

B 3315

CANDIDA FAJOK INTERSPECIFIKUS PROTOPLASZT FUZIÓJA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készítette és a József Attila Tudományegyetem  
Természettudományi Karához benyújtotta:

Kucsera Judit

Készült

a szegedi József Attila Tudományegyetem  
Mikrobiológiai Tanszékén

1980.

## T A R T A L O M J E G Y Z É K

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	1. oldal
ANYAG ÉS MÓDSZER	
MIKROORGANIZMUSOK, FELHASZNÁLT ANYAGOK	11. oldal
MÓDSZEREK	18. oldal
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	26. oldal
ÖSSZEFOGLALÁS	49. oldal
IRODALOMJEGYZÉK	53. oldal

## BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A gombák az élőlények egyik különálló és igen sajátos csoportját képviselik. Telepes testű szervezetek, amelyek különböző differenciáltságú fonalakból, a fonalak pedig eukariotikus sejtekből épülnek fel, Citoplazmájukban egy vagy több magot tartalmaznak. Utóbbi esetben homo- vagy heterokarionok lehetnek.

Fajon belül, gombasejtek egyesülése vagy fúziója, ezáltal pedig a genetikai információ átvitele a szexuális és a paraszexuális szaporodás során valósul meg. Szexuális /ivaros/ folyamatok során vagy homotallikus párosodás, vagy pedig heterotallikus párosodás zajlik le. Mindkét folyamat a partnerek plazmájának összeolvadásával /plazmogámia/ kezdődik, amit a magok összeolvadása /kariogámia/ követhet, diploid zigóta jön létre, melynek sorsa a különböző gombáknál eltérő lehet:

- a diploid zigóta mitotikus osztódásával stabil diploid generáció nő fel, amely csak meghatározott körülmények között válik haploiddá.

- a diploid zigóta azonnali meiotikus osztódásával négy haploid spóra keletkezik.

A meiotikus osztódások során, a kromoszómák véletlenszerű szétválásával, valamint a "crossing overek" révén genetikai rekombináció játszódhat le, amely különböző genotípusú, új tulajdonság-kombinációjú egyedek keletkezéséhez vezet.

Agombáknak egy jelentős része viszont ivari folyamatra képtelen. Ennek ellenére lehet lehetőség a különböző genetikai információk átvitelére, cseréjére az ún. paraszexuális folyamatok révén: kompatibilis haploid vegetatív sejtek anasztomózis /összenövés/ során két egymás mellé kerülő sejt konjugál és plazmatömlőn át az egyik sejt magja a másikba vándorol, heterokarion állapot jön létre. Kariogámia csak ritkán, kb.  $10^{-7}$  gyakorisággal következik be.

A természetes módon lejátszódó információcsere mellett újabban egyre több manipulációs technika alakult ki két, tetszőleges genetikai rendszer egy szervezeten belüli egyesítésére /pl. sejtfúzió, génátvitel szubcelluláris alkotókkal, vírusokkal, baktériumokkal, transzformációs kísérletek/.



Az így alkotott sejthibridek egyrészt a legkülönbözőbb kutatási területeken alkalmazhatók: pl. lehetővé teszi az élő sejtek géntranszferének és génregulációjának mikrobiális szinten való tanulmányozását, informatív nukleinsavat tartalmazó citoplazmatikus organellek bevitelével pedig / pl. mitokondrium / ezek biogenezisének genetikai, biokémiai vizsgálatát, stb. Másrészt, ezekkel az új módszerekkel lehetővé válik, a szexuális hibridizáció, a keresztezési akadályok / genetikai izoláció, inkompatibilitás / megszüntetése, és olyan új génkombinációjú hibrideket állítanak elő, amelyek gazdaságilag nagy jelentőségűek /pl. fokozott antibiotikum- vagy enzimtermelő, valamint eszenciális aminosavakban gazdag fehérjével rendelkező mikroorganizmusok, betegségekkel szemben rezisztens, nagy termőképességű növények/.

Gombáknál a mesterséges úton történő hibrid, illetve heterokarion képzést protoplasztok kényszerített fúziójával először Ferenczy és mtsi<sup>a</sup> valósították meg, Geotrichum candidum aminosav auxotróf mutánsainak alkalmazásával [1]. A módszer finomítása lehetővé tette a fúzió gyakoriságának növelését [2]. Kao és Michayluk [3] 1974-ben növényi protoplasztok fúzióját hatásosan tudták

indukálni polietilén-glikol /PEG/ magas koncentrációjú oldatával. Az új, fúziót indukáló szer alkalmazásával lehetővé vált gomba protoplasztok igen nagy gyakoriságú fúziója is [4,5].

Azt, hogy PEG indukálta fúzióval az élesztőgombák párosodás típusbeli különbségei /mating-type barrier/ legyőzhetők, azonos mating típusú intraspecifikus fúzióval igazolták Saccharomyces cerevisiae-ben [6-11] Schizosaccharomyces pombe-nál [12], Rhodosporidium toruloides-ben [13,14], Saccharomycopsis lipolytica-nál, [15,16], valamint Hansenula wingei [17] és Pichia guilliermondii [18] esetében. A keletkezett fúziós termékek stabil vagy instabil diploid illetve magasabb ploiditású szervezetek voltak, amelyek a fúzióban résztvevő partnerek teljes kromoszóma készletét egy magon belül tartalmazzák. Élesztőszerű gombák /pl. Candida/ esetében is, ahol párosodási típusról, szexuális vagy paraszexuális szaporodásmódról nem tudunk, a fajon belüli fúzió megvalósítható. Ennek eredménye instabil heterokarion, amely azután diploidként stabilizálódhat [19, 20]. Candida fajoknál ez az új módszer a genetikai munkák megkezdését teszi lehetővé, hiszen semmiféle természetes keresztezést ezideig nem lehetett elvégezni.

A fúziós technika alkalmazásával a mag-gén transzfer mellett lehetőség van mitokondriális genom átvitelére is [21-25], valamint fajok között hibridek létrehozására. Élesztőgombák körében Candida tropicalis és Saccharomycopsis fibuligera [26], Saccharomycopsis lipolytica és Candida guilliermondii [16], Kluyveromyces lactis és K. fragilis [27] valamint Schizosaccharomyces pombe és S. octosporus [28] sikeres keresztezését közölték. Egymástól nagyon távolsó fajok protoplaszt-fúziójával /pl. Schizosaccharomyces pombe és Saccharomyces cerevisiae/ valódi, intergenerikus hibridek nem nyerhetők [29].

Ebben a dolgozatban újabb interspecifikus fúziót írunk le. A két partner /Candida albicans és Candida tropicalis/ rendszertanilag igen közel áll egymáshoz. Morfológiai elkülönítésük nehézkes, megkülönböztetésükhöz fiziológiai, biokémiai tulajdonságaikat is fel kell használni. Kíváncsiak voltunk, vajon e két faj esetében létrehozhatók-e életképes hibridek és ha igen, milyen tulajdonságokkal rendelkeznek.

Candida albicans és Candida tropicalis jellemzése

A Candida génusz élesztőszerű mikroorganizmusok rendkívül heterogén csoportjából áll. Közös jellemzőjük az ivari folyamat hiánya, illetve ismeretlen volta, valamint az, hogy jól differenciált micéliumokkal vagy pszeudomicéliumokkal rendelkeznek. Az idesorolt fajok élesztőszerű Ascomycetesek és Basidiomycetesek imperfekt alakjai.

Mivel a fúziós munka során alkalmazott Candida albicans partner szexuálisan aktív formáját 1967-ben Van der Walt [30] megtalálta, új rendszertani helye és neve:

divisio: Zymomycota

classis: Endomycetes

ordo: Endomycetales

familia: Syringosporaceae

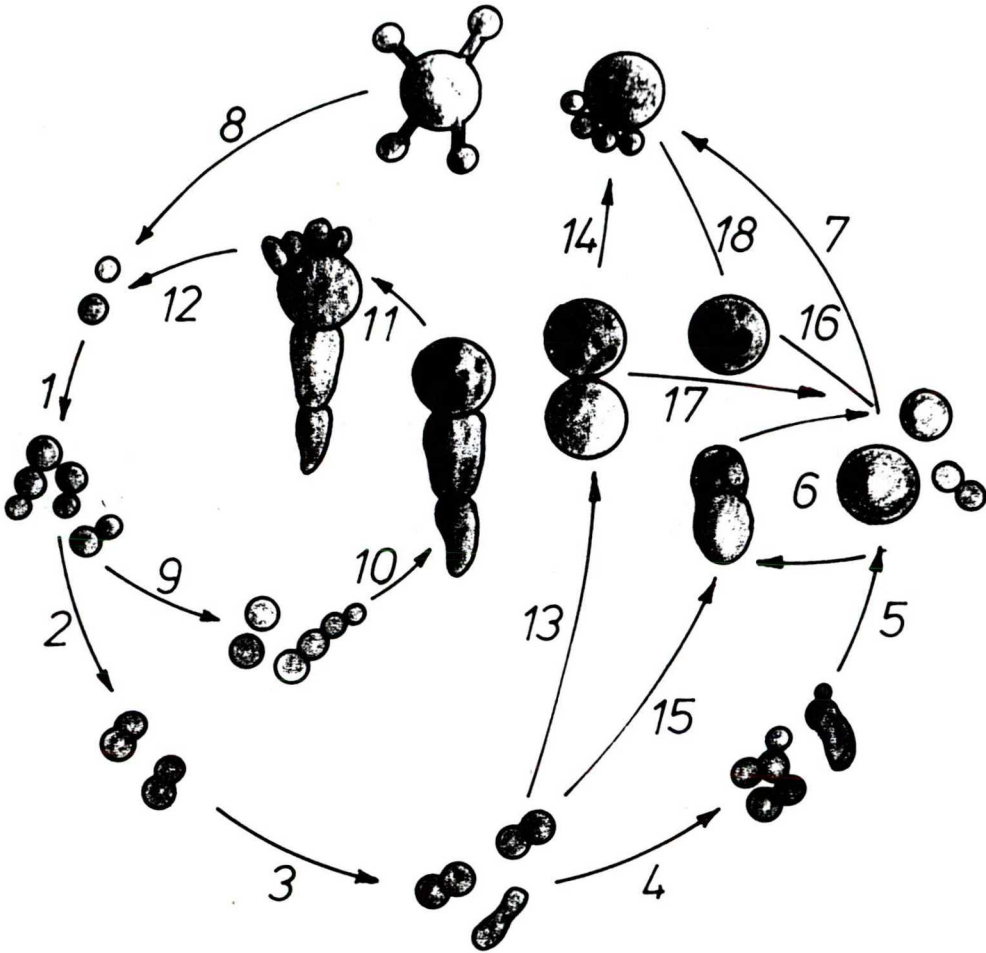
species: Syringospora albicans

Életciklusát az 1. ábra mutatja: a szexuális folyamat néhány lépése még mindig kérdéses, nem kellően tisztázott.

A Candida tropicalis partner szexuális szaporodás[módjáról a mai napig nincs tudomásunk. Bár életciklusát [2. ábra] már tanulmányozták, sem sejtek konjugációját, sem pedig



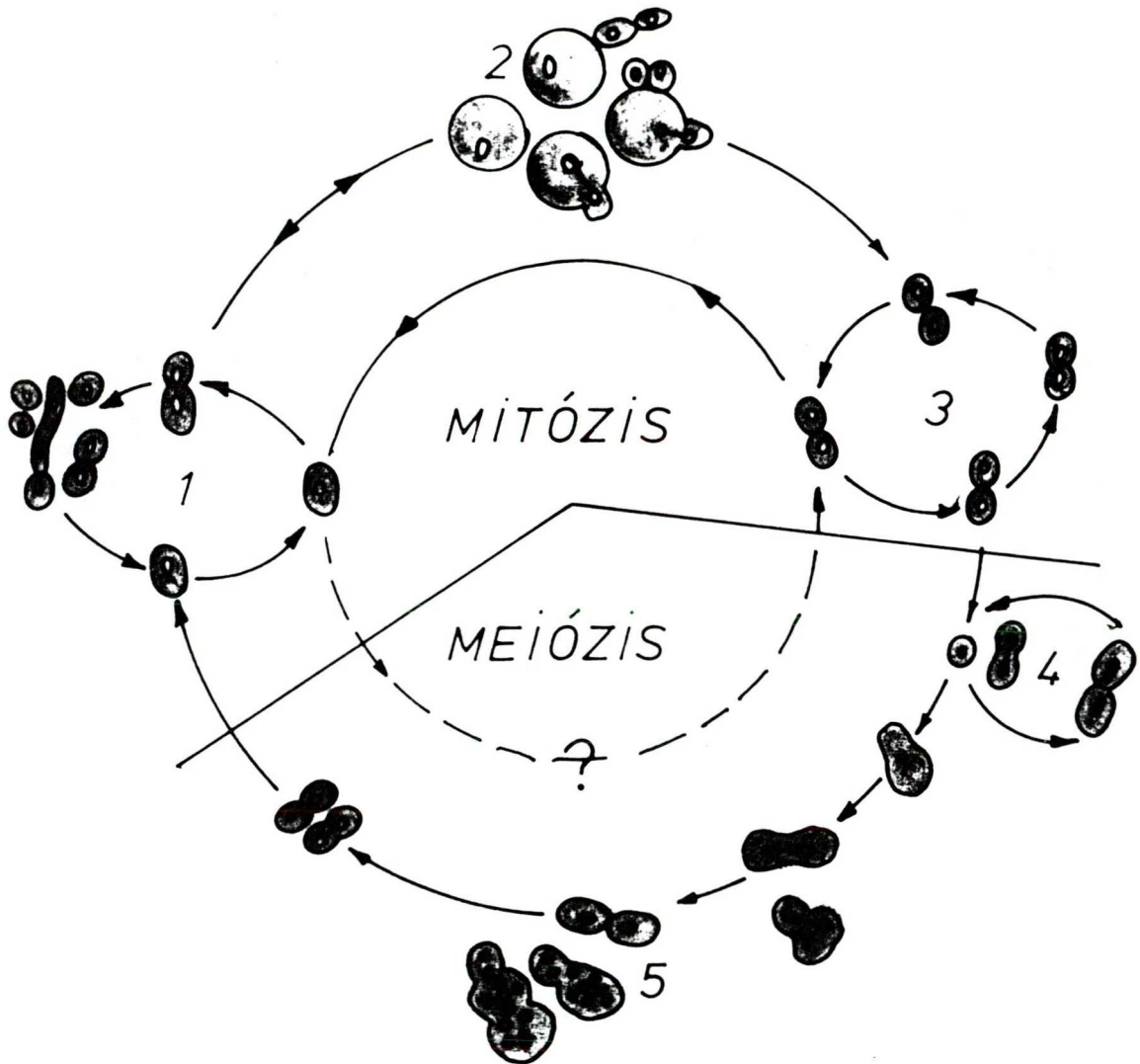
# A Candida albicans életrciklusa



- 1 szexuálisan aktív haploid sejtek sarjadzása, mitotikus sejtmegosztódás
- 2-5. konjugáció, kariogámia és a diploid sejtek sarjadzása, mitotikus sejtmegosztódás
- 6. endospóra képzés /?/
- 7-8. meiózis és meiokonidium képzés, valamint a meiokonidiumokból visszaálló haploid nemzedék
- 9-12. szexuálisan inaktív sejtek öndiploidizációja /?/, klamidospóra képzése, meiózisa, a klamidospórák csirázása
- 13-14. diploid sejtek klamidospóra képzése és meiózisa
- 15. diploid sejtek endospóra képzése /?/
- 16-18. klamidospóra képzés, meiózis

1. ábra

# A *Candida tropicalis* feltételezett életrajza



1. szexuálisan inaktív haploid sejtek sarjadzása, mitotikus sejtmegosztódás
2. klamidospórák képződése /?/
3. szexuálisan aktív haploid sejtek sarjadzása, mitotikus sejtmegosztódás
4. diploid sejtek sarjadzása
5. sarjadásos meiosis /?/

- haploid mag
- diploid mag
- ⊗ poliploid mag

2. ábra

sejtmagvak fúzióját nem tapasztalták. Átmeneti diploid állapot csak az un. autoploidizáció során jött létre

[31]. Rendszertani helye:

form-divisio : Deuteromycota

form-classis : Blastomycetes

form-ordo : Cryptococcales

form-genus: Candida

species : Candida tropicalis

Mivel a rendszerezés során a filogenetikai összefüggéseket leginkább tükröző ivari folyamatokat felhasználni nem lehet, hiszen nem ismertek, a rendszer mesterséges, amelyet a "form" kifejezéssel jelölünk.

Élesztőgombák rendszerezéséhez jelenleg mintegy 50féle morfológiai és fiziológiai tulajdonságot vizsgálnak. De ha a fajok azonosítása illetve elkülönítése érdekében mindez nem bizonyul elégségesnek, akkor egyéb fenotipikus jellemzők meghatározását is elvégzik, makromolekuláris szinten. Pl.: megállapítják a kérdéses törzsek DNS-ének bázis összetételét /GC %/ vagy a bázis szekvenencia homológia mértékét a DNS-DNS vagy DNS-RNS hibridizáció alapján, különféle szerológiai tesztek végzésnek, és az ezzel szoros összefüggésben levő sejtfal



mannán, illetve mannóz tartalmú fal-diszacharidok proton mágneses rezonancia /P.M.R./ spektrumát vizsgálják, esetleg az elektrontranszport rendszerek izoprenoid kinonjait osztályozzák, elektroforetikus enzimrendszereket tanulmányoznak, stb.

Mikromorfológiáját tekintve mind a C. albicans mind a C. tropicalis élesztőszerű, szaporodásuk multipoláris sarjadzással történik. Megfelelő körülmények között pszeudomicéliumokat képeznek, amelyek pszeudohifákra és blasztoporákra különíthetők. Valódi micéliumok szintén előfordulnak, továbbá <sup>a C. albicans-ra</sup> jellemző a klamidospórák képződése meghatározott tenyésztési körülmények során. A két partner fiziológiai sajátágaiban is sok hasonlóság mutatkozik. Ezeket Lodder "The Yeast" című munkájának útmutatása alapján vizsgáltuk [32].

Lodder fiziológiai tesztként cukrok és más szénforrások oxidatív felhasználásának és fermentációjának vizsgálatát, a nitrát kizárólagos N-forrásként való felhasználását, antibiotikum érzékenység vizsgálatát, stb. használja fel a fajok leírásához, jellemzéséhez. A cukor asszimilációs és erjesztési spektrum szélesebb a Candida tropicalis esetében, a  $\text{NaNO}_3$ -ot egyik faj sem asszimilálja, mindkettejük maximális növekedési hőmérséklete hasonló /41-44 °C/.

Szerológiai vizsgálatok szerint, választott partnereink sejtfal antigén tulajdonságaik alapján azonos fajcsoportba tartoznak, de a fajcsoporton belül elég távol állnak egymástól [33-36].

1968-ban Stenderup és Leth Bak [37] megállapította, hogy a C. albicans és C. tropicalis DNS-ének igen alacsony és csaknem azonos a guanin- citozin mól százaléka, a Tm és az uszódenzitás alapján: 35,1 %, illetve 34,9 %. A DNS szekvencia homológia, a DNS-r- RNS hibridizáció alapján, a megvizsgált Candida fajok közül a C. tropicalis és C. albicans között a legnagyobb, mintegy 86 % [38].

Mitokondriális DNS-re vonatkozó vizsgálatokat csak egyetlen Candida fajról, a C. parapsilosisról közöltek [39,40]. O' Connor és munkatársainak kutatásai alapján a mt-DNS nagysága 11,14  $\mu$ m, molsúlya  $23,1 \times 10^6$  dalton. Uszódenzitása a magéval csaknem megegyező: a zárt köralakú mt-DNS-é  $1,698 \text{ g/cm}^3$ , a magsavé  $1,700 \text{ g/cm}^3$ . Candida albicans és C. tropicalis ilyen jellegű összehasonlító vizsgálatát még nem közölték.

Az orvosi diagnosztikai laboratóriumokban - egyes Candida fajok patogenitása miatt - nagy intenzitással folynak



enzimaktivitási vizsgálatok. A C. albicans-ról 1849 óta tudott, hogy szisztémás mikozisokat, olykor halálos kimenetelű betegséget okozhat, bár normális körülmények között minden emberben előfordul anélkül, hogy betegséget okozna. A C. tropicalis viszont többnyire csak kísérőként fordul elő candidiazisos betegekben. Ezt a fajt néhány országban takarmányélesztőként is gyártják. A C. albicans patogénitását savas foszfatazok [40], észterázok és proteázok aktivitásával próbálták kapcsolatba hozni [41].

ANYAG ÉS MÓDSZER

Alkalmazott mikroorganizmusok

Candida albicans CBS 562T lys auxotróf mutánsa  
Candida albicans CBS 562T met auxotróf mutánsa  
Candida tropicalis CBS 94T ade auxotróf mutánsa  
Candida tropicalis CBS 94T ade, met " mutánsa

Felhasznált anyagok

A.: TÁPTALAJOK

1./ Komplet t táptalaj /KM/

a./ élesztő kivonatos tápoldat

1 % glukóz

0,5 % yeast extract /Oxoid/

b./ élesztő kivonatos tápagar

1 % glukóz

0,5 % yeast extract /Oxoid/

2 % agar /Bacto/

2./ Ozmotikusan stabilizált komplet t tágagar /OKM/

1 % glukóz

0,5 % yeast extract /Oxoid/

1,5 % agar /Bacto/

0,7 M KCl vagy 0,3 M CaCl<sub>2</sub>

3./ Minimál táptalaj /MM/

- 0,5 %  $\text{NH}_4/2 \text{SO}_4$

- 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 1 % glukóz

- 2 % agar /Bacto/

- 1 ml Wickerham-féle vitamin oldat /1000 ml

4./ Ozmotikusan stabilizált minimál táptalaj /OSM/

mint MM

+ 0,7 M KCl vagy 0,3 M  $\text{CaCl}_2$

5./ Fedő tápágar

- 0,3 M  $\text{CaCl}_2$

- 1,5 % agar /Bacto/

6./ Asszimilációs táptalaj

- 0,5 %  $\text{NH}_4/2 \text{SO}_4$

- 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 1 ml Wickerham-féle vitaminoldat /1000 ml

- 1,5 % agar /Bacto/

- 0,1 % a megfelelő diagnosztikus cukorból

7./ Tápoldat erjesztési próbához

- 0,5 %  $\text{NH}_4/2 \text{SO}_4$
- 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 ml Wickerham-féle vitaminoldat/1000 ml
- 10 mg brómkrezol bibor/ 1000 ml
- 0,5 % a megfelelő diagnosztikus cukorból

8./ Kukoricaliszttes agar

- 40 g kukoricalisztet 1 liter vízben 1 órán át
- 60 °C-on kevergetünk, szűrjük, hozzáadunk
- 20 g agart és sterilizáljuk.

B.: EGYÉB ANYAGOK

1./ Protoplasztáló enzim oldat

- 1,5 % liofilezett csigaenzim
- 0,1 %  $\beta$ -merkaptoetanol
- 0,7 M KCl-ben oldva

2./ Előkezelő oldat protoplasztáláshoz

- 5 mM EDTA
- 0,1 M TRISZ                      pH = 8
- 1 %  $\beta$ -merkaptoetanol

3./ Polietilén glikol /Karbawax, M.s: 4000/

- 30 %-os deszt.vizes oldat
- 10 mM  $\text{CaCl}_2$



4./ Sejtmag festéshez felhasznált anyagok

a./ tömény HCl és deszt.viz 1:3 arányu keveréke

b./ 0,5 mg/ml koncentrációjú metilénkék festékoldat deszt.vizben

pH = 7

5./ Az egy sejtre vonatkoztatott DNS mennyiség meghatározásához felhasznált anyagok:

a./ 10 és 20 %-os perklórsav /deszt.vizben higitva/

b./ 4 % difenilamin /petroléterben átkristályosított/ jégcetben oldva

c./ acetaldehid 16 mg/ml törzsoldata deszt.vizben

d./ DNS standard: 400  $\mu$ g/ml csirke vörösvérsejt DNS 5 mM-os NaOH-ban oldva

Felhasználás előtt kétszeresen higitva 20 %-os perklórsavban/70 °C-on 15 perc/, utána ujjabb 2-szeres higitás 10 %-os perklórsavban. Végkoncentráció: 100  $\mu$ g/ml.

6./ Mitokondriális DNS szeparáláshoz felhasznált anyagok:

a./ protoplaszt lizáló oldat:

15 ml TRISZ-HCl puffer /pH = 8/

1,7 ml 1 M EDTA

0,34 g sarcosyl / FLUKA /



b./ cézium klorid /LTD Biochemicals/

c./ Hoechst - 33.258 vegyület 10 mg/ml oldata  
deszt.vizben

7./ Haploidizáló szerek

- akriflavin /Reanal/ 1 mg/ml oldata etanolban
- klorálhidrát /Reanal/ 10 mg/ml oldata deszt.  
vizben
- benomyl /Chinoin/ 1 mg/ml oldata etanolban
- p-fluorofenilalanin /Serva/ 1 mg/ml oldata  
etanolban

8./ Diagnosztikus cukrok

Glukóz, galaktóz, szaharóz, maltóz, laktóz, raffinóz,  
melibióz, fruktóz, szorbóz, L-ramnóz, D-xilóz,  
L-arabinóz, D-arabinóz, D-ribóz, cellobioz,  
arbutin, szalicin, eszkulin,  $\alpha$ -metil glukozid,  
trehalóz, melecitóz, keményítő, inulin, etanol,  
glicerol, eritritol, adonitol, mannitol, szorbitol,  
dulcitol, inozitol, Na-acetát, Ca-Na-laktát,  
K-Na-tartarát, Na-glukonát.

9./ Izoenzim vizsgálatok során felhasznált anyagok:

Gél összetétel:

Akrilamid A	10,1 ml
Deszt. viz	3,4 ml
Gél-puffer	15,0 ml
Ammónium perszulfát / 10%-os /	1,5 ml
N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin	0,045 ml

Akrilamid A : 22,2 g akrilamid  
0,6 g N,N'-metilén-bisz-akrilamid  
deszt. viz 100 ml-re

Észteráz vizsgálatok :

Gél-puffer: 0,02 M bórsav

pH=8,62 / 2 N NaOH-val beállítva /

Hid-puffer: 0,3 M bórsav

0,03 M NaCl

pH=8,0 / 2N NaOH-val beállítva /

Festés: 200 mg Blue RR salt / 100 ml 0,006M  $\alpha$ -naftil-  
acetát

0,08 M TRISZ // pH=7 //





## Módszerek

### 1. Protoplaszt\_képzés

A protoplasztálandó C. albicans és C. tropicalis törzsek 24 órás, komplett táptalajon előnevelt tenyészetéből 1 kacsnyi mennyiséggel 100 ml komplett tápoldatot beoltunk, 10 órán keresztül, 30 °C-on rázatva inkubáljuk. Ekkorra a sejtkoncentráció körülbelül  $10^7$  sejt/ml, a tenyészet logaritmikus növekedési fázisba kerül, amely optimális a protoplaszt képzéshez. A gomba sejteket tápoldatukból kicentrifugáljuk /2000 g/5 perc/, steril körülmények között 0,7 M KCl-dal átmoszuk és ismét centrifugáljuk. Előkezelő oldatban felszuszpendáljuk, a sejt koncentrációt kb.  $10^8$ /ml-re állítjuk. 30 °C-on történő 20 perces inkubálást, újabb centrifugálást és 0,7 KCl-dal való átmosást követően protoplasztáló enzimoldatba tesszük a sejteket. A 30-40 perces kezelés során az intakt sejtek 95-100 %-ban átalakulnak protoplasztokká.

### 2. Fúzió

Az enzimoldatból kicentrifugált C. albicans és C. tropicalis protoplasztokat 0,3 M  $\text{CaCl}_2$ -dal kétszer átmoszuk, majd Bürker-kamrás számolással

meghatározzuk a szuszpenzió 1 ml-re vonatkozó sejt-számot. A fúzióban résztvevő partnerek mindegyikéből  $5 \cdot 10^8$  protoplasztot összecentrifugálunk, a felül-úszót elöntjük és 2 ml 30 %-os PEG-et rétegzünk óvatosan a centrifugacsőbe. A protoplasztok intenzív aggregációja sokszor szemmel is jól követhető. 20 perces inkubáció után a regenerációhoz szükséges higitások elvégezhetők.

### 3. Regeneráció

a./ A PEG-es kezelés során képződött aggregátumokat kellő higitás után /PEG-ben/  $42^\circ\text{C}$ -os fedő-táptalajba kevertük és olyan Petri-csészébe öntöttük vékony rétegben /1 ml/csésze/, amely már megszilárdult, ozmotikusan stabilizált szintetikus minimál ill. ozmotikusan stabilizált komplett táptalajt tartalmazott. 7-10 napos,  $30^\circ\text{C}$ -on történő inkubáció után az <sup>OSM-en</sup> megjelenő fúziós telepeket friss minimál táptalajra izoláltuk.

b./ Az egyes partnerek regenerációs képességét külön-külön is meghatároztuk. A protoplasztokat  $0,3 \text{ M CaCl}_2$ -dal való átmosás, Bürkerkamrás sejtszám ellenőrzés után úgy higitottuk, hogy a szuszpenzió ml-ként  $10^4$  sejtet tartalmazzon. Ebből  $0,5 \text{ ml}$ -t  $10 \text{ ml}$   $42^\circ\text{C}$ -os fedőtáptalajba

kevertünk és az előbb ismertetett módon ozmotikusan stabilizált komplett alaplemezre öntöttük. 3 napos inkubáció után a regenerációs %-ot meghatároztuk:

$$\frac{\text{regenerálódott telepek száma/csésze}}{\text{leoltott protoplasztok száma/csésze}} \cdot 100$$

A komplementációs gyakoriságot a következőképpen számoltuk ki:

$$\frac{\text{OSM táptalajon megjelenő telep szám/csésze}}{\text{OSK táptalajon megjelenő telep szám/csésze}} \cdot \text{higitás}$$

c. Back-mutáció ellenőrzése

Az előzőekben ismertetett regenerációs módszerrel  $5 \cdot 10^7$  protoplasztot tesztelünk OSM táptalajon.

4. Sejtmag festés

A fúziós termékek és a partnerek sejtjeiből kenetet készítünk tárgylemezen, beszárítjuk, majd cc. HCl : desztviz = 1 : 3 keverékében a sejtplazma RNS-ét 30 percig hidrolizáljuk. Csapvizes öblítést és szárítást követően metilénkékkel 30 percig festjük a sejteket. Ujabb csapvizes öblítés és szárítás után 100 x-os nagyítású immerziós lencsével vizsgáljuk a preparátumot.

5. Sejtek térfogat mérése

A hibrid sejteket komplett tápoldatban rázatva tenyésztettük 48 órán keresztül, 30 °C-on. A sejtekről mikroszkópikus fotót készítettünk, a negatív filmet kinagyítottuk és 50 sejt rövid és hossz-tengelyét lemértük. Sejt térfogatot számoltunk:

$$V = \frac{4}{3} \pi ab^2$$

a: a hossz-tengely fele

b: a rövid tengely fele

6. Egy sejtre vonatkoztatott DNS mennyiségi meghatározása

A hibrideket és a fúziós partnereket minimál, illetve a megfelelő aminosavakkal kiegészített minimáltáptalajon neveltük 48-72 órán keresztül. 0,5 %-os csigaenzimbe átmostuk és kb. fél órán keresztül 30 °C-on rázattuk. Az inkubáció során a sejtek aggregációja megszűnik, az anyasejthez tapadt sarjak is leválnak. Enzimentesítést deszt. vizes mosással végeztünk, kétszer ismételtük. A sejtkoncentrációt Bürker-kamrában meghatároztuk. A DNS extraháláshoz Burton [42] módszerét alkalmaztuk, mennyiségét difenilamin reagenssel mértük [43]. Minden vizsgálandó törzsből  $5 \cdot 10^9$  sejtet centrifugáltunk 5 ml-es centrifugacsőbe. Szuszpendáltuk 5 ml 10 %-os perklórsavban és 30 percig jégfürdőn extrahál-



tuk a savoldékony anyagokat. Ujabb centrifugálást követően 5 ml 10 %-os perklórsavban 70 °C-on a DNS-t extraháltuk, 30 perc múlva a sejteket centrifugáltuk. A felülúszót megtartottuk, 2 ml extraktumhoz 2 ml difenilamin reagenst és 0,1 ml acet-aldehyd oldatot pipettázunk, 17 óras 30 °C-on történő inkubálás után a mintákat 595 nm-nél fotometráltuk. Ismert koncentrációjú csirke vörösvérsejt DNS-ből kalibrációs görbét készítünk és az egy sejtre vonatkoztatott DNS mennyiségét meghatározzuk.

## 7. Cukor asszimilációs és erjesztési spektrum meghatározása

### a./ Cukor asszimiláció

A vizsgálandó élesztők 24 órás tenyészetéből indulunk ki, 5 ml steril vízben 1 kacsnyi sejtet szuszpendálunk, majd gereblye oltással a különböző szénforrásokat 0,1 %-ban tartalmazó minimál, ill. a megfelelő aminosavakkal kiegészített minimál táptalajra szélesztettük. A lemezeket 30 °C-on inkubáljuk, a harmadik és ötödik napon állapítjuk meg, hogy a mikrobák mely szénforrásokat hasznosítják. Mértékét 0-3-ig értékeljük. Kontroll kísérletet szénforrás nélküli táptalajon végzünk.

b./ Erjesztési spektrum

Az erjesztési tápoldatokat a vizsgálandó törzsek 1-1 kacsnyi mennyiségével beoltjuk. A csöveket 2-3 cm magasan vazelin : paraffinolaj 1:1 arányu steril keverékével lezárjuk.

25 °C-on inkubálunk és 2 naponként 2 héten keresztül értékelünk. Pozitív erjesztési csőben gáz-buborékot, valamint az indikátor elszineződését láthatjuk.

8. Haploidizáció indukálása

Egy hetes tenyészetekből kiindulva, a megfelelő aminosavakkal kiegészített minimál táptalajra, amely a haploidizáló szert is tartalmazta, 1 cm átmérőjű foltban kb  $5 \cdot 10^6$  sejtet oltunk. Egy hetes 30 °C-on való inkubálás után a sejteket 5 ml deszt. vízben szuszpendáljuk és gereblyeoltással komplett táptalajra szélesztjük. 24-48 óra múlva a kifejlődő telepek auxotrófiáját replika technikával meghatároztuk.

9. Mag és mitokondriális DNS szeparálása Williamson módszerével [44]

A vizsgálandó törzsek  $5 \cdot 10^9$  sejtjéből már az előzőekben ismertetett módon protoplasztokat képeztünk. Enzimentesítés után 60 °C-on 15 percig protoplaszti-

záló oldattal a sejtek membránját feloldottuk. Gyors hűtés után /0 °C-ra/ tisztító centrifugálást végeztünk Janetzki VAC 601-es ultracentrifugával /12000 rpm, 4 °C-on/. A felülúszó 3,9 ml-ében 4 g CsCl-t feloldottunk és 10 mg/ml koncentrációjú Hoechst 33 258-as vegyület 0,1 ml-ével jól összekevertük. 48-72 órán át 30 000 rpm-mel 20 °C-on centrifugáltuk. A centrifugálás során kialakuló gradiensen a mag és mt-DNS eltérő denzitásuk alapján szétváltnak. A DNS-hez irreverzibilisen kötődött festék pedig hosszú UV-ben fluoreszkál, így a sávok láthatóvá tehetőek. Értékelést Philips HPV 125 W-os lámpákkal megvilágítva végeztünk.

10. Izoenzim vizsgálatok /Brewer és Sing szerint [45]/

A vizsgálandó törzsek 24 órás, komplett tápoldatban előnevelt sejtjeit centrifugálás illetve desztillált víz mosás után French Press-szel 15000 psi-nél, kétszer, hűtött körülmények között feltártuk. 20000 rpm-mel Janetzki T24-es centrifugában a mintából a sejt-törmelékét és az ép sejteket leülepitettük, a felülúszót megtarottuk. Géltre vitelkor az egyes minták 10 % glicerint és 0,001 % brómfenolkék jelző festéket tartalmaztak. 50 µl-nyi mennyiségeket helyeztünk az előre elkészített gélalapok egy-egy mintahelyére.

A futtatást Frigomix berendezéssel hűtött Pharmacia gyártmányu gél elektroforétikus készülékkel végeztük, kb 8-10 V/ gél cm-nél illetve 10 mA/gél áramerősséggel 4-8 órán keresztül, amíg a brómfenolkék marker elérte a gél alsó szélét. Az elektroforézis után a gélblokkokat 37 °C-on 30 percig sötétben a festőoldatban inkubáltuk, majd pedig 50%-os etanolban festék mentesítettük. A 24 órás kezelés után a gélblokkokat 4 °C-on 50%-os etanolban tároltuk.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 1. Protoplasztképzés, regeneráció

Candida fajok sejtfalának oldása mind csigaenzimmel [46] mind pedig bakteriális eredetű enzimmel [47] megvalósítható. A létrejövő sejtfal nélküli sejtek a protoplasztok. Ha mikroszkóposan követjük a protoplasztképzést, az intakt, tojásdad alakú sejtek lekerekedését, az anyasejtekhez tapadt sarjak leválását figyelhetjük meg /1-4 kép/. Candida tropicalis esetében egy órán belül teljes a protoplaszt képzés a C. albicansnál 1,5 órán belüli 100 %-os protoplaszt képzést érhetünk el előkezlő oldattal való kezelés nélkül.

Kísérleteink szerint a sikeres protoplaszt képzés meghatározója a tenyészetek kora. Vizsgálataink során az exponenciális növekedési fázisú kulturából származó fiatal sejtekből /kb 10 órás/ mindig könnyedén nyerhetünk protoplasztokat, míg a stacioner fázisból származó idős sejtek /16-18 órás/ rezisztensek voltak a faloldó enzimmel szemben. Ezt a sejtek öregedésével járó sejtfal struktúra változások okozzák.



A protoplasztképzés szempontjából másik fontos tényező a sejtek előkezelése valamilyen szulfhidril reagenssel /pl: cisztein, 2-merkaptóetanol, vagy ditiotreitól/. A hatás a sejt-fal-proteinek diszulfid hidjainak redukálásán alapszik. A sejt-falban levő fehérjemolekulák felnyílnak, a litikus enzimek pedig hozzáférnek az egyéb /glukán, mannán/ sejt-fal alkotókhöz.

Előkezelés nélkül a sejteknek csak kb. 60-75 %-a alakítható át protoplasztokká, ha az enzimidat merkaptóetanolt nem tartalmaz.

Az enzimkezelés során létrejövő protoplasztok ozmotikusan érzékenyek, ezért harmadik feltételként ozmotikusan stabilizált környezetet kell biztosítanunk. Esetünkben 0,7 M-1,2 M KCl a megfelelő ozmolaritású stabilizáló szer.

A megfelelő korú tenyészetből kiindulva az általunk alkalmazott előkezelő oldattal 100 %-os protoplaszt képzés érhető el 30-40 percen belül, mindkét Candida faj esetében.

Nečas és munkatársai 1961-ben leírták, hogy megfelelő táptalajon a protoplasztokban makromolekulák

szintézise folyik, képesek sejtfaluk regenerálására és további osztódásra [48]. A regenerálódás mértéke a táptalaj minőségének függvénye és az alkalmazott fajra specifikus.

Kísérleteink során különböző koncentrációjú  $MgSO_4$ -t  $KCl$ -t és  $CaCl_2$ -t próbáltunk ki stabilizátorként a regenerációhoz.

Az eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

Stabilizátor	Regeneráció /%/	
	<u>C. albicans</u> /lys <sup>-</sup> /	<u>C. tropicalis</u> /ade <sup>-</sup> , met <sup>-</sup> /
0,5 M KCl	10	5
0,6 M KCl	25	20
0,7 M KCl	45	35
0,8 M KCl	30	30
1,0 M KCl	10	15
0,2 M $CaCl_2$	15	10
0,3 M $CaCl_2$	30	25
0,4 M $CaCl_2$	25	15
0,5 M $CaCl_2$	15	10
0,6 M $MgSO_4$	30	20
0,8 M $MgSO_4$	50	35
1,0 M $MgSO_4$	25	20

1. táblázat





Mivel protoplasztot leggyorsabban és legtisztábban KCl jelenlétében nyerhetünk és a fúzió megvalósulásához a PEG mellett  $\text{Ca}^{2+}$  ionokra is szükség van, a fúziós telepek regeneráltatásához e kétféle stabilizáló szert, szénforrásként pedig 1 % glukózt választottunk. A 0,7 M KCl és a 0,3 M  $\text{CaCl}_2$  hasonló mértékű regenerációt biztosít mindkét Candida faj esetében. Alaptáptalajban 0,7 M KCl-t, fedőtáptalajban 0,3 M  $\text{CaCl}_2$ -t használva, a regenerációs ráta 20 %.

2. Az auxotróf törzsek fúziója, a fúziót befolyásoló tényezők,

Ahhoz, hogy két fuzionált protoplaszt közötti komplementációt fel tudjunk ismerni, a partnereknek ismert, vagy legalább jelzett genetikai készlettel kell rendelkezniük. Mivel pedig a protoplasztoknak csak csekély hányada fuzionál, a komplementáció jeleinek olyannak kell lennie, hogy azt könnyen nyomon tudjuk követni. Ezért a különböző megbízható auxotrofiát hordozó törzsek protoplasztjai rendkívül alkalmasak a fúzió bizonyítására, hiszen minimál táptalajon csak a komplementálódott, egymást genetikailag kiegészített fúziós hibridek életképesek. Különösen előnyös az adenin auxotróf

mutánsok használata, mivel ezek telepei pirosak, a sejtekben felhalmozódott poliribozilaminoimidazol pigment miatt. Ez a megkülönböztető telepmorfológia pedig kényelmes szelektív rendszert biztosít. A fúziós kísérletek megkezdése előtt ellenőriznünk kellett, vajon előfordul-e back-mutáció az általunk alkalmazott törzseknél és ha igen, milyen gyakorisággal. Ebből a célból minden auxotróf mutáns  $5 \cdot 10^7$  sejtjét teszteltük az "Anyag és módszer" c. fejezetben leírt technikával. Az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

Törzs	Back-mutáció gyakorisága
<u>C. tropicalis</u> ade <sup>-</sup>	$< 10^{-7}$
<u>C. tropicalis</u> ade <sup>-</sup> met <sup>-</sup>	$< 10^{-7}$
<u>C. albicans</u> lys <sup>-</sup>	$< 10^{-7}$
<u>C. albicans</u> met <sup>-</sup>	$5 \cdot 10^{-7}$

2. táblázat

Ha két különböző auxotróf törzs intakt sejtjeit vagy protoplasztjait PEG hozzáadása nélkül együtt neveljük, minimál táptalajon nem jelennek meg makroszkópikus méretű telepek, legfeljebb egyet-kettőt osztódnak, amelyet mikrosz-

kópiusan ellenőrizhetünk. Ez bizonyítja, hogy a partnerek egymással nem tudnak párosodni és az át.-etetés" /cross-feeding/ lehetősége is kizárt.

Amikor Candida albicans és Candida tropicalis auxotróf törzseinek 1:1 arányú keverékét PEG-gel kezeltük /5. kép/ és ozmotikusan stabilizált minimál táptalajon neveltük, 7-10 nap után kis gyakorisággal prototróf telepek jelentek meg /3. táblázat/. Fúziós telepeket a genetikai markerek minőségétől függetlenül minden esetben nyertünk.

Keresztezés	Komplementációs gyakoriság
<u>C. tropicalis</u> $ade^-$ <u>C. albicans</u> $lys^-$ +	$5 \cdot 10^{-6}$
<u>C. tropicalis</u> $ade^- met^-$ <u>C. albicans</u> $lys^-$ +	$2,4 \cdot 10^{-6}$
<u>C. tropicalis</u> $ade^-$ + <u>C. albicans</u> $met^-$	$8 \cdot 10^{-6}$

3. táblázat

3. A fúziós termékek analízise /C. tropicalis ade<sup>-</sup> + C. albicans lys<sup>-</sup>/

Az első fúziós telepek a 6 - 10. nap között jelentek meg.

Telep és sejt morfológia

Kiindulási partnereinket telepszínük alapján tudtuk megkülönböztetni: a C. tropicalis telepei az adenin auxotrófia miatt pirosak voltak, a C. albicans-é pedig fehérek. A fúzió következményeként megjelenő hibridtelepek a szelektáló minimál táptalajon szintén fehérek. A sejtek alakja a legtöbb törzsnél élesztőszerű, tojásdad, bár egyes fúziós termékek sejtjei pseudomicéliumokat is fejlesztettek.

A fúziós termékek stabilitása

A szelekciós minimál táptalajon megjelenő telepeket azonnal friss minimálra oltottuk át. Az izolátumok 10 %-a nem szaporodott tovább, nem volt életképes. A megmaradó 90 %-át a stabilitásuk alapján 3 csoportba tudtuk osztani:

A típus: Komplet t áptalajon állandó szegregációt mutató fúziós termékek

/7. kép/

A telepek túlnyomó többsége /60-80 %/ fehér, 15-30 %-a

- piros szektoros, illetve 1-2 %-ban kizárólag piros.
- Ha a piros telepekről komplett táptalajra szélesztünk, majd minimálra, ill. adeninnel, lizinnel, valamint adeninnel és lizinnel kiegészített táptalajra replikázunk, minden telepet adenin auxotrófnak találunk /C. tropicalis sajátság/.
  - Ha a szektoros telepekkel végezzük el ugyanezt a vizsgálatot, a komplett táptalajon mintegy 70 %-ban fehér telepeket, 10 %-ban szektoros, 20 %-ban pedig piros telepeket nyerünk. A fehér telepek prototrófok, a szektorosokból a fehér rész minimálisan szaporodni tud, szintén prototróf, a piros szektor és a piros telepek adenin auxotrófok.
  - Ha a komplett táptalajon eredetileg nagy fehér telepeket szélesztjük, szintén komplett tápagarra, akkor a kifejlődő telepek 90-95 %-a fehér, prototróf, 5-10 %-a továbbra is szegregáló, piros szektoros. /Ez az arány 1 éves intenzív tenyésztés során csökken, de szektoros telepek még mindig előfordulnak./

Minimál táptalajon tenyésztve ezt a típusú fúziós terméket, semmiféle szegregációt nem tapasztalunk, a növekedés intenzitása pedig megegyezik vagy gyorsabb a



C. tropicalis vad típusú törzsével, bár a telepnagyság igen heterogén.

Már a szelekciós táptalajról megtörtént az egy sejtben levő magok számának meghatározása. Metilénkéssel történő festés alapján minden egyes hibridsejtben csak egy magot találunk. /6. kép/

/A gombák DNS tartalma csak néhányszorosa a baktériumok DNS tartalmának. Ez a viszonylag kis genom is több kromoszóma között oszlik meg, vagyis a kromoszómák olyan kicsik, hogy fénymikroszkóppal nem, vagy csak nehezen vizsgálhatók, ezért kariológiai analízist a legtöbb gomba esetében nem lehet végezni./

Mivel a fúziós termékeink nem több magvuak, nem heterokarionok, a komplett táptalajon való szegregáció ezen hibrid típus erőteljes instabilitását jelzi. Csak a szelektív minimálisan stabilak, de amint a "táplálkozási" kényszerítő erő megszűnik és a komplementáció tovább már nem szükséges, azonnal szegregálnak auxotróf és prototróf sejtekké. Minden esetben csak az egyik partner, a C. tropicalis adenin markerét találjuk meg, a lys hiányos C. albicanst sohasem, annak ellenére, hogy az auxotróf sejtek dúsitását csigaenzimmal is elvégeztük.

B típus: Komplet táptalajon nem szegregáló, stabil fúziós termek /8. kép/

Az előző tipussal ellentétben mind minimlon, mind pedig a megfelelő aminosavakkal kiegészített minimlon stabilak, többszöri átoltás után is. Növekedés intenzitásuk vagy megegyezik a szülőkével, vagy néhány esetben annál lassúbb. Pszeudomiclium képzést sem figyelhetünk meg optimális tenyésztési körülmények között annak ellenére, hogy megfelelő táptalajon /burgonyás-glükózos v. kukoricalisztes agar/ erre knyszerithetk. /Az A típusban optimális tenyésztés során is előfordult pszeudomiclium ill. valódi micélium képzés/. Hosszú idejű /1 v/ tenyésztés során a hibridek 20 %-ban a partnerek auxotróf markerei megjelnek. Megfestssel mindenütt csak egy magot találtunk sejtenként.

C típus: A kezdetben prototróf sajátságukat néhány átoltás után elveszt fúziós hibridek

Ebbe a csoportba sorolható a fúziós termek azon 10 %-a, melyben a prototrfia már a szelektálás utáni els toltskor megsznt.

Ez a csoport kezdetben /1-2 átoltás után/ a B típusba tartozott, de további tenyésztés során vagy a C. albicans lys<sup>-</sup> törzsét vagy a C. tropicalis ade<sup>-</sup> markeres törzsét tudtuk csak fenntartani.

Sejt térfogat és DNS tartalom:

A szülői törzsek és a fúziós termékek sejtjeinek nagyságát, térfogatát az "Anyag és módszerek" c. fejezetben leírtak alapján mértük, illetve számítottuk ki.

Az eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

Fúziós termék	Sejthossz /u	szélesség /u	térfogat /u <sup>3</sup>	DNS tart/sejt fg
C. tropicalis ade <sup>-</sup>	7,62±0,53	5,84±0,64	135,9	70,4
C. albicans lys <sup>-</sup>	7,04±0,47	5,40±0,53	107,4	61,7
3	-	-	-	104,1
A típus				
R	-	-	-	98,6
4	7,58±0,52	5,79±0,61	132,9	74,0
8	7,25±0,58	5,91±0,62	132,3	79,2
10	7,36±0,53	5,80±0,60	129,5	74,8
11	7,08±0,56	5,97±0,68	132,05	71,3
B típus				
12	7,84±0,60	5,96±0,64	145,7	95,1
14	7,71±0,51	5,61±0,58	126,1	78,5
20	7,33±0,56	5,72±0,43	124,6	73,6
22	7,12±0,45	5,45±0,47	110,14	69,7

5. táblázat

Az A típusba tartozó sejtek nagyságát nem mértük az intenzív pszeudomicélium képzés miatt. Ilyenkor ugyanis a sejtek alakja nem szabályos, ezért térfogat számolást nem végezhetünk. A B tipushoz tartozó hibrid sejtek alakja csaknem szabályos ellipszoid, így a térfogat számítás elvégezhető. Mint az 5. táblázatból látható, a hibridsejtek térfogata nem különbözik lényegesen a két partnerétől. /Irodalmi adatok szerint diploid sejtek képződése esetén térfogatonövekedés várható [9,13,20,23] ./

Élesztősejtek esetében a ploiditás mértékének meghatározására elfogadott módszer az egy sejtre vonatkoztatott DNS mennyiségi megállapítása. Diploid kromoszóma garnitúra esetén kétszer annyi, triploid állapotban háromszoros, stb. az egy sejtre vonatkoztatott DNS mennyisége [49]. Fúziós termékeink vizsgálata során meghatároztuk a két szülő, valamint a különböző hibridek 1 sejtre jutó DNS tartalmát /5. táblázat/.

Az A típusú hibridek mind a C. tropicalis, mind a C. albicans partnernél magasabb DNS tartalommal rendelkeznek. A B típusú hibridekben a C. tropicalis partnerhez közeleső, szignifikánsan nem különböző értékeket mértünk.

Cukor asszimilációs és erjesztési spektrumok vizsgálata

Mint azt már az előző fejezetekben említettük, az élesztők egyik igen jellegzetes sajátossága az, hogy szénforrásként mely cukrokat képesek felhasználni asszimilációval, illetve anaerob körülmények közötti erjesztéssel. Ma már több mint harminc féle cukrot, illetve egyéb szénforrást tesztelnek a teljes spektrum megállapításához. Kísérleteink során először meghatároztuk a C. albicans és C. tropicalis spektrumát, majd a fúziós termékek tesztelése következett.

Eredményeinket a 6. táblázat tartalmazza.



C-forrásként hasznosított szénhidrátok	C. albicans lys <sup>-</sup>	C. tropicalis ade <sup>-</sup>
D-glukóz	3	3
galaktóz	3	3
szaharóz	3	3
maltóz	3	3
laktóz	0	0
rafinóz	0	0
melibióz	0	0
fruktóz	3	3
mannóz	2	2
L-szorbóz	0	1
L-ramnóz	0	0
D-xilóz	2	2
L-arabinóz	0	0
D-arabinóz	0	0
D-ribóz	0	0
cellobióz	0	1
arbutin	0	1
szalicin	0	1
α-Me-glukozid	3	3
trehalóz	3	3
melecitóz	0	2
keményítő	2	2
inulin	0	0
etanol	2	2
glicerol	2	2
eritritol	0	0
adonitol	0	2
mannitol	3	3
szorbitol	2	2
inozitol	0	0
laktát	1	1
szukcinát	1	1
fumarát	0	0
malát	0	0
citrát	0	0
tartarát	0	0
mezotartarát	0	0
malonát	0	0
glukuronát	0	0

A 7. táblázatban a fermentációs spektrumot tüntettük fel.

Szénforrás	fermentáció	
	C.albicans lys <sup>-</sup>	C.tropicalis ade <sup>-</sup>
glukóz	3	3
galaktóz	3	3
szacharóz	0	3
maltóz	3	3
laktóz	0	0
rafinóz	0	0
melibióz	0	0

7. táblázat

A 8. táblázat a partnerek asszimilációs és fermentációs spektruma közti jelentősebb különbségeket és az A és B típusba tartozó néhány hibrid szénforrás hasznosítását mutatja.

Törzs	Asszimilációs különbségek		Fermentációs
	melecitóz	adonit	szacharóz
<i>C. albicans</i> lys <sup>-</sup>	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> ade <sup>-</sup>	2	2	3
F3	2	2	3
A típus			
R	2	2	3
4	2	2	3
8	2	2	3
10	2	2	3
11 B típus	0	0	0
12	2	2	3
13	2	2	3
14	0	1	0
20	2	2	3
22	0	0	0

8. táblázat

Amint az adatokból kitűnik, az A típusú hibridek mind asszimilációs, mind pedig fermentációs képességükben a C. tropicalis-hoz hasonlóak. A B típus jelentősebb része szintén a C. tropicalis sajátosságaival rendelkezik, míg a 11-es és a 22-es törzs a C. albicans spektrumának megfelelően hasznosítja a szénhidrátokat.

Mitotikus szegregáció indukálása haploidizáló szerekkel

Diploid élesztősejtekből haploidizációt indukáló vegyületekkel aneuploid, esetleg haploid sejteket nyerhetünk vissza. A haploidizáló szerek nagy része mitotikus szegregációt /mitotikus crossing-overt, génkonverziót és kromoszómális "non-disjunctio"-t/ okoz, amely spontán is előfordul, kis gyakorisággal /50-56/.

Kísérleteink során négy különböző vegyületet teszteltünk. Haploidizáció indukálására azt a vegyületet választottuk ki és olyan koncentrációban, amely már erősen gátolja a növekedést, de még lehetővé tesz néhány sejtosztódást. Az egyes ágenseknek a különböző törzsekre vonatkozó kritikus koncentrációját a 9. táblázatban foglaltuk össze.

Törzsek	Kritikus koncentráció /mg/ml/			
	akriflavin	p-fluorofenil-alanin	benomyl	klorálhidrát
C.tropicalis ade <sup>-</sup>	0,3	-	-	5
C.albicans lys <sup>-</sup>	1,0	0,1	-	5
F3	0,3	-	-	5
F11	0,8	0,3	-	5

9. táblázat

Haploidizáló szerként a továbbiakban az 5 mg/ml koncentrációjú klorálhidrátot használtuk fel.

Az A típusú hibridek haploidizáció indukálása nyomán csaknem 100 %-ban visszanyertük a C. tropicalis adenin markeres törzsét /9. kép/. A B típusból főleg csak a C. tropicalis adenin auxotrófiáját, de egyes törzsekből a C. albicans lizin auxotrófiáját kaptuk vissza /10. táblázat/ /10. kép/.

Törzsek	Tesztelt te- lepek száma	Prototróf	Auxotróf ade <sup>-</sup>	lys <sup>-</sup>
3	1267	1,4 %	98,6 %	-
R A típus	1328	0,8 %	99,2 %	-
4	1947	95,5 %	4,5 %	-
8	1296	94,9 %	5,1 %	-
11 B típus	1730	92,1 %	-	7,9 %
12	1466	86,2 %	13,8 %	-
20	226	78,0 %	22,0 %	-
22	544	97,0 %	-	3,0 %

10 . táblázat

#### A mag és mitokondriális DNS szeparálása

Az élesztő sejt citoplazmájában lévő kétféle DNS molekulát eltérő denzitásuk alapján izopiknikus CsCl



gradiensén szét tudjuk választani és a nukleinsavakhoz szelektíven kötődő UV fényben fluoreszkáló festékekkel láthatóvá tudjuk tenni. Ezt a módszert elsősorban Saccharomyces cerevisiae DNS-ének szeparálására írták le [44]. Megpróbáltuk az általunk vizsgált partnerek és fúziós termékek nukleinsavainak elválasztását ezzel a módszerrel. Mint az a 3. ábráról látható, a DNS szétválasztása nem sikerült, valószínűleg a nagyon kicsiny denzitás különbségek miatt.



3. ábra

### Izoenzim vizsgálatok

Az izoenzim vizsgálatok alkalmat adnak különböző fajok azonos funkciójú enzimeinek összehasonlítására. A homológ enzimek szerkezetében a fejlődés során változások történnek, és így az izoenzim elektroforetikus mobilitása eltérő az egyes fajokban.

A Candida albicans és C. tropicalis esetében lényeges különbséget találtunk az aspecifikus észterázok izozim mintázatában. A Candida albicans vad és mutáns, a C. tropicalis vad és mutáns törzseit, valamint a fúziós termékek közül minden csoport egy-egy reprezentánsát vizsgáltuk meg. A futtatás eredményét a 4. ábra mutatja.



4. ábra



A vad C. albicans és a mutáns 5 izozimmel, a vad C. tropicalis és a mutáns 3 izozimmel rendelkezik. Az Rf értékek:

<u>C. albicans</u> 562 T:	0,22	0,31	0,50	0,69	0,83	12. sáv
<u>C. albicans</u> lys <sup>-</sup> :	0,22	0,31	0,50	0,69	0,83	13. sáv
<u>C. tropicalis</u> 94 T:	0,52	0,69	0,91			11. sáv
<u>C. tropicalis</u> ade <sup>-</sup> :	0,52	0,69	0,91			14. sáv

A fúziós termékek izozim mintázata megegyezik annak a partnernek a mintázatával, amelyikre spontán /F3 - C. tropicalis ade<sup>-</sup>/ vagy indukáltan /F18 - C. albicans lys<sup>-</sup>/ szegregál. Új észteráz típus megjelenését vagy észterázok keveredését nem tapasztaltuk. Egyéb enzimek /ADH, LDH, MDH/ gélelektroforetikus vizsgálata folyamatban van.

#### 5. Intraspecifikus fúzió /C. albicans lys<sup>-</sup> + C. albicans met<sup>-</sup>/

Az inter- és intraspecifikus fúziók összehasonlítása céljából a C. albicans lys és met auxotróf törzseit is fuzionáltattuk.

A legfontosabb adatok:

Back-mutáció gyakorisága:

C. albicans lys<sup>-</sup>:  $10^{-7}$

C. albicans met<sup>-</sup>:  $5 \times 10^{-7}$

Regenerációs ráta /0,3 M CaCl<sub>2</sub>, 0,6 M KCl/: 45 %

Komplementációs gyakoriság:  $3-5 \times 10^{-3}$

Az első fúziós telepek már a 3-4. napon megjelentek. A telepeket izolálva, 5-10 %-uk nem tenyészik tovább minimál tápközegben /valószínűleg azonnal szegregál a szülői törzsekre /. Magfestés során 2-3 magnál többet egyetlen sejtben sem találtunk, viszont 2-3-szori átoltás után már csak 1 magvú sejteket láttunk. A fúziós termékek spontán szegregációját vizsgálva 8 izolátumban 4-73 % met auxotróf és prototróf /F 2, 3, 4, 10, 12, 15, 18/, 2 izolátumban 5-8 % met<sup>-</sup>, 2-5 % lys<sup>-</sup> és prototróf /F 13, 19/, valamint 5 izolátumban kizárólag prototróf telepeket /F 5, 6, 8, 16, 14/ találtunk. A prototróf telepek további analizisével csak az első csoportban figyelhettünk meg újabb spontán szegregációt /20-50 % met<sup>-</sup>/.

A szülői törzsek és a fúziós termékek 1 sejtre vonatkoztatott DNS tartalmát a 12. táblázatban összegeztük:

TÖRZS	fg DNS/sejt	
F 4	82	
F 10	85	
F 12	87	
F 13	<u>C. albicans</u> lys <sup>-</sup>	75
F 19		79
F 8	<u>C. albicans</u> met <sup>-</sup>	71
F 14		74
F 16		77

12. táblázat

A fúziós termékek mindegyike magasabb DNS tartalommal rendelkezik, mint bármely szülői partner, de a kettő összegét sohasem érik el.

Klorálhidráttal indukált haploidizációval mindkét auxotróf partnert valamint prototróf egyedeket nyertünk vissza. /13. táblázat/ Mivel mindkét szülői sajátságot megtaláltuk a fúziós termékek 1 magvú utódai között, bizonyítékunk van arra, hogy az átmeneti heterokarion állapot után kariogámia is lejátszódott és valószínűleg diploid, esetleg magasabb ploiditású termékeket nyertünk.

TÖRZSEK	Tesztelt te- lepek száma	Prototróf	met <sup>-</sup>	Auxotróf lys <sup>-</sup>	met <sup>-</sup>	lys <sup>-</sup>
F 4	1106	25 %	65 %	25 %	-	-
F 10	975	15 %	58 %	27 %	-	-
F 12	783	30 %	56 %	14 %	-	-
F 13	953	48 %	30 %	22 %	-	-
F 19	1064	57 %	19 %	24 %	-	-
F 8	1137	29 %	33 %	38 %	-	-
F 14	1201	22 %	40 %	38 %	-	-
F 16	985	32 %	37 %	31 %	-	-

13. táblázat



### ÖSSZEFOGLALÁS

Candida albicans és Candida tropicalis különböző auxotróf mutánsainak sikeres fúzióját valósítottuk meg. Protoplasztokat fiatal logaritmikus tenyésztési fázisú sejtekből képeztünk 1,5 %-os csigaenzim segítségével 0,7 M-os KCl oldatban. Fúziót PEG 30 %-os oldatában,  $\text{Ca}^{2+}$  ionok jelenlétében indukáltunk. A fúziós gyakoriság  $2-8 \cdot 10^{-6}$  volt. A hibrid sejtek telep és sejt morfológiában, a sejtek térfogatában a szülői partnerekhez hasonlítottak. Minden fúziós termékünk sejtenként egy magot tartalmazott, a DNS mennyisége csak alig néhány esetben volt lényegesen magasabb a C. albicans ill. C. tropicalis-énál. A termékeket stabilitás szempontjából három csoportba tudtuk sorolni. A típus: a megfelelő aminosavakkal kiegészített minimál táptalajon állandó, spontán szegregációt mutató hibridek, amelyekből mindig a C. tropicalis adenin igényes partnere hasadt ki. A növekedés intenzitása, egy sejtre vonatkoztatott DNS mennyisége meghaladta a szülői értékeket, cukor asszimilációs spektrumokban megegyeztek a C. tropicalis-szal. Haploidizáló szerekkel csaknem 100 %-ban adenin auxotróf telepeket nyertünk vissza. Mivel ebben a

tipusban is sejtenként csak egy mag van, lehetséges, hogy ezek a termékek C. tropicalis sejt kromoszóma készletét, vagy annak egy-egy részét és a C. albicans azon kromoszómáját, vagy kromoszóma darabját tartalmazzák, amely az adenin auxotrófiát megszünteti.

B típus: kiegészített minimál táptalajon stabil fúziós termékek. Sejttérfogat, az 1 sejtben levő DNS mennyiség vagy a C. tropicalis vagy a C. albicans értékeihez hasonló. Ugyanez vonatkozik a cukor asszimilációs és fermentációs képességre. A termékek mitotikus szegregációjának indukálásával vagy csak az egyik, vagy csak a másik partner auxotróf markerét kaptuk vissza. Kb. 1 éves tenyésztés során ez típus 20 %-a is spontán visszaalakul /késői kromoszóma elimináció/.

C típus: néhány átoltás után instabillá váló termékek. Szintén egy magvú hibridek, amelyek növekedés intenzitását kezdetben valamelyik partner auxotrófiáját kielégítő aminosavak stimulálják, de 1-2 átoltás után vagy a C. albicans-szá vagy a C. tropicalis-szá alakulnak vissza, amit cukor asszimilációs spektrumuk is bizonyít /korai kromoszóma elimináció./

A kísérletek eredményei alapján kijelenthetjük, hogy fúziós termékeink "aneuploid" szervezetek voltak,

amelyek 1 magon belül valamelyik partner teljes kromoszómakészletét és a másik partner egy vagy néhány kromoszómáját tartalmazták. Ezt a kromoszómát többségük szelektív táptalajon hosszú ideig meg tudta tartani.

A bevezető részben már említettük, hogy a C. albicans és a C. tropicalis egymáshoz igen közel álló fajok. Elkülönítésük mindössze néhány morfológiai /C. albicans klamidospóra képzése/, és fiziológiai-biokémiai kritériumon /melezítő asszimiláció, szacharóz fermentáció/ alapszik. Az intra- és interspecifikus protoplaszt fúzió további megerősítését adhatja a fenti állításnak: Irodalmi adatokból /19,20 /ismert, hogy a C. tropicalis intraspecifikus fúziójával 7-8 magvú heterokarionok jönnek létre, igen nagy komplementációs gyakorisággal / $10^{-3}$ /. A C. albicans intraspecifikus fúzióját hasonló technikával, hasonló gyakorisággal tudtuk indukálni. /Ez a nagyságrend megegyezik az éllesztő gombák körében elérhető gyakorisággal./ A termékek szintén többmagvú heterokarionok voltak, amelyek igen gyorsan egymagvúakként stabilizálódtak. A két faj közötti komplementációs gyakoriság három nagyságrenddel csökkent / $10^{-6}$ /, a fúziós termékek pedig csak egy maggal rendelkeztek, amely bármelyik partnertől származhatott. Azaz a kétféle eredetű mag nem tudott egymás mellett funkcionálni, csak

az életben maradásukhoz szükséges kromoszómarészek maradtak meg. Ahhoz, hogy idegen eredetű DNS-ek hibridizálódhassanak, a köztük/ legalább egyes szakaszokon/ erős homológiának kell lennie, ami ritkán fordulhat elő két elég távol álló faj esetén, még akkor is, ha ugyanazon funkciót irányító génszakaszokról van is szó. Kapcsolódásuk emiatt labilis lehet, vagy az idegen eredetű DNS szakasz a genom más-más részébe beépülve másféleképpen működhet, másképpen fejti ki hatását. Az, hogy bármelyik partner képes volt a másikkal való részleges kiegészülésre, jelezheti, hogy tulajdonképpen valamilyen mérvű rokonság fennállhat. /Egymástól igen távol álló gomba fajok között "Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae" életképes hibridek nem is nyerhetők./

Eredményeink alapján megkockáztathatjuk: C. tropicalis = Syringospora tropicalis ?



## IRODALOM

1. Ferenczy, L., Zsolt, J. and Kevei, F. /1972/  
Forced heterokaryon formation in auxotrophic Geotrichum strains by protoplast fusion.  
In Third International Protoplast Symposium on Yeast Protoplasts, p. 74. October 2-5, 1972, Salamanca, Spain: Abstracts
2. Ferenczy, L., Zsolt, J. /1974/  
Fusion of fungal protoplasts. Nature /London/ 248, 793-794
3. Kao, K.N. and Michayluk, M.R. /1974/  
A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta /Berl/ 115, 355-367
4. Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M. /1975/  
Increased fusion frequency of Aspergillus nidulans protoplasts Experientia 31, 50-52
5. Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi M. /1975/  
High-frequency fusion of fungal protoplasts Experientia 31, 1028-1030
6. Solingen van, P., Plaat van der, J.B. /1977/  
Fusion of yeast spheroplasts. Journal of Bacteriology, 130, 946-947
7. Yamamoto, M. and Fukui, S. /1977/  
Fusion of yeast protoplasts. Agricultural and Biological Chemistry, 41, 1829-1830
8. Svoboda, A. /1978/  
Fusion of yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. Journal of General Microbiology, 109, 167-175



9. Maráz, A., Kiss, M. and Ferenczy, L. /1978/  
Protoplast fusion in Saccharomyces cerevisiae  
strains of identical and opposite mating types  
FEMS Letters, 3, 319-322.
10. Kawakami, N., Mondo, H., and Kawakami, H. /1978/  
Protoplast fusion of Saccharomyces cerevisiae  
optimal procedures and morphological evidences  
Transactions of Micrological Society of Japan  
19, 181-187
11. Gunge, N. and Tamaru, A. /1978/  
Genetic analysis of products of protoplast fusion  
in Saccharomyces cerevisiae. Japanese Journal of  
Genetics, 53, 41-49
12. Sipiczki, M. and Ferenczy, L. /1977/  
Protoplast fusion of Schizosaccharomyces pombe  
auxotrophic mutants of identical mating-type  
Molecular and General Genetics, 151, 77-81
13. Sipiczki, M. and Ferenczy, L. /1977/  
Fusion of Rhodospiridium /Rhodotorula/ protoplasts  
FEMS Letters, 2, 203-205
14. Becher, D. and Böttcher, F. /1980/  
Hybridization of Rhodospiridium toruloides by  
protoplast fusion. In Advances in Protoplast Research  
/eds: Ferenczy, L. and Farkas, G./ pp: 105-113  
Akadémia Kiadó, Budapest and Pergamon Press, Oxford
15. Stahl, U. /1978/  
Zygote formation and recombination between like mating  
types in the yeast Saccharomycopsis lipolytica by  
protoplast fusion. Molecular and General Genetics,  
160, 111-113

16. Spata, L. and Weber, H. /1980/  
A study on protoplast fusion and parasexual hybridization of alcañe utilizing yeasts.  
In Advances in protoplast research /eds: Ferenczy, L. and Farkas, G./ pp: 131-139  
Akadémia Kiadó, Budapest and Pergamon Press, Oxford
17. Savchenko, G. V. and Kapultsevich, Yu. G. /1980/  
Hybridization of yeast from genus Hansenula by protoplast fusion. In Advances in protoplast research /eds: Ferenczy, L. and Farkas, G./ pp: 125-131
18. Klinner, U., Böttcher, J. and Samsonova, A. /1980/  
Hybridization of Pichia guilliermondii by protoplast fusion. In Advances in protoplast research /eds: Ferenczy, L. and Farkas, G./ pp: 113-119
19. Fournier, P., Provost, A., Bourguignon, C., and Heslot, M. /1977/ Recombination after protoplast fusion in the yeast Candida tropicalis. Archives of Microbiology 115, 143-149.
20. Vallin C. and Ferenczy L. /1978/  
Diploid formation of Candida tropicalis via protoplast fusion. Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 25, 209-212
21. Ferenczy, L., and Maráz, A. /1977/  
Transfer of mitochondria by protoplast fusion in Saccharomyces cerevisiae. Nature, /London/ 268, 524-5
22. Morgan, A.J. Heritage, H. and Whittaker, P.A. /1977/  
Protoplast fusion between petite and auxotrophic mutants of the petite-negative yeast, Kluyveromyces lactis. Microbios Letters 4, 103-107

23. Allmark, B.M., Morgan, A.J. and Whittaker, P.A. /1978/  
The use of protoplast fusion in demonstrating chromosomal and mitochondrial inheritance of respiratory-deficiency in Kluyveromyces lactis, a petite-negative yeast. Molecular and General Genetics 159, 297-299
24. Morgan, A.J., Hall, J.L., Brunner, A. and Whittaker, P.A. /1980/  
Protoplast fusion in the study of mitochondrial genes in the petite-negative yeast, Kluyveromyces lactis in: Advances in Protoplast Research /eds: Ferenczy, and Farkas, G./ pp. 93-98
25. Spencer, J.F.T., Land, P. and Spencer, D.M. /1980/  
The use of mitochondrial mutants in the isolation of hybrids obtained by fusion of protoplasts of brewing yeasts. in: Advances in Protoplast Research /eds: Ferenczy, L. and Farkas, G./ pp. 145-150
26. Provost, A., Bourguignon, C., Fournier, P., Ribet, A.M. and Heslot, M. /1980/  
Intergeneric hybridization in yeast through protoplast fusion. FEMS Letters, 3, 309-312
27. Whittaker, P. A., and Leach, S.M. /1978/  
Interspecific hybrid production between the yeasts Kluyveromyces lactis and Kluyveromyces fragilis by protoplast fusion. FEMS Letters, 4, 31-34
28. Sipiczki, M. /1979/  
Interspecific protoplast fusion in fission yeasts Current Microbiology, 3, 37-40



29. Svoboda, A. /1980/  
Intergeneric fusion of yeast protoplasts: Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe  
pp: 119-124 in: Advances in Protoplast Research
30. van der Walt, J.P. /1967/  
Sexually active strains of Candida albicans and Cryptococcus albidus. Antonie van Leeuwenhoek, 33  
246-256
31. Sukroongreung, S. and Rodrigues de Miranda, L. /1973/  
A new aspect of the life cycle of Candida tropicalis  
Antonie van Leeuwenhoek, 39: 65-80
32. Lodder, J. /1970/  
The yeasts - a taxonomic study  
North - Holland Publishing Co., Amsterdam, London.
33. Hasenclever, H.F., Mitchell, W.O. and Loewe, J. /1961/  
Antigenic studies of Candida II. Antigenic relation  
of Candida albicans group A and B to Candida stellatoidea and Candida tropicalis.  
Journal of Bacteriology, 82, 574-577
34. Fraser, E.W. /1977/  
Serological studies on twelve species of Candida  
Mycopathologia, 61, 179-182
35. Guinet, R., Gabriel, S., Oriez, F., and Bonaly, R. /1979/  
Specific soluble cell wall antigens of Candida albicans demonstrated by crossed immunoelectrophoresis  
Annales de Microbiologie /Inst. Pasteur/ 130, 433-443

36. Montrocher, R. /1980/  
Significance of immunoprecipitation in yeast taxonomy: antigenic analyses of some species within the genus Candida. Cellular and Molecular Biology, 26, 293-303
37. Stenderup, A. and Leth Bak, A. /1968/  
Deoxyribonucleic acid base composition of some species within the genus Candida. Journal of General Microbiology, 52, 231-236
38. Segal, E. and Eylan, E. /1974/  
Genetic relatedness of Candida albicans to asporogenous and ascosporegenous yeasts as reflected by nucleic acid homologies. Microbios 9, 25-33
39. O'Connor, R.M., McArthur, C.R. and Clark-Walker, D.G. /1975/. Closed-circular DNA from mitochondrial-enriched fractions of four petite-negative yeasts. European Journal of Biochemistry, 53, 137-144
40. Clark-Walker, G.D. and Miklós G.L. /1974/  
Mitochondrial genetics, circular DNA and the mechanism of the petite mutation in yeast Genetical Research Cambridge, 2, 43-52
41. Odds, F.C. and Triyillo-Gonzales, A. /1974/  
Acid phosphatase levels in the genus Candida and their application to the taxonomy and identification of pathogenic Candida species Sabouraudia, 12, 287-294



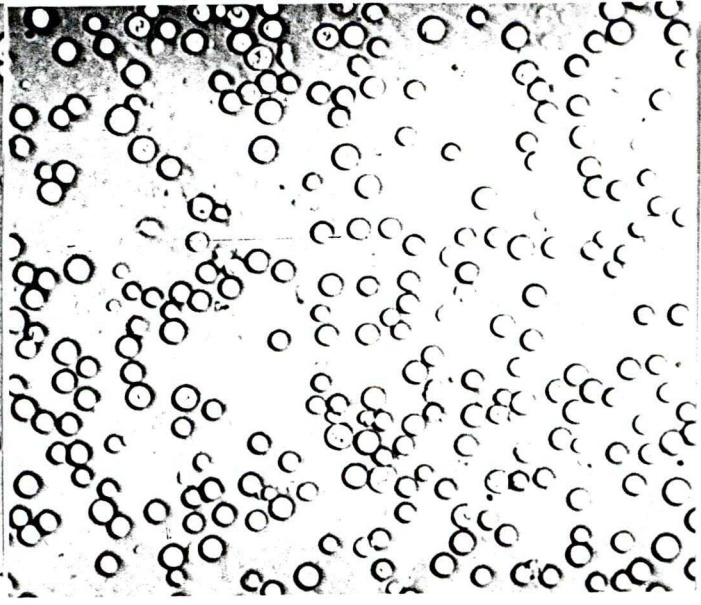
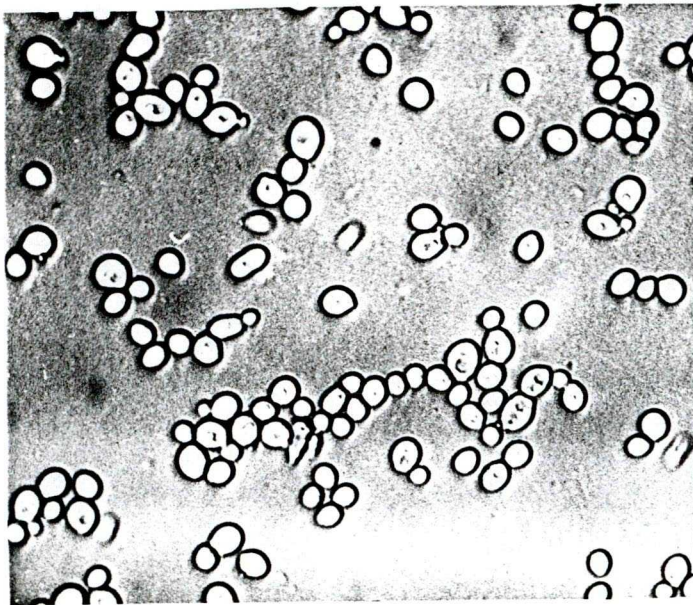
42. Rudek, W. /1978/  
Esterase activity in Candida species  
Journal of Clinical Microbiology, 8, 756-759
43. Burton, K. /1956/  
A study of the conditions and mechanism of the  
diphenylamine reaction for the colorimetric esti-  
mation of deoxyribonucleic acid.  
Biochemical Journal, 62, 315-333
44. Giles, K.W., Myers, A. /1965/  
An improved diphenylamine method for the estimation  
of deoxyribonucleic acid.  
Nature, /London/ 206, 93
45. Williamson, D.H. and Fennell, D.J. /1975/  
The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting  
and separating yeast mitochondrial DNA  
in: Methods in Cell Biology XII. /eds. Prescott, D.M./  
pp: 335-344  
Academic Press, New York, San Francisco, London
46. Brewer, G.J. and Sing, C.F. /1970/  
An introduction to isozyme techniques.  
Academic Press, New York San Francisco, London
47. Deák, T. and Novák, E.K. /1968/  
Formation and regeneration of protoplasts in the  
genus Candida. In Yeast Protoplasts  
/O.Nečas and A.Svoboda eds./ p: 217-223  
Proceedings of the Second International Symposium  
on Yeast Protoplasts, Brno, August 20-23, 1968

48. Hann, J.W., Heintz, C.E., Mac Millan, J.D. /1972/  
Yeast spheroplasts formed by cell wall degrading  
enzymes from Oerskovia sp  
Journal of Bacteriology, 111, 821-824
49. Necas, O., Svoboda, A. /1967/  
Relation between the biosynthesis of the cell wall  
and regeneration in yeast.  
In Müller R. /eds/ Symposium über Hefeprotoplasten  
Akademie-Verlag, Berlin pp. 67-72
50. Olaiya, A.F. and Sogin, S.J./1979/  
Ploidy determination of Candida albicans  
Journal of Bacteriology, 140, 1043-1050
51. Lhoas, P. /1961/  
Mitotic haploidization by treatment of Aspergillus  
niger diploids with para-fluorophenylalanine  
Nature /London/, 190, 744
52. Gutz, M. /1966/  
Induction of mitotic segregation with p-fluorophenyl-  
alanine in Schizosaccharomyces pombe  
Journal of Bacteriology, 92, 1567-1568
53. Lhoas, P. /1968/  
Growth rate and haploidization of Aspergillus niger  
on medium containing p-fluorophenylalanine  
Genetical Research, 12, 304-315
54. Hastie, A.C. /1970/  
Benlate induced instability of Aspergillus diploids  
Nature, /London/, 226, 771

55. Kappas, A. Georgopoulos, S.G. and Hastie, A.C. /1974/  
On the genetic activity of benzimidazol and  
thiophanate fungicides on diploid Aspergillus  
nidulans. Mutation Research, 26, 17-27
  
56. Davies, P.J., Evans, W.E. and Parry, J.M./1975/  
Mitotic recombination induced by chemical and  
physical agents in the yeast Saccharomyces cerevisiae.  
Mutation Research, 29, 301-314
  
57. Singh, M. and Sinha, U. /1976/  
Chloral hydrate induced haploidization in Aspergillus  
nidulans  
Experientia, 32, 1144-1145

FÜGGELÉK

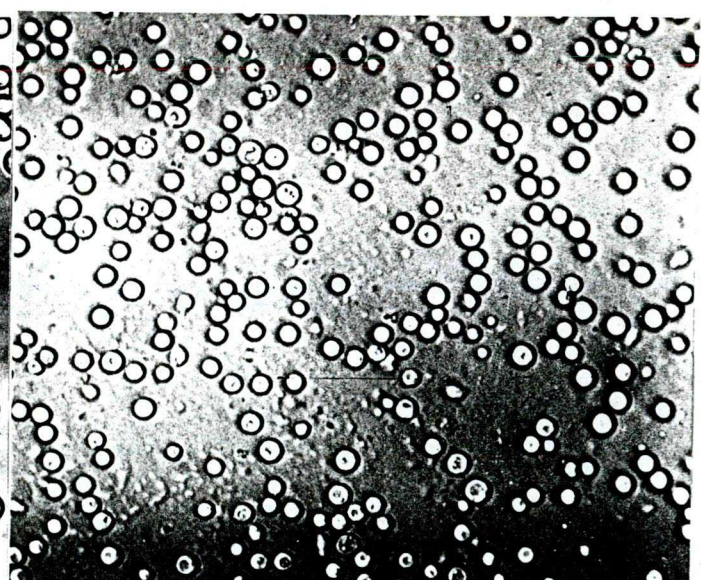
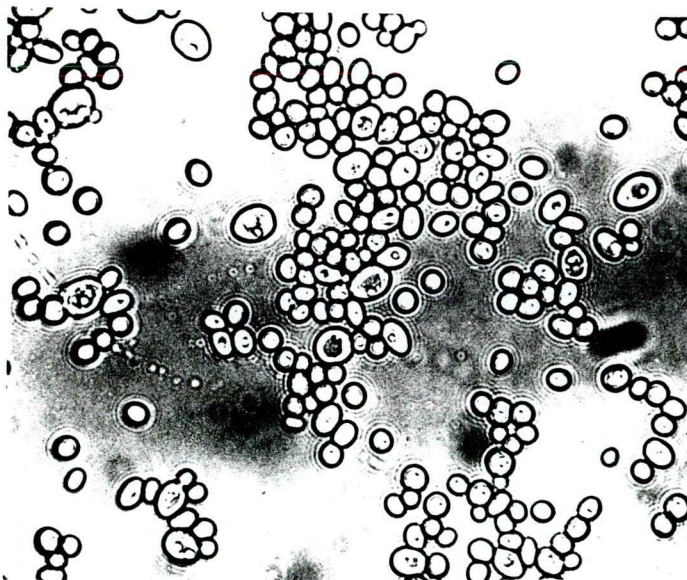




1. kép:  
C. albicans intakt sejtek

kb: 640x-es nagyítás

2. kép:  
C. albicans protoplasztok

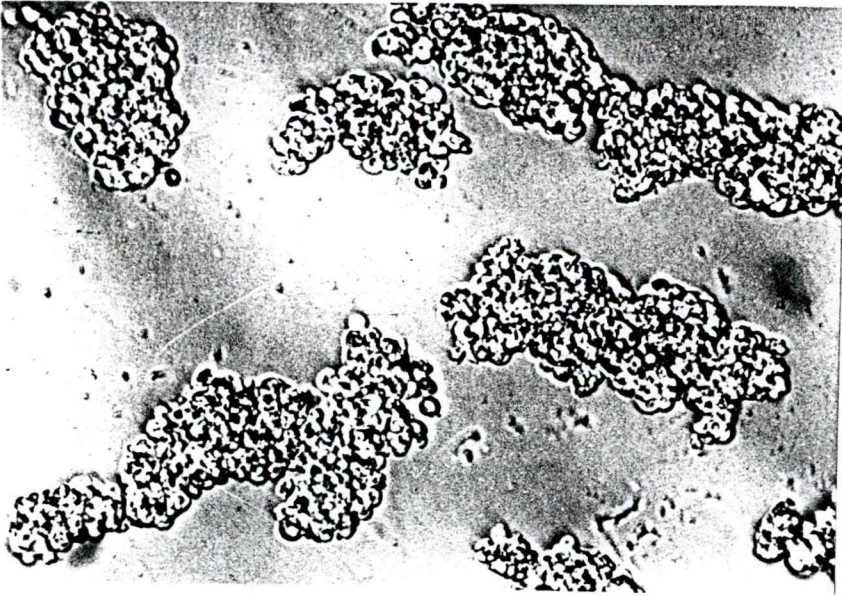


3. kép:  
C. tropicalis intakt sejtek

kb: 640x-es nagyítás

4. kép :  
C. tropicalis protoplasztok





5. kép : C. albicans és C. tropicalis protoplasztok  
PEG -gel indukált aggregációja

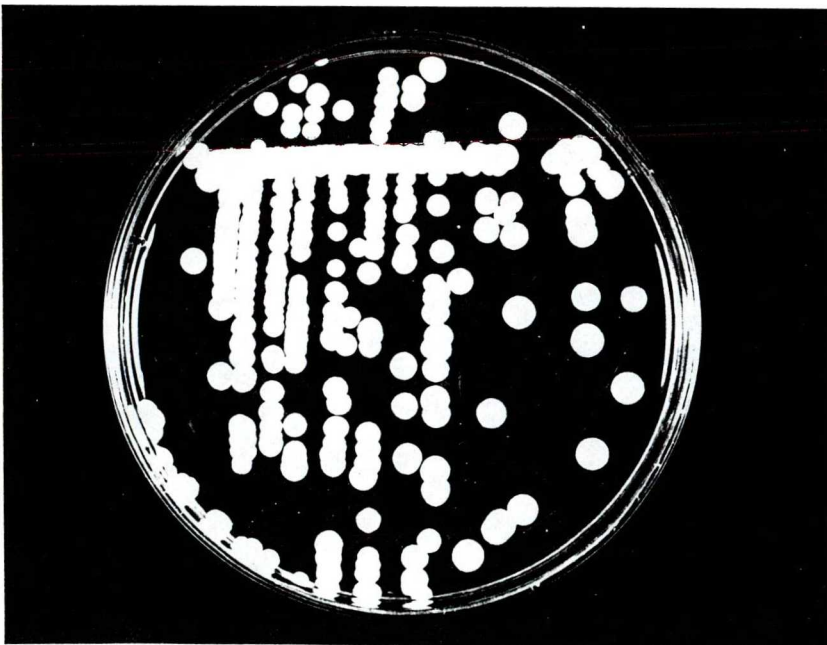
( kb 350x-es nagyítás )



6. kép : F3 interspecifikus fúziós termék mikroszkó-  
pos képe / metilénkékes magfestés / kb 1600 x - os  
nagyítás



7. kép: A típusu fúziós termék / F3 / komplett tápagaron



8. kép: B típusu fúziós termék / F12 / komplett tápagaron



9. kép: A típusu hibrid haploidizáció után, komplett tápagaron



10. kép: B típusu hibrid haploidizáció után, komplett tápagaron

Köszönetet mondok dr. Ferenczy Lajos tanszékvezető docensnek, aki doktori értekezésem elkészítését lehetővé tette, elméleti és gyakorlati tanácsaival munkámat messzemenően támogatta. Ugyancsak megköszönöm Juhász Erzsébet laboránsnak a kísérleti munkákban, Nagy Lajos Gergely technikusnak pedig a fotóanyagok elkészítésében nyújtott segítségét.