

József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

**Variabilitás, mitokondriális genomszerveződés elemzése és a
mtDNS rekombináció értelmezése két imperfekt fekete
Aspergillus faj esetében**

Doktori (PhD) Értekezés



Készítette: Kozma-Bognárné Hamari Zsuzsanna
Témavezető: Dr. Kevei Ferenc
Készült: JATE Mikrobiológiai Tanszék

Szeged
1999

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. Tartalomjegyzék	1
2. Bevezetés	2
3. Irodalmi áttekintés	5
Az <i>Aspergillus</i> nemzetség rövid áttekintése	5
Vegetatív kompatibilitási kapcsolatok	8
Polimorfizmus vizsgálatok	10
A mitokondriális DNS szerveződése fonalas gombákban	10
Intronok eloszlása különböző fonalagomba fajok mitokondriális genomjában	12
Az intronok rövid általános jellemzése	13
Az intronok jellemzése, különös tekintettel az I. típusú intronokra	14
4. Anyagok és módszerek	18
4.1. Felhasznált mikroorganizmusok, vizsgált gombatörzsek	18
4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	18
4.3. Felhasznált oldatok, pufferek, enzimek	21
4.4. Vizsgálati módszerek, kísérleti technikák	26
5. Eredmények és értékelés	32
5.1. Polimorfizmus vizsgálata és értelmezése.	32
5.1.1. A mitokondriális genom és a nukleáris rDNS polimorfizmus vizsgálata <i>A. carbonarius</i> fajok izolátumai körében. <i>A. carbonarius</i> izolátumok mitokondriális DNS RFLP vizsgálata során meghatározott három eltérően szerveződő mitokondriális genom részletes vizsgálata. Restriktív és funkcionális térképek készítése és összehasonlító elemzése.	32
5.1.2. A mitokondriális genom és a nukleáris rDNS polimorfizmus vizsgálata <i>A. japonicus</i> faj izolátumai körében.	44
5.2. Mitokondrium transzmisszió, mitokondriális rekombináció értelmezése.	48
Mitokondrium transzmisszió megvalósítása protoplasztfúzióval <i>A. japonicus</i> izolátumok körében, mitokondriális rekombináns utódok izolálása, szülői és rekombináns mitokondriális DNS-ek összehasonlító vizsgálata.	48
6. Összefoglalás	63
7. Angol nyelvű összefoglalás	67
8. Irodalomjegyzék	71
9. Köszönetnyilvánítás	79

2. BEVEZETÉS

Az *Aspergillus niger* fajaggregátum molekuláris jellemzésével világossá vált, hogy az imperfekt fekete *Aspergillus* fajok extrakromoszómális elemei (mtDNS, RNS vírusok, plazmidok) erőteljes polimorfizmust mutatnak, szemben a teljes életciklussal bíró fajokkal (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*). Az imperfekt gombák kevésbé ismert voltukat szexuális életciklusuk hiányának köszönhetik. A klasszikus genetikai módszerek alkalmazásához a fajon belüli keresztezhetőség elsődleges szempont. A paraszexuális ciklus felfedezése új távlatokat nyitott az imperfekt gombák körében, de a teljes életciklussal bíró fajok esetében is bővíti az elemzések lehetőségét. A paraszexuális ciklus jól használható genetikai vizsgálatokban kapcsoltsági viszonyok meghatározására és extrakromoszómális elemek rekombinálódásának vizsgálatára. Felhasználóságának egyedüli korlátja az imperfekt gombák (így a fekete *Aspergillusok*) körében tapasztalt nagyfokú genetikai diverzitás, és ennek következtében a széleskörű intraspecifikus vegetatív inkompatibilitás, mely azonban protoplasztfúzió segítségével esetenként áthidalható. Vegetatív inkompatibilitás esetén az anasztomózis útján létrejövő heterokarion állapot nem tud kialakulni. Bizonyos esetekben a heterokarionikus állapot gátja az anasztomózisra való képtelenség, s ilyenkor protoplasztfúzió alkalmazásával mesterségesen heterokarionikus állapot hozható létre. A vegetatív inkompatibilitási rendszer megakadályozhatja a nukleáris állományok keveredését, ugyanakkor lehetőséget nyújt az extrakromoszómális elemek transzmissziójára, és azok esetleges rekombinálódására. A vegetatív kompatibilitási kapcsolatok háttérében egy összetett, sok gént érintő genetikai rendszer áll (Glass és Kuldau, 1992; Leslie és mtsi, 1993; Esser és Blaich, 1994), melyet a humán szövetspecifitást determináló genetikai rendszerrel lehetne párhuzamba vonni. Számos gén több allélja határozza meg egy egyed kompatibilitási genotípusát, így két egyed akkor tud természetes körülmények között heterokariont létrehozni, ha kompatibilitási rendszerük minden génje, s azoknak minden allélja megegyezik. Minthogy a szexuális

életciklussal nem rendelkező gombák rekombinálódásának egyedüli lehetősége a paraszexuális ciklus, melynek körülményei és feltételei tisztázottá váltak, az imperfekt gombák tanulmányozása is fellendült.

Ezek az előzmények indokolták tanszékünkön a heterokarion kompatibilitási viszonyok vizsgálatát a fekete *Aspergillus* fajok (*A. niger* fajaggregátum, *A. japonicus* és *A. carbonarius*) körében. Az eredmények azt mutatták, hogy nagyfokú a heterokarion inkompatibilitás, nem csak a fent említett közel rokon fajok között, de még az egy fajhoz tartozó izolátumok körében is. Annak felderítésére, hogy a jelenség létrejöttében milyen meghatározó tulajdonságok állnak, molekuláris módszereket vezettek be az egyedi izolátumok jellemzésére. E vizsgálatok ha a jelenséget megmagyarázni nem is, a kompatibilitási viszonyokat azonban valószínűsíteni tudják. A jellemzésre bevezetett új módszer volt az izoenzim analízis, a magi rDNS RFLP (restriction fragment length polymorphisms), a mtDNS RFLP vizsgálatok, továbbá a RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) analízis. A fekete *Aspergillus*okon belül az *A. niger* fajaggregátum körében jellemezték először a polimorfikus bélyegeket. A sejtmagi rDNS és a mtDNS RFLP mintázatai alapján a fajaggregátum tagjait három fő csoportba tudták sorolni, melyről utóbb kiderült, hogy a fajaggregátumot alkotó három *Aspergillus* faj képviselői, név szerint az *A. niger*, az *A. tūbingensis* és az *A. brasiliensis* fajoké (Varga és mtsi, 1994). A fő csoportokon belül további alcsoportokat tudtak elkülöníteni, melynek alapja a mtDNS *HaeIII*-*BglII* restrikciós endonukleázokkal történő kettősemésztése volt. A mitokondriális DNS mérete az *A. brasiliensis* kivételével 30-33 kb között változott. Az *A. japonicus* és *A. carbonarius* fajokat mint külső kontrollt használták az *A. niger* fajaggregátum jellemzésekor. Ezek a fajok már akkor kitűntek jelentősen eltérő molekuláris jellegekkel. Főként a mtDNS méretük alapján váltak érdekessé számunkra, amely az *A. niger* fajgyűjtemény tagjaihoz viszonyítva kétszeres méretet is elérhetett. A kutatások ezen stádiumában kerültem szakdolgozóként a JATE Mikrobiológiai Tanszékére, ahol feladatomban a két, mtDNS szempontjából "különleges" *A. japonicus* és *A. carbonarius* fajok izolátumainak molekuláris markerekkel történő

jellemzését kaptam. PhD dolgozatom tárgya is e két faj, melyek körében tapasztalt nagyfokú mtDNS polimorfizmus eredetét, okait igyekeztem feltárni. Az *A. japonicus* fajon belül végrehajtott mitokondrium transzmissziós kísérletek eredményeként létrejött mitokondriális rekombináns utódokat hoztunk létre. Ezek vizsgálatával a mitokondrium rekombinációjának molekuláris szintű értelmezését igyekeztem megadni.

CÉLKITŰZÉS

Céлом: két *Aspergillus* nemzetségbe tartozó faj izolátumainak molekuláris markerekkel történő vizsgálata. A mitokondriális DNS polimorfizmust mint molekuláris markert vizsgáltam. Az *A. carbonarius* faj izolátumainak mitokondriális genomja között megfigyelt különbségeket fizikai térképekkel és szekvenciaadatokkal magyaráztam.

Az egyes *Aspergillus japonicus* izolátumok között protoplasztfúzióval végrehajtott sikeres mitokondrium transzmisszió során létrejött rekombináns mitokondriális genommal bíró utódok mitokondriális DNS-eit összehasonlítottam a két szülőivel és a rekombinációs eseményeket szekvenciaszinten értelmeztem.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az *Aspergillus* nemzetség rövid áttekintése

Az *Aspergillus* fajok teleomorfiái, szexuális alakjai a fonalas aszkuszos gombák közé sorolhatók. A Webster-féle rendszertani besorolás szerint (Webster, 1986) a valódi gombák törzsébe (*Eumycota*), az aszkuszos gombák (*Ascomycotina*) altörzsébe, az *Eurotiales* rend, *Trichocomaceae* családjába tartoznak. Az Alexopoulos-féle taxonómiai kézikönyv 1996-ban megjelent negyedik kiadása (Alexopoulos és mtsi, 1996) a rend és család besorolás érintetlenül hagyásával, az *Aspergillus*-okat a valódi gombák (Kingdom *Fungi*) országán belül az önálló *Ascomycota* törzsnek abba a *Filamentous Ascomycetes* osztály rangú csoportjába sorolja, amelyre a kleisztotéciumos termőtest képzés jellemző.

Az *Aspergillus* nemzetség az eukarióta fonalas mikroszervezetek egyik legintenzívebben vizsgált csoportja. A taxonómusok a nemzetség tagjait úgynevezett fajcsoportos rendszerbe sorolták. 18 fajcsoportot különítettek el, névadójukként az egyes csoportok legismertebb fajai szerepelnek (Raper és Fennell, 1965). Az *Aspergillus niger* fajcsoportot, amely vizsgálati objektumainkat magába foglalja, a szakzsargon "fekete *Aspergillus*"-okként említi. A fajcsoport kifejezés helyett újabban a section-t használják (section *Nigri*) (Gams és mtsi, 1985). Az *A. niger* fajcsoporton belül korábban nagyszámú fajt írtak le. Az arra vonatkozó összehasonlító elemzések, hogy a külön fajként leírt egyedi izolátumok halmazán belül a valódi fajhatárokat próbálják körülírni, mindössze 7 faj elkülönítését eredményezték (Croft és mtsi, 1984). Ezek közé tartoznak a jól körülírható *A. japonicus* és *A. carbonarius* fajok, továbbá az *A. niger* gyűjtőfaj vagy fajaggregátum.

A génusz tagjai fontosságukat két tényezőnek köszönhetik. Egyrészt hasznosak, ipari termelésben alkalmazzák többféle metabolit gazdaságos előállítására, másrészt kártevők, illetve közegészségügyi szempontból kórokozóként tartják őket számon.

Az iparilag jelentős fajok között vezető helyen találjuk az *A. niger* törzseket, de fontosak pl. az *A. terreus*, *A. wentii*, *A. fumigatus* különböző izolátumai, ezek az élelmiszer- és gyógyszeriparban nélkülözhetetlen szerves savakat, enzimeket és antibiotikus hatású anyagokat termelnek.

Egészségügyi szempontból két ok miatt jelentős az *Aspergillus* nemzetség. Egyrészt számos faja – *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* – emberre és állatra veszélyes mikotoxinokat termelhet, melyek az emberi, állati fogyasztásra kerülő növényi termékeket szennyezve, toxinnal "fertőzik" meg a fogyasztót. Hazai vonatkozásban elsősorban a gabonafélék fertőzöttsége okozhat problémát. Az import növényi termékek között a földimogyoró és a kávé komoly szennyezésével kell számolnunk. A mikotoxinok különböző kóros élettani (pl. az ochratoxin nefrotoxikus) hatása mellett, azok karcinogén következményeivel is számolni kell. Egyes *Aspergillus*-ok más jellegű egészségkárosító hatása is jelentős. Mint oportunista patogének, tüdőmikózisok okozói lehetnek. A tüdő mélymikózisok kialakításában az *A. fumigatus*-é a vezető szerep, de sok gondot okoz az *A. niger* is. Extrém foglalkozási betegségként jegyezték fel a fűszerpaprika kézi feldolgozása időszakában a paprika hasítását végző asszonyok kezén kialakuló körömágy mikózist, amit a szárítás során elszaporodó, elsősorban *A. niger* okozott. Egyes biotópokon való nagytömegű elszaporodásuk esetén lokálisan nagymennyiségű spóra (konídium) levegőbe kerülésével számolhatunk, ami igen erős allergén lehet, sokszor faji hovatartozástól függetlenül is.

Az *Aspergillus* fajok számos növényi megbetegedést is okozhatnak, ilyen pl. a mogyoró koronarothadása, a mandulafák klorózisa, a hagyma rothadása. A génusz egyes tagjai alacsony vízaktivitás értékek mellett, magas ozmótikus nyomás mellett is képesek szaporodni, emiatt fontos szerepük lehet a raktározott termények, tárolt gyümölcsök, zöldségfélék károsításában. Mint másodlagos raktári kártevők, az *A. glaucus*, *A. halophilus*, *A. restrictus*, *A. chevalieri*, *A. amstelodami* törzsek említhetők. A szárazabb termőterületeken az *A. flavus* és *A. parasiticus* fajok mint a gyapot és kukorica kártevői is számottevők (Cotty és mtsi, 1994).

Az *Aspergillus* nemzetség gazdaságilag legfontosabb képviselői, mint arra már a fentiekben utaltunk, a fekete *Aspergillus* fajok (sectio *Nigri*). E szekcióba tartozó törzseket széles körben alkalmazzák különféle szerves savak, a citromsav, glukonsav előállítására. Nélkülözhetelen enzimeket termelnek velük, a különböző amilázok, pektináz, laktáz, mellett a növényi eredetű keményítő feltárását biztosító egyik alapenzim, a glükóamiláz termelése is a fekete *Aspergillus* fajokhoz kötődik. Az *A. niger* törzsek által termelt különféle enzimek (pektináz, celluláz, lipáz, glukóz-oxidáz, kataláz), illetve a citromsav és a glukono- δ -lakton rendelkeznek az amerikai FDA (Food and Drug Association) által adott GRAS (Generally Regarded As Safe) minősítéssel, amely étel- és italfélékben való közvetlen forgalmazásukat biztosítja (Roehr, 1992; Berka és mtsi, 1992). Hasonló engedéllyel az *Aspergillus* fajok közül csak az *A. oryzae* által termelt enzimek rendelkeznek.

A nemzetség biológiai szempontból legjobban ismert faja az *A. nidulans* (teleomorfa *Emericella nidulantes*), amelyet a fonalas aszkuszos gombák között a *Neurospora crassa*-val, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgombákkal együtt a legrészletesebben tanulmányozott eukarióta modellszervezetként tartanak számon (Smith és mtsi, 1977).

Elméleti, biológiai fontosságukat az adja, hogy a nemzetségen belül egyaránt találkozhatunk olyan szekciókkal amelyekbe teljes életsiklusú szervezetek tartoznak (sectio *Nidulantes*), olyanokkal, ahová csak imperfekt fajok sorolhatók (sectio *Nigri*), és vannak, amelyekbe imperfektek mellett perfekt fajok is találhatóak (sectio *Fumigati*). A fekete *Aspergillusok* tagjai imperfektek, szexuális életsiklussal nem rendelkeznek. Nagy genetikai heterogenitás, sokszínűség jellemzi őket, melynek egy markáns megnyilvánulása az izolátumok közötti nagyfokú paraszexuális inkompatibilitás.

Vegetatív kompatibilitási kapcsolatok

Mint ahogy a bevezetőben is elhangzott, a vegetatív kompatibilitási kapcsolatok háttérében bonyolult genetikai rendszer áll. Hogy ennek jelentőségét könnyen áttekinthessük, szólni kell a paraszexuális ciklus főbb stádiumairól és azok jellegzetességeiről.

A paraszexuális ciklust bevezető esemény két sejt anasztomózisa, mely során heterokariotikus állapot jön létre. Ekkor kis gyakorisággal ugyan, de bekövetkezhet kariogámia, mely a nukleáris genetikai információcsere szempontjából fontos állapot. Ezt követően több generáción keresztül megvalósuló haploidizáció révén létrejön az új egyed, mely a kiindulási két egyed nukleáris állományához képest eltérő, rekombináns genetikai állománnyal rendelkezik. A kariogámia nagyon kis valószínűséggel jön létre (10^{-5} - 10^{-9}), a gyakoriságot a kereszteződő törzsek tulajdonságai befolyásolják. A paraszexuális ciklusnak azonban a sejtmagi rekombinációtól függetlenül is jelentős szerepe van, ugyanis végbemehet alatta az extrakromoszómális elemek (így a mitokondriális genom) szabad rekombinációja. Így lehetőség nyílik a mitokondriális genom rekombinációjának vizsgálatára, mely rekombináció csak akkor történhet meg, ha nincs külső korlátozó tényező, mely ezeket a folyamatokat megakadályozhatja. Ilyen tényező a szexuális ciklus létezése. A teljes ciklussal bíró mikroorganizmusok mitokondriumai a szexuális keresztezések során uniparentális (főként maternális) öröklődést mutatnak (Birky, 1978; 1983; 1994; Smith és mtsi, 1990; Yang és Griffiths, 1993; Boynton és mtsi, 1987; Kawano és mtsi, 1995). A szexuális ciklus kizárja a mitokondriális DNS rekombinációját, így az imperfekt gombák azok a szervezetek, amelyek szexuális ciklus hiányában nem rendelkeznek a mitokondriális genom rekombinációját korlátozó mechanizmusokkal. Részben ez is eredményezhet a természetben előforduló imperfekt gombákat jellemző erős mitokondriális DNS polimorfizmust. Az előzőekben említett okok a már meglévő polimorfikus változatok részben eliminálódását, másrészt fennmaradását és gazdagodását biztosítják, de a

természetes mitokondrium változatok keletkezése az evolúciós léptékű mutációs események következménye.

Visszatérve a vegetatív inkompatibilitást meghatározó rendszerekhez, a paraszexuális ciklus első mozzanata, az anasztomózis, többféle képpen is gátlódhat. Az egyik, mely protoplasztfúzió segítségével áthidalható, feltehetően a falszerkezet változásából, illetve az anasztomózist "levezénylő" autokatalitikus enzimrendszer működésképtelenségéből ered. A másik, mely még protoplasztfúzióval sem kerülhető el, a kompatibilitási gének bonyolultabb rendszerének következménye. A *Podospora* esetében megfigyeltek egy "killing" effektusra visszavezethető inkompatibilitási jelenséget (Esser és Blaich, 1994), amely esetben a vegetatív inkompatibilis törzsek találkozásakor ún. "barrage" reakció alakul ki, proteolitikus enzimek tevékenysége révén.

A kompatibilitási rendszer lehet allélikus, és nem-allélikus (illetve átfedő). Egy-egy mikroorganizmus faji hovatartozástól függően rendelkezhet nem-allélikus (*Heterobasidion annosum*; Chase és Ullrich, 1990a; 1990b), vagy allélikus kompatibilitási rendszerrel (*A. nidulans*; Esser és Blaich, 1994), illetve egyszerre mindkettővel (*P. anserina*; Turcq és mtsi, 1990; Esser és Blaich, 1994). A nem-allélikus rendszernél egyedi génekhez kapcsolható a kompatibilitás. Ha két szervezet kompatibilitási génjeikben megegyezik, akkor azok potenciálisan képesek heterokarion képzésre. Ha egy génjükben is eltérést mutatnak, akkor az eltérő gén inkompatibilitásban betöltött szerepétől függően vagy kizárja a heterokarion képzést, vagy pedig csökkent fitness-szel, de képes heterokariont létrehozni (Croft, 1987). Az allélikus rendszereknél több gén számos alléljának összessége határoz meg egy kompatibilitási genotípust. Csak akkor jöhet létre teljes értékű heterokarion, ha két szervezet minden érintett génjének minden allélja megegyezik. Ebben a rendszerben is vannak kisebb illetve erősebb befolyásoló szereppel bíró gének, vagy allélok, melyek két szervezet relációjában ha eltérést mutatnak vagy kizáró, vagy megengedő szereppel bírnak a heterokarion képzést illetően (Leslie és mtsi, 1993; Glass és Kuldau 1992).

Polimorfizmus vizsgálatok

A teljes életciklussal rendelkező *A. nidulans* esetében intraspecifikus polimorfizmust még heterokarion inkompatibilis törzsek között sem tudtak kimutatni (mtDNS, rDNS, izoenzim analízis) (Croft és mtsi, 1984; 1987). Közeli rokon fajok között kismértékű mtDNS polimorfizmust észleltek, a jelenséget intronok jelenlétével vagy hiányával, szám és méretbeli eltéréssel magyarázták (Croft és mtsi, 1987; Earl és mtsi, 1981; Turner és mtsi, 1982). Fajon belüli heterokarion inkompatibilitás létezik, de protoplasztfúzióval létrehozhatók heterokarionok, továbbá a section *Nidulantes* rokon fajai között interspecifikus fajhibridek is (Kevei és Peberdy, 1977; 1985). MtDNS rekombináció kettős szülői magkontroll mellett szelekciós nyomás nélkül is bekövetkezett (Croft és mtsi, 1987).

Az általunk vizsgált imperfekt fekete *Aspergillus* törzseknél erőteljes inter- és intraspecifikus polimorfizmus figyelhető meg (izoenzim, mtDNS RFLP, magi rDNS RFLP). Fajon belül kiterjedt a paraszexuális inkompatibilitás, s a parciálisan heterokarion inkompatibilis izolátumok kivételével protoplasztfúzióval sem hozhatók létre heterokarionok (Kevei és Varga, 1994). Rokon fajok között interspecifikus fajhibridek nem hozhatók létre, de mitokondrium transzmisszió és mtDNS rekombináció fajon belül és közeli rokonságú fajok között is megvalósulhat.

A mitokondriális DNS szerveződése fonalas gombákban

A gombák mitokondriális genom mérete igen változó. A *Schizosaccharomyces pombe* 17,4 kb-os mitokondriális genomjától az *Agaricus bitorquis* 174 kb-os mtDNS-éig változó méretűekkel találkozhatunk (Hudspeth, 1992). A gombák mtDNS mérete a növény- és állatvilág mitokondriális genomjához képest középutat jelent. Az állatok minimális mtDNS mérete (16,5 kb) kisebb mint a gombáké, a növények mtDNS mérete pedig jóval túlhaladja azt (több száz kb). A genomméretek között közel rokon fajok

esetében is jelentős eltérés lehet (*S. cerevisiae*: 72-78 kb, *S. exiguus*: 23,7 kb; *Coprinus cinereus*: 43 kb, *Coprinus stercorearius*: 91 kb) (Grossman és Hudspeth, 1985). A gombák mitokondriális genomja zömmel cirkuláris szerveződésű, néhány faj azonban lineáris mtDNS-t hordoz (*Physarum polycephalum*, *Hansenula mrakii*) (Grossman és Hudspeth, 1985). A gombák mitokondriális DNS szerveződéséről újabban az a kép alakult ki, hogy az élő sejtben a mitokondriális DNS függően a replikációs aktivitástól cirkuláris és lineáris formában egyaránt jelen lehet (Bendich, 1993).

A mitokondriális DNS kódoló és nem kódoló régiókat hordoz. A nem kódoló egységeket intergénikus régióknak nevezték el, hiszen a kódoló régiókat összekötő szekvenciát jelentik. Értelmes információtartalmuk nincs, de fajra jellemző szekvenciamotívumokat hordozhatnak. Ilyen ismert motívumok a magas kópiaszámban ismétlődő repeat szekvenciaként megjelenő GC kluszterek a *S. cerevisiae*-ben, a *SacII* helyek a *Kluyveromyces lactis*-ban, a GC gazdag elemek az *Allomyces macrogynus*-ban, a *PstI* palindromok a *N. crassa*-ban és a MUSE elemek (mitochondrial ultra short elements) a *P. anserina*-ban (Koll és mtsai, 1996).

A mtDNS által kódolt géneket négy csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba tartoznak azok a proteinek kódoló gének, melyek a mitokondriális elektrontranszport láncban játszanak szerepet. Ilyenek a NADH dehidrogenáz alegységeit kódoló gének (*ndh1-6*), az apocitokrómban (*cob*), és a citokrómban oxidáz alegységeit kódoló gének (*cox1-3*). Az elektrontranszport lánc további fehérjéi a magi kromoszómákon kódoltak, a citoplazma riboszómáin transzlálódnak, majd a mitokondriumba transzportálódnak. A gének második csoportja a mitokondriális ATP-áz egyes alegységeit kódolja (*atp6*, 8, 9), a többi alegység magban kódolt. A gének harmadik csoportja a mitokondriális transzlációs apparátus molekuláit kódolja. Idetartoznak a nagy és kis riboszómális RNS génjei (*rnl*, *rns*), a mitokondriális tRNS gének (legalább 22) és egyes riboszómális proteinek (pl. *S. cerevisiae* *Var1* génje). A gének negyedik csoportjába a nem azonosított ORF-ek (URF-unidentified reading frame), melyek funkciója jelenleg még nem ismert (pl. az *A. nidulans* URFA3 génje) (Hauswirth és mtsai, 1987). Végül külön

kell említeni az intronok ORF-jait amelyek a mtDNS szerveződésében fontos szerepet játszanak.

Ha az endoszimbionta elméletből kiindulva úgy tekintünk a mtDNS ősére, mint egy prokarióta információhordozó egységre, akkor napjaink mtDNS-e feltűnően kevés információt tartalmaz. Az evolúció során információ átáramlás történt az eukarióta sejtmagba, ezáltal számos addig kizárólag mitokondriális gén kódja a sejtmagba került át, illetve magi gének termékei a mitokondriumba transzportálódva ott látnak el funkciókat. Az, hogy a sejtmagba történő génáramlás milyen géneket érintett, taxonómiai egységenként eltérő lehet. A jól ismert *S. cerevisiae* élesztőgomba, és számos rokon fájának mtDNS-e nem kódolja a NADH dehidrogenáz enzim alegységeit, szemben a jól ismert fonalagombákkal, ahol jelenlétük általános (Hudspeth, 1992). A *S. cerevisiae* ATP-áz 9 alegysége mtDNS-ben kódolt, míg a fonalagombáké lehet mtDNS-ben, sejtmagban (*Podospora*), vagy mindkettőben kódolt (*Neurospora*). Utóbbi esetben a működő gén vagy a sejtmagi, vagy a mitokondriális kópia, vagy pedig alternatívan életciklushoz kötötten vagy egyik, vagy másik gén fejeződik ki (Ridder és mtsai, 1991; Brown és mtsai, 1984).

Intronok eloszlása különböző fonalagomba fajok mitokondriális genomjában

A fonalagombák introntartalom tekintetében extrém szélsőségek képviselői. A két részletesen tanulmányozott faj mtDNS-ét összehasonlítva jelentős méretbeli eltérést láthatunk: az *Aspergillus nidulans* 33 kb, a *Podospora anserina* pedig 102 kb-os mitokondriális genommal rendelkezik, s köztes méretű például a *Neurospora crassa* 63 kb-os mtDNS-ével. A nagy méretbeli különbség nem a kódoló gének számának eltéréseiből, hanem a hordozott intronok számából adódik, hiszen a kódoló régiók a mitokondriális DNS-ben behatároltak (néhány, az oxidatív foszforilációban szerepet játszó fehérje génje, és a mitokondriális transzlációs apparátus génjei). Ezen belüli variációs lehetőségek nem indokolják az akár 70 kb-nyi méretbeli különbséget.

Cummings és munkatársai (1990) a *Podospora anserina* 102 kb-os mtDNS szekvenciájának felderítése során ugyanazokat a géneket detektálták, amik például az *A. nidulans* mtDNS-ét is felépítik, s kimutatták, hogy a mintegy 70 kb-nyi eltérést tisztán intronális szekvenciák okozták. Az a tény, hogy az intronok képesek extrém módon "benépesíteni" a mtDNS-t, alátámasztja az intronok mobilitására vonatkozó elképzeléseket, továbbá magyarázza a különböző gombafajok mtDNS-ének diverzitásában betöltött szerepüket. Vannak olyan gének, melyekre az jellemző, hogy intronokat hordoznak (*cox1*, *cox2*, *rnl*), és olyanok, melyekben az intronok előfordulása ritka (*atp9*, *atp8*, *atp6*). A *P. anserina* *cox1* génje jól szemlélteti a nagy mitokondriális genommal bíró fajok mtDNS szerveződését. Maga a teljes gén 24'503 bp, ebből mindössze 1'606 bp az exonális szekvencia, a "maradék" 22'897 bp-t pedig tizenhat intron teszi ki. Ha százalékosan fejezzük ki, akkor a teljes gén 6,55%-a kódoló rész, 93,45%-a pedig intron.

Az intronok rövid általános jellemzése

Számos gén kódoló szekvenciáit nem kódoló DNS szakaszok szakítják meg, melyeket közbevetett szekvenciáknak, intronoknak neveznek (Lambowitz és Belfort, 1993). Az intronok minden esetben a mRNS transzkriptumból precízen ki tudnak vágódni (splicing), és így a kódoló régiók (exonok) eredeti olvasási keretük megváltozása nélkül újra illeszkedve érett formába kerülnek. A megfigyelt splicing mechanizmusok alapján az intronokat négy kategóriába sorolják: I. és II. típusú intronok, magi mRNS és tRNS intronok (Lambowitz és Belfort, 1993; Cech, 1990). Az I. és II. típusú intronok egyben ribozimek is, tehát enzim aktivitással bíró RNS-nek tekinthetjük őket, mely aktivitás révén önmaguk precíz kivágódását tudják végrehajtani. Ezt az önkivágó aktivitást a szaknyelv self-splicing-nak nevezi. A magi mRNS-ek úgynevezett splice-szómákban szabadulnak meg intronjaiktól, ahol számos segítő molekula (pl.: U1, U2 kis magi ribonukleoproteinek) katalizálja az intronok

kivágódását. A magi tRNS-ek intronjai számos enzim segítségével vágódnak ki (endonukleáz, kináz, ligáz, foszfatáz).

Az I. és II. típusú intronok nem csak arról nevezetesek, hogy saját kivágódásukat (self-splicing) katalizálni tudják (ribozimek), hanem mobilitásukról is, ezért mobil genetikai elemeknek tekintik őket (Lambowitz és Belfort, 1993). Mobilitásuk alatt azt értjük, hogy intronmentes allélokat intronhordozóvá alakíthatnak, saját környezetüktől eltérő új szekvenciális környezetbe is be tudnak épülni, ugyanakkor introntartalmú gének elveszthetik intronjaikat. Mobilitásuk függ az általuk ORF-ekben kódolt fehérjék jelenlététől, melyek endonukleáz illetve reverz transzkriptáz aktivitással bírhatnak, amellett hogy maturáz aktivitással is rendelkezhetnek, azaz magát az intron kivágódását segítő funkciót láthatnak el. Az I. típusú intronok ORF-jeire az endonukleáz aktivitás, a II. típusú intronok ORF-jeire pedig a reverz transzkriptáz aktivitás jellemző. Ezek az intron kódolt enzimek teszik mobilissé, mozgékonyá az I. és II. típusú intronokat (Lambowitz és Belfort, 1993; Dujon, 1989). Jelenlegi ismereteink szerint az intron ORF-ek önmagukban is mobilisek, azaz egy adott ORF képes megjelenni új szekvenciális környezetben is (Sellem és mtsi, 1996). Az intron ORF-ek önálló mozgását gyakran az intronnal szomszédos két exonnak az intronnal határos néhány nukleotidjának megváltozása kíséri. Ezek az exonális átrendeződések feltehetően evolúciós szereppel is bírnak, mivel változást okoznak a kódolt fehérje aminosav szekvenciájában.

Az intronok jellemzése, különös tekintettel az I. típusú intronokra

1. elterjedés

I. típusú intronokat számos szekvenciakörnyezetben lokalizáltak különböző szervezetekben (eukarióták mitokondriális, kloroplaszt vagy sejtmagi DNS-ében). Számos taxonómiai egységben elterjedtek, beleértve a gombákat, növényeket, protozoákat és a prokariótákat is. Ma már a metazoákat is az intronhordozók körébe

sorolják bár korábban ennek a lehetőségét az addigi eredmények birtokában kizárták (Beagley és mtsai, 1996). Ha szekvenciakörnyezetüket tekintjük, akkor azt láthatjuk, hogy egy adott intron különböző organizmusban megjelenhet ugyanazon gén ugyanazon szekvenciakörnyezetében, illetve megjelenhet más génben is. Ez a jelenség közvetve alátámasztja a mobilitásukkal kapcsolatos elképzeléseket (Dujon, 1989).

2. lokalizációjuk

Az I. típusú intronok (a magi rRNS-ek néhány intronja kivételével) kompartmentekben lokalizálhatók, ahol a transzkripció és transláció folyamatai fizikailag nem különülnek el. Ilyen rendszerek az eukarióta sejtek mitokondriumai és kloroplasztjai, illetve maguk a prokarióta sejtek. Ez a fizikai közelség biztosítja, hogy az intronok ORF-jei fennmaradnak, mivel az intronok RNS-einek translációja a kompartment riboszómáin folyik. (Ezek a megállapítások a II. típusú intronokra is jellemzők.)

3. self-splicing

Az intron kivágódásának mechanizmusa transz-észterifikációs lépések sorozatából áll, melynek részletei számos munkában rögzítettek és kísérletesen alátámasztottak (Cech, 1990; Dujon, 1989; Lambowitz és Belfort, 1993).

4. intron mobilitással kapcsolatos fogalmak: intron nyerés (intron homing, intron transzpozíció), intron vesztés

Mind az intron nyerés (intron acquisition), mind az intron vesztés (intron loss) folyamata ismert, molekuláris mechanizmusokról a szakirodalom részletesen beszámol (Lambowitz és Belfort, 1993; Dujon, 1989). Az ORF-et hordozó I. típusú intronok körében az intronnyerés folyamata nagy gyakorisággal bekövetkező esemény. ORF-ük általában endonukleáz aktivitással bír, melynek mind szekvencia-felismerőhelye, mind pedig a restrikciós hasítóhelye specifikus. Az előbbi 18 bp vagy annál több nukleotidnyi motívumot takar, az utóbbi pedig néhány bázispárnyi (4 bp) szekvenciához kötött



(Dujon és mtsi, 1989). Az endonukleáz, ha ép hasítóhellyel találkozik, akkor elvégzi feladatát, azaz hasítja a kettősszalú DNS-t. Ezt követően a jól ismert DSBR (double strand break repair) mechanizmus javítja a DNS törést. A mechanizmus során először az eltört DNS 5'-3' és 3'-5' exonukleázok által emésztődik, agresszív túlnyúló egyszalú DNS-ek keletkeznek, melyek homológ szekvenciákhoz próbálnak elsősorban illeszkedni. A túlnyúló egyszalú DNS-ek befűrik magukat homológ kettős szalú párjukba, és létrehozzák a rekombinációs folyamatok kezdeti stádiumára jellemző D-loop struktúrát. A túlnyúló egyszalú DNS-ek a továbbiakban a homológjaikkal párosodva primerként szolgálnak a DNS polimeráz számára, mely templátnak a homológ szekvenciát tekinti. Kialakul a kettős Holliday struktúra, a DNS polimerázok feltöltik a degradálódott törött végek közötti rést, majd kettős crossing over zárja a folyamatot, melynek eredményeképpen kettő darab kettős szalú DNS molekula jön létre. Amennyiben a templátként felhasznált homológ DNS szakasz az adott gén intront hordozó vátozata, akkor a DSBR révén az addig intronmentes exonális szekvencia intronhordozóvá válik. Ez a mechanizmus ha beindul a mitokondriumban, ahol a mtDNS több tucat kópiaszámban lehet jelen, kaszkádszerűen intronhordozóvá tehet egy exonális régiót, ami addig nem tartalmazott intront. Ha az intron a származási helyével azonos környezetbe és helyre épül be, azt a szakirodalom "intron homing"-nak, azaz az intron hazatérésének nevezi. Idegen, azaz új környezetbe is beépülhet az intron, ha a felismerőhely és a restriktív hasítóhely motívumok ezt lehetővé teszik, illetve ha nem homológ rekombináció történik a DSBR során. Ekkor intron transzpozícióról beszélünk. Az intronvesztés jelensége a fent idézett szakirodalmak adatai szerint sokkal összetettebb, és nagyságrendekkel ritkábban bekövetkező esemény, mint az intron nyerés. E szerint a már érett mRNS reverz transzkriptáz aktivitás révén egyszalú cDNS-sé íródik át, mely intronhordozó homológjával rekombinációra lép. Ily módon az introntartalmú forma intronját elveszti. A homológ rekombináció "kiterjedtsége" (extenziója) változó, így egy, kettő vagy több szomszédos intron egyidejű elvesztése történhet meg (Dujon, 1989; Lambowitz és Belfort, 1993; Moran és mtsi, 1994; Derr és

mtsi, 1991). A folyamat sikeres kimeneteléhez szükséges reverz transzkriptáz aktivitást gyakran a kloroplaszt DNS, vagy a mtDNS-ben jelen levő II. típusú intronok ORF-jeiben kódolt reverz transzkriptázok (Baltimore, 1985), illetve reverz transzpozonok aktivitása biztosítja. A reverz transzkriptáz működés fontosságát kísérletesen is bizonyították (Derr és mtsi, 1991; Baltimore, 1985).

5. intron loss az evolúció követésére és génterápiára

A napjainkban folyó kutatások során rafinált módszerekkel "vadásszák" nukleáris génekben az intronvesztés tényét, mely segítségével fajok diverzitását, evolúciós események időbeliségét, sorrendjét tudják nagy biztonsággal megállapítani (Häger és mtsi, 1996; Frugoli és mtsi, 1998). Génterápia szempontjából is fontossá vált az intronvesztés kérdésének tanulmányozása. Számos humán betegséget, tünetegyüttest tudnak kötni intronális mutációkhoz (Huang, 1998; Smyth és mtsi, 1998). Elégtelen sejtműködéshez, enzimfunkciók hiányához vezethet ha egy introntartalmú gén intronja mutáció következtében képtelen kivágódni, azaz nem tud érett mRNS létrejönni (Moran és mtsi, 1994). Súlyos betegségek alakulhatnak ki, ha egy jelmolekula, másodlagos hírvivő, vagy egyéb fontos funkciókat ellátó molekula iktatódik ki ily módon a szervezetből. A természet azonban tudja gyógyítani önmagát. Kísérletesen igazolt tény (Moran és mtsi, 1994), hogy a sérült, self-splicing-ra képtelen intron ellenére nagyon minimális szinten, de képződik érett mRNS. A róluk reverz transzkripcióval készült cDNS rekombinálódása a homológ szekvenciákkal úgyszólván gyógyítja a defektes régiókat. Extrakromoszómális elemek genomjában (plazmidok, kloroplaszt és mtDNS) is detektálták az intronvesztés eseményét (Wallace és mtsi, 1996; Freyer és mtsi, 1995; De Jonckheere és mtsi, 1994), kísérletesen igazolták molekuláris mechanizmusát (Derr és mtsi, 1991), de továbbra is ritka eseménynek tartják, és nem vetődött fel az, hogy az organelumok örökítő anyaga a magas kópiaszám ellenére homogénné tud válni intronvesztett jellegére nézve.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált mikroorganizmusok, vizsgált gombatörzsek

4.1.1. Baktérium transzformáció során felhasznált mikroorganizmus

Escherichia coli DH5 α

4.1.2. Vizsgált gombatörzsek

Az adatokat az I. táblázat tartalmazza.

4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

4.2.1. Kiegészített Pontecorvo minimál (PM) tápoldat

(Pontecorvo és mtsi 1953) a fonalagombák rázó lombikos tenyésztésére

0,25% NaNO₃

0,10% KH₂PO₄

0,05% MgSO₄

0,05% KCl

2,00% glükóz

0,50% élesztőkivonat

4.2.2. Maláta táptalaj ferdeagaron történő törzsfenntartáshoz és szaporításhoz, továbbá protoplasztképzéshez történő előneveléshez.

1,00% maláta

1,00% glükóz

0,50% élesztőkivonat

1,00% agar (Bacto)

I. táblázat

Faj	Törzs v. izolációs szám	Eredet (Gyűjtemény v. szerző)	Izoláció eredete
<i>A. japonicus</i>	1126	IMI 119894	-
	340	J.H.Croft	Tunézia
	327	"	"
	422	"	Marokkó
	426	"	"
	427	"	"
	443	"	"
	557	"	Ausztrália
	558	"	"
	564	"	"
	IN5	Kevei F.	India
	IN6	"	"
	IN8	"	"
	IN9	"	"
	IN10	"	"
	IN12	"	"
	IN13	"	"
	IN14	"	"
	IN15	"	"
	IN16	"	"
	IN17	"	"
	IN18	"	"
	IN30	"	"
	KF2	"	Magyarország
	KF3	"	"
	KF5	"	"
	KÉ01	Kovács Éva	"
	M 1.3.1	B. Megnegneau	Marokkó
	In 2.1.15	F. Debets	Indonézia
	Fr.1.2.1	B. Megnegneau	Franciaország
	Fr.1.2.2	"	"
	1.4.32	F. Debets	Indonézia
	1.7A.5	"	"
	1.7A.6	"	"
1.5A.11	"	"	
Zebra	Kevei F.	Magyarország	
No55	CBS 114.51	-	
440	Szegedi M.	Ausztrália	
JP01	Pénzes Zs.	Panama	
JP02	"	"	
JP03	"	"	
JP04	"	"	
JP06	"	"	
JP07	"	"	
JP08	"	"	
JP09	"	"	
JP10	"	"	
JP12	"	"	
JP14	"	"	

Az I. táblázat folytatása

Faj	Törzs v. izolációs szám	Eredet (Gyűjtemény v. szerző)	Izoláció eredete
<i>A. japonicus</i> <i>var. aculeatus</i>	No57 IN19 419	CBS 172.66 Kevei F. J.H. Croft	India - Marokkó
<i>A. carbonarius</i>	1118 677 N/1 N/2 No50 M.1.4.1 Isr.1.1.1 ETH 1.4.29 In.1.2.11 In.1.2.16 Haren NRRL IN7	IMI 016136 IMI 041875 J.F.Peberdy J.F.Peberdy CBS 111.26 B. Megnegneau B. Megnegneau ETH 8969 F.Debets A. Dipeningen A. Dipeningen Kevei F. NRRL 67 Kevei F.	- - Nottingham, UK Nottingham, UK - Marokkó Izrael - Indonézia Indonézia Indonézia Hollandia - India

4.2.3. LB tápoldat baktérium tenyésztéshez

1,00% tripton

0,50% élesztőkivonat

1,00% NaCl

4.2.4. LB táptalaj baktérium tenyésztéshez

LB tápoldat

2% agar

4.3. Felhasznált oldatok, pufferek, enzimek

4.3.1. Mitokondriális DNS izoláláshoz használt oldatok

ETS-1: 10 mM Tris; 5 mM EDTA; 0,44 M szacharóz pH 7,5

ETS-2: 10 mM Tris; 100 mM EDTA; 0,44 M szacharóz pH 8

MTS: 20 mM Tris; 5 mM MgCl₂; 0,44 M szacharóz pH 7,5

TS: 50 mM Tris; 10% szacharóz

TEN: 0,25 M Tris; 100 mM EDTA, 1 M NaCl

TESDS: 0,25 M Tris; 100 mM EDTA; 1% SDS

TE: 10 mM Tris; 1 mM EDTA

4 M Na-acetát oldat

5 M NaCl oldat

Kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keveréke

PCI: fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke (Maniatis és mtsi, 1982)

4.3.2. Totál DNS tisztításához használt oldatok

LETS: 0,1 M LiCl; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 10 mM Tris pH 8

4.3.3. Plazmid tisztításhoz használt oldatok

Lízis oldat: 50 mM glükóz; 25 mM Tris; 10 mM EDTA pH 8; 2 mg/ml lizozim

Alkalikus SDS oldat: 0,2 M NaOH; 1% SDS

"High salt": 3 M Na-acetát pH 4,5

4.3.4. DNS blottoláshoz és hibridizációhoz használt oldatok

A hibridizációs kísérletek során a Boehringer Mannheim cég "DIG DNA Labeling and Detection Kit"-jét használtuk. A reagensek és oldatok nagy részét már elkészített formában hozza forgalomba a cég.

0,25 M HCl

0,4 M NaOH

0,2 M EDTA, pH 8

4 M LiCl

20xSSC (0,3 M Na-citrát, 3 M NaCl, pH 7)

Hibridizációs puffer (5xSSC, 0,1% N-laurylsarcosine, 0,02% SDS, 1% blocking reagens)

Mosó pufferek:

2xSSC, 0,1% SDS

0,1xSSC, 0,1% SDS

1. puffer (0,1 M maleinsav, 0,15 M NaCl, pH 7,5)

2. puffer (1% blocking reagens 1. pufferben oldva)

3. puffer (0,1 M Tris\HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5)

dimetil-formamid

4.3.5. Egyéb felhasznált oldatok, anyagok, reagensek és enzimek

50 mM CaCl₂ kompetens sejt készítéshez

TCM: 10 mM Tris pH 7,5; 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂ *E. coli* transzformációhoz

TBE puffer agaróz gélelektroforézishez: 1 l-hez 10,8 g Tris pH 8; 5,5 g bórsav; 0,75 g EDTA

TAE puffer preparatív agaróz gélelektroforézishez: 50 l-hez 242 g Tris pH 8; 57,1 ml jégcet; 18,6 g EDTA

"Loading" oldat: 40% szacharóz; 0,25% brómfenolkék; 0,2 M EDTA, pH 8

25% PEG (Ms 4000) 0,1 M CaCl₂ tartalommal protoplasztfúzióhoz

PCI: fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke (Maniatis és mtsi, 1982)

RN-áz (Sigma, bovin pancreas): 10 mg/ml törzsoldat

DN-áz (Sigma, bovin pancreas)

Ampicillin (Sigma): 50 mg/ml törzsoldat

IPTG (Sigma): 25 mg/ml törzsoldat

X-gal (Sigma): 25 mg/ml törzsoldat DMF-ban

Agaróz (Reanal)

Etidium-bromid (SIGMA): 10 mg/ml törzsoldat

T4 DNS ligáz (Boehringer, Fermentas)

Restrikciós endonukleázok(Amersham, Fermentas)

*Bam*HI, *Bg*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hinc*II, *Hind*III, *Hae*III, *Hha*I, *Kpn*I, *Pst*I,
*Pvu*II, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I

Az enzimekkel történt kezelésekhöz a gyártó cég által forgalmazott puffereket használtuk.

4.3.6. Felhasznált génpróbák

4.3.6.1. *Aspergillus nidulans* (Glasgow törzs) mitokondriális DNS-ből (Brown és mtsi, 1985) általunk készített génpróbák.

rnl: 6,7 kb *Eco*RI fragment

rns: 1,44 kb *Hind*III-*Bg*II fragment

cox2-ndh3-atp9: 5,5 kb *Bam*HI fragment

cox1: 4,3 kb *Hind*III-*Bg*II fragment

cob: 1,17 kb *Bg*II fragment

cob-ndh1: 3,45 kb *Hind*III-*Hha*I fragment

ndh1-ndh4: 1,78 kb *Hind*III-*Hha*I fragment

ndh4-atp8-atp6: 2,17 kb *Hind*III fragment

orf364: 0,58 kb *Hind*III-*Hinc*II fragment

A4-A5-*orf364*: 2,77 kb *Hind*III-*Pvu*II fragment (A4 és A5 az *ndh2* gén részei Hauswirth és mtsi, 1987)

A6 (az *ndh2* gén egyik 300bp-os részlete; Hauswirth és mtsi, 1987): 0,55 kb
HindIII-*PvuII* fragment

cox3-ndh6: 2,72 kb *HindIII*-*PvuII* fragment

atp9: PCR reakcióval felamplifikált 198 bp-os fragment. A reakcióban alkalmazott primer-t az *A. nidulans* (Brown, 1984) ismert szekvenciája alapján terveztük, és szintetizáltattuk (forward primer: 5'-CGAATTCTCTTTAAATGCTAATGTATTAGGGAA-3'; reverse primer: 5'-TATCTCGAGTTGAGCTTGAA TAAATGCGATA-3').

4.3.6.2. *Aspergillus carbonarius* 1118-as izolátum mitokondriális DNS-éből származó, általunk készített génpróbák

ndh5: 1,66 kb *EcoRI*-*BamHI* fragment pSK vektorba klónozva

ndh4l: 828 bp *PstI*-*XbaI* fragment pSK vektorba klónozva

intergénikus régió: 614 bp *EcoRI*-*XbaI* fragment pSK vektorba klónozva

4.3.6.3. *Aspergillus carbonarius* Isr.1.1.1 jelű izolátum mitokondriális DNS-éből származó, általunk készített génpróba

cox2 gén első intronja: 540 bp *HincII* fragment pSK vektorba klónozva

4.3.6.4. *A. japonicus* izolátumok mtDNS-éből származó általunk készített intronális próbák

4.33 *cox1-iB*: A 4.33 jelű rekombináns utód *EcoRV/9*. fragmentumának 700 bp-os *EcoRV/BamHI* régiója, mely a *cox1* gén általunk B-nek jelölt intronjának 700 bp-os része.

4.33 *cox1-iC*: A 4.33 jelű rekombináns utód *EcoRV4b/EcoRI4* fragmentumának 900 bp-os *HindIII* régiója, mely a *cox1* gén általunk C-nek jelölt intronjának 900 bp-os részét hordozza.

4.33 *cob-i1*: A 4.33 jelű rekombináns utód *EcoRV/6*. fragmentumának egy *HaeIII* restrikciós hasítóhely és egy általunk tervezett reverse primer (5'-GTCAA GGTATTCTACTC-3') által határolt 880 bp-os régiója, mely a *cob* gén első intronját tartalmazza.

1287 *cox1*-iB: Az 1287^{oR} izolátum *cox1* génjéből származó génpróba. A B intron precíz klónozásához a szekvenciaelemzések során a V4/E4d fragmentumról rendelkezésünkre álló adatok birtokában primereket terveztünk PCR reakció számára, melyek 5' végeire *EcoRI* és *XhoI* restrikciós enzim felismerő szekvenciákat építettünk (forward primer: 5'-TTTTCCTCGAGCAT GGAGCCAATACGCCTGAG-3'; reverse primer: 5'- GGAATTCGTTTAACAT AAGATCTAACTC-3'). A felamplifikált 814 bp PCR terméket jelöltük meg.

4.3.6.5. Sejtmagi rDNS polimorfizmus vizsgálatánál használt nukleáris rDNS-t hordozó génpróba

pMN1: Borsuk és mtsi, 1982

4.3.7. PCR-hoz, RAPD-PCR-hez felhasznált anyagok (Promega)

4.3.7.1. "CORE" puffer (20 reakcióra)

10-10 µl dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

50 µl 10x inkubációs puffer

50 µl MgCl₂ oldat

10 µl steril bidesztillált víz

4.3.7.2. "COCTAIL" (10 reakcióra)

1 µl Taq polimeráz (5 U/µl)

5 µl primer (10 µM) (OPC random primerek illetve általunk tervezett primerek)

144 µl steril bidesztillált víz



4.4. Vizsgálati módszerek, kísérleti technikák

4.4.1. Mitokondriális DNS izolálása módosított Osman (1987) szerint

Fonals gomba 36 órás micéliumtenyészetét szűrővel összegyűjtöttük, hideg csapvízzel, majd ETS-1-gyel mostuk. A sejtfeltárást üvegyöngyök hozzáadásával Bead-Beaterrel (Biospec Products) 2,5 percen keresztül jégfürdős hűtéssel ETS-1-ben végeztük, majd a sejtfaltörmelékeket 15 perc 3000 rpm centrifugálással távolítottuk el. A mitokondriumokat 40 perc 12000 rpm centrifugálással üleptítettük, majd DNáz kezelés céljából 30 ml MTS oldatban szuszpendáltuk fel 6 mg/ml DNáz hozzáadásával. 1 óra 4°C-on történő kezelés során az ép mitokondriumok mellől a magi eredetű nukleinsavakat elimináltuk. A reakciót 80 ml ETS-2 oldattal állítottuk le, majd a mitokondriumokat ismét összegyűjtöttük 15 perc 18500 rpm centrifugálással. A pelletet 1 ml TS-ben szuszpendáltuk fel, majd 16 ml TESDS hozzáadásával 15 percig 65°C-on inkubálva feltártuk a mitokondriumokat. 3 ml 5 M-os NaCl hozzáadásával megnöveltük a sókoncentrációt, majd előbb 30 perc 15500 rpm centrifugálással, majd 2 ml 4 M-os Na-acetát hozzáadása után 5 perc 15500 rpm centrifugálással tisztítottuk a mintát. A felülúszóhoz azonos térfogatú izopropanolt adva 1 éjszakán át -20°C-on kicsaptuk a mitokondriális DNS-t, melyet azután 15 perc 12000 rpm centrifugálással üleptítettünk. A DNS-t 1 ml TE-ben oldottuk fel, 1 órán át RNáz kezeltük 10 µl 10 mg/ml RNázal 37°C-on, majd többször fenolozva tisztítottuk. Ezt követően a DNS-t abszolút etanollal kicsaptuk, végül 200 µl TE-ben oldottuk.

4.4.2. Totál DNS izolálása Leach és mtsi (1986) alapján

0,2 g liofilezett micéliumot dörzs mozsárban elporítottunk, majd 2 ml LETS pufferben alaposan felkevertünk. Ezután 2 ml PCI-t hozzáadva az elegyhez alapos vortexelést követően 4°C-on 10 percig 3000 g-vel centrifugáltunk. A

felülúszóhoz azonos mennyiségű etanolt adtunk, majd a DNS-t 30 percig -70°C -on kifagyasztottuk, majd centrifugálással (10 perc, 3000 g, 4°C) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, majd 600 μl desztillált vízben felfuszpendáltuk. Az így kapott DNS oldatot többszöri fenolozással tovább tisztítottuk. A végső tisztítási lépés után a DNS-t ismét kicsaptuk, végül 100 μl TE-ben felfuszpendáltuk.

4.4.3. Protoplasztképzés

Fonalgomba sejtek protoplasztképzését szilárd maláta táptalaj felületére helyezett celofánon (Kevei és Peberdy, 1984), illetve folyadékkultúrában nevelt tenyészetekből (Hamari és mtsi, 1997) végeztük 0,02% NovoZym-mel (Novo Trade Industry) kiegészített saját készítésű, indukált *Trichoderma* törzsekkel termeltetett lítikus enzimmel. A lítikus enzimet szénforrásként csak *A. niger* sejtfalpreparátumot tartalmazó Pontecorvo minimál oldatban rázatva nevelt *Trichoderma harzianum* kultúrából nyertük, a fermentlé besűrítésével (Kevei és Peberdy, 1984). A protoplasztáló enzimoldatot 0,7 M KCl-dal egészítettük ki, a protoplasztok stabilizálása érdekében.

4.4.4. Protoplasztfúzió és regeneráció Kevei és mtsi (1997) alapján

A fúziós partnerek frissen izolált protoplasztjainak 1:1 arányú keverékét (5×10^6 protoplaszt/ml páronként) centrifugálással ülepítjük, majd a stabilizáló oldat eltávolítása után 25% PEG oldatban felfuszpendáljuk úgy, hogy az aggregálódás előtti protoplasztszám $10^7/\text{ml}$ érték körül legyen. A vizsgálati célnak megfelelően kiválasztott, 0,7 M KCl-dal stabilizált táptalajokra 5-5 ml 0,8% agar tartalmú fedőagart öntünk, melyek a regeneráltatandó mintát tartalmazzák. A regeneráció értékelése a mikroba növekedési gyorsaságától függően a leoltástól számított 3-10 napon történik.

4.4.5. DNS izolálása agaróz gélből

Agaróz gélen elválasztott DNS fragmentek izolálása Benore és Anderson (1995) által leírt módszer alapján történt.

4.4.6. Nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel, méretük meghatározása

A nukleinsavak elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk (Sambrook és mtsai, 1989). A fragmentek méretének meghatározását a "GelBase/GelBlot Pro" (Ultra Violet Product Ltd) gél dokumentáló- és kiértékelő szoftver segítségével végeztük.

4.4.7. DNS fragmentek klónozása, baktérium transzformáció

A DNS fragmentumokat pBluescript SK vektorba ligáltuk. A ligálást T4 DNS ligázzal (Fermentas) végeztük, a gyártó által javasolt feltételek közt. Kompetens sejtek készítését és a sejtek transzformációját a Sambrook és mtsai (1989) által ismertetett módon hajtottuk végre. A DNS fragmentet hordozó transzformáns sejtek szelektálása 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajon történt, melyre 40 µl X-gal-t és 40 µl IPTG-t szélesztettünk.

4.4.8. Plazmid tisztítás

Baktérium sejtekből alkalikus lízis módszerrel tisztítottunk DNS plazmidokat (Sambrook és mtsai, 1989). DNS szekvencia meghatározáshoz a plazmid tisztítás Kovalenko és mtsai (1994) szerint történt.

4.4.9. Restriktációs térképek készítése Hamari és mtsai (1999) alapján

A restriktációs térképezéshez használt módszerek során figyelembe vettük a vizsgált organizmus mitokondriális DNS-ének méretét. Ez alapján a kicsi, 40 kb mtDNS-sel bíró izolátumok térképezését a leggyorsabban A és B enzimmel történő preparatív emésztés során kapott mtDNS fragmentek DNS tartalmának

visszaizolálását követően **B** és **A** enzimekkel történt reciprok emésztéssel tudtuk végrehajtani (Hamari és mtsai, 1999). Az **A** és **B** fragmentek egymásutániségének meghatározásához agaróz gél egyik oldalára felvittük az izolált **A** fragmentek **B**-vel emésztett mintáit, a másik oldalára az izolált **B** fragmentek **A**-val emésztett mintáit, a gél közepére pedig a térképezendő izolátum mtDNS-ének **A**-val, **B**-vel, és **A/B**-vel kettősemésztett mintáit kontrollként, egy DNS molekulásúly marker kíséretében. Ezt követően 1%-os agaróz gélen elektroforézist hajtottunk végre, közben korai, közepes és késői futási stádiumokban dokumentáltuk az elektroforetikus képet. A gélfotók jobb és bal oldalán szereplő fragmentek egymással, és a középre felvitt kontroll kettősemésztett mintával megegyező számú és méretű fragmenteket hordoztak, mely alapján vizuális módon "össze lehetett olvasni" az **A** és **B** emésztéskor kapott fragmentek sorrendjét. A nagyobb, 50 kb feletti mtDNS-ek térképezésekor a fenti módszert kombinálnunk kellett az **A** és **B** fragmentek pSK vektorba történő klónozásával, mivel az emésztéseket gyakran tíz-tizenöt feletti fragmentszám jellemezte, amit még az is bonyolít, hogy gyakori az azonos, vagy közel azonos méretű fragmentek száma, melyek a gélen azonos távolságra, azaz együtt futnak. Ilyenkor minden egyes **A** és **B** fragmentet pSK vektorba klónoztunk, majd ezen klónok reciprok emésztéseit végeztük el, és a fentiekben megegyező elvek szerint 1%-os agaróz gélben futtattuk meg őket. Ekkor a vizuális "fragment összeolvasás" mellett szükség volt az adott fragmentek méretének pontos meghatározására is. A méretmeghatározást a "GelBase/GelBlot Pro" (Ultra Violet Product Ltd) gélelemző szoftver segítségével állapítottuk meg. Így tudtuk a leggyorsabban a legnagyobb mtDNS-ek restriktív térképeit létrehozni. Az egyes izolátumok mtDNS-ének valós mérete kivétel nélkül a restriktív térképek szerkesztésekor határozható meg, ugyanis a nagy méretű fragmentek meghatározásakor adódott tévedések kiküszöbölődnek.

4.4.10. DNS blottolás és hibridizáció

Az agaróz gélelektroforézissel elválasztott DNS-t alkalikus transzfer módszerrel vittük át Hybond N+ membránra (Reed és Mann, 1985).

A génpróbák digoxigennel történő jelölését és a hibridizációt a gyártó által előírt módon végeztük el. A hibridizációt, valamint a nem kötődött, jelölt DNS eltávolítását a filterről minden esetben 68°C-on végeztük el.

4.4.11. DNS szekvencia meghatározása, összehasonlítása adatbankokkal

A klónozott DNS fragmentumok szekvenciájának meghatározását a Szegedi Biológiai Központban végezték el, ABIPRISM Model version 2.1.0 automata szekvenátorral, a Maxam-Gilbert módszer alapján. A szekvenciák adatbankokkal történő összehasonlítását az NCBI (National Center for Biotechnology Information) "on-line service"-én a BLAST (Altschul és mtsi, 1990) és FASTA (Pearson és Lipman, 1988) programok felhasználásával végeztük.

4.4.12. PCR reakció

4.4.12.1. PCR reakció RAPD analízishez

500 µl-es Eppendorf csőbe az alábbi komponenseket mértük össze: 7,5 µl CORE puffer, 15 µl COCTAIL és 2,5 µl templát DNS (0,03 µg/µl). A reakcióelegyet elkevertük, majd 30 µl ásványi olajat rétegeztünk rá. A PCR reakciót az alábbi körülmények szerint végeztük: 92°C-on 1 perc denaturáció, 35°C-on 1 perc annealing, 72°C-on 2 perc elongáció. A műveletet 45x ismételtük, majd a reakciót 7 perc 72°C-on történő utópolimerizációval zártuk. A reakcióhoz OPC-02, OPC-04, OPC-05, OPC-06, OPC-07, OPC-08, OPC-09, random primereket használtunk.

4.4.12.2. PCR reakció szubklónozáshoz az általunk tervezett "forward" és "reverse" szintetikus primerekkel

A reakcióelegy 50 μl végtérfogatba bemért 8 μl egyes nukleotidokra nézve 2,5 mM-os nukleotid keveréket, 5 μl inkubációs puffert, 5 μl MgCl_2 oldatot, 1 μl 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ forward primert, 1 μl 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ reverse primert, 1 μl templát DNS-t és 1 μl Taq polimerázt tartalmazott. A reakcióelegyre 40 μl ásványi olajat rétegeztünk. A primerek "olvadáspontja" által meghatározható legmagasabb annealing hőmérsékletet választva az alábbi reakciókörülmények között 45 ciklust hajtottunk végre: 94°C 45 másodperc denaturáció, 50°C 45 másodperc annealing 72°C 1 perc polimeráz reakció, majd a 45 ciklust lezáró 7 perc 72°C-on történő utópolimerizáció. A felhasznált primerek ismert szekvenciák alapján forward és reverse primerek voltak. A primerek tervezésekor a primerek 5' végeire *EcoRI* illetve *XhoI* felismerőhelyeket terveztünk a pSK vektorba történő egyszerű klónozás érdekében.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

5.1. DNS polimorfizmus vizsgálata és értelmezése

A bevezetőben megfogalmazottak alapján, a fekete *Aspergillus*-ok heterokarion inkompatibilitásának értelmezése céljából kezdődött meg a biodiverz jellegek populáció szintű vizsgálata, azaz a fenotipikus és molekuláris jellegek elemzése. Munkám tárgyát az *A. carbonarius* és *A. japonicus* fajok körébe tartozó izolátumok képviselték (I. táblázat). Az eredmények és értékelés fejezetben elsőként az *A. carbonarius* izolátumokkal kapcsolatos eredményeimet (Kevei és mtsi, 1996; Hamari és mtsi, 1999), majd ezt követően az *A. japonicus* izolátumokkal végzett kísérleteket tárgyalom (Hamari és mtsi, 1997; 1999).

5.1.1. A mitokondriális genom és a nukleáris rDNS polimorfizmus vizsgálata *A. carbonarius* izolátumok körében

Az *A. carbonarius* fajt képviselő, 15 rendelkezésünkre álló, eltérő földrajzi területekről származó egyedi izolátumok között (I. táblázat) anasztomózis létrehozására tett kísérleteink sikertelennek bizonyultak, az izolátumok egymással heterokariont nem képeznek, teljes vegetatív inkompatibilitás jellemzi őket (Kevei, nem publikált adatok). A heterokarion inkompatibilitás értelmezése céljából megkezdtük a különböző molekuláris jellegek populáció szintű vizsgálatát, mely a konzervatívnak tekintett magi rDNS RFLP (restriction fragment length polymorphism) és mitokondriális DNS (mtDNS) RFLP analízisére terjedt ki. A magi rDNS RFLP analízisét totál DNS *Sma*I resztikciós enzimmal történő emésztésének magi rDNS próbával történő hibridizációs mintázatelemzésével végeztük el. Igaz, hogy a *Sma*I enzim a totál DNS készletet teljesen felaprózza, agaróz gélen történő elektroforetikus elválasztással egybefüggő "smear"-t hoz létre, de a repetitíven előforduló DNS állomány - így a magi rDNS-ek is -

jól körvonalazható fragmentumok formájában jelenik meg. A "smear"-es háttérben megjelenő fragmentumok magi rDNS-ként való azonosítását Southern hibridizációval végeztük el, génpróbaként jelölt magi rDNS-t alkalmaztunk. A hibridizáló fragmentumok által mutatott RFLP mintázatokat hasonlítottuk össze. A rendelkezésre álló összes vizsgált izolátum kétféle típusba (magi rDNS I. és II. csoport) volt sorolható (1. ábra). A II. rDNS RFLP típust mindössze egyetlen izolátum, az IN7-es törzs képviselte. Az eredményeket a II. táblázat foglalja össze.

II. táblázat

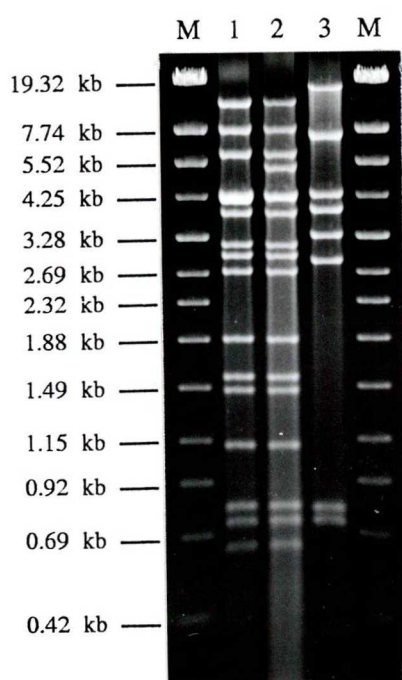
<i>A. carbonarius</i> törzsek izolációs száma	mtDNS típusa	rDNS típusa	<i>A. carbonarius</i> törzsek izolációs száma	mtDNS típusa	rDNS típusa
1118	1a	I	Haren	1a	I
N/1	1a	I	In.1.2.11	1a	I
N/2	1a	I	In.1.2.16	1a	I
No50	1a	I	ETH	1b	I
1.4.29	1a	I	Isr.1.1.1	1b	I
677	1a	I	M.1.4.1	1b	I
NRRL	1a	I	IN7	2	II



1. ábra

A. carbonarius izolátumok sejtmagi rDNS polimorfizmusát mutató ábra, mely a *Sma*I emésztett totál DNS pMN1 próbával történt hibridizálásának eredményét ábrázolja. M: *Hind*III emésztett λ DNS molekulásúly marer; 1: IMI 016136 (I. rDNS típus); 2: ETH 8969 (I. rDNS típus); 3: IN7 (II. rDNS típus)

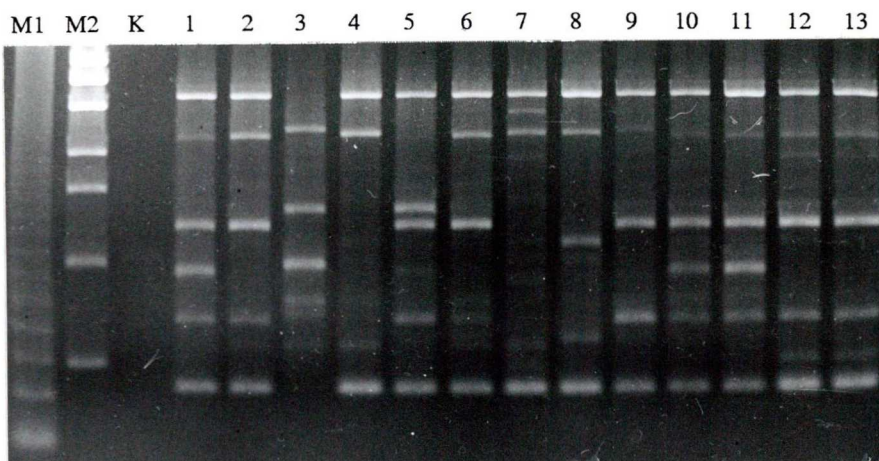
A mitokondriális DNS RFLP vizsgálatát totál DNS *Hae*III restrikciós enzimmel történő emésztésével végeztük el, kihasználva a fekete *Aspergillus*ok körében jellemző eltérő magi és mitokondriális DNS bázisösszetételt, valamint a *Hae*III enzim sajátos hasítóhely felismerő motívumát (5'-GG/CC-3'). A fonalas gombák egy részére AT gazdag mitokondriális genom jellemző (Hudspeth, 1992), szemben a GC gazdag nukleáris DNS állománnyal. Míg *Hae*III emésztéssel a sejtmagi DNS teljesen felaprózódik, addig a mtDNS-ben az enzim csak néhány helyen tud hasítást végezni. Totál DNS *Hae*III emésztését követő agaróz gélelektroforetikus elválasztás során a sejtmagi eredetű DNS állomány frontközelbe fut, a mitokondriális DNS pedig az alkalmazott általános DNS molekulásúly markerekkel összevethető néhány fragmentum formájában jelenik meg. A módszer előnye, hogy nagyszámú izolátum gyors azonosítását teszi lehetővé.



2. ábra

A. carbonarius izolátumok *Hae*III-mal emésztett mtDNS-ét mutatja. M: λ -pUC Mix DNS molekulásúly marker (Fermentas); 1: IMI 016136 (1a mtDNS típus); 2: ETH 8969 (1b mtDNS típus); 3: IN7 (2. mtDNS típus)

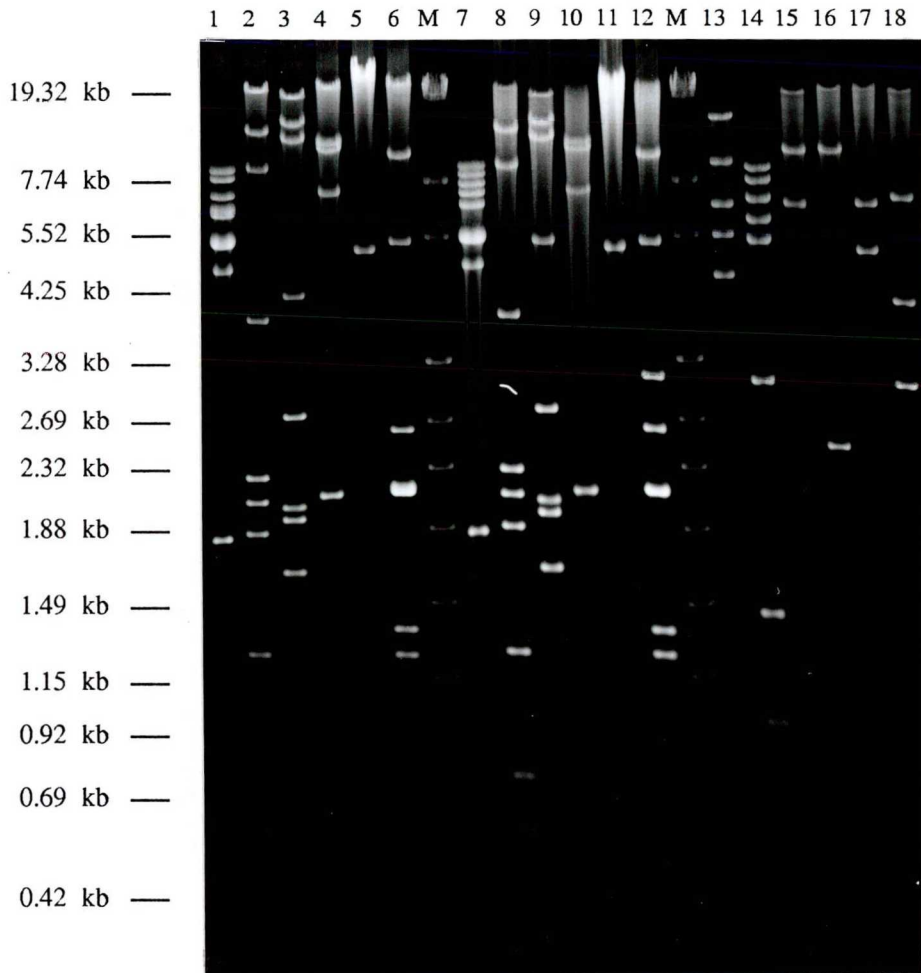
A vizsgált 15 izolátum mtDNS RFLP mintázat alapján (2. ábra) két csoportba volt sorolható (mtDNS 1. és 2. típus), mely korrelációt mutatott a sejtmagi rDNS RFLP mintázatok alapján kialakított I. és II. csoportokkal. A 2. mtDNS RFLP csoportot itt is az IN7 nevű izolátum képviselte. Az 1. mtDNS csoportba sorolt izolátumok RFLP mintázatai nem mutattak teljes azonosságot. Közöttük kis eltéréseket lehetett felfedezni, mely alapján az 1. csoporton belül 1a és 1b altípusokat különböztettünk meg (2. ábra). Az eredményeket a II. táblázat mutatja. A különböző mtDNS RFLP csoportok létjogosultságát RAPD-PCR módszerével is alátámasztottuk. Számos primerrel végzett reakció eredményeként az 1. és 2. mtDNS típusok mindig jól elkülöníthetők voltak egymástól (3. ábra).



3. ábra

A. carbonarius izolátumok RAPD-PCR mintázatai. Primerként az Operon kit OPC-01 dekamer-jét használtuk. M1: 100 bp-os DNS létra molekulásúly marker (Sigma); M2: λ -*EcoT14I* DNS molekulásúly marker (Amersham); 1: NRRL 67; 2: Haren; 3: IN7; 4: ETH 8969; 5: IMI 041875; 6: 1.4.29; 7: Isr 1.1.1; 8: M 1.4.1; 9: CBS 111.26; 10: N/2; 11: N/1; 12: 0465; 13: IMI 016136

A későbbiek során Osman (1987) módszerével izolált mitokondriumból tisztított mtDNS-el dolgoztunk, és több restriktációs enzim (*EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *KpnI*, *XhoI*, *BamHI*, ill. *HhaI*) (4. ábra) alkalmazásával igazoltuk a mtDNS-nek a fentiekben megadott típusokba sorolásának valóságát.



4. ábra

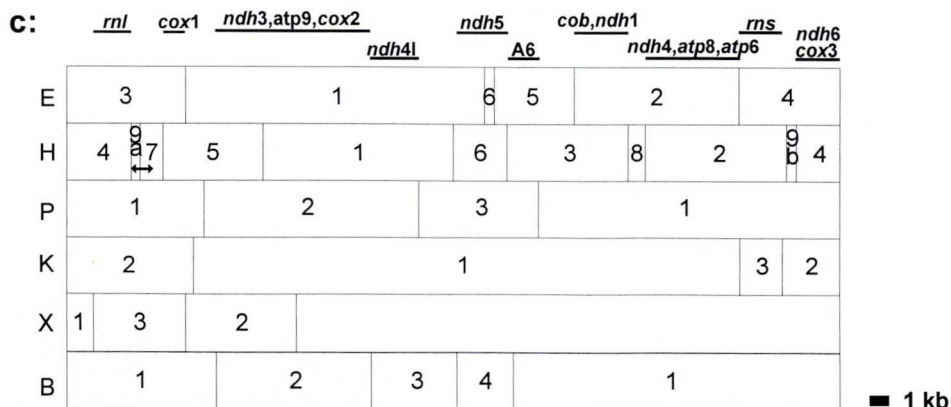
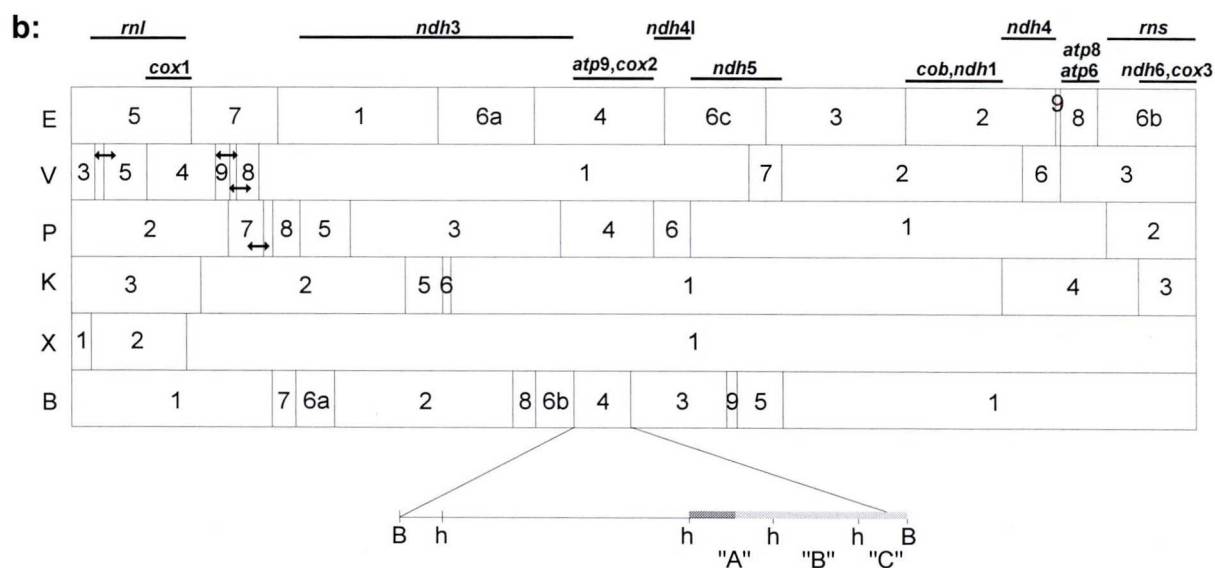
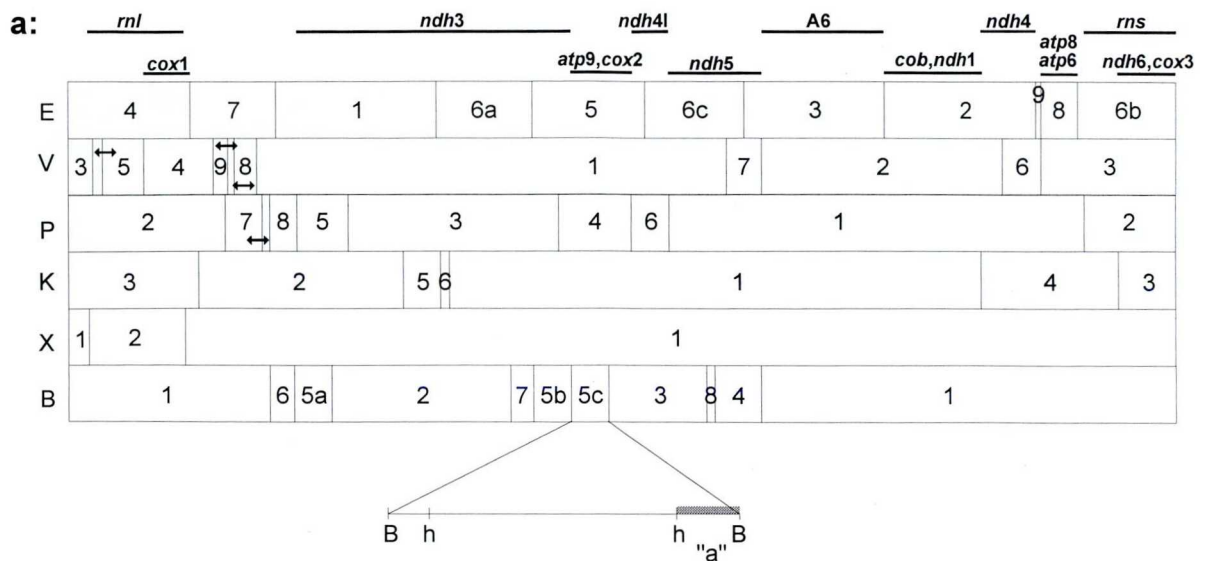
A. carbonarius izolátumok izolált mtDNS-ének számos enzimmel történt emésztésekor kapott RFLP mintázata. M: λ -pUC mix DNS molekulasúly marker (Fermentas); 1-6: az IMI 016136 törzs (1a mtDNS típus) emésztési mintázata (1) *EcoRI*, (2) *EcoRV*, (3) *PstI*, (4) *KpnI*, (5) *XhoI* és (6) *BamHI*; 7-12: az Isr 1.1.1 izolátum (1b mtDNS típus) emésztési mintázata (7) *EcoRI*, (8) *EcoRV*, (9) *PstI*, (10) *KpnI*, (11) *XhoI* és (12) *BamHI*; 13-18: az IN7 törzs (2. mtDNS típus) emésztési mintázata (13) *EcoRI*, (14) *HhaI*, (15) *PstI*, (16) *KpnI*, (17) *XhoI* és (18) *BamHI*;

A mitokondriális genomok hozzávetőleges méretét a különböző enzimekkel történt emésztések során kapott RFLP fragmentadatokból gélanalizáló szoftver segítségével határoztuk meg. A valós értékekről csak akkor nyertünk adatokat, amikor később megszerkesztettük a három mtDNS típus (1a, 1b és 2) részletes fizikai térképét. Így a mitokondriális genomok tényleges mérete 62,0 kb (1a), 63,1 kb (1b) és 43,3 kb-nak bizonyult típusonként. A mitokondriális DNS mérete az addig tanulmányozott fekete *Aspergillus*okhoz viszonyítva (az *A. niger* fajaggregátum tagjai) jelentősen nagyobb. Az *A. niger* komplex tagjainak túlnyomó része 30-33 kb méretű, az *A. carbonarius* izolátumok mtDNS-e pedig ehhez viszonyítva 10-től akár 30 kb többlettel rendelkezik. Ez a szignifikáns, jól körülírható eltérés felkeltette érdeklődésünket, és a továbbiakban figyelmünk a mitokondriális genom felé irányult. Elsősorban magyarázatot szerettünk volna adni az *A. niger* fajaggregátum tagjainak mtDNS-éhez viszonyított néha kétszer akkora genomméret okára, valamint arra is, hogy az *A. carbonarius* fajon belül a mitokondriális genomok eltérő mérete (1a, 1b, 2 típusok esetében) mire vezethető vissza. Kérdéseink megválaszolására elkészítettük a három eltérő típusú mtDNS fizikai és funkcionális térképét. Az eredményeket az 5. ábra mutatja.

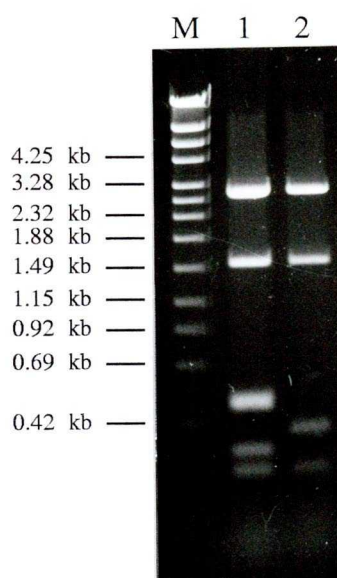
5. ábra (lsd. 38. oldal)

a., Az 1a mtDNS típus (IMI 016136) fizikai és funkcionális térképe. b., Az 1b mtDNS típus (Isr 1.1.1) fizikai és funkcionális térképe. c., A 2. mtDNS típus (IN7) fizikai és funkcionális térképe. E: *EcoRI*; V: *EcoRV*; P: *PstI*; K: *KpnI*; X: *XhoI*; B: *BamHI*; H: *HhaI*; h: *HincII*; "a": 391 bp *HincII-BamHI* fragmentum, mely a *cox2* első exonját kódolja; "A": 508 bp *HincII* fragmentum, mely a *cox2* első exonját, valamint a 221 bp-jától a *cox2* első intronját kódolja; "B": 540 bp *HincII* fragmentum, a *cox2* első intronjának szekvenciafolytatása; "C": 308 bp *HincII-BamHI* fragmentum a *cox2* első intronjának 3' vége; A6: 300 bp-os részlete a *ndh2* génnek (Hauswirth és mtsi, 1987); A nyilak a jelölt fragmentumok bizonytalan sorrendjét jelölik.

5. ábra



A restrikciós térképezéshez olyan módszert fejlesztettünk ki, mely alkalmas volt a nagyméretű mtDNS-ek egyszerű és gyors térképezésére. Az 1a és 1b típusú mtDNS fizikai térképe az *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *KpnI*, *XhoI* és a *BamHI*, a 2. típusú mtDNS térképe az *EcoRI*, *HhaI*, *PstI*, *KpnI*, *XhoI* és a *BamHI* restrikciós enzimek hasítóhelyeiről készültek. A restrikciós térképeket összehasonlítva, az 1a és 1b térképe egy kis régió kivételével azonosnak mutatkozott. Az eltérést hordozó régió jól lokalizálható az 1a DNS 5c jelzésű *BamHI* fragmentumára (B5c), illetve az 1b DNS 4. fragmentumára (B4). A továbbiakban ezen régió részletes analizisével foglalkoztunk. A B5c és B4 fragmentumokat pBluescript SK (pSK) vektorba klónoztuk *BamHI* helyre, majd az inszert DNS *HincII* szubklónozását hajtottuk végre. A *HincII* restrikciós endonukleáz mutatkozott egyedül alkalmasnak, hogy az 1a és 1b között megfigyelhető eltérést a legkisebb DNS régióra szűkítse (6. ábra).



6. ábra

Az 1a mtDNS típus B5c jelű fragmentuma és az 1b mtDNS típus B4 jelű fragmentuma pSK klónjainak *BamHI/HincII* kettősemésztést követő RFLP mintázata. M: λ -pUC Mix DNS molekulásúly marker (Fermentas); 1: az 1btípus B4 fragmentumának pSK klónja; 2: az 1a típus B5c fragmentumának pSK klónja

Az 5. ábrán ezeket a régiókat a térképek alatt felnagyítva kivetítettük. Az 1a-ban a kérdéses legkisebb fragmentumot "a"-val jelöltük, az 1b mtDNS térképén pedig "A", "B" és "C"-vel. A fragmentumok méretét és klónozóhelyét a III. táblázat mutatja be. A későbbiek során ezen fragmentumokat megszekvenáltuk és adatbankok szekvenciaeredményeivel összehasonlítottuk. (Az "a" fragment szekvenciája a National Center for Biotechnology Information [NCBI] on-line service adatbankban az AF051833 azonosító számon, az "A, B, C" fragmentumok szekvenciája pedig az AF059605 számon kérhető le.)

III. táblázat

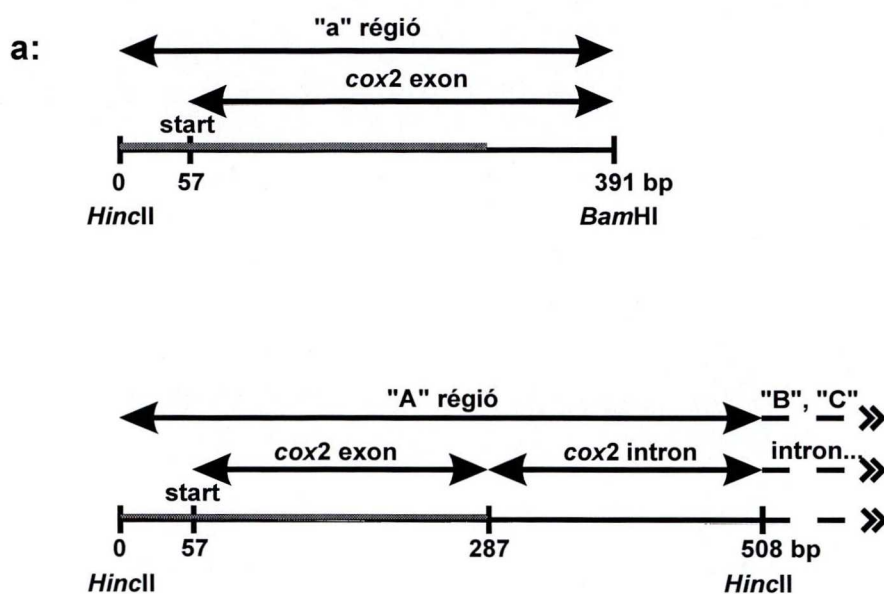
"a" fragment	"A" fragment	"B" fragment	"C" fragment
391 bp	508 bp	540 bp	308 bp
<i>BamHI/HincII</i>	<i>HincII</i>	<i>HincII</i>	<i>BamHI/HincII</i>

Az adatbankokkal történt szekvenciaösszehasonlítások során fény derült ezen régiók funkcionális szerveződésére. Az 1a mtDNS-ből származó "a" fragmentum az 57. bp-tól kezdődően (ATG start kodon) a citokróm oxidáz második alegységét kódoló gén (*cox2*) exonális szekvenciáját tartalmazza. Az 1b-ből származó "A" fragmentum a 287. nukleotidig teljes homológiát mutat az "a" jelű rokonával, azaz a *cox2* gén első exonját hordozza. A 287. bp-tól kezdődően történt változás az "a"-hoz képest. Az összehasonlító elemzések alapján az "A" fragmentum 287. bp-jától a "B" és "C" fragmentumokon keresztül egy I. típusú intront azonosítottunk, mely GIY-YIG motívumot hordozó endonukleáz típusú ORF-et kódol (7. ábra).

7. ábra (lsd.41. oldal)

a., A rajz a "a" és "A" jelű régiók felépítését és homológia viszonyait szemlélteti. start: a *cox2* gén start kodonja, szürke sávok: a "a" és "A" régiók 100%-os homológiát mutató részei. b., Az "a" és "A", "B", "C" régiók nukleotidszekvenciája.

7. ábra



b: 1a mtDNS "a" régiója

```

      10      20      30      40      50
1   GTTGACTAAA TTGGACTAGC TATAAAAATA AATGAATATC TTATATAAAT
51  ATATAAATGT TTTTAGATAT ATTAAAAGGA CATATACTAT TGGATGCTCC
101 TACTCCTTGA GGAGTATTCT TCCAAGATAA TGCTTCACCT CAAATGGAAG
151 GAATAGAAGA ATTACATAAT AATATTATGT TTTATTTAGC TATTATTTTA
201 TTCACAGTTA CATGAATGAT GATAATAATT ATAAAAAATT TTGTAGCAAC
251 TAAATCTCCT ATTGCTCACA AATATATGAA TCACGGTACA TTAATAGAAT
301 TAATATGAAC AATTACACCT GCGTTTATAT TAATATTAAT TGCATTCCTT
351 TCATTCAAAT TATTATATTT AATGGATGAA GTTATGGATC C

```

1b mtDNS "A", "B", "C" régiója

```

      10      20      30      40      50
1   GTCGACTAAA TTGGACTAGC TATAAAAATA AATGAATATC TTATATAAAT
51  ATATAAATGT TTTTAGATAT ATTAAAAGGA CATATACTAT TGGATGCTCC
101 TACTCCTTGA GGAGTATTCT TCCAAGATAA TGCTTCACCT CAAATGGAAG
151 GAATAGAAGA ATTACATAAT AATATTATGT TTTATTTAGC TATTATTTTA
201 TTCACAGTTA CATGAATGAT GATAATAATT ATAAAAAATT TTGTAGCAAC
251 TAAATCTCCT ATTGCTCACA AATATATGAA TCACGGTACA TTAATAGAAT
301 TTCAAAGTG TTCTAAGTTT AATATTAATA ATAATACTTT TTTAAAAGT
351 AAAATGTACA TTCCTTTACG TACTTATACT ACTTTACCCG GTAATCTTTT
401 AGACAAGAAT AATAATAATA TAAATTATGT TAAATTTTAT GAAGATGCTT
451 ATGAAATGAG AAAAGACATC TTTAAAAGAA ATAAAGCAA ATCGGGTATT
501 TATATGTAC TAATAAATTA ACAATGAAT ATATATATTG GACAGTCTAT
551 TGATATATCG AAAAGGTTT CAAATTAAT TAATCTTAGT TATTTAAAAA
601 GTAAGATAG TTATATAATA AGTAGGGGCT TAATTAAGTA CGGATATTCT
651 AATTTTCTG TTAGCATAT AGAATATTGT GATATATCTG ATTTAACTTT
701 AAGAGAACAA TACTACTTTG ATAATTTAA TCCACAATAT AATATATTTA
751 AAGTAGCAGG TAGTTCCTCG AATTTTAAGC ATATGAAAA GACTAAAAC
801 AAAATTAGTA AGTCTTTAAA AGGAATTTAT GAAAAAGAGA AGTCAGCTTT
851 ATTTGGTCGT TTTCATACAG AAAGAACTAA AAAACTGATG AGTTTAAAAA
901 AAAAAAATGG AAAATAATCC TTTGTTTGA AAAAATCCA TAGTTGAATA
951 TACTATAGAG TTTGATGAAA CAAAAGGCAT TAGGTTAGAA TTACATTCGG
1001 AAGGGAACAA AATTTAAAAA ATGAGTGCTA TAATGGGAA ATCCTGTTAA
1051 CATTTATGAA AAGTGTCTT ACAACACTTT AAATTAATAG GTAGTTTGT
1101 TTCAGCTAGA AGAGCTGGAA AATTTTATA TATAAGTGA AGTACTGTAA
1151 TAAAATATAT GAGATCAGGT GAAATATTTA AAGAAAGATA TAAATTTTCA
1201 TCCAAATAAA CTTAGAAAAA CTATGAATAA AATTCATAT ATGCTGGAAA
1251 CTCCTAAAGC CTTAAATACT ATATTATTAG TGACAATTTT AATGGATGTA
1301 ACAATGGACA ATCAGCAGGA AACCAACGGA TACTTACATG TATCTTAGTA
1351 GGATCC

```

Az 1a és 1b típusú mitokondriális genomok között tapasztalt 1,1 kb méreteltérés tehát egy I. típusú intron opcionális jelenlétére vezethető vissza. A változás bekövetkezésének sorrendjét, illetve eredetét nem tudjuk megállapítani, hiszen a változást vagy az 1a mitokondrium vizsgált *cox2* régióját érintő intron inszerciója (ezzel létrehozva az 1b típust), vagy pedig az 1b mitokondrium *cox2* génjének első intronjának elvesztése okozta. Az I. és II. típusú intronok mobilitására vonatkozó eddigi ismereteink mindkét eseményt egyaránt valószínűsítik (Dujon, 1989; Cech, 1990; Lambowitz és Belfort, 1993).

A 2. típusú mitokondriális genom, előzőekhez viszonyított, majd 20 kb-os kisebb méretére magyarázatot csak közvetett bizonyítékokkal szereztünk. Ezek az 1a és 1b mtDNS-ből származó szekvenciaeredmények ismeretében készített génpróbákkal végzett hibridizációs kísérleteken alapulnak. A hibridizációs kísérletek intronális és intergénikus szekvenciákat hordozó DNS próbákkal történtek. Intronális próbaként az 1b 540 bp-os "B" jelű *HincII* fragmentjét használtuk. Intergénikus próbaként pedig a *ndh4l* és *ndh5* (NADH dehidrogenáz 4l és 5. alegysége) gének között szekvenálás során feltárt 596 bp-os intergénikus régiót alkalmaztuk. A 2. típust képviselő IN7 izolátum mitokondriális DNS-e a rendelkezésünkre álló intronális, illetve intergénikus próbák egyikével sem adott pozitív reakciót. Közvetett bizonyítékok alapján feltételezzük, hogy a mintegy 20 kb méreteltérést eltérő introntartalom és eltérő intergénikus szerveződés okozza.

A. nidulans mtDNS-ből, illetve *A. carbonarius* mitokondriális genomból származó génpróbák segítségével funkcionális térképeket hoztunk létre (5. ábra), választ adva arra a kérdésre, hogy a különböző RFLP mintázat vajon a mitokondriális DNS eltérő organizációját takarja-e? Az *A. nidulans* mitokondriumából származó génpróbákat a szakirodalomban közzé tett restriktív és funkcionális térképek felhasználásával a hivatkozott *A. nidulans* izolátumból készítettük el. Az *A. carbonarius* eredetű génpróbákat pedig saját szekvenciaadataink alapján hoztunk létre (*ndh4l*, *ndh5*). A funkcionális térképek felbontását korlátozta részben a restriktív térkép helyenkénti

részlet szegénysége, más részt pedig az *A. nidulans*ból származó génpróbák komplex volta (egyes próbák kettő-három gént is hordoznak). Néhány egyedi génpróbát az *A. nidulans* esetén úgy hoztunk létre (*atp6*, *atp9*), hogy az adott gén adatbankból származó szekvenciájáról tervezve PCR reakció számára primereket szintetizáltunk, s a kérdéses gént a hivatkozott törzs mtDNS-én végrehajtott PCR reakcióval felamplifikáltuk, pSK vektorba klónoztuk, s az inszertet megjelöltük. A 4. ábrán bemutatott három eltérő típusú mtDNS génsorrendje a felbontás adott szintjén azonosnak tűnik, de géntartalom tekintetében eltéréseket fedezhetünk fel. Az A6 jelű génpróba, mely a *ndh2* gén mintegy 300 bp-os részletét tartalmazza (Hauswirth és mtsi, 1987) a három különböző mtDNS esetében eltérő előfordulást mutat. Az 1a és 2. típusú mtDNS tartalmazza az A6-ot, az 1b pedig nem. A *ndh2* gén "maradék" szekvenciái nem hibridizáltak egyik mitokondriális genomhoz sem. Ebből arra következtethetünk, hogy a NADH dehidrogenáz második alegységét kódoló gén az *A. carbonarius* izolátumok mitokondriális genomjából "távozófélben" van. Esetünkben tehát egy ismert evolúciós esemény szemtanúi lehetünk, miszerint bizonyos funkcionális gének eltűnnek a mitokondriális DNS-ből, s szerepüket magi gének veszik át (Hudspeth, 1992).



5.1.2. A mitokondriális genom és a nukleáris rDNS polimorfizmus vizsgálata *A. japonicus* faj izolátumai körében.

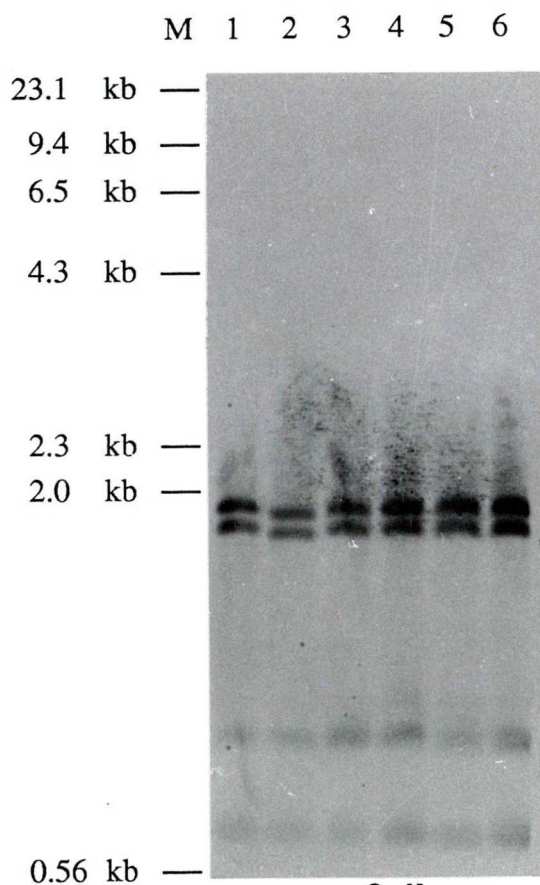
Az *A. japonicus* fajon belül mintegy 50, eltérő földrajzi területekről származó egyedi izolátum (I. táblázat) nukleáris rDNS és mtDNS polimorfizmusát vizsgáltam, az *A. carbonarius* izolátumoknál fent bemutatott módszerekkel.

IV. táblázat

<i>A. japonicus</i> és <i>A. aculeatus</i> törzsek izolációs száma	mtDNS típusa	rDNS típusa	<i>A. japonicus</i> és <i>A. aculeatus</i> törzsek izolációs száma	mtDNS típusa	rDNS típusa
1126	1	I	IN10	2	I
340	1	I	No55	3	I
327	1	I	422	3	I
IN5	1	I	426	3	I
IN12	1	I	427	3	I
IN13	1	I	443	3	I
IN14	1	I	KF3	3	I
IN15	1	I	IN6	3	I
IN16	1	I	IN8	3	I
IN17	1	I	IN9	3	I
IN30	1	I	IN18	3	I
KF2	1	I	FR.1.2.1	4	I
KF5	1	I	FR.1.2.2	4	I
KÉ02	1	I	JP02	4	I
Zebra	1	I	JP06	4	I
M.1.3.1	1	I	JP08	4	I
In.2.1.15	1	I	JP09	4	I
1.4.32	1	I	JP14	4	I
1.7A.5	1	I	557	5	I
1.7A.6	1	I	558	5	I
1.5A.11	1	I	564	6	I
JP01	1	I	No57	7	I
JP03	1	I	IN19	7	I
JP04	1	I	419	7	I
JP07	1	I	440	8	I
JP10	1	I			
JP12	1	I			

Sejtmagi rDNS polimorfizmust az 52 vizsgált izolátum nem mutatott, minden esetben azonos RFLP mintázatot kaptunk (még a 7. csoportot reprezentáló *A. japonicus* var. *aculeatus* izolátumok esetében is). Az *A. japonicus* var. *aculeatus* fajt később *A.*

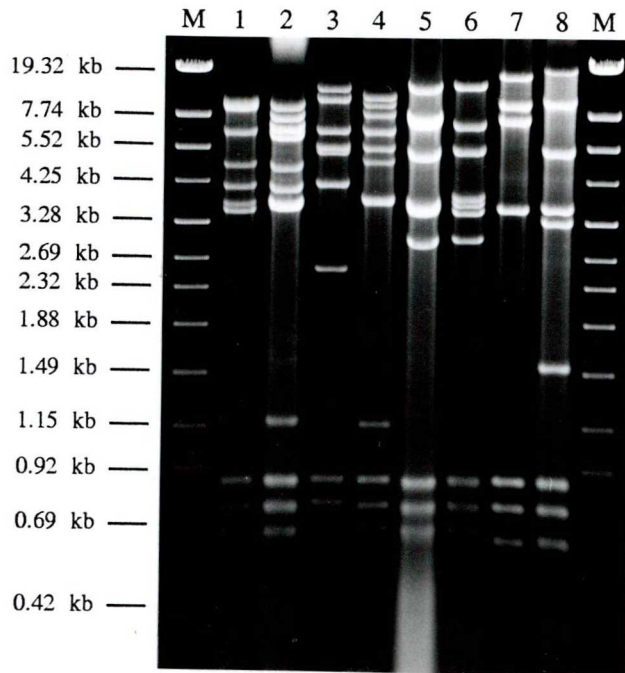
aculeatus-ként különítették el. Az eredményeket a 8. ábra és a IV. táblázat foglalja össze.



8. ábra

Az *A. japonicus* és *A. japonicus* var. *aculeatus* izolátumok sejtmagi rDNS RFLP mintázatát mutatja. Az ábrán totál DNS *Sma*I emésztését követően pMN1 próbával történt hibridizáció eredménye látható. M: *Hind*III-al emésztett λ DNS molekulasúly marker (Amersham); 1: IMI119894; 2: Fr.1.2.1; 3: 558; 4: IN19; 5: 419; 6: CBS 172.66

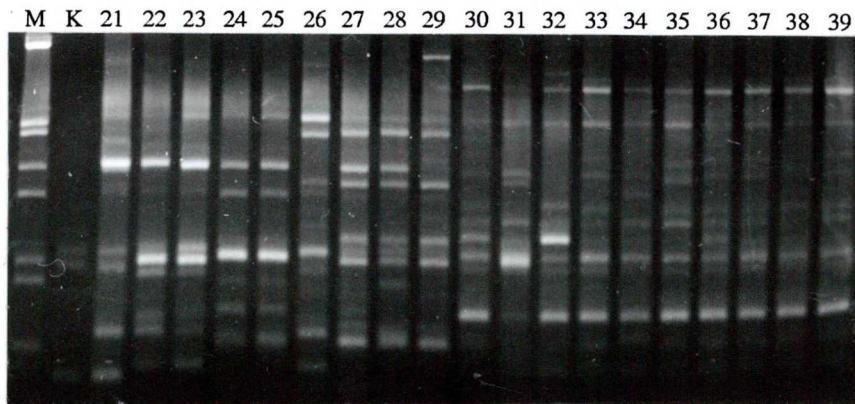
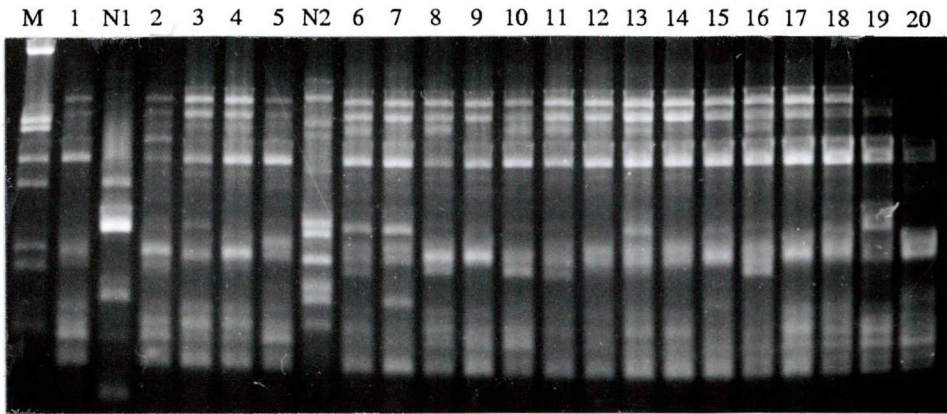
A mitokondriális DNS vizsgálatok azonban gazdag polimorfizmust detektáltunk, mely alapján az izolátumok 8 mtDNS RFLP csoportba voltak sorolhatók (IV. táblázat, 9. ábra). A mitokondriális genomok méretei 50 és 60 kb közöttinek bizonyultak előzetes becslés alapján.



9. ábra

A. japonicus izolátumok mtDNS-ének *Hae*III emésztett RFLP mintázatai. M: λ -pUC Mix DNS molekulásúly marker (Fermentas); 1: IMI 119894; 2: IN10; 3: 427; 4: Fr.1.2.1; 5: 557; 6: 564; 7: CBS 172.66; 8: 440

A különböző mtDNS típusokat csoportonként eltérő számú izolátum képviselte, mely a természetben is meglévő előfordulási gyakoriság viszonyait tükrözi. Az izolátumok zöme az 1. mtDNS típust képviselte, bár egészen távoli földrajzi területekről származtak (I. és IV. táblázat), s bizonyos típusokhoz csak egy (2., 6., 8. típus) illetve kettő (5. típus) izolátum volt rendelhető. A különböző mtDNS RFLP csoportok létjogosultságát RAPD-PCR módszerével is alátámasztottuk. Számos primerrel végzett reakció eredményeként a különböző mtDNS típusok mindig jól elkülöníthetők voltak egymástól (10. ábra).



10. ábra

A. japonicus és *A. japonicus* var. *aculeatus* izolátumok RAPD-PCR RFLP mintázatai. A PCR reakcióban primerként az Operon kit OPC-02 dekamer-jét használtuk. M: DNS molekulásúly marker III (Boehringer Mannheim); K: kontrol reakció; N1 és N2: *A. tūbingensis* IMI 172296 és CBS 120.49, külső kontrollok; 1: Zebra; 2: 1.7A.6; 3: 1.7A.5; 4: 1.4.32; 5: KÉ02; 6: KF5; 7: KF2; 8: In.2.1.15; 9: M.1.3.1; 10: IN30; 11: IN17; 12: IN16; 13: IN15; 14: IN14; 15: IN13; 16: IN12; 17: IN5; 18: 340; 19: 327; 20: IMI19894; 21: 564; 22: 558; 23: 557; 24: Fr.1.2.1; 25: Fr.1.2.2; 26: IN10; 27: CBS 172.66; 28: IN19; 29: 419; 30: KF3; 31: CBS 114.51; 32: IN18; 33: IN9; 34: IN8; 35: IN6; 36: 443; 37: 426; 38: 422; 39: 427

5.2. Mitokondrium transzmisszió, mitokondriális rekombináció értelmezése

A mitokondriumok transzmissziójára irányuló kísérleteink előzményeként az *A. niger* fajaggregátum törzsei között protoplasztfúzióval megvalósított intra- és interspecifikus mitokondrium átviteli kísérletek tapasztalatai (Kevei és mtsi, 1997) szolgáltak. Az interspecifikus mitokondrium transzmissziós kísérletek során a közel rokon *A. tūbingensis* törzsekbe sikerrel vittük át a donor *A. niger* oligomycin rezisztens mitokondriumát, de távolabbi rokoni körhöz tartozó *A. japonicus*, és *A. carbonarius* izolátumokba a transzmisszió sikertelen volt.

Az *A. japonicus* mtDNS 1. típust reprezentáló fehér konídiumszínű lizin auxotróf törzséből (1287) mitokondriális oligomycin rezisztens (oliR) mutánst sikerült izolálnunk (1287o^R), mely lehetővé tette az *A. japonicus* faj esetében is a széleskörű mitokondrium transzmissziós kísérletek megvalósítását. Ennek az oligomycin rezisztencia markernek protoplasztfúzió módszerével történő átvitelét minden eddig vizsgált mtDNS RFLP osztályt reprezentáló törzsbe megkíséreltük, megfelelő szelekciós körülmények között. Célunk kettős volt. Egyrészt azt kívántuk megállapítani, hogy az életképes utódokat eredményező mitokondrium transzmisszió milyen határok között valósítható meg olyan törzsek között, amelyeket sejtmagi komplementáció szempontjából a teljes inkompatibilitás jellemez, másrészt a létrejött mitokondrium-hibridekben lezajló rekombinációs események molekuláris szintű történéseinek magyarázatát kívántuk megadni, a rekombináns utódok mtDNS fizikai térképeinek szülőkkel történő összehasonlításával, továbbá a változást magában foglaló régiók szekvencia-szintű összehasonlításával.

Protoplasztfúzió segítségével mitokondrium átvitelt valósítottunk meg különböző mtDNS RFLP csoportokhoz tartozó egy-egy törzs felhasználásával. A mitokondrium transzmisszió mindig egyirányú volt, az átvitel során donor partnerként minden esetben az 1. mtDNS típusú, oligomycin rezisztenciát mitokondriálisan hordozó 1287o^R törzs szerepelt. A recipiensek a különböző mtDNS RFLP osztályt reprezentáló

szenzitív, prototróf izolátumok voltak (V. táblázat). A protoplasztfúziót követő szelekciós körülmények (oligomycint tartalmazó minimál táptalaj) miatt a szenzitív törzsek markerezése mellőzhető volt.

V. táblázat

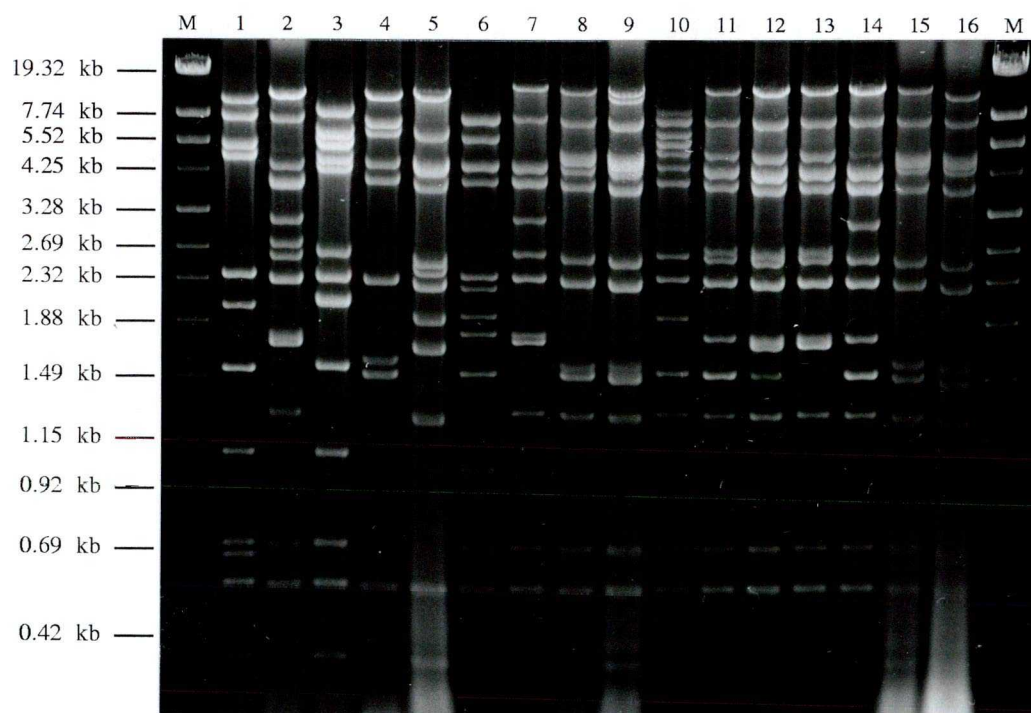
Mitokondrium átviteli kísérletekben alkalmazott törzsek azonosító számai	Törzsek eredete	Izolátum eredete	mtDNS típusa
1287 lys ⁻ white	IMI 119894	mutagenesis	1
1287 ^{oR}	Kevei F.	szelekció 1287-ből	1
IN10	"	India	2
427	J. H. Croft	Marokkó	3
Fr.1.2.1	B. Megnegneau	Franciaország	4
557	J.H.Croft	Ausztrália	5
564	"	"	6
IN19	Kevei F.	India	7
440	Szegedi M.	Ausztrália	8

A megvalósított transzmissziós kísérletek a donor és recipiens törzsek közt a mtDNS restriktív mintázatára nézve rekombináns és egyszerű ún. "szubsztitúciós" jellegű klónokat eredményeztek. Azaz fúziót követően oliR regenerált utódok mtDNS RFLP mintázatát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy rekombináns (mindkét szülői mintázattól eltérő) mtDNS profillal jellemezhető törzsek mellett nagy gyakorisággal olyan utódok izolálhatók, amelyek a donor oliR mitokondriumára jellemző RFLP mintázatot mutatják (ezeket nevezzük helyettesített, vagy szubsztitúciós utódoknak). A mitokondrium helyettesítés az *A. niger* fajaggregátum izolátumai közötti mitokondrium transzmisszió során igen ritka, 1% alatti gyakoriságú eseménynek számított (Kevei és mtsi, 1997; Tóth és mtsi, 1998). A mitokondrium transzmissziós kísérletek eredményét a VI. táblázat összegzi.

VI. táblázat

mitokondrium transzmisszió iránya	rezisztens regenerált utódok száma	valódi rekombináns utódok aránya (%)	rekombináns típusokat képviselő egyedi izolátumok (lásd 1.ábra)	donor mtDNS-ét hordozó szubsztitúciós utódok száma (%)
1→2	118	0	-	100
1→3	52	22	3.120; 3.127	78
1→4	120	100	4.01; 4.14; 4.33; 4.35	0
1→5	10	20	5.01; 5.06	80
1→6	132	0	-	100
1→7	0	-	-	-
1→8	4	0	-	100

A kísérletek során alkalmazott szülői partnerek és az összes valódi rekombináns utód mtDNS RFLP mintázatát a 11. ábra szemlélteti.



11. ábra

Az V. táblázatban feltüntetett szülői és a VI. táblázatban felsorolt valódi rekombináns mitokondriummal rendelkező utódok mtDNS-ének *EcoRV* enzimmel történt emésztésével kapott RFLP képet mutatja be. M: λ -pUC Mix DNS molekulaszúlya marker (Fermentas), 1: CBS 172.66, 2: IN10, 3: 440, 4: 564, 5: 557, 6: 427, 7: Fr.1.2.1, 8: 1287^{oR}, 9: 3.120, 10: 3.127, 11: 4.33, 12: 4.35, 13: 4.01, 14: 4.14, 15: 5.01, 16: 5.06

A kísérleti eredményeket összefoglaló VI. táblázatban feltüntettük a protoplasztfúzió után regenerálódott rezisztens utódok számát. Láthatjuk, hogy a különböző törzspárokkal elvégzett protoplasztfúziókból akár egy nagyságrendben eltérő számban kaptunk rezisztens utódot. Ennek okát jelenleg nem ismerjük, de a protoplasztfúziókat megismételve a gyakoriságok újra a fenti értékeknek feleltek meg, így kizártuk annak a lehetőségét, hogy esetleges technikai okok következtében kaptunk alacsony számú rezisztens utódot.

Az *A. japonicus* 1→2, 1→6 és 1→8 mtDNS RFLP osztályok közötti mitokondrium átvitel utódainak 100%-a szubsztitúciós törzs volt (VI. táblázat), azaz recipiens sejtmagi háttér mellett az oliR donor mitokondrium RFLP mintázata jelent meg.

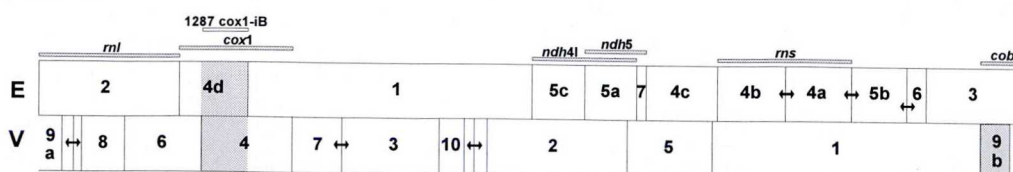
Az 1→3 és az 1→5 mtDNS RFLP csoportok közötti mitokondrium transzfer utódainak kisebb hányada volt valódi rekombináns utód volt, amelyek gyakran többféle mtDNS RFLP mintázatot mutatnak (11. ábra, VI. táblázat). Az utódok nagyobb hányada azonban helyettesített donor RFLP-jű mitokondrium hordozónak bizonyult.

Az 1→4 mtDNS típusok közötti transzmisszió utódainak 100%-a valódi rekombinánsnak bizonyult, melyek négyféle mtDNS RFLP mintázatot mutattak (11. ábra, VI. táblázat).

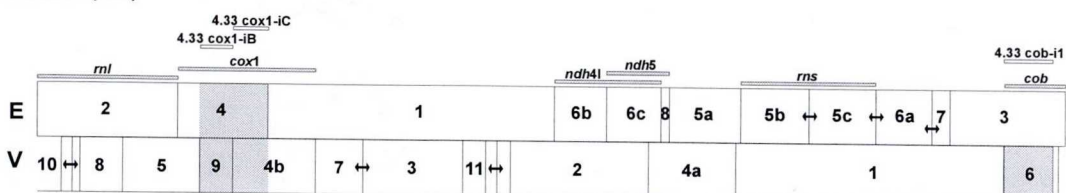
A 7. mtDNS csoportot képviselő izolátumok különálló fajnak (*Aspergillus aculeatus*) tekinthetők. A transzmissziós kísérletek (1→7) ezekkel a törzsekkel nem adtak pozitív eredményt, azaz egyéb *A. japonicus* törzsektől eltérő molekuláris jelek mellett (Hamari és mtsi, 1997) az extrakromoszómális elemek közti inkompatibilitás is indokolja a külön fajba történő besorolásukat.

A transzmissziót követő mtDNS rekombináció értelmezése céljából kiválasztottunk egy, az 1→4 csoport között lezajló mitokondrium átvitelből származó rekombináns utódot (4.33 jelű izolátum), és elkészítettük a két szülőivel együtt azok fizikai térképét (12. ábra).

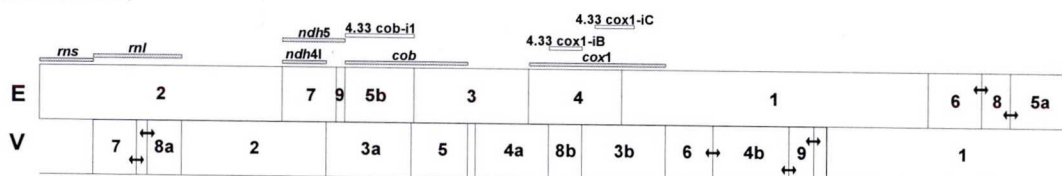
12. ábra

donor (1287o^R)

rekombináns (4.33)



recipiens (Fr.1.2.1)



■ 1 kb

12. ábra

A donor (1287o^R), a 4.33 rekombináns utód és a recipiens (Fr.1.2.1) törzsek mtDNS-ének két enzimmel létrehozott fizikai térképét mutatja be. E: *EcoRI*, V: *EcoRV*. Sötétített fragmentumok: a rekombinációs események által érintett régiók. Sötét csíkok: az adott génpróba által lefedett terület. Üres csíkok: intronpróba által lefedett terület.

A fizikai térképek összehasonlításával valószínűsíteni tudtuk, hogy a fúziót követően alapvetően a donor mitokondriuma szelektálódik ki a recipiens mitokondriális DNS-ének egy-egy szekvencia-részletével módosulva. A térképek alapján a donorhoz képest a rekombináns mtDNS-ében bekövetkezett módosulásokat lokalizáltuk, klónoztuk, majd szekvenáltuk. Két egymástól távoli régiót érintett a változás. Ezek a donor E4d és a V9b

jelű fragmentjeihez, valamint a rekombináns E4, V9 és a V6-os fragmentjeihez kapcsolhatók (a 12. ábrán ezek a régiók szürke színnel vannak kiemelve).

A donor V9b és a rekombináns V6-os fragmentek szekvencia-analízise során (13. ábra) kiderült, hogy a változás a *cob* génben történt (14. ábra). A donor *cob* gén 368. bázispárja után egy 1149 bp-os, a recipiens szülőtől származó intron épült be (I. típusú intron, ORF-et tartalmaz) a rekombináns utód mtDNS-ébe (14. ábra). Az intron eredetét az intronnal, mint DNS próbával elvégzett hibridizációs kísérletekkel igazoltuk (az intront 4.33 *cob*-i1 jelzéssel láttuk el).

13. ábra (lsd. 54. oldal)

A rekombinációs események által érintett *cob* génnek a donor és a rekombináns törzsekre jellemző szekvenciárészlete.

14. ábra (lsd. 55. oldal)

A rekombinációs események által érintett szekvenciaadatok értelmezése a donor és a rekombináns törzsek analóg mtDNS régióin. Az ábra a recipiens eredetű intron *cob* génbe történő inszertálódását mutatja be.

13. ábra

Cob régió

donor V9b fragmentum

	10	20	30	40	50	60
1	GATATCCAAT	AGAGCAAGAA	GAAGAAGAAG	AAGAAGAAAT	AGGACTATTT	TTTGATGAAC
61	GGCCAATAAA	TAGAGATTTT	AATATAGAAT	ATGAACAAAC	TAGAGATCCA	TTGTTTGAAT
121	TTGTATCAGC	ACCAACAATT	AATATACAAG	AAGCTTATTT	TAACAATCTA	GATTATATAA
181	ATGATCTTAA	TTTTGGTAAT	TATTATTAT	TTTTGTTTAA	TGGATTCTCA	ATAAATAGAA
241	TTTATAGATT	TGAAGAAATA	GATAGAGTAC	CTGCTAATAT	TAATAATAAT	AATAACAACA
301	ATAATAATAA	CAATAATAAT	AATAGCAATC	CAGAAGTTAA	TAACCCGCAA	CATAATAATT
361	CAGAACTTAA	TTTAAATAGT	AATAACTTAG	AAATTAATTT	GAATAATAAT	GGACAATCTA
421	TAGCAGGTAC	TAATATGTTA	AATAATAATC	CTAACAAATTT	AGAATCTAAC	TCGAGTTTGG
481	GTGAAATAGT	TAGAAATCCA	ACACCTGATT	TGAGTGATTG	CTCAACAGTA	TCAGAACAAT
541	CAGTGTAGTA	CCCTGGGCAT	TTTTTCAGATA	TAGCGTCAGT	AATTTCCGAG	ATATTAAGTA
601	ATTTTTAATA	TTATTTTAGG	GGTAGAATAA	AATTAAGTAA	TTTTTAATCT	TATTTTAGGG
661	GTAGGATAAT	ATTAATAAAT	TAAATTTAGT	TTATTAATGA	TAAAGACTA	GAACATAAAA
721	AAAAAAAAAA	TAAAAACAAA	AAATAAAAATA	AGAATCAGAT	AAATGTTAAT	AGTGAACATA
781	AAAAAAAAAA	ATTTTTTTTT	TATTTTCAGAT	GAGAATTTTA	AAAAAGTCATC	CTTTATTAAA
841	GATAGTAAAT	TCATATATAA	TAGATTCACC	ACAACCAGCT	AATATTAGTT	ATTTATGAAA
901	TTTTGGATCT	TTATTAGCTT	TGTGTTTAGG	TATACAAAATA	GTTACAGGTG	TTACATTAGC
961	TATGCATTAT	ACACCTAGCG	TATTAGAAGC	ATTTAATCCA	GTAGAACACA	TTATGAGAGA
1021	TGTTAATAAT	GGTTGATTAG	TACGTTATTT	ACATGCTAAT	ACAGCTTCAG	CTTTCTCTTT
1081	TTTAGTATAT	CTACCCATAG	GTAGAGGTTT	ATATTATGGT	TCATACAAGC	ACCCTAGAAC
1141	ATTAACCTGA	GCTATAGGTA	CAGTAATACT	TATCGTTATG	ATGGCTACAG	CTTTCTGGGG
1201	ATATGTTTTA	CCTTATGGTC	AAATGAGTTT	ATGAGGTGCA	ACAGTTATTA	CTAACCTTAT
1261	GAGTGTATA	CCTTGAATAG	GTCAAGATAT	TGTTGAGTTC	ATATGGGGAG	GTTTCTCTGT
1321	AAACAATGCA	ACTTTAAACA	GATTCTTTGC	ATTACACTTC	TTATTACCTT	TTGATATTAGC
1381	TGCATTAGTA	TTAATGCACT	TAATAGCTAT	GCACGATACA	GTAGGATCAG	GAAATCCATT
1441	AGGAATATCA	GGTAACTATG	ATAGATTACC	ATTTGCACCA	TACTTTATAT	TTAAAGATTT
1501	AGTAACTATA	TTTATTTTCT	TTATAGTTT	ATCAATATTT	GTATTCTTTA	TGCCTAATGC
1561	ATTAGGAGAC	AGTGAATAAT	ATGTAATGGC	TAATCCAATG	CAAACCTCCAC	CTGCAATTTG
1621	ACCAGAGTGA	TATC				

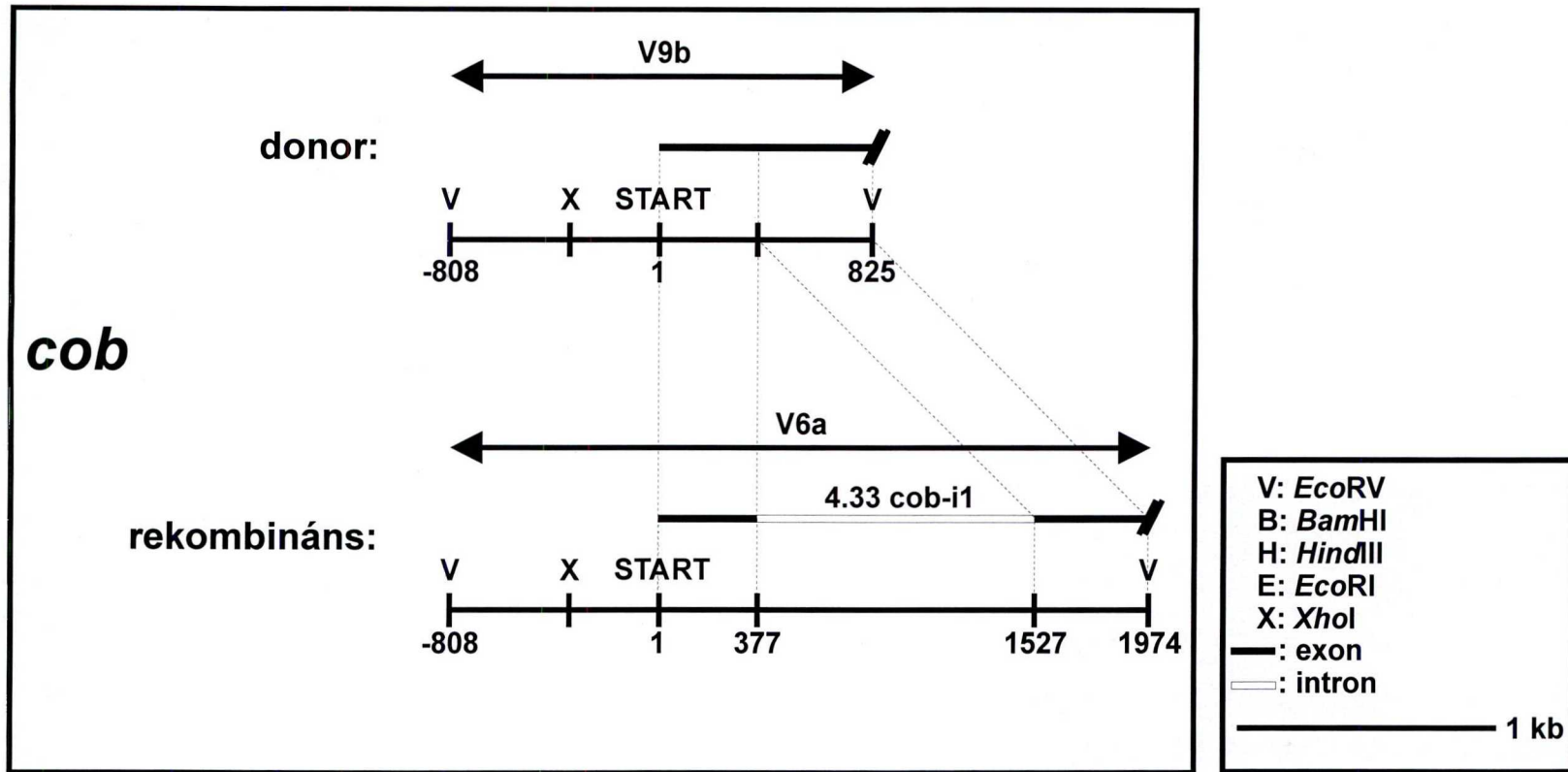
EcoRV

rekombináns V6 fragmentum

	10	20	30	40	50	60
1	GATATCCAAT	AGAGCAAGAA	GAAGAAGAAG	AAGAAGAAAT	AGGACTATTT	TTTGATGAAC
61	GGCCAATAAA	TAGAGATTTT	AATATAGAAT	ATGAACAAAC	TAGAGATCCA	TTGTTTGAAT
121	TTGTATCAGC	ACCAACAATT	AATATACAAG	AAGCTTATTT	TAACAATCTA	GATTATATAA
181	ATGATCTTAA	TTTTGGTAAT	TATTATTAT	TTTTGTTTAA	TGGATTCTCA	ATAAATAGAA
241	TTTATAGATT	TGAAGAAATA	GATAGAGTAC	CTGCTAATAT	TAATAATAAT	AATAACAACA
301	ATAATAATAA	CAATAATAAT	AATAGCAATC	CAGAAGTTAA	TAACCCGCAA	CATAATAATT
361	CAGAACTTAA	TTTAAATAGT	AATAACTTAG	AAATTAATTT	GAATAATAAT	GGACAATCTA
421	TAGCAGGTAC	TAATATGTTA	AATAATAATC	CTAACAAATTT	AGAATCTAAC	TCGAGTTTGG
481	GTGAAATAGT	TAGAAATCCA	ACACCTGATT	TGAGTGATTG	CTCAACAGTA	TCAGAACAAT
541	CAGTGTAGTA	CCCTGGGCAT	TTTTTCAGATA	TAGCGTCAGT	AATTTCCGAG	ATATTAAGTA
601	ATTTTTAATA	TTATTTTAGG	GGTAGAATAA	AATTAAGTAA	TTTTTAATCT	TATTTTAGGG
661	GTAGGATAAT	ATTAATAAAT	TAAATTTAGT	TTATTAATGA	TAAAGACTA	GAACATAAAA
721	AAAAAAAAAA	TAAAAACAAA	AAATAAAAATA	AGAATCAGAT	AAATGTTAAT	AGTGAACATA
781	AAAAAAAAAA	ATTTTTTTTT	TATTTTCAGAT	GAGAATTTTA	AAAAAGTCATC	CTTTATTAAA
841	GATAGTAAAT	TCATATATAA	TAGATTCACC	ACAACCAGCT	AATATTAGTT	ATTTATGAAA
901	TTTTGGATCT	TTATTAGCTT	TGTGTTTAGG	TATACAAAATA	GTTACAGGTG	TTACATTAGC
961	TATGCATTAT	ACACCTAGCG	TATTAGAAGC	ATTTAATCCA	GTAGAACACA	TTATGAGAGA
1021	TGTTAATAAT	GGTTGATTAG	TACGTTATTT	ACATGCTAAT	ACAGCTTCAG	CTTTCTCTTT
1081	TTTAGTATAT	CTACCCATAG	GTAGAGGTTT	ATATTATGGT	TCATACAAGC	ACCCTAGAAC
1141	ATTAACCTGA	GCTATAGGTA	CAGTAATACT	TATCGTTATG	ATGGCTACAG	CTTTCTGGGG
1201	AATGACTATA	GGATTTTAAA	ATTAATAATA	CAAAGAAATG	TATTTTTTCT	GTTTACCTTT
1261	TATTAAGAG	TAGAACTAAA	GCCATACAAA	GAATGGTCC	ACATAATAAG	GATGCTCTAT
1321	CTTTAATAGT	ATGTGGAATG	TTAGGAGATT	GATGAGGTAA	TAAATATAAA	GGTAAACAAA
1381	TAGATAGTGT	TAGATTTTGT	ATTGAACAAG	GTATAAAAAA	TTCTGCATAT	ATTCATCACC
1441	TTAACATTAC	TTTACATAAT	TTAGGTTACT	GTTCAACAGT	AACACCTAAA	TTAATGTGAA
1501	AATCTGAATC	AAAAAATAGT	AAAAGATTAG	ATCAGACATC	AATTTCCGAT	AACATATAGT
1561	TAAACAACCA	TAGTTTTACT	AATCTATTAT	GGATATATAA	TTCCTTTTAT	TACGAAGTAA
1621	ATGGTACTAT	AACAAAAAAA	GTACCAGATT	GAATAGGGGA	ATATATAACA	CCAATAGGTT
1681	TAGCTCATTT	AATTTATGCA	GACGGGTCAA	GACAAAAAAA	TCAAGGAATA	AATATTGCAA
1741	CTAATAAATTT	TTTATATAAA	GATTGTGTTT	ACTTAAGTAA	AATACTTACT	GAAAAGTATG
1801	GGTTAAAAAC	TAGTGTATAA	AAAGCAGGAG	TTGTAGACCA	ATGAAAATAA	AGTATTTGAA
1861	AACAATCTAT	GAATGATTTA	GTTTCAATAG	TTAAACCATA	TATAGTAGAC	GAATGAAAT
1921	ATAAATTTAT	AGGGTATATT	TAATTTTATT	TCTTAGATCA	AAGTCCCTACT	CTACTTAGAG
1981	TATATGCAAT	ATATAAATTA	AAATATACTG	TTATAATTTA	TGATTTTTCG	ATTAATTTATA
2041	ACTAGAGTAG	GATACCTCGA	CAGGGTATTG	GTTATAACTG	GCATATTAGT	GAACGGTTA
2101	AATATTCGTT	ATCTGTATAA	GCCGTCGGTT	AATTATATAT	TCGNACAGA	CTGGGTCATT
2161	AGTGGGTATN	TGAAATGATA	CCTAATGTAC	AGTCGGAAGT	TCNTAATCGT	AAAGATTACA
2221	CAGGCTTTAG	ATGAGATATA	TTATAAAGAT	ATTTGNTAAA	TATCGGGGAC	TAATATATTG
2281	ATAAAGTACA	GGGGCACTAT	ACAGATAAAT	TTAGGTTATA	GTTAGCCGGA	ACTTAGTACAG
2341	CTTTCTTGGG	ATATGTTTTA	CCTTATGGTC	AAATGAGTTT	ATGAGGTGCA	ACAGTTATTA
2401	CTAACCTTAT	GAGTGTATAA	CCTTGAATAG	GTCAAGATAT	TGTTGAGTTC	ATATGGGGAG
2461	GTTTCTCTGT	AAACAATGCA	ACTTTAAACA	GATTCCTTGC	ATTACACTTC	TTATTACCTT
2521	TTGTATTAGC	TGCATTAGTA	TTAATGCAC	TAATAGCTAT	GCACGATACA	GATGATCAG
2581	GAAATCCATT	AGGAATATCA	GGTAACTATG	ATAGATTACC	ATTTGCACCA	TACTTTATAT
2641	TTAAAGATTT	AGTAACTATA	TTTATTTTCT	TTATAGTTT	ATCAATATTT	GTATTCTTTA
2701	TGCCTAATGC	ATTAGGAGAC	AGTGAATAAT	ATGTAATGGC	TAATCCAATG	CAAACCTCCAC
2761	CTGCAATTTG	ACCAGAGTGA	TATC			

EcoRV

14. ábra



A változást érintő másik régió a donor E4d, V4 és a rekombináns E4, V9, V4b fragmentek átfedő területére lokalizálható. Ezeknek a fragmentek szekvencia-analízise azt mutatta (15. ábra), hogy a donor *cox1* gén általunk vizsgált szakaszának második exonjába egy recipiens eredetű intron épült be (ORF-et hordozó I. típusú intron), mely 1359 bp méretnövekedést okozott (16. ábra).

15. ábra (lsd. 57. oldal)

A rekombinációs események által érintett *cox1* génnek a donor és a rekombináns törzsekre jellemző szekvenciárészlete.

16. ábra (lsd. 58. oldal)

A rekombinációs események által érintett szekvenciaadatok értelmezése a donor és a rekombináns törzsek analóg mtDNS régióin. Az ábra a recipiens eredetű intronok *cox1* génbe történő inszertálódását, továbbá egy donor intron elvesztését mutatja be.

Az intron recipiens eredetét, annak hibridizációs próbaként történő felhasználásával igazoltuk (az intronális próbát 4.33 *cox1*-iC-ként jelöltük). A donor és a rekombináns utód szekvenciaeredményeinek összehasonlításából egy másik rekombinációs esemény bekövetkezését is valószínűsítettük. Ez az esemény detektálható méretbeli változással nem járt, csak a szekvenciaadatok bizonyítják a lezajlott eseménysorozatot. A vizsgált *cox1* régió első exonja a donorban és a rekombinánsban is tartalmaz intront (ORF-et hordozó I. típusú intron), de azok nem identikusak, egymással nem mutatnak szekvencia azonosságot. A donorban levő 1230 bp-os intron a donorra jellemző (1287 *cox1*-iB), a rekombinánsban levő 1239 bp-os intron pedig a recipiens szülőre jellemző (4.33 *cox1*-iB), mely megállapítást a szekvenciaelemzéseken túl az intronokkal végzett hibridizációs kísérletek támasztják alá. A donor és a rekombináns ezen intronja nem azonos exonális környezetben helyezkedik el, de egymáshoz közeli (15 nukleotid távolság) pozícióban foglalnak helyet. A fenti tények alapján valószínűsíthető, hogy két esemény játszódott le ebben a kis régióban. Az egyik a donor 1038 bp-tól kezdődő intronjának elvesztése



15. ábra

cox1 régió

donor V4/E4d fragment

```

10      20      30      40      50      60
EcoRV  |      |      |      |      |
1  GATATCATGA ACCAATGAGT CAAGAAATAC GAGAAAGATT ACGTAAACAA AGAGGTATTC
61 CTGTTTATAT ATATAATGCA GATGACTTTG CATTAAATATA TGTTTTGAG TCAAAACAAAC
121 ATATGTATGA TTCAATCAAT ATTCATCATA AAAGTTTAAA CGATTGTTTA AATTTAGGAA
181 CCTTATATCT AGATACTTTC TTTTTTCTT TAGATTTAAT TGAGGAATCA ACTAAAACTA
241 ATATACTCAC TTTAGAAGAG ATTTAAAGTT TAGTTAGCGA TAAACGAGAT AAATATCTCG
301 TTAACATCC  TGCAGCTAAA TCTATTTTAG CTGAGTTTAA AGACGATTCA AGTAAAAATT
361 TAGTATTTCA ATCCTTGAAT AGTTTAGCTA ACAATCTAAA AGGTGACCGT CAAGTTATTA
421 GAGAATACCT AAAAGGAAAA AAATCAGGTT ATTATCGAGG TAAATGAAAA TTTACTTACA
481 TAAATTAAGG ATATTATATA AAAAAAAGG GCATGGCCGG GTAAGGTAGA AATATCTTAC
541 TTATTTTCAC TGTATGCTGG AATCCCTTTA GAGCTTTTGG ACTAGTACTG CAGACTTTCT
601 TTTAATAGAA AAGCGGCAGA ATACAGTAAC ATTTCAAAGG ATTAGGCAAT CGCCGGAAAC
661 AAAAAATAAA GGGCCCTGTG NCATTAACAC TTTATTTAGT AGGATCCTCA GAGACTACAC
721 GTGAAATACC TTAGTAAATA TTATATATAT TTAAGGTAA AGATATAGTC CAAACATTA
781 TGAAATTTAA TGAGAAAGTCC CCAAGAGAAA GTCCCAAAA TTTCTCGTAA AAGTTAATT
841 TGATTTGATT ACAAAAAGT TGTATGCCAG CTTTAATGG AGGATTTGGT AATTTTTTAT
901 TACCATTATT AGTCGGAGGG CCAGACATGG CATTCCCTAG ACTAAATAAT ATAAGTTTCT
961 GATTATTAGT ACCTAGTTTA CTATTATTTG TATTCTCGGC AACTATAGAA AATGGAGCAG
1021 GTACAGGTTG AACCTTTAAA AATAGGGAGT TGCTTAGAGG TGACTCTAAG GCAATAAACC
1081 TCTTTTCGAT GCGTGAACAT CTTCAAGTAT TAAATTAAT AAAATACAC GTTATAGACT
1141 ACTCATGGTT ATTATTAECT AAAGCATATG TNAAAATGTC TATTGCATGG ACTCAATACG
1201 CCTGAGTAAA TAATAAATAT TATTCTACTC ATCAGAGACT AAATAAAGAG TATCTGTATA
1261 ACAATAAAAA TTGATTTAAA CAATGATTAG TTGGTATGAC TGTAGTGTAG GAGCCTTTTC
1321 ATATATCATA TCAAAATGGT AAATGGAATC TAGTATATAA AATAGCTTTA TCTAGATATA
1381 ATTTAAAGAC TCTTTTTAT ATTTAAAGAC AATAGGTGT AGGTTCTACT GACTAAAGC
1441 ATCAAAAAGG ACAATTTGTT ATTAGAGATA GGAAAAACCT AGCTCAAGTT ATATTCTCA
1501 TTTTGATATA ATATCCTTTA TTAACTAGTA ACAAATTTGA TTACATAAAA TTAAAAAAAG
1561 CATATGATAT ATTAGAAGAT ATTAATTTAT CTAAAAGTGG AAAAATAAAA ATTTATTTT
1621 GAAATAAAAA AAAAAACTAT CCCTTTTTAA TTATAGATCA AATGCTTAG AAAAAATAA
1681 ACTACCTTTT GAAACTGTAC AAGATGTTAC TTGTGTAATG ACTAAACCTT GAGTACTTGG
1741 ATTTATAGAA GCTGAAGGAA GTTTTATTT ACTTTCAAAA GATAGTACTA GAATGTACA
1801 TGCTTTTGGG ATAACTCAA AATTAGATCC TATAGTTTAA GAGAGTATAA GACTATATTT
1861 ACATATCTGA ACTACTATA GATTTAAATC AAACATAAT TATTATATTT TAGATAACAAC
1921 TAATCTTAGA GCTATTGAAA ATATTATACA TTATTTTTAT AATACAATGA AAGGTATGAA
1981 ATCAATAGAA TATAGAAATG GAGTAGATC TTATGTTAAA CATAAGGGAA ATTAGATAAA
2041 ATTTGCAAA AATTAGAGATA TTATAAGAAA ACTTAAATAT AAATTTAATG GAAATTAATG
2101 ATTTGCAAA AATTAGAGATA TTATAAGAAA ACTTAAATAT AAATTTAATG GAAATTAATG
2161 TATTGTTATC AAGATAAAGG TATAGTCCGA ACAATAAAGA AATTTATTTGA GTGTAAACGAT
2221 AGTTTCTTTT TTTTTTAATT TAAGAAATGA GGTACCACAC ATAAATGTTA CCGACCTTTA
2281 TCAGGAATAC AATCTCACAG TGGACCAAGT GTTGATTTAG CAATATTTGG TTTACACTTA
2341 AGTGGAAITA GTAGTATGTT AGGAGCTATG AACTTCATAA CAACAATTTT AAATATGAGA
2401 AGTCCAGGTA TACGTTTACA CAAATTAGCT TTATTTGGTT GAGCTGTAAT AATAACAGCA
2461 GTGTTATAT TATTATCATT ACCAGTATTA GCCGGTAAAT ATAGAAAACCT GTCCGGCTTA
2521 AATTTGGCTA TATACTGGAA ACTGTTATAT ATTTATAGAT ATATAACACA ATCAGTAGGA
2581 AACCTTTTAG GTTTGAACCT AGAGGATTTC TTCAGAGACT ACACGCCAAA GTATTTTCAT
2641 TGTAGATTAT TGCATTTCTT GTTTAATAAT AAGATTTG
EcoRI

```

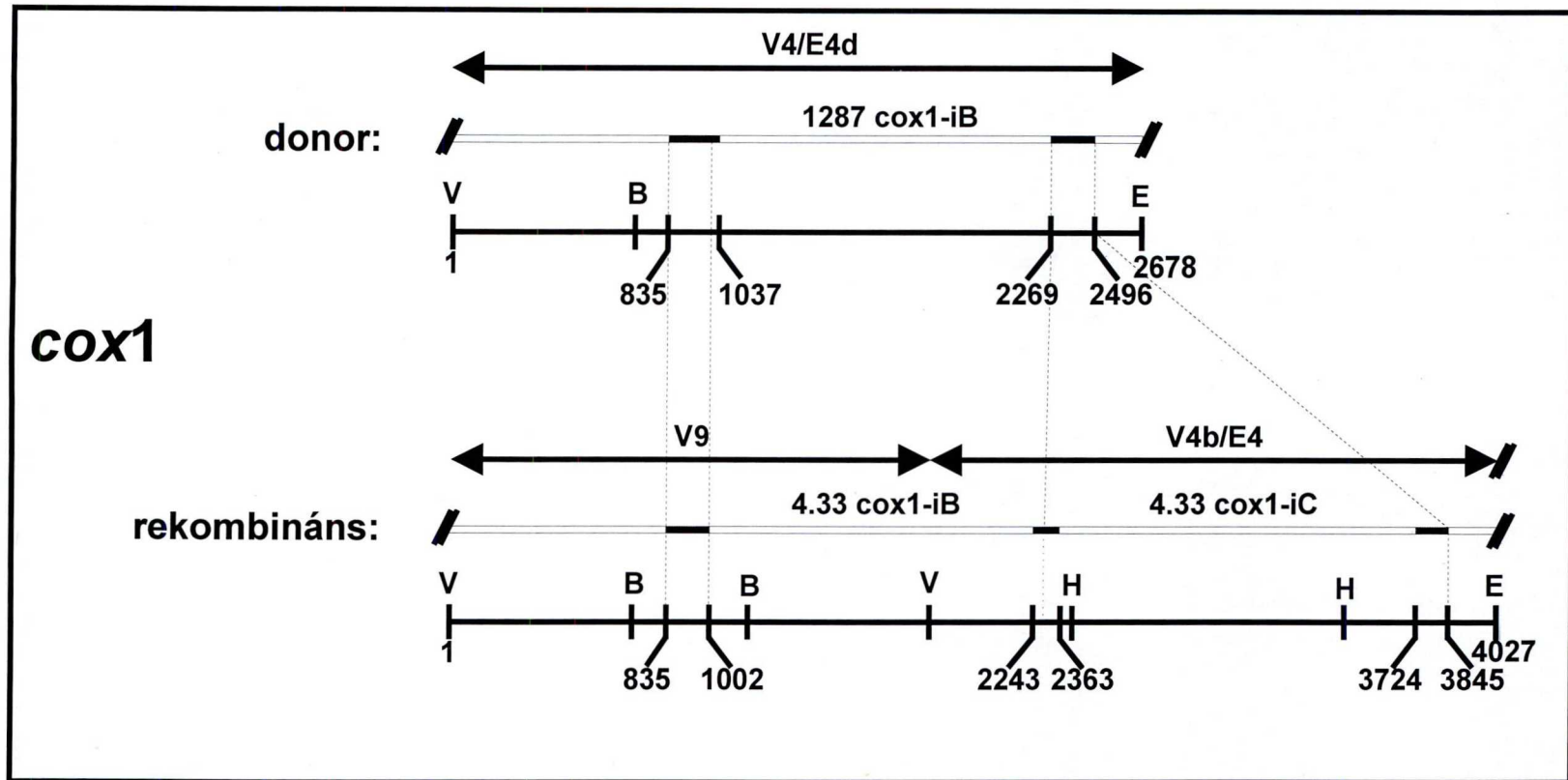
rekombináns V9 és V4b/E4 fragmentek

```

10      20      30      40      50      60
EcoRV  |      |      |      |      |
1  GATATCATGA ACCAATGAGT CAAGAAATAC GAGAAAGATT ACGTAAACAA AGAGGTATTC
61 CTGTTTATAT ATATAATGCA GATGACTTTG CATTAAATATA TGTTTTGAG TCAAAACAAAC
121 ATATGTATGA TTCAATCAAT ATTCATCATA AAAGTTTAAA CGATTGTTTA AATTTAGGAA
181 CCTTATATCT AGATACTTTC TTTTTTCTT TAGATTTAAT TGAGGAATCA ACTAAAACTA
241 ATATACTCAC TTTAGAAGAG ATTTAAAGTT TAGTTAGCGA TAAACGAGAT AAATATCTCG
301 TTAACATCC  TGCAGCTAAA TCTATTTTAG CTGAGTTTAA AGACGATTCA AGTAAAAATT
361 TAGTATTTCA ATCCTTGAAT AGTTTAGCTA ACAATCTAAA AGGTGACCGT CAAGTTATTA
421 GAGAATACCT AAAAGGAAAA AAATCAGGTT ATTATCGAGG TAAATGAAAA TTTACTTACA
481 TAAATTAAGG ATATTATATA AAAAAAAGG GCATGGCCGG GTAAGGTAGA AATATCTTAC
541 TTATTTTCAC TGTATGCTGG AATCCCTTTA GAGCTTTTGG ACTAGTACTG CAGACTTTCT
601 TTTAATAGAA AAGCGGCAGA ATACAGTAAC ATTTCAAAGG ATTAGGCAAT CGCCGGAAAC
661 AAAAAATAAA GGGCCCTGTG NCATTAACAC TTTATTTAGT AGGATCCTCA GAGACTACAC
721 GTGAAATACC TTAGTAAATA TTATATATAT TTAAGGTAA AGATATAGTC CAAACATTA
781 TGAAATTTAA TGAGAAAGTCC CCAAGAGAAA GTCCCAAAA TTTCTCGTAA AAGTTAATT
841 TGTATGCCAG CTTTAATGG AGGATTTGGT AATTTTTTAT TACCATTATT AGTCGGAGGG
901 CCAGACATGG CATTCCCTAG ACTAAATAAT ATAAGTTTCT GATTATTAGT ACCTATTTG
961 CTATTATTTG TATTCTCGGC AACTATAGAA AATGGAGCAG GACTAACAA CCGTGTGCT
1021 GAGTAGTAAG CAATTACTAT ATAGATTATC ACCATAGCT GGAAGTCCT ACATAGATT
1081 GTTCAATAA GTATATGCTA TGTATTGCA AGGACATCA CGAGAAAC CCACAACTAT
1141 TGATCTCTC AGAGACTACA CGGTATACAC NTTAAAGGT GAAATATAG TCCAATTTA
1201 TATGAAAGT TAACCAAAAT GAATATATT TTACTTTAAT AGTGAAGGA TTAGTAAAA
1261 TTTGAAATC TCTCTTAAAT CATCGTTTAT CGCACTCTT AGCTAAAAAT AATCCGTAA
1321 ATATTAGT GCATTACTT AGCAGGGTGG ATAGAAGGTG ATGGATCTCT TATCGTACT
1381 AAAAAATGTC GAAATCAAAA AGTTAAGTTG TTATTTCCCT GTAGTAAAA TCACTTTTTC
1441 AGAAAGGAT GCACCTTAG CCAATAAAT TAAAGAGCT TAAATGGAG GTACTTTGGT
1501 GTATTCTAAA AATTCAAAGT ATTTGATCT TTTATTTCAA GATCTAAAT CAATAGATT
1561 GATTCGTTA CTCTTAAAG GGAATAGAG GACACATAA ATAGAAGCTC TACTAGATT
1621 AATTTGTTGA TTAATGCTA GATCAAGTGA AAATTTAAA ATGCTAAAC TTGGTTTAGA
1681 TCATAGTCCA TTAGGAAATA ACCCGTATT AACTGGTTTT ATCGAAGCT ACGGTAATT
1741 TACTGTGTT TCGGTTTTAA ATTCAGAAGG TATAGCAGAG GTAGTAAAA GTTATATGAG
1801 AATTTCTCAA AAACAAATAT ATAAAATAC CTCAGATATC TCAAAAGAAA ATACTCTAA
1861 TTTTCAAAT ATGAAAAAAA TTAGATATT CCTTGATGTA AAAAAAGTTA ATGAAATTTA
1921 AAGAACTCAAG GATAATTATG TTGAAATATC TTATGAAGTT AGAACTATA AAAAACTTC
1981 TTGTGATAAT TTAATAGATT ATTTATCAAC ATATCCTTTA TTTAGTTCTA AACATCAAGA
2041 CTCTTAGAT TGACGGGAAAT TTCATCGAAT AAGATTATCT AGAGGGTATA AATACAGCGA
2101 AGGTAGATCT AAATTAATAT CCCTAAAATA CCGCATGAAT ACTAAAAGAA CTCATTTTAA
2161 TTGAGATTCA TTGAACAGTT TTTACTGTAC AATGTAATCA GGGTTAACAA TAATGAGATA
2221 GAAAAAAGTT CATTAAAAAA TGCAGGTTG AACATTTAAT CCACCTTTAT CAGGAATACA
2281 ATCTCACAGT GGACCAAGTG TTGATTTAGC AATATTTGGT TTACACTTAA GTGGAAATAG
2341 TAGTATGTTA GGAGCTATGA ACTTAACTTG GCACGTATTT GTTTTATTA TAATAAAAA
2401 TTTGATAAGC TTTAACTAA CAAAGCGAAA TTTTAAACAGT AACGGTAATT TAAATAATA
2461 TAAACTATCC GATCCCAATA AAAATAAAGA TAAATGAAA ATTTATCTAG GGAAGTGG
2521 TGTTAATCAA TTTGTTACA GATTAGCTTT TGAAACAATA AAATCAGGTA AACCTGTAAC
2581 GGTAAGAAATA ATTAACGAGA TATTATCTTC TTGTATATA GAAATFACT AAGAGATATT
2641 AAAAGATCTT GTTCAAGAAA AAAGATATAT TTATGATAAT TTAGATAAAA ATGAAACAA
2701 AAAAGGCTTT AAAGCTCAA TTGGTTCACC GTCTAATAAG ATTCAGTTT CAGGATATA
2761 CATATTCAAA CACCAAGAAA CGGGAGATA GATATTTGGT TCTCTTCA AATTAGCAAT
2821 TAGATTAAT GGTATTGTA AAGATACACA TAAAGCAATT GGTCTATTA TCCGCAATT
2881 AAAAGGGAAA TTAGATAAAA TTTACTTTGG AAGTAATACC TTTGTATAG AATATGAAT
2941 TTAGATCGGA AATAGCTTG GAACAATATT ATTTATGGA TCCTCTTTT AATTAATAA
3001 CAGTAAGAGT AGTAAATAAT CCTAGTGG A TCTAATCGGA AACCTTTGTA TATGTATAA
3061 AGAGATAAAA CTATCTTGTA TTACTCTCA ATGCAGCAA AAGATTTAT TACTAATCT
3121 AATATTCATT ATGTTACATT TAATAAGCAT TTAATAAGG GTACTTATA TTAGGTAAA
3181 TATTATTATA CTAGAGAAC TTCATTAAT GTTAAAAATA ATGATATGC TATTACAGAT
3241 TTATCATTA TTTAGAAAA GATAGGGTT AAATATAATA GAATTAACC TTTAGTAGT
3301 CTAGTAGAC CAGTAATATT AATAAATGAA AAAGATAGTA ATAAAACGTA GTTCTTCTC
3361 AGTTTAGGTA AGTGTGTTGA ATATTTAAGA AGTAAAGGTT TACCTGCAAC TCAAGTTACG
3421 TTAATTAAT GTATAAATAC AGATAAAGCT TATCATAGT ACAATGTAA ATACGATAA
3481 AACAAATTT TAAGTATGG TTCAATAAAA AAATCTAACT ATATGCTGGA ACAGCTTAGT
3541 GTTTATAAGT ACGTGTGTT ATAAACAGCT GAAATCTTA TAGGCTATG TCAATCAGCA
3601 GGAACCAA GACTACTTCT TTGTATCTTA GTAGGATCCT CAGAGACTAA CCGTTAGCA
3661 CCGTAACTGA AAATACGATA CGCTGAAGAT ATAGTCCATT CATTATCAAT AATGATAAGT
3721 GTTATAAC AACAAATTTA AATATGAGAA GTCCAGGTA ACCTTTACAC AAATAGCTT
3781 TATTGGTTG AGCTGTAATA ATAAACAGCAG TTTTATTTT ATTTATCATA CCAATATAG
3841 CCGGTAATA TAGAAAAGT TCGGGCTTAA ATTTGGCTAT ATACTGGAAA CTGTATATA
3901 TTTATAGATA TATAACAAA TCAGTAGGAA ACCTTTTAG TTTGACCTA GAGGGATCT
3961 TCAGAGACTA CACGCCAAG TATTTTCATT CTAGATTTAT GCATTTCTCG TTTAATAATA
4021 AGAATTC
EcoRI

```

16. ábra



("intron loss"), a másik pedig a recipiens eredetű 1003-2242 bp-ig tartó intronjának beugrása ("intron acquisition", vagy intron nyerés). Figyelembe véve, hogy az I. típusú intronok által ORF-ekben kódolt specifikus endonukleázok restrikciós felismerőhelye 18 bp terjedelmű (Dujon és mtsi, 1989), a két intron inszerciója pedig egymáshoz képest 15 nukleotid távolságra pozícionálódott, arra következtethetünk, hogy a donorban és a rekombinánsban detektált két intron szekvenciafelismerő motívuma átfedést mutat egymással. Ennek értelmében a bekövetkezett két esemény időbeli sorrendjét is valószínűsíteni tudjuk, miszerint csak a donor intronjának elvesztését követően inszertálódhatott a recipiens eredetű másik intron, ugyanis a donor intronjának elvesztésével állhat csak helyre az a szekvencia felismerő motívum, melyet a recipiens eredetű intron által kódolt endonukleáz igényel. A két ellentétes irányú esemény, mely szinte ugyanazon pozícióban zajlott, a mtDNS RFLP mintázatában az általánosan alkalmazott restrikciós endonukleázokkal nem okozott változást. Ha a szekvenciameghatározásra nem került volna sor, ez a változás valószínűleg rejtve maradt volna. A szekvenciaadatok összehasonlítása során egyéb nukleotid átrendeződéseket is megfigyelhetünk, melyek a rekombináns utód exonális szekvenciáit érintetik. A donor 1287 cox1-iB intron 5' és 3' végét határoló exonális szekvenciák megváltoztak. Az intron 5' vége felé eső exon 3' végének utolsó négy nukleotidja (a 15. ábrán fekete pontokkal jelöltük) és az intron 3' végét határoló exon 5' végének első három nukleotidja (a 15. ábrán fekete pontokkal jelöltük) az intron elvesztésekor, illetve a recipiens eredetű új intron beépülésekor szubsztitúciós változásokat szenvedett. A rekombináns utódban a donorban jelzett hét nukleotid helyett hét, attól eltérő nukleotidot azonosítottunk. Hasonló jelenséget részletesen leírtak *Podospora* izolátumok intronális ORF-jei opcionális előfordulásának tanulmányozásakor (Sellem és mtsi, 1996). Ezen kívül egy 20 bp-t érintő deléciós eseményt is megfigyeltünk, azaz a donor 843-862. bp-ig terjedő rövid exonális szekvenciája (a 15. ábrán sötét keretben kiemelt régió) a rekombináns analóg részéből hiányzik. Az irodalmi adatok ismeretében úgy gondoljuk, hogy a recipiens eredetű intron inszerciója okozta az exonális

szekvenciák szubsztitúciós átrendeződését, de a deléciós események okát jelenleg nem ismerjük, irodalmi adatok nem állnak rendelkezésünkre a jelenséggel kapcsolatban.

Az 1287oR (donor), a Fr.1.2.1 (recipiens) és egy rekombináns utód (4.33) részletes, szekvenciaszintű analízise során négy intront azonosítottunk, melyek a vizsgált utód relációjában a rekombinációs események résztvevői voltak. A többi, hét különböző, valódi rekombináns utód viszonylatában térképek, szekvenciaadatok nem állnak rendelkezésünkre, de a négy ismert intront intronális próbaként alkalmazva hibridizációs kísérletekben, mégis bepillantást nyerhetünk azok rekombinációs eseményeire. A négy intront hibridizáltattuk a kísérletek során alkalmazott összes szülő mtDNS-éhez, továbbá a kísérletek során izolált nyolc különböző valódi rekombináns utód mtDNS-éhez. Az eredményeket a VIII. táblázat foglalja össze.

VIII. táblázat

törzsek	4.33 cox1-iB	4.33 cox1-iC	4.33 cob-il	1287 cox1-iB
5.06	-	-	-	+
5.01	-	-	-	+
4.14	+	+	+	-
4.01	+	+	+	-
4.35	+	+	+	-
4.33	+	+	+	-
3.127	-	+	-	+
3.120	-	-	-	+
1287o^R	-	-	-	+
Fr.1.2.1	+	+	+	-
427	+	+	-	-
557	+	-	-	-
564	-	-	-	+
440	+	-	-	-
IN10	+	-	+	-
No57	-	-	-	-

A hibridizációs eredmények alapján láthatjuk, hogy a donor *cox1-iB* intronja a Fr.1.2.1 izolátummal való transzmisszió során minden esetben (4.01, 4.14, 4.33, 4.35) elveszett, a többi transzmisszióból származó valódi rekombináns utódok esetében pedig nem. Az, hogy az intronvesztés gyakorisága az 1→4 transzmisszió során 100 százalékos, a szakirodalmi adatok tükrében figyelemreméltó, de magyarázni jelenleg nem tudjuk. Az utódok között vannak olyan rekombináns típusok, melyek rekombináns karakterének kialakításában, a négy vizsgált intron egyike sem játszott szerepet (3.120, 5.01, 5.06). Ezen utódok rekombináns jellegét valószínűleg más intronok mozgása formálta.

Az intronvesztés gyakori lehetőségének ismeretében vissza kell térnünk a szubsztitúciós mitokondriumú rekombináns utódokhoz. Azok mtDNS RFLP mintázata a donor törzs mtDNS RFLP mintázatával mutat teljes azonosságot. A fenti ismeretek birtokában azonban az is elképzelhető, hogy az azonos RFLP mellett introntartalomban eltérnek egymástól, és a donortól. Nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy közeli pozícióban lezajlott intronvesztés és intronnyerés révén a mitokondrium helyettesített utódok mtDNS-e introntartalom vonatkozásában eltér a donorétól, s így valódi rekombináns mtDNS-sel rendelkezhetnek. A kérdést következő munkáink során kívánjuk tisztázni. Amennyiben újabb valódi rekombináns utódok szekvenciaszintű analíziséből újabb mobilis intronokat tudunk azonosítani, és kellően sokféle mobilis intronnal rendelkezünk, akkor hibridizációs kísérletek sorozatával megpróbálunk információt nyerni a szubsztitúciós utódok mtDNS-ének introntartalmáról.

Mindezek alapján valószínűsíthetjük, hogy az általunk megfigyelt rekombinációs események intron-mozgáson alapulnak. Az intronok akár I., akár II. típusúak, képesek intronmentes régiók benépesítésére bizonyos természetes törvényszerűségek miatt (Lambowitz, 1993). Valószínű, hogy a rekombináció tényét és a bekövetkező események gazdagságát a két partner introntartalma határozza meg, függően a két partner kompatibilitási hajlamától, rokonsági fokától. Az intronok mozgását tulajdonságaik határozzák meg, teszik szabályszerűvé (pl. az I. típusú intron ORF-ek

által kódolt endonukleázok felismerő helyei specifikusak). A specifitás bizonyos rokonsági (kompatibilitási) körön belüli mozgást tesz lehetővé, de ezzel nem zárjuk ki a távoli biológiai rokonok között végbemenő horizontális géntranszfer lehetőségét, hiszen egy-egy intronnak csak néhány bázispáros szekvencia-felismerőhelyre és hasítóhelyre van szüksége a mozgáshoz (Lambowitz, 1993), ezt a szintű molekuláris kompatibilitást pedig távoli esetek is biztosíthatják.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az általunk vizsgált két imperfekt gombafaj (*A. carbonarius*, *A. japonicus*) polimorfizmusát gyűjteményes és szabadföldi izolátumok mtDNS és magi rDNS RFLP analízisével tanulmányoztuk.

Az *A. carbonarius* fajon belül vizsgált 15 izolátum mtDNS RFLP polimorfizmus alapján három mitokondriális genom típust reprezentált (1a, 1b és 2). A magi rDNS az *A. japonicus* izolátumokkal ellentétben az *A. carbonarius* fajon belül két típust reprezentált (I., II.), mely korrelációban áll mtDNS RFLP csoportjaival. Az 1a és 1b mtDNS típust képviselő izolátumok a magi rDNS I. típusú RFLP profilját mutatták, a 2. mtDNS típust reprezentáló egyetlen izolátum pedig a II. típusú rDNS-t képviselte. A fajra jellemző három különböző megjelenési formájú mtDNS méreteit már kutatásunk kezdeti fázisában megbecsültük, és összehasonlítva az *A. niger* fajaggregátum tagjaira jellemző értékekkel (30-33 kb), kiugróan nagyoknak találtuk őket.

A mitokondriális genom méretbeli különbségeit értelmezni szeretnénk volna, ezért fordult figyelmünk ezek után a mitokondriális genom szerveződése felé. Kidolgoztunk egy egyszerű és gyors restrikciós térképezési módszert, mely alkalmas volt a nagyméretű mtDNS-ek térképezésére. Elkészítettük a három különböző mtDNS hat-hat enzimes fizikai, továbbá mitokondriális génpróbák segítségével funkcionális térképeit. A térképezés során meghatároztuk a mitokondriális genomok pontos méretét, mely az 1a, 1b és 2 mtDNS típus esetén 62,0 kb, 63,1 kb és 43,3 kb-nak bizonyult. A 2. mtDNS típust képviselő egyetlen, IN7 nevű izolátum mitokondriális genom mérete mintegy 20 kb-sal kisebb a többinél. A mtDNS és magi rDNS jellege is eltér a többi izolátumétól, ezért taxonómiai szempontból távolabbi rokoni kapcsolatot feltételezünk, s ezt a típust az *A. carbonarius* faj alfajának tekintjük. Az 1a és 1b mtDNS-ek restrikciós térképei közöttük megfigyelt jól lokalizálható 1,1 kb méreteltéréstől eltekintve azonosak. Az eltérést okozó régió szekvenciaanalíziséből kiderült, hogy az a *cox2* gén egyik I. típusú (GIY-YIG motívumos ORF-et hordozó) intronja, mely az 1b mtDNS-ben jelen van, az

1a-ból pedig hiányzik. Az intronnal történt hibridizációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a 2. típusú mtDNS-ben sincs jelen ez az intron. Intergénikus régiókkal történt hibridizációs kísérletek rávilágítottak arra, hogy a 2. típusú mtDNS intergénikus régiói is eltérő módon szerveződnek. A funkcionális térképek eredményei alapján a három különböző mtDNS géntartalma és génsorrendje alapvetően azonosnak bizonyult. A NADH dehidrogenáz hét lehetséges alegysége közül a *ndh2* gén kivételével mindegyik kódolva van a mitokondriális genomokban. A *ndh2* gén az 1b mtDNS-ből teljesen hiányzik, míg az 1a és 2. típusú mtDNS pozitív hibridizációt mutatott a gén egy 300 bp-os darabjával. E szerint a *ndh2* gén részlegesen jelen van még az 1a és 2. mtDNS-ben, de ez egy átmeneti állapot lehet a teljes eltűnés irányába. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy az *A. carbonarius* faj polimorfikus mtDNS megjelenése alapvetően intronális variációkra vezethető vissza, melyet az intergénikus régiók eltérő szerveződése is formál.

Az *A. japonicus* fajon belül 52, földrajzilag távoli területekről származó izolátum polimorfizmusát tanulmányoztuk mtDNS és magi rDNS RFLP vizsgálatával. A mtDNS RFLP analízis eredményeként nyolc eltérő típust találtunk. A különböző polimorfikus csoportot reprezentáló mitokondriális genomok mérete az *A. niger* komplex tagjaihoz képest 20-30 kb-sal bizonyultak nagyobbak (50 és 60 kb között változtak). A fajon belül, magi rDNS szinten polimorfizmust nem tapasztaltunk, annak ellenére, hogy alfajként elkülönített törzsek vizsgálatára is sor került (*A. japonicus* var. *aculeatus*), melyeket később különálló fajként *A. aculeatus* néven soroltak be.

Mitokondrium transzmissziós kísérleteket végeztünk az *A. japonicus* faj és rokonsági körének nyolc mtDNS RFLP csoportját képviselő törzsei irányába. Donor partnerként mindig az 1. csoporthoz tartozó mitokondriális oliR törzset alkalmaztuk. A mitokondrium transzmissziók az *A. japonicus* var. *aculeatus* irányába történő átviteltől eltekintve sikereseknek bizonyultak. A sikertelenség az *A. japonicus* var. *aculeatus* izolátumok különálló, *A. aculeatus* fajba történő besorolásának további bizonyítékának tekinthető. A többi mitokondrium átviteli kísérlet során valódi mtDNS rekombinációs

és egyszerű mitokondrium helyettesítési események játszódtak le transzferenként különböző gyakorisággal, változatos eloszlásban.

Egy kiválasztott rekombináns utód fizikai térképének és bizonyos régióinak a szülőivel történő szekvenciaszintű összehasonlítása igazolta azt, hogy a rekombinációs események lényegében az intronok mozgását jelentik. Ezt a következtetést az *A. niger* fajaggregátum törzsei közt megvalósított mitokondrium transzmissziós kísérletekből származó rekombináns utódokon hasonló módon elvégzett, összehasonlító elemzések is alátámasztják (Hamari és Tóth, nem publikált adatok). A szakirodalomban leírthoz képest nagy gyakorisággal bekövetkező intronvesztést valószínűsítettünk, melynek háttérében eddig még nem ismert szabályozó tényezők állnak. Az intronvesztés jelensége napjaink egyik központi érdeklődésre számot tartó témáját jelenti mind az evolúciós, mind az orvosi kutatások terén. A jelenség részletes tanulmányozása, pontos megismerése a jövőben komoly gyakorlati felhasználási lehetőséget jelenthet (génterápia). Kísérleti rendszerünk nagy gyakoriságú intronmozgás megfigyelését biztosítja, a molekuláris történések jó modellrendszere. A transzmisszió eredményessége a sejtmagtól független kompatibilitási viszonyok értelmezését segíti.

Fontosnak tartjuk azt, hogy az *A. japonicus* fajon belüli mitokondrium transzmissziókat követően nagy gyakorisággal jöttek létre mitokondrium helyettesített utódok, ugyanis az *A. niger* fajaggregátum körében végzett intra- és interspecifikus mitokondrium transzmissziók során az ún. transzmissziós donor mitokondrium megjelenése recipiens sejtmagi háttérrel 1% alatti, ritka eseménynek számított. Az erőteljes mitokondrium szubsztitúciót irányító tényezőket és szabályszerűségük háttérét ma még nem ismerjük, bár a közel azonos pozícióban zajló intronvesztés és nyerés események lehetőségével számolva előbb bizonyítanunk kell, hogy a szubsztitúciós mitokondriumok valóban léteznek.

Kísérleteink során a természetben lezajló mitokondriális rekombinációt modelleztük. Bizonyítottuk, hogy a rekombinációs események alapvetően intronmozgáson alapulnak. Valószínűsíthető, hogy az imperfekt fajok esetében tapasztalt nagyfokú intraspecifikus

mtDNS polimorfizmus a természetben lezajló rekombinációs események következményeként jött létre.

7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÁS

Imperfect filamentous fungi like black *Aspergilli* exhibit a wide range of variability in their morphological and physiological characteristics (Raper & Fennell 1965; Al-Mussallam 1980). Since phenotypic characters are highly influenced by growth conditions and consequently by gene expression, molecular characterisation might provide an important contribution to the classification of these fungi. Detailed molecular analysis of individual isolates might also be useful for detecting intraspecific variability within these asexual species. In previous studies, a large number of collection strains and field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate were examined by molecular methods (Varga et al. 1994). On the basis of their nuclear DNA and mitochondrial DNA RFLPs, these strains showed strong intraspecific polymorphic characteristics. In contrast to these results there were not any intraspecific mtDNA polymorphisms within the well studied *A. nidulans* species, possessing whole life cycles, even between their heterokaryon incompatible strains (Croft 1987). Only closely related species of section *Nidulantes* show slight alterations based on intronal differences (Earl et al. 1981). The strains of *A. niger* aggregate could be divided into three main groups on the basis of rDNA and mtDNA RFLPs. RFLP types one and two correspond to the *A. niger* and *A. tubingensis* species, respectively, while RFLP type three is represented by only a few Brazilian field isolates. MtDNA types 1 and 2 consist of several subgroups (1a-1e and 2a-2f) (Varga et al. 1994). These studies also involved some *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus* and *A. japonicus* strains as closely related outgroups of section *Nigri* (*Aspergillus niger* species group). In contrast to *A. niger* complex, *A. japonicus* and *A. carbonarius* possess extremely large mtDNA. One of the goals of this study is to learn the organisation of these large mtDNAs, and to determine reasons for RFLP variability and size differences. The goals of this work have also been motivated by the idea that the natural occurring intraspecific mtDNA variants might be a reflection of evolutionary divergence of mitochondrial genome.



Thirteen collection strains and field isolates of *Aspergillus carbonarius* were examined by using various genotypic approaches. RAPD-PCR and RFLP analysis of the ribosomal RNA gene cluster; and the mitochondrial DNA, were developed. On the bases of RFLP studies of rDNAs, thirteen isolates could be divided into two groups (rDNA type I and II). In the cases of analysis of mtDNAs, two molecular groups (type 1 and 2) could be distinguished among examined strains. The groups of rDNA I and II of isolates showed correlative relation with their mtDNA RFLP groups. On the basis of slight alterations in RFLP patterns the mtDNA type 1 could be divided into two subgroups (type 1a and 1b) (Kevei et al. 1996).

MtDNA sizes of three types (1a, 1b and 2) of *A. carbonarius* strains proved to be 61.2, 62.2, and 42.7 kb, respectively. For interpretation of intraspecific polymorphism and the considerable differences in the size of mtDNAs among three groups of *A. carbonarius*, restriction maps were constructed from several enzymes. Functional maps were also developed to compare genome organisations and gene content. The appearance of various mtDNAs of *A. carbonarius* strains are different in size, but their gene content is almost identical. The 1.1 kb size difference between two closely related subgroups (1a, 1b) can be attributed to the presence or absence of an intron in *cox2* gene. This phenomenon demonstrates that the migration of introns is possibly responsible for the development of variable mitochondrial genomes in nature. The striking differences in size and restriction patterns between two main mtDNA groups might derive from both the intronal variations and the altered intergenic organisation (Hamari et al. 1999).

Fifty *A. japonicus* and *A. japonicus* var. *aculeatus* strains, most of them wild-type isolates, were examined using various molecular techniques, RAPD-PCR and RFLP, as in the case of *A. carbonarius*. On the basis of RFLP analysis the rDNAs proved to be invariable (even strains of the species *A. japonicus* var. *aculeatus* exhibited the same restriction profile), while the strains could be classified into eight different mtDNA RFLP groups. The sizes of mtDNAs in *A. japonicus* and *A. japonicus* var.

aculeatus strains were calculated on the basis of their restriction patterns generated by single *Hae*III, and *Eco*RI digestions. Average molecular sizes were estimated as 50-60 kb for different mtDNAs. The products of RAPD-PCR reflected the eight mtDNA RFLP groups. Apart from differences among the eight RFLP groups, some strain specific variations could also be detected within these groups (Hamari et al. 1997).

Strains belonging to different mtDNA RFLP types of black *Aspergilli* exhibit a strong incompatibility. Even strains originated from the same molecular group might also show heterokaryon incompatibility (Kevei and Varga, 1994). Intra and interspecific mitochondrial transmission were carried out among strains of *A. niger* aggregate, by using protoplast fusion technique (Kevei et al. 1997). A mitochondrial oligomycin resistant donor was used in the unidirectional transmissions. The progenies were selected for recipient nuclei and oligomycin resistance.

When mtDNA transmission were performed between *A. japonicus* strains, the donor represented the most frequently occurring typed mtDNA group. All attempted transfers (except *A. aculeatus*) were successful and resulted in different varieties of resistant recombinant mitochondrial progenies at various frequencies. Resistant progenies can be divided into two groups. One is represented by real mtDNA recombinants. The other consists of "substituted" progenies (These harbour unchanged donor mtDNA RFLPs and recipient nuclei). Ratios between substituted and recombinant progenies were different in various transmissions.

Results of mtDNA RFLP analysis suggest that the progenies inherit basically the resistant donor mitochondrial DNA, which may remain unchanged or may be modified by the sequences of recipient mtDNA.

One of the recombinant strains derived from the transmission which resulted in the highest numbers of recombinants were analysed in detail. Maps of mtDNA of oligomycin resistant donor strain and recombinant strain were constructed, obtained by *Eco*RI and *Eco*RV restriction enzymes. These proved to be similar which suggests that the recombinant characters emerged from the changes of the donor mtDNA. On the

similar restriction maps of the donor and recombinant, two regions proved to be different. Sequence analysis revealed that these regions covered the genes of *cob* and *cox1*. In the case of *cob* sequences, an 1149 bp intron was inserted after the 381 bp of the exon. The recipient origin of the intron was proved by hybridisation when intron was used as probe.

The further alterations could be localised to the *cox1* sequences. On the basis of sequence analysis, two distinct sites of the *cox1* gene were proved which played a role in recombination events. In one of the sites a simple intron acquisition occurred. A 1359 bp intron was inserted in the sequenced downstream region of *cox1* fragment. The recipient origin of intron was proved by hybridisation. The other site involved in recombination process could be localised to the sequenced upstream region of *cox1*. Recombination process seemed to be more complex in this site because it involved mobility of two distinct introns. A 1230 bp intron of the donor strain was lost and in nearly the same position a new 1239 bp one with recipient origin was gained. The order of these two opposite events could be recognized. Intron acquisition must occur only after the loss of the previous intron, because these two mobile introns have overlapped recognition sequences. The recognition sequence of the recipient intron has been interrupted by the placement of the donor intron. When the donor intron was lost from the *cox1* gene, the recognition sequence of the recipient intron was rebuilt which provided a possibility for the insertion of the recipient originated intron. In our experiments a high frequency of intron loss could be detected. This observation is novel because it was predicted as a rare event by Dujon (1989). Apart from the intron loss and acquisition, two kinds of sequence conversions of neighbouring exons could be recognised. One of the changes was the deletion of 20 nucleotide from donor upstream exon, and the other was an eight base pair substitution of exonal sequences of the upstream and the downstream exon. Exon rearrangements were already detected due to the mobility of some intron ORFs of *Podospora* (Sellem et al. 1996).

Summarised, the recombinant progenies basically inherit the mitochondrial DNA of the resistant donor strain, which may remain unchanged or may be modified by the introns of recipient ones under selection conditions. MtDNA profiles of recombinant progenies are strongly influenced by the intron content of both parental mtDNAs. Both intron loss and acquisition play a role in development of recombinant characters. These experiments elucidate the processes and molecular events which may take place in nature, causing the wide range divergence of mitochondrial characters of imperfect fungi.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996) *Introductory Mycology*. (Fourth Ed.), John Wiley and Sons. Inc., New York
- Atschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Baltimore D. (1985) Retroviruses and retrotransposons: The role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell* 40: 481-482
- Beagley C.T., Okada N.A., Wolstenholme D.R. (1996) Two mitochondrial group I introns in a metazoan, the sea anemone *Metridium senile*: One intron contains genes for subunits 1 and 3 of NADH dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5619-5623
- Benore-Parson M. and Anderson L. (1995) Purification of DNA fragments from lyophilised agarose gels. *Nuc. Acid Res.* 23: 4926-4927
- Berka R.M., Dunn-Coleman N., Ward M. (1992) Industrial enzymes from *Aspergillus* species, In: *Aspergillus. Biology and Industrial Applications*. Bennett, J.W. and Klich., M.A. (eds), Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 155-202
- Birky C.W. (1978) Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.* 12: 471-512
- Birky C.W. (1983) Relaxed cellular and organelle heredity. *Science* 222: 468-475
- Birky C.W. (1994) Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws. *J. Heredity* 85: 355-365
- Borsuk P.A., Nagiec M.N., Stepien P.P., Bartnik E. (1982) Organization of the ribosomal RNA gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 17: 147-152
- Boynton J.E., Harris E.H., Burkhart B.D., Lamerson P.M., Gillham N.W. (1987) Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 460-462

- Brown T.A., Ray J.A., Waring R.B., Scazzocchio C., Davies R.W. (1984) A mitochondrial reading frame which may code for a second form of ATPase subunit 9 in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 17: 489-492
- Brown T.A., Waring R.B., Scazzocchio C., Davies R.W. (1985) The *Aspergillus nidulans* mitochondrial genome. *Curr. Genet.* 9: 113-117
- Cech T.R. (1990) Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 543-568
- Chase T.E., Ullrich R.C. (1990a) Genetic basis of biological species in *Heterobasidion annosum*. *Mycologia* 82: 67-72
- Chase T.E., Ullrich R.C. (1990b) Five genes determining intersterility in *Heterobasidion annosum*. *Mycologia* 82: 73-81
- Cotty P.J., Bayman P., Egel D.S., Elias K.S. (1994) Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: The Genus *Aspergillus*, From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications. Powell K.A., Renwick A., Peberdy J.F. (eds), Plenum Press, New York, pp. 1-27
- Croft J.H., Dales R.B.G. (1984) Mycelial interactions and mitochondrial inheritance in *Aspergillus*. In: Jennings D.H., Rayner A.D.M. (eds) The ecology and physiology of the fungal mycelium. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 433-450
- Croft J.H. (1987) Genetic variation and evolution in *Aspergillus*. In: Rayner A.D.M., Brasier C.M., Moore D. (eds) Evolutionary biology of the fungi. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 311-323
- Cummings D.J., McNally K.L., Domenico J.M., Matsuura E.T. (1990) The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 17: 375-402
- De Jonckheere J.F., Brown S. (1994) Loss of the ORF in the SSUrDNA group I intron of one *Naegleria* lineage. *Nucl. Acid Res.* 22: 3925-3927
- Derr L.K., Strathern J.N., Garfinkel D.J. (1991) RNA-mediated recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* 67: 355-364

- Dujon B. (1989) Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations - a review. *Gene* 82: 91-114
- Dujon B., Belfort M., Butow R.A., Jacq C., Lemieux C., Perlman P., Vogt V.M. (1989) Mobile introns: definition of terms and recommended nomenclature. *Gene* 82: 115-118
- Earl A.J., Turner G., Croft J.H., Dales R.B.G., Lazarus C.M., Lünsdorf H., Küntzel H. (1981) High-frequency transfer of species-specific mitochondrial DNA sequences between members of the *Aspergillaceae*. *Curr. Genet.* 3: 221-228
- Esser K., Blaich R. (1994) Heterogenic incompatibility in fungi. In: *Mycota I*. Esser K., Lemke P.A. (eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 211-232
- Freyer R., Neckermann K., Maier R.M., Kössel H. (1995) Structural and functional analysis of plastid genomes from parasitic plants: loss of an intron within the genus *Cuscuta*. *Curr. Genet.* 27: 580-586
- Frugoli J.A., McPeck M.A., Thomas T.L., McClung C.R. (1998) Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in Angiosperms. *Genetics* 149: 355-365
- Gams W., Christensen M., Onions A.H.S., Pitt J.I., Samson R.A. (1985) Intrageneric taxa of *Aspergillus*. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Samson R.A and Pitt J.I. (eds), Plenum Press, New York, pp. 55-62
- Glass N.L., Kuldau G.A. (1992) Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 201-224
- Grossman L.I., Hudspeth M.E.S. (1985) Fungal mitochondrial genomes. In: *Gene manipulation in fungi*. (eds) Bennet J.W. and Lasure L.L. Chapter 3. Academic Press, London, pp. 65-103
- Hamari Z., Kevei F., Kovács É., Varga J., Kozakiewicz Z., Croft J.H. (1997) Molecular and phenotypic characterisation of *Aspergillus japonicus* and *A. aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 337-347

- Hamari Z., Pfeiffer I., Kevei F., Ferenczy L. (1997) Preparation of mitochondrial DNA from fungal protoplasts. *J. Microbiol. Meth.* 30: 165-166
- Hamari Z., Pfeiffer I., Ferenczy L., Kevei F. (1999) Interpretation of variability of mitochondrial genomes in the species *Aspergillus carbonarius*. *Antonie van Leeuwenhoek* (accepted)
- Hamari Zs., Ferenczy L., Kevei F. (1999) Recombination of mitochondrial DNAs after transmission of mitochondria between vegetative incompatible *Aspergillus japonicus* strains. *Fungal Genet. & Biol.* (submitted)
- Häger K.P., Müller B., Wind C., Erbach S., Fischer H. (1996) Evolution of legumin genes: loss of an intron at the beginning of angiosperm diversification. *FEBS Lett.* 387: 94-98
- Hauswirth W.W., Lim L.O., Dujon B., Turner G. (1987) Methods for studying the genetics of mitochondria. In: Darley-Usmar V.M., Rickwood D. & Wilson M.T. (Eds) *Mitochondria* (pp 171-244). IRL Press, Oxford.
- Huang C.H. (1998) The human Rh50 glycoprotein gene. Structural organisation and associated splicing defect resulting in Rh(null) disease. *J. Biol. Chem.* 273: 2207-2213
- Hudspeth M.E.S. (1992) The fungal mitochondrial genome - A broader perspective. In: Arora D.K., Elander R.P., Mukerji K.G. (Eds) *Handbook of Applied Mycology, Vol. 4 Fungal Biotechnology* (pp 213-241). Marcel Dekker Inc., New York
- Kawano S., Takano H., Kuroiwa T. (1995) Sexuality of mitochondria: fusion, recombination and plasmids. *Int. Rev. Cytol.* 161: 49-110
- Kevei F., Varga J. (1994) Compatibility relations among black *Aspergilli* based on molecular characters. *Fungal Genet. Newslett.* 41A (suppl.): 60
- Kevei F., Hamari Zs., Varga J., Kozakiewicz Z., Croft J.H. (1996) Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 59-66

- Kevei F., Tóth B., Coenen A., Hamari Zs., Varga J., Croft J.H. (1997) Recombination of mitochondrial DNA following transmission of mitochondria among incompatible strains of black *Aspergilli*. *Mol. Gen. Genet.* 254: 379-388
- Kevei F., Peberdy J.F. (1977) Interspecific hybridisation between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* 102: 255-262
- Kevei F., Peberdy J.F. (1984) Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the *Aspergillus* genus. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2229-2236
- Kevei F., Peberdy J.F. (1985) Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridisation within the *Aspergillus nidulans* group. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2229-2236
- Koll F., Boulay J., Belcour L., d'Aubenton-Carafa Y. (1996) Contribution of ultra-short invasive elements to the evolution of the mitochondrial genome in the genus *Podospora*. *Nucl. Acid Res.* 24: 1734-1741
- Kovalenko S.A., Tanaka M., Ozawa T. (1994) Simple methods for preparation of plasmid DNA yielding long and accurate sequence data. *Nucl. Acid Res.* 22: 5771-5772
- Lambowitz A.M., Belfort M. (1993) Introns as mobile elements. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 587-622
- Leach J., Finkelstein D.B., Rambosek J.A. (1986) Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. *Fungal Genet. Newslett.* 33: 32-33
- Leslie J.F. (1993) Fungal vegetative compatibility. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 127-150
- Moran J.V., Mecklenburg K.L., Sass P., Belcher S.M., Mahnke D., Lewin A., Perlman P. (1994) Splicing defective mutants of the *COXI* gene of yeast mitochondrial DNA: initial definition of the maturase domain of the group II intron AI2. *Nucl. Acid Res.* 22: 2057-2064
- Osman K.E. (1987) Genetic and molecular studies of *Aspergillus*. PhD Thesis, University of Birmingham, Birmingham, UK

- Pearson W.R., Lipman D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448
- Pontecorvo G., Roper J.A., Hemmons L.M., MacDonald K.D., Bufton A.W.J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5: 141-238
- Raper K.B., Fennell D.I. (1965) The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Company, Baltimore
- Reed K.C., Mann D.A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucl. Acid Res. 13: 7207-7221
- Ridder R., Künkele K.P., Osiewacz H.D. (1991) Sequence of the nuclear ATP synthase subunit 9 gene of *Podospora anserina*: lack of similarity to the mitochondrial genome. Curr. Genet. 20: 349-351
- Roehr M., Kubicek C.P., Kominek J. (1992) Industrial acids and other small molecules. In: *Aspergillus*. Biology and Industrial Applications. Bennett J.W. and Klich M.A. (eds), Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 91-131
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sellem C.H., Carafa Y.A., Rossignol M., Belcour L. (1996) Mitochondrial intronic open reading frames in *Podospora*: Mobility and consecutive exonic sequence variations. Genetics 143: 777-788
- Smith J.E., Pateman J.A. (eds), (1977) Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Acad. Press. London
- Smith M.L., Duchesne L.C., Bruhn J.N., Anderson J.B. (1990) Mitochondrial genetics in natural populations of the plant pathogen *Armillaria*. Genetics 126: 575-585
- Smyth I., Wicking C., Wainwright B., Chenevix-Trench G. (1998) The effects of splice site mutations in patients with naevoid basal cell carcinoma syndrome. Hum. Genet. 102: 598-601

- Tóth B., Hamari Zs., Ferenczy L., Varga J., Kevei F. (1998) Recombination of mitochondrial DNA without selection pressure among compatible strains of the *Aspergillus niger* species aggregate. *Curr. Genet.* 33: 199-205
- Turner G., Earl A.J., Greaves D.R. (1982) Interspecies variation and recombination of mitochondrial DNA in the *Aspergillus nidulans* species group and the selection of species specific sequences by nuclear background. In: Slonimski P., Borst P., Attardi G. (eds) *Mitochondrial genes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 411-414
- Turcq B., Denayrolles M., Bégueret J. (1990) Isolation of two allelic incompatibility genes *s* and *S* of the fungus *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 17: 297-303
- Varga J., Kevei F., Vriesema A., Debets F., Kozakiewicz Z., Croft J.H. (1994) Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Can. J. Microbiol.* 40: 612-621
- Wallace R.S., Cota J.H. (1996) An intron loss in the chloroplast gene *rpoC1* supports a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae. *Curr. Genet.* 29: 275-281
- Webster J. (1986) *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Yang X., Griffiths J.F. (1993) Male transmission of linear plasmids and mitochondrial DNA in the fungus *Neurospora*. *Genetics* 134: 1055-1062

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez úton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kevei Ferenc-nek aki elindított a kutatómunka labirintusába, aki fáradhatatlan odafigyeléssel és mély szakmai tudásával formálta látásmódomat, minden igyekezetével támogatta tevékenységemet, s akivel jelen pillanatban is küzdünk, hogy egyre gyarapodó kérdéseinkre választ találjunk.

Köszönetet mondok Dr. Pfeiffer Ilonának (Icának), aki végtelen nyugalommal és türelemmel viseltetett irántam, akivel gyakran hosszan gondolkodtunk, töprengtünk egy-egy probléma megoldásán.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Kucsera Juditnak, aki mind emberi tulajdonságaival, mind pedig naprakész mély szakmai tudásával segítette munkámat.

Köszönetet mondok prof. Ferenczy Lajos-nak, aki a kezdetektől fogva lehetővé tette számomra azt, hogy a JATE Mikrobiológiai Tanszékén dolgozhassak, aki bizalommal támogatta és egyengette különböző pályamunkáim és nem utolsó sorban jómagam sorsát.

Köszönetemet fejezem ki Nagy Lajos Gergelynek a technikai segítségért, valamint Palágyi Andrásnének (Ilának), hogy munkámmal és jómagammal kapcsolatos hivatalos ügyeket elrendezte.