

B3598

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 tézisei



Készítette: Kaló Péter

Témavezető: Dr. Kiss György Botond

BEVEZETÉS

Az élő szervezetek egyik nélkülözhetetlen alkotó eleme a nitrogén. A bioszféra jelentős mennyiségű nitrogénkészlete N_2 gáz formában van jelen, amelyet azonban a legtöbb élőlény nem képes közvetlenül hasznosítani. A nitrogéngáz megkötésére, ammóniává történő redukálására csak néhány mikroorganizmus képes. Ezen mikroorganizmusok egy része egy magasabbrendű növényi partnerrel létrehozott szimbiózisban végzi a légköri nitrogén megkötését. A szimbiotikus nitrogénkötés kialakulása egy több lépésből álló összetett folyamat, amelynek során a gazdanövény gyökerén a baktérium által indukált új szervek, a gyökérgümők jelennek meg, amelyekben a baktériumok által végzett nitrogén redukció és asszimiláció folyik. A szimbiotikus nitrogénkötés már régóta a tudományos érdeklődés középpontjában áll. A szimbiotikus gümő kialakulásához nélkülözhetetlen bakteriális gének közül már többet azonosítottak és jellemeztek, és így a nitrogénkötő mikroorganizmusokban lejátszódó folyamatokról bőséges ismeretanyaggal rendelkezünk. A gazdanövények genomjának bonyolultabb szerveződése, valamint a vizsgálatukhoz szükséges molekuláris biológiai módszerek és eszközök hiánya, illetve fejletlensége miatt a növényi partnerek vizsgálata később indult meg. Ezek a vizsgálatok eddig még nem hoztak igazán nagy áttörést, hiszen a szimbiotikus gümő kialakításában, és a hatékony szimbiotikus nitrogénkötés fenntartásában résztvevő növényi gének közül eddig keveset azonosítottak. A szimbiózis kezdeti lépéseiben, a baktérium és a gazdanövény közötti jelcserében bizonyítottan szerepet játszó növényi géneket pedig egyáltalán nem ismerjük. A szimbiotikus nitrogénkötés létrehozásában és fenntartásában szerepet játszó gének azonosításához nagy segítséget jelenthetnek a folyamatban hibás növényi mutánsok. A megakadt gümőfejlődésből, vagy hibás funkcióból következtethetünk arra, hogy a folyamat mely lépéseiben vehet részt a mutációt szenvedett gén, a gén

azonosítása után pedig a géntermék szimbiotikus nitrogénkötésben betöltött szerepét is megérthetjük. A mutációt szenvedett gén izolálására a legbiztosabb módszer a térképezésen alapuló génizolálás. A módszer szerint a meghatározott térképhelyzetű mutációhoz közel eső molekuláris markerektől elindulva „genomsétával” azonosítjuk a kérdéses szenvedett gént. A mutáns és a vad allél szekvenciája közti különbségből gyaníthatjuk, illetve a vad típusú alléllal végzett genetikai komplementációval bizonyíthatjuk, hogy valóban a mutációt szenvedett gént izoláltuk.

Az MTA SZBK Genetikai Intézetének Lucerna Genetikai Csoportja a lucerna (*Medicago sativa*) és *Rhizobium meliloti* között létrejövő szimbiotikus kapcsolat kialakulását és működését vizsgálja genetikai módszerekkel. A lucerna gazdanövény szimbiotikus nitrogénkötésben betöltött szerepének tanulmányozásához szükséges genetikai vizsgálati rendszerek egyik alappillére a lucerna kapcsoltsági térképe.

Az eukarióta élőlények örökítő anyaga kromoszómákba szerveződik. A gének a kromoszómákon lineárisan helyezkednek el, és így csoportokba rendeződve jutnak át az utódokba. Ennek megfelelően ezen csoportok számának meg kell egyezniük az élőlény haploid kromoszómaszámával. A kromoszómákon a különböző gének alléljai a rekombinációnak nevezett folyamat révén elválhatnak egymástól, a bekövetkező rekombináció gyakorisága pedig arányos a gének közötti távolsággal. A gének közötti rekombinációs gyakoriságok meghatározásával a gének sorrendbe rakhatók, aminek grafikus megjelenítése a kapcsoltsági, vagy genetikai térkép. A genetikai térképek nagy elméleti és gyakorlati jelentőséggel bírnak. Az eukarióta genomok komplexitásuk miatt tisztán molekuláris biológiai, génszézési módszerekkel nehezen kezelhetők. A genetikai térképek azonban jelentősen megkönnyítik a nagy genomok genetikai vizsgálatát, pl. nagy segítséget jelentenek a térképezésen alapuló génizolálásban. Különböző rokonsági viszonyban lévő élőlények részletes genetikai térképeinek

összehasonlításából pedig genomszerveződésükről kaphatunk információt, melyek származástani kérdések tisztázására adnak lehetőséget. A genetikai térképek segítségével meghatározhatók gazdasági és agronómiai szempontból fontos tulajdonságokért felelős gének térképhelye, valamint lehetőség nyílik mennyiségi tulajdonságok (QTL) kialakításáért felelős lókuszok térképezésére is.

ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉS

A csoportunkban zajló kutatások célja a szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő mutáns gének azonosítása a térképezésen alapuló génizolálás módszerével. A módszer megvalósításában nagy segítséget jelent egy részletes, molekuláris markerekkel sűrűn telített genetikai térkép. Kutatásaink kezdetén nem állt rendelkezésünkre a lucerna genetikai térképe, ezért először elkészítettük annak alaptérképét két diploid *Medicago sativa* alfaj (ssp. *coerulea* és ssp. *quasifalcata*) keresztezéséből származó F₂ szegregáló populáción 89 morfológiai és molekuláris marker felhasználásával. Az alaptérkép nyolc kapcsoltsági csoportjának markertelítettsége azonban nem volt kielégítő mutáns gének térképhelyének meghatározására és finom térképezésére. Célunk ezért egy olyan kapcsoltsági térkép létrehozása volt, amellyel a mutációt szenvedett, a szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő gének térképhelyét meghatározhatjuk. Ezen kívül reményeink szerint sokrétűen kihasználhatjuk a genetikai térkép egyéb előnyeit is (pl. genomösszehasonlítás, elméleti kérdések, stb.). A dolgozat témáját képező vizsgálatok megkezdésekor ezért a következő feladatokat tűztük ki célul.

1. Munkánk elsődleges célja az alaptérkép minél több morfológiai és molekuláris markerrel történő bővítése volt. Ehhez elsősorban RFLP és polimeráz láncreakción alapuló (RAPD és specifikus amplifikációval előállított)

markerek genotípusait kellett meghatározni a szegregáló populáció 137 egyedére. A betérképezett markerek segítségével egy markerrel sűrűn telített genetikai térkép létrehozása volt a célunk.

2. Minél több ismert funkcióval rendelkező gén térképhez való megállapítását is terveztük elvégezni, ami a lucerna kapcsoltsági térképét a későbbiekben alkalmassá tehetik más rokon, és kevésbé rokon fajok genetikai térképével való összehasonlításra.

3. A térképezett markerek egy részénél a genotípusok szegregációs arányának erőteljes torzulását figyeltük meg, a legtöbb esetben a heterozigóta genotípusok túlsúlyát tapasztaltuk. Egy markerre nézve a homozigóta genotípusú egyedek számának csökkenése feltételezhetően a csökkent életképesség következménye. Ezért vizsgálatokat terveztünk annak eldöntésére, hogy a növényi egyedfejlődés melyik fázisában zajlik le a homozigóta genotípusú egyedek szelekciója.

4. Olyan DNS klónok térképhez való megállapításával, melyeket már más diploid lucerna genetikai térképek elkészítéséhez is használtak, tervbe vehettük az eddig közölt lucerna kapcsoltsági térképek összehasonlítását.

5. A lucerna kapcsoltsági térképe lehetőséget nyújt olyan, a szimbiotikus nitrogénkötésben szerepet játszó, illetve annak során kifejeződő gének térképhez való megállapítására, amelyek feltehetően szimbiotikus nitrogénkötésre képtelen növényfajokban nem fordulnak elő. Ezért célul tűztük ki ezen gének elhelyezkedésének, és kópiaszámának meghatározását a lucerna genomában. A szimbiotikus nitrogénkötés során specifikusan kifejeződő gének felhasználhatók pillangós virágú növények genomjának összehasonlítására. Ezek alapján a lucerna, és egyik közeli rokonának, a borsó genetikai térképének összehasonlítását is terveztük.

6. Csoportunkban korábban Dr. Kiss György Botond munkatársaival a diploid *Medicago sativa* ssp. *coerulea* populációból izolálta a FixI szimbiotikus növényi mutáns. A mutáns növény kötött nitrogént nem

tartalmazó tápközegben és gazdabaktérium (AK631) jelenlétében mutatja a nitrogénhiány jellegzetes tüneteit (klorózis), míg kötött nitrogént tartalmazó tápközegben (virágföld) a vad típusú növényekhez hasonló, normális fenotípust mutat, azaz a növény szimbiotikus nitrogénkötésre nézve “ineffektív”. A mutációt szenvedett gén térképhelyét a *Fix1* mutáns növény és a *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* növény keresztezésével létrehozott F₂ szegregáló populáción korábban Dr. Csanádi Gyula határozta meg a hetes kapcsoltsági csoporton (LG 7). Feladatomban volt a *fix1* mutáns gén térképhelyének pontosítása a bővített kapcsoltsági térkép markereivel, valamint további, a mutációhoz szorosan kapcsolódó markerek keresése.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- rekombináns DNS-technikák (plazmid és növényi DNS izolálás, DNS molekulák restrikciós enzimmel történő emésztése, DNS fragment izolálás, DNS elválasztás akrilamid és agaróz gélen, DNS-DNS hibridizáció)
- növény genetikai módszerek (növények vegetatív szaporítása, önbeporzása, keresztezése, szimbiotikus növényi teszt)
- genotípus meghatározási módszerek (RFLP, specifikus PCR, RAPD, SSCP)
- kapcsoltság számítás klasszikus és speciális maximum likelihood képletek segítségével; számítógépes programokkal történő kapcsoltság meghatározás (MapMaker/Exp 3.0, Linkage1)
- markerek kapcsoltságának vizsgálata szintérkép segítségével
- χ^2 számítás a szegregációs arány kapott értékeinek vizsgálatára
- számítógépes oligonukleotid tervezés

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A lucerna genetikai alaptérképének markerekkel történő bővítéséhez meghatároztuk a térképező populáció egyedeinek genotípusát több száz markerre nézve. A markereket genotípus adataik alapján a Mapmaker/Exp 3.0 számítógépes program segítségével helyeztük el az alaptérkép nyolc kapcsoltsági csoportján. A genetikai térkép markerekkel történő telítése során felfigyeltünk arra a jelenségre, hogy számos marker genotípusainak szegregációs aránya jelentősen eltért az elméleti 1:2:1 aránytól, a legtöbb esetben a heterozigóta genotípusok erőteljes túlsúlyát észleltük. Ez azt jelentette, hogy az ezekben a lókusokban heterozigóta genotípusú egyedek sokkal életképesebbek voltak mint a homozigóta genotípusúak. A heterozigóta genotípusok túlsúlyával rendelkező markerek kapcsoltságának az elterjedten használt klasszikus maximum likelihood számítási eljárással, és különböző térképező programok használatával történő vizsgálatok azt tapasztaltuk, hogy ezek a markerek az alaptérkép különböző kapcsoltsági csoportjain elhelyezkedő, szintén erősen torzult szegregációs arányt mutató lókusokhoz erős kapcsoltságot mutattak. Az elterjedten használt térképezési módszerekkel nem tudtunk egyértelműen nyolc kapcsoltsági csoportot kialakítani. Az alaposabb vizsgálatokból kiderült, hogy a heterozigóta genotípusok túlsúlyával rendelkező markerek térképezése okozott legtöbbször problémát. Feltételezésünk szerint a genotípusok jelentősen torzult szegregációs arányával rendelkező markerek között számolt kapcsoltsági értékeket a heterozigóta genotípusok túlsúlya jelentősen módosította. A torzító hatás következtében a valósnál nagyobb kapcsoltságot (azaz kisebb rekombinációs gyakoriságot) számoltunk a hagyományos rekombinációs gyakoriság meghatározási módszerekkel az erősen torzult szegregációs arány mutató markerek között.. Ezért feltételeztük, hogy a torzult rekombinációs gyakorisági értékek

következtében mutattak, a genetikailag egyébként nem kapcsolt markerek erős kapcsolságot. Ebben az állapotban több száz marker genotípus adatai álltak a rendelkezésünkre, viszont ezek kapcsolsági viszonyai részben ellentmondásosak voltak, és így nem tudtunk nyolc valódi kapcsolsági csoportot kialakítani. Ezért alapos vizsgálatnak vetettünk alá 121 kodomináns kiértékelésű marker kapcsolsági értékeit. Megkülönböztetett figyelemmel kísértük a jelentős szegregációs arány torzulást mutató markerek kapcsolsági viszonyait. A túlsúlyban lévő heterozigóta genotípusoknak a kapcsolsági értékekre kifejtett torzító hatását három különböző módszerrel tudtuk kiküszöbölni.

(i) A markerek páronkénti összehasonlítása során a rekombinációs gyakoriságokat kiszámoltuk oly módon, hogy a számításához használt adatsorból kihagytuk azokat a növényeket, melyek mindkét vizsgált markerre nézve heterozigóta genotípusúak voltak. Ennek eredményeként csak a mindkét markerre nézve megegyező homozigóta genotípusú (ún. „homozigóta kapcsolat”) és az eltérő genotípusú egyedek adatai maradtak az adatsorban. Azok a markerek, melyek között nem volt „homozigóta kapcsolat” nem kapcsoltak mutatkoztak, azok pedig, amelyek között volt azonos homozigóta genotípusú egyed, kapcsoltak bizonyultak.

(ii) A csoportunkban kifejlesztett szintértékepezési módszerrel szintén tisztázni tudtuk a nagyszámú heterozigóta genotípussal rendelkező markerek kapcsolsági viszonyait. Az előző módszerhez hasonlóan a szintértékepezés is a „homozigóta kapcsolatok” hangsúlyozottabb figyelembevételén alapszik. Ez a két módszer genetikai távolság meghatározásra közvetlenül nem volt alkalmas, de a markerek kapcsolsági viszonyait egyértelműen tisztázhattuk segítségükkel.

(iii) Figyelembe kellett vennünk, hogy egy markerpár vizsgálata esetén az egyes genotípus kategóriák előfordulása nemcsak a rekombinációs gyakoriságtól függ, hanem a különböző genotípusú egyedek életképességétől is.

Az irodalomban korábban közölt, a különböző genotípusú egyedek eltérő életképességét figyelembe vevő speciális maximum likelihood egyenletek alkalmazásával határoztuk meg a vázmarkerek közötti rekombinációs gyakoriságokat. Ismereteink szerint eddig gyakorlati probléma megoldására nem használt speciális maximum likelihood egyenletekkel sikerült a túlsúlyban lévő heterozigóta genotípusok torzító hatását megszüntetni, és a vázmarkereket egyértelműen nyolc kapcsoltsági csoportba elhelyezni.

Az általunk alkalmazott mindhárom módszer alkalmas volt a markerek közti rekombinációs gyakoriságot befolyásoló, a nagyszámú heterozigóta genotípus okozta torzító hatás kiküszöbölésére. A három módszer alkalmazásával ugyanazokat a kapcsoltsági csoportokat tudtuk felállítani, és azokon belül a markerek sorrendje is azonos volt.

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 G5a markerek esetében. Magféhérje preparátumokat két dimenziós poliakrilamid gélen elválasztva 26 magféhérje markert sikerült térképeznünk.

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 (750-1000 Mbp) kb. 1000-1300 kilobázis 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 történhet.

2. Az ismert funkcióval vagy szekvenciával rendelkező 93 gén és morfológiai bélyeg betérképezésével 129 lókuszt azonosítottunk a lucerna genomban. Ezek között számos szimbiózis specifikus, vagy a szimbiotikus nitrogénkötés során a gümőben intenzíven kifejeződő gén található (Lb, ENOD és NOD gének, AAT, GS, Mtst, stb.). Korábban már citológiaiilag lokalizált gének térképezésével két kapcsoltsági csoportot meg tudunk feleltetni a lucerna két kromoszómájával.

A térképező populáció egyedeinek meghatároztuk a liztharmat-érzékenységét. A liztharmatfertőzéssel szembeni rezisztenciáért felelős lókuszt a második kapcsoltsági csoportra térképeződöt recesszív marker.

3. A térképezett markerek egy részénél a genotípusok szegregációs arányának az elméleti aránytól való jelentős eltérést tapasztaltuk. A legtöbb esetben a homozigóta genotípusok erőteljes csökkenését figyeltük meg. Ismereteink szerint ilyen erőteljes, és a genom ilyen nagy részére kiterjedő, a heterozigóta genotípusokat előnyben részesítő szegregációs arány torzulást eddig még nem írtak le. Néhány marker esetén az egyedfejlődés különböző fázisaiban megvizsgált genotípus arányok alapján megállapítottuk, hogy a homozigóta genotípusú egyedek számának csökkenése már a magállapotban bekövetkezett. Egy adott régióban megfigyelhető szegregációs arány torzulás valószínűleg több, a genom különböző részéről keletkező géntermékek együttes kölcsönhatásának lehet az eredménye. A felnevelt szegregáló populáció egyedeinél tapasztalt szegregációs arány torzulás feltételezhetően az egyedfejlődés különböző fázisaiban lejátszódó, egymásra rakódó szelekciós események következménye. A jelenség magyarázható azzal, hogy a lucerna egy idegenbeporzó növény. Az utódok közül a heterozigóta génösszeállítású egyedek szelekciós előnyt élveznek a viszonylag több, homozigóta génösszeállítású egyedekkel szemben.

4. Közös betérképezett markerek segítségével elvégeztük a más kutató csoportok által készített diploid lucerna genetikai térképek összehasonlítását. A

genom nagy részén az összehasonlítás egyezést mutatott, a tapasztalt eltérések okait (biológiai vagy technikai) eddig még nem tudtuk azonosítani.

5. A lucerna és a borsó genetikai térképeinek összehasonlítása során négy kapcsoltsági csoport részlet esetében azonos markersorrendet tudtunk megállapítani. Ez az eredmény kiindulási alapot adhat a két rokon növény genomjának teljes összehasonlítására.

6. A genetikai térkép elkészítésének célja a szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő növényi gének térképezésén alapuló génizolálásának elősegítése. A csoportunkban vizsgált szimbiotikus nitrogénkötésben mutáns növények egyike a korábban izolált Fix1 növény. A mutációt szenvedett gén térképhelyének elvégeztük a pontosítását, és azonosítottunk további kapcsolt markereket. Eszerint a mutáns gén az U69 és L83 markerek között egy 4.6 cM nagyságú régióban helyezkedik el, ami az átlagosan 1 cM-ra eső genomméretet figyelembe véve egy 4600-6000 kb nagyságú szakaszt fed le a genomban. A mutáció még pontosabb betérképezéséhez további, szorosan kapcsolt markerek keresése, valamint a régióban rekombinációt mutató növények azonosítása folyamatban van.

Munkánkat összefoglalva elmondhatjuk, hogy a lucerna genetikai térképének létrehozásával megteremtettük annak a lehetőségét, hogy meghatározhassuk a szimbiotikus nitrogénkötésben, vagy egyéb biológiai folyamatban résztvevő, mutációval azonosított gének térképhelyzetét. A térképhely ismerete nagy segítséget jelenthet ezen gének klónozásában, csoportunkban jelenleg ezzel a módszerrel intenzíven folyik két, a szimbiotikus folyamatban résztvevő gén vizsgálata. A folyamatosan bővülő, ismert funkcióval rendelkező gének térképhelyzetének ismerete alapot nyújthat a lucerna genomjának más kétszikű növények genomjával való összehasonlításra. Reményeink szerint a közeljövőben néhány fontosabb agronómiai, illetve mennyiségi tulajdonság térképezésére is lehetőség nyílik a részletes genetikai térkép alkalmazásával.

KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ 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.

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.

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

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.

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.

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)

2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

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. The 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 CycIII_Ms from *Medicago sativa*: Chromosomal mapping and expression. Plant Mol Biol 27:1059-1070.

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.

- 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.
- 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 Biotechnology Letters* 2:461-468.
- 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 21th 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 21th Century*. Eds. Elmerich, C., Kondorosi A., Newton, W.E. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 313.