

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**ÉLESZTŐGOMBÁK FAJOK KÖZÖTTI HIBRIDIZÁLÁSA ÉS A
HIBRIDGENOMOKBAN LEJÁTSZÓDÓ POSZT-ZIGOTIKUS
ESEMÉNYEK VIZSGÁLATA**

Szabó Adrienn

Témavezető: Dr. Antunovics Zsuzsa



DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

1. Célkitűzés

Tanszékünkön évtizedek óta folyik az interspecifikus *Saccharomyces* hibridek genetikai kutatása, amely eddig leginkább a nukleáris genom és a hibridek sterilitásának vizsgálatára terjedt ki. Viszont a mitokondriális genom öröklődése is egy kihívásokban gazdag területe az interspecifikus hibridek kutatásának. Ezért kutatócsoportunk célul tűzte ki nagyszámú *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces uvarum* hibrid izolálását és mitokondriális genomjának vizsgálatát. A mitokondriális DNS (mtDNS) öröklődésének vizsgálatát interspecifikus *Saccharomyces uvarum* x *Saccharomyces kudriavzevii* x *Saccharomyces cerevisiae* hármashibridekre is kiterjesztettük.

A *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridek esetében kíváncsiak voltunk arra, hogy a szülői törzsek megválasztása befolyásolja-e a mtDNS öröklődését, meg szeretnénk volna tudni, hogy a mitokondriális genom hatással van-e a hibridek fertilitására, valamint, hogy a mtDNS változik-e a spóráképzés során. Ezenkívül a különböző mitotípussal rendelkező hibridek hőmérséklet-toleranciáját és respirációs képességét is górcső alá vettük, ugyanis egyre több publikáció jelenik meg, amely azt sugallja, hogy a mtDNS jelentős hatással van ezekre a tulajdonságokra (Wolters és mtsi., 2018; Baker és mtsi., 2019; Li és mtsi., 2019).

2. Irodalmi áttekintés

A *Saccharomyces* fajok mtDNS öröklődésének vizsgálata az egyik legnagyobb kihívást jelentő területe a genetikai kutatásoknak. Az első kísérletek már az 1970-es években elkezdődtek, de számos kérdésre a mai napig nem sikerült választ kapnunk (Williamson és Moustacchi, 1971). A mtDNS öröklődésének vizsgálata nem csak az alapkutatások számára érdekes, számos publikáció jelent meg az utóbbi években, amely a törzsek mitotípusát összefüggésbe hozta olyan ipari szempontból fontos tulajdonságokkal, mint az oxidatív stresszel és a dehidratációval szembeni tolerancia, a hőmérséklet-tolerancia és a respirációs ráta (Solieri és mtsi., 2008; Albertin és mtsi., 2013; Picazo és mtsi., 2015; Baker és mtsi., 2019; Li és mtsi., 2019). Ezeket a kísérleteket azonban kisszámú hibriddel végezték, ezért még szükség van átfogó tanulmányokra annak érdekében, hogy pontosan megtudjuk, hogy milyen és mekkora szerepe van a mitotípusnak ezeknek a tulajdonságoknak a meghatározásában.

A mitotípust ezenkívül a hibridsterilitással is összefüggésbe hozták (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010; Jhuang és mtsi., 2017). A hibridsterilitás leginkább elfogadottabb magyarázata, hogy az allodiploid hibridekben az eltérő szülőktől származó homeológ kromoszómák a meiózis I profázisában nem tudnak párba állni, ezért a meiózis nem tud megfelelően végbemenni a hibridekben (Delneri és mtsi., 2003; Charron és mtsi., 2014). A *Saccharomyces* fajoknál azonban gyakran megfigyelhető genom duplikáció, vagyis a genomjuk megkettőződhet, amelynek eredményeként allotetraploid hibridek jönnek létre. Az allotetraploid hibridekben minden kromoszómának megtalálható az azonos szülőtől származó homológ párja, ezért ezekben a hibridekben a meiózis lejátékozódásának nincs akadálya (Banno és Kaneko, 1989; Charron és mtsi., 2019). Viszont a *Saccharomyces* fajoknál a párosodásért felelős gének a *MAT* lókuszt szabályozása alatt állnak. Az allotetraploid hibridek allodiploid spórákat képeznek, amelyek heterozigóták a *MAT* lókuszt **a** és α alléljére nézve. Az ezekről az allélekről átíródó $a1$ és $\alpha2$ fehérjék létrehozzák az $a1$ - $\alpha2$ represszort, amely meggátolja a konjugációért felelős gének átírását. Az allotetraploid hibridek által létrehozott allodiploid spórák ezért valószínűleg nem tudnak egymással konjugálva F2 hibrideket képezni (Pfliegler et al., 2012; Sipiczki, 2018).

Egy tajvani kutatócsoport kísérletei arra utalnak, hogy hibridsterilitás kialakulhat mitonukleáris inkompatibilitás miatt is. A mitonukleáris inkompatibilitás megértéséhez fontos tudnunk, hogy a mitokondriális fehérjék egy része a sejtmagban, másik része pedig a mtDNS-en kódolt. Mitonukleáris inkompatibilitás akkor lép fel, amikor a mitokondriális fehérjéket kódoló

kromoszómák és a mtDNS különböző fajoktól származnak és a fajok közötti szekvencia különbségek miatt az eltérő kompartmentekben kódolt géntermékek nem tudnak egymással kölcsönhatásba lépni. Ennek következtében a hibridek elveszíthetik a respirációs képességüket. Ez azért fontos, mert a *Saccharomyces* fajok respirációs képesség hiányában nem tudnak belépni a meiózisba, tehát elveszítik a spórázási képességüket (Treinin és mtsi., 1993; Jambhekar és Amon, 2008; Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010).

A *Saccharomyces* fajoknál a mitokondriális genom öröklődése biparentális, ami azt jelenti, hogy mindkét szülő mtDNS-e bekerül a zigótába (Birky, 1978; Dujon, 1981). Viszont néhány osztódási ciklus után már csak az egyik szülőre jellemző mtDNS mutatható ki a sejtekben. Interspecifikus hibridekkel végzett kísérletek kezdetben azt sugallták, hogy két adott faj keresztezéséből származó hibridek mindig ugyanannak a fajnak az mtDNS-ét öröklik (Marioni és mtsi., 1999; Pulvirenti és mtsi., 2000; de Vero és mtsi., 2003; Antunovic és mtsi., 2005; Karanyicz és mtsi., 2017). Későbbi kutatási eredmények viszont arra mutattak rá, hogy ez nem minden esetben igaz. Ugyanannak a két fajnak különböző törzseit keresztezve egymással a hibridek mitotípusa a törzskombinációtól függően eltérő lehet (Verspohl és mtsi., 2018).

A homoplazmia fokozatosan alakul ki, viszont a pontos mechanizmus még nem ismert (Albertin és mtsi., 2013). Az egyik lehetséges magyarázat, hogy csak néhány mtDNS molekula replikálódik és kerül be az utódsejtekbe (Ling és Shibata, 2004). Illetve vannak arra utaló adatok is, hogy a különböző mitotípusok eltérő növekedési képességet biztosíthatnak a sejteknek, ami hozzájárulhat ahhoz, hogy a különböző mitotípusú szubpopulációk közül az egyik túlnője a többi (Hsu és Chou, 2017).

3. Módszerek

3.1. Törzsek és hibridizáció

Célunk nagyszámú interspecifikus hibrid előállítás és mtDNS-ének vizsgálata volt. Ennek érdekében három *S. cerevisiae* és két *S. uvarum* auxotróf törzs keresztezésével létrehoztunk négy hibridcsoportot, amelyeknek CU2, CU3, CU4 és CU6 nevet adtunk. Mindegyik hibridcsoportba 10-10 törzs tartozott. A keresztezés az auxotróf szülői törzsek minimál táptalajon való keresztbe-replikálásával, majd a prototróf telepek izolálásával történt. A különböző szülői törzsek keresztezése által arról szerettünk volna információt kapni, hogy a szülői törzsek megválasztása befolyásolja-e a hibridek mitotípusát.

Ezt követően a 10-170-es *S. cerevisiae* és a 10-522-es *S. uvarum* törzs komplett tápfolyadékban történő keresztezésével létrehoztunk további negyven hibridet (A1-40) annak érdekében, hogy teljesebb képet kapjunk egy adott törzspárosításból származó hibridek mitokondriális öröklődésével kapcsolatban is.

A hibridizáció sikerességét pulzáló erőterű gélelektroforézissel is leellenőriztük: elkészítettük a hibridek kariogramját és megnéztük, hogy valóban jelen van-e mindkét szülői faj kromoszómakészlete bennük.

A tanszékünk munkatársai pedig egy párhuzamos kísérlet során létrehoztak öt interspecifikus hármashibridet is egy *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* kettőshibrid (II/6) és a 10-170-es *S. cerevisiae* törzs keresztezésével.

3.2. A hibridek mtDNS-ének vizsgálata

A hibridek és a spóráklónok mitotípusát először a teljes mitokondriális genom RFLP analízisével vizsgáltuk. mtDNS-t izoláltunk a törzsekből, amelyet ezután *Hae*III restrikciós endonukleázzal megemésztettünk, majd a kapott fragmenteket gélelektroforézis segítségével elválasztottuk egymástól. A hibridek mtDNS-ének RFLP mintázatát (mitotípusát) összehasonlítottuk a szülői mintázatokkal. Azokat a hibrideket, amelyek RFLP mintázata egyik szülőjével sem egyezett meg, rekombináns mitotípusúnak tekintettük.

Ezt követően meg szeretnénk volna tudni, hogy a rekombináns hibridekben és a spóráklónokban bizonyos mitokondriális gének mely szülői fajtól származnak. Ezért korábbi publikációk protokolljai alapján (López és mtsi., 2003; Albertin és mtsi., 2013) elvégeztük négy mitokondriális lókuszt (*COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*) allél-specifikus PCR analízisét. A *S.*

cerevisiae és a *S. uvarum* *COX1*, *COX3*, *ATP6* allélek PCR termékei eltérő méretűek voltak, a *COX2* gén esetében a PCR terméket *SfcI* restrikciós endonukleázzal meg kellett emésztetni, hogy méretbeli különbséget tudjunk tenni az allélok között.

3.3. A hibridfertilitás vizsgálata

A hibridek fertilitásának vizsgálatát először egy közvetett módszerrel, az úgynevezett random spóra analízissel vizsgáltuk. A hibrideket négy napig spóráztató táptalajon tartottuk, majd a spórákat hordozó aszkuszkok sejtfalát Zymolyase-20T enzimmel lebontottuk és a spórákat szonikálást követően komplett táptalajra szélesztettük. Pár nap elteltével a csészékről replikát készítettünk minimál, illetve leucinnal vagy uracillal kiegészített minimál táptalajokra. Mivel a *S. uvarum* *leu2* marker gén és a *MAT* lókuszt azonos kromoszómán helyezkedik el, vélhetően a leucin auxotróf spórákból hiányzik a *S. uvarum* *MAT* lókuszt hordozó kromoszóma. Ennek eredményeként feloldódik a *MAT* heterozigótaságból eredő sterilítási gát és a spórák visszanyerik a fertilitásukat.

Az elméletünk helyességét tetrádanalízissel is leellenőriztük. A tetrádanalízis során mikromanipulátor segítségével elválasztottuk az aszkuszkokban található négy spóráat egymástól és megnéztük, hogy a spórák képesek-e mitotikus osztódással telepeket (spóráklónokat) képezni. Azokat a hibrideket tekintettük fertilisnek, amelyek F1 spóráklónjaiból spóráztatást követően sikerült életképes F2 spóráklónokat izolálni.

3.4. Növekedés-vizsgálat

A hibridek és a kiválasztott spóráklónok növekedés-vizsgálatát szobahőmérsékleten és 37 °C-on, fermentálható és nem-fermentálható (glükóz helyett glicerolt tartalmazó) táptalajon végeztük. Fermentálható táptalajon az energiatermelés főleg fermentációval, nem-fermentálható táptalajon pedig kizárólag oxidatív foszforilációval történik. Nem-fermentálható táptalajon a törzsek respirációs képesség hiányában nem képesek növekedni. Minden törzsből létrehoztunk egy 0,2 optikai denzitású (λ : 590 nm) sejtszuszpenziót, amelyből 15 μ l-t pipettáztunk a fent említett táptalajokra. A növekedés-vizsgálat eredményét hat nap elteltével értékeltük ki.

4. Eredmények és megbeszélésük

A különböző törzspárosításokból származó hibridek mitotípusának vizsgálatok azt vettük észre, hogy a 10-167 *S. cerevisiae* x 10-522 *S. uvarum* keresztezésből származó CU6 hibridek mind *S. uvarum*, a 10-170 *S. cerevisiae* x 10-1651 *S. uvarum* keresztezésből származó CU2 hibridek pedig mind *S. cerevisiae* mitotípusúak voltak. Amikor pedig a 10-170-es és a 10-522-es törzset kereszteztük egymással (CU4 és „A” hibridcsoportok), kaptunk *S. cerevisiae*, *S. uvarum* és különböző rekombináns mitotípusú hibrideket, illetve egy olyan törzset (CU4. 3), amelyben a sejtek egy része *S. cerevisiae* másik része pedig rekombináns mitotípusú volt. A CU3 csoportban (10-174 *S. cerevisiae* x 10-522 *S. uvarum*) szintén találtunk *S. cerevisiae*, *S. uvarum* és rekombináns mitotípusú hibrideket, valamint egy heteroplazmiás törzset (CU3. 7) is. A hármashibridek esetében a 10-1651 *S. uvarum* x 10-1653 *S. kudriavzevii* keresztezésből származó kettőshibrid szülői törzs *S. kudriavzevii* mtDNS-t örökölt, míg a hármashibridek a 10-170 *S. cerevisiae*-vel való keresztezés után mind *S. cerevisiae* mitotípust mutattak. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a szülői törzsek megválasztása erősen befolyásolja a hibridek mitotípusát, valamint hogy a különböző mitotípusú törzsek eltérő hatékonysággal örökítik tovább a mitokondriális genomjukat.

A hibridek mitotípusának elemzésekor a CU3. 7 és CU4. 3 törzsek mitotípusát különösen érdekesnek találtuk a homoplazmia kialakulásának szempontjából. A homoplazmia valószínűleg fokozatosan alakul ki, kezdetben különböző mitotípussal rendelkező szubpopulációkból áll a tenyészet. Az eddigi kutatási eredmények arra utaltak, hogy ezalatt egy heteroplazmiás és egy homoplazmiás populációt kell érteni, de az eltérő mitotípusú szubpopulációkból álló CU4. 3 hibrid arra utal, hogy kezdetben több homoplazmiás szubpopuláció is jelen lehet, amelyek közül az egyik később túlnövi a többit (Albertin és mtsi., 2013). A CU4. 3 hibrid arra is bizonyítékot nyújt, hogy a különböző mitotípusú szubpopulációk fitnesze adott körülmények között közel megegyező is lehet. A heteroplazmiás CU3. 7 hibrid pedig azt bizonyítja, hogy a homoplazmia nem minden esetben alakul ki.

A 10-170-es *S. cerevisiae* és 10-522-es *S. uvarum* törzs keresztezéséből származó 50 hibrid 34 %-a rekombináns mitotípusú volt. A rekombináns hibrideket a mtDNS-ük RFLP mintázata alapján nyolc csoportba (R1-R8) osztottuk.

Kíváncsiak voltunk, hogy a rekombináns mitokondriális genomok milyen allélkombinációkat hordoznak, ezért PCR reakcióval megvizsgáltunk négy mitokondriális gént: *COX1*, *COX2*, *COX3*,

ATP6. A rekombináns hibridek néhány kivétellel mind *S. cerevisiae COX1* és *S. uvarum COX2* és *COX3* alléleket hordoztak. Az *ATP6* allél esetében a rekombináns hibridcsoportok felében (R1, R4, R6, R8) *S. cerevisiae*, másik felében (R2, R3, R5, R7) pedig *S. uvarum* allél volt kimutatható. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a rekombináció valószínűleg nem véletlenszerű helyeken történik a két törzs mtDNS-e között.

A növekedési vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a mitotípus jelentősen befolyásolja a hibridek respirációs képességét 37 °C-on: az azonos mitotípusú hibridek hasonló növekedési képességgel rendelkeztek. Három rekombináns csoportba (R2, R3, R7) tartozó összesen hét hibrid elvesztette a respirációs képességét. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a légzési láncot alkotó fehérjekomplexekben a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* allélok által kódolt fehérjék kevésbé hatékonyan kapcsolódnak egymáshoz, ezért magas hőmérsékleten a fehérjekomplexek könnyebben széteshetnek (He és mtsi., 2016).

A 37 °C-on respirációs képességüket elvesztett hibridek mind *S. uvarum ATP6* allélt hordoztak, viszont találtunk olyan *S. uvarum ATP6* alléllal rendelkező hibrideket is, amelyek közepes mértékben képesek voltak növekedni magas hőmérsékleten, nem-fermentálható szénforráson. A legtöbb *S. cerevisiae ATP6* alléllal rendelkező hibrid jó respirációs képességet mutatott, de voltak olyanok is, amelyek csak gyenge vagy közepes növekedési képességgel rendelkeztek. Ez arra utal, hogy az *ATP6* allélikus variánsainak fontos szerep jut a hibridek magas hőmérsékleten való respirációs képességének kialakításában, viszont más tényezők hatása is érvényesül. Valószínűleg az *ATP8* és az *ATP9* mitokondriális gének genotípusa is meghatározó ebből a szempontból.

A spóráklónok mitotípusának vizsgálatokor azt figyeltük meg, hogy a mitotípus a legtöbb spóráklón esetében a szülői hibridhez képest változatlanul adódik tovább. A spóráklónok egy részénél viszont a mtDNS RFLP mintázatából sávok vesztek el. Ezek a spóráklónok a respirációs képességüket és a mitokondriális markergének egy részét is elvesztették. Legalábbis bizonyos markergének PCR reakcióval nem voltak kimutathatóak. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a mtDNS a meiózis során deléciókon eshet át.

A hibridsterilitás vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a hibridek 98%-a a mitotípustól függetlenül képes volt életképes spórákat létrehozni, tehát a mitonukleáris inkompatibilitás nem akadályozta meg a spóráképzésüket. Az életképes spórák magas száma arra utal, hogy a hibridek tetraploidok voltak. Egy olyan hibridet találtunk, amely nem képzett spórákat. Ez a törzs

rekombináns mitotípussal rendelkezett és nem volt képes respirációra, ami a meiózis lejátszódásának a feltétele (Treinin és mtsi., 1993; Jambhekar és Amon, 2008). A rendelkezésre álló adatok alapján nem tudjuk eldönteni, hogy a respirációs képesség elvesztésének hátterében egy rekombináció által funkciót veszített mitokondriális gén vagy egy rekombinációtól független mutáció áll-e.

Random spóra analízissel négy olyan hibridet azonosítottunk, amelyek közel 30% gyakorisággal képeztek leucin auxotróf spórákat és feltehetően elvesztették az egyik *MAT* lókuszt hordozó kromoszómájukat, ezáltal pedig visszanyerték a fertilitásukat. A leucin auxotróf F1 spóráklónokból várákozásainknak megfelelően hiányzott a *S. uvarum* *MAT* lókuszt hordozó kromoszóma, míg a prototróf F1 spóráklónokban jelen volt.

Tetrádanalízissel is megerősítettük, hogy ezek a hibridek valóban fertilesek voltak, az auxotróf F1 spóráklónokból sikeresen izoláltunk életképes F2 spóráklónokat. A fertilitást, vagyis az F2 spóráklónok életképességét, a ~30% gyakorisággal auxotróf spórákat képző hibrideken kívül másik három hibrid esetében is megvizsgáltuk: A2 (rekombináns mitotípus), A5 (*S. uvarum* mitotípus), A7 (*S. cerevisiae* mitotípus). Ezek a hibridek nem képeztek életképes F2 spóráklónokat.

A négy fertilis hibrid közül kettő *S. cerevisiae*, egy rekombináns, egy pedig *S. uvarum* mitotípussal rendelkezett, ami azt bizonyítja, hogy a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* mitotípus egyaránt kompatibilis volt a hibridek nukleáris genomjával. Viszont az általunk vizsgált hibridek genomjában mindkét szülői faj kromoszómakészlete megtalálható volt. A mitonukleáris inkompatibilitásnak azoknál a hibrideknél és spóráklónoknál lehet nagyobb szerepe, amelyek nukleáris genomja elkezdett redukálódni, vagyis vannak olyan kromoszómák, amelyeknek csak a *S. cerevisiae* vagy csak a *S. uvarum* ortológja van jelen a genomban.

5. Az új tudományos eredmények felsorolása

1. Többféle mitotípusú szubpopuláció is alkothatja a hibrid tenyészetet.
2. Először izoláltunk viszonylag nagy számban rekombináns mtDNS-sel rendelkező interspecifikus *Saccharomyces* hibrideket.
3. A rekombináció valószínűleg nem véletlenszerű helyeken történik az általunk használt *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzs mtDNS-e között.
4. A mtDNS rekombinációja az intraspecifikus hibridekhez hasonlóan, az interspecifikus hibridek respirációs képességét is sok esetben negatívan befolyásolja magas hőmérsékleten.
5. A legtöbb esetben a mtDNS a szülői hibridekhez képest változatlanul adódik tovább a spóráklónokba, viszont a meiózis során viszonylag gyakran történt benne deléción is.
6. A hibridek spóráképző képességét a mitotípus a legtöbb esetben nem befolyásolta.
7. Nem tapasztaltunk mitonukleáris inkompatibilitást az interspecifikus hibridek nukleáris genomja és a különböző mitotípusok között (*S. cerevisiae*, *S. uvarum*, rekombináns).

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőm, Dr. Antunovics Zsuzsa támogatását. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sipiczki Mátyásnak, amiért anyagi háttérrel biztosított a kísérleteimnek és tanácsaival segítette a munkámat. Köszönöm Karanyicz Edinának a CU4 hibridekből való tetrádhúzást. Köszönettel tartozom Gálné Dr. Miklós Idának, tanszékünk vezetőjének, a lehetőségért, hogy a tanszéken végezhettem a kísérleteimet. Köszönöm továbbá a tanszék valamennyi dolgozójának a munkám során nyújtott támogatását, valamint Brachyahu Meir Kestecher-nek az angol fordításban való segítségét.

Vizsgálatainkat az OTKA K124417 pályázat tette lehetővé.



Nyilvántartási szám: DEENK/216/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Adrienn

Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10088748

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. Antunovics, Z., **Szabó, A.**, Heistinge, L., Mattanovich, D., Sipiczki, M.: Synthetic two-species allodiploid and three-species allotetraploid *Saccharomyces* hybrids with euploid (complete) parental subgenomes.

Sci. Rep. 13 (1), 1-13, 2023. EISSN: 2045-2322.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-27693-2>

IF: 4.996 (2021)

2. **Szabó, A.**, Antunovics, Z., Karanyicz, E., Sipiczki, M.: Diversity and Postzygotic Evolution of the Mitochondrial Genome in Hybrids of *Saccharomyces* Species Isolated by Double Sterility Barrier.

Front. Microbiol. 11, 1-22, 2020. EISSN: 1664-302X.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00838>

IF: 5.64

3. Sipiczki, M., Antunovics, Z., **Szabó, A.**: MAT heterozygosity and the second sterility barrier in the reproductive isolation of *Saccharomyces* species.

Curr. Genet. 66 (5), 957-969, 2020. ISSN: 0172-8083.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-020-01080-0>

IF: 3.886

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,522

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 14,522

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2023.06.07.

Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

**Interspecific hybridization of yeast species and
examination of the post-zygotic events in the hybrid
genomes**

by Adrienn Szabó

Supervisor: Dr. Zsuzsa Antunovics



UNIVERSITY OF DEBRECEN
Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2023

1. Aims

Genetic research on interspecific *Saccharomyces* hybrids has been carried out in our laboratory for decades, thus far with a primary focusing on the nuclear genome and sterility of hybrids. However, the inheritance of the mitochondrial genome is also a challenging area of research on interspecific hybrids. Therefore, our research group aimed to isolate a large number of *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces uvarum* hybrids and to study their mitochondrial genomes. The inheritance of mitochondrial DNA (mtDNA) was also examined in interspecific *Saccharomyces uvarum* x *Saccharomyces kudriavzevii* x *Saccharomyces cerevisiae* triple hybrids.

In the case of *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hybrids, we asked whether the choice of parental strains affects the inheritance of mtDNA, whether the mitochondrial genome affects the fertility of the hybrids, and whether the mtDNA undergoes a change during spore formation. We also examined the temperature tolerance and respiratory ability of hybrids with different mitotypes, as a growing body of literature suggests that mtDNA has a significant effect on these properties (Wolters et al., 2018; Baker et al., 2019; Li et al., 2019).

2. Literature review

The study of mtDNA inheritance in *Saccharomyces* species is one of the most challenging areas of genetic research. The first experiments started in the 1970s, but many questions have remained unanswered to date (Williamson and Moustacchi, 1971). The investigation of mtDNA inheritance is not only of interest for basic research, but several articles have also been published in recent years that have linked the mitotype to industrially important traits such as resistance to oxidative and dehydration stress, temperature tolerance and respiration rate (Solieri et al., 2008); Albertin et al., 2013; Picazo et al., 2015; Baker et al., 2019; Li et al., 2019). However, these experiments have been conducted with a small number of hybrids and therefore comprehensive studies are still needed to learn what is the exact role of the mitotype in determining these properties.

Mitotype has also been associated with hybrid sterility (Lee et al., 2008; Chou et al., 2010; Jhuang et al., 2017). The most widely accepted explanation for hybrid sterility is that in allodiploid hybrids, due to the different sequences, the homeologous chromosomes from different parental species cannot align in meiosis I prophase, and thus meiosis cannot occur properly in hybrids (Delneri et al., 2003; Charron et al., 2014). However, genome duplication is often observed in *Saccharomyces* species i.e. their genomes can be duplicated, resulting in allotetraploid hybrids. In allotetraploid hybrids, each chromosome has a homologous pair from the same parent, so in these hybrids, there is no obstacle to meiosis (Banno and Kaneko, 1989; Charron et al., 2019). However, in *Saccharomyces* species, the genes responsible for mating are under the regulation of the *MAT* locus. Allotetraploid hybrids form allodiploid spores that are heterozygous for the **a** and α alleles of the *MAT* locus. Transcription of the $a1$ and the $\alpha2$ proteins from these alleles results in the formation of the $a1$ - $\alpha2$ repressor, which prevents transcription of genes responsible for conjugation. Therefore, allodiploid spores produced by allotetraploid hybrids are unlikely to form F2 hybrids by conjugation (Pfliegler et al., 2012; Sipiczki, 2018).

Experiments by a Taiwanese research team suggest that hybrid sterility may also arise due to cytonuclear incompatibility. To understand cytonuclear incompatibility, it is important to know that some mitochondrial proteins are encoded in the nucleus and others in the mtDNA. Cytonuclear incompatibility occurs when the chromosomes coding for mitochondrial proteins and the mtDNA are from different species and the gene products encoded in the different compartments cannot interact due to species specific allelic differences. As a result, hybrids may

lose their ability to respire. This is important because *Saccharomyces* species lacking respiratory capacity cannot enter meiosis and thus lose their ability to sporulate (Treinin et al., 1993; Jambhekar and Amon, 2008; Lee et al., 2008; Chou et al., 2010).

In *Saccharomyces* species, the inheritance of the mitochondrial genome is biparental, meaning that mtDNA molecules from both parents are transferred into the zygote (Birky, 1978; Dujon, 1981). However, after a few division cycles, only one type of mtDNA can be detected in the cells. Experiments with interspecific hybrids initially suggested that hybrids derived from crosses between two species always inherited the mtDNA of the same species (Marioni et al., 1999; Pulvirenti et al., 2000; de Vero et al., 2003; Antunovics et al., 2005; Karanyicz et al., 2017). However, subsequent research has shown that this is not always the case. When different strains of the same two species are crossed with each other, the mitotype of the hybrids may differ depending on the combination of strains (Verspohl et al., 2018).

The establishment of homoplasmy is gradual, but the exact mechanism is not yet known (Albertin et al., 2013). One possible explanation is that only a few mtDNA molecules are replicated and introduced into the progeny cells (Ling and Shibata, 2004). Alternatively, there is evidence that different mitotypes may confer different growth capacities to cells, thus one of the different mitotype subpopulations might outgrow the others (Hsu and Chou, 2017).

3. Methods

3.1. Strains and hybridisation

Our aim was to generate a large number of interspecific hybrids and to study their mtDNA. For this purpose, we crossed three *S. cerevisiae* and two *S. uvarum* auxotrophic strains, and generated four hybrid groups which were named CU2, CU3, CU4 and CU6. Each hybrid group contained 10-10 strains. The crosses were made by cross replica-plating auxotrophic parental strains on minimal medium and then isolating the prototrophic colonies. By crossing the different parental strains, we wanted to obtain information on whether the choice of parental strains influences the mitotype of the hybrids.

Subsequently, forty additional hybrids (A1-40) were generated by crossing *S. cerevisiae* strain 10-170 and *S. uvarum* strain 10-522 in complete medium to obtain a more complete picture of the hybrid mitochondrial inheritance from a given cross.

We also checked the success of hybridization by pulsed power gel electrophoresis: karyotyped the hybrids to check whether the hybrids indeed contain the chromosome sets of both parental species.

In a parallel experiment, our colleagues generated five interspecific triple hybrids by crossing an *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* double hybrid (II/6) with the *S. cerevisiae* strain 10-170.

3.2. mtDNA analysis of hybrids

The mitotypes of the hybrids and spore clones were first examined by RFLP analysis of the whole mitochondrial genome. First, mtDNA was isolated from the strains, which was then digested with *Hae*III restriction endonuclease and the resulting fragments were separated by gel electrophoresis. The mtDNA RFLP pattern (mitotype) of the hybrids were compared to the parental patterns. Hybrids with RFLP patterns that did not match the pattern of either parent were considered recombinant mitotypic hybrids.

Next, we examined the route of origin of certain mitochondrial genes in recombinant hybrids and in spore clones. Following the protocols of previous publications (López et al., 2003; Albertin et al., 2013), we performed allele-specific PCR analysis of four mitochondrial loci (*COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*). In cases of *COX1*, *COX3* and *ATP6* genes, the PCR products of the *S. cerevisiae* and the *S. uvarum* alleles are of different sizes. The *COX2* PCR product was digested with the restriction enzyme *Sfc*I to distinguish the alleles by size.

3.3. Testing hybrid fertility

The fertility of hybrids was first tested using an indirect method, the so-called random spore analysis. The hybrids were kept for four days on sporulation medium, then the cell walls of the ascospores carrying the spores were degraded with the enzyme Zymolyase-20T then the spores were sonicated and spread on complete medium. After a few days, the colonies were replica-plated on minimal and minimal media supplemented with either leucine or uracil. Since the *S. uvarum leu2* (encoding 3-isopropylmalate dehydrogenase) marker gene and the *MAT* locus are located on the same chromosome, it is assumed that the leucine auxotroph spores lack the chromosome carrying the *S. uvarum MAT* locus. As a result, the sterility barrier resulting from the *MAT* heterozygosity is released and the spores regain fertility.

We have also tested the validity of our theory using tetrad analysis. During the tetrad analysis a micromanipulator was used to separate the four spores in the ascus from each other. We examined whether the spores could form colonies (spore clones) by mitotic divisions. Hybrids were considered to be fertile if viable F2 spore clones could be isolated from F1 spore clones after sporulation.

3.4. Growth test

The growth of hybrids and selected spore clones were tested at room temperature and at 37 °C, on fermentable and non-fermentable (containing glycerol instead of glucose) complete media. Energy is produced mainly by fermentation on fermentable medium, and exclusively by oxidative phosphorylation on non-fermentable medium. On non-fermentable medium strains are therefore unable to grow if they lack the ability to respire. During the growth tests a cell suspension of 0.2 optical density (OD₅₉₀) was prepared from each strain and 15 µl of this suspension was pipetted onto the above media. Growth test results were evaluated after six days.

4. Results and discussion

When analysing the mitotype of *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hybrids from different strain pairs, we observed that CU6 hybrids derived from the 10-167 *S. cerevisiae* x 10-522 *S. uvarum* cross all had *S. uvarum*, and CU2 hybrids derived from the 10-170 *S. cerevisiae* x 10-1651 *S. uvarum* cross all had *S. cerevisiae* mitotypes. When strains 10-170 and 10-522 were crossed with each other (hybrid groups CU4 and A), we obtained hybrids with *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and different recombinant mitotypes, we also observed a strain (CU4. 3) in which some of the cells showed *S. cerevisiae* and some showed recombinant mitotypes. In the CU3 group (10-174 *S. cerevisiae* x 10-522 *S. uvarum*), we also found hybrids that had *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and recombinant mitotypes, as well as a heteroplasmic strain (CU3. 7). In the case of the triple hybrids, the double hybrid parental strain from the 10-1651 *S. uvarum* x 10-1653 *S. kudriavzevii* cross inherited *S. kudriavzevii* mtDNA, while the triple hybrids all showed *S. cerevisiae* mitotype after crossing with *S. cerevisiae* 10- 170. These results show that the choice of parental strains strongly influences the mitotype of the hybrids and that strains with different mitotypes pass on their mitochondrial genomes with different efficiency.

When analysing the mitotype of the hybrids, we found the mitotype of strains CU3. 7 and CU4. 3 to be particularly interesting for the development of homoplasmy. The establishment of homoplasmy is likely to be a gradual process, initially the cell culture probably consists of subpopulations with different mitotypes. Previous research has suggested that this should be understood as heteroplasmic and homoplasmic populations, but the CU4. 3 hybrid, consisting of two subpopulations with different mitotypes, suggests that several homoplasmic subpopulations may be present initially, one of which later outgrows the others (Albertin et al, 2013). The CU4. 3 hybrid also provides evidence that the fitness of different mitotypic subpopulations can be nearly identical under given conditions. The heteroplasmy CU3. 7 hybrid, on the other hand, demonstrates that homoplasmy does not always occur.

Among the 50 hybrids derived from the cross between *S. cerevisiae* strain 10-170 and *S. uvarum* strain 10-522, 34 % of the hybrids had recombinant mitotypes. The recombinant hybrids were divided into 8 recombinant groups (R1-R8) based on the RFLP pattern of their mtDNA.

We were interested to analyse which allele combinations the recombinant mtDNAs carry, so we tested four mitochondrial genes by PCR: *COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*. The recombinant hybrids all carried *S. cerevisiae* *COX1* and *S. uvarum* *COX2* and *COX3* alleles, with some

exceptions. In the case of the *ATP6* allele, half of the recombinant hybrid groups (R1, R4, R6 R8) had the *S. cerevisiae* allele and the other half (R2, R3, R5, R7) had the *S. uvarum* allele. These results suggest that recombination probably occurs at non-random sites between the mtDNAs of the two strains.

Growth studies have shown that mitotype has a significant influence on the the respiratory capacity of hybrids at 37 ° C: hybrids with the same mitotype had similar growth ability. A total of seven hybrids belonging to three recombinant groups (R2, R3, R7) lost their ability to respire at high temperatures. This is probably due to the fact that the proteins encoded by the different *S. cerevisiae* and *S. uvarum* alleles in the respiratory chain protein complexes are less efficiently linked and therefore may break down more easily at high temperatures (He et al., 2016).

The hybrids that lost the ability to respire at 37 ° C all carried the *S. uvarum* *ATP6* allele, however, we also found hybrids with *S. uvarum* *ATP6* allele that were able to grow at moderate levels at high temperature on non-fermentable carbon source. Most of the hybrids with *S. cerevisiae* *ATP6* allele showed good respiratory capacity, but there were also some with poor to moderate growth ability. This suggests that allelic variants of *ATP6* have a strong influence on the ability of hybrids to respire at high temperatures, but other factors are also involved. It is likely that the genotype of the *ATP8* and *ATP9* mitochondrial genes is also important in this respect.

When analysing the mitotype of spore clones, we observed that the mitotype is transmitted unchanged in most spore clones compared to the parental hybrid. However, in a subset of the spore clones, bands were lost from the RFLP pattern of the mtDNA. These spore clones also lost their respiratory capacity and some of their mitochondrial marker genes. At least some marker genes were not detectable by PCR reaction. These results indicate that the mtDNA may undergo deletions during meiosis.

When looking at the hybrid sterility, we found that 98% of the hybrids were able to produce viable spores regardless of their mitotype, this shows that cytonuclear incompatibility did not prevent spore formation. The high number of viable spores suggests that the hybrids were probably tetraploids. One hybrid was however; found that did not form spores. This strain had a recombinant mitotype and was unable to respire, which is a requirement for meiosis to occur (Treinin és mtsi., 1993; Jambhekar és Amon, 2008). Based on the available

data, we cannot determine whether the loss of respiration is caused by a mitochondrial gene that has lost function through recombination or by a mutation independent of recombination.

Using random spore analysis, we identified four hybrids that produced leucine auxotrophic spores at a rate of nearly 30%. These hybrids most likely lost one of their *MAT* locus-bearing chromosomes and thus regained fertility. The leucine auxotroph F1 spore clones lacked, as expected, the *S. uvarum* *MAT* locus-bearing chromosome, while it was present in prototrophic F1 spore clones.

We also confirmed by tetrad analysis that these hybrids were indeed fertile, viable F2 spore clones were successfully isolated from auxotrophic F1 spore clones. Fertility, i.e. the viability of F2 spore clones, was also tested for three hybrids in addition to the hybrids that produced auxotrophic spores at ~30% frequency: A2 (recombinant mitotype), A5 (*S. uvarum* mitotype), A7 (*S. cerevisiae* mitotype). These hybrids did not form viable F2 spore clones. Two of the four hybrids had *S. cerevisiae* mtDNA, one was a recombinant hybrid and one had *S. uvarum* mitotype. These results demonstrate that both *S. cerevisiae* and *S. uvarum* mitotype were compatible with the nuclear genomes of the hybrids. However, the genomes of the hybrids we studied contained chromosome sets from both parental species. This indicates, that cytonuclear incompatibility may be more important in hybrids and spore clones which nuclear genomes have started to reduce, meaning that their genome contains only either the *S. cerevisiae* or the *S. uvarum* orthologue of a chromosome.

5. List of new scientific findings

1. Hybrid cultures can be composed of different mitotypic subpopulations.
2. For the first time, we isolated a relatively large number of interspecific *Saccharomyces* hybrids with recombinant mtDNA.
3. Recombination is likely to occur at non-random sites between the mtDNA of the *S. cerevisiae* and the *S. uvarum* strains we used.
4. Similarly to intraspecific hybrids, recombination of the mtDNA often negatively affects the respiratory capacity of interspecific hybrids at high temperatures.
5. In most cases, the mtDNA is passed on unchanged from the parental hybrids into the spore clones, but deletions during meiosis are relatively common.
6. In most cases, the ability of the hybrids to sporulate was not affected by the mitotype.
7. No mitonuclear incompatibility was observed between the nuclear genome and different mitotypes (*S. cerevisiae*, *S. uvarum*, one of the recombinants).

6. Acknowledgement

I thank my supervisor, Dr. Zsuzsa Antunovics for her continuous support. I would like to thank Dr. Mátyás Sipiczki for providing financial support for my experiments as well as for his advice and support. I also thank Edina Karanyicz for the isolation of F1 spore clones from the CU4 hybrids. I would also like to thank Dr. Ida Miklós Gálné, the head of our department, for the opportunity to carry out my experiments at the department. I thank all the staff of the department for their support during my work and Brahyachu Meir Kestecher for his help in the English translation.

Our project was financed by the Hungarian research fund OTKA K124417.



Registry number: DEENK/216/2023.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Adrienn Szabó

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10088748

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (3)

1. Antunovics, Z., **Szabó, A.**, Heistingering, L., Mattanovich, D., Sipiczki, M.: Synthetic two-species allodiploid and three-species allotetraploid *Saccharomyces* hybrids with euploid (complete) parental subgenomes.
Sci. Rep. 13 (1), 1-13, 2023. EISSN: 2045-2322.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-27693-2>
IF: 4.996 (2021)
2. **Szabó, A.**, Antunovics, Z., Karanyicz, E., Sipiczki, M.: Diversity and Postzygotic Evolution of the Mitochondrial Genome in Hybrids of *Saccharomyces* Species Isolated by Double Sterility Barrier.
Front. Microbiol. 11, 1-22, 2020. EISSN: 1664-302X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00838>
IF: 5.64
3. Sipiczki, M., Antunovics, Z., **Szabó, A.**: MAT heterozygosity and the second sterility barrier in the reproductive isolation of *Saccharomyces* species.
Curr. Genet. 66 (5), 957-969, 2020. ISSN: 0172-8083.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-020-01080-0>
IF: 3.886

Total IF of journals (all publications): 14,522

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 14,522

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.



07 June, 2023

Irodalom – References

- Albertin, W., da Silva, T., Rigoulet, M., Salin, B., Masneuf-Pomarede, I., de Vienne, D., Sicard, D., Bely, M., Marullo, P. (2013). The mitochondrial genome impacts respiration but not fermentation in interspecific *Saccharomyces* hybrids. *PLoS One*. 8: e75121.
- Antunovics, Z., Nguyen, H.V., Gaillardin, C., Sipiczki, M. (2005). Gradual genome stabilisation by progressive reduction of the *Saccharomyces uvarum* genome in an interspecific hybrid with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS. Yeast. Res.* 5: 1141-50.
- Baker, E.P., Peris, D., Moriarty, R.V., Li, X.C., Fay, J.C., Hittinger, C.T. (2019). Mitochondrial DNA and temperature tolerance in lager yeasts. *Sci Adv*. 5: eaav1869.
- Banno, I., Kaneko, Y. (1989). A genetic analysis of taxonomic relation between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *Yeast*. 5: S373-377.
- Birky, C.W. (1978). Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.* 12: 471-512.
- Charron, G., Leducq, J.B., Landry, C.R. (2014). Chromosomal variation segregates within incipient species and correlates with reproductive isolation. *Mol. Ecol.* 23: 4362-4372.
- Charron, G., Marsit, S., Hénault, M., Martin, H., Landry, C.R. (2019). Spontaneous whole-genome duplication restores fertility in interspecific hybrids. *Nat. commun.* 10: 4126.
- Chou, J.Y., Hung, Y.S., Lin, K.H., Lee, H.Y., Leu, J.Y. (2010). Multiple molecular mechanisms cause reproductive isolation between three yeast species. *PLoS Biol.* 8: e1000432.
- Delneri, D., Colson, I., Grammenoudi, S., Roberts, I.N., Louis, E.J., Oliver, S.G. (2003). Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature*. 422: 68-72.
- Dujon, B. (1981). Mitochondrial genetics and function. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, edited by Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 505-635.
- Hsu, Y.Y., Chou, J.Y. (2017). Environmental Factors Can Influence Mitochondrial Inheritance in the *Saccharomyces* Yeast Hybrids. *PloS. One*. 12: e0169953.
- Jambhekar A., Amon A., (2008). Control of meiosis by respiration. *Curr. Biol.* 18: 969–975.

Jhuang, H.Y., Lee, H.Y., Leu, J.Y. (2017). Mitochondrial-nuclear co-evolution leads to hybrid incompatibility through pentatricopeptide repeat proteins. *EMBO. Rep.* 18: 87-101.

Karanyicz, E., Antunovics, Z., Kallai, Z., Sipiczki, M. (2017). Non-introgressive genome chimerisation by malsegregation in autodiploidised allotetraploids during meiosis of *Saccharomyces kudriavzevii* x *Saccharomyces uvarum* hybrids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 4617-4633.

Lee, H., Chou, J., Cheong, L., Chang, N.H., Yang, S.Y., Leu, J.Y. (2008). Incompatibility of nuclear and mitochondrial genomes causes hybrid sterility between two yeast species. *Cell.* 135: 1065-1073.

Li, X.C., Peris, D., Hittinger, C.T., Sia, E.A., Fay, J.C. (2019). Mitochondria-encoded genes contribute to evolution of heat and cold tolerance in yeast. *Sci Adv.* 5: eaav1848.

Ling, F., Shibata, T. (2004). Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial homoplasmic cells. *Mol. Biol. Cell.* 15: 310-322.

López, V., Fernández-Espinar, M.T. Barrio, E., Ramón, D., Querol, A. (2003). A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 63-71.

Marinoni, G., Manuel, M., Petersen, R.F., Hvidtfeldt, J., Sulo, P., Piskur, J. (1999). Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. *J. Bacteriol.* 181: 6488-6496.

Pfliegler, W.P., Antunovics, Z., Sipiczki, M. (2012). Double sterility barrier between *Saccharomyces* species and its breakdown in allopolyploid hybrids by chromosome loss. *FEMS. Yeast. Res.* 12: 703-718.

Picazo, C., Gamero-Sandemetro, E., Orozco, H., Albertin, W., Marullo, P., Matallana, E., Aranda, A. (2015). Mitochondria inheritance is a key factor for tolerance to dehydration in wine yeast production. *Lett. Appl. Microbiol.* 60: 217-222.

Pulvirenti, A., Caggia, C., Restuccia, C., Giudici, P., Zambonelli, C. (2000). Inheritance of mitochondrial DNA in interspecific *Saccharomyces* hybrids. *Ann. Microbiol.* 50: 61-64.

Sipiczki M. (2018). Interspecies Hybridisation and Genome Chimerisation in *Saccharomyces*: Combining of Gene Pools of Species and Its Biotechnological Perspectives. *Front. Microbiol.* 9: 3071.

Solieri, L., Antúnez, O., Pérez-Ortín, J.E., Barrio, E., Giudici, P. (2008). Mitochondrial inheritance and fermentative : oxidative balance in hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum*. *Yeast*. 25: 485-500.

Treinin, M., Simchen, G. (1993). Mitochondrial activity is required for the expression of *IME1*, a regulator of meiosis in yeast. *Curr. Genet*. 23: 223-227.

de Vero, L., Pulvirenti, A., Gullo, M., Bonatti, P.M., Giudici, P. (2003). Sorting of mitochondrial DNA and proteins in the progeny of *Saccharomyces* interspecific hybrids. *Ann. Microbiol*. 53: 219-231.

Verspohl, A., Pignedoli, S., Giudici, P. (2018). The inheritance of mitochondrial DNA in interspecific *Saccharomyces* hybrids and their properties in winemaking. *Yeast*. 35: 173-187.

Williamson, D.H., Moustacchi, E. (1971). The synthesis of mitochondrial DNA during the cell cycle in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 42: 195-201.