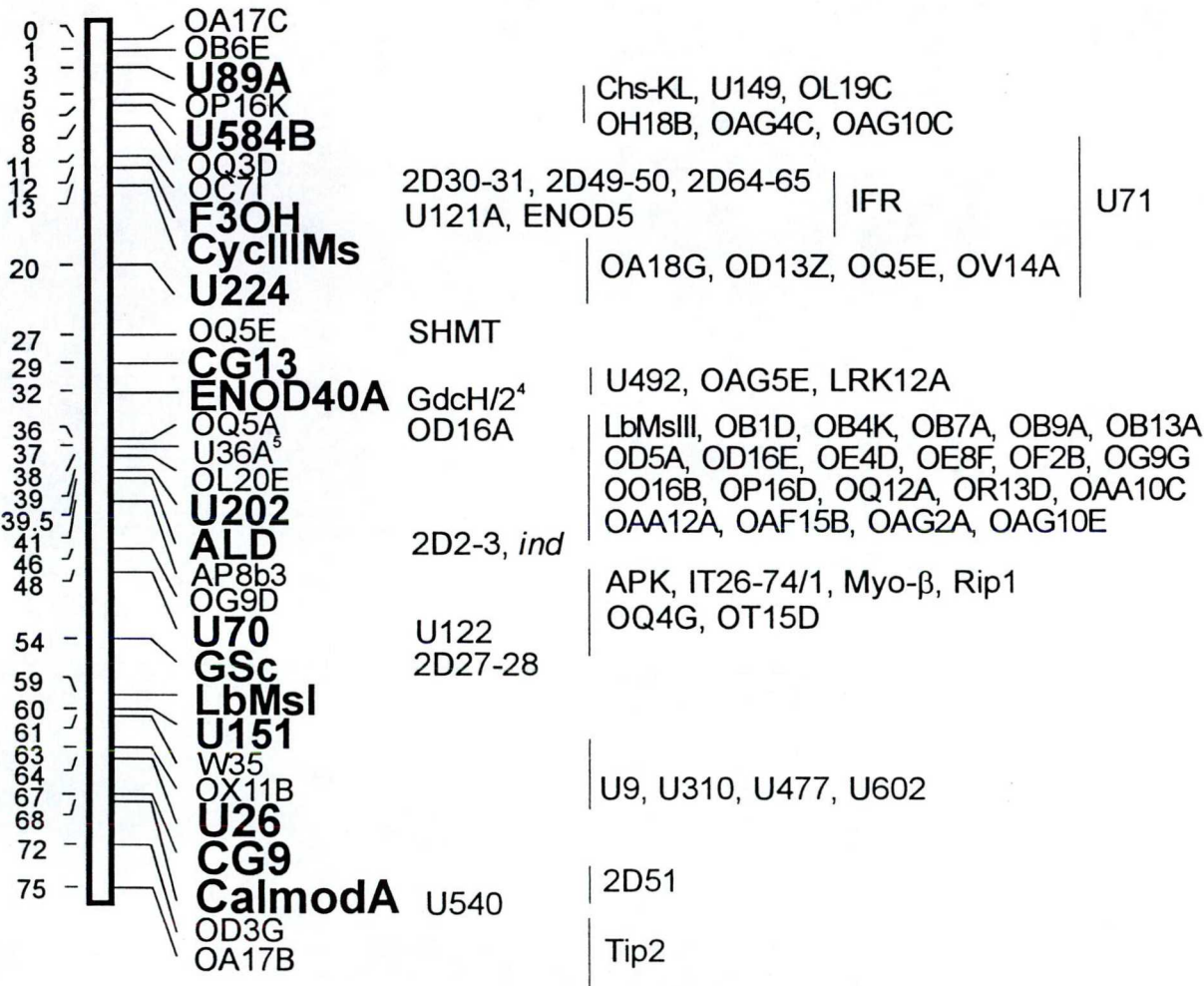
LG 4



4/d. ábra.

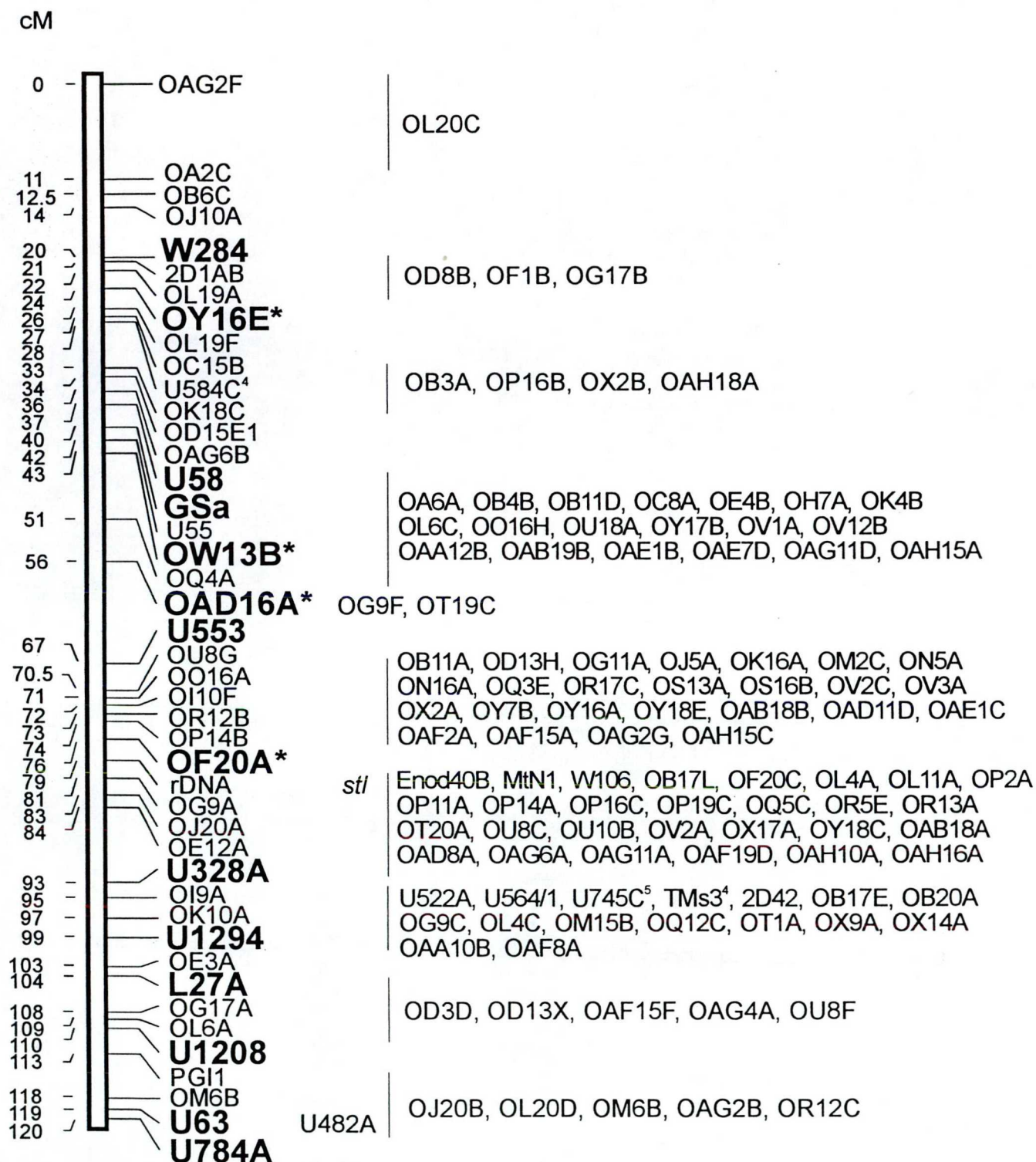
LG 5

cM



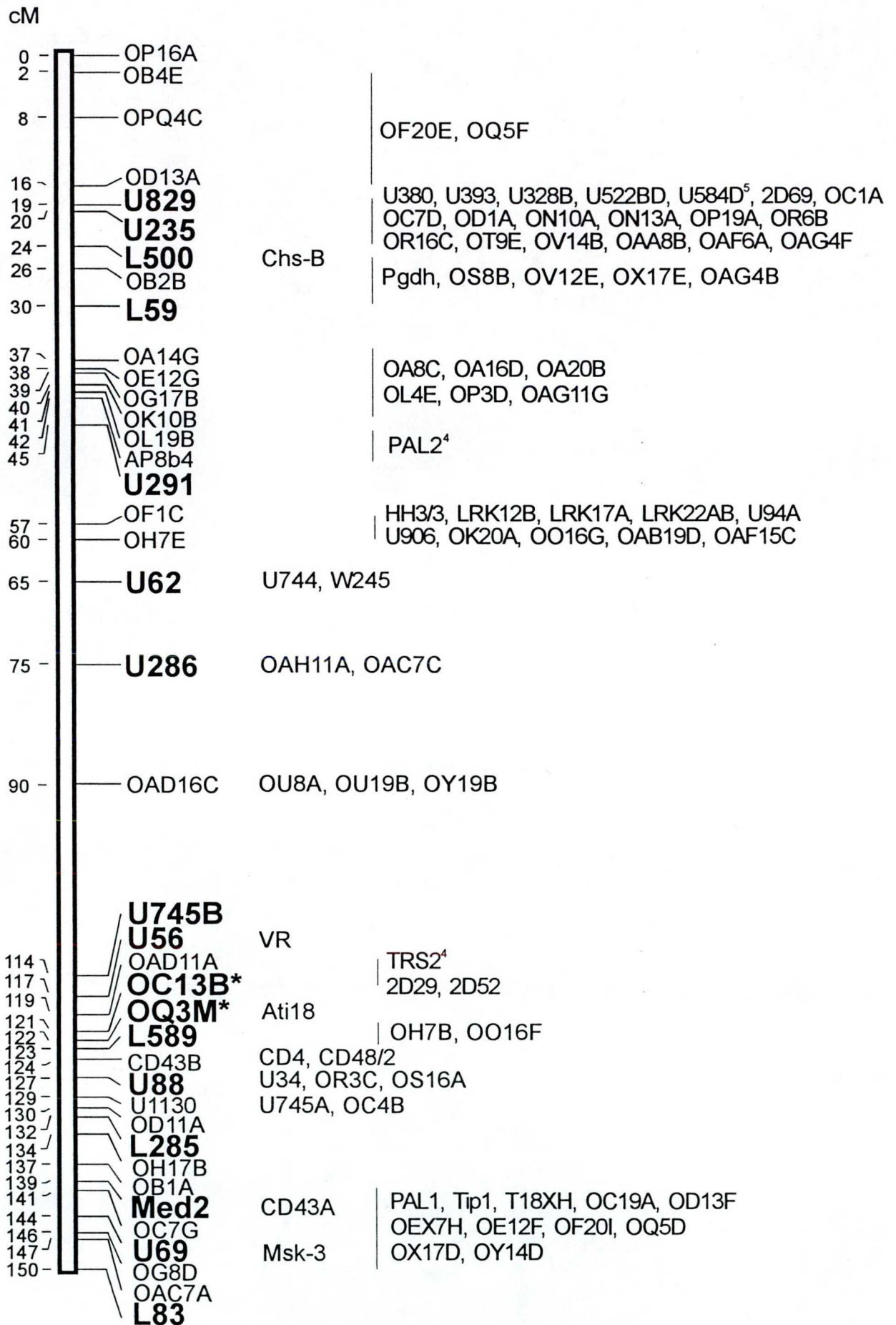
4/e. ábra.

LG 6



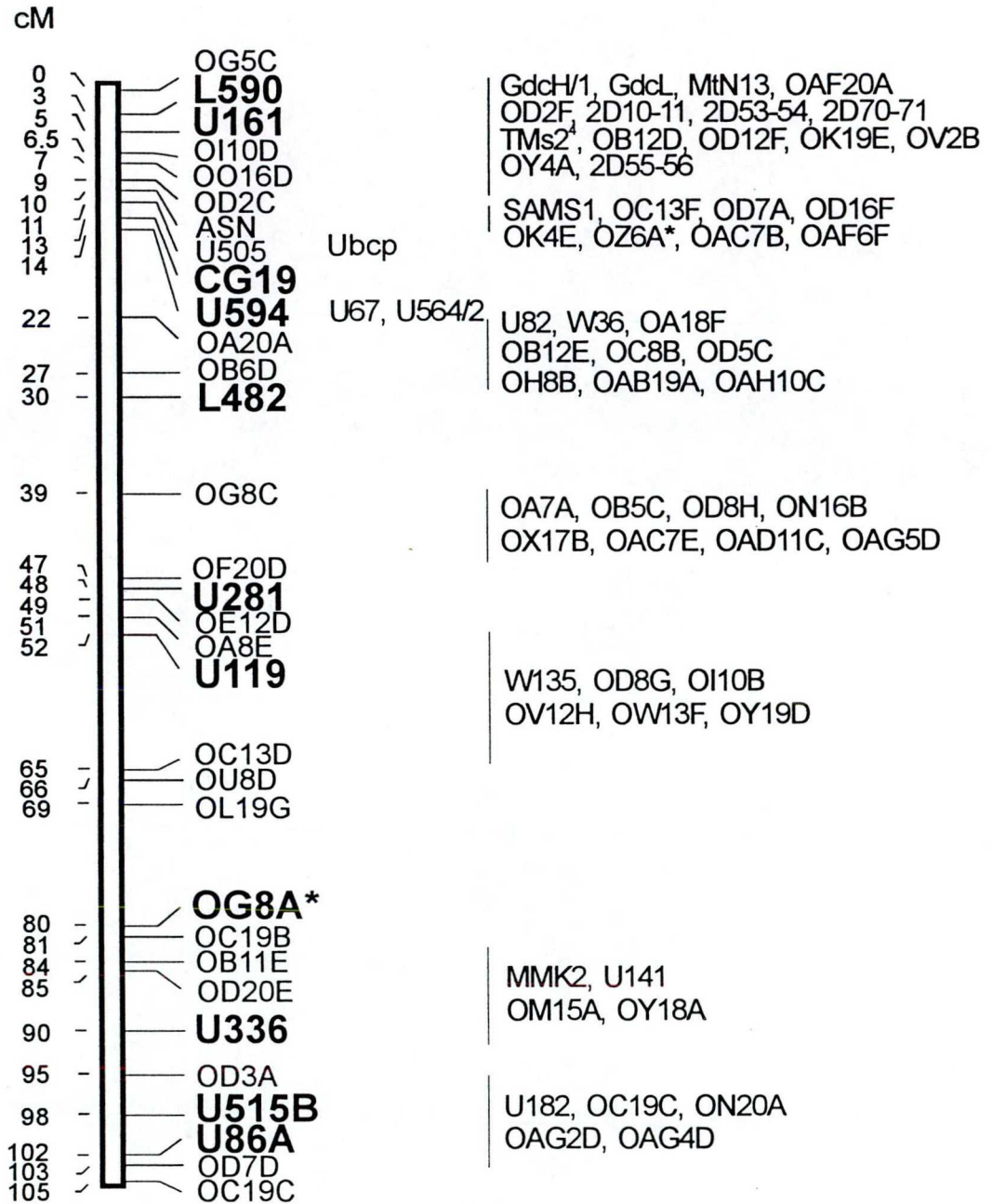
4/f. ábra.

LG 7



4/g. ábra.

LG 8



4/h. ábra.

6.5. A diploid lucerna genetikai térképének jellemzése

A megszerkesztett lucerna genetikai térkép 924 markert tartalmaz. Meghatároztuk egy rezisztencia, nyolc morfológiai, 269 RFLP (236 cDNS és 33 genomi DNS marker), 607 RAPD, 10 izoenzim, két SSCP módszerrel azonosított és kettő, kizárólag specifikus amplifikációval (5. táblázat) előállított marker térképhelyzetét. Mind RFLP-módszerrel, mind pedig specifikus amplifikációval sikerült polimorfizmust azonosítanunk a β -tubulin, ENOD40 és GSa markerek esetében. Magféhérje-preparátumokat kétdimenziós poliakrilamid-gélen elválasztva 26 magféhérjemarkert sikerült térképeznünk (Felföldi, nem közölt eredmény).

A nyolc kapcsoltsági csoportba szétosztott 924 genetikai marker 753 cM genetikai távolságot fed le. Az átlagos markersűrűség 0.8 marker/cM, és két marker között azonosított legnagyobb genetikai távolság 24 cM a hetes kapcsoltsági csoporton (LG 7) található OAD16C és U745B markerek esetében. A lucerna haploid genomméretét figyelembevéve - ami 750-1000 Mbp (Winicov és mtsai 1988, és Arumuganathan és Earle 1991) - kb. 1000-1300 kilobázis (kb) átlagos érték adódik egy cM genetikai távolságra. Ez természetesen egy átlagos érték, mely a genom különböző részein igen eltérő értékeket is jelenthet. Pontos meghatározása egy adott régióban fizikai térképezéssel végezhető el.

Az ismert funcióval vagy szekvenciával rendelkező 93 gént vagy morfológiai bélyeget, melyek 129 lókuszt azonosítanak a lucerna genomban, a 6. táblázatban tüntettük fel. Ezek között számos szimbiózisspecifikus vagy a szimbiotikus nitrogénkötés során a gümőben intenzíven kifejeződő gén található (Lb, ENOD és NOD gének, AAT, GS, Mtst, stb.).

Gén	Primer szekvencia	Hivatkozás	A polimorfizmus azonosításának módja	
			PCR	RFLP
GSa	5' GCACAAGGAGCACATTG 3'	Stanford és mtsai 1993	+	+
	5' ACCACTTGGACAATTACTAC 3'			
GSb	5' GCACAAGGAGCACATTG 3'	Stanford és mtsai 1993	—	+
	5' GAAACCTATAACAAGGCCTC 3'			
GSc	5' GCACAAGGAGCACATTG 3'	Stanford és mtsai 1993	+	—
	5' GCCCATAATTAAACATCATG 3'			
Calmodulin	5' GATTTCCCTGAATTCCTTAACCTGATG 3'	Barnett és Long 1990	—	+
	5' GAAGTACAAATGCATGGTGGGAC 3'			
Chi	5' GAGCACGCTGTTTCCCC 3'	McKhann és Hirsch 1994	—	+
	5' GAAATAGTACAAGAGTAGAAAGC 3'			
Chs	5' CAAAGGGCAGAAGGCC 3'	McKhann és Hirsch 1994	—	+
	5' TG GTAAGACCCGGTCC 3'			
Enod40	5' CAAACAGTTTGCTTTG 3'	Crespi és mtsai 1994	+	+
	5' CTAGAATACTCTTCAATTC 3'			
F3OH	5' GCT/ATGC/TGAG/AGAATGGGG 3'	Charrier és mtsai 1995	—	+
	5' GGTTTG/ATCT/AGGCCAC/TCCT 3'			
rDNA 18S-25S régió	5' ATGGTCCGGTGAAGTGTTG 3'	Sun és Skinner 1994	+	+
	5' CCCGGTTCGCTCGCCGTTAC 3'			
rDNA 5S régió	5' CTGCGGAGTTCTGATGGG 3'	Barciszewska és mtsai 1987	—	+
	5' GTTAAGCGTTCTTGGGCG 3'			
β-tubulin	5' GAAAACTGTGATTGCTTG 3'	Liaud és mtsai 1992	+	+
	5' TCCTCTCCATACTCATCC 3'			
AP8b12	5' GTCCTGTAAAGTTGTGATGA 3'	Kaló és mtsai	+	—
	5' TTAGAAACTTGGTGTCGGC 3'			

5. táblázat. Specifikus polimeráz-lánreakcióban (PCR) használt primerek szekvenciái.

A polimorfizmusok azonosítása a PCR-termékek restrikciós emésztés nélküli, vagy *HinfI* restrikciós enzimmel végzett emésztését (CAPs; Konieczny és Ausubel 1993) követően végzett gélelektroforézissel történt. Azokban az esetekben amikor nem sikerült ily módon polimorfizmust azonosítani, a PCR-termékeket próbaként használtuk DNS-DNS hibridizáció során (RFLP).

6. táblázat. Az ismert funkcióval vagy szekvenciával rendelkező térképezett markerek. A hivatkozás oszlopban *-gal jelölve feltüntettük azokat, akik rendelkezésünkre bocsátották az eddig nem közölt klónokat és szekvenciákat.

6. táblázat.

Lokusz	Marker típus	Gén termék/fenotípus	Lokuszok száma	LG	Hivatkozás
AAT1, 2	izoenzim, RFLP	aszpartát aminotranszferáz	2	3, 1	Kiss és mtsai 1993
ADH	RFLP	alkohol dehidrogenáz	1	3	Llewellyn és mtsai 1987
ALD	RFLP	aldoláz	1	5	Kiss és mtsai 1993
Aldr	RFLP	aldóz redukáz	1	4	Fehér A. *
Annexin	RFLP	annexin	1	4	Pirck és mtsai 1994
<i>ant</i>	morf.	antocianin pigment	1	1	Kiss és mtsai 1993
APK	RFLP	protein kináz	1	5	Kondorosi É. *
ASN	RFLP	aszparagináz	1	8	Lough és mtsai 1992
Ati18	RFLP	sebzés által indukált tripszin inhibitor	1	7	McGurl és mtsai 1995
Cad5A, B	RFLP	cinnamil alkohol dehidrogenáz	2	1, 2	Doorsselaere és mtsai 1995
CalmodA, B	RFLP, SSCP	kalmodulin	2	5, 3	Barnett és Long 1990
Cdc2A, B	RFLP	szerin/treonin kináz	2	2, 4	Hirt és mtsai 1993
CD32A, B	RFLP	B-típusú legumin (raktározó fehérje)	2	1, 3	Domoney és Casey 1985
CD4	RFLP	vicilin (raktározó fehérje)	1	7	Ellis és mtsai 1986
CD40	RFLP	B-típusú legumin (raktározó fehérje)	1	1	Domoney és Casey 1985
CD43A, B	RFLP	A-típusú legumin (raktározó fehérje)	1	7	Domoney és Casey 1985
CD48/1, 2, 3	RFLP	vicilin (raktározó fehérje)	3	3, 7, 3	Ellis és mtsai 1986
CHMT1	RFLP	izoliquiritigenin 2'-O-metiltranszferáz	1	1	Maxwell és mtsai 1993
Chi	RFLP	salkon izomeráz	1	1	McKhann és Hirsch 1994
Chs-a, b, kd	RFLP	salkon szintáz	3	1, 7, 5	McKhann és Hirsch 1994
CyclIMs	RFLP	mitotikus ciklin	1	5	Savouré és mtsai 1995
CycMs3	PCR	B-típusú ciklin	1	2	Meskiene és mtsai 1995
CycMs4	RFLP, SSCP	D-típusú ciklin	1	1	Dahl és mtsai 1995
DFR	RFLP	dihidroflavonol-4-reduktáz	1	1	Charrier és mtsai 1995
DOF1	RFLP	transzkripció faktor	1	2	Kondorosi É. *
<i>dw</i>	morf.	törpe fenotípus	1	2	Kiss és mtsai 1993
Enod2	RFLP	korai nodulin	1	1	Dickstein és mtsai 1988
Enod5	RFLP	korai nodulin	1	5	Scheres és mtsai 1990b
Enod8	RFLP	korai nodulin	1	1	Dickstein és mtsai 1993
Enod10	RFLP	korai nodulin	1	3	Löbner és Hirsch 1993
Enod12	RFLP, PCR	korai nodulin	1	3	Kiss és mtsai 1993 és Csanádi és mtsai 1994
Enod40A, B	RFLP, PCR	korai nodulin	1	5, 6	Crespi és mtsai 1994
EST1, 2, 3	izoenzim	észteráz	3	4, 1, 2	Kiss és mtsai 1993
F3OH	RFLP	flavanon-3 β -hidroxiláz	1	5	Charrier és mtsai 1995
GdcH/1, 2, 3	RFLP	glicin dekarboxiláz H alegység	3	8, 5, 2	Macherel és mtsai 1990
GdcL	RFLP	glicin dekarboxiláz L alegység	1	8	Turner és mtsai 1992b
GdcP	RFLP	glicin dekarboxiláz P alegység	1	2	Turner és mtsai 1992a
GdcT	RFLP	glicin dekarboxiláz T alegység	1	2	Turner és mtsai 1993
Gogat	RFLP	glutamát szintáz	1	1	Gregerson és mtsai 1993
GSa, b, c	RFLP, PCR	glutamin szintetáz	3	6, 3, 5	Kiss és mtsai 1993 Kaló és mtsai
HH3/1, 3, 4	RFLP	hiszton H3	3	4, 7, 4	Wu és mtsai 1989
Hsp70Ms1	RFLP	hősokk fehérje 70	1	2	Kondorosi É. *
IFR	RFLP	izoflavon redukáz	1	5	Kondorosi É. *
<i>ind</i>	morf.	indigókék pigment	1	5	ez a dolgozat
LAP1, 2	izoenzim	leucin aminopeptidáz	2	3, 3	Kiss és mtsai 1993
LbMsl, II, III	RFLP, PCR	leghemoglobin	3	5, 1, 5	Davidowitz és mtsai 1991 és Kiss és mtsai 1993
LRK12A, B	RFLP	lektin receptor kináz	2	5, 7	J. Cullimore *
LRK17A, B	RFLP	lektin receptor kináz	2	7, 1	J. Cullimore *
LRK22AB, C	RFLP	lektin receptor kináz	2	7, 1	J. Cullimore *

6. táblázat. (folyt.)

Lokusz	Marker típus	Gén termék/fenotípus	Lokuszok száma	LG	Hivatkozás
L34	RFLP	prolin gazdag fehérje	1	3	Györgyey J. *
Med1,2	2D-PAGE	63-65 és 60 kD medikagin	2	1, 7	Felföldi K., nem közölt eredmény
MePPDC	RFLP	mevalonát pirofoszfát dekarboxiláz	1	1	Kondorosi É. *
MMK1, 2	RFLP	mitogén aktivált protein (MAP) kináz	2	4, 8	Jonak és mtsai 1993
MNR1	izoenzim	menadion reduktáz	1	2	Kaló és mtsai
MsK-1, 2, 3	RFLP	szerin/treonin kináz	3	1, 4, 7	Páy és mtsai 1993
MsRab1	RFLP	kis GTP-kötő protein	1	2	Jonak és mtsai 1995
MsZnf	RFLP	Zn-finger protein	1	3	Kondorosi É. *
MtN1	RFLP	nodulin	1	6	Gamas és mtsai 1998
MtN13	RFLP	nodulin	1	8	Gamas és mtsai 1998
Mtst1	RFLP	hexóz transzporter	1	4	Harrison 1996
Myo-β	SSCP	miozin β lánc	1	5	Kondorosi É. *
NMs25	RFLP, PCR	késői nodulin	1	3	Kiss és mtsai 1993
Nod1G	RFLP	nodulin	1	4	Dickstein és mtsai 1991
Nod6G	RFLP	nodulin	1	1	Dickstein és mtsai 1991
Nod14	RFLP	nodulin	1	1	Dunn és mtsai 1988
Nod22A, B	RFLP	nodulin	2	2, 4	Dunn és mtsai 1988
Nod32/34	RFLP	nodulin	1	3	Dunn és mtsai 1988
PAL1, 2	RFLP	fenilalanin ammónia liáz	2	7, 7	Gowri és mtsai 1991
pc	morf.	hüvelytermés színe	1	3	ez a dolgozat
PEPC	RFLP	foszfoenolpiruvát karboxiláz	1	2	Kiss és mtsai 1993
PGDH	RFLP	6-foszoglukonát dehidrogenáz	1	7	Fahrendorf és mtsai 1995
PGI1	izoenzim	foszoglukóz izomeráz	1	6	Kaló és mtsai
pmr	morf.	lisztharmat rezisztencia	1	2	ez a dolgozat
PRX	izoenzim	peroxidáz	1	2	Kiss és mtsai 1993
ps	morf.	hüvelytermés alakja	1	1	ez a dolgozat
rDNA	RFLP	riboszómális RNS (NOR)	1	6	Kaló és mtsai
RHF38	RFLP	gyökérször faktor	1	2	Kondorosi Á. *
Rip1	RFLP	<i>Rhizobium</i> által indukált peroxidáz	1	5	Cook és mtsai 1995
5S rDNA	RFLP	5S riboszómális RNS	1	4	Kaló és mtsai
SAMS1, 2	RFLP	S-adenozilmetionin szintáz	1	8, 2	Kondorosi É. *
SHMT	RFLP	szerin hidroximetil transzferáz	1	5	Turner és mtsai 1992c
SKDH1, 2	izoenzim	sikimát dehidrogenáz	2	4, 1	Kiss és mtsai 1993
stl	morf.	ragadós levél fenotípus	1	6	Kiss és mtsai 1993
Tip1, 2	RFLP	tonoplaszt fehérje/hősokk fehérje 80	1, 1	7, 5	Kondorosi É. *
TMs1,2,3,6,7-8	RFLP	retrotranszpozonszerű szekvencia	5	3, 8, 6, 2, 2	Kiss és mtsai 1993
TRS1,2	RFLP	telomérszerű szekvencia	2	1, 7	Kiss és mtsai 1981
β-tubulin	RFLP, PCR	β-tubulin	1	4	Kaló és mtsai
Ubcp	RFLP	ubiquitin hordozó protein	1	8	Pramanik és Bewley 1993
VR	RFLP	vesztiton reduktáz	1	7	Guo és Paiva 1995
Wip	RFLP	sebzés által indukált protein	1	2	Bögre L. *
xant	morf.	xantofill pigment	1	1	Kiss és mtsai 1993
12583	RFLP	peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	1	1	Domoney és mtsai 1991
60Sribp	RFLP	60S ribosomál protein	1	3	Kondorosi É. *

A térképezett ismert és ismeretlen funkciójú gének közül számos nem csak egy lókuszban, hanem kettő, három, esetleg négy lókuszban volt térképezhető a diploid lucerna genomjában. A legújabb eredmények szerint a növényi genomokban sok fehérjét nem egy, hanem több gén is kódol (pl. riboszomális fehérjék génjei; Cooke és mtsai 1997). Egy kódoló szekvenciával végzett térképezés (RFLP) során gyakran azonosítottak több lókuszt a genomban, a géncsaládok tagjait viszont csak az egyes génekre jellemző, nem kódoló szekvenciával lehetett kimutatni. A diploid lucernában a 279 térképezett RFLP és izoenzim markerből 86 (31%) térképeződött egynél több helyre a genomban. 24 DNS marker (gén vagy ismert szekvencia; CAD5, Calmod, CD32, CDC2, L27, L408, LRK12, LRK17, LRK22, MED, MMK, NOD22, PAL, SAMS, TRS, U36, U40, U52, U68, U157, U328, U457, U515, U564) és három izoenzim marker (AAT, LAP, SKDH) térképeződött két lókuszban, tíz gén (CD48, Chs, GdcH, HH3, GS, EST, leghemoglobin, Msk, U522 és U745) pedig három lókuszban. Két cDNS klón (U584 és U212) azonosított négy lókuszt a genomban, melyek érdekes módon egyenlőtlen géneloszlást mutattak. Az U584 cDNS klón által azonosított markerek közül egy kodomináns markerként (U584B), a másik három pedig domináns markerként öröklődött. Az U584C marker a Mcw2 szülőből, míg az U584A és U584D markerek az Mqk93 szülőből öröklődtek. Az U212 klón esetében két kodomináns kiértékelésű markert (U212A és U212D), egy Mcw2 szülőből származó (U212C) és egy Mqk93 szülőből származó (U212B) markert azonosítottunk. Az ilyen típusú egyenlőtlen géneloszlás jó példa a két szülői genom eltérő evolúciós fejlődésére. A két cDNS klón egy-egy géncsalád tagjait azonosítja a lucernagenom több pontján. Feltételezhetjük, hogy a géncsalád megfelelő tagjai ugyanabban a lókuszban helyezkedtek el az ősi diploid lucerna növényben, majd a két diploid lucernaalfaj evolúciós szétválása után valószínűleg az egyik alfajban az egyik allél áthelyeződött egy másik kromoszómára. Az U584 cDNS marker esetében a transzlokáción kívül egy duplikációs vagy egy deléciós eseménynek is le kellett játszódnia az egyik alfajban, hogy létrejöjjön a megfigyelt megoszlás. A transzlokáció

valószínűleg nem érintett nagy DNS-régiót, mert egyik egyenlőtlen géneloszlást mutató marker környezetében sem találtunk hasonló egyenlőtlen géneloszlást mutató lókuszt.

A *Tetrahymena thermophila* extrakromoszomális riboszomális DNS-ének telomerszekvenciáját (Kiss és mtsai 1981) hibridizációs próbaként használva két telomerszerű szekvencia helyzetét (TRS1 és TRS2) tudtuk azonosítani a lucerna kapcsoltsági csoportjain (LG1 és LG 7). Ezek egyike sem a kapcsoltsági csoportok végein helyezkedett el, hanem a kromoszóma közbenső régióiban azonosított telomerszerű szekvenciákat. Közbenső kromoszomális régiókban, a centromerhez közel elhelyezkedő telomerszekvenciák jelenlétét mutatták ki paradicsomban a közelmúltban genetikai térképezéssel (Presting és mtsai 1996).

Két olyan nagykópiaszámú gén helyét is meghatároztuk a genetikai térképen, melyeket korábban már citológiaiilag lokalizáltak. Az egyik ilyen marker az eukarióta genomokban többes nagyságrendben, és tandem elrendeződésben (Vedel és Delseny 1987 és Dean és Schmidt 1995) található riboszomális RNS gének (rDNS) voltak, melyek a hatos kapcsoltsági csoportra (LG 6) térképeződtek. A riboszomális RNS-gének alkotják az eukariótákban a nukleolusz szervező régiót (NOR), amit már korábban citológiaiilag azonosítottak a lucerna nyolcas kromoszómáján (McCoy és Bingham 1988; Baughan és Campbell 1994; Falistocco és mtsai 1995). A térképezési adat alapján az általunk azonosított hatos kapcsoltsági csoport (LG 6) megfeleltethető a lucerna nyolcas kromoszómájának. A négyes kapcsoltsági csoportra (LG 4) térképeződtek a β -tubulin gének, amely így az *in situ* hibridizációs kísérletek alapján megfelel a lucerna egy kis metacentrikus vagy szubmetacentrikus kromoszómájának (Schaff és mtsai 1990).

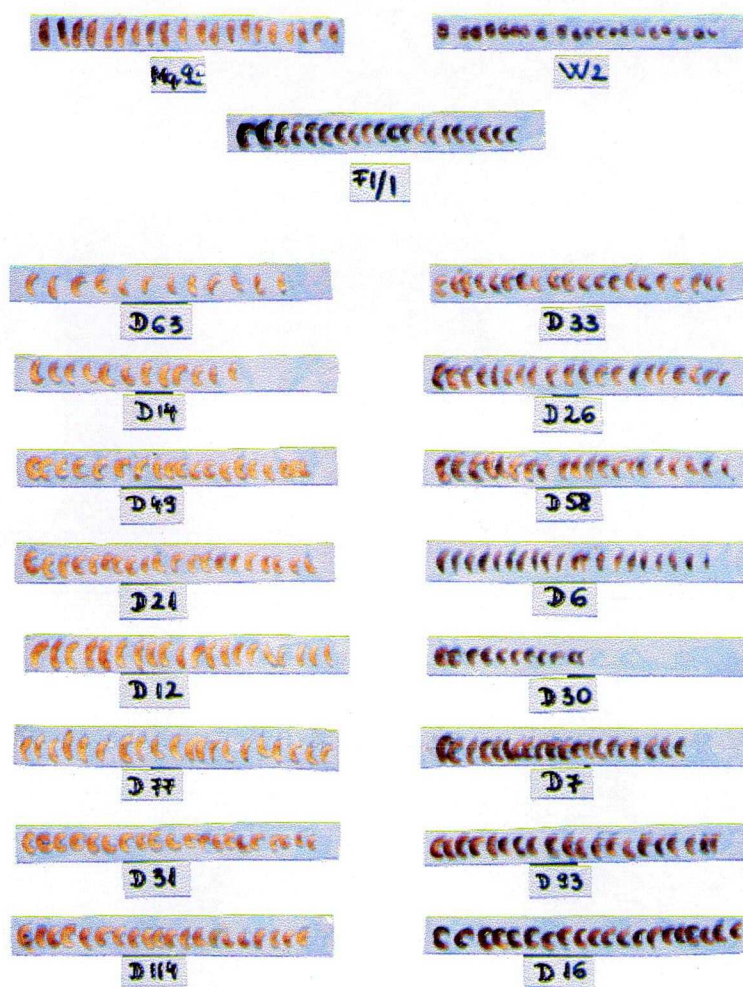
A genetikai térképezés alapján kiderült, hogy néhány, feltehetően hasonló funkcióval rendelkező gén egymáshoz közel, csoportosan helyezkedik el a lucerna kapcsoltsági csoportjain. Korábbi térképezési adataink alapján (Kiss és mtsai 1993, Csanádi és mtsai 1994) a lucerna ENOD12A és B génje a hármass kapcsoltsági csoport (LG 3) alsó részén helyezkedik el, a két gén között nem találtunk rekombinációt a térképező populáció egyedeiben. A szegregáló

populációban azonban azonosítottunk olyan egyedeket, melyek nem tartalmazták sem ENOD12A, sem a B gént, és így az ENOD12 géneket domináns markerként tudtuk térképezni (Csanádi és mtsai 1994). Az ENOD12 génhez hasonlóan prolingazdag fehérjét kódoló ENOD10 (Löbner és mtsai 1993) és L34 (Györgyey János hozzájárulásával) gének az ENOD12 génhez közel térképeződtek, közöttük rekombinációt nem tudtunk kimutatni. Az ENOD10 és L34 gének hibridizációs mintázata egymástól különbözött, tehát biztosan nem ugyanazokat a lokuszokat azonosították a lucerna genomban. Az ENOD12 szekvenciát nem tartalmazó növényekben viszont a hibridizációs kísérletek szerint mind az ENOD10, mind a L34 szekvencia jelen volt. Mivel a gének között rekombinációt nem tudtunk kimutatni, ezért ezek feltételezhetően egymáshoz közel helyezkednek el, de az ENOD12 gén hiányát okozó deléciós esemény az ENOD10 és L34 géneket nem érintette.

A szimbiotikus nitrogénkötés korai szakaszában kifejeződő két gén, az ENOD8 és az ENOD2 (Dickstein és mtsai 1988 és 1993) is rekombináció nélkül térképeződött egymás mellé az LG 1-en. A szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő gének ehhez hasonló csoportosulását már megfigyelték a borsó genomban (Weeden és mtsai 1990, Kozik és mtsai 1996). A J. Cullimore által rendelkezésünkre bocsátott LRK12, LRK17 és LRK22 klónok segítségével azonosított lektin receptor kinázgének szintén csoportokba rendeződve találhatók az LG7-en és LG 1-en.

A szegregáló populáció egyedeinek önmegtermékenyítéséből származó hüvelytermések (csigák) alakját és színét kiértékelve meghatároztuk az ezen tulajdonságok kialakításáért felelős gének térképhelyzetét. Ahogyan az irodalmi áttekintés 2.1.1. fejezetében említettem, a *falcata/quasifalcata* alfajra az egyenes, a *coerulea* alfajra pedig a sarló alakú hüvelytermésforma a jellemző. A térképező populáció egyedeinél is megfigyeltünk egyértelműen egyenes (anyai homozigóta), vagy különböző mértékben görbült és félhold alakú (heterozigóta vagy apai homozigóta állapot) hüvelyterméseket (5. ábra). Az egyenes csigaalak tehát recesszív monogénis öröklődésű volt, és az ezt a tulajdonságot meghatározó lokuszt (*ps*) az egyes

kapcsoltsági csoportra (LG 1) tudtuk térképezni. A hüvelytermések színében lévő különbségek (5. ábra) (az anyai homozigóták termése sárgás, világosbarna színű volt) alapján a harmadik kapcsoltsági csoporton (LG 3) azonosítottuk a csigák világos színét meghatározó lókuszt (*pc*), monogénes recesszív módon öröklődő tulajdonságként.



5. ábra. A szülői egyedek és a szegregáló populáció néhány tagjának önmegtermékenyítéséből származó hüvelytermései (csigái).

A csigák alakját és színét meghatározó lókuszek egygénesen öröklődtek. Az egyenes csiga anyai homozigóta (pl. D6, D12), a különböző mértékben görbült és félhold alakú csiga pedig a heterozigóta vagy apai homozigóta genotípus következménye (pl. D16, D31, D114). A hüvelytermés színét meghatározó lókuszt anyai homozigóta állapota esetén a csiga világos színű (bal oldali oszlop), heterozigóta vagy apai homozigóta-állapot esetén pedig sötétbarna színű (jobb oldali oszlop).

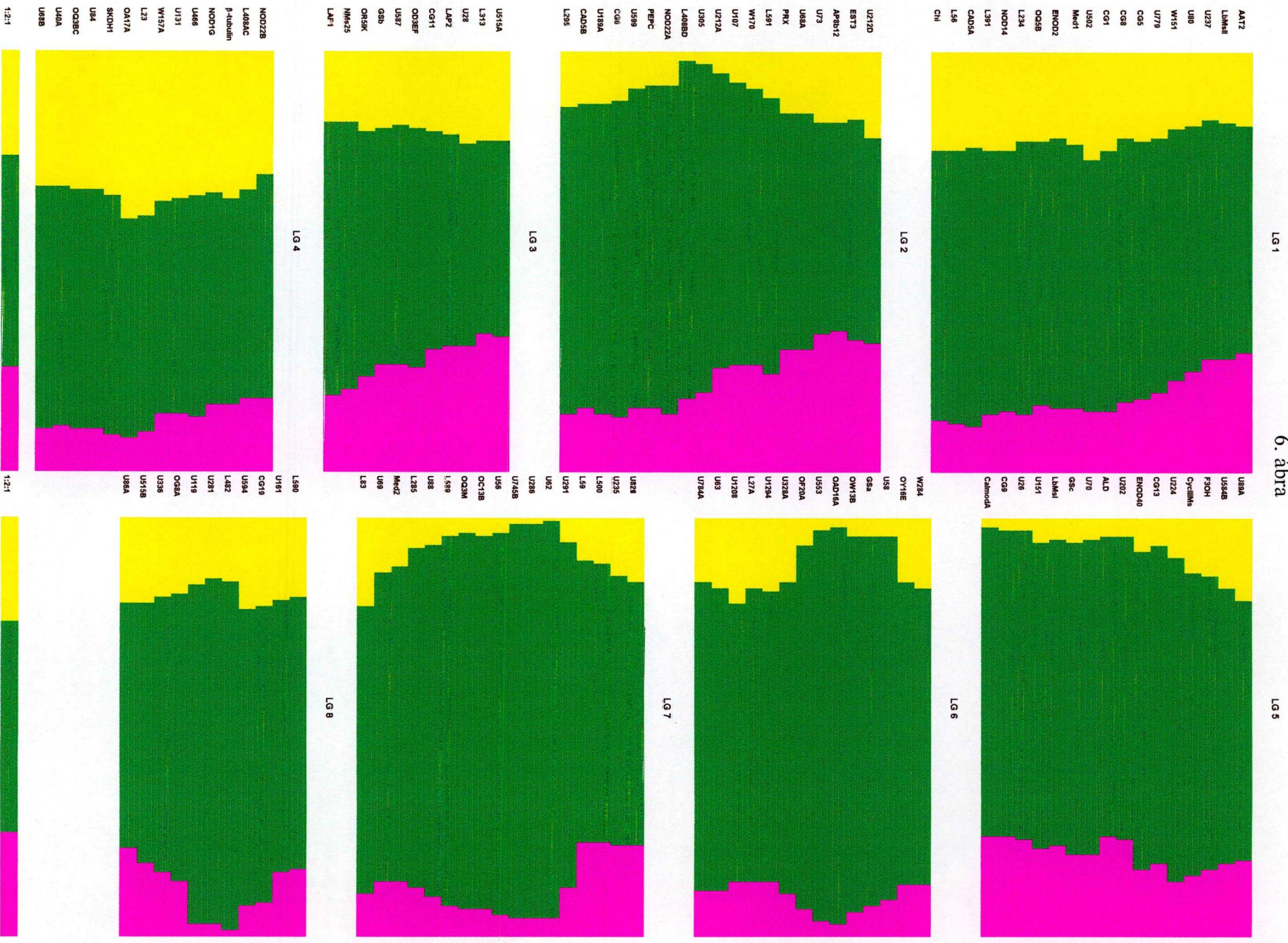
A térképező populáció egyedeinek lisztharmat-érzékenységét Dr. Nagy Béla, a GATE Kompolti Mezőgazdasági Kutatóintézetének tudományos főmunkatársa határozta meg. Az egyedek egy része rezisztens volt a lisztharmat (*Erysiphe graminis*) gombafertőzéssel szemben, és a rezisztens és szenzitív növények meghatározása után a térképezés azt a meglepő eredményt szolgáltatva, hogy a lucerna lisztharmattal szembeni rezisztenciájáért felelős genetikai lókuszt a második kromoszóma alján helyezkedik el, a L295 cDNS közelében (*pmr* lókuszt). A rezisztencia recesszív módon öröklődött, ami azt jelentette, hogy az anyai homozigóta és heterozigóta egyedek érzékenyek voltak a gombafertőzésre, csak az apai homozigóta egyedek voltak rezisztensek a lisztharmattal szemben. A rezisztencia recesszív módon történő öröklődése különösnek tűnt, de az irodalomban már ismertek voltak olyan eredmények, melyek szintén recesszíven öröklődő rezisztenciáról számoltak be. A növényi patogén gombákat ugyanis két fő csoportba lehet osztani életstratégiájuk alapján (Pryor 1987). A biotróf típusúak (1) a fertőzött növényi sejtet életben hagyják, annak csak az anyagcseréjét zavarják meg úgy, hogy az a patogén gomba növekedésének és szaporodásának kedvezzen. A patogén – gazdanövény kölcsönhatás az ilyen típusú fertőzéseknél egy finoman kiegyensúlyozott folyamat, és így a rezisztencia is két, egymást kiegészítő géntermék specifikus kapcsolatán alapul. A folyamat során a növény rezisztenciájáért felelős gén által termelt termék felimeri a patogén kórokozó ún. „avirulens” génje által közvetlenül vagy közvetetten termelt ligandot (gén - gén kölcsönhatás; Pryor 1987 és Staskawicz és Tsai 1995), amelynek következtében védekezési reakciók sorozata indukálódik a növényben. A biotróf típusú kölcsönhatások esetében megfigyelhető rezisztencia általában dominánsan öröklődő tulajdonság. A nekrotróf típusú (2) fertőzés esetén a kórokozó gomba toxinjaival elpusztítja, majd metabolizálja a fertőzött növényi sejtet. A növény gomba elleni rezisztenciája ezekben az esetekben a kórokozó támadási pontjának megváltozásával vagy elvesztésével valósul meg, azaz a rezisztencia genetikailag egy recesszíven öröklődő tulajdonságként jelenik meg. A nekrotróf gombák általában a növények széles skáláját képesek fertőzni, és a kialakult rezisztencia az esetek nagy részében sokféle patogén gomba ellen nyújt

védelmet. Recesszíven öröklődő nekrotróf típusú gombafertőzés elleni rezisztenciát írtak már le *Arabidopsis*-ban (Dietrich és mtsai 1994), valamint lisztharmatfertőzéssel szembeni, szintén recesszíven öröklődő rezisztenciát közöltek árpaival végzett kísérleteket követően (Hinze és mtsai 1991, Jorgensen 1992, Schönfeld és mtsai 1996). Ezek közül az egyik esetben térképezésen alapuló génizolálással már azonosították is a rezisztenciáért felelős gént (Büschges és mtsai 1997). A gén szekvenciája alapján nagyfokú hasonlóságot találtak egyéb rizs és *Arabidopsis* fajokból azonosított EST (expressed sequenced tags) klónokhoz, a levezetett aminosavszekvencia azonban semmilyen eddig ismert fehérjéhez sem mutatott szembeszökő homológiát. A feltételezett fehérjében megfigyelt hat hidrofób tulajdonságú szakasz alapján azonban valószínűleg egy, a sejtmembránban elhelyezkedő fehérjéről van szó.

6.6. A torzult szegregációs arány okainak vizsgálata

A markerek kapcsoltsági viszonyainak meghatározásánál jó néhány marker esetében lényeges zavaró tényező volt a genotípusok jelentős eltérése a mendeli szegregációs arányoktól. Elméletileg a genotípusoknak 1:2:1 arányban kellett volna szegregálniuk kodomináns, és 3:1 arányban domináns markerek esetében. Az 1. táblázatban jól megfigyelhető, hogy a 121 vázmarker jelentős részénél (63%) a genotípusok aránya szignifikánsan eltért az elméletileg várt szegregálási aránytól. A kapcsoltsági csoportok mentén haladva a torzult és a normális szegregációs eloszlású markereket tartalmazó régiók között az átmenet fokozatos volt, ami a 6. ábrán a genotípusok arányának színekkel történő ábrázolásnál is jól megfigyelhető. Az esetek nagy részében a homozigóta genotípusok voltak „alul képviselve”, az 1:2:1 arány a heterozigóta genotípusok nagyobb aránya felé tolódott el. Ez a jelenség jellegzetes tulajdonsága az olyan idegenbeporzó növényeknek, mint amilyen a lucerna is. A heterozigóta génösszeállítás (konfiguráció) az életképesség szempontjából sokkal előnyösebb, mint a homozigóta.

6. ábra

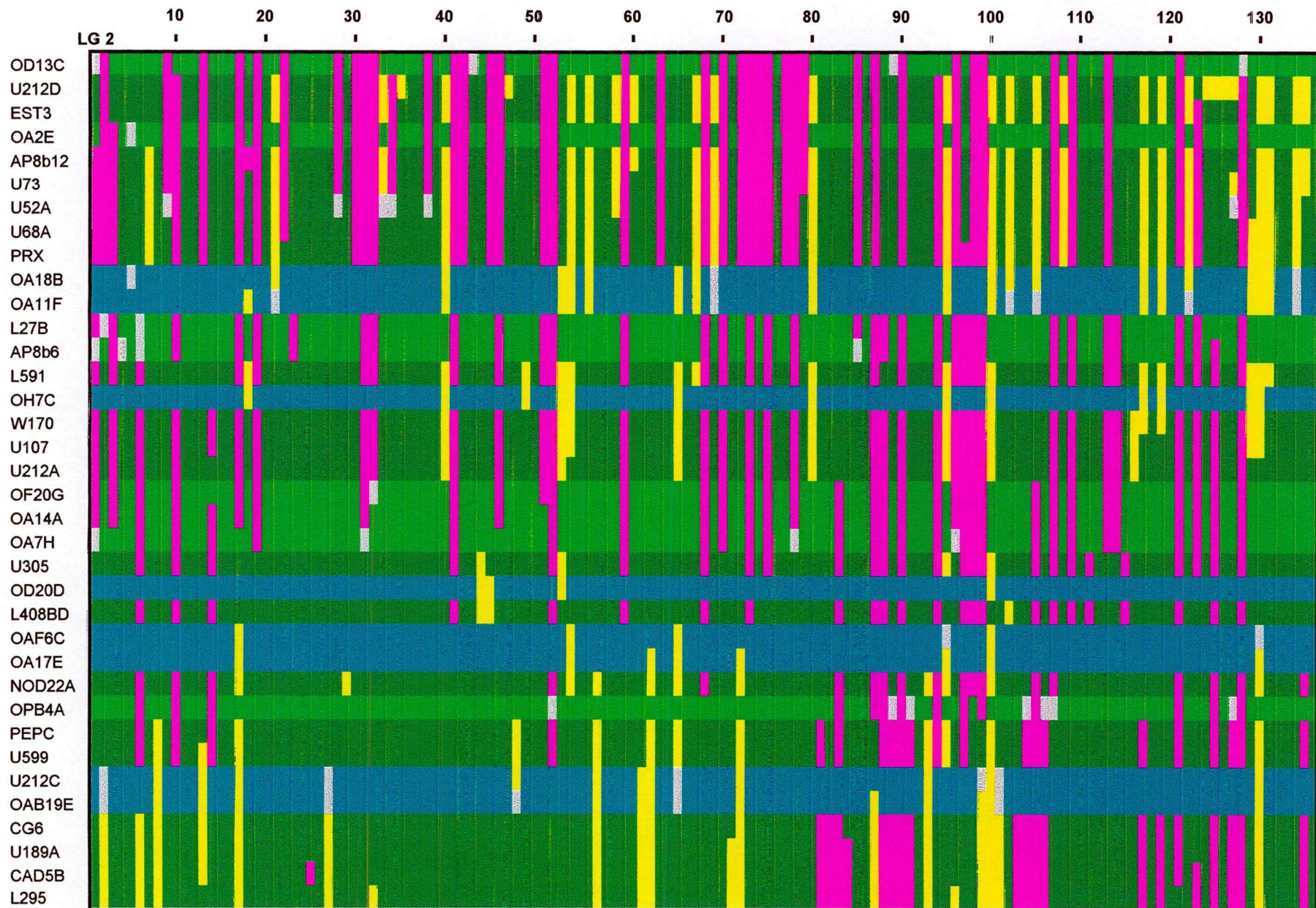


6. ábra. A nyolc kapcsoltsági csoport vázmarkereinek genotípusaránya. Az egyes genotípusokat színekkel kódoltuk, a sárga az anyai homozigóta, zöld a heterozigóta, az ibolya szín pedig az apai homozigóta egyedek számát jelöli. Az ábra alján a kodomináns kiértékelésű markerek esetén várt elméleti 1:2:1 szegregációs arányt tüntettük fel.

Néhány esetben a két homozigóta genotípusosztály 1:1 aránya is eltolódott valamelyik genotípus irányába, mint ahogy a LG 2, LG 4 és LG 5 markereinél ez jól megfigyelhető (1. táblázat és 6. ábra). Ez azt jelzi, hogy az adott régióban valamely gén(ek) homozigóta állapotának következményeként az egyik gaméta életképessége csökkent. Egy esetben sem tapasztaltuk a kodomináns markerek esetében valamelyik homozigóta genotípus teljes hiányát, ami egy letális lókuszt jelenléte utalt volna. A diploid lucerna színtérképének vizsgálata során felfigyeltünk azonban egy olyan, az L408BD RFLP marker és OAF6C RAPD marker közötti régióra a kettes kapcsoltsági csoporton (LG 2), amelyen nem halad keresztül anyai (Mqk93) homozigóta kromoszomális szakasz (7. ábra). Egy letális lókuszt jelenlétét feltételezhetjük a két marker között, amit azonban csak egy olyan marker térképezésével tudnánk bizonyítani, amely az L408BD RFLP és OAF6C RAPD markerek közé térképeződne, és egyetlen anyai homozigóta genotípust sem találnánk erre a markerre. Erre a jelenségre a hagyományos genetikai térképezés esetében nem figyeltünk volna fel, a színtérkép viszont lehetőséget biztosított a genetikai térkép ilyen jellegű boncolgatására is.

7. ábra. Egy feltételezett letális lókuszt térképezése a színtérkép segítségével.

A színtérképen a LG 2 kapcsoltsági csoport vázmarkereinek a térképező populáció 137 növényére meghatározott genotípusait tüntettük fel színekkel kódolva. A sárga, a zöld és ibolya színek az anyai homozigóta, heterozigóta és apai homozigóta genotípusokat, a világoszöld a nem apai homozigóta, az acélszürke szín pedig a nem anyai homozigóta genotípusokat jelöli. A színtérkép tetején a szegregáló populáció egyedeinek sorszáma látható, a jobboldali nyíl a feltételezett letális lókuszt helyét jelöli a L408BD RFLP és OAF6C RAPD markerek között.



A torzult szegregáció oka pontosan nem ismert, de feltételezések szerint a növény egyedfejlődése során ható különböző, az életképességet befolyásoló géntermékek, illetve azok kölcsönhatásai okozhatják (Gebhardt és mtsai 1991, Bentolila és mtsai 1992, Pillen és mtsai 1993, Cloutier és mtsai 1995). Annak kiderítésére, hogy a megfigyelt torzult szegregáció a nem elégséges számú mintavétel következménye-e, megnöveltük az F_2 populációt további kifejlett, egészséges egyedekkel. Ezeknél a növényeknél megvizsgáltuk öt olyan kodomináns kiértékelésű RAPD marker genotípusainak szegregációs arányát (7. táblázat), melyek az eredeti 137 növényt tartalmazó térképező populáció esetében a legtorzultabb szegregációs arányt mutatták. Azt tapasztaltuk, hogy a torzult szegregációs arány megmaradt (GSa és OQ3M markerek), vagy pedig még kifejezettebbé vált (OW13B, OAD16A és OF20A markerek). A jelenség talán azzal magyarázható, hogy bár a megnövelt egyedszámú populáció felnevelése során igyekeztünk hasonló környezeti feltételeket biztosítani, mint az eredeti populáció létrehozásakor, azonban néhány üvegházi körülmény esetleg erősebb szelekciót fejthetett ki a homozigóta genotípusokra, mint előzőleg. Mindenesetre az adatokból valószínűnek látszott, hogy nem az elégtelen méretű szegregáló populáció az oka a markereknél tapasztalt torzult szegregációs aránynak.

Annak eldöntésére, hogy a növény egyedfejlődésének mely szakaszaiban következik be a homozigóta genotípusú egyedek szelekciója, további F_2 egyedeket vizsgáltunk különböző fejlettségi állapotban (7. táblázat). Az eredeti és a megnövelt egyedszámú térképező populáció előállításánál is azt tapasztaltuk, hogy a magok kb. 10%-a nem csírázott, valamint a kicsírázott magvak harmadából fejlődésnek indult növények fejlődése hamarosan megállt, és kifejlődésük előtt elpusztultak. Logikusnak tűnt a felvetés, hogy esetleg e kipusztult, vagy növekedésnek sem indult növények között kell keresni a hiányzó genotípusú egyedeket. Ezért megvizsgáltuk néhány marker szegregációs arányát 57 olyan növény esetében, melyek abnormális növekedésűek voltak a csírázást követően, és így valószínűleg hamar kipusztultak volna. Azt tapasztaltuk, hogy egy marker (OF20A) kivételével a heterozigóták aránya csökkent a 209

további egyedet tartalmazó populációhoz képest, de az eredeti populáció arányainál az OQ3M marker kivételével nagyobb volt a tapasztalt szegregációs arány.

A GSa marker genotípusainak szegregációját megvizsgáltuk 44 mag össz-DNS-én (7. táblázat) annak eldöntésére, hogy az érett mag állapotban milyen a bekövetkezett szelekció. Itt is a heterozigóta genotípusok arányának csökkenését tapasztaltuk, de a genotípusok aránya még mindig nem érte el az elméleti 1:2:1 arányt. A fenti eredményből tehát kiderült, hogy a GSa marker környezetében a homozigóta genotípusú egyedek csökkent száma már magállapotban megtörtént.

Marker	LG	Eredeti térképező populáció			További 209 F ₂ növény			57 abnormális növekedésű csíranövény			44 F ₂ mag DNS		
		a ₁ a ₁	a ₁ a ₂	a ₂ a ₂	a ₁ a ₁	a ₁ a ₂	a ₂ a ₂	a ₁ a ₁	a ₁ a ₂	a ₂ a ₂	a ₁ a ₁	a ₁ a ₂	a ₂ a ₂
GSa	LG 6	1.00	20.17	1.67	1.00	20.00	3.00	nv*			1.00	9.00	1.00
OW13B	LG 6	1.00	20.50	1.33	1.00	38.60	2.20	1.00	26.50	1.00	nv*		
OAD16A	LG 6	1.00	43.33	1.33	1.00	101.50	2.00	-	56.00	1.00	nv*		
OF20A	LG 6	1.00	13.22	1.00	1.38	23.75	1.00	1.00	53.00	3.00	nv*		
OQ3M	LG 7	1.00	24.60	1.80	1.63	23.50	1.00	1.20	9.40	1.00	nv*		

* nv = nem vizsgáltuk

7. táblázat. Öt kodomináns RAPD marker genotípusainak szegregációs aránya a kiterjesztett térképező populáció különböző fejlettségi állapotú növényeinél. A genotípusok a 1. táblázat genotípus-jelzéseivel azonosak.

Az eredményekből nem kaptunk egyértelmű választ arra, hogy pontosan melyik fejlődési lépésben következik be a homozigóta genotípusú egyedek szelekciója. Annyi megállapítható volt, hogy az elsődleges szelekció már a magfejlődés előtt bekövetkezett (pl. a megtermékenyítés vagy a zigóta differenciálódása alatt), hiszen a magok genotípusának meghatározása sem adott olyan torzulásmentes növényi anyagot. Az egyedfejlődés későbbi fázisaiban minden bizonnyal a szegregációs arány tovább torzult az adott régióban. Részben a

korai fejlődési fázisban lezajló szelekciót támasztja alá az a tény is, hogy az F_1 hibrid-növényeknél végzett önmegtermékenyítés hatékonysága tapasztalataink szerint 10 %-nál kisebb volt (ez részben lehet inkompatibilitás következménye is).

Egy adott régióban bekövetkező szegregációs arány torzulása valószínűleg több, esetleg a genom különböző pontjairól (azaz nemcsak a kérdéses lókusztól) keletkező géntermékek együttes kölcsönhatásának is lehet az eredménye. Kizárólag egy lókusztól nem köthető a torzult szegregációs arány megjelenése, hiszen egy vizsgált régióban mindig találtunk homozigóta genotípusú egyede(ke)t. A szelekció időpontja markerenként (régióként) is eltérő lehet, és a különböző szelekciós események is egymásra rakódhatnak. A genotípusok szegregációs arányának torzulását okozó tényezők feltárása ezért nehézségekbe ütközik, és a fent említett lehetőségek talán magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy a jelenség okaira ilyen egyszerű kísérletekben miért nem kaptunk egyértelmű választ. Általánosságban annyi kijelenthető, hogy a genotípusok torzult szegregációját magyarázhatjuk azzal a ténnyel, hogy a lucerna idegenbeporzó növény. Az evolúció folyamán a heterozigóta génösszeállítású egyedek szelekciós előnyt élveztek a viszonylag több homozigóta genotípusú régiót hordozó egyedekkel szemben. Az önbeporzásból származó egyedek tehát nem képviselik a lehetséges teljes utódgenerációt, mivel a megfelelő életképességhez nélkülözhetetlen régiókban a heterozigóta génösszeállítású egyedek életképessége messze felülmúlja a homozigótáét.

Több nem kapcsolt, jelentős szegregációs torzulást mutató vázmarker kontingencia-táblázatából próbáltuk megbecsülni azt a feltételezett kiindulási populációméretet, amely a növények különböző fejlődési fázisaiban ható szelekciós tényezők hatására végül is a szegregáló populáció méretére (137 egyed) csökkent. Ha feltételezzük, hogy a heterozigóta genotípusú egyedek száma a vizsgált markereknél nem csökkent a populáció felnevelése során, hanem a szelekció csak valamelyik markerre homozigóta genotípusú egyedek számát csökkentette (azaz csak ezek hiányoztak a kontingencia táblázatból), akkor a mindkét markerre heterozigóta genotípusok számából megbecsülhető az elméleti kiindulási egyedek minimális száma. Ezen

okfejtés szerint az U62 és az OAD16A vázmarkerekre heterozigóta genotípusú egyedek számából az elméleti populáció méretét egy minimum 500 növényt tartalmazó populációra tudtuk becsülni. Ez természetesen csak egy minimális méret, mert feltételezhetően nem az összes, mindkét markerre heterozigóta egyed maradt életben, és lett tagja a szegregáló populációnak.

6.7. Diploid lucerna genetikai térképek összehasonlítása

Csoportunkon kívül még két másik kutatócsoport foglalkozott a diploid lucerna genetikai térképének elkészítésével, G. Kochert (Brummer és mtsai 1993), valamint T. Osborn és T. McCoy laboratóriumában (Echt és mtsai 1994). Mindkét kutatócsoporttól kaptunk olyan lucerna cDNS, illetve genomi DNS-klónokat, melyek térképhelyét saját szegregáló populációikon meghatározták. Mindkét térképező populáció előállításához a termesztett lucerna diploid változatának (CADL; cultivated alfalfa at the diploid level) egyedeit használták, az egyik esetben F_2 (Brummer és mtsai 1993), a másik esetben pedig visszakeresztett populáción (Echt és mtsai 1994) végezték a térképezést.

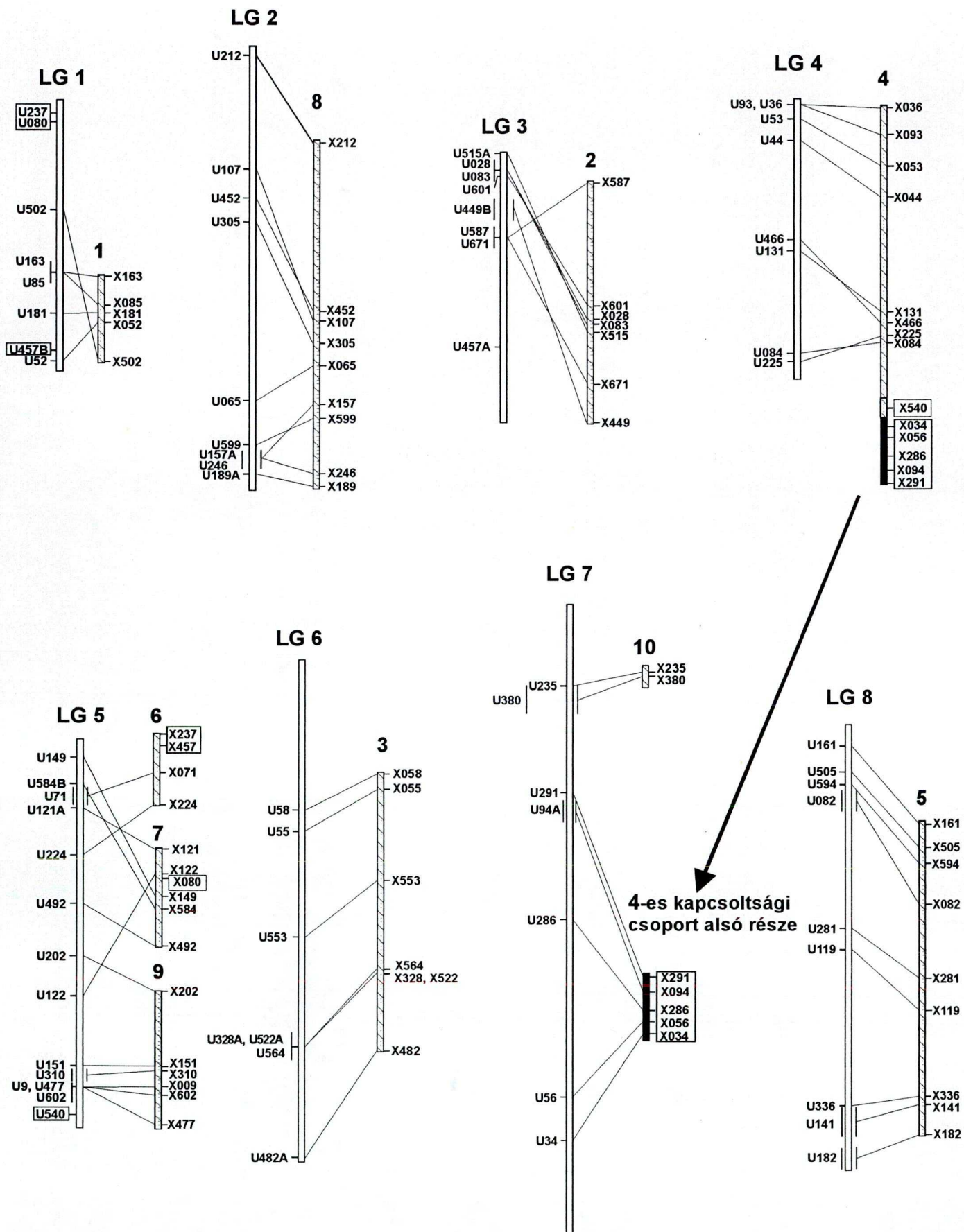
Az F_2 populáción 108 cDNS marker helyét állapították meg Brummer és mtsai (1993), melyeket tíz kapcsoltsági csoportba rendeztek. A 108 cDNS marker közül 69-nek mi is meghatároztuk a térképhelyét, így ez lehetőséget adott a két genetikai térkép kapcsoltsági csoportjainak összehasonlítására. Az általuk felállított kapcsoltsági csoportok mindegyike, egy kivételével, jórészt megfeleltethető volt a mi kapcsoltsági csoportjainkkal (8/a. ábra). Az általuk 4-esnek nevezett kapcsoltsági csoport alsó régiója a mi eredményeink szerint a mi hetes kapcsoltsági csoportunk (LG 7) egy része. Hasonlóképp, a Brummer-féle térkép 4-es kapcsoltsági csoportján található X540 marker a mi genetikai térképünk esetében a LG 5-ra térképeződött, míg a Brummer-féle térkép 6-os kapcsoltsági csoportján található X237 és X457, valamint a 7-esen lévő X080 markerek a mi egyes kapcsoltsági csoportunkra (LG 1) került.

Ezek az eseteken kívül a markerek a megfelelő kapcsoltsági csoportba térképeződtek, bár néhány esetben (pl. LG 3 - 2) sorrendjük nem egyezett meg. A két genetikai térkép közötti eltérések oka nem ismert. A genotípus adatainak ismeretében talán többet tudnánk arról, hogy az eltérések genetikai átrendeződésekkel, vagy esetleg más okokkal (rossz genotípus meghatározás, téves adatbevitel, torzult szegregáció) magyarázhatók-e. Genotípus adataink meghatározását többször is ellenőriztük, és a genetikai analízisek kétféle módszerrel (speciális ML-egyenletek és színtérképezés) is ugyanazt az eredményt szolgáltatták, így az általunk használt térképező populáció esetén a meghatározott markersorrendet helyesnek tartjuk. A Brummer-féle térkép közlése még a térképezési folyamat egy kezdeti szakaszában történt, információink szerint azóta térképüknek újabb változata nem jelent meg. Az eltérés magyarázható azzal is, hogy az adott cDNS-próbával (pl. X540) a térképezés során egy gén család különböző tagjait azonosítottuk (paralóg lokuszok) a két genetikai térképen.

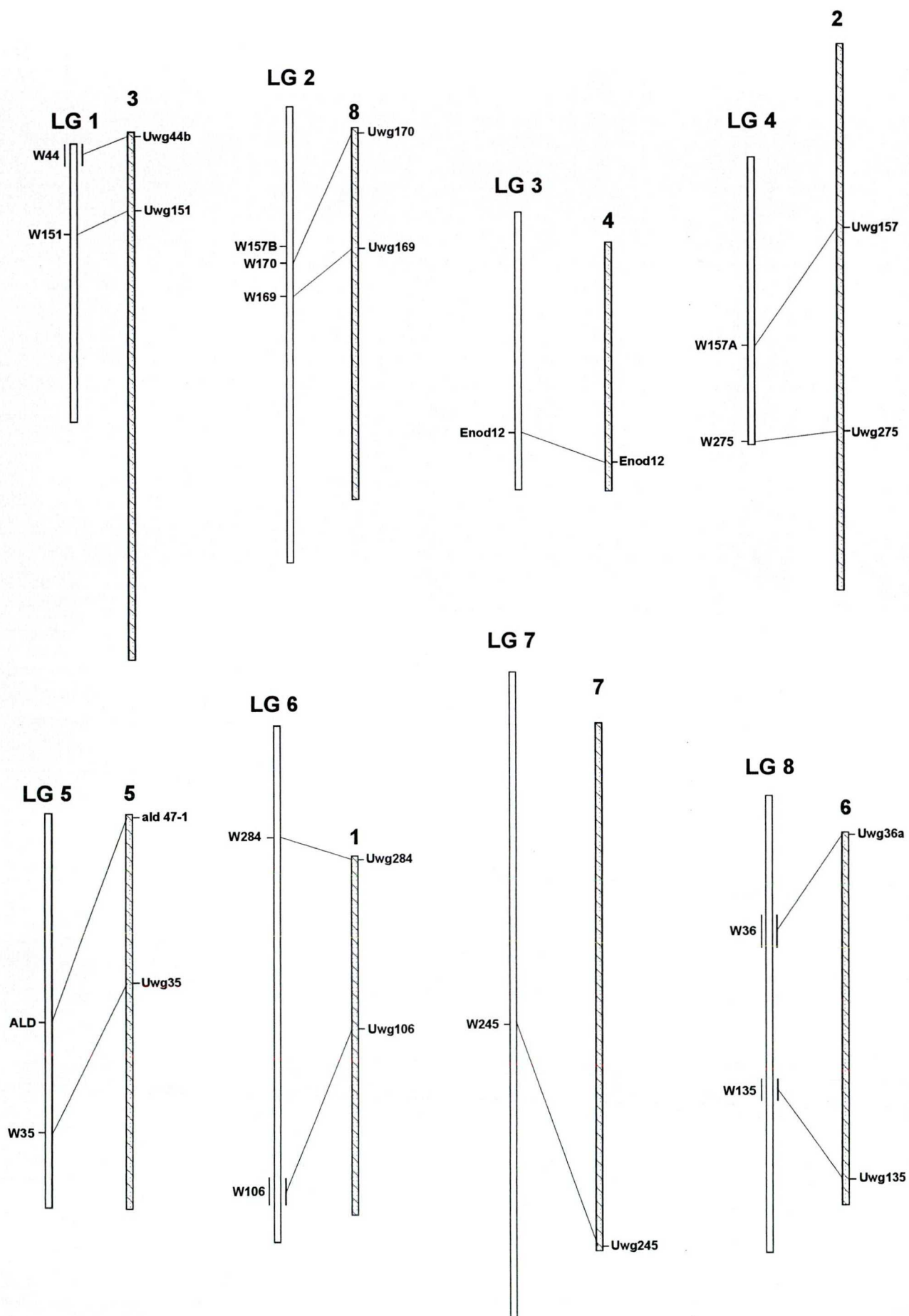
A visszakeresztelt populáció egyedeinek szegregációs adatai alapján készült lucerna genetikai térkép (Echt és mtsai 1994) nagyrészt genom DNS-klónokkal azonosított markereket tartalmazott. Az általuk betérképezett, és a mi kapcsoltsági csoportjainkon található tizennégy azonos marker segítségével a két genetikai térkép nyolc-nyolc kapcsoltsági csoportjait meg tudtuk feleltetni egymásnak (8/b. ábra).

8. ábra. Diploid lucerna genetikai térképek összehasonlítása.

- a. Az általunk és Brummer és mtsai (1993) által elkészített lucerna genetikai térképek közös markereinek térképhelyzete. Az üres fehér oszlopok az általunk elkészített kapcsoltsági csoportokat ábrázolják (LG 1 - LG 8), a ferde csíkozású oszlopok pedig az amerikai kutatócsoport által meghatározott kapcsoltsági csoportokat (1 - 10) ábrázolják (Brummer és mtsai 1993). Nyíllal jeleztük a 4-es kapcsoltsági csoport azon részletét, amely elvált a közölt kapcsoltsági csoporttól, és a mi hetes kapcsoltsági csoportunk egy régióját képezte. Azokat a markereket, amelyek nem a megfelelő kapcsoltsági csoportokban helyezkednek el, téglalapban tüntettük fel.
 - b. Az általunk és Echt és mtsai (1994) által elkészített lucerna genetikai térképek kapcsoltsági csoportjainak összehasonlítása. A kapcsoltsági csoportok jelölése hasonló az a. ábrához.
-



8/a. ábra.



8/b. ábra.

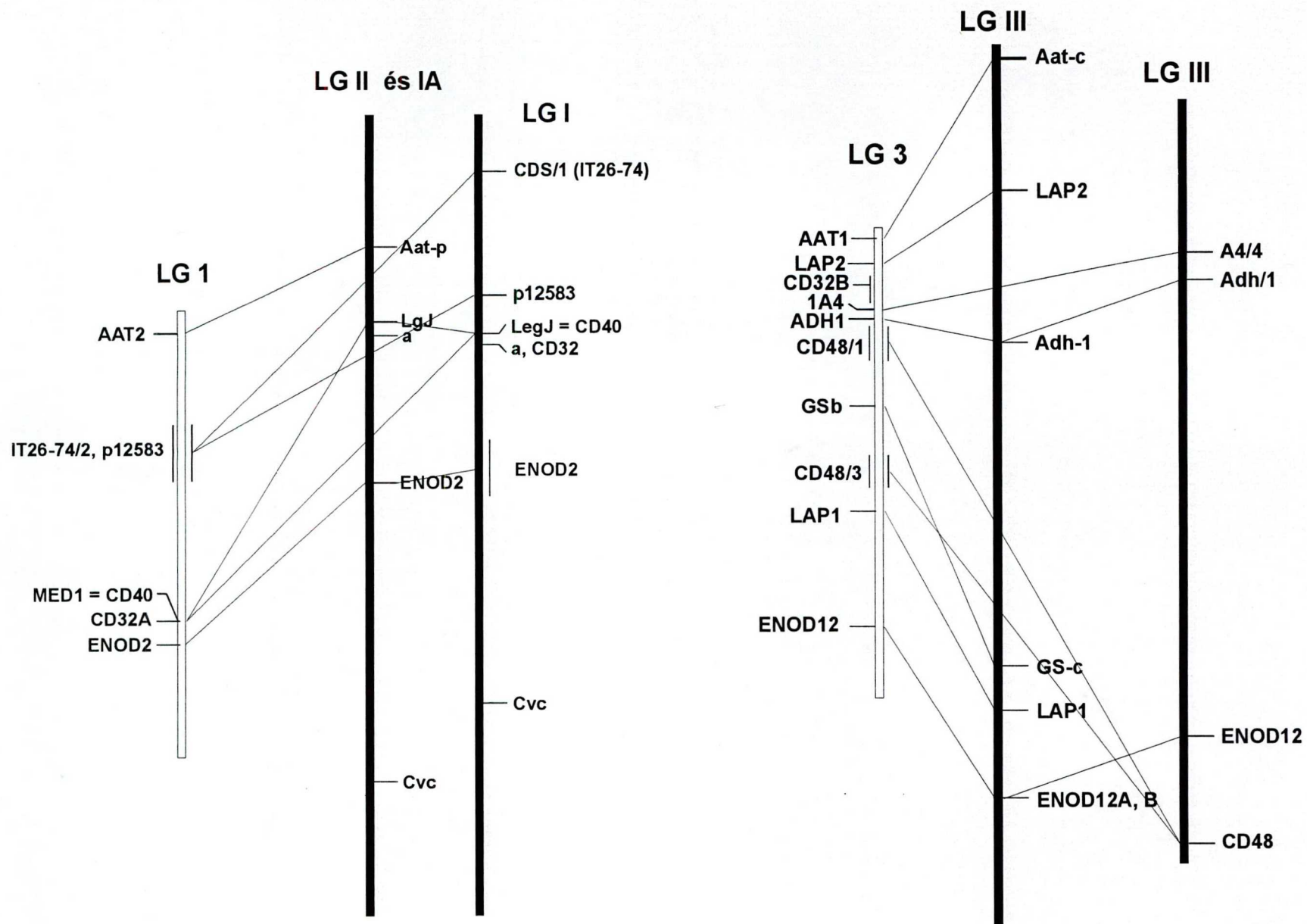
6.8. A lucerna és a borsó genetikai térképének összehasonlítása

Több rokon növényfaj esetében mutattak már ki azonos markersorrendű kapcsoltsági csoport-részleteket, melyek a genomok összehasonlítására adnak lehetőséget (Tanksley és mtsai 1992). Rendelkezésünkre állt egy részletes, számos ismert funkcióval rendelkező gént tartalmazó genetikai térkép, amelynek segítségével megpróbálkozhattunk azzal, hogy egy másik pillangósvirágú növény, a borsó (*Pisum sativum*) genetikai térképével is összehasonlítsuk. A borsó genetikailag jól jellemzett növény, több kapcsoltsági térkép is készült már morfológiai, izoenzim és különböző DNS-alapú molekuláris markerek felhasználásával (Weeden és Marx 1984 és 1987; Ellis és mtsai 1992 és 1993; Weeden és mtsai 1996; Gilpin és mtsai 1997). A borsó haploid kromoszómaszáma hét, és az ezeknek megfelelő kapcsoltsági csoportok közül négynek kisebb-nagyobb régiója a betérképezett molekuláris markerek alapján megfeleltethető volt a lucerna kapcsoltsági csoportjainak egy-egy régiójával (9/a, b és c ábra). Két borsó kapcsoltsági térkép alapján készítettük az összehasonlítást, melyek Weeden és mtsai (1996) és Ellis és mtsai (1992 és 1993) munkái, valamint T. H. N. Ellis személyes közlése alapján készültek. Csoportunkban a lucerna kapcsoltsági csoportjaira térképeződő jó néhány cDNS-klón szekvenciáját meghatároztuk, amelyből kiderült, hogy az U328, U522 és U564 markerek valószínűleg a ribulóz 1,5-bi-foszfát karboxiláz (Rubisco) gének (RbcS) helyét, az U63, U482 és U784 markerek pedig a klorofill a/b-kötő fehérjét kódoló gének (Cab) helyét jelölik a térképen (Dr. Kiss György személyes közlés). Ezen gének térképhelyét szintén felhasználtuk a térképösszehasonlítás során. A lucerna LG 6 és borsó VII kapcsoltsági csoportok párhuzamba állítása (9/c. ábra) a kevés marker és a nem teljesen megegyező markersorrend miatt további markerek térképezésével még megerősítésre szorul. A többi kapcsoltsági csoport, és az eddig még nem azonosított régiók sorrendjének összehasonlítása folyamatban van, mely után a két genetikai térkép RFLP markerei kölcsönösen segítséget jelenthetnek további génizolálási és a molekuláris markereken alapuló nemesítési kísérletekben.

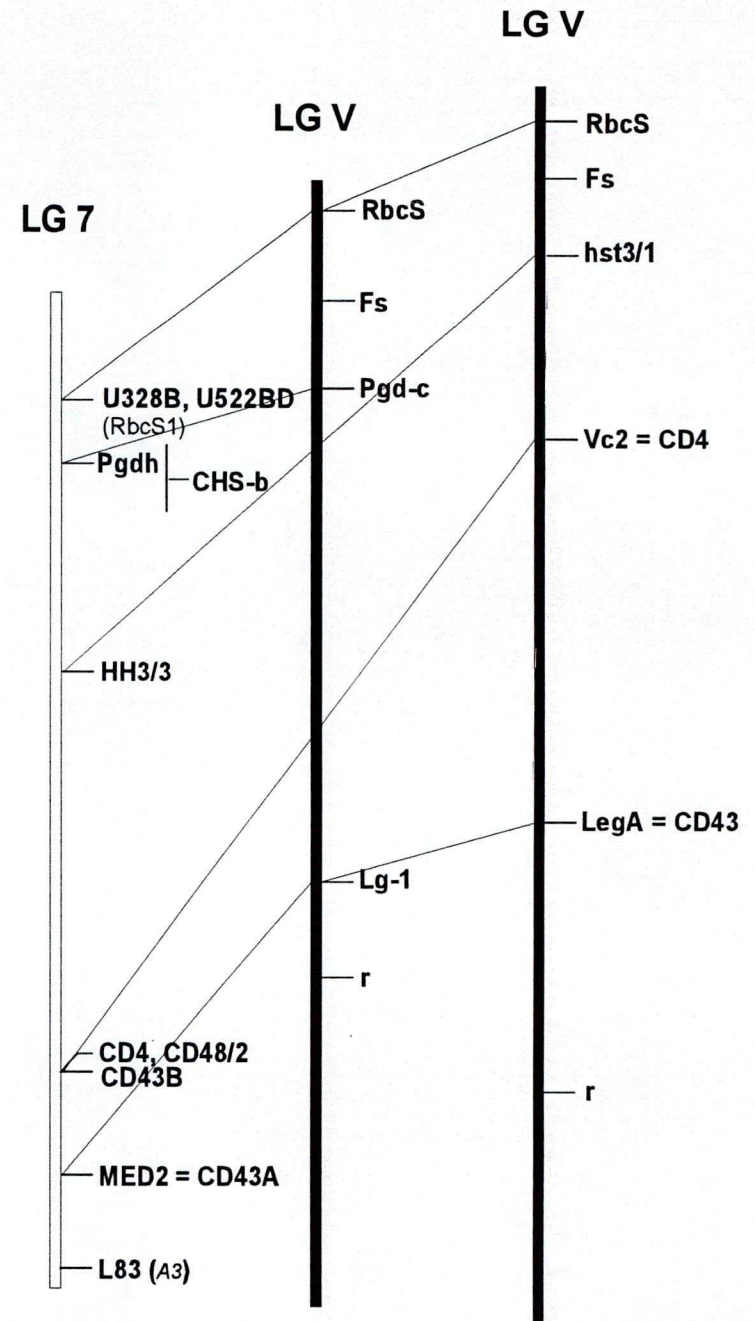
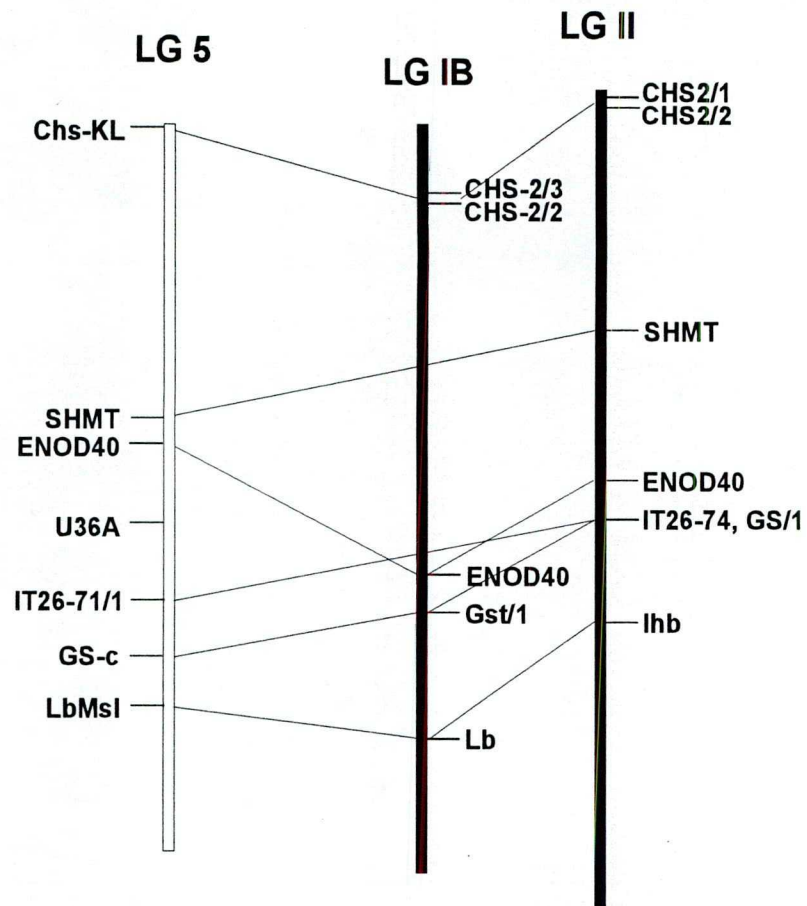
Csoportunk résztvevője annak a több európai kutatócsoportot magában foglaló együttműködésnek (EUDICOTMAP), amelynek célja több kétszikű növényfaj, így az *Arabidopsis thaliana*, a *Brassica napus*, a paradicsom, a burgonya, a napraforgó, a cukorrépa, a borsó és a lucerna genetikai térképeinek összehasonlítása. A tervek szerint a genetikai térképek összehasonlítása a már betérképezett azonos funkciójú gének térképhelyének összevetésével, valamint *Arabidopsis thaliana* növényből származó EST (expressed sequence tag) klónok térképezésével történik majd. A lucerna és a borsó között elkészült összehasonlítás jó kiindulási alapot szolgáltat a munka folytatására.

9/a., b. és c. ábra. A lucerna (*Medicago sativa*) és a borsó (*Pisum sativum*) kapcsoltsági csoportjainak összehasonlítása.

Az üres oszlopok a lucerna kapcsoltsági csoportjait ábrázolják, a fekete oszlopok pedig a borsó kétféle szegregáló populáció analízise alapján készített kapcsoltsági csoportjait mutatják. Ahol két borsó kapcsoltsági csoportot ábrázoltunk, ott a bal oldali borsó kapcsoltsági csoportok (LG II és IA, LGIII, LG IB és LG V) Weeden és mtsai (1996) által készített térkép felhasználásával, a jobb oldali borsó kapcsoltsági csoportok (LG I, LG III, LG II, LG V és LG VII) pedig Ellis és mtsai (1992 és 1993) munkái, valamint T. H. N. Ellis személyes közlése alapján készültek. Függőleges vonallal a kapcsoltsági csoport azon részletét jeleztük, amely mentén a kérdéses marker elhelyezkedhet.

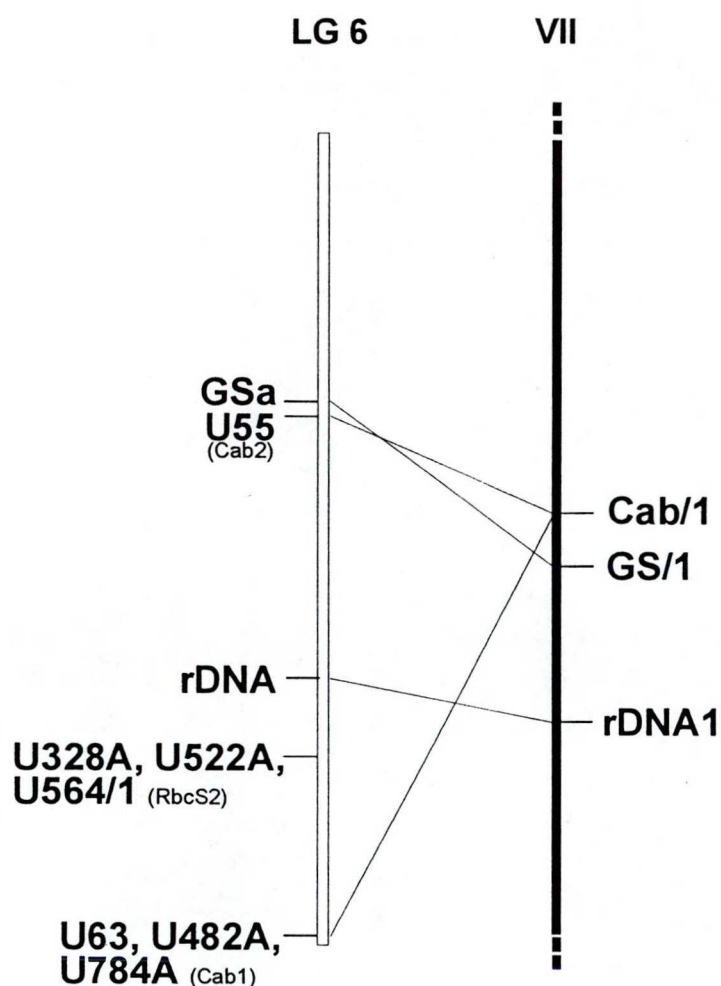


9/a. ábra.



9/b. ábra.





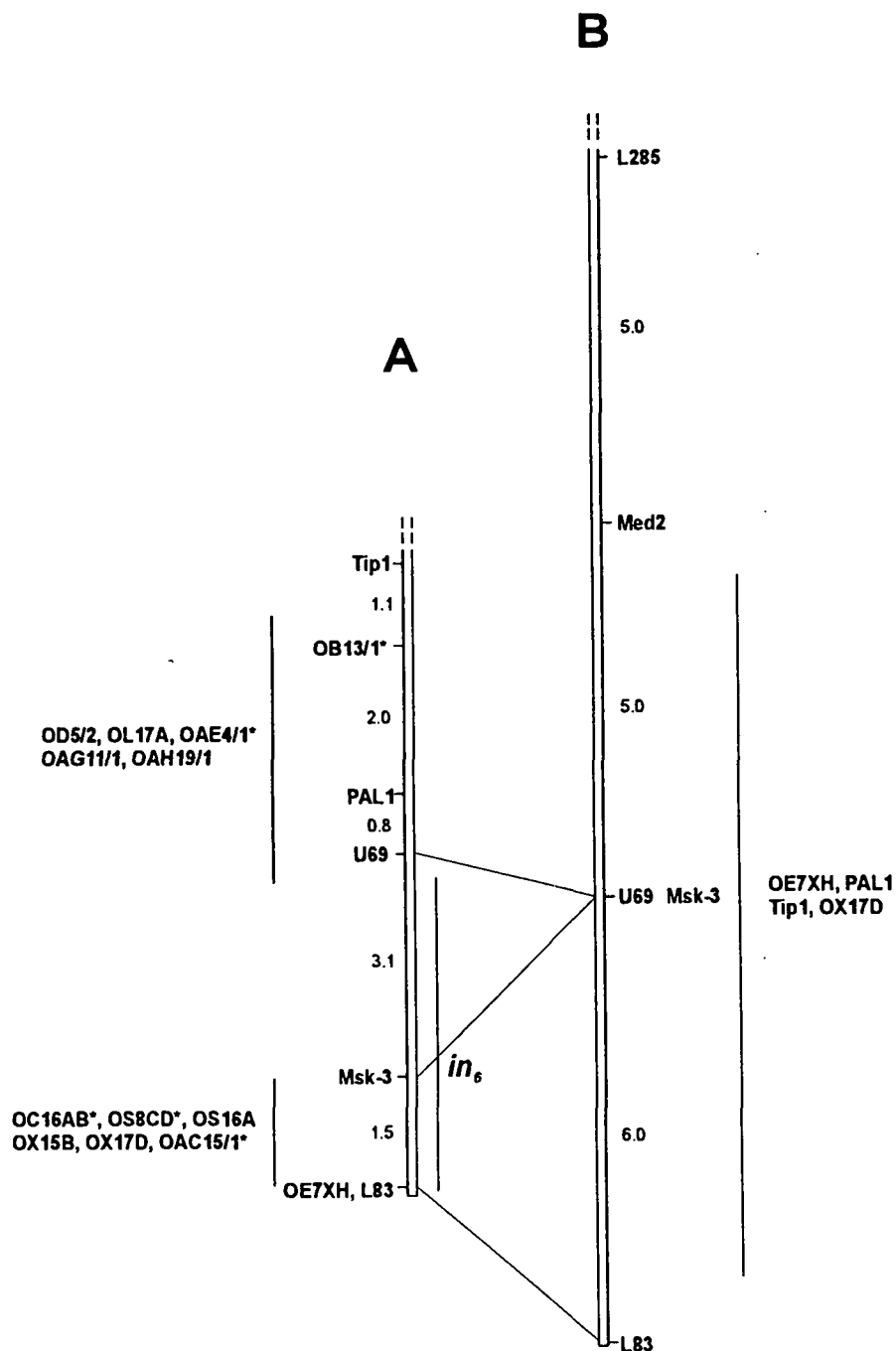
9/c. ábra.

6.9. A *fix1* (*in*₆) mutáns gént tartalmazó régió finomtérképezése

A *fix1* mutáns gén izolálásának elkezdéséhez a mutáció térképhelyének minél pontosabb meghatározására, és a mutációhoz minél közelebbi markerek azonosítására van szükség, hogy a „kromoszómasétát” a mutáns génhez lehető legközelebb eső molekuláris markertől kezdhessük el. A *fix1* mutáns gént tartalmazó szegregáló populáció (3.3. fejezet) egyedei a mutáció betérképezése óta kipusztultak, ezért egy újabb szegregáló populációt (ún. „Fix” populációt) hoztunk létre az ineffektív Fix1 növény és a vad típusú *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* k93 növény keresztezéséből származó F_{1/51} növény további önbeporzásával. Az önbeporzásból származó 214 magból 180 csírázott ki, melyekből 88 maradt úgy életben, hogy cserépbe tudtuk ültetni őket. Fenotípusos kiértékelés alapján tíz növény volt gyenge növekedésű és sárgászöld

levelű, azaz nagy valószínűséggel szimbiotikus nitrogénkötésben ineffektív fenotípusú. Ezek a növények feltételezésünk szerint homozigóták voltak a *fix1* génre nézve. Meghatároztuk az új szegregáló populáció egyedeinek genotípusát az U69, L83 és OE7XH RFLP markerekre nézve, melyek az előző kísérletek alapján közrefogták, illetve közel térképeződtek az ineffektív mutációhoz. A tíz ineffektív fenotípusúnak gondolt növényből kilenc mind a három RFLP markerre nézve apai (Fix1 növény) homozigóta genotípusú volt, a tizedik növény az U69 markerre nézve heterozigóta, a L83 és OE7XH markerre nézve pedig apai homozigóta genotípusú volt. Ezen adatok alapján tehát a *fix1* (*in₆*) mutáns gén az U69 markertől lejjebb, az Msk-3 és L83, OE7XH markerek közelébe térképeződik (10. ábra). A meghatározott genotípusok alapján kiválasztottunk öt-öt növényt, melyek apai, illetve anyai homozigóták voltak az U69 és L83 RFLP markerekre nézve, és így nagy valószínűséggel a köztük lévő kromoszomális régióban is. Az öt-öt növény össz DNS-ét elegyítettük, és ezt a keveréket használtuk DNS-templátként polimeráz láncreakciókban különböző, tíz nukleotid hosszúságú primerek tesztelésére (Bulked Segregant Analysis; Michelmore és mtsai 1991). Ezzel a módszerrel eddig 240 primert vizsgáltunk át, és az ezek által készített RAPD-fragmentek közül tizenhárom (öt kodomináns) térképeződött a vizsgált régióba (10. ábra). Ezeken kívül az alaptérkép ezen régiójába térképezett markerek helyzetét (Msk-3, OX17D, PAL1, Tip1) is meghatároztuk a „Fix” populáción, és az így kapott markersorrendet a 10. ábrán tüntettük fel. Az 1 cM-ra eső átlagos genomméretet figyelembe véve a mutációt szenvedett gén egy 4600-6000 kb nagyságú régióban helyezkedik el. Mivel ez egy igen nagy régió, ezért a fölösleges génsebészeti kísérletek csökkentése érdekében a jövőben további tíz nukleotid hosszúságú primerek tesztelését tervezzük még több, a *fix1* mutáns gén környezetébe térképeződő RAPD marker azonosításához. A régióba térképeződő molekuláris markerek számának növelése mellett rekombinációkat kell keresnünk a vizsgált szakaszon, hogy a markerek sorrendjét meg tudjuk állapítani. Ezért újabb, több száz szegregáló egyed előállítását tervezzük az $F_{1/51}$ növény további önbeporzásával. Az újabb populáció egyedei közül egy „alsó” (pl. L83) és egy „felső” (pl. U69)

marker genotípusának meghatározásával kiválasztjuk az érdekes, a régióban feltételezhetően rekombinációt mutató egyedeket, és csak ezekkel végezzük el a növényi teszteket a *fix1* (*in₆*) mutáns gén helyzetének pontosabb megállapításához. Ezeket az egyedeket használjuk az újonnan térképezett markerek sorrendjének meghatározásához is. Ezzel a megközelítéssel könnyebb az elvégzendő munka, mert nem kell sok száz F_2 egyedet hosszan tartó növényi tesztben megvizsgálnunk.



10. ábra. A *fix1* (*in₆*) mutáns gént hordozó populáció („Fix” populáció) és az alap térképező populáció alapján készített hetes kapcsoltsági csoportok (LG 7) egy régiójának összehasonlítása.

Az ineffektív fenotípusért felelős gént tartalmazó populáció alapján készült genetikai térképrészletet **A**-val, az alap térképező populáció alapján készült térképrészletet pedig **B**-vel jelöltük (ld. még 4/g. ábra). Függőleges vonallal jelöltük azt a régiót, amelyhez a vonal mellett jelzett markerek teljes kapcsoltságot mutattak. A *fix1* (*in₆*) mutáns gén lehetséges elhelyezkedését szintén egy függőleges vonallal jelöltük. A markerek közötti rekombinációs gyakoriságokat a zigotikus szelekcióra kidolgozott speciális ML-egyenletek (Lorieux és mtsai 1995) segítségével határoztuk meg, a genetikai távolságokat (cM) pedig a Haldane térképfüggvény szerint számoltuk ki. Csillaggal a kodomináns kiértékelésű RAPD markereket jelöltük.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a diploid lucerna genetikai alaptérképéből kiindulva elkészítettünk egy részletes, több mint 900 markert tartalmazó kapcsoltsági térképet. A bővített genetikai térkép elkészítése nem egyszerűen csak a térképezett marker számának növelésében merült ki, hanem a korábban és az újonnan azonosított markerek részletes genetikai analízisét is elvégeztük. Ennek során a következő eredményeket értük el:

- megállapítottuk, hogy a hagyományos térképezési eljárással (Mapmaker/Exp 3.0) a lucerna genetikai térkép markerei nem oszthatók egyértelműen nyolc kapcsoltsági csoportba;
- kimutattuk, hogy ennek oka az erősen torzult szegregációs arányt mutató markerek között a nagyszámú heterozigóta genotípus miatt kialakuló nem valós kapcsoltság;
- meghatároztuk χ^2 tesztek segítségével, hogy zigotikus vagy gametikus szelekció következménye-e a vázmarkerek genotípusainál bekövetkezett torzult szegregációs arány;
- megállapítottuk, hogy a torzult szegregációs arálynak, pontosabban a heterozigóta genotípusok túlsúlyának a rekombinációs gyakoriságot torzító hatása kivédhető olyan speciális maximum-likelihood (ML) egyenletek alkalmazásával, melyek figyelembe veszik a különböző genotípusú gaméták és zigóták életképessége közötti eltéréseket;
- a speciális ML-egyenletek használatával a markereket egyértelműen szét tudtuk osztani nyolc kapcsoltsági csoportba, amelyek megfelelhetnek a haploid lucerna genom nyolc kromoszómájának;
- más módszerekkel, a „heterozigóta” kapcsolatok csökkentésével, és az ún. színtérképes analízissel szintén vizsgáltuk a torzult szegregációt mutató markerek kapcsoltsági viszonyait, melynek eredménye megegyezett a speciális ML-egyenletek alkalmazásával kapott eredményekkel;

- az elkészült részletes, 753 cM genetikai távolságot lefedő lucerna genetikai térkép nyolc kapcsoltsági csoportjára 925 genetikai markert helyeztünk el, átlagos értéként egy cM genetikai távolságra 750-1000 Mbp fizikai távolság esik;

- az általunk speciális ML-egyenletekkel elvégzett genetikai analízis volt ismereteink szerint az első gyakorlati példa, amikor a torzult szegregációs arány okozta térképezési rendellenességre ezeket a módosított ML-egyenletek alkalmazták; ezek az egyenletek lehetőséget biztosítottak a markerek közötti rekombinációs gyakoriságok, és így a genetikai távolságok pontosabb becslésére is;

- néhány marker vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a torzult szegregációs arány már mag-, ill. csíranövény-állapotban is jelen van, tehát a heterozigóta genotípusok arányának megnövekedését kiváltó szelekciók már az egyedfejlődés egy korábbi szakaszában bekövetkeztek a vizsgált markereknél;

- a színtérkép segítségével egy lehetséges letális lókuszt helyét is azonosítottuk a *M. sativa* ssp. *quasifalcata* k93 növényben a kettes kapcsoltsági csoporton;

- közös markerek térképhelyének meghatározásával összehasonlítottuk lucerna genetikai térképünket más diploid lucerna kapcsoltsági térképekkel;

- a lucerna néhány kapcsoltsági csoportját, ill. annak részletét összehasonlítottuk a borsó kapcsoltsági csoportjaival, az azonos betérképezett markerek figyelembevételével;

- folytattuk egy ineffektív nitrogénkötést okozó mutáns gén (*fix1* vagy *in₆*) térképhelyének pontosítását.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Ahn S, Anderson JA, Sorrels ME, Tanksley SD (1993) Homologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol Gen Genet* 241:483-490.

Ahn S és Tanksley SD (1993) Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7980-7984.

Allard RW (1956) Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* 24:235-278.

Arumuganathan K és Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:208-219.

Bailey NTJ (1949) The estimation of linkage with differential viability, II and III. *Heredity* 3:220-228.

Barciszewska MZ, Nalaskowska M, Mashkova TD, Kisselev LL, Barciszewski J (1987) Heterogeneity in the 3' portion of Papilionaceae 5S rRNAs. The primary structure of alfalfa 5S RNA. *Plant Mol Biol* 15:362

Barnett MJ, Long SR (1990) Nucleotide sequence of an alfalfa calmodulin cDNA. *Nucleic Acid Research* 18:3395

Bauchan GR, Campbell TA (1994) Use of an image analysis system to karyotype diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Journal of Heredity* 85:18-22.

Bálint A (1966) Lucerna. *Mezőgazdasági növények nemesítése* :351-360.

Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Yvette D, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Génier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguet T (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep* 8:40-49.

Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz BJ (1994) RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265:1856-1860.

Bentolila S, Hardy T, Guitton C, Freyssinet G (1992) Comparative genetic analyses of F₂ plants and anther culture derived plants of maize. *Genome* 35:575-582.

Bénaben V, Duc G, Lefebvre V, Huguet T (1995) TE7, an inefficient symbiotic mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong. *Plant Physiology* 107:53-62.

Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120:1095-1103.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.

Brummer EC, Kochert G, Bouton JH (1991) RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. *Theor Appl Genet* 83:89-96.

Brummer EC, Bouton JH, Kochert G (1993) Development of an RFLP map in alfalfa. *Theor Appl Genet* 86:329-332.

Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley *MLO* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88:695-705.

Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991) Plant genetic control of nodulation. *Ann Rev Microbiol* 45:345-382.

Caetano-Anollés G, Joshi PA, Gresshoff PM (1993) Nodule morphogenesis in the absence of *Rhizobium*. p. 297-302. In *New Horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, Palacios R, Mora J, Newton WE editors.

Carroll BJ, McNeill DL, Gresshoff PM (1985a) Isolation and properties of a novel soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentration. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4162-4166.

Carroll BJ, McNeill DL, Gresshoff PM (1985b) A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (*nts*) soybean mutant. *Plant Physiology* 78:34-40.

Charrier B, Coronado C, Kondorosi A, Ratet P (1995) Molecular characterization and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavanone-3-hydroxylase and dihydroflavonol-4-reductase encoding genes. *Plant Mol Biol* 29:773-786.

Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1991-1995.

Cloutier S, Cappadoccia M, Landry BS (1995) Study of microspore-culture responsiveness in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by comparative mapping of a F₂ population and two microspore-derived populations. *Theor Appl Genet* 91:841-847.

Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K (1995) Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *The Plant Cell* 7:43-55.

Cook DR, VandenBosch K, De Bruijn FJ, Huguet T (1997) Model legumes get the nod. (meeting report). *The Plant Cell* 9:275-281.

Cooke R, Raynal M, Laudie M, Delseny M. (1997) Identification of members of gene families in *Arabidopsis thaliana* by contig construction from partial cDNA sequences: 106 genes encoding 50 cytoplasmic ribosomal proteins. *The Plant Journal* 11:1127-1140.

Cooper JB, Long SR (1994) Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. *The Plant Cell* 6:215-225.

Covitz PA, Smith LS, Long SR (1998) Expressed sequence tags from a root-hair-enriched *Medicago truncatula* cDNA library. *Plant Physiology* 117:1325-1332.

Crespi MD, Jurkevitch E, Poirot M, d'Aubenton Carafa Y, Petrovics G, Kondorosi É, Kondorosi A (1994) enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. The EMBO Journal 13:5099-5112.

Crow JF (1990) Mapping functions. Genetics 125:669-671.

Csanádi G, Szécsi J, Kaló P, Kiss P, Endre G, Kondorosi A, Kondorosi É, Kiss GB (1994) ENOD12, an early nodulin gene, is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. The Plant Cell 6:201-213.

Davidowitz EJ, Creissen G, Vincze É, Kiss GB, Lang-Unnasch N (1991) Sequence analysis of alfalfa (*Medicago sativa*) leghemoglobin cDNA and genomic clones. Plant Mol Biol 16:161-165.

Dahl M, Meskiene I, Bögre L, Ha DTC, Swoboda I, Hubmann R, Hirt H, Heberle-Bors E. (1995) The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G₁ cyclin-deficient yeast induced in the G₁ phase of the cell cycle. The Plant Cell 7:1847-1857.

Dean C, Schmidt R (1995) Plant genomes: a current molecular description. Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol 46:395-418.

Delauney AJ, Verma DPS (1988) Cloned nodulin genes for symbiotic nitrogen fixation. Plant Mol Biol Rep 6:279-285.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. Plant Mol Biol Rep 1:19-21.

Devos KM, Gale MD (1997) Comparative genetics in the grasses. Plant Mol Biol 35:3-15.

Dickstein R, Bisseling T, Reinhold VN, Ausubel FM (1988) Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. Genes Dev 2:677-687.

Dickstein R, Prusty R, Peng T, Ngo W, Smith ME (1993) Enod8, a novel early nodule-specific gene, is expressed in empty alfalfa nodules. Mol Plant-Microbe Interactions 6:715-721.

Dickstein R, Scheirer DC, Fowle WH, Ausubel FM (1991) Nodules elicited by *Rhizobium meliloti* heme mutants are arrested at an early stage of development. Mol Gen Genet 230:423-432.

Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals JA, Dangl JL. (1994) *Arabidopsis* mutants stimulating disease resistance response. Cell 77:565-577.

Domoney C, Casey R (1985) Measurement of gene number for seed storage proteins in *Pisum*. Nucleic Acid Research 13:687-699.

Domoney C, Casey R, Turner L, Ellis THN (1991) *Pisum* lipoxygenase genes. Theor Appl Genet 81:800-805.

Doorsselaere JV, Baucher M, Feuillet C, Boudet AM, Van Montagu M, Inzé D (1995) Isolation of cinnamyl alcohol dehydrogenase cDNAs from two important economic species: alfalfa and poplar. Demonstration of a high homology of the gene within angiosperms. Plant Physiology Biochemistry 33:105-109.

Duc G, Messenger A (1989) Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. *Plant Science* 60:207-213.

Dudley ME, Long SR (1989) A non-nodulating alfalfa mutant displays neither root hair curling nor early cell division in response to *Rhizobium meliloti*. *The Plant Cell* 1:65-72.

Dunn K, Dickstein R, Feinbaum R, Burnett BK, Petermann TK, Thoidis G, Goodman HM, Ausubel FM (1988) Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol Plant Microbe Interactions* 1:66-74.

Echt CS, Kidwell KK, Knapp SJ, Osborn TC, McCoy TJ (1994) Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome* 37:61-71.

Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256:998-1000.

Ehrhardt DW, Wais R, Long SR (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85:673-681.

Ellis THN, Domoney C, Castleton J, Cleary W, Davies DR (1986) Vicilin genes of *Pisum*. *Mol Gen Genet* 205:164-169.

Ellis THN, Turner L, Hellens RP, Lee D, Harker L, Enard C, Domoney C, Davies DR (1992) Linkage maps in pea. *Genetics* 130:649-663.

Ellis THN, Hellens RP, Turner L, Lee D, Domoney C, Welham T (1993) On the pea linkage map. *Pisum Genetics* 25:5-12.

Endre G, Kaló P, Tárczy MH, Csanádi G, Kiss GB (1996) Reducing the tetraploid non-nodulating alfalfa (*Medicago sativa*) MnNC-1008(NN) germ plasm to the diploid. *Theor Appl Genet* 93:1061-1065.

Eppig JT, Nadeau JH (1995) Comparative maps: the mammalian jigsaw puzzle. *Curr Opinion in Gen and Dev* 5:709-716.

Fahrendorf T, Ni W, Shorrosh BS, Dixon RA (1995) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response. *Plant Mol Biol* 28:885-900.

Falisticco E, Falcinelli M, Veronesi F (1995) Karyotype and C-banding pattern of mitotic chromosomes in alfalfa, *Medicago sativa* L. *Plant Breeding* 114:451-453.

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.

Foote T, Roberts M, Kurata N, Sasaki T, Moore G (1997) Detailed comparative mapping of cereal chromosome regions corresponding to the *Ph1* locus in wheat. *Genetics* 147:801-807.

Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T (1992) Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol Biol* 19:89-107.

Gale MD, Devos KM (1998) Plant comparative genetics after 10 years. *Science* 282:656-659.

Gamas P, De Billy F, Truchet G (1998) Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtN1* and *MtN13*, encoding products homologous to plant defense proteins. *Mol Plant Microbe Interactions* 11:393-403.

Gebhardt C, Ritter E, Barone A, Debener T, Walkemeier B, Schachtschabel U, Kaufmann H, Thompson RD, Bonierbale MW, Ganai MW, Tanksley SD, Salamini F, (1991) RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theor Appl Genet* 83:49-57.

Geurts R, Franssen H (1996) Signal transduction in *Rhizobium*-induced nodule formation. *Plant Physiology* 112:447-453.

Geurts R, Heidstra R, Hadri AE, Downie JA, Franssen H, van Kammen A, Bisseling T (1997) Sym2 of pea is involved in a nodulation factor-perception mechanism that controls the infection process in the epidermis. *Plant Physiology* 115:351-359.

Gibson AH, Bergersen FJ (1980) Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. in *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Wiley and Sons Ltd. p. 139-184.

Gibson S, Somerville C (1993) Isolating plant genes. *Trends in Biotechnology* 11:306-313.

Gilpin BJ, McCallum JA, Frew TJ, Timmerman-Vaughan GM (1997) A linkage map of the pea (*Pisum sativum* L) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). *Theor Appl Genet* 95:1289-1299.

Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM (1992) Isolation of the *Arabidopsis ABI3* gene by positional cloning. *The Plant Cell* 4:1251-1261.

Gowri G, Paiva NL, Dixon RA (1991) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones and appearance of PAL transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing plants. *Plant Mol Biol* 17:415-429.

Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269:843-846.

Gregerson RG, Miller SS, Twary SN, Gantt JS, Vance C (1993) Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *The Plant Cell* 5:215-226.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin, RC, Gelbart, WM (1993a) Linkage I: Basic eukaryotic chromosome mapping. in *An introduction to genetic analysis*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company, p. 118-48.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin, RC, Gelbart, WM (1993b) Linkage II: Special eukaryotic chromosome mapping techniques. in *An introduction to genetic analysis*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company, p. 149-77.

Guo L, Paiva NL (1995) Molecular cloning and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) vestitone reductase, the penultimate enzyme on medicarpin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 320:353-360.

Györgyey J, Gartner A, Németh K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol* 16:999-1007.

Harrison MJ (1996) A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal* 9:491-503.

Heidstra R, Kozik A, Bisseling T, Lie TA (1992) Pea Nod⁻ mutants and Nod factor perception. in *New Horizons in Nitrogen Fixation*. (Palacios R, Mora J, Newton WE editors) Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 267-268.

Heun M, Gregorius HR (1987) A theoretical model for estimating linkage in F₂ populations with distorted single gene segregation. *Biometrical J* 4:397-406.

Hinze K, Thompson RD, Ritter E, Salamini F, Schulze-Lefert P. (1991) Restriction fragment length polymorphism-mediated targeting of the *ml-o* resistance locus in barley (*Hordeum vulgare*). *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3691-3695.

Hirsch AM, Bhuvaneswari TV, Torrey JG, Bisseling T (1989) Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1244-1248.

Hirsch AM, Fang Y (1994) Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol Biol* 26:5-9.

Hirt H, Páy A, Bögre L, Meskiene I, Heberle-Bors E (1993) *cdc2MsB*, a cognate *cdc2* gene from alfalfa, complements the G1/S but not the G2/M transition of budding yeast *cdc28* mutants. *Plant Journal* 4:61-69.

Imaizumi-Anraku H, Kawaguchi M, Koiwa H, Akao S, Syono K (1997) Two ineffective-nodulating mutants of *Lotus japonicus* - Different phenotypes caused by the blockage of endocytotic bacterial release and nodule maturation. *Plant Cell Physiology* 38:871-881.

Jacobsen E, Feenstra WJ. (1984) A new pea mutant with efficient nodulation in the presence of nitrate. *Plant Science Letters* 33:337-344.

Jonak C, Heberle-Bors E, Hirt H (1995) A cDNA from *Medicago sativa* encodes a protein homologous to small GTP-binding proteins. *Plant Physiology* 107:263-264.

Jonak C, Páy A, Bögre L, Hirt H, Heberle-Bors E (1993) The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ specific manner. *The Plant Journal* 3:611-617.

Jorgensen JH (1992) Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63:141-152.

Kaló P, Endre G, Zimányi L, Csanádi G, Kiss GB (1999) Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Theor Appl Genet* (nyomtatás alatt)

Kiss GB, Amin AA, Pearlman RE (1981) Two separate regions of the extrachromosomal ribosomal deoxyribonucleic acid of *Tetrahymena thermophila* enable autonomous replication of plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 1:535-543.

Kiss GB (1987) A szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő lucerna gének izolálása és jellemzése. Kandidátusi értekezés.

Kiss GB, Vincze É, Végh Z, Tóth G, Soós J (1990) Identification and cDNA cloning of a new nodule-specific gene, Nms-25 (nodulin-25) of *Medicago sativa*. Plant Mol Biol 14:467-475.

Kiss GB, Csanádi G, Kálmán K, Kaló P, Ökrész L (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. Mol Gen Genet 238:129-137.

Kiss GB (1997) A szimbiotikus nitrogénkötés génjeinek vizsgálata, genetikai térkép szerkesztése és annak alkalmazása lucernában. Akadémiai doktori értekezés

Kiss GB, Kereszt A, Kiss P, Endre, G (1998) Colormapping: a non-mathematical procedure for genetic mapping. Acta Biologica Hungarica 49:47-64.

Kiss GB, Endre G. Molekuláris markerek alkalmazása a növénygenetikában. (megjelenés alatt)

Kneen BE, LaRue TA (1988) Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweetclover (*Melilotus alba annua*). Plant Science 58:177-182.

Kneen BE, LaRue TA, Hirsch AM, Smith CA, Weeden NF (1990) *sym-13* a gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum*. Plant Physiology 94:899-905.

Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant Journal 4:403-410.

Korn GA, Korn TM (1975) Illeszkedés vizsgálat χ^2 -próbával. 622-623 és 943. old. Matematikai kézikönyv műszakiaknak. Műszaki Könyvkiadó, Budapest

Kozik A, Matvienko M, Scheres B, Paruvangada VG, Bisseling T, van Kammen A, Ellis THN, LaRue T, Weeden NF. (1996) The pea early nodulin gene *PsENOD7* maps in the region of linkage group I containing *sym2* and leghaemoglobin. Plant Mol Biol 31:149-156.

Kurata N, Moore G, Nagamura Y, Foote T, Yano M, Minobe Y, Gale M (1994) Conservation of genome structure between rice and wheat. Bio/technology 12:276-278.

Lagercrantz U, Lydiate DJ (1996) Comparative genome mapping in Brassica. Genetics 144:1903-1910.

Lagercrantz U, Putterill J, Coupland G, Lydiate D (1996) Comparative mapping in *Arabidopsis* and *Brassica*, fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time. Plant Journal 9:13-20.

Lagercrantz U (1998) Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that Brassica genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. Genetics 150:1217-1228.

Lander ES, Botstein D (1986) Mapping complex genetic traits in humans: new methods using a complete RFLP linkage map. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology LI. 1986:49-62.

- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J (1990) Symbiotic host-specificity of rhizobium meliloti is determined by a sulfated and acylated glucoseamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-784.
- Lesins KA és Lesins I (1979a) General key to *Medicago* species. in Genus *Medicago* (*Leguminosae*). The Hague-Boston-London: Dr. W Junk bv Publishers, p. 62-216.
- Lesins KA és Lesins I (1979b) Evolution in *Medicago*. in Genus *Medicago* (*Leguminosae*). The Hague-Boston-London: Dr. W. Junk bv Publishers, p. 46-52.
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chefdor F, Giraudat J (1994) *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264:1448-1452.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Liang P, Averboukh L, Pardee AB (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acid Research* 21:3269-3275.
- Liaud MF, Brinkmann H, Cerff R (1992) The β -tubulin gene family of pea: primary structures, genomic organization and intron-dependent evolution of genes. *Plant Mol Biol* 18:639-651.
- Lincoln S, Daly M, Lander E (1992) Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report 3rd edition
- Llewellyn DJ, Finnegan EJ, Ellis JG, Dennis ES, Peacock WJ (1987) Structure and expression of an alcohol dehydrogenase 1 gene from *Pisum sativum* (cv. "Greenfeast"). *Journal of Mol Biol* 195:115-123.
- Long SR (1996) *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *The Plant Cell* 8:1885-1898.
- Lorieux M, Perrier X, Goffinet B, Lanaud C, González De Leon D (1995) Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 2. F₂ populations. *Theor Appl Genet* 90:81-89.
- Lough TJ, Reddington BD, Grant MR, Hill DF, Reynolds PHS, Farnden KJF (1992) The isolation and characterization of a cDNA clone encoding L-asparaginase from developing seeds of lupin (*Lupinus arboreus*). *Plant Mol Biol* 19:391-399.
- Löbler M, Hirsch AM (1993) A gene that encodes a proline-rich nodulin with limited homology to PsENOD12 is expressed in the invasion zone of *Rhizobium meliloti*-induced alfalfa root nodules. *Plant Physiology* 103:21-30.
- Macherel D, Lebrun M, Gagnon J, Neuburger M, Douce R (1990) cDNA cloning, primary structure and gene expression for H-protein, a component of the glycine-cleavage system (glycine decarboxylase) of pea (*Pisum sativum*) leaf mitochondria. *Biochem J* 268:783-789.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Markwei CM és LaRue T (1992) Phenotypic characterization of *sym8* and *sym9*, two genes conditioning non-nodulation in *Pisum sativum* "Sparkle". Can J Microbiol 38:548-554.

Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science 262:1432-1436.

Mathews A, Carroll BJ, Gresshoff PM (1989) A new recessive gene conditioning non-nodulation in soybean. J Heredity 80:357-360.

Maxwell CA, Harrison MJ, Dixon RA (1993) Molecular characterization and expression of alfalfa isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase, an enzyme specifically involved in the biosynthesis of an *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Plant Journal 4:971-981.

McCoy TJ, Bingham ET. (1988) Cytology and cytogenetics of alfalfa. in Alfalfa and alfalfa improvement (Hanson AA, Barnes DK, Hill RR editors). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science of America, p. 737-76.

McGurl B, Swarup M, Kahn M, Ryan CA (1995) Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) cDNAs from alfalfa leaves (*Medicago sativa* var. Vernema): the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. Plant Mol Biol 27:995-1001.

McKhann HI és Hirsch AM (1994) Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest transcript levels occur in young roots and root tips. Plant Mol Biol 24:767-777.

Mead DA, Pey NK, Herrnstadt C, Marcil RA, Smith LM. (1991) A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. Bio/technology 9:657

Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science 282:662-682.

Meskiene I, Bögre L, Dahl M, Pirck M, Ha DTC, Swoboda I, Heberle-Bors E, Ammerer G, Hirt H. (1995) *cycMs3*, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G₀-to-G₁ transition of the cell cycle. The Plant Cell 7:759-771.

Meyer K, Leube MP, Grill E (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. Science 264:1452-1455.

Michaud R, Lehman WF, Rumbaugh MD (1988) World distribution and historical development. in Alfalfa and alfalfa improvement. 2. p. 25-92. (Hanson AA, Barnes DK, Hill RR editors) Madison Wisconsin, USA: Am. Society of Agronomy, Crop Science Society of Am., Soil Science Society of Am.

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. Proc Natl Acad Sci USA 88:9828-9832.

Monaco AP, Larin Z (1994) YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends in Biotechnology* 12:280-286.

Moore G (1995) Cereal genome evolution: pastoral pursuits with 'Lego' genomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 5:717-724.

Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* 7:869-885.

Nap JP, Bisseling T (1990) Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250:948-954.

Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D (1989) A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245:1434-1435.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-2770.

Orosz L (1979) Genetikai térképezés. Klasszikus és molekuláris genetika. Akadémiai Kiadó szerk. Orosz L. 107-152. old.

Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genetics* 85:985-993.

Park SJ, Buttery BR (1994) Inheritance of non-nodulation and ineffective nodulation mutants in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Heredity* 85:1-3.

Páy A, Jonak C, Bögre L, Meskiene I, Mairinger T, Szalay A, Heberle-Bors E, Hirt H (1993) The MsK family of alfalfa protein kinase genes encodes homologues of *shaggy/glycogen synthase kinase-3* and shows differential expression patterns in plant organs and development. *Plant Journal* 3:847-856.

Penmetsa RV, Cook DR (1997) A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its Rhizobial symbiont. *Science* 275:527-530.

Pepper A, Delaney T, Washburn T, Poole D, Chory J (1994) *DET1*, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in Arabidopsis, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* 78:109-116.

Pereira MG, Lee M, Bramel-Cox P, Woodman W, Doebley J, Whitkus R (1994) Construction of an RFLP map in Sorghum and comparative mapping in maize. *Genome* 37:236-243.

Peterson MA, Barnes DK (1981) Inheritance of ineffective nodulation and non-nodulation traits in alfalfa. *Crop Science* 21:611-616.

Pham JL, Glaszmann JC, Ghesquiére A, Second G (1990) Isozyme markers in rice: genetic analysis and linkage relationships. *Genome* 33:348-359.

Phillips DA, Teuber LR. (1992) Plant genetics of symbiotic nitrogen fixation. in *Biological Nitrogen Fixation*. (Stacey G, Burriss RH, Evans HJ editors) London: Chapman and Hall, p. 625-47.

- Pillen K, Steinrücken G, Herrmann RG, Jung C (1993) An extended linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including nine putative lethal genes and the restorter gene X. Plant Breeding 111:265-272.
- Pirck M, Hirt H, Heberle-Bors E (1994) The cDNA sequence encoding an annexin from *Medicago sativa*. Plant Physiology 104:1463-1464.
- Pramanik SK, Bewley JD (1993) A ubiquitin carrier preprotein cDNA from developing alfalfa embryos. Plant Physiology 102:1049-1050.
- Press WH, Flannery BP, Teukolsky SA, Vetterling WT (1989) Modeling of data. Least squares as a maximum likelihood estimator. in Numerical recipes. The art of scientific computing. Cambridge: Cambridge University Press, 14, 499-502.
- Presting GG, Frary A, Pillen K, Tanksley SD (1996) Telomere-homologous sequences occur near the centromeres of many tomato chromosomes. Mol Gen Genet 251:526-531.
- Prince JP, Pochard E, Tanksley SD (1993) Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. Genome 36:404-417.
- Pryor A. (1987) The origin and structure of fungal disease resistance genes in plants. Trends in Genetics 3:157-161.
- Putnoky P, Petrovics G, Kereszt A, Grosskopf E, Ha DTC, Bánfalvi Z, Kondorosi A (1990) *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. J Bacteriol 172:5450-5458.
- Quiros FC, Bauchan GR (1988) The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. p. 93-124. Hanson AA, Barnes DK, Hill RR, editors. Alfalfa and alfalfa improvement. Madison, Wis. American Society of Agronomy,
- Rédei PG. Genetika. Budapest: Mezőgazdasági kiadó - Gondolat, 1987; 8. fejezet, Kapcsoltság és crossing over eukariótákban. 151-86.
- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. Genetics 125:645-654.
- Rolfe BG, Gresshoff PM (1988) Genetic analysis of legume nodule initiation. Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol 39:297-319.
- Sagan M, Morandi D, Tarengi E, Duc G (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after γ -ray mutagenesis. Plant Science 111:63-71.
- Sánchez F, Padilla JE, Pérez H, Lara M (1991) Control of nodulation genes in root-nodule development and metabolism. Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol 42:507-528.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with the chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467.

Savouré A, Fehér A, Kaló P, Petrovics G, Csanádi G, Szécsi J, Kiss GB, Brown S, Kondorosi A, Kondorosi É (1995) Isolation of a full-length mitotic cyclin cDNA clone CycIIIMs from *Medicago sativa*: Chromosomal mapping and expression. *Plant Mol Biol* 27:1059-1070.

Schaff DA, Koehler SM, Matthews BF, Bauchan GR (1990) In situ hybridization of b-tubulin to alfalfa chromosomes. *The Journal of Heredity* 81:479-483.

Scheres B, van de Wiel C, Zalensky A, Horváth B, Spaink HP, van Eck H, Zwartkruis F, Wolters A-M, Gloudemans T, van Kammen A, Bisseling T (1990a) The ENOD12 gene product is involved in the infection process during pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* 2:687-700.

Scheres B, van Engelen F, van der Knaap E, van de Wiel C, van Kammen A, Bisseling T (1990b) Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *The Plant Cell* 2:687-700.

Schönfeld M, Ragni A, Fischbeck G, Jahoor A. (1996) RFLP mapping of three new loci for resistance genes to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) in barley. *Theor Appl Genet* 93:48-56.

Schultze M, Kondorosi É, Ratet P, Buiré M, Kondorosi A (1994) Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int Review of Cytology* 156:1-75.

Schwarzacher T (1994) Mapping in plants: progress and prospects. *Current Opinion in Genetics and Development* 4:868-874.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Mol Biol* 98:503-517.

Stanford AC, Larsen K, Barker DG, Cullimore JV (1993) Differential expression within the glutamine synthetase gene family of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 103:73-81.

Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268:661-667.

Sturtevant AH. (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J Exp Zool* 14:203-204.

SunY. és Skinner D.Z (1994) A phylogeny of *Medicago* species based on ribosomal DNA sequences. Report of the 34th North American alfalfa improvement conference. July 10-14. Guelp, Canada. 65 p.

Szczyglowski K, Shaw RS, Wopereis J, Copeland S, Hamburger D, Kasiborski B, Dazzo FB, De Bruijn FJ (1998) Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interactions* 11:684-697.

Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vincente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young WD (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160.

Tanksley SD (1993) Mapping polygenes. *Ann Rev Genet* 27:205-233.

- Turner SR, Ireland R, Rawsthorne S (1992a) Cloning and characterization of the P subunit of glycine decarboxylase from pea (*Pisum sativum*). *Journal of Biol Chem* 267:5355-5360.
- Turner SR, Ireland R, Rawsthorne S (1992b) Purification and primary amino acid sequence of the L subunit of glycine decarboxylase. Evidence for a single lipoamide dehydrogenase in plant mitochondria. *Journal of Biol Chem* 267:7745-7750.
- Turner SR, Ireland R, Morgan C, Rawsthorne S (1992c) Identification and localization of multiple forms of serine hydroxymethyltransferase in pea (*Pisum sativum*) and characterization of a cDNA encoding a mitochondrial isoform. *Journal of Biol Chem* 267:13528-13534.
- Turner SR, Hellens R, Ireland R, Ellis THN, Rawsthorne S (1993) The organisation and expression of the genes encoding the mitochondrial glycine decarboxylase complex and serine hydroxymethyltransferase in pea (*Pisum sativum*). *Mol Gen Genet* 236:402-408.
- Utrup LJ, Cary AJ, Norris JH (1993) Five nodulation mutants of white sweetclover (*Melilotus alba* Desr.) exhibit distinct phenotypes blocked at root hair curling, infection thread development, and nodule organogenesis. *Plant Physiology* 103:925-932.
- Vance CP, Johnson LEB (1983) Plant determined ineffective nodules in alfalfa (*Medicago sativa*): structural and biochemical comparisons. *Can J Bot* 61:93-106.
- Van Deynze AE, Nelson JC, Yglesias ES, Harrington SE, Braga DP, McCouch SR, Sorrells ME (1995) Comparative mapping in grasses. Wheat relationships. *Mol Gen Genet* 248:744-754.
- Vedel F, Delseny M (1987) Repetivity and variability of higher plant genomes. *Plant Physiol Biochem* 25:191-210.
- Verma DPS (1992) Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *The Plant Cell* 4:373-382.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23:4407-4414.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.
- Weeden NF, Marx GA (1984) Chromosomal locations of twelve isozyme loci in *Pisum sativum*. *J Heredity* 75:365-370.
- Weeden NF, Marx GA (1987) Further genetic analysis and linkage relationships of isozyme loci in the pea. *J Heredity* 78:153-159.
- Weeden NF, Kneen BE, LaRue TA. (1990) Genetic analysis of *sym* genes and other nodule-related genes in *Pisum sativum*. Nitrogen fixation: Achievement and Objectives 323-330 Chapman and Hall, Gresshoff, Roth, Stacey and Newton eds.
- Weeden NF, Swiecki WK, Timmerman-Vaughan GM, Ellis THN, Ambrose M (1996) The current pea linkage map. *Pisum Genetics* 28:1-4.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18:6531-6535.

Winicov I, Maki DH, Waterborg JH, Riehm MR, Harrington RE (1988) Characterization of the alfalfa (*Medicago sativa*) genome by DNA reassociation. *Plant Mol Biol* 10:369-371.

Wu SC, Györgyey J, Dudits D (1989) Polyadenylated H3 histone transcripts and H3 histone variants in alfalfa. *Nucleic Acid Research* 17:3057-3063.

9. FÜGGELÉK

9.1. A genotípusok szegregációs arányának tesztelése

Egy kodomináns marker öröklődését figyelve elméletileg az F_2 generációban az összes egyed $\frac{1}{4}$ -ének anyai homozigóta, másik $\frac{1}{4}$ -ének apai homozigóta, felének pedig heterozigóta genotípusúnak kell lennie. A genotípusok szegregálási arányának az elméleti 1:2:1 hasadási aránytól való eltérését a következő próbával teszteltük:

$$\chi^2_{segr} = \frac{(n_{AA} - \frac{n_{AA}+n_{Aa}+n_{aa}}{4})^2}{\frac{n_{AA}+n_{Aa}+n_{aa}}{4}} + \frac{(n_{Aa} - \frac{n_{AA}+n_{Aa}+n_{aa}}{2})^2}{\frac{n_{AA}+n_{Aa}+n_{aa}}{2}} + \frac{(n_{aa} - \frac{n_{AA}+n_{Aa}+n_{aa}}{4})^2}{\frac{n_{AA}+n_{Aa}+n_{aa}}{4}}$$

ahol n_{AA} = anyai homozigóta egyedek száma,
 n_{Aa} = heterozigóta egyedek száma,
 n_{aa} = apai homozigóta egyedek száma.

A számolt értékek az 1. táblázat χ^2_{segr} oszlopában vannak feltüntetve, a szabadságfok száma $df = 2$.

Annak eldöntésére, hogy a torzult szegregációs arányok az allélek eltérő megjelenési gyakoriságának (gametikus szelekció), vagy pedig a keletkező zigóták különböző életképességének (zigotikus szelekció) a következménye-e, további χ^2 -próbákat végeztünk (Pham és mtsai 1990). Egyenlő allélgyakoriság esetén az összes gaméták egyik fele „A”, a másik fele pedig „a” genotípusú, ennek megfelelően gametikus szelekció tesztelésére a következő χ^2 -próbát (χ^2_{gam}) használtuk:

$$\chi^2_{gam} = \frac{[(2 \times n_{AA} + n_{Aa}) - s]^2}{s} + \frac{[(2 \times n_{aa} + n_{Aa}) - s]^2}{s}, \text{ ahol „s” az összes gamétaszám fele:}$$

$$S = \frac{2 \times n_{AA} + 2 \times n_{Aa} + 2 \times n_{aa}}{2} = n_{AA} + n_{Aa} + n_{aa}$$

A kapott értékek az 1. táblázat χ^2_{gam} oszlopában vannak felsorolva, a szabadságfok száma $df = 1$.

Zigotikus szelekció bekövetkeztéről a genotípus gyakoriságok nem $p^2:2pq:q^2$ arány szerinti eloszlásának (nem random találkozásának) tesztelésével szerezhethetünk tudomást. Itt p az „A” allél, q pedig az „a” allél gyakorisága jelöli, ezek számítása pedig a

$$p = \frac{2 \times n_{AA} + n_{Aa}}{2 \times n_{AA} + 2 \times n_{Aa} + 2 \times n_{aa}} \quad \text{és a} \quad q = \frac{2 \times n_{aa} + n_{Aa}}{2 \times n_{AA} + 2 \times n_{Aa} + 2 \times n_{aa}}$$

képletekkel történt. A χ^2 -próba (χ^2_{zyg}) pedig a következőképpen néz ki:

$$\chi^2_{\text{zyg}} = \frac{(n_{AA} - n \times p^2)^2}{n \times p^2} + \frac{(n_{Aa} - 2 \times n \times p \times q)^2}{2 \times n \times p \times q} + \frac{(n_{aa} - n \times q^2)^2}{n \times q^2}$$

ahol n = összegyedszám

A kapott χ^2 értékeket az 1. táblázat χ^2_{zyg} oszlopában tüntettük fel, a szabadságfok száma $df = 2$.

9.2. Életképességi értékek kiszámítása

A Lorieux és mtsai (1995) által a torzult szegregációs arányt mutató markerek közötti rekombinációs gyakoriság meghatározására kidolgozott speciális maximum-likelihood egyenletek alkalmazásához szükség volt az adott genotípusú gaméták vagy zigóták életképességi értékeinek kiszámítására a különböző markerek esetén. A Lorieux és mtsai (1995) által kidolgozott, a rekombinációs gyakoriság és az életképességi értékek becslésére szolgáló speciális ML egyenletek egyidejű megoldását nem tudtuk végrehajtani, ezért először az életképességi értékeket kellett meghatároznunk, majd pedig azokat behelyettesítenünk a

rekombinációs gyakoriságot számoló maximum likelihood egyenletbe. A életképességi értékeket a következő képletek alapján számoltuk:

Kodomináns markerpár („A/a” és „B/b”) és gametikus szelekció esetén az „A” genotípusú gaméták életképessége az „a” genotípusú gamétákéhoz képest

$$(i) \quad u_g = \frac{2 \times n_{AA} + n_{Aa}}{2 \times n_{aa} + n_{Aa}} ,$$

a „B” genotípusú gaméták életképessége az „b” genotípusú gamétákéhoz képest pedig

$$(ii) \quad v_g = \frac{2 \times n_{BB} + n_{Bb}}{2 \times n_{bb} + n_{Bb}} ,$$

ahol n_{BB} = anyai homozigóta egyedek száma,

n_{Bb} = heterozigóta egyedek száma,

n_{bb} = apai homozigóta egyedek száma.

Kodomináns markerpár („A/a” és „B/b”) és zigotikus szelekció esetén az „AA” genotípusú zigóták életképessége az „aa” genotípusú zigótákéhoz képest

$$(iii) \quad u_1 = \frac{n_{AA}}{n_{aa}} ,$$

az „Aa” genotípusú zigóták életképessége az „aa” genotípusú zigótákéhoz képest

$$(iv) \quad u_2 = \frac{n_{Aa}}{2 \times n_{aa}} ,$$

az „BB” genotípusú zigóták életképessége az „bb” genotípusú zigótákéhoz képest

$$(v) \quad v_1 = \frac{n_{BB}}{2 \times n_{bb}} ,$$

az „Bb” genotípusú zigóták életképessége az „bb” genotípusú zigótákéhoz képest pedig

$$(vi) \quad v_2 = \frac{n_{Bb}}{2 \times n_{bb}} .$$

Egy kodomináns-marker és egy domináns marker közötti rekombinációs gyakoriság becslését csak a kodomináns markerek sorrendjének meghatározása után végeztük. A domináns markereket a színtérképezés módszerével (5.4.4. fejezet és Kiss és mtsai 1998) helyeztük el a kodomináns markerek között a legvalószínűbb sorrendjüknek megfelelően. Gametikus szelekción átesett domináns marker esetén nem lehet megállapítani a domináns és recesszív genotípusú gaméták pontos számát, hiszen nem tudjuk a heterozigóta egyedek számát. Ennek következtében a kétféle genotípusú gaméta egymáshoz viszonyított életképességét sem tudjuk megállapítani, ezért kodomináns marker és domináns marker gametikus szelekciója esetén a domináns markerekkel rendelkező gaméták életképességi értékeit a két legközelebbi kodomináns markerre jellemző életképességi értékek számtani közepeként határoztuk meg:

$$(vii) \quad u_g = \frac{u_C + u_D}{2}, \text{ ahol } u_C \text{ és } u_D \text{ az (i) egyenlet szerint meghatározott}$$

életképességi érték a domináns marker két oldalán található két legközelebbi kodomináns markerre („C” és „D”) nézve. A kodomináns marker esetén természetesen szintén az (i) egyenletet alkalmaztuk.

Kodomináns marker és domináns markerpár („A/a” és „B/b”) és zigotikus szelekció esetén a domináns markernél a B_ genotípusú zigóta életképességi értékét a bb genotípusúéhoz képest a következőképpen határoztuk meg, amikor a „B” allél volt domináns:

$$(viii) \quad u = \frac{n_{BB} + n_{Bb}}{3 \times n_{bb}}, \text{ és ekkor a kodomináns markernél pedig a}$$

$$(ix) \quad v_1 = \frac{n_{AA}}{n_{aa}} \quad \text{és} \quad v_2 = \frac{n_{Aa}}{2 \times n_{aa}} \quad \text{egyenleteket}$$

használtuk.

Ha a „b” allél volt domináns, akkor pedig a b_ genotípusú zigóta életképességét a BB genotípusúéhoz képest az

$$(x) \quad u = \frac{n_{bb} + n_{Bb}}{3 \times n_{BB}} \quad \text{egyenlettel határoztuk meg. A kodomináns}$$

markernél pedig ekkor a

$$(xi) \quad v_1 = \frac{n_{aa}}{n_{AA}} \quad \text{és} \quad v_2 = \frac{n_{Aa}}{2 \times n_{AA}} \quad \text{egyenleteket}$$

használtuk.

9.3. A térképező populáció 137 egyedének a 121 vázmarkerre meghatározott genotípusa

A genotípust számokkal kódoltuk, 1-sel az anyai, 3-sal az apai homozigóta, 2-sel a heterozigóta genotípusokat, 5-sel a nem apai homozigóta, 4-sel pedig a nem anyai homozigóta genotípusokat jelöltük. A hiányzó genotípusadatokat 0-val jeleztük. A markereket a dolgozatban leírt módszerekkel meghatározott sorrendjüknek megfelelően raktuk sorba. A szegregáló populáció egyedeinek sorszáma az ábrák alsó részében láthatók.

[illegible]

LG 7[illegible]

LG 8

L590	2222212332712227122222131222312202032112221132210222332322222212322122223232121311221213212121215322232232222222032123312322300122
U161	220221233271222212202221312022312222327122221152212202332232022220222322122223232121311201213212121201532223222222221732123311502322122
CG19	2222212222122221222222121222232212123021222212322102222322322220222222711222232301212111212132121210012322220222200021221122311222320122
U594	2220212222211222102022212120023221212302122221232212202232230222222222211222232321212111012132121212212322220022202021221102311222222122
L482	222221222221222212222221222222200121222212222123021222222222222222200221122222301212222212122222212212222222222200022221202211202222122
U281	222222222322222122220222220222221312222222112220212222223222222122022222211212223212222122222022120122222222122222222122221222222212
U119	2022222222222121222222220222221312222222121222112222122322222212222222211212223212222322222212012222222212222221212222122222212
QG8A	22322222222231222323222222232321222222212123112322112321222221222222222121222321232232222231221223321232222123212202222212
U336	013222202222312223232222320032321222020212122322322112321222212022222211211223123202322222312012212233215032231232122222212212
U515B	21300202010203122323222322232232122122222212102322322112321220212022222311121122231232023222212312012212323312322331013221220002122312
U86A	22322322212223123232322223223212212232221223222322211321222212222322311121122231232223222123122122123231213232331232122222222312

[illegible]

10. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Referált folyóiratokban megjelent közlemények

- Kiss, G.B., Csanádi, G., Kálmán, K., **Kaló, P.**, Ökrész, L., (1993) Construction of a basic genetic map of *Medicago* using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. Mol Gen Genet 238:129-137.
- Csanádi, G., Szécsi, J., **Kaló, P.**, Kiss, P., Endre, G., Kondorosi, Á., Kondorosi, E., and Kiss, G.B. (1994). ENOD12, an early nodulin gene, is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. Plant Cell 6:201-213.
- Savouré, A., Fehér, A., **Kaló, P.**, Petrovics, G., Csanádi, G., Szécsi, J., Kiss, G.B., Brown, S., Kondorosi, Á., and Kondorosi, É. (1995). Isolation of a full-length mitotic cyclin cDNA clone CycIIIMs from *Medicago sativa*: Chromosomal mapping and expression. Plant Mol Biol 27:1059-1070.
- Endre, G. **Kaló, P.**, Hangyel Tárczy, M., Csanádi, G., and Kiss G.B. (1996). Reducing the tetraploid non-nodulating alfalfa (*Medicago sativa*) MnNC-1008(NN) germ plasm to the diploid level. Theor Appl Genet 93:1061-1065.
- Siffelova, G., Pavelkova, M., Wiesner, I., Nasinec, V., Kiss, G.B., **Kaló, P.**, Csanádi, G., Endre, G., and Felföldi, K. (1996) Genetic map of diploid alfalfa based on DNA markers. J Exp Botany 47:31.
- Jurcoane, S., Peres, A., **Kaló, P.**, Kiss, G.B., Cornea, A. P. Vatafu, I. (1997) Preliminary data concerning the amplification and purification of the gene which enhances proteases production in *Bacillus subtilis*. Roumanien Biotechnol Letters 2:461-468.
- Kaló, P.**, Endre, G., Zimányi, L., Csanádi, G., Kiss, G.B. (1999) Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Theor Appl Genet (nyomtatás alatt)

Összefoglalók

- Kiss, G.B., Csanádi, G., Endre, G., **Kaló, P.** (1994) Mapping alfalfa. Rice Biotechnology Quarterly 19:28.

Kongresszusi kiadványok, könyvfejezetek

- Kiss, G.B., Csanádi, G., Kálmán, K., **Kaló, P.**, and Ökrész, L. (1993). Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. In: R. Palacios, J. Mora, and W.E. Newton, (eds). New horizons in nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 355.

- Kaló, P., Endre, G., Csanádi, G., Felföldi, K., and Kiss, G.B. (1994).** An Improved linkage map of *Medicago sativa*. In: Proceedings of the "1st European Nitrogen Fixation Conference" and the Workshop on "Safe Application of Genetically Modified Microorganisms in the Environment". G.B. Kiss and G. Endre, (eds). Officina Press, Szeged, Hungary, pp. 330.
- Kiss, G.B., Kaló, P., Endre, G., Csanádi, G., and Felföldi, K. (1994).** An improved linkage map for alfalfa. In: Proceedings of the "1st European Nitrogen Fixation Conference" and the Workshop on "Safe Application of Genetically Modified Microorganisms in the Environment". G.B. Kiss and G. Endre, (eds). Officina Press, Szeged, Hungary, pp. 169-173.
- Endre, G., Kaló, P., Csanádi, G., Kiss, P., Felföldi, K., and Kiss, G.B. (1995).** Generating diploid non-nodulating alfalfa mutant from a tetraploid germplasm. In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications. I. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, and W.E. Newton, (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 482.
- Kiss, G.B., Kaló, P., Csanádi, G., Felföldi, K., Kiss, P., and Endre, G. (1995).** Map based cloning system in *Medicago* suitable for isolating genes involved in leaf morphogenesis, nodule formation and effectiveness of nitrogen fixation. In: I. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, and W.E. Newton, (eds). Nitrogen fixation: fundamentals and applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 437-442.
- Kiss, G.B., Kaló, P., Felföldi, K., Kiss, P., and Endre, G. (1996).** An improved linkage map of alfalfa (*Medicago sativa*) and its use to map seed protein genes as well as genes involved in leaf morphogenesis and symbiotic nitrogen fixation. In: G. Parente, J. Frame, and S. Orsi, (eds.) Grassland and land use systems. ERSa, Gorizia, Italy pp. 919-923.
- Kiss, G.B., Kaló, P., Felföldi, K., Kiss, P., and Endre, G. (1997).** Genetic linkage map of alfalfa (*Medicago sativa*) and its use to map seed protein genes as well as genes involved in leaf morphogenesis and symbiotic nitrogen fixation. In Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Eds. Legocki, A., Bothe, H., Pühler, A. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 279-282.
- Endre, G., Kaló, P., Kereszt, A., Kiss, P., and Kiss, G.B. (1997)** Genetic Analysis of *Medicago sativa* nodulation genes. In: Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Eds. Elmerich, C., Kondorosi A., Newton, W.E. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 315-316
- Kiss, G.B., Kaló, P., Kiss, P., Felföldi, K., Kereszt, A., and Endre, G. (1997)** Construction of an improved genetic map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*) using a novel linkage analysis for chromosomal regions exhibiting extreme distorted segregation. In: Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Eds. Elmerich, C., Kondorosi A., Newton, W.E. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 313.

11. SUMMARY

11.1. Introduction

Medicago and some other leguminous plants are capable to establish N-fixing symbiotic association with soil bacteria belonging to the genus *Rhizobia*. During the symbiotic interactions between the host plants and the bacteria highly organized structures, the symbiotic nodules develop on the plant roots. The endosymbiotic form of the bacteria, called bacteroids in the nodules reduce the atmospheric nitrogen gas to ammonia which can be utilized by the host plant.

Since the formation of root nodules involves several developmental steps, the *Rhizobium*-legume nitrogen fixing symbiosis requires the highly coordinated symbiotic-specific expression of several bacterial and plant genes. The study of these genes is essential to understand the formation, the maintenance and the regulation of the symbiotical nitrogen fixation. However, in comparison to the bacterial genes, relatively few plant genes involved in the symbiotic process are isolated and characterized. Plant genes responsible for the nodule formation and the maintaining the function of the nodules are called nodulin genes. Several nodulin genes were isolated based on their differential expression in nodules or infected roots and other plant organs especially non-infected roots, though there is no evidence that these nodulin genes have essential functions in the symbiosis (Csanádi et al. 1994). Mutants defective in the symbiotic process provide powerful tools to investigate the steps of the nodule development and function guaranting the affected genes play significant roles in the symbiotic nitrogen fixation and furthermore provide an opportunity for isolation the mutant gene by map-based cloning. Two main categories of legume symbiotic mutants are distinguished based on their reduced nodule formation ability and/or nitrogen fixing efficiency. The plants which can not form nodules in the presence of wild type bacteria are non-nodulating mutants and mutants developing nodules on their roots in the presence of wild bacteria strain but unable to fix

nitrogen are named ineffective mutants. The diploid alfalfa mutant, Fix1 (McIN6) which was isolated and characterized by G. B. Kiss (1987) belongs to this mutant category.

One of the possible approaches to isolate genes involved in symbiotic nitrogen fixation is the map-based cloning strategy. According to this approach the map position of the gene of interest (the mutant gene) has to be determined on a genetic map. The genetic maps are constructed by the use of linkage values [recombination fractions (RFs) and LOD scores] calculated by the pair-wise linkage analysis of the genetic markers. The RFs are estimated from the determined genotypes of markers by the maximum-likelihood (ML) method ("classical" ML equation; Allard 1956) using computer programs (e.g. Mapmaker\Exp 3.0; Lander et al. 1987 and Lincoln et al. 1992). Nowadays linkage maps are constructed by the use of molecular markers (PCR-based and RFLP markers). As a next step in the map-based cloning, the vicinity of the mutant locus has to be saturated with molecular markers to detect close markers as close as possible. Chromosomal walking has to be performed from the closest molecular markers to reach the gene of interest. The gene isolation has to be followed by the complementation of the mutant plant with the wild type allele of the gene to prove that the required gene was isolated indeed.

Our group studies the symbiotic interaction between *Rhizobium meliloti* and *Medicago sativa*. We intend to isolate plant genes impaired in the symbiotic nitrogen fixation process by map-based cloning. Since possessing an alfalfa linkage map is a necessary condition to carry out this approach, our group started to construct the basic linkage map of diploid alfalfa at the beginning of 90's. The first basic genetic map of diploid *Medicago* has been developed by analysing the linkage relationships of 89 RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers (Kiss et al. 1993) in an F₂ segregation population derived from a cross between the diploid *Medicago sativa* ssp. *coerulea* and the diploid *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata*. The 89 markers were localized on eight linkage groups which corresponded to the haploid chromosome number of diploid alfalfa. Our aim was to saturate the genetic map with molecular markers and

to determine the map position cDNA clones with known function to facilitate the mapping of genes which have essential roles in the process of symbiotic nitrogen fixation and to promote the genome comparison of *Medicago* with other species.

11.2. Results and discussion

11.2.1. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*)

The genotypes of hundreds of RFLP and PCR-based markers were determined to develop the saturated linkage map of diploid alfalfa. As more and more markers were mapped on the basic linkage map by the use of Mapmaker/Exp 3.0 mapping program, it turned out that some markers showed linkages equal to markers mapped earlier on different linkage groups. To solve these discrepancies, we restarted the construction of the linkage map of alfalfa from the beginning. As a first step 121 codominant markers (so-called core markers) were selected and analyzed thoroughly to establish a frame map.

First the recombination fractions (RFs) and the pertaining LOD scores were determined by “two-point” linkage analysis of 121 core markers. These linkage values were used to establish groups of markers by the “group” command of Mapmaker/Exp 3.0 program altering the parameters of grouping. Tightening the parameters of grouping the markers were distributed in more and more groups (Figure 1. and Table 2.). Because the *Medicago* haploid chromosome number is eight we investigated those cases when the analysis resulted in eight groups. We observed that the marker composition of the eight groups in some cases was identical, but in other cases was different, so it was impossible to determine whether which groups represented the genuine eight linkage groups of alfalfa. Therefore the markers of six groups - where the marker composition was always identical - were analyzed thoroughly. The genetic analysis performed with the Mapmaker/Exp 3.0 program revealed that in five groups out of six, the order of the markers could be established unambiguously, but at the sixth group, the determination of

the marker order was unsuccessful. Comparing the marker composition of the five groups to the linkage groups (LGs) of the basic genetic map (Kiss et al. 1993), it turned out that these five groups corresponded to LG 1, LG 2, LG 3, LG 4 and LG 5, respectively.

We investigated the segregation ratio of the genotypes for the core markers and realized that several of them showed significant distortion. The typical source of deviation is the disturbed function of gametes or zygotes, due to the selection of one or more genes acting at different development stages. The type of the selection can be determined by using two successive χ^2 test (Pham et al. 1990), where the first one tests the equality of the of the allelic frequencies (test for gametic selection) and the second one tests the independent assortment of the alleles (test for zygotic selection). Calculating the χ^2 tests, it turned out that the zygotic selections detected at several core markers resulted in the overwhelming number of heterozygous genotypes. It also turned out that the majority of the core markers showing the most significant distortion were accumulated in the group (group *CDE* in Figure 1.) where the order of the markers could not be determined. Based on this phenomenon we suspected that markers displaying extreme distorted segregation may be responsible for the failure of proper grouping and setting the marker order in this group.

It was demonstrated by Lorieux et al. (1995) that in the case of zygotic selection the calculation of recombination fractions by the “classical” maximum-likelihood (ML) estimation (Allard 1956) resulted in significantly lower RFs if the viability of the individuals with heterozygous genotypes exceeded tenfold the viability of the individuals with homozygous genotypes (which is similar to the viability differences detected in the case of the markers in the group where the determination of the marker order was failed). We supposed that these lower RF values calculated by the “classical” ML estimation could cross-link markers which otherwise belong to different linkage groups.

Lorieux et al. (1995) developed “special” maximum-likelihood formulas to analyze the linkage relationships between dominant and codominant markers that are under gametic or

zygotic selection. The “special” ML formula developed for zygotic selection between codominant markers was supposed to eliminate the disturbing effect of the distorted segregation between the markers displaying this phenomenon. Therefore all of the RF values between the core markers of the group with ambiguous marker order were calculated with this “special” ML formula. Using the exclusion threshold of 0.3 for RFs, the markers could be split unambiguously into three distinct linkage groups. Based on the marker composition of these three groups and the LGs of the basic genetic map of alfalfa (Kiss et al. 1993), they represented the LG 6, LG 7 and LG 8, respectively. So the disturbing effect of the overwhelming number of heterozygous genotypes could be eliminated by the use of the “special” ML formulas and the colormap method. According to our knowledge, the establishing of the eight linkage groups of alfalfa was the first practical usage of the “special” ML formulas (Lorieux et al. 1995) to construct a linkage map containing several markers displaying significant distorted segregation ratio.

The genetic analysis demonstrated that some markers had belonged to other LGs in the previous map. The reason of these rearrangements was the lack of sufficient marker saturation in the previous genetic map as well as the false linkage values between the markers with extreme distorted segregation ratio calculated by the “classical” ML formula. The genetic analysis of the 121 core markers performed with the combination Mapmaker/Exp. 3.0 and the “special” ML formulas resulted in eight linkage groups which most probably represent the eight haploid chromosomes of the diploid *Medicago sativa*.

The linkage relationships were also demonstrated and analyzed by colormapping (Kiss et al. 1998). The colormap proved to be a rapid and suitable method to determine the linkage relationships between markers displaying extreme distorted segregation ratio. The linkage analysis with colormap could be performed without any mathematical calculation. This method produced the same eight linkage groups established by the above described manner.

The order of the core markers within the eight linkage groups was determined based on the RFs calculated by the “special” ML formulas. The determination of the RFs was followed by

the calculation of the genetic distances in cM using the Haldane function. This established map, called “frame map” was used afterwards to map more than 800 additional, mostly dominant molecular markers.

The 803 additional markers were distributed into the eight linkage groups by the combined use of Mapmaker/Exp. 3.0 program, the “special” ML formulas and the colormap. All of the additional markers could be mapped in one of the eight linkage groups without modifying the established linkage relationships which ensured us that eight LGs represented the eight genuine LGs of alfalfa. After determining the order of the markers, the RFs between the neighbouring markers were calculated by the appropriate “special” ML formulas for the selection type as determined by the χ^2 tests and the genetic distances were determined by using the Haldane function. Based on these genetic distances the genetic map of alfalfa was drawn (Figure 4/a-h).

The constructed detailed linkage map of alfalfa contains 924 markers of which eight were morphological, one resistance, 269 RFLP (236 cDNA and 33 genomic markers) and 607 RAPD markers, two were detected exclusively by specific PCR amplification, as well as 10 isozyme and 26 seed protein markers were mapped. The 924 genetic markers span 753 centimorgan in genetic distance and the correlation between the physical and genetic distance is 1000-1300 kb per cM on average taking the DNA content of the haploid genome as 750-1000 Mbp (Winicov et al. 1988 and Arumuganathan and Earle 1991). The map position of several nodule specific genes among the 94 genes with known function or sequence were determined. The genetic mapping of two multicopy genes, localized by cytological experiments earlier allowed us to correlate LG 6 (ribosomal RNA genes) with chromosome No. 8 carrying the Nucleolus Organizing Region detected by cytology (McCoy and Bingham 1988, Bauchan and Campbell 1994 and Falistocco et al. 1995) and LG 4 carrying the β -tubulin genes with the small metacentric or another submetacentric chromosome to which these genes hybridized *in situ* (Schaff et al. 1990).

The markers showing extreme distorted segregation ratio were investigated thoroughly. The majority of the core markers (63%) showed distorted segregation ratios where the 1:2:1 ratio was skewed towards the heterozygous genotypes. The explanation of this phenomenon is not clear but it is assumed that viability factors may play an important role during fertilization, embryogenesis, seed development and the ontogenesis of the plants. The excess number of heterozygous genotypes for several markers may be characteristic for outcrossing plant species like alfalfa, in which the heterozygous configuration may be advantageous for viability. As alfalfa plants suffer inbreeding severely, heterozygosity is essential for their viability. When the mapping population was established we observed that 10% of the alfalfa seeds did not germinate and about third of the seedlings died before they could develop into mature plants. We suspected that plants with the missing homozygous genotypes could be among these non-germinated and the dead seedlings. To reveal at what developmental stage the selection acted against homozygous genotypes, extended F_2 populations in different developmental stages were tested for segregation distortion. Segregation ratio was determined for five distorted markers in F_2 plants which were either healthy living plants, seedlings which showed abnormal morphology consequently did not develop to whole plants and seeds originated from the self mating of the F_1 plant. Based on the determined segregation ratios it seemed that the selection against the missing genotypes occurred before seed germination, consequently, events preceding this developmental stage (e.g. fertilization, zygote differentiation, seed development) could be the primary cause of distorted segregation in the analyzed regions.

11.2.2. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*

The detailed linkage map of diploid alfalfa was compared with the genetic maps of pea (Weeden et al. 1996 and Ellis et al. 1992 and 1993) on the basis of the linkage arrangements of markers mapped in common between the two species. There are five smaller or larger regions of the *Medicago sativa* genetic map where the gene order were similar to those found in the

corresponding linkage groups of pea. In the future we intend to expand the comparative genetic studies to the entire genome of the two species since the detected collinearity potentially facilitates the identification of genes involved in the symbiotic nitrogen fixation process.

11.2.3. Saturation of the region containing the *fix1* mutant gene

The diploid ineffective alfalfa mutant, the Fix1 (McIN6) develops nodules but is incapable to utilize the atmospheric nitrogen in the presence of *Rhizobium meliloti* (Kiss 1987). Earlier the Fix1 individual plant was crossed with the yellow-flowered *M. sativa* ssp. *quasifalcata* k93 and the generated F₁ plants were self-mated to produce segregation populations (“Fix” populations). RFLP and PCR markers were used earlier to determine the map position the *fix1* (*in₆*) mutation close to the U69 RFLP marker in linkage group 7 (Kiss 1997).

RAPD markers were generated using 240 10-base-long oligonucleotide primers to saturate the region of the vicinity of the *fix1* mutation by the so-called bulked segregant analysis method (Michelmore et al. 1991). Thirteen RAPD markers were mapped in this region by the use of this method and the mapping of other RFLP markers revealed that the *fix1* mutation located between U69 and L83 RFLP markers which were mapped in 4.6 cM genetic distance from each other. The aim of our work is to determine the map position of the *fix1* mutation as accurate as possible, therefore the screening for tightly linked markers to the *fix1* locus will be continued.