

Tézisek

Kromoszómális és extrakromoszómális genom átvitel természetes és mesterséges hibridizációval az élesztőgombák körében

készítette: dr. Kucsera Judit
JATE Mikrobiológiai Tanszék



Szeged 1995

Előzmények és célkitűzések

A mikroszkópikus gombák világában genetikai információ sejtek közötti átvitelére és/vagy kicserélődésére természetes úton a szexuális folyamat ad lehetőséget. Alapvető szerepe, hogy a genetikai variációnak és az élet során bekövetkező DNS károsodások kijavításának lehetőségével lássa el az organizmust. Fajokon belül mesterséges úton protoplasztfúzióval nyílt mód a konjugáció és anasztomózis természet szabta akadályainak leküzdésére. Ez a teljes életciklusú élesztőknél a szexuális fázis párosodási típustól független beindulását, a fonalagombáknál a paraszexuális út kezdetét biztosítja. Fajok között természetes körülmények között nincs, vagy nagyon korlátozott az információcsere. A mikroorganizmusok akadályokat építenek ki az idegen információ bejutásával és expressziójával szemben. Ezáltal védekeznek az olyan organizmusok ellen, amelyek elősködnék a szervezeten (pl. vírusok), ill. segítségével maradnak a fajok különállóak, megelőzendő a genetikai rendezetlenséget. Mesterséges körülmények között, protoplasztfúzió segítségével interspecifikus, sőt intergenerikus keresztezéseket meg lehet valósítani. Kísérleteink megkezdésekor nem tudtuk, hogy milyen széles határok között lehetséges a genetikai információ átvitel, és hogy milyen típusú életképes utódok várhatók egy-egy fúziós "termék" képződésekor. Kérdés volt továbbá, hogy alkalmas-e a protoplasztfúzió rokonsági viszonyok meghatározására, az akkor még nagyon hiányos molekuláris taxonómiai módszerek kiegészítésére. Célul tűztük ki a három élesztőgomba csoportban (Ascomycota, Basidiomycota és Deuteromycota) a morfológiai és fiziológiai elemzések alapján közel rokonoknak tartott fajok közötti hibridizációt; a magi és citoplazmás (mitokondrium, DNS plazmid ill. vírus) genetikai információ átvitelét és a termékek molekuláris szintű analizisét valamint az eseményeket befolyásoló tényezők felderítését.

Vizsgálati módszerek

1. Törzsek:

Kísérleteink során a *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Yeast Division, Delft* gyűjteményből származó élesztőgombákat használtuk.

2. A törzsek markerezése:

Nukleáris markerek

Auxotrófia mutációkat idéztünk elő törzseinken UV-sugárzás, EMS (etil-metánszulfonát) és NTG (N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin) kezelés segítségével. Homothalliás törzsekben haploid spóra populációkat, heterothalliás törzsekben stationer fázisú kultúrákat kezeltünk 1-5%-os túlélésig. Az auxotróf fenotípusokat meghatároztuk. Alacsony gyakoriságú mutáns előfordulás esetén a mutagén kezelést követően nystatinos (Snow, 1966) vagy sejtfal bontó enzimmel történő dúsítást (Ferenczy et al. 1974) végeztünk.

Mitokondriális markerek

Drog / antibiotikum rezisztencia és petite mutációkat építettünk ki. Mutagénként előbbi esetben Mn^{2+} ionokat (Putrament, 1973), utóbbi esetben etidium bromidot (Hauswirth et al. 1987) alkalmaztunk. A mutációk mitokondriális eredetét tetrádanalízissel, illetve a vegetatív szegregáció előfordulásával, nem párosodó gombák esetében protoplasztfúzióval bizonyítottuk.

3. Hibridizációs módszerek:

Konjugációs hibridizálás

Egymást komplementáló auxotróf szülői törzsek párosodását komplett táptalajon indukáltuk, az utódokat minimál táptalajon szelektáltuk.

Protoplasztfúzióval történő hibridizáció

A sejtek falának enzimikusoldása után a protoplasztokat polietilén-glikol (PEG) 30%-os

oldatával aggregáltattuk és az utódokat ozmotikusan stabilizált minimál táptalajon izoláltuk (Maráz et al. 1978).

4. Az utódok jellemzése:

Citológiai módszerek

Fény- és fluoreszcens mikroszkópikus eljárások.

Fiziológiai tesztek - biokémiai módszerek

Szénhidrát hasznosítás aerob és anaerob körülmények között, egyéb vegyületek hasznosítása és velük szembeni érzékenység ellenőrzése (Kreger-van Rij 1984), feromon termelés és érzékenység tesztelése, killer fenotípus meghatározása (Philliskirk and Young 1975), celluláris citokróm spektrum felvétele alacsony hőmérsékleten (Rickwood et al. 1988).

Genetikai módszerek

Komplementációs analízis, allélikusság és dominancia viszonyok meghatározása, szomatikus markerek szegregációjának tesztelése, indukált mitotikus szegregáció/haploidizáció, randomspóra-analízis és tetrád-analízis (Sherman et al. 1986)

Molekuláris módszerek

Kromoszómális DNS elválasztása CHEF és OFAGE technikával (Carle and Olson 1985), DNS izolálás, magi és mitokondriális DNS-ek RFLP analízise, DNS-DNS hibridizáció (Sambrook et al. 1989), virális RNS-ek izolálása, izoenzim vizsgálatok (Davis 1964).

Fontosabb kutatási eredmények és megállapítások

1. Nukleáris genetikai információ átvitel közel rokon élesztőgombák között

1.1. *Deuteromycoták:*

Kísérleteinkben a *Candida genus* néhány faja szerepelt. Az aszexuális *C. albicans* és *C. tropicalis* opportunistá human patogének, amelyek mind felületi, mind szisztémás

mikózist okozhatnak. A *C. albicans* után a második legvirulensebb faj a *C. tropicalis*. Modell organizmusok a dimorfizmus és a peroxiszóma biogenezis tanulmányozásában (Corner and Poultnier, 1989). A *Candida guilliermondii* fakultatív szaprofita, amelyet a B2 vitamin ipari termeltetésére használnak.

Ezen imperfekt gombák körében elért eredményeink a következő pontokban foglalhatók össze:

Candida albicans és *Candida tropicalis* természetes úton a nagymérvű morfológiai és fiziológiai hasonlóság ellenére nem hibridizálhatók, protoplasztfúzióval előállított utódjaik kétféle típusba sorolhatók: stabilak, valószínűleg rekombinánsok ill. mitotikusan instabilak, valószínűleg aneuploidok (Kucsera and Ferenczy 1979). Az eredmények alapján a fajok szeparálása jogos.

Candida tropicalis és *C. guilliermondii* csak instabil fúziós utódaik léteznek, közöttük távoli evolúciós kapcsolatok feltételezhetők (Vallin et al. 1979).

1.2. Ascomyceták:

Az *Ascomyceta* élesztő gombák két nagy csoportját, a hasadó és sarjadzó élesztőket alkalmaztuk vizsgálataink során. Eredményeink a következők:

1.2.1. *Schizosaccharomyces*ek:

A *Schizosaccharomyces* genus alábbi tagjait vizsgáltuk: *Schiz. japonicus*, *Schiz. malidevorans*, *Schiz. octosporus*, *Schiz. pombe*.

A természetes úton, konjugációval történő keresztezhetőségük és szomatikus hibridizációjuk alapján az eredeti négy helyett a fajok száma háromra csökkenthető (Sipiczki et al. 1982, 1985). Interspecifikus keresztezésekben csak a *Schizosaccharomyces pombe* ill. a *Schizosaccharomyces malidevorans* mutatkozott interfertilisnek, hibridjeik diploidok (minden kromoszóma markerezett volt és minden markert újra lehetett izolálni), sporulálnak, bár a spórák életképessége korlátozott. A meiózis és spóra képzés alatt

mindkét szülő kromoszómái független szegregációt mutattak, továbbá a kromoszómák közötti szabályos rekombinációt tapasztaltuk.

A *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe* és a *S. pombe* var. *malidevorans* mating rendszere is nagyon hasonló, több gén regulációja alatt áll, ami egy fajba sorolásukat megerősíti.

A *genus* tagjai homothallikusak, de fajonként változó gyakorisággal előfordulnak heterothallikus vagy pseudoheterothallikus változatok is.

A különböző fajok hibridizálhatók protoplaszt fúzióval. Kis gyakorisággal életképes termékeket nyertünk.

1.2.2. Saccharomycesek:

Az 1970-es években van der Walt a *Saccharomyces* *genus*ba 41 fajt sorolt, amelynek számát 1983-ban Barnett monográfiájában 7-re csökkentették, de az újabb kiadásban 1990-ben, már 10 faj szerepelt (Barnett, 1992). A típus törzsek hibridizációjával és elemzésével a következő szeparálható csoportokat határoztuk meg, illetve jogosultságukat igazoltuk:

Sensu stricto csoport:

Saccharomyces cerevisiae, *S. bayanus*, *S. pastorianus* és *S. paradoxus* tagokkal

Elektroforetikus karyotípus analízissel általában több (11-16) különböző méretű (500-1200kbp) kromoszómális DNS-t találunk (Kucsera et al, unpublished; Vaughen-Martini et al. 1993).

A fajok homo- és heterothalliás változatban fordulnak elő, egymás feromonjaira reagálnak és kompatibilis párosodási rendszerük szabályozása alatt, természetes fiziológiai körülmények között párosodnak.

A konjugáció során keletkező diploidok jól sporulálnak, de infertilisek. A ritkán életképes spórák ($5 \times 10^2 / 10^3$ aszkuszonként egy vagy néhány spóra) mindkét szülő kromoszómáit tartalmazhatják, de extra kromoszómáik is lehetnek, általában diszómok néhány kromoszómára nézve. Eredményeinket és irodalmi adatokat (Hawthorn and Philippsen 1994) összevetve megállapítható, hogy valószínűleg a meiózis I szakaszában a homológ kromoszómák párosodása és szétválása problémát okoz, amely a legtöbb esetben olyan spórákat eredményez, amelyek inkomplett kromoszóma garnitúrával rendelkeznek, így nem életképesek. A kromoszóma párosodás valamilyen mértékben lejátszódik, igazolja ezt hogy rekombináció észlelhető, azonban a gének közti kis mértékű homológia miatt ez a normálistól eltérő.

Protoplaszt fúzióval kontrollált körülmények között a hibrid képzés jól reprodukálható, tekintet nélkül a partnerek párosodási állapotára. Az utódok többsége viszont magasabb ploiditású (triploid vagy tetraploid) a partnerek homothallikus jellege miatt, és jó spórázó képességgel rendelkezik.

Az eredmények alapján a *sensu stricto* csoport tagjai igen szoros evolúciós kapcsolatban vannak egymással. Közös ökológiai előfordulásuk (borélesztők), és intenzív tenyésztésük magyarázhatja a nagy mérvű hasonlóságot. Bár a *S. paradoxus* a természetben is előfordul (Naumov 1986), ennek ellenére beleillik a csoportba.

Sensu lato csoport:

S. castellii, *S. dairensis*, *S. exiguus*, *S. kluyveri*, *S. servazzii* és *S. unisporus* tagokkal

Elektroforetikus karyotípus vizsgálat alapján a *sensu stricto* csoportnál kevesebb (6-11) a kromoszómák száma, de közepes (500-850 kb) és nagyobb méretű (800-1200 kb) kromoszómákat tartalmaznak. Különösen nagy a hasonlóság a *S. servazzii* és a



S. unisporus karyotípusa között. Kromoszóma polimorfizmus figyelhető meg a *S. dairensis* CBS 421 és CBS 4309 törzsében, mely utóbbit az újabb rendszer szerint *S. castellii* névvel jelölik.

A csoport minden tagja homothalliás, egy (*S. unisporus*)-, kettő (*S. dairensis*)- és négy (*S. exiguus*, *S. kluyveri*, *S. servazzii*)-spórás aszkusz képzéssel.

Saccharomyces cerevisiae és a *sensu lato* tagok közötti hibridizációs kísérleteink a következő eredményeket adták:

Saccharomyces cerevisiae és *S. dairensis*: feromon kereszthatást nem tapasztaltunk, természetes úton nem keresztezhetők, protoplasztfúzióval sem hibridizáltathatók, nincs életképes utódjuk.

Saccharomyces cerevisiae és *S. exiguus*: bár gyenge feromon kereszthatás van, természetes úton nem keresztezhetők, protoplasztfúzióval életképes hibridek nyerhetők, melyek infertilisek és kezdetben instabilak, majd néhány átoltás után stabillá válnak.

Saccharomyces cerevisiae és *S. kluyveri*: nem keresztezhetők, erősebb feromon kereszthatás, mint a *S. exiguus* esetében, protoplasztfúzióval stabil és instabil utódok nyerhetők. Instabil esetben a *S. kluyveri* kromoszómái mellett néhány *S. cerevisiae* kromoszómát is találunk. A termékek néhány passzálás után stabillá válnak, a *S. kluyveri* szülői hibás információ rekombináció vagy transzformáció révén korrigálódik és a felesleges *S. cerevisiae* kromoszómák eliminálódnak (Kucsera et al. 1994).

Saccharomyces cerevisiae és *S. servazzii*: nem keresztezhetők, ugyanakkor a protoplasztfúzió átmeneti instabil termékekhez vezet, melyek később a *S. cerevisiae* genotípusát mutatják.

Saccharomyces cerevisiae és *S. unisporus*: nem keresztezhetők, ugyanakkor a protoplasztfúzió itt is az előbbi kombinációhoz hasonló instabil termékekhez vezet.

A *sensu lato* csoport tagjai közötti fúziók eredményei:

A fajok közötti hibridizációt mind természetes úton, mind protoplasztfúzióval elvégeztük a lehetséges kilenc kombinációban. A kísérletekben használt auxotróf mutáns törzsekkel sem természetes sem mesterséges úton nem nyertünk hibrideket, kivéve a *Saccharomyces kluyveri* és *Saccharomyces servazzii* és *Saccharomyces kluyveri* és *Saccharomyces unisporus* kombinációt, ahol protoplasztfúzióval instabil termékeket kaptunk.

A *sensu lato* tagok között a kromoszóma analízis és a fiziológiai sajátosságok alapján közelebbi rokonság állapítható meg a *S. servazzii* és *S. unisporus* között, a *S. exiguus* és *S. kluyveri* között.

Úgy tűnik, hogy a *S. kluyveri* a *genus* "általános recipiens" tagja, amely a hat nagy kromoszómája mellett a kisebb, idegen eredetű kromoszómák replikációjának átmeneti tolerálására képes. A fúziót követően különböző stabilitású termékek keletkeznek, amelynek mértékét nem feltétlenül a partnerek rokonsági foka (pl. hasonló kromoszóma szám és méret) szabályoz. Mivel az extrakromoszómák többnyire eliminálódnak, a kromoszóma szakaszok szelektív körülmények indukálta integrációját sokkal inkább a korrigálható gén és környezete homológiájának mértéke szabályozhatja. Ez, egyes gének esetében, akár távoli fajok között is lehet nagyon hasonló.

2. Mitokondiumok *Saccharomyces* fajok közötti átvitelének lehetőségei:

Mitokondriális sajátosságait illetően a *Saccharomyces* genus tagjai igen heterogének. Az élesztőgombákra legjellemzőbb mutáció, a petite mutáció spontán előfordulása, ill. indukálhatósága szempontjából a *S. exiguus* és *S. kluyveri* petite negatív, a többi faj petite pozitív.

A típus törzsekben nem fermentálható szénforráson való tenyésztés alatt a különböző antibakteriális antibiotikumokkal és más gátló anyagokkal szembeni érzékenységük rendkívül eltérő. Rezisztenciákat ezen vegyületekkel szemben Mn^{2+} kezelés hatására a legtöbb esetben kiépíthetünk.

Az izolált mt DNS-ek mérete és restriktációs enzim mintázata is eltérő, a legnagyobb méretű mtDNS-sel a *S. cerevisiae* (78 kb) és *S. kluyveri*, a legkisebbel a *S. exiguus* (23,7 kb) és a *S. unisporus* rendelkezik (Clark-Walker et al. 1983; Kucsera et al. unpublished).

Mitochondrium szubsztitúció Saccharomyces cerevisiae-be

A mitokondriumok biogenezise a két szeparált genom, a mag és a mtDNS együttműködésének függvénye. A különböző fajok ilyen jellegű információ tartalmának összehasonlítására a *Saccharomyces cerevisiae* ρ° , mtDNS-sel nem rendelkező törzsébe a taxon többi tagjának mitokondriumát próbáltuk bejuttatni. Eredményeink szerint még a *sensu stricto* csoporton belül sem lehetséges a helyettesítés.

S. cerevisiae petite és *S. paradoxus* grande, oligomycin rezisztens törzsének fúziójával olyan interspecifikus hibrideket kaptunk, amelyek a magi és mitokondriális genom különböző kombinációját tartalmazták. A hibridek között légzés deficiens mitokondriumút is találtunk, mely normális működést csak oligomycin jelenlétében mutatott. A

magyarázat: 1. a két különböző eredetű mtDNS rekombinációja, amely a szülői típustól eltérő méretű és megváltozott működésű mtDNS-t eredményezett,

2. a mag-mitokondrium interakció zavara: a magasabb ploiditású utódokban a két szülői tulajdonság kiegyensúlyozott (diploid, tetraploid) vagy kiegyensúlyozatlan (triploid) arányban fordul elő, amely a mitokondriális genomra, és működésére is hatással lehet. A fent említett magyarázatok igazolása további kísérleteket igényel.

3. *Saccharomyces cerevisiae* killer vírusainak átvitele más *Saccharomyces* fajokba

A *S. cerevisiae* killer fenotípusát egy kisebb és egy nagyobb dsRNS molekula (LdsRNS ill. MdsRNS) határozza meg. Az RNS-ek vírus szerű partikulumokba (VLP) csomagolódnak a citoplazmában (Tipper and Schmitt, 1991).

Ezen vírusok átvitele a *sensu stricto* csoporton belül lehetséges, az utódokban fenotipikusan megnyilvánulnak.

A *sensu lato* csoportban a *S. cerevisiae*-ből a *S. kluyveri*be csak az L dsRNS vihető át. Ha az utódba már korábban bejuttattuk ezt a vírust, amely az RNS dependens RNS polimerázt kódolja, és ezt követően újabb vírus bevitelt hajtunk végre, a toxin termelésért felelős MdsRNS ekkor sem tud fenn maradni (Kucsera et al. 1994). Az eredmények azt jelzik, hogy az MdsRNS fennmaradását biztosító magi gének nincsenek a *S. kluyveri*ben.

4. Az interspecifikus magi információ átvitel gyakoriságának befolyásolása

Proteinek funkcionális inaktiválásával

Fonalgombák körében ismeretes a szomatikus inkompatibilitás jelensége, amely különböző genotípusú sejtek között játszódik le az anasztomózist követően. A folyamat többféle módon nyilvánul meg: nem képződnek stabil utód sejtek, a fúziót követően sejt lízis figyelhető meg, vagy barrage képződik. *Podosporában* új típusú proteázok szintetizálódnak az utód sejtben (Labarere and Bernet, 1987), *Neurosporában* viszont megszüntethető a protoplazmás inkompatibilitás proteázokkal (Perkins, 1990). Élesztőgombákban a jelenség fajon belül nem ismeretes, interspecifikus körülmények között pedig nem tanulmányozták. Kísérleteinkben megpróbáltuk a lehetséges protoplazmás inkompatibilitást úgy megszüntetni, hogy a fúziós partnerek valamelyikének fehérjéit etil-maleinimiddel inaktívtuk. A *S. cerevisiae* és *S. kluyveri* hibridizációjakor

egyik partner kezelésével sem segíthető az interspecifikus hibrdek létrehozásának esélye, vagyis inkompatibilitás citoplazmatikus szinten nem áll fenn (Kucsera et al 1994).

A fenti inaktiválási módszer viszont kiválóan alkalmas fajok közötti hibrdek létrehozására, a törzsek markerezés céljából történő mutagén kezelése nélkül (Ferenczy and Kucsera, 1985).

Mitokondriumok eliminálásával

A protoplasztfúzió alatt a két partner mitokondriális genomja is interakcióba lép egymással, melynek hatása lehet a komplementációra is. Eredményeink szerint a mtDNS *S. cerevisiae*-ből történő eliminálásával az interspecifikus komplementációs gyakoriság egy nagyságrenddel megemelhető.

5.A *Saccharomyces dairensis* CBS421 killer fenotípusának jellemzése

A *Saccharomyces cerevisiae* vírus kódolta killer sajátsága alapján a törzsek toxin termelő, toxinra érzékeny és sem nem érzékeny sem nem termelő (neutrális) csoportokba sorolhatók. Kísérleteink során megállapítást nyert, hogy a *S. dairensis* CBS421 törzse toxin termelő (Kucsera, 1990).

A toxin termelés sajátosságai

A toxin termelése a legaktívabb a sejtek stacioner növekedési fázisában. A toxin fehérje természetű, mivel proteázokkal a termelődött toxin hatástalanítható. Aktivitást a pH 4,2-5,2 tartományban mutat, optimuma pH= 4,3.

A hatásspektrum

A toxinra érzékeny élesztőgombák feltérképezése alapján a hatás spektruma eltér a *S. cerevisiae* killer fehérje hatásspektrumától.

Genetikai determináltsága

A toxin termelését a *Saccharomyces cerevisiae* esetében dsRNS vírus kódolja, amelynek termelése megszüntethető szubletális koncentrációjú cikloheximiddel való kezelés ill. magasabb hőmérsékleten való tenyésztés hatására. A *S. dairensis*-ben a fenti kezelések valamint etidium bromid és akriflavin sem eredményezték a killer sajátság eliminálását.

Plazmid, ill. dsRNS kimutatásaink szerint egyik extrakromoszómás elem sem található a *S. dairensis* CBS421 törzsében. Sikerült viszont UV sugárzással killer negatív mutánsokat előállítanunk, amelynek előfordulási gyakorisága nem haladta meg az egyéb, pl. auxotróf mutánsok előfordulási gyakoriságát. Killer pozitív és negatív egymást komplementáló auxotróf mutánsok keresztezésével kiderítettük, hogy a killer pozitív fenotípus domináns és "diád analízissel", hogy magi gének kódolják.

6. Basidiomyceta élesztők fúziója

A Basidiomyceta élesztők közül a *Phaffia rhodozyma* a kísérleteink kezdetén a *Deuteromycota* tagozatba tartozott, mivel szexuális életciklusa nem volt ismert. A sejtfal ultrastrukturális szerkezete, ill. az ubikinon enzim típusa alapján tartották számon, mint lehetséges bazidiumos gombát. Jellegzetes tulajdonsága, hogy fermentációra képes, hogy asztaxantint termel, ill. hogy csak viszonylag alacsony hőmérsékleten szaporodik (Miller et al. 1976).

Hibridizációs lehetőségek a Phaffia rhodozyma törzsek között

Hat *Phaffia rhodozyma* törzs egymás közötti hibridizációs lehetőségeit vizsgálva bebizonyosodott, hogy ezen fajok között is lehetséges protoplasztfúzióval a magi genetikai információ átvitele. Auxotróf mutánsok fúziójából az utódok stabil, prototróf sajátságúaknak bizonyultak. Indukált mitotoikus haploidizáció után mindkét partner markereit visszanyertük, bizonyítván, hogy karyogámia történt. Állításunkat a partnerek, a

hibridek ill. a haploidizáltatott szegregánsok karyotípus elemzése is bizonyította. A citodukciót dsRNS vírusok átvitelével követtük nyomon.

Szexuális élekciklusa

Az ezidáig aszexuálisnak tartott *Phaffia rhodozyma*-t speciális körülmények között párosodásra tudtuk bírni és így bizonyítást nyert, hogy *Basidiomyceta* élesztőgomba. A párosodás feltétele, hogy az intenzív szaporodási ciklusban lévő sejtektől megvonjuk a nitrogén forrást, vagy teljes mértékű tápanyag megvonás történjen. Ilyen körülmények között két sejt, vagy az anya- és leánysejtje egymás felé rövid konjugációs csövecskét fejlesztenek és összeolvadnak. Ezt követően a sejtből egy vékony holobasidium nyúlik ki, a csúcán 3-7 basidiospóra képzésével. Auxotróf és szín markerekkel ellátott mutánsok keresztezésével bizonyítható, hogy a holobasidiumban karyogámia, ill. meiózis történik. A basidiosporuláció ribitol szénforrásként történő alkalmazásakor fokozható (Golubev, 1995). A *Phaffia rhodozyma* élekciklusa homothalliás, mivel a szabályos meiózis eredményeként keletkező 4 basidiospóra mindegyike újfent sporulációra képes. További kísérleteket tervezünk a *Phaffia rhodozyma* mating rendszerének felderítésére, amelyhez pillanatnyilag a párosodásban defektes mutánsok előállítása és analízise folyik.

Mitokondriális sajátosságaik jellemzése

Egyedül álló a *Basidiomyceta* élesztők között, hogy a *Phaffia rhodozyma*-ban spontán keletkező pici telepek megjelennek. Ezek a pici telepek oxidatív körülmények között is fermentációval nyerik energiájukat, vagyis a faj petite pozitív. A mutáció gyakorisága egyes törzsekben 100%-ra emelhető etidium bromid kezelés hatására. A mutánsokból izolált mitokondriumok oxigén fogyasztása csökkent mértékű, és antimycin A jelenlétében nincs gátló hatás úgy, mint a vad grand törzsek esetében. A kis telepűség mitokondriális funkció kiesése miatti eredete így bizonyított.

Nem fermentálható szénforrásokon tenyésztve néhány antibakteriális antibiotikummal szemben érzékeny, amelyekre nézve rezisztencia markerek kiépítése folyik.

A két féle mutáció segítségével a továbbiakban szeretnénk meghatározni, hogy a petite fenotípust a mtDNS vagy a nukleáris DNS-en bekövetkező mutációk idézik-e elő? További kísérletek folynak a mutáció természetének meghatározására, mivel a többi élesztőgombától eltérően a mutánsok indukálhatók UV sugárzás hatására is mintegy 50%-os gyakorisággal.

Irodalom:

Barnett, J. A. (1992) The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists *Yeast* 8: 1-25

Carle, G. F. and Olson M. V (1985) An electrophoretic karyotype for yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3756-3760

Clark-Walker G. D. , McArthur, C. R. and Sriprakash K.S.(1983) Order and orientation of genic sequences in circular mitochondrial DNA from *Saccharomyces exiguus*
J. Mol. Evol. 19: 333-341

Corner, B. E. and Poultnier T. M. (1989) Interspecific complementation analysis by protoplast fusion of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* adenine auxotrophs
J. Bacteriol. 171: 3586-3589

Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins *Ann. New York Acad. Sci.* 121:404-423

Ferenczy, L., and Kucsera, J. (1985) Gene transfer via chemically inactivated protoplasts of yeasts. 10th Int. Specialized Symposium on Yeast, Varna 1985, Abstracts, 103.

Ferenczy, L., Sipiczki, M. and Szegedi, M. (1974) Enrichment of fungal mutants by selective cell-wall lysis. *Nature* 253: 46-47

Golubev, W.I. (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) *Yeast*. 11, 101-110.

Hauswirth, W. W., Lim, L. O., Dujon, B. and Turner G. (1987) Methods for studying the genetics of mitochondria in: *Mitochondria-A Practical Approach* Eds. V. M. Darley-Usmar, D. Rickwood, M. T. Wilson IRL PRESS, Oxford, Washington DC pp:171-244

Hawthorn, D. and Philippsen, P. (1994) Genetic and molecular analysis of hybrids in the genus *Saccharomyces* involving *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and a new species, *S. douglasii* *Yeast* 10: 1285-1296

Kreger-van Rij, N. J. W.(Ed) (1984) *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 3rd edn. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

Kucsera, J., and Ferenczy, L. (1979) Interspecific protoplast fusion between *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. 5th Int. Protoplast Symposium, Szeged 1979, Abstracts, p 52.

Kucsera, J. (1990) Characterization of the killer phenotype of *Saccharomyces dairensis* CBS 421. In 4th Int. Mycological Congress, Regensburg 1990, Abstracts 197.

- Kucsera, J., Csiha, J., Nagy, Á., Pfeiffer, I. and Ferenczy, L. (1994) Interspecific protoplast fusion of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kluyveri*.
Acta Microbiol. Hung. 41, 351-352.
- Labarere, J. and Bernet, J. (1989) Protoplasmic incompatibility and cell lysis in *Podospora anserina* Genetics 87:249-252
- Maráz, A., Kiss M. and Ferenczy (1978)
Protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae* strains of identical and opposite mating types FEMS Letters 3:319-322
- Miller, M. W. , Yoneyama, M. and Soneda, M. (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*) Int. J. Syst. Bacteriol. 26: 286-291
- Naumov, G.I. (1986) Genetic differentiation and ecology of the yeast *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaia. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 289: 213-216
- Perkins, D. D. (1990) Main features of vegetative incompatibility in *Neurospora*
Fungal Newsletter 35: 44-46
- Philliskirk, G. and Young T. W. Z. (1975) The occurrence of killer character in yeasts of various genera Antonie van Leeuwenhoek 41: 147-151
- Putrament, A., Baranowska, H. and Prasmo W. (1973)
Induction by manganese of mitochondrial antibiotic resistance mutations in yeast
Molec. Gen. Genet. 126: 357-366

Rickwood D., Dujon, B. and Darley-Usmar V. M. (1988) Yeast mitochondria in: Yeast - a practical approach Eds. Campbell, I. and Duffus, J. H., IRL PRESS Oxford, Washington DC, pp 185-254

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis T. (1989) A Laboratory Manual I-III. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sherman, F., Fink, G. R. and Hicks J. B. (1986) Laboratory Courses Manual for Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor Laboratory

Snow, R. (1966) An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic nystatin Nature 211: 206-207

Sipiczki, M., Kucsera, J., and Dobó, E. (1985). Homo- and heterothallic sexual types in *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*. Curr. Genet. 9, 263-272.

Sipiczki, M., Kucsera, J., Ulaszewski, S., and Zsolt, J. (1982). Hybridization studies by crossing and protoplast fusion within the genus *Schizosaccharomyces* Lindner. J. Gen. Microbiol. 128, 1989-2000.

Tipper, D. J. and Schmitt, H. J. (1991) Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes Mol. Microbiol. 5:2331-2338

Vallin, C., Kucsera, J., Klinner, U., and Ferenczy, L. (1979). Intergeneric protoplast fusion between *Candida tropicalis* and *Pichia guilliermondii*. 5th Int. Protoplast Symposium, Szeged 1979, Abstracts, 59.

Vaughen-Martini, A., Martini, A. and Cardinali G. (1993) Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces* Antonie van Leeuwenhoek 63:145-156