

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Analysis of the hybridisation processes of yeasts

Élesztőgombák hibridizációs folyamatainak vizsgálata

Pfliegler Valter Péter

Témavezető: Prof. Dr. Sipiczki Mátyás



DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2013.

Élesztőgombák hibridizációs folyamatainak vizsgálata.

1. Célkitűzés.

Munkánk során a *Saccharomyces* genuszba tartozó aszkuszos élesztőgombák három fájának segítségével (*S. cerevisiae* - pékélesztő, borélesztő; *S. uvarum*; *S. kudriavzevii*) vizsgáltuk a fajok közötti kereszteződés egyes aspektusait. Ezen élesztőgombák laboratóriumi körülmények között keresztezhetők, valamint tanulmányozásukhoz számos bevett vizsgálati módszer áll rendelkezésre, így kísérleteinkhez ideális modellszervezeteknek bizonyultak.

A *S. cerevisiae* x *S. uvarum* fajpár esetében mesterséges hibridek előállításával és ezek utódnemzedékeinek izolálásával a hibrid genomok generációról generációra történő változásait, stabilizálódását kívántuk tanulmányozni, valamint célul tűztük ki a hibridek sterilitása ill. ritkán jelentkező fertilitása okának molekuláris módszerekkel történő tanulmányozását.

További célkitűzésünk volt, hogy mind a *S. cerevisiae* x *S. uvarum*, mind a *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* fajpárok hibridjei segítségével tanulmányozzuk a hibridekben ill. ivaros utódnemzedékeikben végbemenő genetikai változások egyes jellemző fiziológiai tulajdonságokra gyakorolt hatását.

2. Irodalmi előzmények.

Az eukarióta szervezetek, különösen a növények esetében a fajok közötti hibridizáció fontos evolúciós szereppel bír, gyakran eredményezi új, poliploid fajok létrejöttét, melyek a szülőfajok közel teljes genomjával rendelkeznek (pl. Bento, 2008). Az élesztőgombák esetében ezzel szemben gyakori, hogy az interspecifikus hibridek aneuploidok, a szülőfajok genomjának csak egyes részeit tartalmazzák. Ezek között előfordulnak azonban külön fajnak tekintett, hibrid eredetű taxonok, mint pl. a lager-sőrélesztő (*Saccharomyces pastorianus*) (Libkind et al., 2011). A részleges hibridek mellett a borászati *Saccharomyces*-élesztők között ismertek euploid, teljes hibridek is (pl. Sipiczki, 2008; Borneman et al., 2011), melyekhez hasonlók laboratóriumi körülmények közt is előállíthatók és tanulmányozhatók (pl. Antunovics et al., 2005). Így a *Saccharomyces*-fajok az interspecifikus hibridizáció jelenségének tanulmányozására különösen alkalmas modellszervezetek, mesterséges keresztezésük során pedig jelentős előnyt jelent, hogy a hibridek szülői törzsei ismertek, ellentétben a természetből izoláltakkal.

A fajok közötti hibridizációnak fontos szerepe van a iparilag jelentős élesztőtörzsek létrejöttében is - számos különböző steril hibridet izoláltak már fermentációs körülmények közül Európa-szerte (pl. González et al., 2006;

Lopandic et al., 2007; Sipiczki, 2008; Peris et al. 2012a-b). Újabban pedig a mesterségesen keresztezett élesztők ipari felhasználásának kutatására is egyre több példa akad (pl. Bellon et al., 2013).

A fajok közötti hibridizáció folyamatainak vizsgálata során a hibridek szaporodóképessége, fertilitása fontos szereppel bír. Az élővilágban az egyes fajok között reproduktív izolációs barrierek működnek, általánosan megfigyelhető jelenség a pre-ill. posztzigotikus izoláció (pl. Wolf et al., 2010; Maheshwari & Barbash, 2011). A posztzigotikus izoláció által elválasztott fajok hibridjei lehetnek életképesek, azonban ivaros szaporodásra képtelenek (emiatt evolúciós zsákutcát jelenthetnek). Ugyanakkor abban az esetben, ha a hibrid organizmus mitotikus szaporodásra képes, a sterilitás ellenére is életképes populációt hozhat létre, amint az pl. a *Saccharomyces* genuszba tartozó élesztőgombák esetében ismert (ez a jelenség leginkább a steril növények vegetatív szaporodásával analóg) (Sipiczki, 2008; Morales & Dujon, 2012).

A posztzigotikus izoláció jelentette akadály megkerülésének egyik módja a poliploidizáció: a poliploid (leggyakrabban tetraploid) hibrid eredetű fajokra számos példa ismert az élővilágban, elsősorban a növények között (pl. Hegarty & Hiscock, 2008; Schatlowksi & Köhler, 2012).

Ugyanakkor az azonos genuszba tartozó fajok kereszteződésével létrejött élesztőhibridekről ismert, hogy az allotetraploidizációt követően, bár képesek életképes F1 meiotikus generáció létrehozására, az utódjaik nagyrészt sterilek. Így - elsősorban az aszkuszos élesztők között - megkülönböztethető egy F1 sterilitási barrier, melynek mechanizmusa nem volt ismert (Greig, 2009). Ez a sterilitási barrier azonban ritka esetekben átléphető (pl. Antunovics, 2005). Az életképes és fertilis utódgenerációkkal rendelkező élesztőhibridek segítségével lehetőség nyílik olyan, evolúciós szempontból jelentős folyamatok tanulmányozására, mint pl. az allopoloid genomok nagymérvű változásai.

Munkánk során a *Saccharomyces cerevisiae* (borélesztő v. pékélesztő) és a *Saccharomyces uvarum* (korábban *S. bayanus* var. *uvarum* (Nguyen & Gaillardin, 2005)) nevű, leginkább hidegen erjesztett borokból ismert élesztőfaj mesterségesen létrehozott hibridjei és azok ivaros utódnemzedékei segítségével vizsgáltuk az F1 sterilitási barrier átlépésének mechanizmusát, valamint a hibrid genomokban bekövetkező változásokat, modellezve így a természetben is lejátszó folyamatokat (Pfliegler et al., 2012).

Korábbi tanulmányok megállapították, hogy az ivaros szaporodásra képes hibridek utódaiban fokozatos genomstabilizáció ill. redukció játszódhat le, mely az allopoloid

genetikai állomány egy részének elvesztésével jár (pl. Antunovics, 2005). A természetes módon létrejött hibrid eredetű törzsek esetén is megfigyelhető az allopoloid genom redukciója ill. átrendeződése, valamint az introgresszió jelensége, ezeknek a folyamatoknak pedig - a genom újrendezése által - jelentős hatásuk van az egyes élesztőtörzsek fiziológiai jellemzőire (pl. Naumova et al., 2005; Lopandic et al., 2007; Belloch et al., 2009). Emiatt a fajok közötti hibridizáció folyamatának vizsgálata nem csak az evolúciókutatás szempontjából, hanem az élelmiszer-mikrobiológia és biotechnológia számára is érdekes eredményekkel szolgálhat.

A hibrid élesztők ivaros generációiban fellépő genomszintű változások hatását a törzsek fiziológiai tulajdonságaira a már említett *S. cerevisiae* x *S. uvarum*, valamint az *S. cerevisiae* és a *S. kudriavzevii* nevű faj hibridjei és azok utódai segítségével vizsgáltuk, összehasonlítva őket a szülői törzsekkel, valamint a természetből izolált hibrid eredetű törzsekkel (Pfliegler et al., publikálás alatt).

Kísérleteink során így az élesztőfajok közötti hibridizáció jelenségét genetikai ill. evolúciós szempontból, valamint a fiziológia és az élelmiszer-mikrobiológia szempontjából is vizsgálatnak vetettük alá.

3. Módszerek.

3.1. Törzsek és hibridizáció.

Munkánk során a természetből izolált hibrideken kívül eltérő auxotróf mutációkkal rendelkező (azaz bizonyos aminosavakat vagy nukleotidokat igénylő) szülői törzsek keresztezésével állítottunk is elő hibrid törzseket. A hibridekben a szülői auxotróf mutációk nem jelennek meg (prototrófok), ami megkönnyíti izolálásukat minimál táptalajon. Törzseinket fiziológiai (szénforráshasznosítási képesség, hőmérsékletérzékenység) és PCR-RFLP módszerekkel is megvizsgáltuk, bizonyítandó hibrid mivoltukat, valamint kromoszómamintázatukat is analizáltuk. Az ivaros szaporodásra képes hibrid törzsek spóráit mikromanipulátor segítségével izoláltuk, az életképes spórákból kinőtt telepek jelentették az F1 nemzedéket (hasonlóan nyertük az F2 nemzedéket a spórázni képes F1 törzsek aszkuszaiból, és így tovább). A *Saccharomyces*-fajok aszkuszaiban általában 4-4 spóra található, ezeket együttesen tetrádként szokás említeni. A tetrádok tagjait betűkkel jelöltük (a-d). Valamennyi törzsünket -70°C -on, törzsgyűjteményünkben tároltuk és mindig csak a kísérletekhez szükséges ideig tartottuk fenn táptalajon, elkerülendő genetikai megváltozásukat.

3.2. Fiziológiai vizsgálatok.

Törzseink számos fiziológiai tulajdonságát (auxotrófia, hőmérséklet-érzékenység, spórázóképeség, spórák életképessége) megvizsgáltuk az életképesség ill. szaporodóképesség változásainak nyomonkövetésére. A fiziológiai tulajdonágokra vonatkozó tanulmányunk során (második tanulmány) a fenotipizáló microarray-tálcák segítségével nagyszámú különböző körülmény között teszteltük hibridjeinket, majd ezen előzetes adatok alapján a legjelentősebb különbségeket mutató szénhidrátokkal, ozmotikus stresszorokkal és antibiotikumokkal végeztünk részletes tesztekkel négy-négy ismétlésben, összehasonlítva az egyes szülőfajok, hibridek és utódtörzsek növekedésének ütemét. A kísérletek során az élesztőkkel beoltott különböző tápfolyadékokban az optikai denzitás (OD) változását követtük nyomon mikrotálca-leolvasó készülék segítségével, 24 órás időközönként méréseket végezve 6 napon keresztül.

3.3. Molekuláris módszerek.

Törzseink molekuláris karakterizálására PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism) és RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA) módszereket, valamint interdelta-tipizálást használtunk.

Az RFLP-vizsgálatok során különböző kromoszómákon elhelyezkedő gének restrikciós profilját elemeztük törzseinkben (a profilok a különböző szülőfajokban eltérőek voltak). Emellett az ún. párosodási típust meghatározó lokusztól a kromoszómán mindkét irányban elhelyezkedő géneket is megvizsgáltunk ezzel a módszerrel, ezen lokusz sorsának a pontos nyomon követése érdekében.

A sterilitási barrierre vonatkozó tanulmányunk során (első tanulmány) két különböző, általánosan használt RAPD primer segítségével végeztük el a törzsek fingerprinting vizsgálatát, valamint a csak a *S. cerevisiae* szülőfajban megtalálható ún. delta-szekvenciák változásait is nyomon követtük a hibridek genomjaiban egy, az ezekre a genomban elszórtan előforduló szekvenciákra tervezett primerpár segítségével. A fiziológiai tulajdonságokra vonatkozó tanulmányunkban AFLP vizsgálatokat végeztünk, a fragmentek analíziséhez az automatizált kapilláris-elektroforézis módszerét használva.

A kromoszómák vizsgálatához CHEF-elektrokariotipizálást (contour-clamped homogeneous electric field) végeztünk, ez a módszer lehetővé teszi a DNS-molekulák méretalapú elválasztását agaróz gélben. Az első tanulmányunkban a *S. cerevisiae*-eredetű kromoszómavégek beazonosításához az elektrokariotipizálással összekötve Southern blot eljárást is

alkalmaztunk egy olyan próbával, mely ezen faj telomerjeihez kötődik (az ún. Y'-szekvenciához).

3.4. Élesztőtranszformáció.

A sterilitási barrierre vonatkozó tanulmányunkban egy újonnan tervezett primerpár segítségével a *S. uvarum* faj párosodási típust meghatározó lokuszát (*MAT*-lokusz) PCR-rel amplifikáltuk, majd a pEVP11 nevű élesztőplazmidba klónoztuk. Az így készült konstruktot használva egy *S. cerevisiae*-törzset transzformáltunk elektroporáció alkalmazásával.

4. Eredmények és értékelésük.

Munkánk során a *S. cerevisiae* és *S. uvarum* fajok hibridjeit ill. azok utódnemzedékeit vizsgálva elsősorban a *S. uvarum* szülőfajtól származó szubgenomot érintő változásokat mutattunk ki. A változások érintették a RAPD-markereket, valamint több kromoszomális gént is. Ezek a változások nem kötődtek kromoszomavesztésekhez. Az *S. cerevisiae* szubgenomban lényegesen kevesebb változást tapasztaltunk. Mindössze néhány hibrid F1 nemzedékében bukkant fel az *S. uvarum* faj auxotróf markere, ami az *S. cerevisiae*-eredetű allél elvesztére utal. Emellett a *cerevisiae*-transzpozonokhoz köthető (és törzsidentifikálásra is alkalmas) ún. delta-szekvenciákban mutatkoztak különbségek a hibridek utódaiban.

Az általunk vizsgált hibridek között előfordultak steril törzsek (feltételezhetően allodiploidok), valamint olyanok is, melyek életképes meiotikus utódokkal rendelkeztek (allotetraploidok). Ez utóbbiak között gyakori volt az utódok sterilitása, vagyis az F1 sterilitási barrier megfigyelhető volt. Egyes esetekben azonban az F1 nemzedékbe tartozó törzsek között akadtak olyanok, melyek életképes utód-tetrádokat hoztak létre. A hibridek sterilitásának ill. fertilitásának vizsgálata során felderítettük az F1 sterilitási barrier átlépésének okát ill. mechanizmusát. A kísérleteink során tett

legfontosabb felfedezés, hogy a hibrid élesztőkben az egyik szülőfajtól származó, párosodási típust hordozó kromoszóma elvesztésével alakulhat ki az ivaros szaporodás öröklődő képessége, vagyis az F1-sterilitás által jelentett barrier áttörhető. Az élesztők párosodási típusai a magasabb rendű élőlények ivaraival analógok, a kétféle párosodási típust a *S. cerevisiae* fajnál a III. kromoszómán elhelyezkedő *MAT* lokusz kétféle allélje határozza meg. A diploid sejtekben mindkét allél jelen van, ezek a sejtek más sejtekkel nem párosodnak, meiózissal pedig spórákat hozhatnak létre. Az eredményeink alapján felállított modellünk szerint a tetraploid hibridekben a meiózis során elveszhet az egyik *MAT*-lokuszt hordozó kromoszóma, így az a létrejövő aneuploid utódokba nem jut be. Emiatt ezekben a ritka esetekben a hibrid eredetű F1 nemzedék tagjaiban egyetlen *MAT*-példány marad meg. Így a kromoszómát vesztett törzsek sejtjei képesek a párosodásra, ezáltal pedig a közel-tetraploid állapot visszaállítására is. Ennek következtében ezek a törzsek egyrészt képesek az ivaros szaporodására, másrészt utódaik is továbbszaporodhatnak. Tanszékünkön így elsőként írtunk le egy olyan folyamatot, melynek során fajok közötti hibrid élőlények kromoszómavesztés által válnak fertillissé.

A hibridek és utódaik fiziológiai változásaira, valamint a genomi és fiziológiai változások kapcsolatára irányuló

vizsgálataink keretében a következő kulcskérdésekre kerestünk választ: (1) Hogyan változik a hibrid élesztők genomja az evolúciójuk során? Az AFLP-eredmények megmutatták, hogy egyik vagy mindkét szubgenomban diverz változások mehetnek végbe, illetve, hogy ezek a hibrid genomok néhány generáció alatt állandó körülmények között stabilizálódhatnak is. A természetes izolátumok nagyobb változékonyságot mutattak a mesterségesen létrehozott hibridekhez képest az AFLP-mintázatokat tekintve. (2) Hogyan változik a hibrid élesztők fenotípusa az evolúciójuk során? Az általunk létrehozott és vizsgált hibridek és azok utódai bizonyos tulajdonságokban felül-, másokban pedig alulmúlták a szülőknek használt törzseket. A természetes izolátumok kisebb változatossággal bírtak, ezek minden bizonnyal evolúciós nyomásra optimalizálták genomjukat az élőhelyükhöz. A cukrok felhasználásának képessége a szülőfajoktól függött, míg az ozmotikus stressztűrés és az antimikrobiális anyagok jelenlétében történő növekedés esetén nagyfokú variabilitást, új fenotípusok létrejöttét is megfigyeltük. (3) Milyen a vizsgált törzsek biotechnológiai felhasználhatósága? Egyes törzsek (*S. kudriavzevii* x *S. uvarum*) jobban hasznosították a raffinózt és a melibiózt, mint a szülői törzsek, valamint ozmotikumok jelenlétében is előfordult, hogy a hibridek jobban nőttek a szülőknél. A

kívánatos tulajdonságokkal bíró törzseket a későbbiekben érdemes lenne biotechnológiai szempontból egy következő kutatásban alaposabban megvizsgálni. Így genom- és expresszió-szinten tanulmányozható lenne a hibridek és azok ivaros szaporodással létrejött utódainak biotechnológiában való felhasználhatósága.

Az új tudományos eredmények felsorolása:

1. A posztzigotikus F1 sterilitási barrier megszűnhet a párosodási típust meghatározó lokuszt hordozó kromoszóma elvesztésével, stabilan öröklődő fertilitást eredményezve a hibridek utódaiban.
2. Az interspecifikus hibridek meiotikus utódgenerációiban genomátrendeződés történik.
3. A vizsgált természetből izolált hibrid élesztőtörzsekben is kimutatható nagyfokú genomiális redukció, átrendeződés - fiziológiai tulajdonságaik, vélhetően a természetes körülményekhez való alkalmazkodás következményeként, mégis kevésbé változatosak.
4. A hibridizáció során a genomok átrendeződésének egyfajta irányultsága van, a *S. cerevisiae* genom sok esetben stabilabb, kevesebb változáson megy keresztül.
5. A hibridizációt követően végbemenő genomiális változások következményekkel járnak az utódtörzsek fenotípusában, változik a törzsek metabolikus aktivitása, stressztűrése, több esetben teljesen új fenotípusok megjelenése is tapasztalható.

5. Köszönetnyilvánítás.

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Sipiczki Mátyásnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy szakdolgozóként, majd doktoranduszként irányítása alatt a tanszéki munkába kapcsolódjak. Köszönöm Gálné Dr. Miklós Idának, tanszékvezetőnknek támogatását, Dr. Ksenija Lopandicnak pedig (Bécs, BOKU), hogy irányításával részt vehettem az Universitát für Bodenkultur-ban végzett, tanszékünkkel közös fiziológiai projektben. Köszönet illeti szerzőtársaimat, elsősorban Dr. Antunovics Zsuzsát és Karanyicz Edinát, továbbá a tanszékünk munkatársait, technikusait és PhD-hallgatóit és az Universitát für Bodenkultur - Institut für angewandte Mikrobiologie munkatársait nélkülözhetetlen segítségükért.

Vizsgálatainkat az OTKA K81792 és a TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, valamint a Stiftung Aktion Österreich-Ungarn 83ÖU12 számú támogatásai tették lehetővé.

Analysis of the hybridisation processes of yeasts.

1. Aims.

During our study we investigated some aspects of the interspecific hybridisation using 3 species of the ascomycetous yeast genus *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* - bakers' or wine yeast; *S. uvarum*; *S. kudriavzevii*). These yeasts can be hybridised in artificial conditions, furthermore, there are various established methods for the analysis of these organisms, thus they proved to be ideal model organisms for our experiments.

Using the *S. cerevisiae* x *S. uvarum* species pair, we constructed hybrids and isolated their offspring generations, aiming to study the changes and stabilization of hybrid genomes that occur during the formation of sexual generations. Using molecular methods, our aim was also to study the reasons behind the sterility and the rarely observable fertility of hybrids.

We also designed experiments to investigate how the genetic changes in the hybrids of the species pairs *S. cerevisiae* x *S. uvarum* and *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* and their meiotic offspring affect some key physiological properties.

2. Review of literature

Interspecific hybridisation is known to have an important role in the evolution of eukaryotic organisms (mostly in that of plants), often resulting in the formation of new, polyploid species that incorporate the nearly-complete genomes of the parent species (e.g. Bento, 2008). In contrast with this, aneuploid hybrids are common among yeasts - these contain only the partial genomes of the parents. Among these, there are hybridogenous taxa regarded as separate species, e.g. the lager brewing yeast (*Saccharomyces pastorianus*) (Libkind et al., 2011). Among the *Saccharomyces* wine yeasts, euploid complete hybrids are also known besides the partial ones (e.g. Sipiczki, 2008; Borneman et al., 2011), the like of which can also be produced and studied in laboratory environments (e.g. Antunovics et al., 2005). Thus, the *Saccharomyces* species are model organisms particularly suitable for studying the processes of interspecific hybridisation. Their artificial crossing has the significant advantage that the parental strains of the hybrids are known, in contrast with the natural ones.

Interspecific hybridisation also has an important role in creating strains significant for the fermentation industry: several different hybrid strains have been isolated from fermentation environments across Europe (e.g. González et al., 2006; Lopandic et al., 2007; Sipiczki, 2008; Peris et al. 2012a-

b). Additionally, more and more studies are focusing on the industrial use of artificially crossed yeasts (e.g. Bellon et al., 2013).

The reproductive capability, fertility of hybrids has a significant role in the analysis of the processes of interspecific hybridisation. Among all groups of organisms, reproductive isolation barriers act between species, the phenomena of pre- and postzygotic isolation are widely known (e.g. Wolf et al., 2010; Maheshwari & Barbash, 2011). The hybrids of species isolated by postzygotic mechanisms may be viable, but are incapable of sexual reproduction (generally, they mean an evolutionary dead-end). In cases when the organism is able to reproduce mitotically, it may establish a viable population despite its sterility, as known, for example, among the yeasts of the genus *Saccharomyces* (this phenomenon is analogous to the vegetative reproduction of plants) (Sipiczki, 2008; Morales & Dujon, 2012).

One of the means of circumventing postzygotic isolation is polyploidization: polyploid (mostly tetraploid) hybridogenous species are known from several examples, mainly from the plant kingdom (e.g. Hegarty & Hiscock, 2008; Schatlowksi & Köhler, 2012). However, it is known that allotetraploid yeast hybrids that originate from the crossing of two species belonging to the same genus (even if they are capable of

producing a meiotic F1 generation) behave else: their progenies are mostly sterile. Thus, mostly in ascomycetous yeasts, a second postzygotic sterility barrier, the F1 barrier is acting, the mechanism of which was unknown (Greig, 2009). In rare occasions, however, this barrier may be broken down (e.g. Antunovics, 2005). Yeast hybrids with viable and fertile offspring generations enable the study of evolutionarily significant processes, such as the large-scale changes in allopolyploid genomes.

During the course of our project, we examined the mechanism of the break-down of the F1 sterility barrier and the changes in the hybrid genomes using artificial hybrids of the species *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) and *Saccharomyces uvarum* (which is mainly known from cold-fermented wine musts and was formerly known as *S. bayanus* var. *uvarum* (Nguyen & Gaillardin, 2005)), thus modelling the natural processes occurring in yeast hybrids (Pfliegler et al., 2012).

Earlier studies have concluded that in the filial generations of fertile hybrids, a gradual genome stabilization and reduction may take place, resulting in the loss of some parts of the allopolyploid genome (e.g. Antunovics, 2005). In natural hybrids, the reduction and rearrangement of the allopolyploid genome is also observable, along with the phenomenon of introgression.

By reshaping the genome, these processes have a significant effect on the physiological properties of certain yeasts strains (e.g. Naumova et al., 2005; Lopandic et al., 2007; Belloch et al., 2009). This means that studying the process of interspecific hybridisation may not only produce interesting results in the study of evolution, but also in the fields of food microbiology and biotechnology.

Using the aforementioned *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hybrids and hybrids of *S. cerevisiae* and another species, *S. kudriavzevii*, we studied the effects of genome-scale changes on the physiological properties of the strains, comparing them to their parent species and to hybrid strains isolated from natural environments (Pfliegler et al., under publication).

Thus, during our work, we examined the phenomenon of interspecific hybridisation from an evolutionary and genetic, and also from a physiological and food-microbiological viewpoint.

3. Methods.

3.1. Strains and hybridisation.

During our experiments, along with natural hybrids, we also used artificial ones created by hybridising parental strains which possessed different auxotrophic mutations (these mutants require certain amino acids or nucleotides). In hybrids, these auxotrophies are not apparent in the phenotype (they are prototrophs), which enables the quick selection of hybrids on minimal medium. Our strains were tested physiologically (utilization of carbon sources, temperature sensitivity) and with PCR-RFLP methods to prove their hybrid origins and their chromosomal composition was also analysed. We isolated the spores of the strains that were capable of sexual reproduction using a micromanipulator and the colonies grown from viable spores were used as F1 generations (similarly, we isolated the F2 generation from asci of F1 strains that were capable of producing spores, and so on). There are usually 4 spores in each ascus of *Saccharomyces* yeast species, which together are referred to as a tetrad. We designated the members of a given tetrad with letters (a-d). Every strain was conserved at -70°C in our strain collection and they were kept on solid medium only for as long as needed for the experiments, to prevent them from accumulating genetic changes.

3.2. Physiological tests.

Numerous physiological properties of our strains have been tested (auxotrophy, temperature-sensitivity, sporulation capability) to track changes in viability and fertility during the meiotic generations. During our study about phenotype changes in meiotic generations of hybrids (second study), we used phenotyping microarray plates to test our strains under a large number of different conditions, than we conducted detailed experiments (in quadruplicates) using the carbon sources and osmotic stressors that showed the most significant differences in the preliminary experiments. Thus we compared the growth rates of the parent species, hybrids and their offspring. For these analyses, the changes in the optical density (OD) were tracked in fluid media inoculated with the yeast strains using a microplate reader. Measurements were carried out every 24 hours for a period of 6 days.

3.3. Molecular methods.

For the molecular characterisation of our strains, PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism) and RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA) methods were used, as well as the so-called interdelta genotyping.

During the RFLP experiments, restriction profiles for several genes located on different chromosomes were analysed (the profiles were different in the parent species). This method was also used for testing genes located on both sides of the chromosome bearing the so-called mating type locus, to track the fate of this locus in our strains.

In the course of our study concerning the sterility barrier (first study) we used two different, widely used RAPD primers to conduct fingerprinting analysis on our strains. We also tracked the changes in the hybrid genomes affecting the so-called delta sequences (these sequence were only present in the *S. cerevisiae* parent species) by using a primer pair specific to these sequences. In our study about physiology of yeast hybrids (second study) we conducted AFLP-analysis on our strains, applying automated capillary electrophoresis to study the fragments produced.

Chromosomes were studied using CHEF-electrokaryotyping (contour-clamped homogeneous electric field). This method allows the separation of DNA molecules based on their size in agarose gel. In our first study, we used electrokaryotyping along with Southern blotting to identify *S. cerevisiae* chromosome ends using a probe specific to the so-called Y' telomeric sequences of this species.

3.4. Yeast transformation.

In our study about the sterility barrier, a newly designed primer pair was used to amplify the mating type locus (*MAT* locus) of the *S. uvarum* species with PCR, than this product was cloned into a yeast plasmid (pEVP11). The construct was used to transform a *S. cerevisiae* strain using electroporation.

4. Results and discussion.

In our study we detected changes in the *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hybrids and their filial generations mainly affecting the *S. uvarum* subgenome. The genomic changes were observed in the RAPD-markers and also several chromosomal genes. These changes were not linked to chromosome-scale alterations. We detected much less changes in the *S. cerevisiae* subgenome. Only in a handful of hybrid F1 generations was the auxotrophic marker of *S. uvarum* found, suggesting the loss of the *S. cerevisiae* allele. In addition, differences in the offspring of hybrids were detectable in the so-called delta sequences, which are linked to transposons (and are used in strain fingerprinting).

Among the hybrids analysed in our study we could detect sterile ones (probably allodiploids) and strains that could produce viable meiotic offspring (allotetraploids). Among the latter, the sterility of the F1 strains was common, the F1 sterility barrier was observed. In some cases, however, F1 strains with viable offspring tetrads could also be detected. During the examination of hybrid sterility and fertility, we managed to uncover the cause and mechanism of the breakdown of the F1 sterility barrier. The most interesting discovery of the experiments is that in the hybrid yeasts, the loss of a chromosome of one parent species that bears the mating-type

determining locus results in the heritable ability for sexual reproduction, meaning that the F1 sterility barrier can be broken down. The mating types of yeasts are analogous to the genders of multicellular organisms, and the two different mating types are determined by the two alleles of the *MAT* locus on the chromosome III. in *S. cerevisiae*. In diploid cells, both alleles are present, these cells do not mate with others, but can produce meiotic spores. According to our model erected using our experimental results, in tetraploid hybrids, the *MAT*-bearing chromosome of one parental species may be lost in meiosis, meaning that it will be missing in the aneuploid offspring. In these rare events, the strains of the hybrid F1 will possess only one *MAT*-copy. The result of this chromosome loss is that these strains will be capable of pairing (being hemizygous for *MAT*) and restoring the near-tetraploid state. This means that these strains and even their offspring are capable of sexual reproduction. Thus, according to our knowledge, we were the first to describe a process when interspecies hybrids become fertile by the loss of a chromosome.

In our project concerning the physiological changes of the hybrids and their filial generations, and the connections between genomic and physiological changes, we aimed to answer 3 key questions: (1) How does the genome of hybrid

yeasts change during the course of their evolution? The results of the AFLP analysis have showed that in one or both subgenomes, diverse changes may happen. Also, these hybrid genomes may also be stabilized in a few generations under unvarying conditions. The natural isolates showed a higher level of diversity compared to the artificial hybrids in the AFLP-patterns. (2) How does the phenotype of hybrids change if they reproduce sexually? The artificial hybrids and their offspring exceeded their parent strains in some properties, whereas in others they showed a reduced growth capability. Interestingly, the natural isolates showed less diversity, these very probably have already optimised their genomes during their evolution to the environment they were isolated from. (3) What characterises the biotechnological usability of the strains analysed? The capability of assimilating different sugars depended on the parent species, whereas regarding the osmotic stress tolerance and growth rates in the presence of antimicrobial substances, a high degree of variability and novel phenotypes were detected. Some strains (e.g. *S. kudriavzevii* x *S. uvarum*) showed an improved utilisation capability regarding raffinose and melibiose, and also some hybrids were found to grow better at osmotic stress conditions than their parents (*S. cerevisiae* x *S. uvarum* and *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*). It would be interesting to study the strains

with potential biotechnological value more thoroughly in another project. Thus, the biotechnological usability of hybrid strains and their meiotic offspring could be studied on the level of genome and gene expression.

List of novel scientific results:

1. The postzygotic F1 sterility barrier can be broken down by the loss of the chromosome that bears the mating type locus, resulting in a stably heritable fertility in the offspring of the hybrids.
2. Genome rearrangement takes place in the meiotic filial generations of interspecific hybrids.
3. In the natural hybrids analysed, a notable genome reduction took place, however, their physiological diversity was less significant, probably because of adaptations to the natural environment.
4. Directional changes are traceable in the hybrid genomes: in most cases, the *S. cerevisiae* genome is more stable and it is less affected by changes.
5. The genomic changes following the hybridisation also affect the physiological properties of filial strains. The metabolical activity and stress tolerance are affected by these changes, and also, completely novel phenotypes may arise.

5. Acknowledgements.

I am indebted to my supervisor, Dr. Matthias Sipiczki, who enabled me to join the projects at the department with his tutorship first as masters student, than as PhD-student. I would like to thank Dr. Ida Miklós, our department leader, for her support and Dr. Ksenija Lopandic (Vienna, BOKU), for that I could take part in the joint project studying genomes and physiology of hybrids with her supervising at the Universität für Bodenkultur. I thank my co-authors, principally Dr. Zsuzsa Antunovics and Edina Karanyicz, and the co-workers, technicians and PhD-students at our department and the staff of the Universität für Bodenkultur - Institut für angewandte Mikrobiologie for their essential help.

Our projects were financed by the Hungarian research funds OTKA K81792 and TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, and also by the Stiftung Aktion Österreich-Ungarn 83ÖU12 fund.

Irodalom - References.

- Antunovics Z, Nguyen HV, 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: 1141–1150.
- Belloch C, Pérez-Torrado R, González SS, Pérez-Ortyn JE, García-Martínez J, Querol A (2009) Chimeric genomes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2534-2544.
- Bellon JR, Schmid F, Capone DL, Dunn BL, Chambers PJ (2013) Introducing a New Breed of Wine Yeast: Interspecific Hybridisation between a Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast and *Saccharomyces mikatae*. *PLoS One* 8: e62053.
- Bento M, Pereira HS, Rocheta M, Gustafson P, Viegas W & Silva M (2008) Polyploidisation as a reaction force in plant genome evolution. Sequence rearrangements in triticale. *PLoS ONE* 3: e1402.
- González SS, Barrio E, Gafner J & Querol A (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res* 6: 1221–1234.

- Greig D (2009) Reproductive isolation in *Saccharomyces*. *Heredity* 102: 39–44.
- Hegarty MJ & Hiscock SJ (2008) Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Curr Biol* 18: R435–R444.
- Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, Gonçalves P, Sampaio JP (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *PNAS* 108:14539-44.
- Lopandic K, Gangl H, Wallner E, Tscheik G, Leitner G, Querol A. (2007) Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res* 7: 953-965.
- Maheshwari S, Barbash DA (2011) The genetics of hybrid incompatibilities. *Annu Rev Genet* 45:331-55.
- Morales L, Dujon B (2012) Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:721-39.
- Naumova ES, Naumov GI, Masneuf-Pomarède I, Aigle M (2005) Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast* 22: 1099-1115.

- Nguyen H-V & Gaillardin C (2005) Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*: reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. *FEMS Yeast Res* 5: 471–483.
- Peris D, Belloch C, Lopandic K, Álvarez-Pérez JM, Querol A, Barrio E (2012a) The molecular characterization of new types of *Saccharomyces cerevisiae* x *S. kudriavzevii* hybrid yeasts unveils a high genetic diversity. *Yeast* 29: 81-91.
- Peris D, Lopes CA, Belloch C, Querol A, Barrio E (2012b) Comparative genomics among *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. *BMC Genomics* 13 Article No. 407.
- Pfliegler WP, 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.
- Schatlowski N, Köhler C (2012) Tearing down barriers: understanding the molecular mechanisms of interploidy hybridisations. *J Exp Bot* 63:6059-67.

Sipiczki M (2008) Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. FEMS Yeast Res 8: 996–1007.

Wolf JB, Lindell J, Backström N. (2010) Speciation genetics: current status and evolving approaches. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 365:1717-33.

Függelék - Supplement.

A kutatáshoz kapcsolódó megjelent közlemények listája.

List of the released publications related to the research.

Folyóiratközlemények. Journal articles.

Sipiczki M, Pfliegler WP, Holb IJ (2013) *Metschnikowia* species share a pool of diverse rRNA genes differing in regions that determine hairpin-loop structures and evolve by reticulation. PLOS One xx: xxx-xxx. (accepted for publication)

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

Sipiczki M, Csoma H, Antunovics Z, Pfliegler W (2010) Biodiversity in yeast populations associated with botrytised wine making. Mitteilungen Klosterneuburg. 60: 387-394.

Konferenciaelőadások. Conference presentations.

Pfliegler W, Antunovics Z, Sipiczki M. A genom-stabilizáció analízise *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces uvarum* fajok közti hibridek esetén. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése. 15-17.10.2008. Keszthely, Hungary.

Pfliegler W, Antunovics Z, Sipiczki M. Fajok közötti allopoloid hibridek genomstabilizációs folyamatai *Saccharomyces*-eknél. Genetikai Műhelyek Magyarországon 8. - minikonferencia. 11.09.2009. Szeged, Hungary.

Antunovics Z, Pfliegler W, Sipiczki, M. Kromoszómavesztés következtében fertilissé vált alloaneuploid interspecifikus élesztőhibridek és utódnemzedékeik molekuláris genetikai vizsgálata. IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. 25-27.03.2011. Siófok, Hungary.

Pfliegler W, Antunovics Z, Sipiczki M. Interspecific *Saccharomyces* hibrids reveal a new way of breaking down the sterility barrier. 39th Annual Conference on Yeasts. 3-6.05.2011. Smolenice, Slovakia.

Sipiczki M, Pfliegler WP, Antunovics Z, Karanyicz E. Interspecies gene transfer in wine yeasts: a safe alternative to GMO technology. ENOFORUM 2013, 7-9.05.2013. Arezzo, Italy.

Konferenciapozterek. Conference posters.

Pfliegler W, Sipiczki M. Delta-szekvenciák szegregálása *Saccharomyces* fajok inter-specifikus hibridjeinek allopoloid genomjában. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus és XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. 17-19.04.2009. Nyíregyháza, Hungary.

Lopandic K, Pfliegler W, Karanyicz E, Sipiczki M, Sterflinger K. Studying the genome stabilisation by artificially constructed and native yeast interspecies hybrids. EMBO Conference Series on Experimental Approaches to Evolution and Ecology Using Yeast. 17-21.10.2012. Heidelberg, Germany.

A kutatáshoz nem kapcsolódó megjelent közlemények listája.

List of the released publications not related to the research.

Folyóiratközlemények. Journal articles.

Kiss O, Pfliegler W (2011) Az *Odontocerum albicorne* (Scopoli, 1763) életciklusa és biológiája (Trichoptera). e-Acta Naturalia Pannonica 2: 167–178.

László Z, Pfliegler W (2011) Records of a new subfamily, a new genus and three new species of chalcids for the fauna of Hungary (Hymenoptera: Chalcidoidea). Folia Entomologica Hungarica 72: 73-78.

Pfliegler W, Bertrand M (2011): A new species of *Labidostomma* Kramer, 1879 for the fauna of Hungary (Acari: Trombidiformes: Labidostommatidae) with an overview of the family. Opuscula Zoologica Budapest 42: 177-183.

Pfliegler WP, Pfeiffer KM, Grabolle A (2012) Some spiders (Araneae) new to the Hungarian fauna, including three genera and one family. Opuscula Zoologica Budapest 43: 179–186.

Bertrand M, Pfliegler WP, Sciberras A (2012) Does the African native host explain the African origin of the parasite? The Maltese *Geckobia estherae* n. sp. parasitic on *Tarentola mauritanica* (Acari: Raphignathoidea: Pterygosomatidae). Acarologia 52: 353-366.

Aakra K, Morka GH, Antonsen A, Farlund M, Wrånes RE, Frølandshagen R, Løvbekke H, Furuseth P, Fjellberg A, Lemke M, Pfliegler W, Andersen S, Olsen KM, Aadland B, Berggren K (2013) Spiders new to Norway (Arachnida, Araneae) with ecological, taxonomical and faunistic comments. Norwegian Journal of Entomology. xx: xxx-xxx. (accepted for publication)