



1949

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

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

SZABÓ ADRIENN

Témavezető  
Dr. Antunovics Zsuzsa  
Adjunktus

DEBRECENI EGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI DOKTORI TANÁCS

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2023



*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Juhász Nagy Pál Doktori Iskola **Fermentációs biotechnológiai és biomérnöki (Biológia) doktori programjának** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

*Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Debrecen, 2023*

.....  
*Szabó Adrienn*

*Tanúsítom, hogy **Szabó Adrienn** doktorjelölt **2016-2020** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Fermentációs biotechnológiai és biomérnöki (Biológia) doktori programjának** keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét. Az értekezés elfogadását javaslom.*

*Debrecen, 2023*

.....  
*Dr. Antunovics Zsuzsa*

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia tudományágban

Írta: Szabó Adrienn okleveles Biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**  
(**Fermentációs biotechnológiai és biomérnöki (Biológia) doktori programja**) keretében

Témavezető:

Dr. Antunovics Zsuzsa

Az értekezés bírálói

Dr. Keserű Judit Szilvia .....	.....
Dr. Gazdag Zoltán .....	.....

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. Emri Tamás .....	.....
tagok:	Dr. Péter Gábor .....	.....
	Dr. Pusztahelyi Tünde .....	.....
	Dr. Hamari Zsuzsa .....	.....
	Dr. Pfliegler Valter Péter .....	.....

Az értekezés védésének időpontja: 2023.....

## Tartalom jegyzék

<b>1. Bevezetés és Célkitűzés</b>	<b>1</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	<b>3</b>
<b>2.1. A <i>Saccharomyces</i> nemzetség</b>	<b>3</b>
2.1.1. A <i>Saccharomyces</i> fajok szerepe az iparban és a kutatásban	3
2.1.2. Rendszertani áttekintés	4
2.1.3. A nemzetség általános jellemzése	6
2.1.4. A <i>Saccharomyces</i> fajok hőmérséklet-toleranciája	7
<b>2.2. A <i>S. cerevisiae</i> jellemzése</b>	<b>8</b>
2.2.1. A <i>S. cerevisiae</i> genetikai jellemzése	8
2.2.2. A <i>S. cerevisiae</i> életciklusa és ivaros szaporodása	8
2.2.3. A <i>S. cerevisiae</i> párosodási típus meghatározása	10
2.2.4. A <i>S. cerevisiae</i> párosodási típus váltása	11
<b>2.3. A <i>S. cerevisiae</i> mitokondriális genomjának öröklődése</b>	<b>12</b>
2.3.1. A mitokondriális genom öröklődésének általános jellemzése	12
2.3.2. A <i>S. cerevisiae</i> mtDNS-ének jellemzése	13
2.3.3. A mtDNS replikációja	14
2.3.4. A mtDNS rekombinációja	15
2.3.5. A mitokondriális nukleoidok	16
2.3.6. A mitokondriális hálózat	17
2.3.7. A mitokondriumok hasadása	18
2.3.8. A mitokondriális tubulusok fúziója	19
2.3.9. A mitokondriális tubulusok dinamikáját befolyásoló tényezők	20
2.3.10. A mitokondriális tubulusok eloszlása a sarj és az anyasejt között sejtosztódás alatt	20
2.3.11. Petite-mutációk	22
<b>2.4. Az interspecifikus hibridek genetikai jellemzése</b>	<b>24</b>
2.4.1. Az interspecifikus hibridek sterilitásának okai	24
2.4.2. A kiméra genomok eredete	25
<b>2.5. A mitotípus hatása az interspecifikus és intraspecifikus hibridek     fenotípusára</b>	<b>27</b>

2.5.1. A mitonukleáris inkompatibilitás szerepe az interspecifikus hibridek sterilitásában	27
2.5.2. A mitonukleáris és a mito-mito episztázis hatása az intraspecifikus hibridek fenotípusára	28
2.5.3. A mitotípus hatása az interspecifikus hibridek fenotípusára	29
2.5.4. A mitokondriális genom öröklődése interspecifikus hibridekben	31
3. Anyagok és módszerek	34
3.1. Anyagok	34
3.1.1. Törzsek	34
3.1.1.1. A <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i> fajok keresztezéséhez használt törzsek	34
3.1.1.2. A 10-170-es <i>S. cerevisiae</i> törzs genotípusa	34
3.1.1.3. A <i>S. uvarum</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. cerevisiae</i> hármashibridek szülői törzsei	35
3.1.2. Alkalmazott tápközegek	35
3.1.3. A molekuláris kísérletek során alkalmazott oldatok	37
3.2. Kísérleti módszerek	38
3.2.1. Interspecifikus hibridizálás	38
3.2.2. Random spóra analízis	39
3.2.3. A mitotípus meghatározása	39
3.2.3.1. Mitokondriális DNS izolálás	39
3.2.3.2. A mtDNS restrikciós emésztése	40
3.2.3.3. Gélelektroforézis	40
3.2.4. Pulzáló erőterű gélelektroforézis	40
3.2.5. Mitokondriális markerek vizsgálata	41
3.2.5.1. Polimeráz láncreakció (PCR)	41
3.2.5.1.1. Az <i>ATP6</i> , <i>COX2</i> , <i>COX3</i> markerek vizsgálata	41
3.2.5.1.2. A <i>COX1</i> marker vizsgálata	42
3.2.5.2. A <i>COX2</i> PCR termék emésztése <i>SfcI</i> restrikciós enzimmal	43
3.2.5.3. Gélelektroforézis	43
3.2.6. Növekedési teszt	43
3.2.7. Tetrádanalízis	43
4. Eredmények	44
4.1. <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i> hibridek vizsgálata	44

4.1.1. Hibridek izolálása	44
4.1.2. A hibridek kariotipizálása	45
4.1.3. A hibridek mitotipizálása	46
4.1.3.1. A CU3. 7. és a CU4. 3. hibrid mitotípusa	48
4.1.4. A rekombináns hibridek vizsgálata	49
4.1.4.1. Mitotípus alapján való csoportosítás	49
4.1.4.2. Mitokondriális markerek vizsgálata	51
4.1.5. A hibridek fertilitásának vizsgálata	52
4.1.5.1. Random spóra analízis	52
4.1.5.2. Tetrádanalízis mikromanipulációval	53
4.1.6. A hibridek növekedés vizsgálata magas hőmérsékleten és nem-fermentálható szénforráson	54
4.1.7. A spóráklónok vizsgálata	56
4.1.7.1. Növekedés-vizsgálat	56
4.1.7.2. A prototrófia vizsgálata	59
4.1.7.3. Kariotipizálás	59
4.1.7.4. A spóráklónok mitotípusának meghatározása	60
4.1.7.5. A megváltozott mitotípusú spóráklónok mitokondriális génjeinek vizsgálata	62
4.2. <i>S. uvarum</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. cerevisiae</i> interspecifikus hármashibridek mtDNS-ének vizsgálata	63
5. Eredmények megbeszélése	66
5.1. Különböző törzspárosításokból származó hibridek mitotípusa	66
5.2. Homoplazmia	67
5.3. A mtDNS rekombinációja	68
5.4. A rekombináns mitotípussal rendelkező hibridek növekedési képességének vizsgálata magas hőmérsékleten, nem-fermentálható szénforráson	69
5.5. A hibridsterilitás vizsgálata	70
5.6. A mitokondriális genom változása a meiózis során	72
5.7. Az F1 spóráklónok növekedési képességének vizsgálata magas hőmérsékleten	72
6. Összefoglalás	74

<b>7. Summary</b>	<b>78</b>
<b>8. Köszönet nyilvánítás</b>	<b>82</b>
<b>9. Irodalomjegyzék</b>	<b>83</b>
<b>10. Függelék</b>	<b>106</b>
<b>10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények</b>	<b>106</b>
<b>10.2. A hibridizálásokhoz használt szülői törzsek mitokondriális genomja</b>	<b>107</b>

# 1. Bevezetés és Célkitűzés

A *Saccharomyces* nemzetségbe tartozó fajok közé tartoznak a legfontosabb bor- és sörélesztők, valamint a genetikai kutatások egyik legfontosabb modell szervezete, a *Saccharomyces cerevisiae* is (de Vries és mtsi., 2019). A *Saccharomyces* fajok ezenkívül értékes modellként szolgálnak az interspecifikus hibridizációval foglalkozó kutatások számára is (de Vries és mtsi., 2019). Biológiai értelemben a faj populációk azon csoportját jelenti, amelynek tagjai sikeresen képesek egymás között szaporodni és más ilyen csoportoktól reprodukcióval izolálódtak (Mayr, 1940). A *Saccharomyces* fajokat poszt-zigotikus barrier választja el egymástól, ami azt jelenti, hogy képesek egymással interspecifikus hibrideket létrehozni, viszont a hibridek sterilek (Pfliegler és mtsi., 2012). Számos laborhoz hasonlóan a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszéken is évek óta folyik az interspecifikus *Saccharomyces* hibridek genetikai kutatása. A tanszéken folyó korábbi kutatások jelentősen hozzájárultak a hibridsterilitás hátterében álló molekuláris folyamatok, valamint a hibridgenomban végbemenő változások megértéséhez (Pfliegler és mtsi., 2012; Karanyicz és mtsi., 2017). A vizsgálatok azonban eddig nem terjedtek ki a mtDNS hibridsterilitásban betöltött szerepére.

Mára már sok ismeretünk van az interspecifikus hibridek nukleáris genomjában lezajló folyamatokról, viszont a mitokondriális genom öröklődésével kapcsolatban még számos megválaszolatlan kérdés áll a tudomány előtt. Az utóbbi években egyre több publikáció jelent meg, amely a hibridek mitokondriális DNS-ét (mtDNS) összefüggésbe hozta a sterilitással és számos borászati szempontból fontos tulajdonsággal (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010; Albertin és mtsi., 2013; Picazo és mtsi., 2015; Baker és mtsi., 2019; Li és mtsi., 2019). Ezért a mitokondriális öröklődés megértése nem csak az alap kutatások számára érdekes, de az ipar számára is hasznos lehet. A *Saccharomyces* fajok esetében a mtDNS a legtöbb eukarióta élőlényel ellentétben biparentálisan öröklődik: a zigótába bekerül mindkét szülői faj mitokondriális genomja, viszont néhány osztódási ciklus után már csak az egyik fajra jellemző mtDNS mutatható ki a hibridekben (Birky, 1978; Dujon, 1981). Még nem tudjuk viszont, hogy mi határozza meg, hogy melyik szülői faj mtDNS-e fixálódik a hibridekben.

Munkánk során 79 interspecifikus *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces uvarum* hibrid és számos spóráklón mitotípust<sup>1</sup> megvizsgáltuk annak érdekében, hogy tágabb képet kapjunk a

<sup>1</sup> A mitotípus definíció szerint mitokondriális haplotípust jelent, amelyet a jelen dolgozatban a mtDNS restriktív fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) analízisével vizsgáltunk.

mitokondriális öröklődés folyamatáról. A mitokondriális öröklődéssel foglalkozó kutatások jelentős részét ugyanis kisszámú hibriddel végezték. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a mitotípusnak milyen szerepe van a hibridek sterilitásának kialakításában. Meg szeretnénk tudni, hogy a mtDNS változatlanul adódik-e tovább a spóráklónokba vagy bizonyos változásokon keresztül megy a meiózis során. Ezenkívül a mitokondriális öröklődést szintetikus *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* x *S. cerevisiae* hármashibridekben is megvizsgáltuk

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A *Saccharomyces* nemzetség

#### 2.1.1. A *Saccharomyces* fajok szerepe az iparban és a kutatásban

A legfontosabb bor- és sörélesztő fajok a *Saccharomyces* nemzetségbe tartoznak. A *S. pastorianus* és a *S. cerevisiae* a legelterjedtebb sörélesztő, míg a *S. uvarum*, a *S. bayanus*, a *S. cerevisiae* és a *S. paradoxus* a borászatban számít népszerű fajnak (García-Ríos és mtsi., 2019; de Vries és mtsi., 2019). *S. kudriavzevii* törzseket eddig leggyakrabban növények felszínéről izoláltak (Sampaio és Goncalves, 2008; Erny és mtsi., 2012). Érdekes azonban e fajjal kapcsolatban, hogy borászati környezetből való izolálások során magát a törzset nem, viszont genom-részleteit számtalan izolátumban találták meg, főleg *S. cerevisiae* genom mellett (Bradbury és mtsi., 2006; Lopandic és mtsi., 2007; Borneman és mtsi., 2012). Emellett a különböző *Saccharomyces* fajok interspecifikus hibridizálása lehetővé teszi olyan törzsek létrehozását, amelyek új ízvilágot adnak a boroknak, továbbá jobb fermentációs képességgel és stressztűréssel rendelkeznek (Ranieri és mtsi., 1999; Gonzáles és mtsi., 2007; Bellon és mtsi., 2011; Libkind és mtsi., 2011; Bellon és mtsi., 2018).

A *S. cerevisiae* mindezek mellett a genetikai kutatások egyik legfontosabb modell szervezete. Felhasználják az öregedés, a génexpresszió szabályozás, a jelátviteli útvonalak, a sejtciklus, az anyagcsere, a neurodegeneratív betegségek és még számos biológiai folyamat tanulmányozására (Nasheuer és mtsi., 2002; Brocard-Masson és Dumas, 2006; Hohmann és mtsi., 2007; Miller-Fleming és mtsi., 2008; Biddick és Young, 2009; Murakami és Kaeberlein, 2009). A *S. cerevisiae*-ben valószínűleg megtalálható a humán betegségekkel összefüggésbe hozott gének mintegy 30%-ának az ortológja, ami lehetővé teszi, hogy a *S. cerevisiae*-t modell szervezetként használva megértsük ezeknek a géneknek a működését (Bassett és mtsi., 1996; Foury, 1997).

A *S. cerevisiae* fontos modellként szolgál a mitokondriális betegségekkel foglalkozó kutatások számára is. A mitokondriumok nem megfelelő energiatermelése számos humán betegség kiváltó oka, amelyek elsősorban az idegrendszer (pl. Leigh-szindróma), az izomszerveket (mitokondriális miopátiák) és a szív működését (mitokondriális kardiomiopátia) érintik. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy ezeknek a szerveknek a legnagyobb az energiaigénye. A mitokondriumok működéséhez számos biológiai folyamat megfelelő végbemenetele szükséges: a mtDNS replikációja és stabilitása, az oxidatív foszforiláció fehérjekomplexeinek összeszerelődése és működése, a mitokondriális

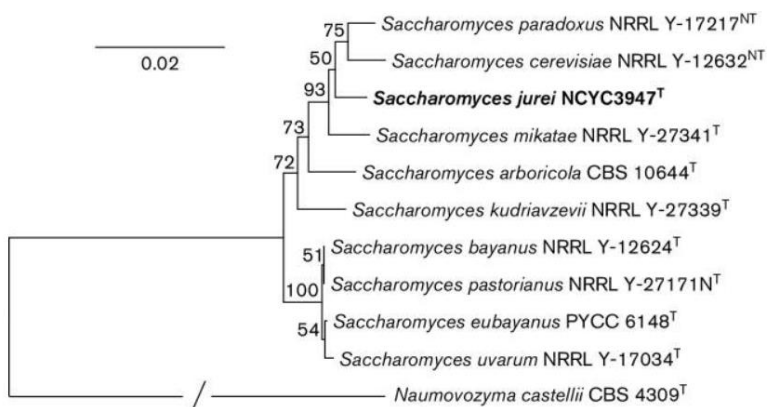
fehérjeszintézis, a mitokondriális tubulusok struktúrájának fenntartása, valamint a mitokondriális hálózat megfelelő dinamikájának biztosítása. Gyógyszerfejlesztés szempontjából fontos azoknak a mutációknak az azonosítása és patomechanizmusának feltárása, amelyek a fent említett folyamatokhoz szükséges fehérjék funkcióvesztését vagy hibás működését eredményezik. A humán és az élesztő gének közötti nagyfokú szekvencia-hasonlóságnak köszönhetően a *S. cerevisiae* számos esetben hozzásegítette a tudományt ezeknek a mutációknak a megismeréséhez. Mivel az *in vitro* sejtkultúrák mtDNS-nek genetikai módosítása még mind a mai napig körülményes, a *S. cerevisiae* továbbra is vezető szerepet tölt be a mtDNS patológiás mutációinak vizsgálatában (Rinaldi és mtsi., 2010).

A *Saccharomyces* fajok jó modellként szolgálnak a genom-hibridizációval, kromoszóma szegregációval és aneuploiditással kapcsolatos kutatások számára is, ugyanis a kromoszómák szegregációjának a hibája gyakran megfigyelhető a *Saccharomyces* hibrideknél a mitózis és a meiózis során (Chambers és mtsi., 1996; Liti és mtsi., 2006; de Vries és mtsi., 2019).

### 2.1.2. Rendszertani áttekintés

A *Saccharomyces* genusz az *Ascomycota* törzs *Saccharomycotina* altörzsének *Saccharomycetes* osztályában levő *Saccharomycetales* rend *Saccharomycetaceae* családjába tartozik (Suh és mtsi., 2006). A *Saccharomyces*-ek taxonómiája sok változáson ment keresztül az évek során. Korábban több fajt soroltak a nemzetségbe, amelyeket két csoportra osztottak. A *sensu stricto* csoportba az egymáshoz evolúciósan közel álló, míg a *sensu lato* csoportba az evolúciósan korábban elvált fajok tartoztak (Vaughan-Martini és Martini, 1987; Barnett és mtsi., 1990; Vaughan-Martini és Martini, 1998; Pulvirenti és mtsi., 2000; Naumov és mtsi., 2000a; Wang és Bai, 2008). A *sensu lato* csoport tagjait később átsorolták más nemzetségekbe, majd felfedeztek két további fajt, amelyeket a *Saccharomyces* nemzetségbe soroltak (Kurtzman, 2003; Libkind és mtsi., 2011; Naseeb és mtsi., 2017). Jelenleg 10 faj tartozik a genuszba: *S. arboricolus* (*S. arboricola*), *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. uvarum* (*S. bayanus* var. *uvarum*), *S. eubayanus*, *S. jurei*, *S. pastorianus/carlsbergensis*, *S. bayanus* (*S. bayanus* var. *Bayanus*) (Libkind és mtsi., 2011; Vaughan-Martini és Martini, 2011; Naseeb és mtsi., 2017). Ezek közül az első nyolc „tisztá” vagy „természetes” fajnak, míg a *S. pastorianus* és a *S. bayanus* hibrid fajoknak számítanak (Vaughan-Martini és Martini, 2011). A *S. pastorianus* a *S. cerevisiae* és a *S. eubayanus* hibridizációjának eredményeként keletkezett (Dunn és Sherlock, 2008; Monerawela és Bond, 2018). A *S. uvarum*-ot kezdetben az *S. bayanus* alfajának tekintették, de később a molekuláris genetikai és genomikai vizsgálatok kimutatták, hogy a *S. uvarum* jól elkülöníthető a *S.*

*bayanus*-tól. Kiderült, hogy a *S. uvarum* egy tiszta, míg a *S. bayanus* egy hibrid faj, amely genomja 67%-ban *S. uvarum*, 33%-ban *S. eubayanus* eredetet mutat, de *S. cerevisiae* szekvenciák is kimutathatóak benne, ezért feltehetően ennek a három fajnak a hibridizációjával jött létre (Nguyen és Gaillardin, 2005; Libkind és mtsi., 2011; Nguyen és mtsi., 2011; Alsammar és Delneri, 2020). A *Saccharomyces* fajok családfája az 1. ábrán látható.



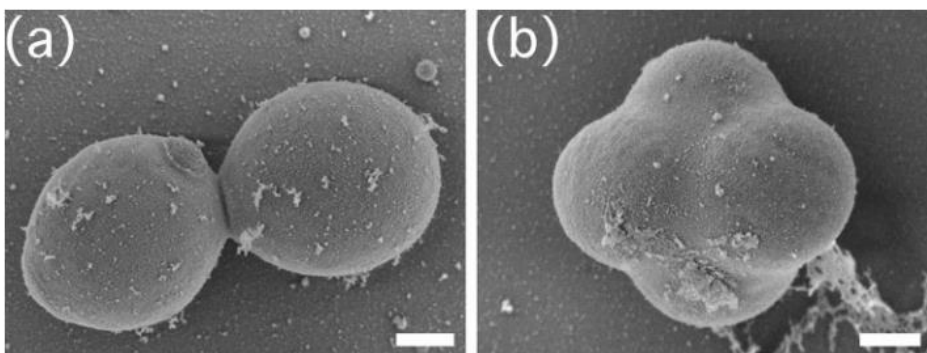
**1. ábra.** A *Saccharomyces* fajok családfája, amely a fajok rDNS szekvenciáinak összehasonlítása alapján készült (Naseeb és mtsi., 2017). A csomópontoknál feltüntetett számok a bootstrap értékek, a bootstrap analízis a törzsfa megbízhatóságának statisztikai próbája. Minél közelebb vannak az értékek a 100-hoz, annál megbízhatóbb a filogenetikai fa. A skála a fajok közötti divergencia mértékére ad információt.

A *Saccharomyces*-ek rendszertani besorolását nehezíti, hogy a „faj” fogalmának különböző értelmezései vannak. Biológiai értelemben a faj a populációk azon csoportját jelenti, amelynek tagjai sikeresen képesek egymás között szaporodni és más ilyen csoportoktól reprodukcióval izolálódtak (Mayr, 1940). Ez alapján két adott *Saccharomyces* törzs akkor tartozik egy fajba, ha az általuk létrehozott hibridek spóráinak több mint 1%-a életképes (Naumov, 1987). Filogenetikai értelemben a faj élőlények egy monofiletikus csoportját jelenti, amelynek tagjai olyan molekuláris jellegeket hordoznak, amelyek egy közös őstől származnak (Moore, 2011). A filogenetikai vizsgálatok evolúciósan konzervatív gének vagy nem-kódoló kromoszóma szegmenszek szekvenciáinak összehasonlításával történnek. A *Saccharomyces* törzsek filogenetikai analíziséhez általában a 25S rRNS gén D1 és D2

doménjét, valamint az rRNS gének között elhelyezkedő ITS szekvenciákat használják (Vu és mtsi., 2016).

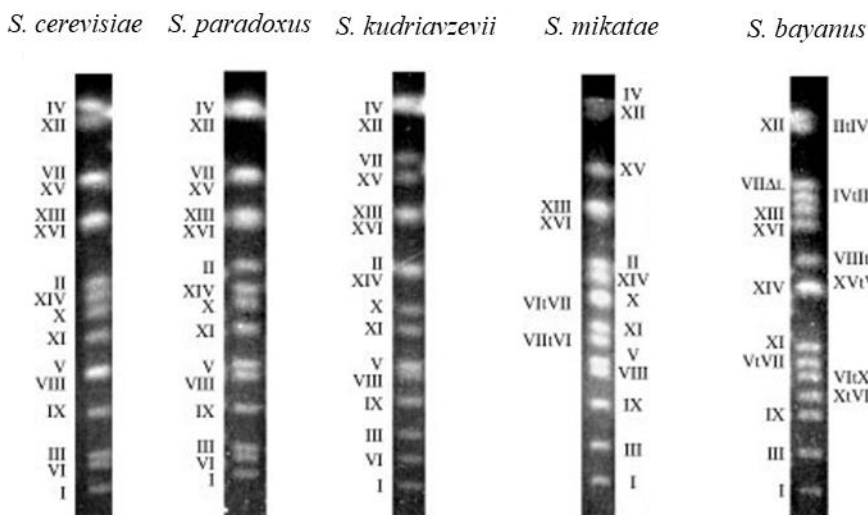
### 2.1.3. A nemzetség általános jellemzése

A *Saccharomyces* fajokra ellipszoid alakú, 2-8  $\mu\text{m}$  átmérőjű sejtek jellemzőek, amelyek ivaros és vegetatív szaporodásra is képesek (Vaughan-Martini és Martini, 1998). Az ivartalan szaporodás sarjadzással, az ivaros szaporodás pedig askospóra-képzéssel történik [2. ábra]. Néhány törzsnél megfigyelhetőek álhifák, de valódi hifát a genusz egyetlen faja sem képes létrehozni (Kron, 1997).



**2. ábra.** Pásztázó elektronmikroszkóppal készült képek a *S. cerevisiae*-ről: (a) vegetatíván szaporodó sejtek; (b) spóráképzés során létrehozott askusz (Coluccio és Neiman, 2004). A méretvonalak 1  $\mu\text{m}$ -nek felelnek meg.

Genomjuk általában 16 kromoszómát (számozás I-XVI) tartalmaz, amelyek mérete eltérő a különböző fajok között [3. ábra] (Johnston és Mortimer, 1986; Zolan, 1995; Codón és mtsi., 1998; Masneuf és mtsi., 1998; Fisher és mtsi., 2000). Ez általában lehetővé teszi a fajok kariotípus alapján történő azonosítását, viszont a fajon belüli kromoszómahossz polimorfizmus miatt ez nem mindig lehetséges (Naumov és mtsi, 1992; Török és mtsi, 1993). Genomjukban gyakran történik spontán mutáció és mitótikus rekombináció, ami jelentősen hozzájárul a törzsek között megfigyelhető nagyfokú genetikai variancia kialakításához (Rainieri, 2003).



**3. ábra.** Néhány *Saccharomyces* genuszba tartozó faj pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített kariotípusa (Fischer és mtsi., 2000 alapján). A kromoszómák jelölése I-től XVI-ig, a *S. cerevisiae* nómenklatúra alapján történt. A hasonló mérettel rendelkező kromoszómák nem választhatók el egymástól, ilyen esetekben a kromoszómákat jelölő sávok intenzitása magasabb.

#### 2.1.4. A *Saccharomyces* fajok hőmérséklet-toleranciája

A hőmérséklet az alkoholos fermentációk egyik legfontosabb paramétere, befolyásolja a fermentáció rátáját és időtartamát, valamint a másodlagos metabolitok termelését, amelyek meghatározóak a bor minősége szempontjából (Lafon-Lafourcade, 1983; Fleet és Heard, 1993). A borok fermentációja általában 10-15 °C-on történik, mert ez a hőmérséklet kedvező az illékony ízanyagok termeléséhez és megtartásához (Torija és mtsi., 2003; Molina és mtsi., 2007).

A *S. cerevisiae*-nek és a *S. uvarum*-nak jelentősen eltér a hőmérsékletigénye. Az optimális hőmérséklet a *S. cerevisiae* növekedése számára 32 °C körül van, alacsony hőmérsékleten lassabb a növekedési rátája, aminek negatív hatása van a fermentációra nézve (Bisson, 1999). Ezzel ellentétben a *S. uvarum* az alacsonyabb hőmérsékletet kedveli, magasabb hőmérsékleten, 34-35 °C felett nem képes növekedni (Vaughan-Martini és Martini, 1993; Gonçalves és mtsi., 2011; Salvadó és mtsi., 2011). A *S. uvarum*-on kívül az alacsony hőmérséklet kedvező még a *S. kudriavzevii* és a *S. eubayanus* növekedése számára is, viszont

a kriotoleráns fajok alkohol-toleranciája elmarad a *S. cerevisiae* mellett (Arroyo-López és mtsi., 2010; Gonçalves és mtsi., 2011). Borból a kriotoleráns fajok közül eddig egyedül a *S. uvarum*-ot izolálták, viszont a másik két faj is értékes lehet a borkészítés szempontjából, hiszen a *S. cerevisiae*-vel keresztezve őket létrejöhetnek olyan hibridek, amelyek mindkét szülői faj előnyös tulajdonságait hordozzák: széles hőmérséklet-tartományban való növekedési képesség és jó alkohol-tolerancia (Belloch és mtsi., 2008; Gamero és mtsi., 2013; Alonso és mtsi., 2017; Origone és mtsi., 2018).

## **2.2. A *S. cerevisiae* jellemzése**

### **2.2.1. A *S. cerevisiae* genetikai jellemzése**

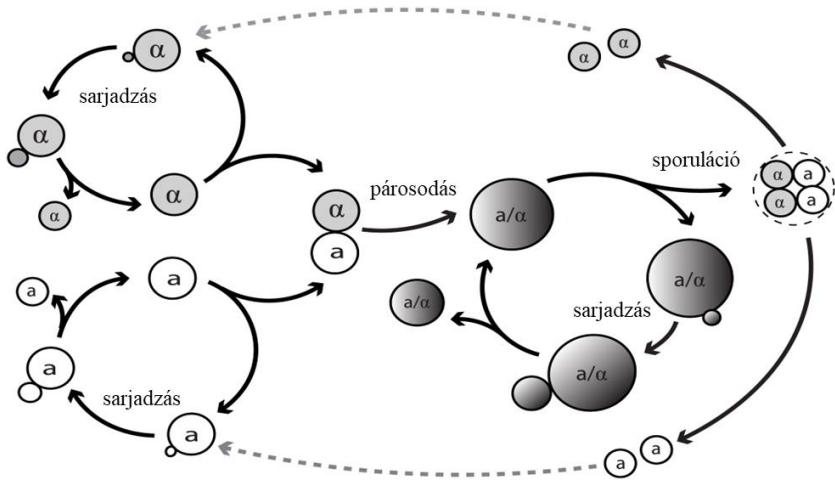
Az eukarióták közül elsőnek a *S. cerevisiae*-nek szekvenálták meg a teljes genomját. Bioinformatikai vizsgálatok 5000-6000 fehérje kódoló gént jósolnak. Ezenkívül mintegy 140 rRNS gén található tandem elrendezésben a XII. kromozómán, 40 kis nukleáris RNS gén szétszórva a XVI. kromozómán és 275 tRNS gén a genom különböző pontjain. A *S. cerevisiae* genomjára kompaktság jellemző, a teljes genomszekvencia kb. 70%-a géneket kódol, valamint a fehérje kódoló géneknek csak kb. 4%-a tartalmaz intronokat. A 16 kromoszóma közül soknál megfigyelhető GC bázisokban gazdag és szegény domének váltakozása (Goffeau és mtsi., 1996). Több kutatási eredmény is arra utal, hogy a GC gazdag régióknál nagyobb eséllyel történik rekombináció (Eyre-Walker, 1993; Gerton és mtsi., 2000). A négy legkisebb kromoszóma (I, III, VI, IX) rekombinációs gyakorisága 1.3-1.8-szor nagyobb, mint ami a teljes genomra jellemző (Kaback és mtsi., 1989). Ennek az lehet az oka, hogy a sejt így próbálja biztosítani a kis kromoszómák megfelelő szegregációját, ugyanis a 150 kb-nál kisebb, mesterségesen létrehozott kromoszómákra mitotikus instabilitás jellemző, valamint a replikáció és a meiózis sikeressége nagymértékben függ a rekombinációs folyamatoktól (Hieter és mtsi., 1985; Murray és mtsi., 1986; Sherratt és mtsi., 2004). Az I-es kromoszóma struktúrája is erre utal: a kromoszóma két végén lévő 31 kb-nyi szakaszokon alig találhatóak gének, mintha csak az lenne a funkciója ennek a két régiónak, hogy növelje a kromoszóma méretét és ezáltal a stabilitását (Bussey és mtsi., 1995; Goffeau és mtsi., 1996).

### **2.2.2. A *Saccharomyces cerevisiae* életciklusa és ivaros szaporodása**

Megfelelő tápanyag-ellátottság mellett a sejtek száma kb. 90 percenként a duplájára nő. A *S. cerevisiae* mitotikus sejtosztódása sarjadzással történik, ami végbemehet haploid és diploid állapotú sejtekben is, habár a sejtek a diploid állapotot részesítik előnyben. A mitotikus

sejtciklus konzervált az eukarióták körében, G1, S, G2 és M fázisból áll. G1 fázisban a sejtek növekednek és felkészülnek az S fázisban végbemenő DNS replikációra, G2 fázisban tovább folytatódik a növekedés, valamint a sejtek előkészülnek magára a mitózisra (M fázis) (Herskowitz, 1988).

Bizonyos környezeti tényezők hatására, mint például a tápanyaghiány a sejtek G1 fázisban felfüggesztik a sejtciklust, amíg a tápanyagok újra elérhetővé nem válnak. A haploid sejtek ellenkező párosodási típusú sejtek jelenlétében is megállnak a G1 fázisban, hogy egymással fuzionálva diploid zigótát hozzanak létre. A diploid sejtek nem képesek más sejtekkel párosodni, viszont környezeti stresszfaktorok hatására meiózissal négy haploid, stresszel szemben ellenálló askospórát képeznek, amelyek egy askusznak nevezett képződményben helyezkednek el. Miután a környezeti viszonyok ismét kedvezővé váltak, a spórák kicsíráznak és belépnek a sejtciklusba [4. ábra] (Herskowitz, 1988).



**4. ábra.** A sarjadzó élesztők életciklusának sematikus ábrája (Wang és mtsi., 2017).

Az ellentétes párosodási típusú sejtek feromonok segítségével érzékelik egymást. Az  $\alpha$  sejtek 13 aminosavból felépülő  $\alpha$  faktort, az *a* sejtek pedig 12 aminosavból álló *a* faktort termelnek. A *STE2* gén kódolja az  $\alpha$  faktor receptorát, a *STE3* gén pedig az *a* faktorét. Mindkét receptor G-fehérjéhez kapcsolt, amely elindít egy proteinkináz-kaszkádot, aminek eredményeként aktiválódni fog a Ste12 transzkripciós faktor (Burkholder és Hartwell, 1985; Hartig és mtsi., 1986). A Ste12 ezt követően aktiválja azoknak a fehérjéknek az átírását, amelyek szükségesek a párosodási folyamat sikeres véghezviteléhez. Ezek a fehérjék szerepet

játszanak a sejtfalak részleges feloldásában, a membránok egyesülésében, a sejtmagok közelítésében és a kariogámiában (Kurihara és mtsi., 1996; Deák, 1998). Ha a két párosodási típus külön tenyészetet alkot, akkor az élesztő heterotalliás, ha a tenyészetben egyaránt vannak **a** és  $\alpha$  sejtek is, akkor az élesztő homotalliás (Deák, 1998).

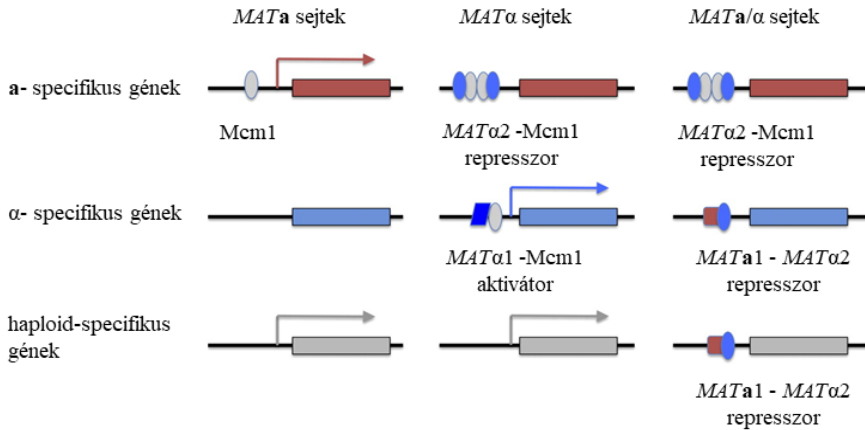
### 2.2.3. A *Saccharomyces cerevisiae* párosodási típus meghatározása

A haploid sejtek **a** vagy  $\alpha$  párosodási típusúak lehetnek. A sejtek párosodási típusát a *MAT* lókuszon elhelyezkedő allél határozza meg. A *MAT* lókuszt a III. kromoszóma jobb karjának közepén található, kb. 100 kb távolságra mind a centromertől, mind pedig a telomertől (Mortimer és Hawthorne, 1966). A két párosodási típus allél, a *MAT<sub>a</sub>* és *MAT $\alpha$*  csak kb. 700 bázispárban különbözik egymástól, a két allélnak ezt a szakaszt **Y<sub>a</sub>**-val és **Y $\alpha$** -val jelölik. Ebben a régióban találhatóak azoknak a géneknek a többsége, amelyek a sejt ivaros folyamatait szabályozzák (Astell és mtsi., 1981; Haber, 2012).

A *MAT $\alpha$*  két fehérjét kódol: az  $\alpha 1$ -et és az  $\alpha 2$ -t. Az  $\alpha 1$  folyamatosan expresszáldó Mcm1-gyel komplexet alkotva aktiválja a  $\alpha$  sejtekre specifikus géneket (Hagen és mtsi, 1993; Bruhn és mtsi, 1994; Haber, 2012). Ezek közé a gének közé tartoznak az  $\alpha$  faktort és a Ste3 receptort kódoló gének is. Az  $\alpha 2$  fehérje is komplexet képez az Mcm1 fehérjével egy represszort létrehozva, amely meggátolja az **a**-specifikus gének expresszióját (Keleher és mtsi., 1989; Smith és Johnson, 1992; Herschbach és mtsi., 1994; Haber, 2012).

Az  $\alpha 2$ -Mcm1 komplex hiányában az élesztő sejtekben az **a**-specifikus gének folyamatosan expresszáldódnak, ezért a *MAT<sub>a</sub>* lókuszt nem szükséges a haploid **a** párosodási típusú sejtek ivaros folyamataihoz, a diploid sejtek normál működéséhez viszont elengedhetetlen (Strathern és mtsi., 1981; Goutte és Johnson, 1988). A *MAT<sub>a</sub>* lókuszt is két proteint kódol: az  $\alpha 1$ -et és az  $\alpha 2$ -t. Az  $\alpha 2$ -nek ismeretlen a funkciója. Mivel a hiánya nem okoz változást a párosodási, sporulációs és sejtnövekedési folyamatokban, elképzelhető, hogy egy inaktív fehérjéről van szó (Tatchell és mtsi., 1981; Dranginis, 1989). Az  $\alpha 1$  fehérje a diploid sejtek ivaros folyamatainak megfelelő szabályzásához szükséges (Goutte és Johnson, 1988). A diploid sejtekben egyaránt jelen van a *MAT<sub>a</sub>* és *MAT $\alpha$*  allél is, ennek következtében pedig a róluk átíródó  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$  és  $\alpha 2$  fehérjék is. Az  $\alpha 1$  fehérje az  $\alpha 2$ -vel összekapcsolódva represszálja a haploid sejtekre specifikus gének transzkripcióját és lehetővé teszi a diploid sejtekre specifikus gének expresszióját. Az  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  represszor meggátolja az  $\alpha 1$  gén átírását, viszont megengedi az  $\alpha 2$  fehérje kifejeződését. Az  $\alpha 1$  fehérje hiányában az  $\alpha$  sejtekre specifikus gének nem aktiválódnak, az  $\alpha 2$  pedig represszálja az **a**-specifikus gének

transzkripcióját, ennek következményeként a diploid sejtek nem képesek párosodásra [5. ábra]. Az  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  komplex represszálja az *RME1*-et (repressor of meiosis 1), amely a meiózisért és a sporulációért felelős gének fő represszora. Az  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  komplex ezáltal lehetővé teszi a sejtek számára a meiózisba való belépést (van Werven és Amon, 2011; Haber, 2012).

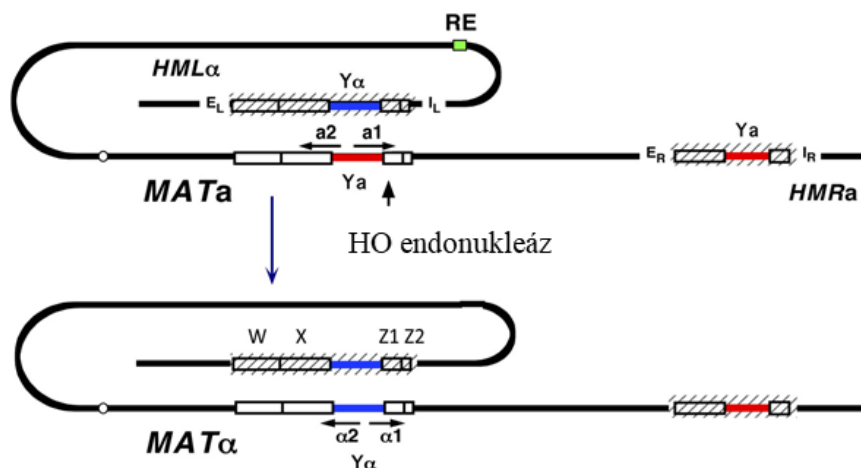


**5. ábra.** A párosodási típust meghatározó gének expressziójának szabályozása (Haber, 2012).

#### 2.2.4. A *Saccharomyces cerevisiae* párosodási típus váltása

A *S. cerevisiae* több másik gombafajhoz hasonlóan képes párosodási típus váltásra. A párosodási típus váltáshoz szükség van két csendes kazetta jelenlétére a genomban: *HMLα*-ra és *HMRa*-ra. A *HMLα* az  $\alpha$ , a *HMRa* pedig az *a* párosodási típus meghatározásáért felelős géneket kódolja, de transzkripció róluk nem történik. A párosodási típus váltás során génkonverzió játszódik le a *MAT* lókuszt és az egyik csendes kazetta között [6. ábra]. A homológ rekombinációt a *MAT*, a *HMLα* és a *HMRa* széleit alkotó, egymással szinte teljesen azonos szekvenciák teszik lehetővé (az X és a Z régió) (Hicks és mtsi., 2011). A folyamat egy DNS kettős száltöréssel kezdődik, amelyet a Ho endonukleáz katalizál (Strathern és mtsi., 1982; Kostriken és mtsi., 1983). Habár mind a *HMLα*, a *HMRa* és a *MAT* lókuszt szekvenciájában megtalálható a Ho endonukleáz felismerő helye, a csendes kazetták kromatin struktúrája nem teszi lehetővé az endonukleáz bekötődését, így a kettős száltörés minden esetben a *MAT* lókusznál fog bekövetkezni (Ercan és Simpson, 2004). A kettős száltörést követően a génkonverziót a homológ rekombináció enzimei viszik véghez (Wang és Haber, 2004; Hicks és mtsi., 2011). Párosodási típus váltásra csak a haploid sejtek képesek. Ennek

az az oka, hogy a diploid sejtekben az  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  represszor meggátolja a *HO* gén transzkripcióját (Jensen és mtsi., 1983; Mathias és mtsi., 2004; Haber, 2012).



**6. ábra.** A párosodási típus váltás során lejátszódó allélcseré sématis ábrája (Haber, 2012).

A váltások megfelelő irányát a *HMLα* és a *MAT* lókuszt között elhelyezkedő rekombinációs enhancer (*RE*) szekvencia biztosítja, hogy *MATα* genotípusú sejtekben megkötse az  $\alpha 2$ -Mcm1 komplexet, ami a nukleoszómák szoros egymás mellé rendeződését eredményezi a *RE*-n (Wu és mtsi., 1996; Wu és mtsi., 1998). Ezáltal lecsökken a rekombináció valószínűsége a *HMLα* és a *MAT* lókuszt között. Az **a**-párosodási típusú sejtekben nincs jelen az  $\alpha 2$  fehérje, így a *RE* aktív marad, aminek következtében megnövekszik a *HMLα* és a *MAT* lókuszt közötti rekombináció esélye (Lee és mtsi., 2010).

### 2.3. A mitokondriális genom öröklődése

#### 2.3.1. A mitokondriális genom öröklődésének általános jellemzése

A *Saccharomyces* fajok mitokondriális öröklődésének kutatása fontos mind biotechnológiai, mind pedig alapgenetikai szempontból. A mitokondriális genom öröklődése számos tekintetben eltér a nukleáris genom öröklődésétől (Birky, 1994; Birky, 2001; Wilson és Xu, 2012). A sejtekben egy nukleusz található, amelyben a haploid genom a sejtek ploiditást fokától függően csak egy vagy két kópiában van jelen. Az intra- és interspecifikus hibridek között előfordulnak diploid, triploid, illetve tetraploid törzsek is. Ezzel ellentétben a

mitokondriális tubulusok egy kiterjedt hálózatot alkotnak, amelyben a mtDNS nagy számban előfordul (Nunnari és mtsi., 1997; MacAlpine és mtsi., 2000; Rafelski és mtsi., 2012). Az S fázisban mindegyik kromoszóma replikációja végbemegy, majd az osztódási orsó biztosítja, hogy két egyforma, a kiindulási sejttel megegyező kromoszómaszámú utódsejt jöjjön létre. Ezzel szemben a mtDNS molekuláknak csak egy része replikálódik és adódik át az utódsejtekbe (Ling és Shibata, 2004). Továbbá talán az egyik legfontosabb eltérés, hogy a kromoszómákon található gének öröklődése követi a mendeli törvényt, míg a mitokondriális genomé nem (Birky, 1994, Xu és Li, 2015).

Az *Saccharomyces* fajoknál a mtDNS öröklődése biparentális, de kb. 20 osztódási ciklus után az egyik szülő mtDNS-e fixálódik a sejtekben (Birky, 1978; Dujon, 1981). A mtDNS öröklődésének mechanizmusával kapcsolatban még számos kérdés megválaszolatlan. Például mi dönti el, hogy melyik szülő mtDNS-e marad meg a sejtekben? Mitől függ, hogy melyik mtDNS molekula replikálódik és melyik nem? Az alábbiakban ismertetem a mitokondriális genomot, valamint azokat a folyamatokat, amelyek hozzájárulnak a *S. cerevisiae* mtDNS-ének szegregációjának szabályozásához.

### **2.3.2. A *Saccharomyces cerevisiae* mtDNS-ének jellemzése**

A *S. cerevisiae* a 75-150 kb méretű mtDNS molekuláinak többsége lineáris konkatemer, kisebb része pedig cirkuláris formában van jelen (Maleszka és mtsi., 1991; Bendlich 1996; Ling és Shibata, 2002). Valószínűleg a cirkuláris molekulák szolgálnak a replikáció templátjaként, a lineáris konkatemek pedig a replikáció eredményeként jönnek létre (Ling és Shibata, 2004). A mtDNS-re intronokban gazdag gének és hosszú intergenikus szakaszok jellemzőek. Az intergenikus régiók, az intronok, az rRNS gének és néhány fehérjét kódoló gén is tartalmaz repetitív elemeket: hosszabb AT ismétlődéseket és rövidebb GC klasztereket, amelyek kedveznek a rekombináció kialakulásának (Bernardi, 2005). Az AT ismétlődések alkotják a mitokondriális genom közel 50%-t, míg a 10-80 bp hosszúságú GC klaszterek kevesebb, mint 5%-át teszik ki a genomnak (Foury és mtsi., 1998). A mtDNS-en 8 replikációs origó található, amelyek közül legalább három (2, 3, 5) aktív (de Zamaroczy és mtsi., 1981; Foury és mtsi., 1998). Az aktív replikációs origók szerkezetére jellemző három GC gazdag klaszter (C-A) megléte, amelyeket AT szekvenciák választanak el egymástól. Az első GC klaszter (C) előtt található egy promóter, amely tartalmazza az Rpo41 RNS polimeráz bekötődéséhez szükséges konszenzus szekvenciát (Foury és mtsi., 1998; Baldacci és Bernardi, 1982; Lecrenier és Foury, 2000). A másik öt replikációs origó promóterét egy rövid inzerció megszakítja, ezáltal megátolva az RNS polimeráz bekötődését (Bernardi, 2005;

Turk és mtsi., 2013). A mitokondriális genom nyolc fehérje kódoló gént tartalmaz, amelyek közül három (*ATP6*, *ATP8*, *ATP9*) az ATP-szintáz, három (*COX1*, *COX2*, *COX3*) a citokróm c-oxidáz, egy (*COB*) a citokróm b-c1 komplex alegységét, egy (*VARI*) pedig riboszómális fehérjét kódol. A fehérjét kódoló géneken kívül a mtDNS-en megtalálható még két rRNS gén, tRNS gének és a mitokondriális RNáz-P RNS komponensének a génje (Foury és mtsi., 1998; Solieri, 2010).

### 2.3.3. A mtDNS replikációja

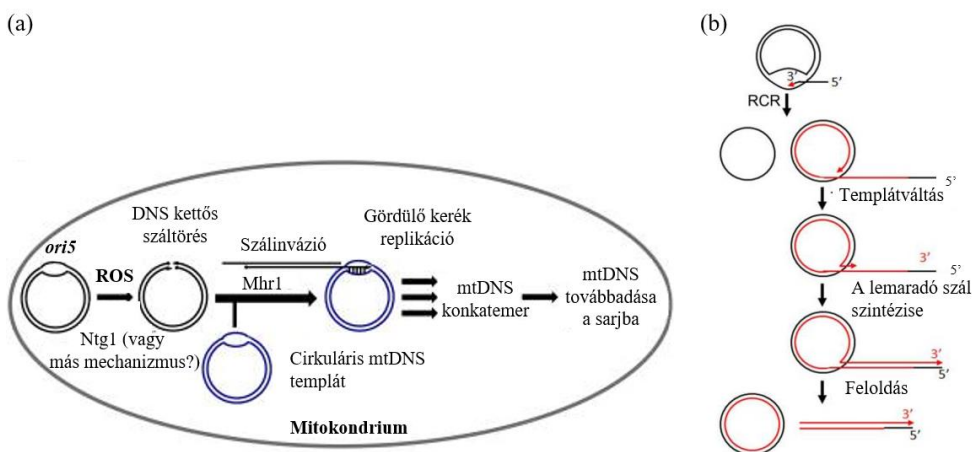
A mitokondriális DNS replikációjának kutatása már az 1970-es években elkezdődött, de még ma sem ismert minden részlet a folyamattal kapcsolatban. Két elmélet is létezik a mtDNS replikációs mechanizmusával kapcsolatban (Williamson és Moustacchi, 1971).

Az egyik első elmélet azt feltételezi, hogy a mitokondriumban található Rpo41 RNS-polimeráz a replikációs origókhoz kötődve RNS transzkriptumok átírását katalizálja, amelyek további érést követően primerként szolgálnak a replikációhoz (Baldacci és mtsi., 1984; Bernardi, 2005; Graves és mtsi., 1998; Van Dyck és Clayton, 1998; Lecrenier és Foury, 2000). Viszont  $p^-$  sejtekben<sup>1</sup> sikerült replikációs origók nélküli, kizárólag AT bázisokból álló mtDNS-t stabilan fenntartani, ami azt jelenti, hogy más replikációs mechanizmusnak is léteznie kell a sejtekben (Fangman és mtsi., 1989).

Jelenleg a legelfogadottabb elmélet a gördülő kerék (angol szakkifejezéssel rolling-circle) modell: a replikáció az *ori5* replikációs origónál kezdődik. Ennek a replikációs origónak buborék-szerű szerkezete van, amely érzékennyé teszi a reaktív oxigéngyökök károsító hatásával szemben. Vannak arra utaló kísérleti eredmények, hogy az *ori5* oxidatív károsodása elősegíti a replikáció iniciációját (Hori és mtsi., 2009). A replikációs origónál bekövetkező károsodást felismeri a bázis excíziós repair egyik enzime, az Ntg1, amely ezután kettős szálú DNS törést hoz létre ezen a helyen, majd egy 5' exonukleáz létrehoz egy 3' szimplaszálú szakaszt (Eide és mtsi., 1996; Ling és mtsi., 2007). Ezt követően az Mhr1 fehérje kialakít egy heteroduplexet a 3' vég és egy cirkuláris mtDNS molekula homológ szakasza között, ahol a 3' vég primerként szolgál a gördülő kerék replikáció számára [7. ábra (a) része] (Ling és Shibata, 2002; Ling és Shibata, 2004; Ling és mtsi., 2013). Miután megszintetizálódott, a kiegészítőszál lecseréli az eredeti szálát, amely szimplaszálú DNS formájában leválik.

<sup>1</sup> Petite mutáns sejtek (lásd 2.3.11. fejezet), amelyekből a vad típusú mtDNS jelentős része deléciók miatt hiányzik, a megmaradt része pedig amplifikálódott.

A gördülő kerék replikáció folytatódik, amelynek eredményeként konkatemerek jönnek létre (Ling és mtsi., 2007). A szimplaszálú konkatemerek kiegészítő szálának megszintetizálására is több elmélet létezik. Az egyik a hagyományos, RNS primerekkel történő szintézis, a másik a templát váltásos modell. Ennek az a lényege, hogy miután megszintetizálódott egy hosszú szimplaszálú szakasz, a DNS polimeráz templátot vált, vagyis a cirkuláris DNS molekula helyett szimplaszálú szakaszt kezdi el szintetizálni [7. ábra (b) része] (Krishnan és mtsi., 2008; Solieri, 2010; Westermann, 2014; Chen és Clark-Walker, 2018).



**7. ábra.** (a) A mtDNS replikációjának rekombináció függő gördülő kerék modellje (Prasai és mtsi., 2017). (b) A gördülő kerék replikáció során keletkező szimplaszálú konkatemerek kiegészítő szálának szintézise (Chen és Clark-Walker, 2018).

### 2.3.4. A mtDNS rekombinációja

A homológ rekombináció a gördülő kerék replikációhoz hasonlóan egy DNS kettősszál töréssel kezdődik, amelyet az Ntg1 enzim katalizál (Ling és mtsi., 2007). A Din7 mitokondriális nukleáz létrehoz egy 3' túlnyúló véget (Mieczkowski, 1997; Fikus és mtsi., 2000; Ling és mtsi., 2013). Ezt követően az Mhr1 fehérje keres a túlnyúló véggel homológ DNS szakaszt, majd elősegíti a szálinváziót, amelynek eredményeként Holliday-intermedierek jönnek létre (Ling és Shibata, 2002). A Holliday-keresztek feloldását az Mgt1 endonukleáz végzi (Kleff és mtsi., 1992; Lockshon, 1995).

Fritsch és munkatársai kutatási eredményei azt mutatják, hogy a mitokondriális genomnak vannak olyan részei, amelyeknél sokkal nagyobb valószínűséggel történik rekombináció, mint

más helyeken. 23 ilyen helyet találtak, amelyek főleg fehérjét nem kódoló régiókban helyezkedtek el. Egy harmaduk a tRNS génklaszterben található, amit magyarázhat az erre a régióra jellemző repetitív szekvenciák magas aránya. Rekombinációs forrópont található a 21S rRNS gén exon-intron kapcsolatánál és a *COB* és *COX1* gének intronjaiban és exon-intron kapcsolatainál is.

Viszont figyelembe kell venni, hogy a rekombinációs forrópontok helyét a genetikai háttér erősen befolyásolja. Kísérleteik során találtak olyan helyeket, amelyek bizonyos törzspárosításból származó hibridekben rekombinációs forrópontok voltak, míg más szülői törzsek keresztezéséből származó hibridekben nem, annak ellenére, hogy a rekombináció fő enzimeinek génjei (*MGT1*, *MHR1*, *DIN7*, *NTG1*) között nem volt allélikus különbség a különböző szülői törzsekben. Egy korábbi tanulmányban azt találták, hogy rekombináció leginkább a GC klaszterekben történik, azonban Fritsch és munkatársai nem tapasztaltak ilyen preferenciát (Dieckmann és Gandy, 1987). Ezt a jelenséget magyarázhatja a mitokondriális genom eltérő topológiája a különböző törzsekben. A nukleáris genom esetében a rekombinációs forrópontok olyan helyeken alakulnak ki, ahol a DNS hozzáférhető a rekombináció enzimei számára, amelyet a kromatinstruktúra határoz meg (Petes, 2001). Habár a mtDNS csomagolásában hiszton fehérjék nem vesznek részt, azonban a mtDNS-nek is van harmadlagos szerkezete, a GC klasztereknél például hajtűkanyarok alakulnak ki (de Zamaroczy és Bernardi, 1986; Brewer és mtsi., 2003; Kucej és mtsi., 2008; Fritsch és mtsi., 2014).

### **2.3.5. Mitokondriális nukleoidok**

A mtDNS-t specifikus fehérjék DNS-fehérje komplexekbe csomagolják, amelyeket nukleoidoknak neveznek. A nukleoidok 200-500 nm-es, gömb alakú struktúrák, amelyek a *S. cerevisiae* mtDNS-ének (amely monomer formában kb. 25  $\mu\text{m}$  hosszúságú) jelentős tömörítését teszik lehetővé (Sanders és mtsi., 1975; Miyakawa és mtsi., 1987). A nukleoidok a mitokondrium belső membránjához kötődve egyenletesen oszlanak el a mitokondriális retikulum mentén. Egy sejtben 40-60 nukleoid található, amelyek 1-10 DNS molekulát tartalmaznak (Miyakawa és mtsi., 1987; Miyakawa és mtsi., 2010; Osman és mtsi., 2015).

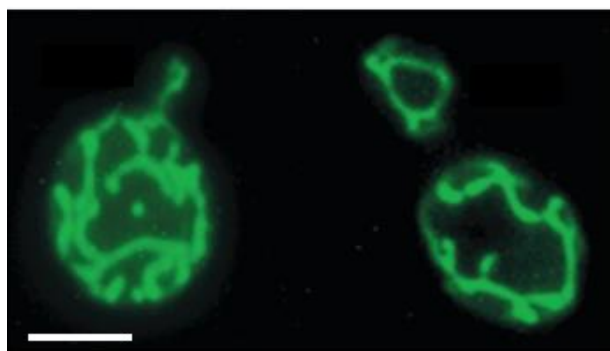
A nukleoidokban található fő DNS kötő fehérje az Abf2. Az Abf2 kötődése a DNS-hez nem specifikus, az oligoA és oligoT szakaszokon kívül bármilyen dsDNS-hez képes hozzákapcsolódni, viszont erősebben kötődik a GC gazdag régiókhoz (Diffley és Stillman, 1992). Az Abf2 kötődésének hatására a DNS számos helyen kb. 78°-os szögben meghajlik,

ami a tömörítés fő mozgatórugója (Friddle és mtsi., 2004). Az Abf2 ezenkívül védi a DNS-t a nukleáz támadásokkal és a kémiai károsodásokkal szemben, valamint a rekombinációs intermedierek stabilizációjához is hozzájárul (Newman és Zeleneya-Troitskaya, 1996; MacAlpine és mtsi., 1998; O'Rourke és mtsi., 2002).

A nukleoid fehérjék között vannak még hősokk proteinek, metabolikus enzimek, illetve replikációban, transzkripcióban, DNS hibajavításban és rekombinációban résztvevő fehérjék is (Chen és Butow, 2005).

### 2.3.6. A mitokondriális hálózat

A mitokondriumok egy kiterjedt, elágazó tubuláris hálózatot alkotnak a sejtek cortex régiójában, amely fenntartásához a fúzió és a hasadás egyensúlyára van szükség [8. ábra] (Sesaki és Jensen, 1999; Egner és mtsi., 2002). A mitokondriális hálózat nagyságát a mitokondriális biogenezis, az autofágia és a szénforrás jelentősen befolyásolja. A nem-fermentálható szénforráson tartott sejtekben a mitokondriális hálózat térfogata és elágazásainak száma, valamint a mitokondriális fehérjék expressziójának mértéke is nagyobb (Egner és mtsi., 2002). A mitofágia<sup>1</sup> stressz hatások alatt aktiválódik, például nitrogén éhezéskor mind a mitofágia, mind az általános autofágia megfigyelhető, melyek célja, hogy nitrogént szolgáltatassanak az esszenciális sejtfolyamatok számára (May és mtsi., 2012).



**8. ábra.** A *S. cerevisiae* mitokondriális hálózata (Yaffe, 1999). Mitokondriális targeting szekvenciához kapcsolt GFP molekulát expresszáló vad típusú sejtek fluoreszcens mikroszkóppal készített felvétele. A méretvonal 3  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

<sup>1</sup> A mitokondriumok szelektív degradációja autofágia útján.

Az alapvető mitokondriális egységek tubuláris alakúak és általában azonos átmérőjűek az egész sejtben. A tubuláris alak a belső membrán szerveződése miatt alakul ki, ideértve a kriszták felépítését, a különböző membránok közötti kapcsolatokat, a fehérjék szegregációját a különböző membrándoménokba, valamint a más organelumokkal való kapcsolatot. A mitokondrium ultrastruktúrájának megváltozása duzzadt tubulusokat és gömb alakú, rendezetlen belső membránszerkezettel rendelkező mitokondriumokat eredményez (Burgess és mtsi., 1994; Paumard és mtsi., 2002; Velours, 2009).

A tubuláris egységek hálózatot alkotnak, amelynek szintén van alakja. A mitokondriális hálózat kiterjedtségének két véglete, amikor a tubulusok egyetlen, nagy összefüggő hálózatot alkotnak, illetve amikor több kisebb, különálló alhálózat van jelen.

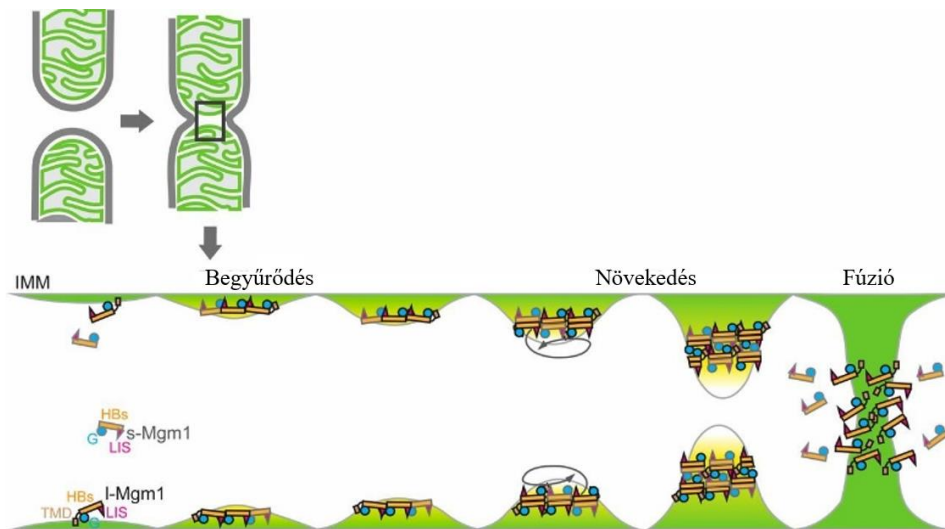
A hálózat alakját a tubulusok fúziójának és a hasadásának aránya alapvetően befolyásolja. A hasadás a tubulusokat kettévágja, míg a fúzió során két tubulus összekapcsolódik, amelyek eredményeként vagy egy hosszabb tubulus vagy egy elágazás jön létre. Ha a hasadás kerül túlsúlyba a hálózat túlzott fragmentációja lesz megfigyelhető, míg a fúzió túlsúlya esetén a vad típustól összefüggőbb szerkezet alakul ki (Hermann és mtsi., 1998; Rapaport és mtsi., 1998; Bleazard, 1999; Sesaki és Jensen, 1999). A tankönyvek ábrázolásaiban szereplő „individuális” mitokondriumok vagy a kisebb mitokondriális alhálózatok hasadások által jönnek létre. De ezek különálló struktúrák helyett sokkal inkább tekinthetők a mitokondriális hálózat átmenetileg elkülönült szubrégióinak, amelyek a hasadás és fúzió egy adott állapotában vannak (Shaw és Nunnari, 2002; Rafelski, 2013).

### **2.3.7. A mitokondriumok hasadása**

A mitokondriumok hasadásának első lépéseként a Dnm1 fehérje, amely egy a dinaminhoz nagyon erős szekvencia és funkcionális hasonlóságot mutató GTP-áz fehérje, a mitokondrium külső membránjához kötődik (Bleazard és mtsi., 1999; van der Bliek, 1999). A kötődéshez szükséges receptor két fehérjéből áll: a membránhoz kötött Fis1-ből és az Mdv1-ből, amely hídként szolgál a Dnm1 és a Fis1 között (Mozdy és mtsi., 2000; Tieu és Nunnari, 2000; Cerveny és mtsi., 2001; Tieu és mtsi., 2002; Cerveny és Jensen, 2003). Ezt követően a Dnm1 polimerizálódik, aminek eredményeként kialakul egy spirál alakú struktúra, amely a mitokondriumot a hasadás helyén körbefogja és összehúzza (Ingerman és mtsi., 2005; Bhar és mtsi., 2006). Az endoplazmatikus retikulumnak (ER) is fontos szerepe van a mitokondriális tubulusok hasadásában: megkönnyíti a Dnm1 polimerizációját azáltal, hogy rácsavarodik a tubulusokra és valamilyen mértékben összehúzza azokat (Friedman és mtsi., 2011).

### **2.3.8. A mitokondriális tubulusok fúziója**

A mitokondriális tubulusok fúziója több lépcsős folyamat, amely a fúzionáló membránok felismerésével és egymáshoz kapcsolásával kezdődik, amit először a külső, majd a belső membránok összeolvadása követ (Meeusen és mtsi., 2004; Anton és mtsi., 2011). A külső membránok fúziójának legfontosabb fehérjeje az Fzo1, amely egy külső membránban elhelyezkedő, dinaminnal rokon GTPáz fehérje (Hermann és mtsi., 1998). Az Fzo1 elsődleges feladata, a mitokondriális tubulusok egymáshoz kapcsolása és közelítése, amely a fehérje cisz (egy adott membránon történő) és transz (két egymással szemben levő membrán közötti) oligomerizációja által valósul meg. Az Fzo1 transz-oligomerek a két fúzionáló membránt összekapcsolják és GTP hidrolízis által egyre közelebb húzzák egymáshoz, amíg már csak 2-3 nm távolság lesz a membránok között (Fritz és mtsi., 2001; Koshiba és mtsi., 2004; Cohen és mtsi., 2018). A belső membránok fúziójának legfontosabb irányítója egy szintén dinaminnal rokon GTPáz fehérje, az Mgm1, amely két formában van jelen: egy hosszú formában (l-Mgm1), amely tartalmaz egy transzmembrán domént, és egy rövid, szolubilis formában (s-Mgm1). A két molekula egy közös prekursor fehérje különböző helyeken történő proteolitikus vágásának eredményeként jön létre (Herlan és mtsi., 2004). Mindkét forma szükséges a belső membránok fúziójához (Sesaki és mtsi., 2003; Herlan és mtsi., 2004). A legelfogadottabb modell szerint a rövid forma trimerjei spirálokat képeznek az egymással fúzionáló membránokon, ezáltal elősegítik a membránok tubulációját. Amikor a membránbegyűrődések/tubulusok elég közel kerülnek egymáshoz a két membrán fúziója a csúcsonnál spontán végbemegy [9. ábra]. A rövid forma hidrofil, ezért a membránokhoz való kötődéshez valószínűleg szüksége van a hosszú, transzmembrán formára (Faelber és mtsi., 2019; Liming és mtsi., 2020; Yan és mtsi., 2020; Ozeir és Cohen, 2022).



**9. ábra.** A belső mitokondriális membránok fúziója (Yan és mtsi., 2020). IMM: a mitokondrium belső membránja.

### 2.3.9. A mitokondriális tubulusok dinamikáját befolyásoló tényezők

A fúzió és a hasadás arányát több tényező is befolyásolja, de általánosan elmondható, hogy a különböző stressz körülmények a fúzió és a hasadás arányát a hasadás irányába tolják el (Knorre és mtsi., 2013). Emlős sejtekben a nem megfelelően működő, alacsony membrán potenciállal rendelkező mitokondriumok nem képesek fúzióra, hasadás után elkülönülnek a mitokondriális hálózattól, majd autofágia útján lebontásra kerülnek (Legros és mtsi., 2002; Twig és mtsi., 2008). Élesztőben is kimutatták, hogy az alacsony membrán potenciállal rendelkező mitokondriumokat a sejtek autofágia által eltávolítják (Priault és mtsi., 2005). A mitokondriumok fúzióját ezenkívül a sejtek redox állapota is befolyásolja (Shutt és mtsi., 2012). A reaktív oxigén gyökök a hasadás és fúzió egyensúlyát a hasadás felé tolják el, ami valószínűleg azzal magyarázható, hogy a  $H_2O_2$  magas koncentrációja meggátolja az elektrontranszportlánc működését, ami a membránpotenciál csökkenését eredményezi (Nulton-Persson és Szweda, 2001; Pozniakovsky és mtsi., 2005; Knorre és mtsi., 2013).

### 2.3.10. A mitokondriális tubulusok eloszlása a sarj és az anyasejt között sejtosztódás alatt

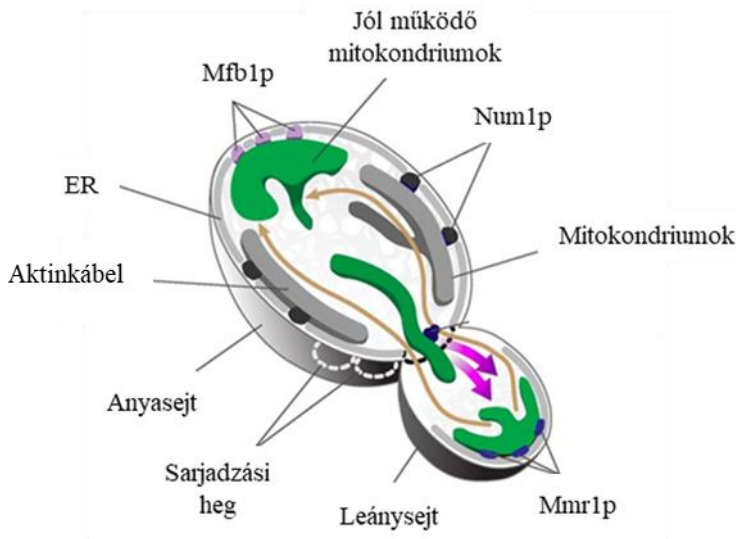
A *S. cerevisiae*-re aszimmetrikus sejtosztódás jellemző, a sejtkeponensek eloszlása különböző a sarj és az anyasejt között (McFaline-Figueroa és mtsi., 2011). Az oxidatív

károsodást szenvedett fehérje-aggregátumok, mitokondriális tubulusok és vakuólumok az anyasejtben maradnak, míg a sarjba bekerülő mitokondriális tubulusok jobban működnek, kevesebb reaktív oxigéngyököt termelnek, illetve magasabb membránpotenciál kialakítására képesek (Sinclair és Guarente, 1997; Shepard és mtsi., 2003; Erjavec és Nyström, 2007; Liu és mtsi., 2011; Spokoini és mtsi., 2012; Higuchi és mtsi., 2013). Bizonyos mennyiségű jól működő mitokondriális tubulusnak viszont az anyasejtben is maradnia kell. A mitokondriális tubulusok megfelelő eloszlásához a sarj és az anyasejt között több folyamat is hozzájárul, az egyik ezek közül a mitokondriális tubulusok mozgása a két sejt között.

A tubulusok aktin kábelek mentén mozognak az anyasejt és a sarj között (Drubin és mtsi., 1993). Az aktin filamentumok dinamikus struktúrák, az egyik végükön (plusz) gyorsabb a polimerizáció, mint a másikon (mínusz), egy bizonyos G-aktin koncentrációval a plusz végen növekedés, a mínusz végen pedig depolimerizáció lesz jellemző. Ennek eredményeként az aktin-monomerek lassan végighaladnak a filamentumon. A filamentum áramlási iránya az anyasejt felé mutat (retrográd áramlás), a mitokondriális tubulusoknak ezzel ellentétes irányba kell haladniuk (anterográd mozgás), hogy átkerülhessenek a sarjba. A tubulusok mozgása az aktin nyálábok mentén dinamikus, egy részük a sarj felé, más részük az anyasejt felé vándorol (Fehrenbacher és mtsi., 2004). Az anterográd mozgás energiaigényes folyamat, amely a Myo2 motorprotein segítségével valósul meg (Itoh és mtsi., 2002; Boldogh és mtsi., 2004; Itoh és mtsi., 2004; Altmann és mtsi., 2008). A Myo2 a miozin-V motorfehérjék közé tartozik, amelyek különböző kargókat, többek között organellumokat, szekréciós vezikulákat és mRNS-eket szállítanak az aktin filamentumok mentén (Matsui és mtsi., 2003; Westermann, 2014). A Myo2 a mitokondrium külső membránján található Mmr1 és Ypt11 fehérjéken keresztül kötődik a tubulusokhoz (Itoh és mtsi., 2002; Itoh és mtsi., 2004; Chernyakov és mtsi., 2013; Lewandowska és mtsi., 2013). A jobban működő tubulusoknak nagyobb a motilitása, így könnyebben tudnak az aktin kábel áramlási irányával szemben haladni, ami szintén hozzájárul ahhoz, hogy a sarjba megfelelően működő tubulusok kerüljenek (Higuchi és mtsi., 2013; Higuchi-Sanabria és mtsi., 2014; Vevea és mtsi., 2014).

A mitokondriális tubulusok motilitásán kívül, a plazmamembránhoz való kihorgonyzásnak is fontos szerepe van a megfelelő eloszlás kialakításában. Három kihorgonyzási pontnak van kiemelkedő szerepe. Az első kihorgonyzási pont a sarj csúcsban található. Az Mmr1 fehérjék nem csak a tubulusok külső membránján találhatóak, hanem a sarj csúcsban is, ahol a mitokondriumot egy közvetlenül a plazmamembrán alatt található dinamikus tubulus hálózathoz, a kortikális ER-hez rögzítik. Ez biztosítja, hogy a

mitokondriális hálózat egy része a retrográd áramlás ellenére is a sarjban maradjon. Az *MMR1* deléciós törzsekben elmarad a mitokondriális tubulusok akkumulációja a sarjban (Swayne és mtsi., 2011). A második kihorgonyzási pont az anyasejt cortex régiójában található. Itt a Num1 és Mdm36 fehérjékből álló komplex (Mitochondria-ER Cortex Anchor, MECA) rögzíti a mitokondriumokat az anyasejt membránjához. A MECA által biztosított, hogy az anyasejtben megfelelő mennyiségű mitokondriális tubulus maradjon (Klecker és mtsi., 2013; Lackner és mtsi., 2013). A harmadik pont az anyasejt sarjjal szemközti pólusán helyezkedik el és az a feladata, hogy jól működő tubulusokat horgonyozzon ki az anyasejtben, ami fontos annak megfelelő működéséhez [10. ábra] (Higuchi-Sanabria és mtsi., 2014; Pernice és mtsi., 2016; Kraft és Lackner, 2017; Pernice és mtsi., 2018).



**10. ábra.** Az aszimmetrikus mitokondriális öröklődés és a mitokondriális tubulusok különböző kihorgonyzási pontjainak sematikus ábrája (Pernice és mtsi., 2017).

### 2.3.11. Petite-mutációk

A mtDNS-ben különböző mutációk történhetnek, amelyek a respiráció képességének elvesztését eredményezik. A respirációs képesség elvesztésének következményeként a törzsek fermentálható szénforráson lassabban nőnek, kisebb telepeket képeznek, míg nem-fermentálható szénforráson életképtelenek. Petite-mutánsokról két esetben beszélünk. A  $p^-$  mutáns törzsekben a mitokondriális genom nagy része deletálódik, a megmaradt rész pedig amplifikálódik, ezáltal a DNS mérete nem változik számottevően, viszont elvesznek

respirációhoz szükséges gének (Dujon, 1981). A  $p^0$  petite-mutánsokból teljesen hiányzik a mtDNS. A  $p^-$  törzseken belül is több csoportot különböztet meg a szakirodalom attól függően, hogy a  $p^-$  és vad típusú ( $p^+$ ) törzsek keresztezéséből származó hibridek milyen mitokondriális genomot örökölnek. Ha a hibridek között vannak olyanok, amelyek  $p^-$  genomot örököltek, akkor az adott  $p^-$  törzs szuppresszív, ha a hibridek mindegyike  $p^+$  genommal rendelkezik, a  $p^-$  törzs neutrális ( $N p^-$ ). Abban az esetben, ha a szuppresszív törzsek hibridjeinek több, mint 95%-a „petite”, az adott  $p^-$  törzs hipersuppresszív ( $HS p^-$ ) (Ephrussi és Grandchamp, 1965; Blanc és Dujon, 1980; de Zamaroczy és mtsi., 1981). A hipersuppresszív törzsek mtDNS-e sok kópiában tartalmaz *ori* régiókat, ami azzal magyarázható, hogy a vad típusú mtDNS egy olyan szakasza maradt meg, és amplifikálódott bennük, amelyen jelen voltak ezek a szekvenciák. Viszont a  $HS p^-$  törzsekben csak három (2., 3. és 5.) *ori* régió fordul elő a *S. cerevisiae*-re jellemző nyolc közül, ezért a vad típusú mtDNS molekulában előforduló másik öt replikációs origót inaktívnak tekintették. Az „inaktív” *ori* szekvenciák annyiban különböznek az aktív replikációs origóktól, hogy a promóter régiójukat rövid inzerció szakítja meg, ezért az Rpo41 RNS polimeráz nem tud bekötődni hozzájuk (Blanc és Dujon, 1980; de Zamaroczy és mtsi., 1981; Faugeron-Fonty és mtsi., 1984). Itt meg kell jegyezni azonban, hogy a replikáció iniciációjának pontos mechanizmusa továbbra sem tisztázott, így a replikációs origók szerepe a folyamatban sem egyértelmű (Chen és Clark-Walker, 2018).

Nincs egyértelmű magyarázat a hipersuppresszivitás jelenségére. MacAlpine és munkatársainak kísérletei azt a korábbi elméletet támasztják alá, miszerint a hipersuppresszivitás a  $HS p^-$  genomban magas kópiaszámban jelenlevő *ori* szekvenciák által megnövelt replikációs hatékonyság miatt alakul ki. Elméletük szerint a  $HS p^-$  genom Rpo41 RNS polimeráz-függő módon is képes replikálódni: az RNS polimeráz megszintetizálja a primereket, amelyek bekötődnek a cirkuláris mtDNS molekulák *ori5* szekvenciájához, elkezdődik a replikáció, majd az elongáció során a DNS kódoló szála cirkuláris ssDNS formában leválik (MacAlpine és mtsi., 2001).

Egy másik kutatásban viszont azt tapasztalták, hogy az Rpo41 RNS polimeráz szuppressziója mellett nem csökken le az *ori* szekvenciákról átvitt RNS-ek mennyisége, viszont a  $HS$  öröklődés gátolt. Ugyanebben a tanulmányban azonosítottak olyan  $HS p^- \times p^+$  keresztezésből származó hibrideket is, amelyekben az eredetileg  $p^+$  mtDNS deléciókat szenvedett. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a  $HS p^-$  mtDNS akár aktívan is

hozzájárulhat a  $p^+$  mtDNS molekulák elvesztéséhez, például rekombináción keresztül (Corbi és Amon, 2021).

Bradshaw és munkatársai eredményei azt mutatják, hogy a HS fenotípus kialakulása az elérhető dNTP mennyiségével is összefüggésben lehet. A  $p^-$  genomból nagy szakaszok hiányoznak, a megmaradt egységnyi genom mérete a vad típusú genom méretének mindössze 2%-a is lehet (Weth és Michaelis, 1974). A HS  $p^-$  sejtekben az egységnyi genom jelen van monomer és oligomer formában is (MacAlpine és mtsi., 2011). Mivel egy adott mennyiségű dNTP több kisméretű DNS molekula replikációját tudja biztosítani, ezért heteroplazmikus sejtekben a replikációért folyó verseny általában a kisebb molekulák javára tolódik el. Elképzelhető, hogy limitált mennyiségű dNTP jelenlétében csak a kisebb mtDNS molekulák replikációja számára áll rendelkezésre elegendő nukleotid (Bradshaw és mtsi., 2017).

## **2.4. Az interspecifikus hibridek genetikai jellemzése**

### **2.4.1. Az interspecifikus hibridek sterilitásának okai**

A *Saccharomyces* fajokat posztzigotikus barrier választja el egymástól, ami azt jelenti, hogy a fajok képesek egymással életképes interspecifikus hibrideket létrehozni, viszont ezek hibridek sterilek: vagy nem tudnak életképes spórát létrehozni, vagy a spórák nem képesek egymással konjugálva F2 hibrideket képezni (Pfliegler és mtsi., 2012). A hibridsterilitás leginkább elfogadott magyarázata az, hogy az allodiploid hibridekben a különböző szülőktől származó homeológ kromoszómák<sup>1</sup> az eltérő szekvenciák miatt nem tudnak párba állni a meiózis I profázisában, így a meiózis nem tud végbemenni a hibridekben (Delneri és mtsi., 2003; Charron és mtsi., 2014). A *Saccharomyces* fajokra azonban jellemző a genom duplikáció, vagyis a genomjuk megkettőződhet, amelynek eredményeként tetraploid hibridek jöhetnek létre. A tetraploid hibridekben minden kromoszómának megtalálható az azonos születtől származó homológ párja, ezért ezekben a hibridekben a meiózis lezárásának nincs akadálya (Banno és Kaneko, 1989; Charron és mtsi., 2019). Viszont a *Saccharomyces* fajokban a párosodásért felelős gének a *MAT* lókuszt szabályozása alatt állnak. Az allotetraploid hibridek allodiploid spórákat képeznek, amelyek heterozigóták a *MAT* lókuszt a és  $\alpha$  alléljére nézve. Az ezekről az allélekről átíródó  $\alpha 1$  és  $\alpha 2$  fehérje létrehozza az  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  represszor, amely meggátolja a konjugációért felelős gének átírását. Az allotetraploid hibridek által létrehozott

<sup>1</sup> Részlegesen homológ kromoszómák, amelyek közös eredetre vezethetőek vissza.

allodiploid spórák ezért valószínűleg nem tudnak egymással konjugálva F2 hibrideket képezni. Tehát az interspecifikus hibridek fertilitásának visszanyeréséhez a genom duplikációjára és az egyik *MAT* lókuszt elvesztésére is szükség van (Pfliegler és mtsi., 2012; Sipiczki, 2018).

Itt érdemes szót ejteni a *Saccharomyces* fajoknál megfigyelhető „rare-mating”-nek nevezett jelenségről is. Kutatók az 1900-as évek során azt figyelték meg, hogy *MATa/a* sejtek kis gyakorisággal visszanyerik a párosodási képességüket. A jelenség hátterében a *MAT* heterozigótáság elvesztése áll, vagyis a *MATa/a* sejtek *MATa/a* vagy *MATa/a* genotípusúvá válnak mitotikus génkonverzió által (Gunge és Nakatomi, 1972). A rare-mating lehetőséget adhat diploid törzsek közötti hibridizálásra, illetve steril hibridek további keresztezésbe vonására (Sipiczki és mtsi., 2020; Antunovics és mtsi., 2023).

Tajvani kutatók felvetették annak a lehetőségét is, hogy hibridsterilitás kialakulhat mitonukleáris inkompatibilitás miatt is (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010). Mitonukleáris inkompatibilitás akkor lép fel, amikor az egyik szülő kromoszómán kódolt mitokondriális fehérjéje a mitokondriumba lépve az allélikus különbségek miatt nem tud kölcsönhatásba lépni a másik szülői faj mtDNS-e által kódolt fehérjével vagy RNS-sel, ami a respirációs képesség elvesztését is eredményezheti. A respiráció pedig szükséges a meiózis kulcsregulátorának, az Ime1 transzkripciós faktor génjének expressziójához, amely nélkül a meiózis nem tud végbemenni (Treinin és mtsi., 1993). A mitonukleáris inkompatibilitásnak viszont valószínűleg csak akkor van hatása a fenotípusra, ha a hibrid genomból hiányzik az adott interakcióhoz szükséges gén mtDNS-sel kompatibilis allélja (Sipiczki, 2018).

#### **2.4.2. Kiméra genomok eredete**

A természetben számos olyan élesztő törzs előfordul, amelyek genomjában más fajtól származó gének is megtalálhatóak (Sipiczki, 2008; Almeida és mtsi., 2014; Albertin és mtsi., 2018). Az ilyen törzsek megnevezése nem egységes az irodalomban: vannak akik interspecifikus hibrideknek tekintik őket, míg mások az idegen gének kis száma miatt az adott fajon belüli törzseknek (Sipiczki, 2018). Mivel egyik előző fogalom sem illik rá teljesen ezekre a törzsekre, bevezetésre került egy harmadik megnevezés is: a kiméra (Groth és mtsi., 1999; Belloch és mtsi., 2009; Sipiczki, 2011). A jelen dolgozatban ezt a kifejezést használom az olyan törzsek leírására, amelyek genomjában a gének döntő többsége egy adott fajtól, kis része pedig egy másik fajtól származik.

A legszélesebb körben elterjedt magyarázat a kiméra genomok eredetére az, hogy az idegen gének introgresszióval kerülnek be a genomba: két faj kereszteződésével létrejön egy interspecifikus hibrid, amely több generáción át mindig csak az egyik szülői fajjal kereszteződik vissza, aminek eredményeként a másik szülői fajtól származó gének szinte teljesen elvesznek a genomból (Anderson és Hubricht, 1938; Liti és mtsi., 2006; Muller és McCusker, 2009; Louis, 2011; Albertin és mtsi., 2018).

Az idegen gének eredetének egy másik magyarázata lehet a genom generációkon keresztül történő autoredukálódása (Karanyicz és mtsi., 2017; Sipiczki, 2018). Az egyik *MAT* lókuszt hordozó kromoszóma elvesztése instabillá teheti a genomot, ami további kromoszómák elvesztéséhez vezet a meiotikus osztódások során, így a genom egyre kevesebb kromoszómát, ezáltal gént fog tartalmazni, végül kialakulhatnak olyan genomok, amelyekben már csak az egyik szülői fajtól származó kromoszómák és a másik szülői faj néhány génje található meg, amelyek rekombinációval kerültek át az adott kromoszómára (Karanyicz és mtsi., 2017; Sipiczki, 2018).

Hasonló jelenség figyelhető meg a mitotikus osztódások során is. A folyamat során általában mindig ugyanattól a szülői fajtól származó kromoszómák vesznek el. Ennek valószínűleg az lehet az oka, hogy míg az ortológ kromoszómák általában ugyanazokat a géneket tartalmazzák, vannak olyan gének, amelyek a két adott fajban eltérő kromoszómán helyezkednek el. Például a pentóz-foszfát útvonal egyik enzimét kódoló *GND1* gén a *S. uvarum* XV-ös, míg a *S. cerevisiae* VIII-as kromoszómáján található (He és mtsi., 2007; Scannel és mtsi., 2011). Ha először elvész a *S. uvarum*-tól származó XV-ös kromoszóma, majd ezt követően a *S. cerevisiae*-tól származó VIII-as kromoszóma, akkor a hibrid genomból a *GND1* gén mindkét allélja hiányozni fog, a sejt vegetatív és fermentatív növekedési rátája egyaránt lecsökken, érzékenyebbé válik a különböző stressz faktorokkal szemben, ezáltal a fitnessze is jelentősen csökkenni fog (Steinmetz és mtsi., 2002; Larochelle és mtsi., 2006; Shima és mtsi., 2008; Yoshikawa és mtsi., 2011). A *GND1*-en kívül még több mint 180 olyan gén van, amely a *S. cerevisiae* VIII-as és a *S. uvarum* XV-ös kromoszómáján található, ezek együttes elvesztése valószínűleg letális a hibridekre nézve (Scannel és mtsi., 2011). Ezért a hibridek életképességének és fitnessének szempontjából kedvezőbb, ha mindig ugyanattól a szülői fajtól származó kromoszómák vesznek el (Karanyicz és mtsi., 2017; Sipiczki, 2018).

## 2.5. A mitotípus hatása az interspecifikus és intraspecifikus hibridek fenotípusára

### 2.5.1. A mitonukleáris inkompatibilitás szerepe az interspecifikus hibridek sterilitásában

Az utóbbi években három olyan tanulmány is megjelent, amely a mitonukleáris inkompatibilitást összefüggésbe hozta az interspecifikus hibridek sterilitásával (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010; Jhuang és mtsi., 2017). A mitonukleáris inkompatibilitás a respirációs képesség elvesztésén keresztül okozhat sterilitást. A sejtek respirációs képesség hiányában nem képesek belépni a meiózisba, ezáltal elvesztik a spórázási képességüket (Treinin és mtsi., 1993).

Mitonukleáris inkompatibilitást fedeztek fel a *S. bayanus* XIII-as kromoszómáján kódolt Aep2 fehérje és a *S. cerevisiae* mtDNS-en kódolt oli1 mRNS között (Lee és mtsi., 2008). Az *OLII* gén a 11 alegységből álló ATP-szintáz 9-es alegységét kódolja. Az *OLII* a Var1 fehérje és a szerint szállító tRNS génjével együtt egy policsztronos mRNS-re íródik át, amelyből egy későbbi érési folyamat során jön létre az oli1 mRNS (Zassenhaus és mtsi., 1984). Az Aep2 elengedhetetlen az oli1 mRNS translációjához (Finnegan és mtsi., 1991). Bár a pontos mechanizmus nem ismert, annyi biztos, hogy az Aep2-nek az oli1 mRNS 5' UTR régiójával kölcsönhatásba kell lépnie ahhoz, hogy a transláció sikeresen végbemehessen (Ellis és mtsi., 1999). Az inkompatibilitást a *S. bayanus* Aep2 és a *S. cerevisiae* *OLII* génje között valószínűleg az okozza, hogy a két fajban az *OLII* 5' UTR régió szekvenciája és hossza jelentősen eltér egymástól, ezért az *S. bayanus* Aep2 nem ismeri fel a *S. cerevisiae* *OLII* 5' UTR régióját. Az oli1 mRNS translációjának hiányában nem jön létre működőképes ATP-szintáz komplex, ami a respirációs képesség és a fertilitás elvesztését okozza (Lee és mtsi., 2008).

Mitonukleáris inkompatibilitást mutattak ki a *S. cerevisiae* IX-es kromoszómáján kódolt Mrs1 és a *S. bayanus* és *S. pastorianus* *cox1* mRNS-e között is (Chou és mtsi., 2010). Az Mrs1 egy mitokondriális RNS splicing fehérje, amely intronokat távolít el a *cob* és *cox1* mRNS-ekből (Kreike és mtsi., 1986; Bousquet és mtsi., 1990). A *COB* és a *COX1* egyaránt elektrontranszportlánc alegységeket kódoló gének: a *COB* gén a citokróm b-t kódolja, amely az ubikinol-citokróm c reduktáz komplex egyik alegysége, a *COX1* pedig a citokróm c oxidáz 1-es alegységét (Kreike és mtsi., 1979; Taanman és Capaldi, 1992). Az inkompatibilitás oka, hogy a *S. bayanus* és a *S. pastorianus* *COX1* génekben jelen van egy olyan intron, amely az evolúció során elveszett a *S. cerevisiae* ortológ génjéből, az intron elvesztését követően

valószínűleg a *S. cerevisiae* Mrs1 fehérje elvesztette ennek az intronnak a felismerési képességét (Chou és mtsi., 2010).

További példa a mitonukleáris inkompatibilitásra a *S. bayanus* sejtmagjában kódolt Ccm1 fehérje kisebb kötődési affinitása a *S. cerevisiae* mtDNS-e által kódolt 15S rRNS-éhez (Jhuang és mtsi., 2017). A Ccm1 a Mrs1-hez hasonlóan egy mitokondriális splicing faktor, amely intronokat távolít el a *COX1* és *COB* génekből, de ezenkívül fontos szerepe van a 15S rRNS stabilizálásában is (Moreno és mtsi., 2009; Puchta és mtsi., 2010). *ccm1Δ* törzsekben a 15S rRNS fragmentálódik, ami a fehérjeszintézis mértékének drasztikus csökkenését eredményezheti a mitokondriumban (Puchta és mtsi., 2010). Fehérjeszintézis hiányában pedig a mtDNS által kódolt enzimek mRNS-ei nem kerülnek transzlációra, az elektrontranszportlánc ezáltal működésképtelenné válik.

### **2.5.2. A mitonukleáris és a mito-mito episztázis hatása az intraspecifikus hibridek fenotípusára**

A mitokondriális és nukleáris genom közötti kölcsönhatás nem csak az interspecifikus hibridek esetében lehet kihatással a törzsek fitneszére, az intraspecifikus hibridek fenotípusát is befolyásolhatja (Paliwal és mtsi., 2014). A mtDNS magas mutációs rátával rendelkezik, ami számos mitokondriális haplotípus kialakulását eredményezi fajon belül (Johnson és mtsi., 2003; Burton és mtsi., 2007; Albertin és mtsi., 2013). A légzési láncot alkotó komplexek alegységeinek egy részét a nukleáris genom kódolja, másik részét pedig a mtDNS. A gének allélikus változatai, függetlenül attól, hogy melyik sejtkompartimentben helyezkednek el, hatással lehetnek a mitonukleáris kölcsönhatásokra, ezzel megváltoztatva a mitokondriális működés hatékonyságát és a sejtek fitneszét (Paliwal és mtsi., 2014).

Egy érdekes kísérlet során összehasonlították azonos nukleáris genommal, de eltérő mitotípussal rendelkező törzsek növekedési rátáját különböző tenyésztési körülmények között: fermentálható és nem-fermentálható szénforráson, 37 °C-on és szobahőmérsékleten, valamint oxidatív stresszt kiváltó táptalajon. Ez lehetőséget adott a nukleáris és a mitokondriális genom, valamint a kettő kölcsönhatásának fenotípusra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Azt tapasztalták, hogy a mitonukleáris kölcsönhatásnak nem-fermentálható szénforráson (a sejtek csak oxidatív foszforilációval képesek energiát termelni) a legnagyobb hatása a fenotípusra: a törzsek között megfigyelhető fenotípusos variancia mintegy 40%-áért volt felelős. Fermentálható szénforráson kicsi volt a jelentősége, ami összhangban van azzal, hogy ilyen tápközegben az energiatermelés elsősorban fermentációval történik. A fokozott

oxidatív stressznek kitett, fermentálható szénforráson tartott törzsek közötti fenotípusos variancia 16%-áért volt felelős a mitonukleáris episztázis. Azt is megfigyelték, hogy a mitotípus hatása a fenotípusra, függetlenül a mitonukleáris kölcsönhatásoktól, 37 °C-on volt a legnagyobb. Egy másik érdekes megfigyelés volt, hogy az eredeti, természetben is előforduló nukleáris és mitokondriális genom kombinációk jelentős előnyt biztosítottak a törzseknek nem-fermentálható szénforráson és hőmérsékleti stressz alatt. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a légzési lánc fehérjéit kódoló gének az evolúció során koadaptálódtak ezekben a genomokban (Paliwal és mtsi., 2014).

A hibridek fitnessét nemcsak a mitonukleáris, de a mitokondriális allélek közötti kölcsönhatások is befolyásolhatják (Wolters és mtsi., 2018). A mtDNS-en több olyan fehérje génje is megtalálható, amelyek egy közös enzimkomplex részét képezik. Ezeknek a fehérjéknek a génjei valószínűleg együtt evolválódtak annak érdekében, hogy a lehető legnagyobb hatékonysággal tudjon működni az adott fehérjekomplex. Rekombinációval új allélkombinációk jönnek létre, amelyek akár hátrányosan is hathatnak a légzési lánc működésére. Wolters és munkatársai ezért összehasonlították szülői, és több rekombináns mitotípussal rendelkező hibrid fitnessét. A rekombináns hibridek fitnessze számos tenyésztési körülmény között (elsősorban 37 °C-on, valamint fermentálható és nem-fermentálható táptalajon) eltért a szülői mitotípussal rendelkező hibridekétől. Eredményeik azt mutatták, hogy a fenotípusos különbségek kialakításában több mitokondriális lókuszt is részt vesz (Wolters és mtsi., 2018).

### **2.5.3. A mitotípus hatása az interspecifikus hibridek fenotípusára**

Még kevés adat áll rendelkezésre a mitotípus interspecifikus hibridek fitnessére gyakorolt hatásával kapcsolatban. Viszonylag kevés kísérlet történt ennek felderítésére, amelyeket kisszámú hibriddel végeztek.

*S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridekkel végzett kísérlet arra utal, hogy a mitotípus összefüggésbe hozható a dehidratációval szembeni toleranciával (Picazo és mtsi., 2015). A dehidratációnak ipari szempontból különösen fontos szerepe van, hiszen a borászatban és sörgyártásnál is elsősorban aktív szárított élesztőport használnak starter kultúraként. A szárítás azonban jelentős hő-, hiperozmotikus- és oxidatív stressznek teszi ki a törzseket (Garre és mtsi., 2010; Capece és mtsi., 2016). A *S. uvarum*-nak alacsony a dehidratációt követő túlélési rátája (Eleutherio és mtsi., 1997). Picazo és munkatársai által végzett kísérletben a *S. uvarum* mitotípussal rendelkező hibrid és a *S. uvarum* szülői törzs szárítást

követő viabilitása egyaránt 5% volt, míg a *S. cerevisiae* mitotípusú hibridé 25%, a *S. cerevisiae* szülői törzse pedig 45%. Ez az eredmény arra utal, hogy a *S. cerevisiae* mitotípusnak jelentős pozitív hatása van a dehidratációval szembeni toleranciára (Picazo és mtsi., 2015).

Egy másik érdekes kísérletben összehasonlították *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridek génexpresszióját, hiszen már 1987-ben felfedezték, hogy a mitotípus befolyásolhatja a nukleáris genom expresszióját (Parikh és mtsi., 1987). Azt figyelték meg, hogy a *S. cerevisiae* mitotípussal rendelkező hibridekben a glikolízis/fermentáció útvonal génjeinek transzkripció szintje jelentősen alacsonyabb, mint a *S. uvarum* mitotípusú hibridekben. Ennek megfelelően a *S. uvarum* mitotípusú hibridekben és a *S. uvarum* szülői törzshöz képest, ami arra utal, hogy a mtDNS hatással lehet a hibridek respiráció:fermentáció arányára. A respirációs ráta jelentősen befolyásolja az élesztők biomassza termelésének mértékét, amely ipari szempontból fontos tulajdonság (Solieri és mtsi., 2008).

Albertin és munkatársai szintén *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridekben vizsgálták a mtDNS hatását a törzsek respirációs növekedésére és fermentációs teljesítményére. Habár korábban a mitotípust összefüggésbe hozták a fermentációs teljesítménnyel, azt tapasztalták, hogy a hibridek alacsony és normál cukorkoncentráció mellett a mitotípustól függetlenül hasonló fermentációs tulajdonsággal rendelkeztek, ami arra utal, hogy a mitotípus nem befolyásolja a fermentáció hatékonyságát (O'Connor és mtsi., 1996). Nem-fermentálható szénforráson azonban jelentős növekedésbeli különbségeket figyeltek meg a különböző mitotípusú hibridek között. A *S. cerevisiae* mitotípusú hibridek növekedése hamarabb elkezdődött és gyorsabb volt, mint a *S. uvarum* mitotípusú hibrideké, ami valószínűleg a hibridek eltérő respirációs rátájával magyarázható. Összefüggést találtak a hibridek respirációs rátája és citokróm a, a<sub>3</sub> (a citokróm-oxidáz tagjai) szintje között: a *S. cerevisiae* mitotípusú hibridekben magasabb volt ez a szint. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a citokróm-oxidáz rendkívül fontos szerepet tölt be az oxidatív foszforiláció rátájának meghatározásában, ezért a citokróm a, a<sub>3</sub> megemelkedett szintjével a respiráció szintje is megemelkedik, ami pozitív hatással van a törzsek növekedésére, ezáltal fitneszére is (Mazat és mtsi., 1986; Rigoulet és mtsi., 1987). Egy számítógépes szimuláció azt az eredményt adta, hogy a kísérletben kimutatott növekedési rátával rendelkező *S. cerevisiae* és *S. uvarum* mitotípusú hibrideket 1 : 1 arányban nem-fermentálható szénforrást tartalmazó tápfolyadékba oltva a *S. cerevisiae* mitotípusú hibridek rövid időn belül túlnövik a *S. uvarum* mitotípusú hibrideket (Albertin és mtsi., 2013).

Több tanulmány is megjelent az utóbbi években, amely a mitotípust összefüggésbe hozta az interspecifikus hibridek hőmérséklet-toleranciájával (Baker és mtsi., 2019; Li és mtsi., 2019). Az egyik ilyen tanulmányt *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* hibridekkel végezték. Az *S. eubayanus* egy kriotoleráns faj, amely 33-35 °C fölött nem képes növekedni (Sampaio, 2018). A kísérletben alkalmazott *S. cerevisiae* szülői törzsek növekedése pedig 4 °C-on maradt el. Habár a hibridek a mitotípustól függetlenül széles hőmérsékleti skálán képesek voltak növekedni, magasabb hőmérsékleten a *S. cerevisiae* mitotípusú hibridek növekedése jelentősen meghaladta az *S. eubayanus* mitotípussal rendelkező hibridek növekedését és ehhez hasonlóan az *S. eubayanus* mitotípusú hibridek növekedése alacsonyabb hőmérsékleten felülmúlta a *S. cerevisiae* mitotípusúakét. A *S. eubayanus* mtDNS-ét *S. cerevisiae* mtDNS-re cserélve azt tapasztalták, hogy az így kapott úgynevezett cibridek a hibridekhez hasonlóan jobban növekedtek magas, és kisebb mértékben alacsony hőmérsékleten, mint az eredeti *S. eubayanus* törzs (Baker és mtsi., 2019). A cibridek citoplazmikus hibrid sejtek, amelyeket egy teljes sejt és egy sejtmag nélküli sejt fúziójával hoznak létre (Modi és Hämäläinen, 2020).

Li és munkatársai is hasonló eredményt kaptak *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridek esetében: a *S. cerevisiae* mitotípusú hibridek jelentősen kisebb növekedést mutattak 4 °C-on, mint 22 °C-on, illetve 37 °C-on, míg a *S. uvarum* mitotípusú hibridek 4 °C-on látványosan nagyobb méretű telepet képeztek, mint magasabb hőmérsékleten. Ez a tendencia fermentálható és nem-fermentálható szénforrást tartalmazó táptalajon tartott törzseknél egyaránt megfigyelhető volt. Amikor a *S. cerevisiae* mitotípusú hibrid *COXI* allélját, *S. uvarum* allélra cserélték, a hibrid növekedési képessége 37 °C-on, nem-fermentálható szénforráson lecsökkent, míg 4 °C-on fermentálható szénforráson megnőtt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mitotípus hozzájárul az élesztők hőmérséklet toleranciájának kialakításához (Li és mtsi., 2019).

#### **2.5.4. A mitokondriális genom öröklődése interspecifikus hibridekben**

Az interspecifikus hibridek mitokondriális öröklődésével kapcsolatban szinte csak nyitott kérdések vannak. Például mitől függ, hogy melyik szülői faj mtDNS-e fixálódik a sejtekben? Az első tanulmányokban, valamint a tanszékünk korábbi kísérletei során is, azt vették észre, hogy a bizonyos fajpárosítások esetén mindig ugyanannak a fajnak a mtDNS-e marad meg a hibridekben (de Vero és mtsi., 2003; Antunovics és mtsi., 2005). Például a *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridek mindig *S. cerevisiae*, a *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* hibridek pedig minden esetben *S. uvarum* mtDNS-t örököltek (Antunovics és mtsi., 2005; Karanyicz és mtsi., 2017).

Későbbi tanulmányok viszont arra utalnak, hogy a mtDNS öröklődése sokkal inkább az adott szülői törzsektől, semmint a fajtól függ.

Egy kísérlet során különböző *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzseket kereszteztek egymással kb. 80 hibridet létrehozva. Azt figyelték meg, hogy a keresztezési partnertől függetlenül bizonyos *S. cerevisiae* törzsekkel létrehozott hibridek mindig *S. cerevisiae* mitotípust örököltek, viszont egy másik törzspárosítás esetén a hibridek mindegyikében *S. uvarum* mtDNS volt kimutatható. Egy bizonyos *S. cerevisiae* szülői törzssel létrehozott hibridek közül pedig egy sem volt képes respirációra. Szintén ebben a tanulmányban fedeztek fel először rekombináns mtDNS-sel rendelkező interspecifikus hibrideket. (Verspohl és mtsi., 2018).

Később egyre több kutatócsoport talált rekombináns mitokondriális genommal rendelkező interspecifikus *Saccharomyces* hibridet. *S. cerevisiae* és *S. paradoxus* fajpárosításból származó hibridek mitokondriális genomszekvenálása azt mutatta, hogy a rekombináns mtDNS molekulák vázát az egyik szülői törzs mtDNS-e képezi, amelybe rekombinációval bekerülnek szekvenciák a másik szülőtől származó mitokondriális genomból (Poláková és mtsi., 2021).

Egy másik kutatásban szintén *S. cerevisiae* és *S. paradoxus* törzseket kereszteztek egymással, viszont arra is kíváncsiak voltak, hogy vajon a szülői partnerek közötti evolúciós távolság befolyásolja-e a mitokondriális öröklődést. Ezért nem csak interspecifikus, de intraspecifikus hibridekre is kiterjesztették a vizsgálatukat. A hibridek között nagy számban mutattak ki rekombináns mitotípust. A rekombináció rátáját a szülői törzsek rokonsági kapcsolata nem befolyásolta. A rekombinációs pontok elhelyezkedésének vizsgálatokor azt figyelték meg, hogy a rekombinációs pontok jelentős része protein kódoló exonok közelében található. Több hibrid mitokondriális genomjában is kimutattak deléciókat, amely a respirációs képesség elvesztését eredményezte. A deléciók kialakulásának valószínűségét a szülői törzsek közötti evolúciós távolság (divergencia) megnövelte (Hénault és mtsi., 2022).

Egy másik érdekes kérdés az interspecifikus hibridek mitokondriális genomjának öröklődésével kapcsolatban, hogy vajon a környezeti tényezők, illetve szelekciós nyomások befolyásolják-e, hogy melyik faj vagy törzs mtDNS-e fixálódik a hibridekben. Sajnos még kevés kísérletet végeztek ennek a kérdésnek a megválaszolására, de ezek arra utalnak, hogy valószínűleg a környezeti faktoroknak is szerepük van a mtDNS öröklődésében.

Amikor *S. cerevisiae* és *S. paradoxus* törzsekkel létrehozott zigótákat különböző körülmények között tenyésztettek, például nem-fermentálható szénforráson vagy ozmotikus stressznek kitéve, azt figyelték meg, hogy a különböző mitotípusokkal rendelkező hibridek

aránya eltérő volt a kontroll tápközeghez viszonyítva. A kutatók arra is kíváncsiak voltak, hogy vajon ez a különbség abból adódik-e, hogy a különböző mitotípusú hibridek fitnessze eltérő a különböző környezeti körülmények között. Elvégezték egy kompetíciós vizsgálatot, amely során 1:1 arányban oltottak *S. cerevisiae* és *S. paradoxus* mitotípussal rendelkező hibrideket az egyes tápfolyadékokba. A kísérlet azt mutatta, hogy a *S. cerevisiae* mitotípussal rendelkező hibrideknek nagyobb fitnessze van szinte az összes fent leírt tápközegben, de az eredményeket befolyásolta az is, hogy a hibridek mely szülői törzsek keresztezéséből származtak (Hsu és Chou, 2017).

Egy másik publikáció adatai szintén arra utalnak, hogy a mitotípus befolyásolhatja az interspecifikus hibridek fitnesszét bizonyos környezeti körülmények között. 122 interspecifikus hibrid mitokondriális genomját vizsgálták meg. A hibridek *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum* és *S. eubayanus* fajok különböző kombinációjából származtak, többségüket ipari környezetből izolálták (pl. sörgyártás, borkészítés), ahol a törzsek hidegtűrésének kiemelkedő szerepe van. Azt tapasztalták, hogy a korábbi publikációkkal ellentétben, a hibridek többsége nem a *S. cerevisiae*-től, hanem a kriotoleráns szülőtől örökölte a mtDNS-ét. Ez arra utal, hogy a mtDNS szerepet játszhat a hibridek kriotoleranciájának kialakításában. Összefüggést találtak a hibridek mitokondriális és nukleáris genomjának eredete között is: általában annak a szülőnek a mtDNS-e maradt meg a sejtekben, amely a hibridek nukleáris genomjának az összetételében is domináns szerepet kapott. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a mitonukleáris kölcsönhatásoknak a természetben előforduló hibridek között is fontos szerepe lehet (Langdon és mtsi, 2019).

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Anyagok

##### 3.1.1. Törzsek

##### 3.1.1.1. A *S. cerevisiae* x *S. uvarum* fajok keresztezéséhez használt törzsek

Több auxotróf *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzset kereszteztünk egymással annak kiderítésének érdekében, hogy a különböző törzsek milyen hatékonysággal örökítik tovább a mtDNS-üket. A felhasznált törzsek listáját, genotípusát és eredetét az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. A keresztezésekhez használt törzsek genotípusa és eredete

Faj	Törzsek	Genotípus	Eredet
<i>S. cerevisiae</i>	10-167	<i>MATa met3- leu2-1</i>	YGSC* s30-3
	10-170	<i>MATa/α met5- leu2-</i>	YGSC X4005-11A
	10-174	<i>MATa ade4- trp1-</i>	YGSC STX23-5B11
<i>S. uvarum</i>	10-522	<i>MATa/α ura3-</i>	tokaji izolátum
	10-1650	<i>MATa</i> SSS110 CBS7001 hoΔ::NatMX <i>ade2- ura3-</i>	CBS** 7001
	10-1651	<i>MATa</i> SSS111 CBS7001 hoΔ::NatMX <i>ade2- ura3-</i>	CBS 7001

\*: Yeast Genetic Stock Center, Berkley, USA.

\*\* : Centraalbureau voor Schimmencultures, Upsalalaan, Netherlands.

##### 3.1.1.2. A 10-170-es *S. cerevisiae* törzs genotípusa

A 10-170-es *S. cerevisiae*-ről kezdetben azt feltételeztük, hogy *MATa* genotípussal rendelkező heterotalliás haploid törzs. Később azonban bebizonyosodott, hogy a párosodási típusváltás aktiválódása által diploiddá vált (Antunovics és mtsi., 2023).

### 3.1.1.3. A *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* x *S. cerevisiae* hármashibridek és szülői törzsei

A hármashibrideket a 10-1651 *S. uvarum* x 10-1653 *S. kudriavzevii* kettőshibrid és a 10-170 *S. cerevisiae* törzs keresztezésével hozták létre a tanszék munkatársai. A törzsek genotípusa és eredete a 2. táblázatban látható.

**2. táblázat.** A hármashibridek és szülői törzseinek genotípusa és eredete

Faj	Törzsek	Genotípus	Eredet
<b>Szülői nemzedék</b>			
<i>S. uvarum</i>	10-1651	<i>MATα</i> SSS111 CBS7001 hoΔ::NatMX <i>ade2- ura3-</i>	CBS 7001
<i>S. kudriavzevii</i>	10-1653	<i>MATa</i> SSS411 hoΔ::NatMX <i>trp1-ura3-</i>	FM* 1193
<i>S. cerevisiae</i>	10-170	<i>MATa/α met5- leu2-</i>	YGSC X4005-11A
<b>F1 nemzedék</b>			
<i>S. uvarum</i> x <i>S. kudriavzevii</i>	II/6	<i>MATa/α ura3-</i>	saját izolátum
<b>F2 nemzedék (hármashibridek)</b>			
<i>S. uvarum</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. cerevisiae</i>	II/6 x 10-170	<i>MATa/α</i> prototróf	saját izolátum

\*: Hittinger és mtsi., 2010. (személyes kérés)

### 3.1.2. Alkalmazott tápközegek

A kísérletek során alkalmazott tápoldatok és táptalajok összetétele a 3. táblázatban található. A tápoldatok desztillált vízzel készültek és autoklávban lettek sterilizálva. A minimál táptalajhoz használt vitaminoldat összetétele a 4. táblázatban, a szelektív táptalajokhoz szükséges kiegészítő oldatok pedig az 5. táblázatban találhatóak.

**3. táblázat.** A kísérletekhez használt tápközegek.

<b>Tápközeg</b>	<b>Összetétel</b>
YEL (100 ml)	1 g élesztő kivonat (VWR 97064-368) 2 g glükóz (VWR BDH9230)
YEA (100 ml)	100 ml YEL + 2g poragar (SIGMA ALDRICH A1296)
YEG (100 ml)	1 g élesztő kivonat (VWR 97064-368) 3 ml 99,7%-os glicerol (VWR BDH1172-1LP) 2 g poragar (SIGMA ALDRICH A1296)
SML (1000 ml)	5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Scharlau AM04001000) 1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (VWR 470302-252) 0,5 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Scharlau MA0085) 10 g glükóz (VWR BDH9230) 1 ml vitaminkeverék
SMA (1000 ml)	1000 ml SML + 20g poragar (SIGMA ALDRICH A1296)
Spóráztató (100 ml)	1 g K-acetát (VWR BDH9254) 0,5 g élesztő kivonat (VWR 97064-368) 0,25 g glükóz (VWR BDH9230) 2 g poragar (SIGMA ALDRICH A1296)

**4. táblázat.** A minimál tápoldathoz használt vitaminkeverék összetétele.

<b>Tápoldat</b>	<b>Összetétel</b>
<b>Vitaminkeverék</b> (100 ml desztillált vízben)	0,2 mg folsav 0,2 mg biotin 40 mg Ca-pantotenát 200 mg inozitol 40 mg niacin 20 mg aminibenzoosav 40 mg pyridoxin-HCl 40 mg tiamin 20 mg riboflavin

**5. táblázat.** Kiegészítő oldatok SMA táptalajhoz.

<b>Tápközeg kiegészítések</b>	
Nukleobázis kiegészítés – uracil (SIGMA ALDRICH U0750)	7,5 mg 100 ml tápoldatban
Aminosav kiegészítés – leucin (SIGMA ALDRICH L8000)	7,5 mg 100 ml tápoldatban

### 3.1.3. A molekuláris kísérletek során alkalmazott oldatok

A molekuláris kísérletek során alkalmazott oldatok összetételét az 6. táblázat tartalmazza.

**6. táblázat.** A kísérletek során felhasznált oldatok összetétele.

Oldat	Összetétel
0,5 M EDTA (1000 ml) pH 8,0	25,5 g EDTA (Scharlau AC0965) 186,1 g NaOH (VWR BDH7466-1)
1 M TRIS (1000 ml) pH 8,0	121,4 g TRIS (VWR BDH7729-1)
1x TE (100 ml)	0,2 ml 0,5 M EDTA (Scharlau AC0965) 1 ml 1 M TRIS (VWR BDH7729-1)
10x TBE puffer (1000 ml)	109,0 g TRIS (VWR BDH7729-1) 55,6 g Bórsav (VWR BDH9222) 40 µl 0,5 M EDTA (Scharlau AC0965)
Sol A	0,5 M Szorbit (SIGMA ALDRICH S7547) 10 mM EDTA (Scharlau AC0965) 50 mM TRIS-HCl pH: 7,5 (VWR BDH7729-1)
Sol B	100 mM NaCl (SIGMA ALDRICH S9888) 10 mM EDTA (Scharlau AC0965) 1% Na-lauril-szarkozin (SIGMA ALDRICH L5125) 50 mM TRIS-HCl pH: 7,5 (VWR BDH7729-1)
Szorbit-EDTA	1,2 M Szorbit (SIGMA ALDRICH S7547) 50 mM EDTA (Scharlau AC0965)
5 M K-acetát (100 ml)	49,07 g K-acetát (VWR BDH9254)
10%-os SDS	10 g Na-dodecil szulfát (SIGMA ALDRICH L5750)
Rnáz A törzsoldat 10 mg/ml (1 ml)	10 mg Ribonukleáz A (SIGMA ALDRICH L5000) 1 ml 1x TE
Lízis puffer	10 mM TRIS-HCl pH 8,0 (VWR BDH7729-1) 0,45 M EDTA pH 8,0 (Scharlau AC0965) 1% Na-lauril-szarkozin (SIGMA ALDRICH L5125) 0,5 mg/ml Proteinase K (SIGMA ALDRICH P2308)
CPE puffer	40 mM citromsav (Spektrum 3.03125) 120 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (VWR 102494C)

## 6. táblázat folytatása

Oldat	Összetétel
CPES puffer	40 mM citromsav (Spektrum 3.03125) 120 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (VWR 102494C) 20 mM EDTA (Scharlau AC0965) 1,2 M Szorbit (SIGMA ALDRICH S7547) 5 mM DTT 250 µg/ml Zymolyase-20T (USBiological Z-1000)

### 3.2. Kísérleti módszerek

#### 3.2.1. Interspecifikus hibridizálás

Kétféle módon hoztunk létre *S. uvarum* x *S. cerevisiae* interspecifikus hibrideket. Az első módszer során először a szülői törzseket komplett táptalajra szélesztettük, majd a csészéket tükörbárony segítségével SMA minimál táptalajra keresztbe-replikáztuk. A keresztezési pontoknál, lehetőség nyílt arra, hogy az adott auxotróf szülői fajok sejtjei egymással konjugálva prototróf hibrideket hozzanak létre, amelyek életképesek minimál táptalajon. A keresztezési pontoknál kinőtt telepek nem voltak jól elkülöníthetőek egymástól, ezért kiszélesztettük őket SMA táptalajra, majd különálló prototróf telepeket izoláltunk. Ezzel a módszerrel több *S. uvarum* (10-522, 10-1650, 10-1651) és *S. cerevisiae* (10-167, 10-170, 10-174) törzset kereszteztünk egymással, hogy megnézzük, hogy az eltérő törzskombinációk hogyan befolyásolják a mitokondriális öröklődést.

A második módszer során a 10-522 *S. uvarum* törzset 3-4 napig K-acetátos spóráztató táptalajon tartottuk, majd a spórázó *S. uvarum* és az akkor még haploidnak vélt 10-170 *S. cerevisiae* tenyészetből 1-1 kacsnyi sejtmennyiséget komplett tápfolyadékba oltottunk. A tenyészetet egy éjszakán át szobahőmérsékleten rázattuk, majd másnap SMA táptalajra szélesztettük. A kinőtt telepeknél háttérnövekedést tapasztaltunk, ezért minden csészéről kiválasztottunk 2-2 telepet, amelyet újra kiszélesztettünk szintén SMA táptalajra. Végül minden csészéről 1-1 telepet izoláltunk, amelynek eredményeként 40 interspecifikus hibridet (A1-40) kaptunk.

A három faj közötti hibrideket pedig a következőképp hoztuk létre: először a 10-1651 (*S. uvarum*, *MATa*, *ade2*-, *ura3*-) és a 10-1653 (*S. kudriavzevii*, *MATa*, *trp1*-, *ura3*-) auxotróf törzseket kereszteztük egymással uracillal kiegészített minimál táptalajon. Majd a keresztezési pontból izolált *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* (*MATa/α*, *ura3*-) kettőshibridek

egyikét (II/6) keresztezésbe vontuk a 10-170 *S. cerevisiae* (*MATa/a*, *leu2*-) partnerrel. A hármashibridekre minimál táptalajon szelektáltunk. Mindkét lépés a törzsek keresztreplikázásával történt. A hármashibridek létrehozását, kariotípus- és mitotípus meghatározását Dr. Antunovics Zsuzsa végezte.

### **3.2.2. Random spóra analízis**

A hibrideket 3-5 napig K-acetátos spóráztató táptalajon inkubáltuk, majd a spórázó tenyészetekből egy kacsnyi sejtmennyiséget 300 µl steril desztillált vízbe szuszpendáltunk, majd vortexszel homogenizáltuk az elegyet. Ezután 300 µl 1 mg/ml koncentrációjú Zymolyase-20T (USBiological Z-1000) sejtfallbontó enzimet adtunk a sejtuszuspenziókhöz, amelyeket ezután egy órán keresztül 37 °C-on inkubáltunk. Az inkubálást követően szonikátor segítségével elválasztottuk az aszkuszokban található spórákat egymástól. A szonikálás 7 percen keresztül 7 másodperc szonikálás és 23 másodperc pihentetés váltogatásával zajlott (a készülék: Biologics, Inc. Model 150 V/T; a készülék beállításai: power: 20; pulser: 90%). Ezt követően Bürker-kamra használatával megállapítottuk a szuszpenziók sejtsűrűségét, majd hígítást követően akkora mennyiséget szélesztettünk ki YEA táptalajokra, hogy kb. 150-200 telepet kapjunk csészénként. A telepek megjelenése után a csészékről replikát készítettünk SMA, 75 µg/ml leucinnal, illetve uracillal kiegészített SMA táptalajokra.

### **3.2.3. A mitotípus meghatározása**

#### **3.2.3.1. Mitokondriális DNS izolálás**

Az izolálást megelőző reggelen 2 kacsnyi élesztőt oltottunk 100 ml YEL-be, majd szobahőn rázattuk a mintákat. Másnap a tenyészeteket centrifugálással üleptítettük (5 perc, 4000 rpm), ezt követően pedig először 4 ml desztillált vízzel, majd 4 ml 50 mM-os EDTA-val mostuk a sejteket, a centrifugálás mindkét lépésnél 5 percig tartott 4000 rpm-en. Ezután 10 ml Szorbit-EDTA oldatba vettük fel a sejteket és 10 percig 37 °C-on inkubáltuk őket. Centrifugálás után (5 perc, 4000 rpm) 5 ml 500 µg/ml Zymolyase-20T (USBiological Z-1000) koncentrációjú Sol A oldattal felsuszpendáltuk a sejteket és 37 °C-on 60 percig inkubáltuk őket. Ezután 2 perces szonikálás következett (a készülék beállításai: power 30; pulser 60%), majd pedig centrifugálás (10 perc, 2800 rpm). A felülúszót átpipettáztuk új csöbe, majd ismét centrifugáltuk a mintát (10 perc, 13000 rpm). Az üledéket háromszor mostuk 500 µl Sol A-val (5 perc, 13000 rpm), amelyet a harmadik centrifugálási lépés után 500 µl Sol A-ba vettünk

fel. Ezt követően 2 µl 25 mM-os MgCl<sub>2</sub>-t (Fermentas MBI), valamint 2 µl DNáz enzimet adtunk az elegyhez, majd szobahőn 10 percig inkubáltuk. Az inkubálás után 1 ml Sol A hozzáadása után centrifugáltuk a mintát (10 perc, 13000 rpm) és az üledéket 500 µl Sol B-ben vettük fel. 45 perces szobahőmérsékleten való inkubálás után 500 µl fenol-kloroform-izoamil-alkoholt mértünk a mintához, amelyet ezután ismét centrifugáltunk (10 perc, 13000 rpm). A felülúszót új csőbe pipettáztuk, majd 0,1 térfogat Na-acetátot és 1 térfogat izopropanolt adtunk az elegyhez. 10 perc szobahőmérsékleten való inkubálás után ismét centrifugálás következett (10 perc, 13000 rpm), majd a csapadékot 300 µl 70%-os alkohollal mostuk. Az alkohol eltávolítása után a mintát steril boxban szárítottuk és 32 µl 1x TE oldatban vettük fel. 7 µl Rnáz A oldat hozzáadása után 30 percig 37 °C-on inkubáltuk a mintát.

### 3.2.3.2. A mtDNS restrikciós emésztése

A mtDNS restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) analíziséhez az alábbi reakcióelegyet mértük össze (20 µl végtérfogatra):

- 10 µl mtDNS
- 2 µl FD puffer (Thermo Fisher Scientific)
- 1 µl *Hae*III restrikciós enzim (Thermo Fisher Scientific ER0151)
- 7 µl MilliQ víz

1 éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk az elegyet.

### 3.2.3.3. Gélelektroforézis

A restrikciós emésztést követően a különböző méretű fragmenteket gélelektroforézis segítségével választottuk el egymástól 1% agaróz gélben, 1x TBE puffert használva. Az elválasztás 2,5 órán keresztül 100 V-on BlueMarine™ 100 (Serva BM-100.01) gélelektroforézis készülékben történt. A gélek kiértékelését UVP BioDoc-It géldokumentációs rendszer segítségével végeztük.

### 3.2.4. Pulzáló erőterű gélelektroforézis

A mintakészítést megelőző napon 1 kacsnyi élesztőt oltottunk 30 ml YEL komplett tápfolyadékba. Másnap megmértük a sejtenyészet optikai denzitását λ: 590 nm-en, majd a sejtenyészet sűrűségét 1,3 x 10<sup>9</sup> sejt/ml-re állítottuk be. Ezt követően centrifugálással üleptítettük a sejtuszpenziót (5 perc, 4000 rpm) és 2 ml 50 mM-os EDTA-val mostuk a sejteket. Az üledéket 250 µg/ml Zymoliase-20T-t (USBiological Z-1000) tartalmazó 500 µl

CPES oldatba vettük fel, amelyhez 500 µl 1,5 %-os Low Melting (SIGMA ALDRICH A9414) agarózt adtunk. Ezt követően öntőformába pipettáztuk az elegyet. Az agarózlapokat dermedés után 1,6 ml CPE pufferben inkubáltuk 2 órán keresztül 37 °C-on, majd a CPE puffert 1,5 ml 0,5 mg/ml Proteináz K enzimet tartalmazó lízis pufferre cseréltük. A mintát másnap reggelig 50 °C-on inkubáltuk. Másnap reggel a lízis puffert 1x TE pufferre cseréltük és 20 percig inkubáltuk a mintát 50 °C-on, majd friss 1x TE puffert mértünk rá és szobahőmérsékleten inkubáltuk újabb 20 percig. Végül eltávolítottuk az 1x TE puffert és 0,5 M-os EDTA-t mértünk a mintára, amelyet a felhasználásig hűtőben tároltunk.

A törzsek elektrokariogramját BioRad CHEF DR III (BioRad 170-3695) pulzáló erőterű gélelektroforézis készülékkel készítettük el. Az elválasztáshoz az alábbi paramétereket alkalmaztuk: 40-120 sec lineáris ramping 26 órán át, 1%-os agaróz (BioRad 162-3102) gélben, 200 V-on, 6 V/cm, 14 °C-os 2,5 L 0,5x TBE pufferben.

Elválasztás után a gél 5 µl/ml koncentrációjú ethidium-bromid oldatban inkubáltuk 40 percig, majd 0,5x TBE pufferben áztattuk egy éjszakán át 4 °C-on. Másnap az UVP BioDoc-It géldokumentációs rendszer segítségével készítettünk képet az elektrokariogramról.

### **3.2.5. Mitokondriális markerek vizsgálata**

#### **3.2.5.1. Polimeráz láncreakció (PCR)**

A PCR reakciók során használt primerek és PCR programok az 7. és 8. táblázatban vannak feltüntetve. Az *ATP6*, *COX2* és *COX3* markerek vizsgálatához alkalmazott primereket Albertin és munkatársai 2013-as, a *COX1* gén intron mintázatának vizsgálatához használt primereket pedig López és munkatársai 2003-as publikációjából vettük át.

##### **3.2.5.1.1. Az *ATP6*, *COX2*, *COX3* markerek vizsgálata**

A reakcióelegyet a megfelelő primerekkel az alábbi összetétellel mértük össze (25 µl végtérfogatra):

- 1 µl mtDNS
- 1 µl 25 mM-os MgCl<sub>2</sub> (Fermentas MBI)
- 2,5 µl dNTP (5-5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)  
(Thermofisher Scientific R0141, R0171, R0151, R0161)
- 1-1 µl a megfelelő forward és reverse primer oldatból (0,5 µM)
- 2,5 µl Dream puffer (Thermofisher Scientific)
- 0,3 µl Dream Taq enzim (Thermofisher Scientific EP0712) (5 u/µl)

- 15,7 µl MilliQ víz

### 3.2.5.1.2. A *COXI* marker vizsgálata

Az alábbi reakcióelegyet állítottuk össze (100 µl végtérfogatra):

- 1 µl mtDNS
- 1,5 µl 25 mM-os MgCl<sub>2</sub> (Fermentas MBI)
- 1,6 µl dNTP (5-5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)  
(Thermofisher Scientific R0141, R0171, R0151, R0161)
- 1-1 µl a primer oldatokból (0,5 µM)
- 10 µl Dream puffer (Thermofisher Scientific)
- 0,5 µl Dream Taq enzim (Thermofisher Scientific EP0712) (5 u/µl)
- 79,9 µl MilliQ víz

### 7. táblázat. A PCR reakciók során alkalmazott primerek.

Primer neve	Primer szekvenciája
ATP6f	5'- AGTCTAATCTCAAATTGATCTAATGGTGATGT -3'
ATP6r	5'- TTACCTATGATCTTAAGATTATAYGTATCTAG -3'
COX2f	5'- GTTATTTTCAGGATTCAGCAACACC -3'
COX2r	5'- CAWGMTCCATAGAARACACCTTCTC -3'
COX3f	5'- TTAGCTTAATTGGTATAGCATTTCGTTTTACACACG -3'
COX3r	5'- ACCATGCATTGTAAWGTAGTGATAATGCTA -3'
COX1 3L	5'- GCTTTAATTGGWGGWTTTGG -3'
COX1 3R	5'- ATTGTCATACCATTTGTYCTYAT -3'
COX1 4L	5'- GAAGTAGCAGGWGGWGGWGA -3'
COX1 5R	5'- GTTAGCTAAGGCWACWCCWGT -3'

### 8. táblázat. A PCR reakciók során alkalmazott PCR programok.

Marker	PCR program
<i>ATP6</i> és <i>COX3</i>	95°C 3' 35x (95°C 0,5', 56°C 0,5', 72°C 1'); 72°C 10'
<i>COX2</i>	95°C 3' 35x (95°C 0,5', 53°C 0,5', 72°C 1'); 72°C 10'
<i>COX1</i>	95°C 5' 35x (95°C 1,5', 52°C 2,5', 72°C 3,5'); 72°C 10'

### 3.2.5.2. A *COX2* PCR termék emésztése *SfcI* restrikciós enzimmel

Az alábbi reakció elegyet mértük össze (20 µl végtérfogatra):

- 5 µl PCR termék
- 2 µl Tango puffer (Thermofisher Scientific)
- 1 µl *SfcI* restrikciós enzim (Thermofisher Scientific ER1162)
- 12 µl MilliQ víz

A reakció elegyet 37 °C-on inkubáltuk 4 órán keresztül.

### 3.2.5.3. Gélelektroforézis

A PCR reakcióval amplifikált DNS szakaszokat gélelektroforézissel választottuk el egymástól 1%-os agaróz gélben 1x TBE puffert használva. A futtatás az *ATP6*, *COX2*, *COX3* markerek esetében 50 percig, a *COX1* marker esetében pedig 2 óráig tartott 110 V feszültség mellett.

### 3.2.6. Növekedési teszt

Előző nap a törzseket átoltottuk YEA táptalajra. A tenyészetből egy kacsnyi mennyiséget 5 ml steril MilliQ vízbe szuszpendáltuk. Ezt követően megmértük az elegy optikai denzitását ( $OD_{590}$ ), majd a sejtszuszpenziót 0,2 OD sűrűségűre hígítottuk és 15-15 µl-t pipettáztunk YEA és YEG komplett táptalajokra. 1-1 csészét 25 °C-on, 1-1 csészét pedig 37 °C-on inkubáltunk 6 napig.

### 3.2.7. Tetrádanalízis

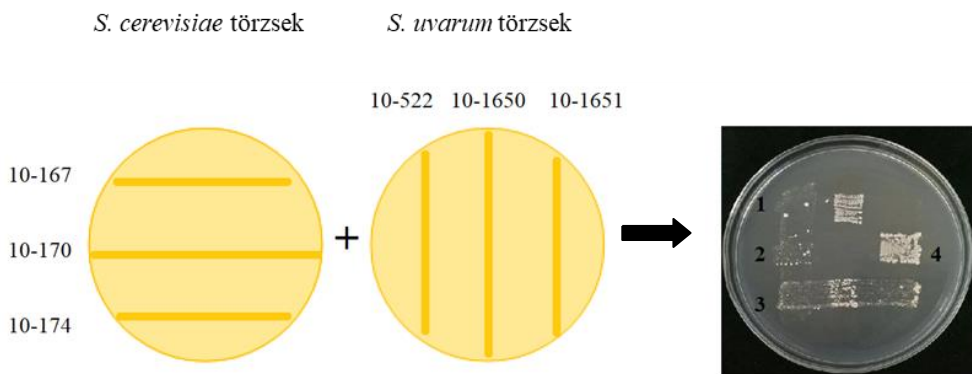
93 µl steril MilliQ vízhez 7 µl 20 mg/ml koncentrációjú Zymolyase-20T enzimet adtunk, amelybe ezután 1 pipettahegynyi spórázó élesztőtenyészetet szuszpendáltunk. Az így kapott elegyet 5 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd 15-17 µl-t szélesztettünk YEA táptalajra. Ezt követően mikromanipulátorral (Carl Zeiss 2588, Jena) kihúztuk a tetrádokat. A CU4 hibridek tetrádanalízisét Dr. Pappné Karanyicz Edina végezte.

## 4. Eredmények

### 4.1. *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridek vizsgálata

#### 4.1.1. Hibridek izolálása

Különböző *S. cerevisiae* (*Sc*) (10-167, 10-170, 10-174) és *S. uvarum* (*Su*) (10-522, 10-1650, 10-1651) törzsek keresztbe-replikázása, majd a kinőtt telepek kiszélesztése után 40 prototróf interspecifikus hibridet sikerült izolálnunk, amelyek négyféle törzspárosításból származtak [11. ábra]. Mindegyik törzspárosítás esetén 10-10 hibridet izoláltunk, amelyeket CU2 (1-10), CU3 (1-10), CU4 (1-10) és CU6 (1-10) hibridekként neveztünk el. A különböző hibrid csoportok szülői törzsei a 9. táblázatban találhatóak.



**11. ábra.** A különböző szülői törzsek keresztezésének ábrázolása. A szülői törzsek auxotrófok, csak komplett táptalajon életképesek, míg a hibridjeik prototrófok, ezért minimál táptalajon is növekednek. A keresztezés során a szülői törzseket minimál táptalajon keresztbe-replikáztuk és a keresztezési pontoknál hibridtelepek megjelenését vártuk. A számok azokat a keresztezési pontokat jelölik, amelyekből szélesztés után az interspecifikus hibrid csoportokat izoláltuk: 1: CU6; 2: CU4; 3: CU3; 4: CU2

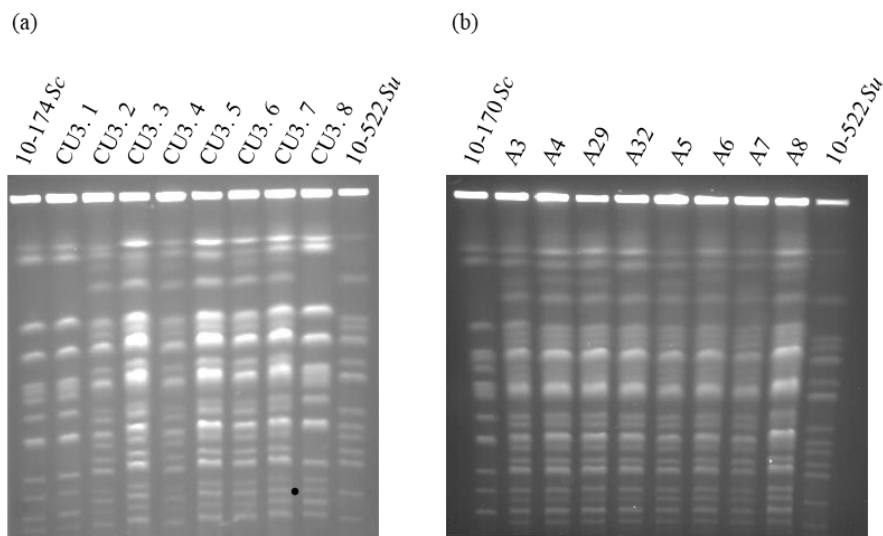
**9. táblázat.** Az egyes interspecifikus hibrid csoportokhoz tartozó szülői törzsek.

<b>Interspecifikus hibrid csoportok</b>	<b>Szülői törzsek</b>	
	<i>Sc</i>	<i>Su</i>
CU2 (1-10)	10-170	10-1651
CU3 (1-10)	10-174	10-522
CU4 (1-10)	10-170	10-522
CU6 (1-10)	10-167	10-522

A fenti hibrideken kívül létrehoztunk még további 40 interspecifikus hibridet (A1-A40) a 10-170-es *Sc* és a 10-522-es *Su* törzs komplett tápfolyadékban történő keresztezésével, ugyanis részletesebben szeretnénk volna vizsgálni a mtDNS öröklődését olyan hibridekben, amelyek egy adott törzspárosításból származnak, valamint arra is kíváncsiak voltunk, hogy a keresztezési technikának van-e valamilyen hatása a mtDNS öröklődésére. Valamennyi hibridet -70 °C-on tároltuk az izolálást követően.

#### **4.1.2. A hibridek kariotipizálása**

A következő lépésben meg szeretnénk volna bizonyosodni arról, hogy valóban interspecifikus hibrideket izoláltunk, nem pedig fertőzés által létrejött telepeket. Ennek érdekében pulzáló erőterű gélelektroforézissel elkészítettük a hibridek kariogramját. Két hibrid kivételével jól látható volt, hogy a törzsek mindkét szülői faj kromoszómáit hordozzák [12. ábra]. Egyedül a CU3. 1 „hibrid”-ről derült ki, hogy valójában a 10-174-es *Sc* törzsről van szó. Ezenkívül találtunk egy olyan törzset is (CU3. 8), amely mindössze egy *Su* kromoszómát hordozott.

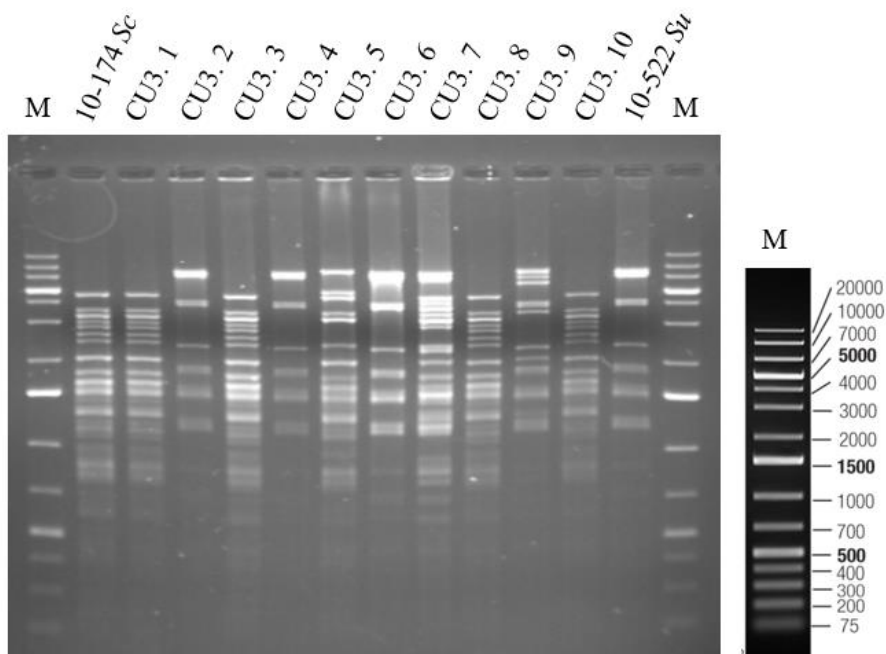


**12. ábra.** Pulzáló gélelektroforézissel készített elektrokariogramok.

Az (a) képen az első, a (b) képen a második módszerrel létrehozott néhány hibrid kariogramja látható. A CU3. 1 „hibrid”-ről a kromoszóma mintája alapján kiderült, hogy egy *Sc* törzsről van szó. CU3. 8 hibrid mindössze egy *Su* kromoszómával rendelkezik, amelyet a fekete pont jelöl.

#### 4.1.3. A hibridek mitotipizálása

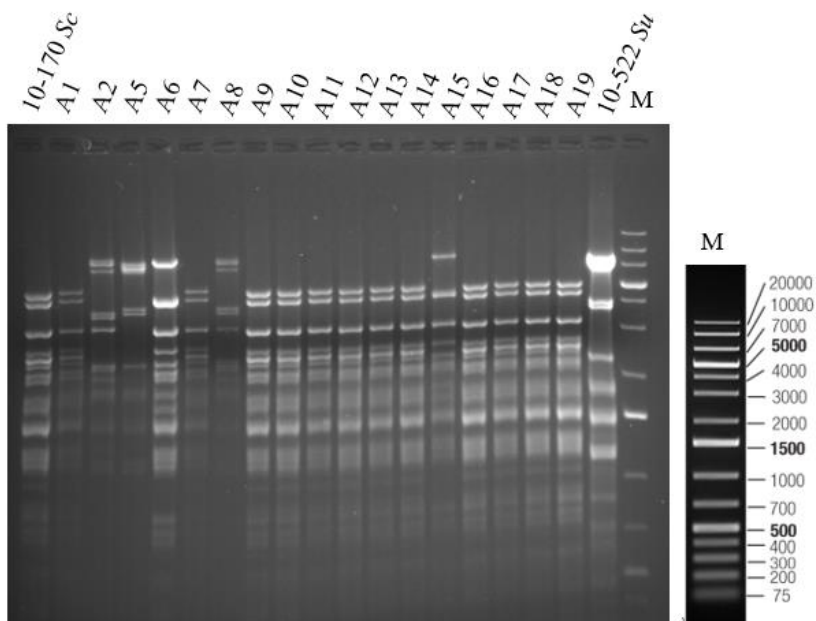
Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a törzseink valóban hibridek, kíváncsiak voltunk arra, hogy melyik szülői faj mtDNS-e fixálódott bennük. Ezért mtDNS-t izoláltunk a törzsekből, amelyet ezután *Hae*III restrikciós enzimmal megemésztettünk, majd a kapott fragmenteket gélelektroforézissel elválasztottuk egymástól. Az így kapott RFLP mintázatot mitotípusnak nevezzük. A CU2 hibridek kivétel nélkül *Sc*, a CU6 hibridek pedig *Su* mitotípust mutattak. A CU3 és CU4 hibridek mitotípusa nagyobb változatosságot mutatott. A CU3 hibridek között találtunk három *Su*, szintén három *Sc*, két rekombináns mitotípusú hibridet, valamint egy olyan törzset is, amely RFLP mintázatában megtalálható volt mindkét szülő valamennyi sávja [13. ábra].



**13. ábra.** A CU3 hibridek és szülői törzseinek mitotípusa. *Su* mitotípussal rendelkező CU3 hibridek: CU3. 2, CU3. 4; Rekombináns mitotípusú hibridek: CU3. 5, CU3. 9; Heteroplazmás hibrid: CU3. 7.; *Sc* mitotípusú hibridek: CU3. 3, CU3. 8, CU3. 10. A géleképekhez mellékeljük a DNS marker (M) gyártó által megadott ábráját.

A CU4 hibridek között is találtunk egy olyan törzset (CU4. 3), amely RFLP mintázatában mindkét szülői faj összes sávja megtalálható volt. Ezenkívül hét *Sc* és két rekombináns mitotípusú hibrid (CU4. 1 és CU4. 8) tartozott még ebbe a hibrid csoportba.

A CU4 csoporttal azonos szülői törzsek keresztezésével, de eltérő technikával létrehozott 40 hibrid (A1-A40) között két *Su*, 15 rekombináns és 23 *Sc* mitotípusú hibridet azonosítottunk. A 14-es ábrán néhány, ebbe a csoportba tartozó hibrid mitotípusa látható.

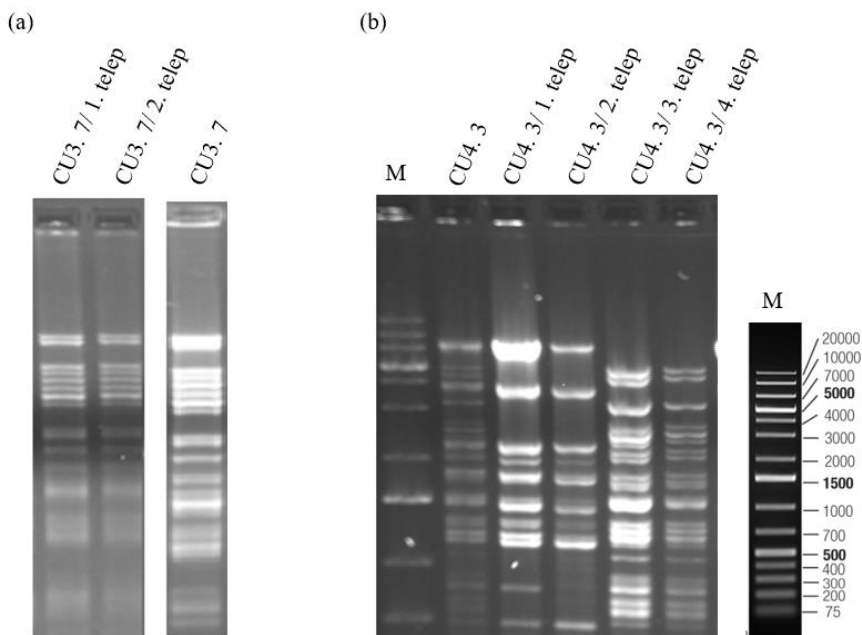


**14. ábra.** Példa a második módszerrel létrehozott hibridek mitotípusára. *Su* mitotípusú hibrid: A5; Rekombináns mitotípusú hibridek: A2, A6, A8, A15; *Sc* mitotípusú hibridek: A1, A7, A9-A14, A16-A19.

#### 4.1.3.1. A CU3. 7 és a CU4. 3 hibrid mitotípusa

A CU3. 7 és a CU4. 3 hibridek mitotípusában mindkét szülő összes sávja megtalálható volt. Ennek két magyarázata is lehet. Az egyik az, hogy a sejtek mindegyikében jelen van a *Su* és a *Sc* mtDNS is, a másik pedig az, hogy bizonyos sejtek *Su*, míg más sejtek *Sc* mtDNS-sel rendelkeznek. A kérdés eldöntésének érdekében kiszélesztettük a hibrid törzseket minimál táptalajra, majd a különálló telepekből újra izoláltuk a mtDNS-t.

A vizsgálat eredményeként azt kaptuk, hogy a CU3. 7 hibrid sejtjeiben megtalálható mindkét szülői törzs mtDNS-e, míg a CU4. 3 hibrid egy kevert tenyészet, amelyben a sejtek egy része *Sc*, másik része pedig rekombináns mitotípussal rendelkezik [15. ábra]. A rekombináns sejtek mitotípusában megtalálható a *Su* mitotípusra jellemző összes sáv, ezért feltételeztük, hogy a CU4. 3 hibrid RFLP mintázatát a szülői mitotípusok együttes jelenléte alakítja ki.

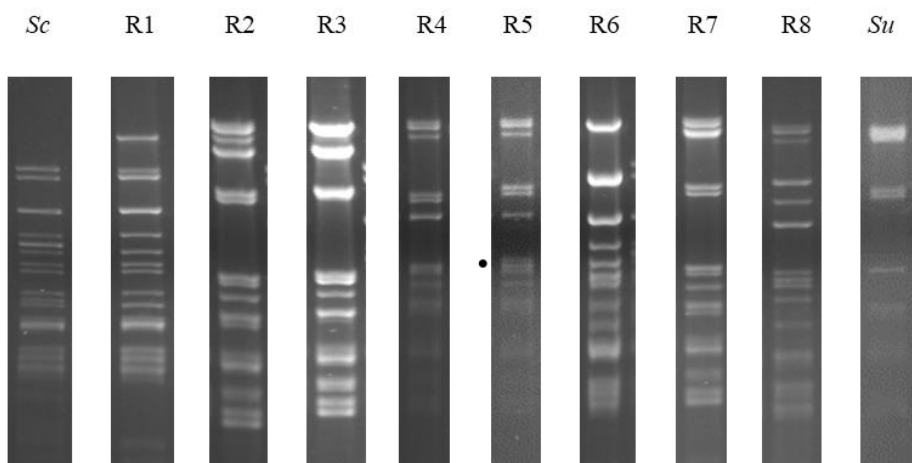


15. ábra. A CU3. 7 (a) és CU4. 3 (b) hibridek szélesztésével kapott telepek mitotípusai.

#### 4.1.4. A rekombináns hibridek vizsgálata

##### 4.1.4.1. Mitotípus alapján való csoportosítás

A rekombináns mitotípussal rendelkező hibridek RFLP mintázatát tanulmányozva azt vettük észre, hogy több hibrid is ugyanolyan mintázattal rendelkezik. A mitotípusuk alapján a rekombináns hibrideket nyolc csoportba osztottuk. A csoportosításba csak a CU4 (1-10) és az A (1-40) hibridek között talált rekombináns hibrideket vontuk be, amelyek közös jellemzője, hogy a 10-170-es *Sc* és 10-522-es *Su* törzs keresztezéséből származtak [16. ábra].



**16. ábra.** Rekombináns mitotípus csoportok. Az R5 csoport szinte azonos az R4 csoporttal, mindössze eggyel vagy kettővel több *Sc* sáv különbözteti meg tőle, amelyet a fekete pont jelöl.

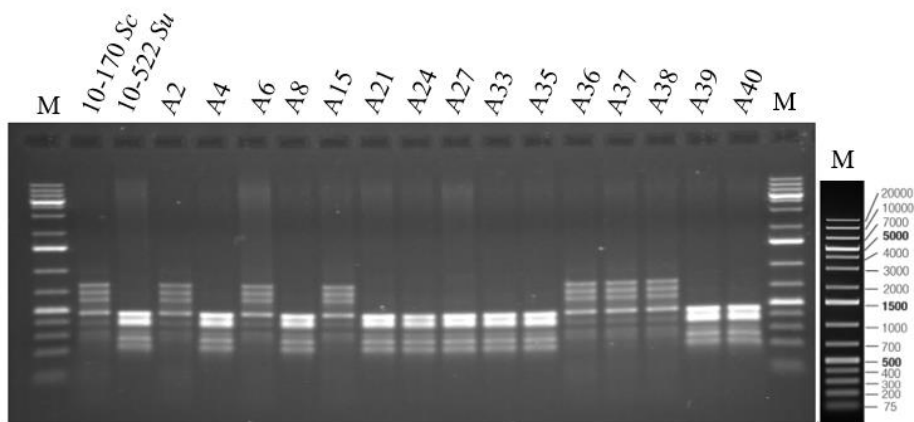
**10. táblázat.** A rekombináns mitotípusú hibridek RFLP mintázat alapján kialakított csoportjai.

<b>Rekombináns csoportok</b>	<b>Hibridek</b>
R1	CU4. 1
R2	A21, A24, CU4. 8
R3	A27
R4	A2, A37
R5	A8, A33
R6	A6, A15, A38
R7	A4, A35, A39, A40
R8	A36

#### 4.1.4.2. Mitokondriális markerek vizsgálata

A hibridekben rekombinációval létrejönnek olyan mtDNS molekulák, amelyek a szülői fajok mitokondriális alléljeinek különböző kombinációit hordozzák. Meg szeretettük volna tudni, hogy a rekombináns hibridekben bizonyos mitokondriális gének mely szülői fajtól származnak. Egy korábbi publikációban (Albertin és mtsi., 2013) sikeresen alkalmaztak PCR protokollokat a *COX2*, *COX3* és *ATP6* mitokondriális gének *Sc* és *Su* alléljeinek megkülönböztetésére, valamint López és munkatársainak (2000) szintén PCR technika alkalmazásával sikerült intraspecifikus törzsek között polimorfizmust kimutatni. Az utóbbi módszer a *COX1* génben található intronok száma és elhelyezkedése alapján tesz különbséget a különböző törzsek között. A PCR protokollt eredményesen alkalmaztuk fajok közötti különbségek kimutatására is.

A gének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns hibridek a CU4. 1 hibrid (R1) kivételével mind *Su* *COX3* allélt hordoztak, valamint a *COX2* gén esetében is magas volt a *Su* allél előfordulási aránya, csak az A27 (R3) hibrid volt kivétel. Az *ATP6* gén esetében a *Sc* és *Su* allélok közel egyenlő arányban fordultak elő [17. ábra]. A rekombináns csoportokon belül a hibridek azonos *ATP6* allélokkal rendelkeztek. Míg a *COX2* és *COX3* gének esetében az *Su* allélek voltak túlsúlyban, addig szinte minden rekombináns hibrid *COX1* gén intron mintázata *Sc* típusú volt. Két hibridnél (A39, A40) figyeltünk meg a szülői alléloktól eltérő mintázatot (11. táblázat). Az eltérő mintázat oka lehet a *COX1* génen belüli rekombináció vagy olyan mutáció, amely megváltoztatta a primerek bekötődési helyét.



**17. ábra.** Az „A” csoportba tartozó rekombináns mitotípussal rendelkező hibridek *ATP6* lókuszaik vizsgálatára PCR technikával.

**11. táblázat.** A rekombináns mitotípussal rendelkező hibridek *ATP6*, *COX2*, *COX3* és *COX1* alléljeinek összefoglaló táblázata.

Mitotípus	Hibridek	<i>ATP6</i>	<i>COX2</i>	<i>COX3</i>	<i>COX1</i>
R1	CU4. 1	C*	U	C	C
R2	A21	U	U	U	C
	A24	U	U	U	C
	CU4. 8	U	U	U	C
R3	A27	U	C	U	C
R4	A2	C	U	U	C
	A37	C	U	U	C
R5	A8	U	U	U	C
	A33	U	U	U	C
R6	A6	C	U	U	C
	A15	C	U	U	C
	A38	C	U	U	C
R7	A4	U	U	U	C
	A35	U	U	U	C
	A39	U	U	U	R**
	A40	U	U	U	R
R8	A36	C	U	U	C

\*: A „C” a *Sc* allélokot, az „U” pedig a *Su* allélokot jelöli.

\*\* : A szülői alléloktól eltérő minta.

#### 4.1.5. A hibridek fertilitásának vizsgálata

##### 4.1.5.1. Random spóra analízis

Több olyan cikk is megjelent az utóbbi években, amely azt mutatta, hogy a mitonukleáris inkompatibilitás az interspecifikus hibridek sterilizációját okozhatja (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010; Jhuang és mtsi., 2017). Ezért megvizsgáltuk, hogy van-e valamilyen összefüggés a hibridek mitotípusa és fertilitása között. Ennek érdekében először random spóra analízist végeztünk. Egy prototróf tetraploid hibrid, amely két auxotróf szülő keresztezéséből származik, a meiózis során allodiploid spórákat hoz létre, amelyekben megtalálható mindkét

szülő egy-egy kromoszóma készlete. Ebből adódóan ezek a spórák prototrófok lesznek. Viszont, ha a meiózis során elvesz az egyik auxotróf marker gént hordozó kromoszóma, akkor auxotróf spórák jönnek létre. Ez azért lényeges, mert a 10-522-es *Su* törzs *leu2* génje a *MAT* lókusszal együtt a III. kromoszómán található. Ez azt jelenti, hogy amennyiben a *Su* III. kromoszóma a meiózis során elvesz, akkor a spórák, mivel a 10-170-es *Sc* törzs  $\Delta leu2$  genotípusú, auxotróffá válnak, tehát csak leucinnal kiegészített táptalajon lesznek életképesek, valamint ezzel egy időben, az egyik *MAT* lókusz elvesztése miatt (amely ugyanezen a kromoszómán helyezkedik el), valószínűleg visszanyerik a fertilitásukat. Tehát a leucin auxotróf spórákról (*S. cerevisiae* szülői jelleg) feltételezhetjük, hogy fertilisek. Ezért a random spóra analízis egy közvetett módszer a hibridek fertilitásának vizsgálatára, amely segítségével megállapítható, hogy az egyes hibridek milyen arányban képeznek auxotróf és prototróf spórákat.

Az 50 hibrid között négy (A3, A4, A29, A32) olyat találtunk, amelyek spóráinak kb. egyharmada *leu*- fenotípust mutatott. A többi hibrid vagy nem, vagy csak kevesebb, mint 1% gyakorisággal hozott létre leucin auxotróf spórákat. Ezért a fent említett négy hibridet fertilisnek, a másik 46-ot pedig sterilnek tekintettük. A négy fertilis hibrid közül egy *Su* (A3), egy R7 rekombináns (A4), kettő pedig *Sc* (A29, A32) mitotípussal rendelkezett.

Itt érdemes megjegyezni, hogy egy kivétellel az összes hibrid jó spóráképző képességgel rendelkezett. Egyedül az A27-es hibrid nem hozott létre spórákat.

#### **4.1.5.2. Tetrádanalízis mikromanipulációval**

Valódi fertilitásról akkor beszélhetünk, ha a meiózissal létrehozott spórák életképesek, vagyis külön-külön képesek telepképzésre is (ezekre a telepekre spóráklónként hivatkozok), továbbá ezek a spóráklónok is képesek további életképes spórák létrehozására. Ezt tetrádanalízissel vizsgáltuk meg; nagyon vékony üvegtű segítségével elválasztottuk egymástól a négy meiotikus leszármazottat, miután kiszabadítottuk őket az aszkuszukból. Majd az így kapott F1 spóráklónokkal (spóráztatás után) megismételtük a folyamatot. Amennyiben az F1 spóráklónok meiotikus termékei életképesek voltak, a hibridet fertilisnek, ellenkező esetben pedig sterilnek tekintettük.

Mind a fertilis, mind pedig a steril allotetraploid hibridek képesek életképes spórákat (F1 spóráklónok) létrehozni. A fertilis hibrideket az különbözteti meg a sterilektől, hogy a spóráklónokban a sejtek (párosodási típusváltás után) képesek egymással konjugálva allotetraploid F2 nemzedéket létrehozni. Az F2 nemzedék az F1 hibridekhez hasonlóan

szintén képes életképes spórákat (F2 spóráklónok) képezni. Ezzel ellentétben, a steril hibridek spórái nem konjugálnak egymással, az általuk képzett telepek allodiploid sejtekből állnak, amelyek vagy egyáltalán nem spóráznak vagy az általuk képzett spórák nem életképesek.

A tetradanalízis során azt tapasztaltuk, hogy mind a négy fenti hibrid képes volt életképes F2 spóráklónokat képezni, tehát valóban fertilizsek. A steril hibridek közül is kiválasztottunk párat (A2, A5, A7, CU4. 1) tetradanalízisre, sikeresen izoláltunk belőlük F1 spóráklónokat, majd néhány F1 spóráklón által képzett tetrad (egy aszkuszban található négy spóra) életképességét is megvizsgáltuk. A várakozásainknak megfelelően nem kaptunk életképes F2 spóráklónokat. Az F1 spóráklónokat viszont felhasználtuk a mitokondriális öröklődés további vizsgálatának céljából.

#### **4.1.6. A hibridek növekedés vizsgálata magas hőmérsékleten és nem-fermentálható szénforráson**

Egyre gyűlik azoknak a publikációknak a száma, amelyek a mitotípust összefüggésbe hozzák a hőmérséklet-toleranciával (Baker és mtsi., 2019; Li és mtsi., 2019). Ezért mi is meg szeretnénk vizsgálni, hogy a különböző mitotípussal rendelkező hibridek növekedési képessége között van-e eltérés különböző hőmérsékleteken.

A hibridek nem-fermentálható szénforráson történő növekedési képességének vizsgálata pedig nagyszerű lehetőséget adott annak kiderítésére, hogy vajon a mitokondriális gének különböző allélkombinációi befolyásolják-e a mitokondriális működést. Van ugyanis egy olyan elmélet, amely szerint a mitokondriális allélek az evolúció során egymáshoz alkalmazkodva fejlődtek. Egy esetleges mtDNS-ek közötti rekombináció létrehozhat kevésbé hatékony allélkombinációkat, ami negatív hatással lehet a hibridek oxidatív foszforilációjára.

A növekedési tesztek elvégzése után azt tapasztaltuk, hogy 37 °C-on, fermentálható szénforráson valamennyi hibrid képes volt növekedni jó vagy közepes mértékben. Az utóbbi nem mutatott egyértelmű összefüggést a mitotípussal. A két *Su* mitotípusú hibrid valamint az R3, R4, R5, R7 és R8 csoportba tartozó rekombináns hibridek közepes mértékben növekedtek. Viszont a *Sc* mitotípusú és az R2 és R6 csoportokba tartozó rekombináns hibridek között volt, amelyik jól nőtt és volt, amelyik csak közepes mértékben [18. ábra]. Az R1 csoportba tartozó CU4. 1 hibrid pedig jó növekedést mutatott.

Nem-fermentálható szénforráson, 25 °C-on egyedül az A27 hibrid nem nőtt, vagyis vélhetően elvesztette a respirációs képességét. Magas hőmérsékleten, nem-fermentálható szénforráson a rekombináns csoportokon belül a hibridek növekedési képessége hasonló volt.

Három rekombináns csoportba (R2, R3, R7) tartozó hét hibrid elvesztette a növekedési képességét, az R4 és R5 csoport tagjai pedig gyenge vagy közepes növekedést mutattak [18. ábra].

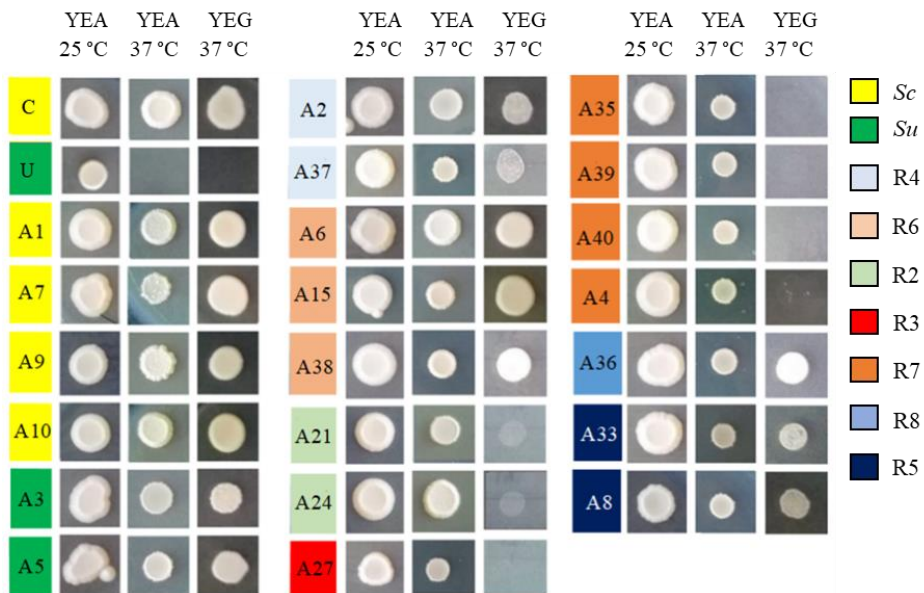
Megvizsgáltuk azt is, hogy van-e valamilyen összefüggés a hibridek magas hőmérsékleten való respirációs képessége és az *ATP6* gén eredete között. Azt vettük észre, hogy a respirációs képességüket elvesztett hibridek mind *Su ATP6* allélel rendelkeztek, viszont az R5 csoportba tartozó, szintén *Su ATP6* genotípusú hibridek közepesen jól növekedtek. Az *Sc ATP6* genotípusú hibridek közül egy sem vesztette el teljesen a respirációs képességét, viszont az R4 csoportba tartozó két hibrid csak gyenge és közepes növekedési képességgel rendelkezett (12. táblázat).

**12. táblázat.** A szülői törzsek és a különböző rekombináns mitotípussal rendelkező hibridek növekedési képessége 37 °C-on, nem-fermentálható szénforrást tartalmazó táptalajon (YEG).

Törzsek	Mitotípus	<i>ATP6</i>	37 °C, YEG
10-170 <i>Sc</i>	C*	C	+++**
10-522 <i>Su</i>	U	U	-
CU4. 1	R1	C	+++
A21, A24, CU4. 8	R2	U	-
A27	R3	U	-
A2	R4	C	++
A37	R4	C	+
A8, A33	R5	U	++
A6, A15, A38	R6	C	+++
A4, A35, A39, A40	R7	U	-
A36	R8	C	+++

\*: A „C” a *Sc* allélokot, az „U” pedig a *Su* allélokot jelöli.

\*\* : A növekedési képesség mértékét 1-3-as skálán + jellel jelöltük, a – jel növekedési képesség hiányát mutatja.



**18. ábra.** A rekombináns mitotípussal rendelkező törzsek növekedési képessége különböző táptalajokon és hőmérsékleteken. YEA: glükózt tartalmazó komplett táptalaj; YEG: glükóz helyett glicerolt (nem-fermentálható szénforrást) tartalmazó komplett táptalaj. A C a 170-es *Sc* törzset, az U pedig a 10-522-es *Su* törzset jelöli. Az azonos mitotípusú törzseket azonos színekkel jelöltük. Az R2, R3 és R7 rekombináns csoportokba tartozó hibridek elvesztették a respirációs képességüket 37 °C-on. Az R4 csoport tagjai közepes-gyenge növekedést mutattak.

#### 4.1.7. A spóráklónok vizsgálata

##### 4.1.7.1. Növekedés-vizsgálat

A spóráklónok esetében is kíváncsiak voltunk arra, hogy tapasztalható-e különbség a hőmérséklet-toleranciájukban és a nem-fermentálható szénforráson való növekedési képességükben. Összesen 10 tetradot választottunk ki a vizsgálatra.

Magas hőmérsékleten, nem-fermentálható szénforráson minden *Sc* mitotípusú hibridtől származó spóráklón jól növekedett, míg a *Su* mitotípussal rendelkező hibridektől származó 11 spóráklón közül csak négy. A rekombináns hibridektől származó spóráklónok pedig egy tetrad három spóráklónjának kivételével mind elvesztették a növekedési képességüket annak ellenére, hogy a rekombináns hibridek, amelyektől származtak, egy kivétellel jó növekedést mutattak azonos körülmények között.

Több olyan spóraklont is találtunk, amely képtelen volt szobahőmérsékleten, nem-fermentálható szénforráson növekedni, vagyis teljesen elvesztette a respirációs képességét. Ez elsősorban rekombináns hibridektől származó spóraklónoknál volt megfigyelhető, de három, egy tetrádba tartozó *Su* mitotípusú hibridtől származó spóraklont is találtunk köztük.

Érdekes módon két rekombináns hibrid (A2, CU4. 1.) néhány spóraklónja 37 °C-on, fermentálható táptalajon is alacsony növekedési képességet mutatott vagy nem volt képes növekedni (13. táblázat).

**13. táblázat.** A spóráklónok növekedési képessége különböző táptalajokon és hőmérsékleten. YEA: glükózt tartalmazó komplett táptalaj; YEG: glükóz helyett glicerolt (nem fermentálható szénforrást) tartalmazó komplett táptalaj.

<b>Spóráklónok</b>	<b>A szülői hibridek mitótípusa és növekedési képessége (37°C, YEG)</b>	<b>25 °C YEA</b>	<b>37 °C YEA</b>	<b>25 °C YEG</b>	<b>37 °C YEG</b>
A2. 3. tetrád a, b	<b>R4</b> Rekombináns +++	+++*	+++	+++	-
A2. 3. tetrád c		+++	+++	-	-
A2. 5. tetrád a, b, c, d		+++	+++	+++	-
A2. 6. tetrád a, c		+++	++	-	-
A2. 6. tetrád b		+++	+	-	-
A2. 6. tetrád d		+++	+/-	+++	-
A3. 1. tetrád a	<i>Su</i>	+++	+++	+++	+++
A3. 1. tetrád b, c, d	+++	+++	+++	+++	-
A4. 5. tetrád a, b, c, d	<b>R7</b> Rekombináns -	+++	+++	+++	-
A5. 2. tetrád a	<i>Su</i> +++	+++	+++	+++	+
A5. 2. tetrád b, c, d		+++	+++	+++	+++
A5. 4. tetrád a		+++	+++	+++	-/+
A5. 4. tetrád b, c, d		+++	+++	-	-
A29. 1. tetrád a, b, c, d	<i>Sc</i> +++	+++	+++	+++	+++
A32. 1. tetrád a, b, c, d	<i>Sc</i> +++	+++	+++	+++	+++
CU4. 1. 7. tetrád a, b, c	<b>R1</b> Rekombináns +++	+++	+++	+++	+++
CU4. 1. 7. tetrád d		+++	+++	-	-
CU4. 1. 9. tetrád a, b		+++	-	-	-
CU4. 1. 9. tetrád c, d		+++	+++	-	-

\*: A növekedési képesség mértékét 1-3-as skálán + jellel jelöltük, a – jel növekedési képesség hiányát mutatja.

#### 4.1.7.2. A prototrófia vizsgálata

Az auxotróf spórákat kb. 30% gyakorisággal létrehozó hibridek (A3, A4, A29, A32) által létrehozott tetrádok többségénél azt figyeltük meg, hogy az auxotróf és prototróf spóráklónok aránya 1:1, a tetrádok egy kis részénél pedig 3:1. Az auxotróf spórákat csak kevesebb, mint 1% gyakorisággal létrehozó hibridekből kihúzott tetrádok esetén, a spóráklónok a vártak megfelelően prototrófok voltak.

A törzsek auxotrófiája, vagyis a *MAT* lókuszt elvesztése, és a fertilitás közötti kapcsolat meglétét erősíti az a tény, hogy minden elsőre kiválasztott auxotróf F1 spóráklón tenyészetből sikerült életképes F2 spóráklónt izolálnunk.

#### 4.1.7.3. Kariotipizálás

A spóráklónok kariotípusának vizsgálatát több szempontból is fontosnak tartottuk. Egyfelől értékes információt nyújt a hibridek genom-összetételét illetően, másfelől megszerettük volna azt is nézni, hogy az életképes F2 spóráklónokat létrehozó hibridek által képzett F1 spóráklónok esetében valóban hiányzik-e az *Su* III-as kromoszóma, ahogy azt korábban feltételeztük. Továbbá kíváncsiak voltunk arra, hogy azok a spóráklónok, amelyek magas hőmérsékleten elvesztették a respirációs képességüket mutatnak-e eltérést a kromoszóma mintázatukban.

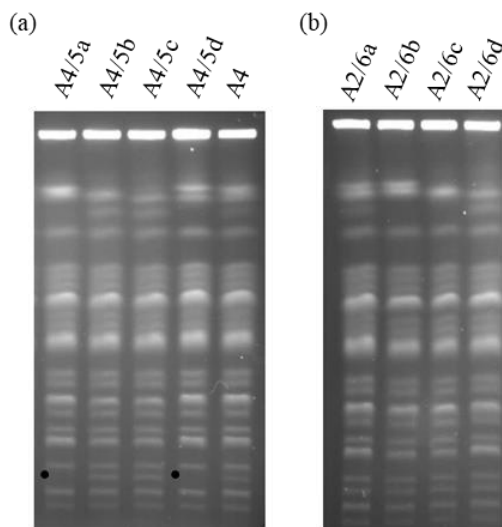
A vizsgálatba az A4. 5-ös és az A2. 6-os tetrádot vontuk be. A kiválasztott tetrádok tulajdonságait a 14. táblázat foglalja össze. A spóráklónok kariotípusa a két fertilis A4. 5-ös tetrádba tartozó spóráklónt leszámítva egységes volt, a *Sc* és a *Su* valamennyi kromoszómája jelen volt bennük [19. ábra]. A két fertilis spóráklón esetében a vártak megfelelően hiányzott az *Su* III-as kromoszóma [19. ábra (a) része].

**14. táblázat.** A kariotipizált spóráklónok tulajdonságai

Spóráklón	Auxotróf/ Prototróf*	Növekedési képesség 25 °C, YEG	Növekedési képesség 37 °C, YEG	A szülői hibrid mitotípusa és növekedési képessége 37 °C, YEG
A4. 5. tetrád a, d	A	+++*	-	Rekombináns, R7
A4. 5. tetrád b, c	P	+++	-	-
A2. 6. tetrád a, b, c	P	-	-	Rekombináns, R4
A2. 6. tetrád d	P	+++	-	+++

\*: Az „A” auxotrófiát, a „P” prototrófiát jelöl.

\*\* : A növekedési képesség mértékét 1-3-as skálán + jellel jelöltük, a – jel növekedési képesség hiányát mutatja.



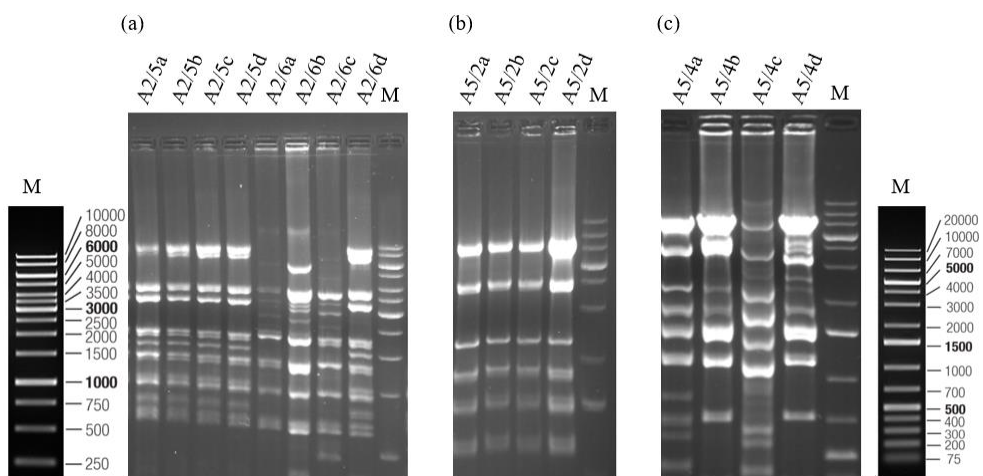
**19. ábra.** Spóráklónok pulzálo gélelektroforézissel készített elektrokariogramja. Az A4 hibrid 5a és 5d leucin auxotróf spóráklónjainak esetében jól látható a *Su III*. kromoszóma hiánya, amit a fekete pontok jelölnek.

**4.1.7.4. A spóráklónok mitotípusának meghatározása**

A következő lépésben a spóráklónok mitotípusát szeretnénk volna megvizsgálni annak kiderítése érdekében, hogy történik-e további rekombináció vagy változás a mtDNS-ben a meiózis során, illetve látható-e valamilyen eltérés az olyan spóráklónok mitotípusában, amelyek 25 °C-on, nem képesek respirációra.

Összesen 20 tetrádból izoláltunk mtDNS-t. A kiválasztott tetrádok közül három *Su* mitotípusú (A3, A5), kettő *Sc* mitotípusú (A32, A29), 15 pedig rekombináns mitotípusú (A2, A4, CU4. 1) hibridektől származott. Hét tetrád tartalmazott legalább egy olyan spóraklón, amely teljesen elvesztette a respirációs képességét.

Azt tapasztaltuk, hogy a 25 °C-on respirációs képességüket megőrzött spóraklónok mtDNS-ében nem történt kimutatható változás, a hibridekkel megegyező RFLP mintázattal rendelkeztek. Az oxidatív foszforilációban gátolt spóraklónok mitotípusa viszont minden esetben megváltozott, a legtöbb spóraklónnál sávok elvesztése volt megfigyelhető, egy esetben pedig új sávok jelentek meg a hibridek RFLP mintázatához képest [20. ábra].



**20. ábra.** Spóraklónok mitotípusa. (a) A rekombináns mitotípusú A2 hibridtől származó spóraklónok. Az 5-ös tetrád minden tagja és a 6d spóraklón megőrizte a respirációs képességét 25 °C-on. (b) A *Su* mitotípusú A5 hibrid 2. tetrádja, a spóraklónok a 2a kivételével jó növekedést mutattak 37 °C-on, nem-fermentálható szénforráson. (c) A *Su* mitotípusú A5 hibrid 4. tetrádja, a spóraklónok nem vagy csak gyengén növekedtek 37 °C-on nem-fermentálható szénforráson. Sávvesztés figyelhető meg a következő spóraklónok esetében: A2/6a, b, c; A5/4b, c, d. Ezek a spóraklónok a respirációs képességüket is elvesztették.

#### 4.1.7.5. A megváltozott mitotípusú spóráklónok mitokondriális génjeinek vizsgálata

A respirációs képesség elvesztése, valamint a mtDNS RFLP mintázatának drasztikus megváltozása indokolta tette, hogy megnézzük, hogy van-e kimutatható változás a mitokondriális markerek szintjén azoknál a spóráklónoknál, amelyek elvesztették a respirációs képességüket.

A legtöbb ilyen spóráklónnál a *COX3* marker elvesztését tapasztaltuk, esetenként az *ATP6* és a *COX1* markerek hiánya is megfigyelhető volt (15. táblázat).

**15. táblázat.** A 25 °C-on respirációs képességet elvesztett spóráklónok mitotípusa és a mitokondriális markerek megléte (+), illetve hiánya (-).

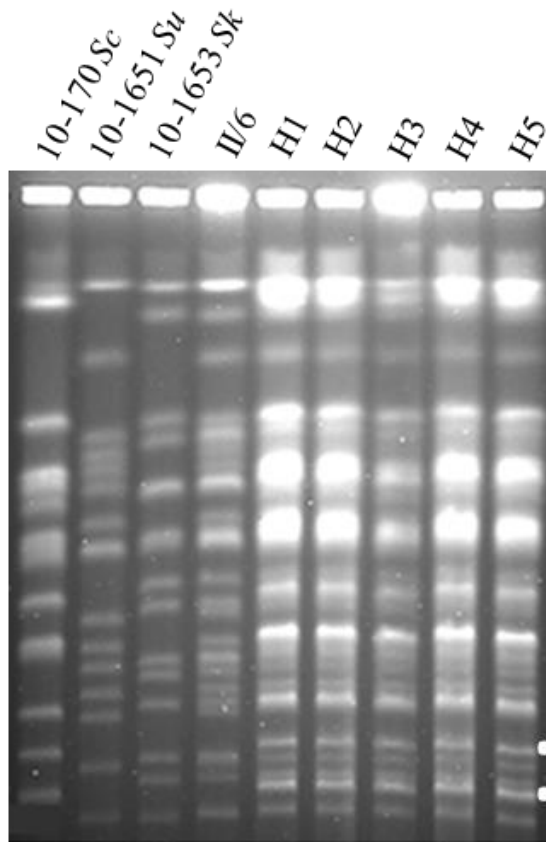
Spóráklónok	Szülői hibrid mitotípusa	<i>ATP6</i>	<i>COX2</i>	<i>COX3</i>	<i>COX1</i>
A2. 3. tetrád c	R4	+	+	-	-
A2. 6. tetrád a		+	+	-	+
A2. 6. tetrád b		+	+	-	+
A2. 6. tetrád c		+	+	-	+
A5. 4. tetrád b	<i>Su</i>	+	+	-	+
A5. 4. tetrád c		+	+	-	+
A5. 4. tetrád d		+	+	+	+
CU4. 1. 7. tetrád d	R1	-	+	-	+
CU4. 1. 9. tetrád a		-	+	-	+
CU4. 1. 9. tetrád b		+	+	-	+
CU4. 1. 9. tetrád c		-	+	-	-
CU4. 1. 9. tetrád d		-	+	-	-

#### **4.2. *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* x *S. cerevisiae* interspecifikus hármashibridek mtDNS-ének vizsgálata**

A tanszékünkön az interspecifikus hibridek vizsgálata igen hosszú múltra tekint vissza, a kettőshibrideken kívül a hármashibridek kutatása is előtérben van. Az alábbiakban a kutatócsoportom eredményeit ismertetem (én csak a kromoszóma markerek tervezésében és vizsgálatában vettem részt).

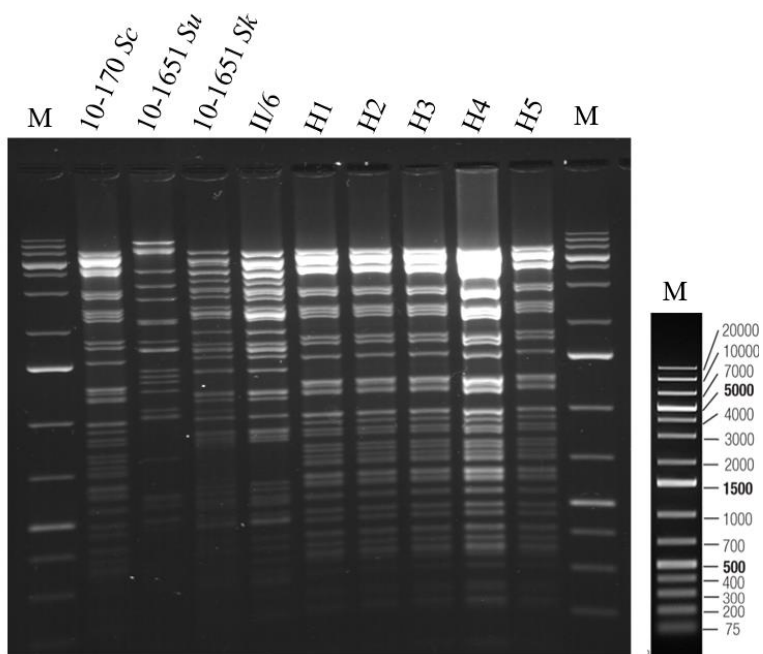
Az egyik kutatásunk során a 10-1651 *S. uvarum* és a 10-1653 *S. kudriavzevii* (*Sk*) törzset kereszteztük egymással, majd az így kapott kettőshibridek egyikét (II/6) sikeresen hibridizáltuk a 10-170-es *Sc* törzssel. A keresztezésből sikeresen izoláltunk öt interspecifikus hármashibridet (H1-H5).

Minden keresztezésbe vont szülői törzs, valamint a kettőshibrid is auxotróf volt, ami lehetővé tette hibridek izolálását megfelelő táptalajokon. A keresztezések sikerességét pulzáló erőterű gélelektroforézis segítségével is leellenőriztük. A kettőshibrid kariogramján jól látható a *Su* és a *Sk* kromoszómák együttes jelenléte. A hármashibridek esetén a kromoszómák nem voltak jól elkülöníthetőek egymástól, viszont a kariogramon látszik, hogy a genomjukban előfordulnak *Su*, *Sk* és *Sc* kromoszómák is, tehát valóban a három faj keresztezéséből származó hibridek, nem pedig fertőzés által kinőtt telepek [22. ábra].



**22. ábra.** A szülői törzsek, a II/6 *Su* x *Sk* kettőshibrid és a *Su* x *Sk* x *Sc* hármashibridek (H1-H5) kariotípusa. A fehér pontok két *Sc*-től származó kromoszómát jelölnek a hármashibridek kariogramjában.

Kíváncsiak voltunk, hogyan öröklődik a mitokondriális genom ezekben a hibridekben. A a hibridek mitotípusának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a kettőshibrid *Sk*, a hármashibridek pedig tisztán *Sc* mtDNS-sel rendelkeztek [23. ábra].



**23. ábra.** A szülői törzsek, a II/6 *Su* x *Sk* kettőshibrid, és a *Su* x *Sk* x *Sc* hármashibridek (H1-H5) mitotípusa. A képhez csatoltuk a DNS marker (M) gyártó által megadott ábráját.

## 5. Eredmények megbeszélése

### 5.1. Különböző törzspárosításokból származó hibridek mitotípusa

A *Saccharomyces* fajoknál a mitokondriális genom öröklődése biparentális, a zigótába bekerül mindkét szülői törzs mtDNS-e, kialakul egy heteroplazmiás állapot, amely viszont csak átmeneti: néhány osztódási ciklus után csak az egyik szülőre jellemző mtDNS molekula mutatható ki a sejtekben, vagyis a sejtek homoplazmiássá válnak (Birky, 1978; Dujon, 1981).

Különböző törzspárosításokból származó hibridek mitotípusának vizsgálatával szerettünk volna pontosabb képet kapni arról, hogy a különböző szülői törzsek milyen hatékonysággal örökítik tovább a mtDNS-üket. Kezdetben ugyanis a kutatók azt figyelték meg, hogy bizonyos fajok keresztezésekor mindig ugyanannak a fajnak a mtDNS-e mutatható ki a hibridekben (de Vero és mtsi., 2003; Antunovics és mtsi., 2005). Később viszont egyre több arra utaló kísérleti eredmény született, hogy a hibridek mitotípusa erősen függ a törzspárosítástól (Verspohl és mtsi., 2018).

Kétféle módszerrel összesen 79 interspecifikus *Sc* x *Su* hibridet izoláltunk, amelyek közül az első módszerrel létrehozott CU4, és a második módszerrel létrehozott „A” hibridcsoport a 10-170 *Sc* és 10-522 *Su* keresztezésből, a szintén első módszerrel létrehozott CU2, CU3 és CU6 csoport pedig különböző szülői törzsek párosításából származott. A CU2, CU4 és CU6 csoportokba 10-10, a CU3 csoportba kilenc, az „A” csoportba pedig 40 hibrid tartozott. Pulzáló erőterű gélelektroforézis segítségével megbizonyosodtunk arról, hogy a törzseink valóban hibridek. A CU3. 8 hibrid kivételével az összes törzsben megtalálható volt a két szülői faj kromoszómáinak legalább egy-egy példánya. Öt hármashibridet is izoláltunk, amelyek a 10-1651 *Su* x 10-1653 *Sk* kettőshibrid és a 10-170 *Sc* törzs keresztezéséből származtak.

A CU2 (10-170 x 10-1651) hibridek mind *Sc*, a CU6 (10-167 x 10-522) hibridek pedig mind *Su* mitotípussal rendelkeztek. A CU3 (10-174 x 10-522) csoport tagjai között volt négy *Sc*, három *Su*, két rekombináns mitotípusú hibrid, illetve egy olyan törzs is, amelyben mindkét szülő mtDNS-e megtalálható volt (heteroplazmia). A CU4 (10-170 x 10-522) hibridek között *Su* mitotípusú törzset nem találtunk, de azonosítottunk egy törzset, amely kétféle mitotípusú sejtpopulációból állt, valamint két rekombináns és több *Sc* mitotípusú törzset. Az ugyanezeketől a szülői törzsektől származó A1-A40 hibrid között két *Su*, 15 rekombináns és 23 *Sc* mitotípusú törzset találtunk. Hármashibridjeink (10-1651 *Su* x 10-1653 *Sk* x 10-170 *Sc*) valamennyien a harmadik partner, a *Sc* mtDNS-ét örökölték, míg a kettőshibrid a *Sk*

mitokondriális genomját „választotta” a *Su*-é helyett. További hármashibridek vizsgálata során sem találtunk rekombináns mintázatú törzseket.

A mi eredményeink is azt mutatják, hogy az interspecifikus hibridek mitotípusát erősen befolyásolja, hogy mely törzseket keresztezzük egymással. A 10-170-es *Sc* törzs a 10-1651-es *Su* törzssel szemben abszolút „uralkodó” volt, csak úgy mint a 10-522-es *Su* törzs a 10-167-es *Sc* törzssel szemben. A két „domináns” törzset egymással keresztezve (CU4 és A1-A40 hibridek) pedig egyfajta részleges hierarchia lépett fel: *Sc*, *Su* és rekombináns mitotípusú hibridek is létrejöttek, viszont a *Sc* mitotípusúak voltak döntő többségben, az 50 hibrid 62%-át alkották. A CU3 (10-174 *Sc* x 10-522 *Su*) hibridek esetében is hasonló jelenséget tapasztaltunk. A 10-1651-es *Su* törzs a *Sk*-vel való keresztezés során is gyengébb jelleget mutatott, míg a 10-170 *Sc* törzs erősebbnek bizonyult a *Sk*-vel szemben is. A jövőben érdemes megvizsgálni több faj, több törzspárosításával létrehozott hibridek mitotípusát annak kiderítése érdekében, hogy a törzsek közötti „erősebb-gyengébb” viszony általános jelensége.

Még nem ismerjük az okát annak, hogy miért az egyik vagy a másik törzs mtDNS-e adódik tovább nagyobb eséllyel a hibridekbe. A kutatócsoportunk elképzelhetőnek tartja, hogy az a mechanizmus, amely eldönti, hogy mely mtDNS molekula replikálódjon, valamiért előnyben részesítheti az egyik mtDNS változatot a másikkal szemben.

## 5.2. Homoplazmia

A szakirodalmi adatokhoz hasonlóan a hibrideink 97%-a homoplazmiát mutatott, vagyis csak egyféle mtDNS-sel rendelkezett, amely *Sc*, *Su* vagy pedig rekombináns volt. A 79 hibrid között mindössze két kivétel adódott: a CU3. 7 hibrid sejtjeiben jelen volt mindkét szülői mtDNS molekula, a CU4. 3 hibrid pedig egy kevert populációból állt, amelyben a sejtek egy része *Sc*, másik része pedig rekombináns mitotípusú volt. Tudomásunk szerint más kutatócsoportok még nem találtak olyan *Saccharomyces* hibrideket, amelyeket különböző mitotípusú szubpopulációk alkottak.

A homoplazmia kialakulásának molekuláris mechanizmusa még nem tisztázott. Egy lehetséges magyarázat lehet néhány mtDNS szelektív replikációja és sarjba történő transzportja (Ling és Shibata, 2004). A homoplazmia kialakulása valószínűleg fokozatosan megy végbe, ami azt jelenti, hogy kezdetben különböző szubpopulációkból áll a tenyészet. Vannak arra utaló adatok, hogy ezalatt egy heteroplazmiás és egy homoplazmiás szubpopulációt kell érteni, de az is előfordulhat, hogy több homoplazmiás (a két szülői

és/vagy rekombináns mitotípusok) és heteroplazmiás szubpopuláció alkotja kezdetben a telepet, amelyek közül az egyik később túlnövi a többi (Albertin és mtsi., 2013). A két homoplazmiás szubpopulációból álló CU4. 3 hibrid létezése is arra utal, hogy kezdetben több homoplazmiás szubpopuláció is jelen lehet a tenyészetben, valamint, hogy a különböző szubpopulációk nem minden esetben szorítják ki egymást. A CU3. 7 hibrid pedig arra hívja fel a figyelmet, hogy a heteroplazmiás állapot nem csak átmeneti lehet, akár stabilizálódhat is.

A további vizsgálatokba kizárólag a 10-170-es *Sc* és 10-522-es *Su* törzs keresztezéséből származó 50 hibridet (CU4. 1-10 és A1-40) vontuk be.

### 5.3. A mtDNS rekombinációja

A kutatócsoportunknak elsőként sikerült nagy számban rekombináns mitotípusú interspecifikus *Saccharomyces* hibrideket izolálni, illetve a rekombináns mitokondriális genomokban előforduló allélkombinációkat megvizsgálni. Előttünk csak egy kutatócsoport talált mindössze három rekombináns törzset 83 hibrid között (3.61%) (Verspohl és mtsi., 2018). A hibrid törzseink 34%-a rekombináns mitotípussal rendelkezett, ami az intraspecifikus hibrideknél tapasztalt rekombinációs gyakorisághoz (25-40%) mérhető (Dujon és mtsi., 1974; Wolters és mtsi., 2018). A rekombináns hibridek magas aránya arra utal, hogy a *Sc* és a *Su* mitokondriális tubulusok egymással könnyen fúzionálnak, hiszen ez előfeltétele annak, hogy a bennük található mtDNS molekulák egymással rekombinálódjanak. A rekombináció lejtátszódása után a mitokondriális tubulusok valószínűleg hasadási folyamaton is keresztülmennek, hogy létrejöhessenek olyan tubulusok, amelyek a két szülői genom rekombináns változatát tartalmazzák. Ezért elképzelhető, hogy az interspecifikus *Sc* x *Su* zigóták mitokondriális hálózatának dinamikája hasonló a vegetatívan osztódó *Sc* sejtekéhez.

A rekombináns hibridekben meglepően magas volt a *Su* *COX2* és *COX3*, valamint a *Sc* *COX1* allélek aránya. A *Sc* és a *Su* *ATP6* allélek pedig közel azonos arányban oszlottak meg a rekombináns hibridek között. Azt is megfigyeltük, hogy a rekombináns csoportokon belül a hibridek azonos *ATP6* allélt hordoztak. Eredményeink arra utalnak, hogy a rekombináció a két genom között vagy nem véletlenszerű helyeken történik vagy pedig a *COX* alléloknak ez a kombinációja előnyösebb a mitonukleáris és/vagy mitokondriális allélek közötti kölcsönhatások szempontjából a hibridek számára. A dolgozatomban kísérleteinek befejezése után született meg a szülők, illetve néhány interspecifikus hibrid mitokondriális genom

szekvenciája. Mivel jómagam ezekben a kísérletekben már nem vettem részt, nem használtam fel ezeket az eredményeket. Azonban a két szülő mitokondriális DNS-ét a Függelék fejezetben mégis bemutatom, mivel egymáshoz való hasonlításuk, illetve a rajtuk elhelyezkedő, általam is vizsgált gének helyzete érdekes lehet az Olvasó számára.

#### **5.4. A rekombináns mitotípussal rendelkező hibridek növekedési képességének vizsgálata magas hőmérsékleten, nem-fermentálható szénforráson**

Intraszpecifikus hibridekkel végzett kísérletek azt mutatták, hogy a rekombináns mitotípussal rendelkező hibridek fitnesze magas hőmérsékleten, nem-fermentálható szénforráson (a törzsek csak oxidatív foszforilációval tudnak energiát termelni) sok esetben alacsonyabb, mint a szülői mitotípusokkal rendelkező hibrideké (Wolters és mtsi., 2018). Wolters és munkatársai szerint ez azzal magyarázható, hogy a mitokondriális allélek egymáshoz alkalmazkodva fejlődtek az evolúció során, hogy a lehető leghatékonyabban működő fehérjekomplexeket tudják kialakítani. A rekombináció ezeket az allélkombinációkat felbontja, ami a proteinkomplexek működési hatékonyságának csökkenését eredményezheti. Magas hőmérsékleten a fehérjekomplexek instabilabbá válnak, ezért az egymással kevésbé hatékonyan kölcsönható komponensek széteshetnek (He és mtsi., 2016). Ezzel az elmélettel összhangban egy másik kutatócsoport arról számolt be, hogy bizonyos *Sc* allélokat *Su* (*COXI* és *ATP6*) allélokra cserélve az általuk használt *Sc* törzs magas hőmérsékleten elveszítette a respirációs képességét (Li és mtsi., 2019).

Az általunk vizsgált minden hibrid képes volt 37 °C-on, fermentálható szénforráson a mitotípusuktól függetlenül növekedni. Viszont magas hőmérsékleten, nem-fermentálható szénforráson mi is azt tapasztaltuk, hogy három rekombináns csoportba tartozó hét hibrid elvesztette a növekedési képességét, míg az összes szülői mitotípussal rendelkező törzs megőrizte azt. Tehát interszpecifikus hibridek esetén is elmondható, hogy a mtDNS rekombinációja sok esetben hátrányosan hat a hibridek fitneszére a fent említett tenyésztési körülmény között. A rekombináns csoportokban a hibridek növekedési képessége közel azonos, ami arra utal, hogy a rekombinációval létrejövő új allélkombinációk erősen befolyásolják a hibridek respirációs képességét.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a hibridek respirációs képessége magas hőmérsékleten összefüggésben van-e az *ATP6* gén eredetével. Azt tapasztaltuk, hogy minden hibrid, amely elvesztette a respirációs képességét *Su ATP6* alléllal rendelkezett, de az R5 rekombináns csoportba tartozó, szintén *Su ATP6* alléllal rendelkező hibridek közepes mértékben képesek

voltak növekedni. A hét *Sc ATP6* genotípusú hibrid közül egyik sem vesztette el a respirációs képességét, viszont az R4 csoportba tartozó két hibrid csak gyenge és közepes növekedési képességgel bírt, míg a más csoportokba tartozó szintén *Sc ATP6* genotípusú hibridek jó növekedéssel rendelkeztek. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *ATP6* allélikus variánsainak fontos szerep jut a hibridek magas hőmérsékleten való respirációs képességének kialakításában, viszont más tényezők hatása is érvényesül.

### 5.5. A hibridsterilitás vizsgálata

A hibridsterilitás legelfogadottabb magyarázata, hogy a hibridekben a homeológ kromoszómák a meiózis során nem tudnak párba állni, ezáltal a hibridek nem képesek életképes gamétákat képezni (Delneri és mtsi., 2003; Charron és mtsi., 2014). Növény és *Saccharomyces* fajoknál is kimutatták, hogy ez a sterilitási barrier áthidalható teljes genom duplikáció által (Banno és Kaneko, 1989; Charron és mtsi., 2019). A köztudatban még kevésbé elterjedt, hogy a *Saccharomyces* fajokra jellemző egy második sterilitási barrier megléte is, amely az allodiploid spóráklónok *MATa/MATa* heterozigótaságából adódik (Pfliegler és mtsi., 2012; Sipiczki, 2018). A két allélról átíródó fehérjék egymással összekapcsolódva létrehoznak egy represszort, amely meggátolja a konjugációért felelős gének aktiválását. Tehát hiába képződnek életképes F1 spóráklónok, ezek nem lesznek képesek egymással konjugálva F2 nemzedéket létrehozni (van Werven és Amon, 2011; Haber, 2012). Ez a sterilitási barrier is áttörhető amennyiben a meiózis során az egyik *MAT* lókuszt hordozó kromoszóma elvész. Ekkor a hibridekben a haploid sejtekre jellemző genetikai program fog működni, vagyis képesek lesznek párosodási típust váltani és egymással konjugálni (Pfliegler és mtsi., 2012; Sipiczki, 2018).

Hibridsterilitást ezenkívül okozhat még a mitonukleáris inkompatibilitás is, amely során az egyik szülői faj kromoszómán kódolt mitokondriális fehérjéje a mitokondriumba lépve nem tud kölcsönhatásba lépni a másik szülői faj mtDNS-en kódolt fehérjéjével vagy RNS-ével az allélikus különbségek miatt (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010). Amennyiben ez a respirációs képesség elvesztését eredményezi, a sejtek nem tudnak belépni a meiózisba (Treinin és mtsi., 1993). A mitonukleáris inkompatibilitással kapcsolatos kísérleteket olyan mesterséges hibridekkel végezték, amelyekben csak a mitokondriális fehérjéjével vagy RNS-sel inkompatibilis szülői allél volt jelen a nukleáris genomban, a másik szülői allél hiányzott (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010).

Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a mitonukleáris inkompatibilitás által okozott sterilitás jelentkezik-e az általunk létrehozott hibrideknél is. Tudomásunk szerint a mtDNS szerepét a hibridsterilitásban még nem vizsgálták olyan interspecifikus hibridekben, amelyekben megtalálható mindkét szülői faj kromoszómakészlete.

A hibridsterilitás vizsgálatába az azonos szülői törzsektől származó *Sc* x *Su* hibrideket vontuk be. Az 50 hibrid közül mindössze egy hibrid (A27) veszítette el a spórázási képességét. A spórázási képesség elvesztésének két lehetséges magyarázata is lehet. Az egyik, hogy egy allodiploid hibridről van szó, amelyben a homeológ kromoszómák nem tudnak a meiózis során párba állni, ezáltal az A27 hibrid nem képes spórákat sem létrehozni. A másik lehetséges ok a respirációs képesség elvesztése. A hibridek közül az A27 volt az egyetlen, amely szobahőmérsékleten és 37 °C-on is képtelen volt nem-fermentálható szénforráson növekedni. A respirációs képesség elvesztésének hátterében viszont több dolog is állhat. A mtDNS rekombinációja inaktíválhatott egy respirációhoz nélkülözhetetlen gént vagy létrejöhetett egy olyan allél, amely inkompatibilis egy sejtmagban kódolt fehérjével, de akár egy mindezekről független mutáció is történhetett valamelyik, a respirációhoz vagy a glicerin anyagcseréhez szükséges génben. Egy további magyarázat lehet a mitondriális allélek közötti inkompatibilitás is, vagyis hogy a *Sc COX2*, a *Su COX3* és a *Sc COX1* kombinációból származó fehérjék nem tudnak működőképes fehérjekomplexet képezni. Az A27 volt az egyetlen olyan hibrid, amelyben ez az allélkombináció fordult elő.

A vizsgálatba bevont többi hibrid képes volt életképes F1 spórákat létrehozni, tehát a meiózis sikeresen lezajszódott bennük, ami arra utal, hogy ezek a hibridek valószínűleg tetraploid genommal rendelkeztek. Egy másik fontos észrevétel ezzel a jelenséggel kapcsolatban, hogy a 49 hibrid között előfordultak *Su*, *Sc* és különböző rekombináns mitotípussal rendelkező törzsek is. Tehát elmondhatjuk, hogy a hibridek spórázási képességét a mitotípus nem befolyásolta. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezeknek a hibrideknek a genomjában megtalálható volt a különböző gének *Su* és *Sc* alléljai is, aminek eredményeként egyidejűleg jelen voltak a sejtekben mindkét faj mtDNS-ével kompatibilis fehérjék. A mitonukleáris inkompatibilitásnak a spóráklónok esetében lehet nagyobb jelentősége, amikor a meiotikus osztódások során fokozatosan elvesznek az egyik szülői fajtól származó kromoszómák a genomból és ennek eredményeként a mitondriális fehérjék jelentős részének csak a másik szülőtől származó allélja fog megmaradni.

A fertilitás visszanyeréséhez a hibrideknek nem elegendő életképes spórákat létrehozniuk, a második sterilitási barriert is át kell törniük, ami az egyik *MAT* lókuszt elvesztésével érhető

el. A *MAT* allél elvesztését egy közvetett módszerrel vizsgáltuk, amelynek az a lényege, hogy az egyik marker gén a *MAT* lókuszt hordozó kromoszómán helyezkedik el, így azok a spóráklónok, amelyek elveszítik az egyik *MAT* allélt, egyúttal auxotróffá is válnak, amit könnyű kimutatni. Négy olyan hibridet találtunk, amelyek kb. 30% gyakorisággal képeztek auxotróf spórákat. Amennyiben a hipotézisünk helyes, akkor ez azt jelenti, hogy ezeknek a hibrideknek a spóráinak az egy harmada képes életképes F2 generációt létrehozni.

Az elméletünk helyességére utalnak a tetrádanalízissel kapott eredmények és a tetrádok pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített kariogramjai. Tetrádanalízissel minden elsőre kiválasztott, a fenti négy hibrid által képzett auxotróf spóráklónból sikerült életképes F2 spóráklónokat izolálni. Pulzáló erőterű gélelektroforézissel kimutattuk, hogy míg a prototróf spóráklónok kariogramjában megtalálható volt az összes *Sc* és *Su* kromoszómának megfelelő sáv, addig a vizsgált auxotróf spóráklónok kariogramjából hiányzott az *Su* III-as kromoszómának megfelelő sáv.

Négy jól spórázó hibrid közül kettő *Sc* (A29, A32), egy *Su* (A3), egy pedig rekombináns (A4) mitotípussal rendelkezett, ami azt mutatja, hogy a *MAT* lókuszt hordozó kromoszóma malszegregációja, vagyis a második sterilitási barrier áttörése sem függ a mitotípustól.

### **5.6. A mitokondriális genom változása a meiózis során**

Az interspecifikus hibridek nukleáris genomja a meiotikus osztódások során redukálódik, az osztódások során az egyik szülőtől származó kromoszómák fokozatosan elvesznek (Karanyicz és mtsi., 2017; Sipiczki, 2018). Viszont a mitokondriális öröklődéssel foglalkozó kutatások eddig nem tértek ki arra, hogy maga a mtDNS változik-e a meiózis során vagy változatlanul kerül be a spórákba.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a mtDNS változhat a folyamat során. A spóráklónok egy részénél azt figyeltük meg, hogy az RFLP mintázatukból sávok veszttek el. Ezek a spóráklónok ezzel párhuzamosan elvesztették még a respirációs képességüket és valószínűleg bizonyos, mtDNS-en kódolt génjeiket is. Úgy gondoljuk, hogy a mitotípus változását ektopikus rekombináció és/vagy intramolekuláris átrendeződés okozhatta.

### **5.7. Az F1 spóráklónok növekedési képességének vizsgálata magas hőmérsékleten**

A legtöbb rekombináns hibridtől származó spóráklón elvesztette magas hőmérsékleten a respirációs képességét annak ellenére, hogy a mitotípusukban nem történt kimutatható változás és a rekombináns hibrid, amelytől származtak jó növekedési képességgel

rendelkezett. Meg kell azonban jegyezni, hogy ez a jelenség a *Su* mitotípusú hibridek által képzett tetradok esetében is előfordult, illetve a vizsgálatainkba csak két *Sc* mitotípusú hibridtől származó tetradot vontunk be.

A spóráklónok respirációs képességének magas hőmérsékleten való elvesztésének háttérében több dolog is állhat. Meiózis során a sejtek ploiditása lecsökken ( $4n \rightarrow 2n$ ) és ezzel együtt a hőmérséklet-tolerancia kialakításában résztvevő gének kópiaszáma is, ami érzékenyebbé teheti a sejteket. Ez megmagyarázná, hogy néhány spóráklón növekedési képessége miért csökkent le magas hőmérsékleten, fermentálható szénforráson.

Hőstressz hatására a genom ezenkívül destabilizálódhat, a kromoszómák malszegregációja nagyobb gyakorisággal fordul elő, ami a heterozigótaság elvesztését eredményezi (Shen és mtsi., 2020). A heterozigótaság elvesztésének következtében pedig a mitonukleáris inkompatibilitásnak is nagyobb szerepe lehet.

## 6. Összefoglalás

Kutatócsoportok a világ számos pontján vizsgálják mind az intraspecifikus, mind pedig az interspecifikus *Saccharomyces* hibridekben lejátszódó genetikai folyamatokat, amelyeknek a megértése egyaránt fontos az ipar és az alapkutatás számára is. Az interspecifikus hibridek nukleáris genomjában végbemenő folyamatokról már sok ismeretünk van, viszont a mtDNS öröklődésével és a fenotípusra gyakorolt hatásával kapcsolatban még számos kérdés megválaszolatlan.

A *Saccharomyces*-ek mitokondriális öröklődéséről tudjuk, hogy a legtöbb élőlényel ellentétben biparentális, a zigótába bekerül mindkét szülő mtDNS-e, viszont néhány osztódási ciklus után az egyik szülő elvész (Birky, 1978; Dujon, 1981). Még nem ismert, hogy mi határozza meg, hogy melyik mtDNS fixálódik a hibridekben. A homoplazmia kialakulásának egyik magyarázata, hogy csak néhány mtDNS molekula replikálódik és kerül át az utódsejtbe (Ling és Shibata, 2004). De az máig ismeretlen, hogy mi dönti el, hogy melyik mtDNS molekula replikálódjon.

Vannak olyan kutatások, amelyek azt mutatják, hogy a mitotípus befolyásolja az interspecifikus hibridek respirációs rátáját, hőmérséklet toleranciáját, dehidratációval és oxidatív stresszel szembeni rezisztenciáját és fertilitását is (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010; Albertin és mtsi., 2013; Picazo és mtsi., 2015; Baker és mtsi., 2019; Li és mtsi., 2019). Itt meg kell viszont jegyezni, hogy a kísérletek jelentős részét kisszámú hibriddel végezték, ezért még szükség van átfogóbb tanulmányokra, hogy biztonsággal vonhassunk le következtetéseket.

A tanszékünk már évek óta vizsgálja az interspecifikus *Saccharomyces* hibridek genetikáját, beleértve a fertilitás-sterilitás háttérében meghúzódó folyamatokat is. A tanszéken folyó korábbi kísérletek világítottak rá arra, hogy az interspecifikus hibridek visszanyerhetik a fertilitásukat. Ehhez két sterilitási barrier áttörésére van szükség: autoploidizáció által létrejöhetnek tetraploid hibridek, amelyekben a meiózis akadály nélkül lejátszódik, valamint az egyik *MAT* lókuszt hordozó kromoszóma elvesztésével az allodiploid spóráklónok képessé válnak haploid sejtekként viselkedni és ezáltal egymással konjugálva F2 generációt létrehozni (Pfliegler és mtsi., 2012; Sipiczki, 2018).

Felkeltette az érdeklődésünket, hogy vajon a mitonukleáris inkompatibilitás, hogyan illeszkedik ebbe a képbe. A sejtekben a kromoszómákon kódolt mitokondriális fehérjék részt vesznek a mtDNS-en kódolt RNS-ek érésében, stabilizálásában, valamint fehérjekomplexek

kialakításában. Mitonukleáris inkompatibilitás akkor lép fel, amikor a sejtmagban kódolt fehérje génje egy adott fajtól, a mtDNS-en kódolt fehérje vagy RNS génje pedig egy másik fajtól származik (pl. szintetikus hibridekben vagy spóráklónokban) és a fajok közötti szekvencia különbségek miatt a két molekula nem tud egymással kölcsönhatásba lépni (Lee és mtsi., 2008; Chou és mtsi., 2010). Ez akár a respirációs képesség elvesztését is okozhatja, ami a spórázási képesség elvesztéséhez vezet (Treinin és mtsi., 1993).

A kutatócsoportunk szerette volna ezúttal az interspecifikus hibrideket a mitokondriális genom szemszögéből megvizsgálni, hogy hozzájáruljunk a mitokondriális öröklődés folyamatának megértéséhez. Munkánk során létrehoztunk 79 *S. cerevisiae* x *S. uvarum* interspecifikus hibridet három *S. cerevisiae* és két *S. uvarum* törzs keresztezésével. Meg szeretnénk nézni, hogy a különböző törzspárosításoknak van-e valamilyen hatása a hibridek mitotípusára. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a mitotípus vajon befolyásolja-e a hibridek fertilitását illetve, hogy történnek-e változások a mtDNS-ben a meiózis során. Ezenkívül a mtDNS öröklődését *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* kettős, illetve *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* x *S. cerevisiae* hármashibridekben is megvizsgáltuk.

A 10-1651-es *S. uvarum* törzs nem tudta tovább örökíteni a mtDNS-ét akkor sem, amikor a 170-es *S. cerevisiae*-vel kereszteztük és akkor sem, amikor a 10-1653-as *S. kudriavzevii*-vel. A *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* kettős hibrid *S. kudriavzevii* mtDNS-t örökölt, viszont a 10-170-es *S. cerevisiae*-vel való keresztezése után a hármashibridek a *S. cerevisiae* mitokondriális genomot örökölték.

A különböző törzspárosításokból származó *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridek mitotípusának elemzésekor azt figyeltük meg, hogy a 10-167 (*S. cerevisiae*) x 10-522 (*S. uvarum*) keresztezésből származó hibridek mind *S. uvarum*, a 10-170 (*S. cerevisiae*) x 10-1651 (*S. uvarum*) keresztezésből származó hibridek pedig mind *S. cerevisiae* mitotípusúak voltak. Amikor pedig a 10-170-es és 10-522-es törzset kereszteztük egymással, kaptunk *S. cerevisiae*, *S. uvarum* és különböző rekombináns mitotípusú hibrideket, illetve egy törzset, amelyben a sejtek egy része *S. cerevisiae* másik része pedig rekombináns mitotípusú volt. Ebből arra következtettünk, hogy a különböző mitotípusú törzsek „dominancia” sorrendet alkothatnak.

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

heteroplazmiás és homoplazmiás populációkat kell érteni, de a kevert mitotípusú tenyészetből 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 között meglepően sok rekombináns mitotípussal rendelkező törzset azonosítottunk, amelyeket 8 rekombináns csoportba osztottunk.

Kíváncsiak voltunk, hogy a rekombináns mtDNS-ek milyen allélkombinációkat hordoznak, ezért PCR reakcióval megvizsgáltunk négy mitokondriális gént: *COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*. A rekombináns hibridek néhány kivételt leszámítva mind *S. cerevisiae COX1* és *S. uvarum COX2* és *COX3* alléleket hordoztak. Az *ATP6* allél esetében a hibridek közel felében *S. cerevisiae*, másik felében pedig *S. uvarum* allél volt kimutatható. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a rekombináció valószínűleg nem véletlenszerű helyeken történik a két faj mtDNS-e között.

Azt is észrevettük, hogy a rekombináns hibridek közel fele magas hőmérsékleten elvesztette a respirációs képességét. Valószínűleg a légzési láncot alkotó fehérjekomplexekben a különböző *S. cerevisiae* és *S. uvarum* allélok által kódolt fehérjék kevésbé hatékonyan kapcsolódnak egymáshoz, ezért magas hőmérsékleten könnyebben széteshetnek (He és mtsi., 2016). A rekombináns csoportokon belül a hibridek hasonló növekedési képességgel rendelkeztek, ami arra utal, hogy a mitotípus magas hőmérsékleten jelentősen befolyásolja a hibridek respirációs képességét.

37 °C-on a legtöbb spóraklón elvesztette a respirációs képességét, ami viszont nem állt szoros összefüggésben a spóraklónok mitotípusával. Elképzelhető, hogy az allodiploid hibridek allotetraploid hibridekhez képest gyengébb hőmérséklet-toleranciája, vagy a genomjukban magas hőmérsékleten bekövetkező változások állhatnak a jelenség háttérében.

A spóraklónok mitotípusának elemzésekor azt figyeltük meg, hogy a mitotípus a legtöbb spóraklón esetében a szülői hibridhez képest változatlanul adódik tovább. A spóraklónok egy részénél viszont a mtDNS RFLP mintázatából sávok vesztek el. Ezek a spóraklónok 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 destabilizálódhat.

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 valószínűleg tetraploidok voltak. Egy hibridet találtunk, amely nem képzett spórákat. Ez a törzs rekombináns mitotípussal rendelkezett és nem volt képes oxidatív foszforilációval energiát termelni. A rendelkezésre álló adatok alapján nem tudjuk eldönteni, hogy a spórázási képesség elvesztésének hátterében a mitonukleáris inkompatibilitás, egy rekombináció által funkciót vesztett mitokondriális gén vagy pedig az áll, hogy ez a hibrid allodiploid genommal rendelkezett.

Random spóra analízissel négy olyan hibridet azonosítottunk, amelyek közel 30% gyakorisággal képeztek leucin auxotróf spórákat. Ezek a hibridek nagy valószínűséggel elvesztették az egyik *MAT* lókuszt hordozó kromoszómájukat, ezáltal pedig visszanyerték a fertilitásukat. Tetrádanalízissel is megerősítettük, hogy valóban fertilisek voltak. A négy hibrid közül kettő *S. cerevisiae*, egy rekombináns, egy pedig *S. uvarum* mitotípussal rendelkezett, ami azt bizonyítja, hogy a *S. cerevisiae* és *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.

## 7. Summary

Research groups globally examine the genetic processes of intra- and interspecific *Saccharomyces* hybrids as it is an interesting area for basic research and also has great industrial importance. While much is known about the processes of the nuclear genome of interspecific hybrids, there are several unanswered questions about the inheritance of mtDNA and its effects on the phenotype.

In contrast to most species; the inheritance of mtDNA in the *Saccharomyces* hybrids are biparental, the zygote contains the mitochondria of both parental cells, however; after a few cell cycles only one type of mtDNA remains in the hybrid (Birky, 1978; Dujon, 1981). One possible explanation for the establishment of homoplasmy is that only a few mtDNA molecules are selected for replication and subsequently transferred into the bud (Ling and Shibata, 2004). However, it is still unknown what determines which mtDNA molecule is replicated.

There are studies which show that the mitotype influences the respiration rate, temperature, dehydration and oxidative stress tolerance and the fertility of interspecific hybrids (Lee et al., 2008; Chou et al., 2010; Albertin et al., 2013; Picazo et al., 2015; Baker et al., 2019; Li et al., 2019). It is important to note here that only a small numbers of hybrids were involved in most of these studies. Therefore, comprehensive research is still needed to confirm these results.

Our department has been investigating the genetics of interspecific *Saccharomyces* hybrids, including the processes underlying their fertility and sterility, for many years. Previous experiments from our laboratory have shown; that interspecific hybrids can regain fertility. This requires breaking down two sterility barriers: tetraploid hybrids can be formed by autopolyploidisation, in these hybrids meiosis can occur unhindered. In order to break down the second sterility barrier the allodiploid spores have to lose one *MAT* locus chromosome. As a result, the spores will behave as haploid cells and thus conjugate with each other to generate F2 generations (Pfliegler et al., 2012; Sipiczki, 2018).

We were interested to see how the cytonuclear incompatibility fits into this picture. Mitochondrial proteins encoded on chromosomes are involved in the maturation and stabilisation of RNAs encoded on mtDNA and in the formation of protein complexes. Cytonuclear incompatibility occurs when the mitochondrial protein encoded in the nucleus is derived from one species and its interacting partner (encoded on the mtDNA) is derived from

another species (e.g. in synthetic hybrids or spore clones) and the two molecules cannot interact due to sequence differences between the species (Lee et al, 2008; Chou et al., 2010). This can lead to a loss of respiratory capacity, leading to a loss of sporulation ability.

Our research team wanted to investigate interspecific hybrids from the perspective of the mitochondrial genome to contribute to our understanding of the mitochondrial inheritance process. In our work, we generated 79 *S. cerevisiae* x *S. uvarum* interspecific hybrids by crossing three *S. cerevisiae* and two *S. uvarum* strains. We wanted to see if the different strain pairings had any effect on the mitotype of the hybrids. We were also curious to see if the mitotype affects the fertility of the hybrids and if changes in mtDNA occur during meiosis. In addition, the inheritance of mtDNA in *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* double and *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* x *S. cerevisiae* triple hybrids was also investigated.

The *S. uvarum* strain 10-1651 failed to pass on its mtDNA when crossed with *S. cerevisiae* 170 and when crossed with *S. kudriavzevii* 10-1653. The *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* double hybrid inherited *S. kudriavzevii* mtDNA, but after crossing with *S. cerevisiae* 10-170, the triple hybrids inherited the *S. cerevisiae* mitochondrial genome.

When analysing the mitotype of *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hybrids from different strain pairs, we observed that hybrids derived from the 10-167 (*S. cerevisiae*) x 10-522 (*S. uvarum*) cross all had *S. uvarum*, and 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, we obtained hybrids with *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and different recombinant mitotypes, we also observed a strain in which some of the cells showed *S. cerevisiae* and some showed recombinant mitotypes. It was concluded that strains with different mitotypes could form a 'dominance' sequence.

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 crosses between the *S. cerevisiae* strain 10-170 and the *S. uvarum* strain 10-522, we identified a surprisingly high number of strains with recombinant mitotypes, which were divided into 8 recombinant groups.

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. The *S. cerevisiae* and *S. uvarum* *ATP6* alleles were almost equally distributed among the hybrids. These results suggest that recombination probably occurs at non-random sites between the mtDNAs of the two species.

We also noticed that nearly half of the recombinant hybrids lost their ability to respire at high temperatures. The mitotype showed a strong correlation with the ability of the hybrids to respire at 37 °C. It is likely 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). Within the recombinant groups, the hybrids had similar growth ability, suggesting that the mitotype significantly influences the respiratory capacity of the hybrids at high temperatures.

At 37 °C, most of the spore clones lost their respiratory capacity, which was not closely related to the mitotype of the sporoclones. Perhaps the poorer temperature tolerance of allodiploid hybrids compared to allotetraploid hybrids or changes in their genome at high temperatures may be responsible for this phenomenon.

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 destabilize 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 produce energy by oxidative phosphorylation. Based on the available data, we cannot determine whether the loss of

sporulation ability is due to cytonuclear incompatibility, a mitochondrial gene that lost function through recombination, or whether this hybrid had an allodiploid genome.

Using random spore analysis, we identified four hybrids that produced auxotrophic spores at a frequency of nearly 30%. These hybrids most likely lost one of their *MAT* locus-bearing chromosomes and thus regained fertility. We also confirmed by tetrad analysis that these hybrids were indeed fertile. 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 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.

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm témavezetőm, dr. Antunovics Zsuzsa folyamatos támogatását és értékes javaslatait. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sipiczki Mátyásnak, amiért anyagi háttérrel biztosított a kísérleteimnek és tanácsaival segítette a munkámat. 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 segítséget és támogatást és Brachyahu Meir Kestecher-nek az angol fordításban nyújtott segítségét.

## 9. Irodalomjegyzék

- Albertin, W., Chernova, M., Durrens, P., Guichoux, E., Sherman, D.J., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P. (2018). Many interspecific chromosomal introgressions are highly prevalent in Holarctic *Saccharomyces uvarum* strains found in human-related fermentations. *Yeast*. 35: 141-156.
- 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.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyama, J., McLeod, M., Warbick, E. (1993). Experiments with fission yeast: a laboratory course manual. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarede, I., Albertin, W., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., Hittinger, C.T., Gonçalves, P., Sampaio, J.P. (2014). A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nat. Commun.* 5: 4044.
- Alonso del Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, E., Querol, A. (2017). Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* Species against a *Sc* wine strain in wine fermentation: competition, physiological fitness, and influence in final wine composition. *Front. Microbiol.* 8: 150.
- Alsammar, H., Delneri, D. (2020). An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus. *FEMS Yeast Research*. 3: foaa013.
- Altmann, K., Frank, M., Neumann, D., Jakobs, S., Westermann, B. (2008). The class V myosin motor protein, Myo2, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 181: 119-130.
- Anderson, E., Hubricht, L. (1938). Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *Am. J. Bot.* 25: 396-402.
- Anton, F., Fres, J.M., Schauss, A., Pinson, B., Praefcke, G.J.K., Langer, T., Escobar-Henriques, M. (2011). Ugo1 and Mdm30 act sequentially during Fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion. *J. Cell Sci.* 124: 1126-1135.
- 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.
- Antunovics, Z., Szabo, A., Heisteringer, L., Mattanovich, D., Sipiczki, M. (2023). Synthetic two-species allodiploid and three-species allotetraploid *Saccharomyces* hybrids with euploid (complete) parental subgenomes. *Sci. Rep.* 1: 1112.

- Arroyo-López, F.N., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Guillamón, J.M., Barrio, E., Querol, A. (2010). Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast*. 27: 1005-1015.
- Astell, C.R., Ahlstrom, L., Smith, M., Tatchell, K., Nasmyth, K.A., Hall, D.B. (1981). The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*. 27: 15-23.
- Bágeľová Poláková, S., Lichtner, Ž., Szemes, T., Smolejová, M., Sulo, P. (2021). Mitochondrial DNA duplication, recombination, and introgression during interspecific hybridization. *Sci. Rep.* 11: 12726.
- 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.
- Baldacci, G., Bernardi, G. (1982). Replication origins are associated with transcription initiation sequences in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO. J.* 1: 987-994.
- Baldacci, G., Cherif-Zahar, B., Bernardi, G. (1984). The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO. J.* 3: 2115-2120.
- Banno, I., Kaneko, Y. (1989). A genetic analysis of taxonomic relation between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *Yeast*. 5: S373-377.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. (1990). *Yeasts: Characteristics and identification*. 2nd edn. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Bassett, D.E., Boguski, M.S., Hieter, P. (1996). Yeast genes and human diseases. *Nature*. 379: 589-590.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., Querol, A. (2008). Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int. J. Food Microbiol.* 22: 188-195.
- Belloch, C., Pérez-Torrado, R., González, S. S., Pérez-Ortín, J. E., García-Martínez, J., Querol, A., Barrio, E. (2009). Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2534-2544.
- Bellon, J.R., Eglinton, J.M., Siebert, T.E., Pollnitz, P.A., Rose, L., de Barros Lopes, M., Chambers, P.J. (2011). Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (91): 603-612.
- Bellon, J.R., Ford, C.M., Borneman, A.R., Chambers, P.J. (2018). A Novel Approach to Isolating Improved Industrial Interspecific Wine Yeasts Using Chromosomal Mutations as Potential Markers for Increased Fitness. *Front. Microbiol.* (9): 1442.
- Bendich, A.J. (1996). Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 255: 564-588.

- Bernardi, G. (2005). Lessons from a small, dispensable genome: the mitochondrial genome of yeast. *Gene*. 354: 189-200.
- Bhar, D., Karren, M.A., Babst, M., Shaw, J.M. (2006). Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *J. Biol. Chem.* 281: 17312-17320.
- Biddick, R., Young, E.T. (2009). The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast*. 26: 205–220.
- Birky, C.W. (1978). Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.* 12: 471-512.
- Birky, C.W. (1994). Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws. *J. Hered.* 85: 355-365.
- Birky, C.W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* 35: 125-148.
- Bisson, L.F. (1999). Stuck and sluggish fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 107-119.
- Blanc, H., Dujon, B. (1980). Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3942-3946.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell. Biol.* 1: 298-304.
- van der Blik, AM. (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends. Cell Biol.* 9: 96-102.
- Boldogh, I.R., Ramcharan, S.L., Yang, H.C., Pon, L.A. (2004). A type V myosin (Myo2p) and a Rab-like G-protein (Ypt11p) are required for retention of newly inherited mitochondria in yeast cells during cell division. *Mol. Biol. Cell.* 15: 3994-4002.
- Borneman, A.R., Desany, B.A., Riches, D., Affourtit, J.P., Forgan, A.H., Pretorius. I.S., Egholm, M., Chambers, P.J. (2012). The genome sequence of the wine yeast *VIN7* reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins. *FEMS Yeast Res.* 12: 88-96.
- Bousquet, I., Dujardin, G., Poyton, R.O., Slonimski, P.P. (1990). Two group I mitochondrial introns in the *cob*-box and *coxI* genes require the same *MRS1/PET157* nuclear gene product for splicing. *Curr. Genet.* 18: 117-124.
- Bradbury, J.E., Richards, K.D., Niederer, H.A., Lee, S.A., Dunbar, P.R., Gardner, R.C. (2006) A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 89: 27-37.

- Bradshaw, E., Yoshida, M., Ling, F. (2017). Regulation of Small Mitochondrial DNA Replicative Advantage by Ribonucleotide Reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)*. 7: 3083-3090.
- Brewer, L.R., Friddle, R., Noy, A., Baldwin, E., Martin, S.S., Corzett, M., Balhorn, R., Baskin, R.J. (2003). Packaging of single DNA molecules by the yeast mitochondrial protein Abf2p. *Biophys. J.* 85: 2519-2524.
- Brocard-Masson, C., Dumas, B. (2006). The fascinating world of steroids: *Sc* as a model organism for the study of hydrocortisone biosynthesis. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 22: 213-252.
- Bruhn, L., Sprague, G.F. (1994). MCM1 point mutants deficient in expression of alpha-specific genes: residues important for interaction with alpha 1. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2534-2544.
- Burgess, S.M., Delannoy, M., Jensen, R.E. (1994). *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell. Biol.* 126: 1375-1391.
- Burkholder, A.C., Hartwell, L.H. (1985). The yeast  $\alpha$ -factor receptor: Structural properties deduced from the sequence of the STE2 gene. *Nucleic. Acids. Res.* 13: 8463-8475.
- Burton, R.S., Byrne, R.J., Rawson, P.D. (2007). Three divergent mitochondrial genomes from California populations of the copepod *Tigriopus californicus*. *Gene.* 403: 53-59.
- Bussey, H., Kaback, D.B., Zhong, W., Vo, D.T., Clark, M.W., Fortin, N., Hall, J., Ouellette, B.F., Keng, T., Barton A.B. (1995). The nucleotide sequence of chromosome I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 3809-3813.
- Capece, A., Votta, S., Guaragnella, N., Zambuto, M., Romaniello, R., Romano, P. (2016). Comparative study of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains to identify potential marker genes correlated to desiccation stress tolerance. *FEMS. Yeast. Res.* 16: fow015.
- Cervený, K.L., McCaffery, J.M., Jensen, R.E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol. Biol. Cell.* 12: 309-321.
- Cervený, K.L., Jensen, R.E. (2003). The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 14: 4126-4139.
- Chambers, S. R., Hunter, N., Louis, E. J., Borts, R. H. (1996). The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss. *Mol. Cell. Biol.* (16): 6110-6120.
- 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.

- Chen, X.J., Butow, R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6: 815-825.
- Chen, X.J., Clark-Walker, G.D. (2018). Unveiling the mystery of mitochondrial DNA replication in yeasts. *Mitochondrion.* 38: 17-22.
- Chernyakov, I., Santiago-Tirado, F., Bretscher, A. (2013). Active segregation of yeast mitochondria by Myo2 is essential and mediated by Mmr1 and Ypt11. *Curr. Biol.* 23: 1818-1824.
- 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.
- Codón, A.C., Benítez, T., Korhola, M. (1998). Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 154-163.
- Cohen, M.M., Tareste, D. (2018). Recent insights into the structure and function of Mitofusins in mitochondrial fusion. *F1000Res.* 7: F1000.
- Coluccio, A., Neiman, A.M. (2004). Interspore bridges: a new feature of the *Saccharomyces cerevisiae* spore wall. *Microbiology.* 150: 3189-3196.
- Corbi, D., Amon, A. (2021). Decreasing mitochondrial RNA polymerase activity reverses biased inheritance of hypersuppressive mtDNA. *PLoS Genet.* 17: e1009808.
- Dranginis, A.M. (1989). Regulation of STA1 gene expression by *MAT* during the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3992-3998.
- Deák, T. (1998). Élesztőgombák. Szaktudás Kiadó. 163-165.
- 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.
- Dieckmann, C.L., Gandy, B. (1987). Preferential recombination between GC clusters in yeast mitochondrial DNA. *EMBO. J.* 6: 4197-4203.
- Diffley, J.F.X., Stillman, B. (1992). DNA binding properties of an HMG1-related protein from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 267: 3368-3374.
- Drubin, D.G., Jones, H.D., Wertman, K.F. (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol. Biol. Cell.* 4: 1277-1294.
- Dujon, B., Slonimski, P.P., Weill, L. (1974). Mitochondrial genetics. IX. A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. 78: 415-437.

- 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.
- Dunn, B., Sherlock, G. (2008). Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res.* 18: 1610-1623.
- Egel, R., Willer, M., Kjaerulff, S., Davey, J., Nielsen, O. (1994). Assessment of pheromone production and response in fission yeast by a halo test of induced sporulation. *Yeast.* 10: 1347-1354.
- Egner, A., Jakobs, S., Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 3370-3375.
- Eleutherio, E.C., Maia, F.M., Pereira, M.D., Degré, R., Cameron, D., Panek, A.D. (1997). Induction of desiccation tolerance by osmotic treatment in *Saccharomyces uvarum* var. *carlsbergensis*. *Can. J. Microbiol.* 43: 495-498.
- Eide, L., Bjoras, M., Pirovano, M., Alseth, I., Berdal, K.G., Seeberg, E. (1996). Base excision of oxidative purine and pyrimidine DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* by a DNA glycosylase with sequence similarity to endonuclease III from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10735-10740.
- Ellis, T.P., Lukins, H.B., Nagley, P., Corner, B.E. (1999). Suppression of a nuclear *aep2* mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by a base substitution in the 5'-untranslated region of the mitochondrial *oli1* gene encoding subunit 9 of ATP synthase. *Genetics.* 151: 1353-1363.
- Ephrussi, B., Grandchamp, S. (1965). Etudes sur la suppressivité des mutants à déficience respiratoire de la levure. I. Existence au niveau cellulaire de divers degrés de suppressivité. *Heredity.* 20: 1-7.
- Erny, C., Raoult, P., Alais, A., Butterlin, G., Delobel, P., Matei-Radoi, F., Casaregola, S., Legrasd, J.L. (2012). Ecological Success of a Group of *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces kudriavzevii* Hybrids in the Northern European Wine Making Environment. *Appl. Environ. Microb.* 78: 3256-65.
- Ercan, S., Simpson, R.T. (2004). Global chromatin structure of 45,000 base pairs of chromosome III in a- and alpha-cell yeast and during mating-type switching. *Mol. Cell. Biol.* 24: 10026-10035.
- Erjavec, N., Nyström, T. (2007). Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 10877-10881.
- Eyre-Walker, A. (1993). Recombination and mammalian genome evolution. *Proc. Biol. Sci.* 252: 237-243.
- Faelber, K., Dietrich, L., Noel, J.K., Wollweber, F., Pfitzner, A.K., Mühleip, A., Sánchez, R., Kudryashev, M., Chiaruttini, N., Lilie, H., Schlegel, J., Rosenbaum, E., Hessenberger, M.,

- Matthaeus, C., Kunz, S., von der Malsburg, A., Noé, F., Roux, A., van der Laan, M., Kühlbrandt, W., Daumke, O. (2019). Structure and assembly of the mitochondrial membrane remodelling GTPase Mgm1. *Nature*. 571: 429-433.
- Fangman, W.L., Henly, J.W., Churchill, G., Brewer, B.J. (1989). Stable maintenance of a 35-base-pair yeast mitochondrial genome. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1917-1921.
- Faugeron-Fonty, G., Le Van Kim, C., de Zamaroczy, M., Goursot, R., Bernardi, G. (1984). A comparative study of the ori sequences from the mitochondrial genomes of 20 wild-type yeast strains. *Gene*. 32: 459-473.
- Fehrenbacher, K.L., Yang, H.C., Gay, A.C., Huckaba, T.M., Pon, L.A. (2004). Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. *Curr. Biol.* 14: 1996-2004.
- Fikus, M.U., Mieczkowski, P.A., Koprowski, P., Rytka, J., Sledziewska-Gójska, E., Ciésła, Z. (2000). The product of the DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *DIN7*, specifically functions in mitochondria. *Genetics*. 154: 73-81.
- Finnegan, P.M., Payne, M.J., Keramidaris, E., Lukins, H.B. (1991). Characterization of a yeast nuclear gene, *AEP2*, required for accumulation of mitochondrial mRNA encoding subunit 9 of the ATP synthase. *Curr. Genet.* 20: 53-61.
- Fisher, G., James, S.S., Roberts, I.N., Oliver, S.G., Louis, E.J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature*. 405: 451-454.
- Fleet, G.H., Heard, G.M. (1993). Yeasts: growth during fermentation. In *The Wine Microbiology and Biotechnology*, edited by Fleet, G.M. Chur: Harwood Academic Publishers. pp. 27-54.
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*. 195: 1-10.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. Lett.* 440: 325-331.
- Friddle, R.W., Klare, J.E., Martin, S.S., Corzett, M., Balhorn, R., Baldwin, E.P., Baskin, R.J., Noy, A. (2004) Mechanism of DNA compaction by yeast mitochondrial protein Abf2p. *Biophys J.* 86: 1632-1639.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 334: 358-362.
- Fritsch, E.S., Chabbert, C.D., Klaus, B., Steinmetz, L.M. (2014). A genome-wide map of mitochondrial DNA recombination in yeast. *Genetics*. 198: 755-771.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152: 683-692.

- Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., Belloch, C. (2013). Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 114: 1405-1414.
- García-Ríos, E., Guillén, A., de la Cerda, R., Pérez-Través, L., Querol, A., Guillamón, J.M. (2019). Improving the Cryotolerance of Wine Yeast by Interspecific Hybridization in the Genus *Saccharomyces*. *Front. Microbiol.* 9: 3232.
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A., Matallana, E. (2010). Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int. J. Food. Microbiol.* 136: 295-303.
- Gerton, J.L., DeRisi, J., Shroff, R., Lichten, M., Brown, P.O. Petes, T.D. (2000). Inaugural article: global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 11383-11390.
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.I., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science.* 274: 546, 563-567.
- Gonçalves, P., Valério, E., Correia, C., de Almeida, J.M.G.C.F., Sampaio, J.P. (2011). Evidence for divergent evolution of growth temperature preference in sympatric *Saccharomyces* species. *PLoS One.* 6: e20739.
- González, S.S., Gallo, L., Climent, M.D., Barrio, E., Querol, A. (2007). Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int. J. Food Microbiol.* (116): 11-18.
- Goutte, C., Johnson, A.D. (1988). a1 protein alters the DNA binding specificity of alpha 2 repressor. *Cell.* 52: 875-882.
- Graves, T., Dante, M., Eisenhour, L., Christianson, T.W. (1998). Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by in vitro capping with guanylyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 26: 1309-1316.
- Groth, C., Hansen, J., Piskur, J. (1999). A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 4: 1933-1938.
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loperino, N. (1974) *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Handbook of genetics*. Ed. by R. C. King. Plenum Press, New York.
- Haber, J.E. (2012). Mating-Type Genes and *MAT* Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 191: 33-64.
- Hagen, D.C., Bruhn, L., Westby, C.A., Sprague, G.F. (1993). Transcription of alpha-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*: DNA sequence requirements for activity of the coregulator alpha 1. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6866-6875.
- Hartig, A., Holly, J., Saari, G., MacKay, V.L. (1986) Multiple regulation of STE2, a mating-type-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2106-2114.

- He, W., Wang, Y., Liu, W., Zhou, C.Z. (2007). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1. *BMC. Struct. Biol.* 7: 38.
- He, Y., Ma, B. (2016). Abundance and Temperature Dependency of Protein-Protein Interaction Revealed by Interface Structure Analysis and Stability Evolution. *Sci. Rep.* 6: 26737.
- Hénault, M., Marsit, S., Charron, G., Landry, C.R. (2022). Hybridization drives mitochondrial DNA degeneration and metabolic shift in a species with biparental mitochondrial inheritance. *Genome Res.* 32: 2043-2056.
- Herlan, M., Bornhövd, C., Hell, K., Neupert, W., Reichert, A.S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J. Cell Biol.* 165: 167-173.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell. Biol.* 143: 359-374.
- Herschbach, B.M., Arnaud, M.B., Johnson, A.D. (1994). Transcriptional repression directed by the yeast alpha 2 protein in vitro. *Nature.* 370: 309-311.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52: 536-553.
- Hicks, W.M., Yamaguchi, M., Haber, J.E. (2011). Inaugural Article: Real-time analysis of double-strand DNA break repair by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 3108-3115.
- Hieter, P., Mann, C., Snyder, M., Davis, R.W. (1985). Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell.* 40: 381-92.
- Higuchi, R., Vevea, J.D., Swayne, T.C., Chojnowski, R., Hill, V., Boldogh, I.R., Pon, L.A. (2013). Actin dynamics affect mitochondrial quality control and aging in budding yeast. *Curr. Biol.* 23: 2417-2422.
- Higuchi-Sanabria, R., Pernice, W.M., Vevea, J.D., Wolken A.D.M., Boldogh, I.R., Pon, L.A. (2014). Role of asymmetric cell division in lifespan control in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 14: 1133-1146.
- Hittinger C.T., Gonçalves P., Sampaio J.P., Dover J., Johnston M., Rokas A. (2010). Remarkably ancient balanced polymorphisms in a multi-locus gene network. *Nature.* 464: 54-58.
- Hohmann, S., Krantz, M., Nordlander, B. (2007). Yeast osmoregulation. *Methods. Enzymol.* 428: 29-45.
- Hori, A., Yoshida, M., Shibata, T., Ling, F. (2009). Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication. *Nucleic Acids Res.* 37: 749-761.

- Hsu, Y.Y., Chou, J.Y. (2017). Environmental Factors Can Influence Mitochondrial Inheritance in the *Saccharomyces* Yeast Hybrids. *PLoS One*. 12: e0169953.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* 170: 1021-1027.
- Itoh, T., Watabe, A., Toh-e, A., Matsui, Y. (2002). Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7744-7757.
- Itoh, T., Toh-e, A., Matsui, Y. (2004). Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *EMBO J.* 23: 2520-2530.
- Jensen, R., Sprague, G.F., Herskowitz, I. (1983). Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of *HO* gene expression by the mating-type locus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 80: 3035-3039.
- 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.
- Johnson, J.A., Toepfer, J.E., Dunn, P.O. (2003). Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented populations of greater prairie-chickens. *Molecular Ecology.* 12: 3335-3347.
- Johnston, H.L., Mortimer, R.K. (1986). Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces* and other yeasts. *Int. J. Syst. Bact.* 36: 569-572.
- Kaback, D.B., Steensma, H.Y., de Jonge, P. (1989). Enhanced meiotic recombination on the smallest chromosome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 3694-3698.
- 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.
- Keleher, C.A., Passmore, S., Johnson, A.D. (1989). Yeast repressor alpha 2 binds to its operator cooperatively with yeast protein Mcm1. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5228-5230.
- Klecker, T., Scholz, D., Förtsch, J., Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J. Cell Sci.* 126: 2924-2930.
- Kleff, S., Kemper, B., Sternglanz, R., (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *EMBO J.* 11: 699-704.

- Knorre, D.A., Popadin, K.Y., Sokolov, S.S., Severin, F.F. (2013). Roles of mitochondrial dynamics under stressful and normal conditions in yeast cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013: 139491.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, M., Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science.* 305: 858-62.
- Kostriken, R., Strathern, J.N., Klar, A.J., Hicks, J.B., Heffron, F. (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* 35: 167-174.
- Kraft, L.M., Lackner, L.L. (2017). Mitochondria-driven assembly of a cortical anchor for mitochondria and dynein. *J. Cell Biol.* 216: 3061-3071.
- Kreike, J. Bechmann, H., Van Hemert, F.J., Schweyen, R.J., Boer, P.H., Kaudewitz, F., Groot, G.S. (1979). The identification of apocytochrome b as a mitochondrial gene product and immunological evidence for altered apocytochrome b in yeast strains having mutations in the COB region of mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem.* 101: 607-17.
- Kreike, J., Schulze, M., Pillar, T., Korte, A., Rodel, G. (1986). Cloning of a nuclear gene *MRS1* involved in the excision of a single group I intron (bI3) from the mitochondrial *COB* transcript in *Sc. Curr. Genet.* 11: 185-191.
- Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowers, R.N., Turnbull, D.M. (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?. *Nat. Genet.* 40: 275-279.
- Kron, S.J. (1997). Filamentous growth in budding yeast. *Trends Microbiol.* 5: 450-454.
- Kucej, M., Kucejova, B., Subramanian, R., Chen, X.J., Butow, R.A., (2008). Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. *J. Cell. Sci.* 121: 1861-1868.
- Kurihara, L.J., Stewart, B.G., Gammie, A.E., Rose, M.D. (1996). Kar4p, a karyogamy-specific component of the yeast pheromone response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 16: 3990-4002.
- Kurtzmann, C.P. (2003) Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS. Yeast. Res.* 4: 233-245.
- Lackner, L.L., Ping H., Graef M., Murley A., Nunnari, J. (2013). Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: e458-467.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and brandy. In *The Biotechnology, Food and Feed Production with Microorganisms*, vol. 5, edited by Rehm and H.J, Reed, G. Weinheim: Verlag Chemie. pp. 81-163.

- Langdon, Q.K., Peris, D., Baker, E.P., Opulente, D.A., Nguyen, H.V., Bond, U., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Libkind, D., Hittinger, C.T. (2019). Fermentation innovation through complex hybridization of wild and domesticated yeasts. *Nat. Ecol. Evol.* 3: 1576-1586.
- Langkjaer, R.B., Casaregola, S., Ussery, D.W., Gaillardin, C., Piskur, J. (2003). Sequence analysis of three mitochondrial DNA molecules reveals interesting differences among *Saccharomyces* yeasts. *Nucleic Acids Res.* 31: 3081-3091.
- Larochelle, M., Drouin, S., Robert, F., Turcotte, B. (2006). Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production. *Mol Cell Biol.* 26: 6690-6701.
- Lecrenier, N., Foury, F. (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene.* 246: 37-48.
- 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.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., Heitman, J. (2010). The Evolution of Sex: a Perspective from the Fungal Kingdom. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 298-340.
- Legros, F., Lombès, A., Frachon, P., Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4343-4354.
- Lewandowska, A., Macfarlane, J., Shaw, J.M. (2013). Mitochondrial association, protein phosphorylation, and degradation regulate the availability of the active Rab GTPase Ypt11 for mitochondrial inheritance. *Mol. Biol. Cell.* 24: 1185-1195.
- 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.
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M. (2011). Microbe domestication and the identification of wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (108): 14539-14544.
- Liming, Y., Yuanbo, Q., Derek, R., Lei, L., Kelly, S., Jinghua, Z., Caiting, Y., Lijie, W., Reta, S., Melissa, W., Zhiyong, L., Zihe, R., Jodi, N., Junjie, H. (2020). Structural analysis of a trimeric assembly of the mitochondrial dynamin-like GTPase Mgm1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 117: 4061-4070.
- Ling, F., Shibata, T. (2002). Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *EMBO. J.* 21: 4730-4740.
- Ling, F., Shibata, T. (2004). Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial homoplasmic cells. *Mol. Biol. Cell.* 15: 310-322.

- Ling, F., Hori, A., Shibata, T. (2007). DNA recombination-initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [rho-] mitochondrial DNA that contains the replication origin ori5. *Mol. Cell. Biol.* 27: 1133-1145.
- Ling, F., Hori, A., Yoshitani, A., Niu, R., Yoshida, M., Shibata, T. (2013). Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break-induced replication and recombination of mtDNA at ori5 in yeast. *Nucleic Acids Res.* 41: 5799-5816.
- Liti, G., Barton, D.B., Louis, E.J. (2006). Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*. 174: 839-50.
- Liu, B., Larsson, L., Franssens, V., Hao, X., Hill, S.M., Andersson, V., Höglund, D., Song, J., Yang, X., Öling, D., Grantham, J., Winderickx, J., Nyström, T. (2011). Segregation of protein aggregates involves actin and the polarity machinery. *Cell*. 147: 959-961.
- Lockshon, D., Zweifel, S.G., Freeman-Cook, L.L., Lorimer, H.E., Brewer, B.J., Fangman, W.L. (1995). A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast. *Cell*. 81: 947-955.
- Lopandic, K., Gangl, H., Wallner, E., Tscheik, G., Leitner, G., Querol, A., Borth, N., Breitenbach, M., Prillinger, H., Tiefenbrunner, W. (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.
- Louis, E.J. (2011). Population genomics and speciation in yeasts. *Fungal Biol. Rev.* 25: 136-142.
- 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.
- MacAlpine, D.M., Perlman, P.S., Butow, R.A. (1998). The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6739-6743.
- MacAlpine, D.M., Perlman, P.S., Butow, R.A. (2000). The numbers of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway. *EMBO. J.* 19: 767-775.
- MacAlpine, D.M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R.A., Perlman, P.S. (2001). Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20: 1807-1817.
- Maleszka, R., Skelly, P.J., Clark-Walker, G.D. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO. J.*, 10: 3923-3929.
- 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.

- Masneuf, I., Hansen J., Groth C., Piskur J., Dubourdiou D. (1998). New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3887-92.
- Mathias, J.R., Hanlon, S.E., O'Flanagan, R.A., Sengupta, A.M., Vershon, A.K. (2004). Repression of the yeast *HO* gene by the MATalpha2 and MATa1 homeodomain proteins. *Nucleic. Acids. Res.* 32: 6469-6478.
- Matsui, Y. Polarized distribution of intracellular components by class V myosins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Rev. Cytol.* 229: 1-42.
- May, A.I., Devenish, R.J., Prescott, M. (2012). The many faces of mitochondrial autophagy: making sense of contrasting observations in recent research. *Int. J. Cell. Biol.* 2012: 431684.
- Mayr, E. (1940). Speciation phenomena in birds. *Am. Nat.* 74: 249-278.
- Mazat, J-P., Jean-Bart, E., Rigoulet, M., Guérin, B. (1986). Control of oxidative phosphorylations in yeast mitochondria. Role of the phosphate carrier. *Biochim. Biophys. Acta. – Bioenergetics.* 849: 7-15.
- McFaline-Figueroa, J.R., Vevea, J., Swayne, T.C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I.R., Pon, L.A. (2011). Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging cell.* 10: 885-895.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science.* 305: 1747-1752.
- Mieczkowski, P.A., Fikus, M.U., Ciesla, Z. (1997). Characterization of a novel DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *DIN7*, which is a structural homolog of the *RAD2* and *RAD27* DNA repair genes. *Mol. Gen. Genet.* 253: 655-665.
- Miller-Fleming, L., Giorgini, F., Outeiro, T.F. (2008). Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol. J.* 3: 325-338.
- Miyakawa, I., Sando, N., Kawano, S., Nakamura, S., Kuroiwa, T. (1987). Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* 88: 431-439.
- Miyakawa, I., Kanayama, M., Fujita, Y., Sato, H. (2010). Morphology and protein composition of the mitochondrial nucleoids in yeast cells lacking Abf2p, a high mobility group protein. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 56: 455-464.
- Modi, S.R., Hämäläinen, R.H. (2020). iPSCs for modeling mtDNA diseases. *Advances in Stem Cell Biology.* 1: 47-70.
- Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 675-687.

- Monerawela, C., Bond, U. (2018). The hybrid genomes of *Saccharomyces pastorianus*: A current perspective. *Yeast*. 35: 39-50.
- Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J. (2011). 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge: Cambridge University Press.
- Moreno, J.I., Buie, K.S., Price, R.E., Piva, M.A. (2009). Ccm1p/Ygr150cp, a pentatricopeptide repeat protein, is essential to remove the fourth intron of both *COB* and *COX1* pre-mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr .Genet*. 55: 475-484.
- Mortimer, P.K., Hawthorne, D. (1966). Genetic mapping in *Saccharomyces*. *Genetics*. 53: 165-173.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell. Biol.* 151: 367-380.
- Muller, L.A., McCusker, J.H. (2009). A multispecies-based taxonomic microarray reveals interspecies hybridization and introgression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS.Yeast. Res.* 9: 143-52.
- Murakami, C., Kaeberlein, M. (2009). Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells. *J. Vis. Exp.* 27: e1156.
- Murley, A., Lackner, L.L., Osman, C., West, M., Voeltz, G.K., Walter, P., Nunnari, J. (2013). ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife*. 2: e00422.
- Murray, A.W., Schultes, N.P., Szostak, J.W. (1986). Chromosome length controls mitotic chromosome segregation in yeast. *Cell*. 45: 529-536.
- Naseeb, S., James, S.A., Alsammar, H., Michaels, C.J., Gini, B., Nueno-Palop, C., Bond, C.J., McGhie, H., Roberts, I.N., Delneri, D. (2017). *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 2046-2052.
- Nasheuer, H.P., Smith, R., Bauerschmidt, C., Grosse, F., Weisshart, K. (2002). Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 41-94.
- Naumov, G.I. (1987). Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts. *Stud. Mycol.* 30: 469-475.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Lantto, R.A., Louis, E.J., Korhola, M. (1992). Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. *Yeast*. 8: 599-612.

- Naumov, G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J., Roberts, I.N. (2000a). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Pt 5: 1931-42.
- Newman, S.M., Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P.S., Butow, R.A. (1996). Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG box protein Abf2p. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 386-93.
- Nguyen, H.V., Gaillardin, C. (1997). Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the Non-Transcribed Spacer 2 in the ribosomal DNA unit. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 268-294.
- Nguyen, H.V., Lepingle, A., Gaillardin, C. (2000). Molecular Typing Demonstrates Homogeneity of *Saccharomyces uvarum* Strains and Reveals the Existence of Hybrids between *Su* and *Sc*, Including the *S. bayanus* Type Strain CBS 380. *System. Appl. Microbiol.* 23: 71-85.
- 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.
- Nguyen, H.V., Legras, J., Neuvéglise, C., Gaillardin, C. (2011). Deciphering the hybridisation history leading to the lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC1948 and CBS380. *PloS One.* 6: e25821.
- Nulton-Persson, A.C., Szweda, L.I. (2001). Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 276: 23357-23361.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell.* 8: 1233-1242.
- O'Connor-Cox, E.S.C., Lodolo, E.J., Axcell, B.C. (1996). Mitochondrial Relevance To Yeast Fermentative Performance: A Review. *J. Inst. Brew.* 102: 19-25.
- Origone, A.C., Rodríguez, M.E., Oteiza, J.M., Querol, A., Lopes, C.A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum* hybrids generated under different conditions share similar winemaking features. *Yeast.* 35: 157-171.
- O'Rourke, T.W., Doudican, N.A., Mackereth, M.D., Doetsch, P.W., Shadel, G.S. (2002). Mitochondrial dysfunction due to oxidative mitochondrial DNA damage is reduced through cooperative actions of diverse proteins. *Mol. Cell. Biol.* 22: 4086-93.

- Osman, C., Noriega, T.R., Okreglak, V., Fung, J.C., Walter, P. (2015). Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112: e947-956.
- Ozeir, M., Cohen, M.M. (2022). From dynamin related proteins structures and oligomers to membrane fusion mediated by mitofusins. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1863: 148913.
- Paliwal, S., Fiumera, A.C., Fiumera, H.L. (2014). Mitochondrial-Nuclear Epistasis Contributes to Phenotypic Variation and Coadaptation in Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 198: 1251-1265.
- Parikh, V.S. Morgan, M.M., Scott, R., Clements, L.S., Butow, R.A. (1987). The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast . *Science.* 235: 576-580.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brèthes, D., di Rago, J-P., Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO. J.* 21: 221-230.
- Pernice, W.M., Vevea, J.D., Pon, L.A. (2016). A role for Mfb1p in region-specific anchorage of high-functioning mitochondria and lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Commun.* 7: 10595.
- Pernice, W.M., Swayne, T.C., Boldogh, I.R., Pon, L.A. (2018). Mitochondrial Tethers and Their Impact on Lifespan in Budding Yeast. *Front. Cell Dev. Biol.* 5: 120.
- Petes, T.D., (2001). Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat. Rev. Genet.* 2: 360-369.
- 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.
- Philippsen, P., Stotz, A., Scherf, C. (1991). DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 194: 169-182.
- Picazo, C., Gamero-Sandemetrio, 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.
- Pozniakovsky, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., Severin, F.F. (2005). Role of mitochondria in the pheromone- and amidarone-induced programmed death of yeast. *J. Cell Biol.* 168: 257-269.
- Prasai, K., Robinson, L.C., Scott, R.S., Tatchell, K., Harrison, L. (2017). Evidence for double-strand break mediated mitochondrial DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 45: 7760-7773.

- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F.M., di Rago, J.P., Martinou, J.C. (2005). Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ.* 12: 1613-1621.
- Puchta, O., Lubas, M., Lipinski, K.A., Piatkowski, J., Malecki, M., Golik, P. (2010). *DMR1 (CCM1/YGR150C)* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an RNA-binding protein from the pentatricopeptide repeat family required for the maintenance of the mitochondrial 15S ribosomal RNA. *Genetics.* 184: 959-973.
- Pulvirenti, A., Nguyen, H.V., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S., Zambonelli, C. (2000a). *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 192: 1991-196.
- Rafelski, S.M., Viana, M.P., Zhang, Y., Chan, Y.H., Thorn, K.S., Yam, P., Fung, J.C., Li, H., Costa, L.F., Marshall, W.F. (2012). Mitochondrial network size scaling in budding yeast. *Science.* 338: 822-824.
- Rafelski, S.M. (2013). Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC. Biol.* 11: 71.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Tini, V., Castellari, L., Giudici, P. (1999). Oenological properties of an interspecific *Saccharomyces* hybrid. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* (20): 47-52.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y. (2003). *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, genetic diversity and evolution. *J. Biosci. Bioeng.* 96: 1-9.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 20150-20155.
- Rigoulet, M., Guerin, B., Denis, M. (1987). Modification of flow-force relationships by external ATP in yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 168: 275-279.
- Rinaldi, T., Dallabona, C., Ferrero, I., Frontali, L., Bolotin-Fukuhara, M. (2010). Mitochondrial diseases and the role of the yeast models. *FEMS. Yeast Research.* 8: 1006-1022.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Guillamón, J.M., Salazar, A., Barrio, E. (2011). Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 2292-2302.
- Sampaio, J.P., Gonçalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2144-52.
- Sampaio, J.P. (2018). Microbe Profile: *Saccharomyces eubayanus*, the missing link to lager beer yeasts. *Microbiology.* 164: 1069-1071.
- Sanders, J.P.M., Borst, P., Weijers, P.J. (1975). The organization of genes in yeast mitochondrial DNA II. The physical map of EcoRI and HindII+ III fragments. *MGG.* 143: 53-64.

- Scannell, D.R., Zill, O.A., Rokas, A., Payen, C., Dunham, M.J., Eisen, M.B., Rine, J., Johnston, M., Hittinger, C.T. (2011). The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics: New Genome Sequences and Strain Resources for the *Saccharomyces sensu stricto* Genus. *G3 (Bethesda)*. 1: 11-25.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L., Vale, R.D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 11429-11434.
- Sesaki, H., Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell. Biol.* 147: 699-706.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Hobbs, A.E.A., Jensen, R. E. (2003). Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308: 276-283.
- Shaw, J.M., Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends. Cell. Biol.* 12:178-84.
- Shen, L., Wang, Y.T., Tang, X.X., Zhang, K., Wang, P. M., Sui, Y., Zheng, D. Q. (2020). Heat shock drives genomic instability and phenotypic variations in yeast. *AMB. Expr.* 10: 146.
- Sherratt D.J., Søballe, B., Barre, F.X., Filipe, S., Lau, I., Massey, T., Yates, J. (2004). Recombination and chromosome segregation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359: 61-69.
- Shima, J., Ando, A., Takagi, H. (2008). Possible roles of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and mitochondrial function in tolerance to air-drying stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *Yeast*. 25: 179-190.
- Shutt, T., Geoffrion, M., Milne, R., McBride, H.M. (2012). The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.* 13: 909-915.
- Sinclair, D.A., Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell*. 91: 1033-1042.
- Sipiczki, M., Ferenczy, L. (1977). Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating type. *Mol. Gen. Genet.* 151: 77-81.
- Sipiczki, M. (2008). Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS. Yeast. Res.* 8: 996-1007.
- Sipiczki, M. (2011). Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome - a review. *Ann. Microbiol.* 61: 85-93.
- Sipiczki M. (2018). Interspecies Hybridisation and Genome Chimerisation in *Saccharomyces*: Combining of Gene Pools of Species and Its Biotechnological Perspectives. *Front. Microbiol.* 9: 3071.

- Smith, D.L., Johnson, A.D. (1992). A molecular mechanism for combinatorial control in yeast: MCM1 protein sets the spacing and orientation of the homeodomains of an alpha 2 dimer. *Cell*. 68: 133-142.
- 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.
- Solieri, L. (2010). Mitochondrial inheritance in budding yeasts: towards an integrated understanding. *Trends Microbiol*. 18: 521-530.
- Spokoini, R., Moldavski, O., Nahmias, Y., England, J.L., Schuldiner, M., Kaganovich, D. (2012). Confinement to organelle-associated inclusion structures mediates asymmetric inheritance of aggregated protein in budding yeast. *Cell Rep*. 2: 738-747.
- Steinmetz, L., Scharfe, C., Deutschbauer, A. Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J., Davis, R.W. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat. Genet*. 31: 400-404.
- Strathern, J.N., Hicks, J., Herskowitz, I. (1981). Control of cell type in yeast by the mating type locus. The alpha 1-alpha 2 hypothesis. *J. Mol. Biol*. 147: 357-372.
- Strathern, J.N., Klar, A.J., Hicks, J.B., Abraham, J.A., Ivy, J.M., Nasmyth, K.A., McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the *MAT* locus. *Cell*. 31: 183-192.
- Suh, S.O., Blackwell, M., Kurtzman, C.P., Lachance, M.A. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 98: 1006-17.
- Swayne, T.C., Zhou, C., Boldogh, I.R., Charalel, J.K., McFaline-Figueroa, J.R., Thoms, S., Yang, C., Leung, G., McInnes, J., Erdmann, R., Pon, L.A. (2011). Role for cER and Mmr1p in anchorage of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Curr. Biol*. 21: 1994-1999.
- Taanman, J.W., Capaldi, R.A. (1992). Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme. *J. Biol. Chem*. 267: 22481-22485.
- Tatchell, K., Nasmyth, K.A., Hall, B.D., Astell, C., Smith, M. (1981). In vitro mutation analysis of the mating-type locus in yeast. *Cell*. 27: 25-35.
- Tieu, Q., Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol*. 151: 353-366.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K., Nunnari, J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol*. 158: 445-452.
- Torija, M., Jesús Rozés, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol*. 80: 47-53.
- Török, T., Rockhold, D., King, A.D. (1993). Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. *Int. J. Food Microbiol*. 19: 63-80.

- 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.
- Turk, E.M., Das, V., Seibert, R.D., Andrulis, E.D. (2013). The mitochondrial RNA landscape of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 8: e78105.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., Shirihai, O.S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27: 433-446.
- Van Dyck, E., Clayton, D.A. (1998). Transcription-dependent DNA transactions in the mitochondrial genome of a yeast hypersuppressive petite mutant. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2976-2985.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1987). Three newly delimited species of *Saccharomyces* sensu stricto. *Antonie van Leeuwenhoek.* 53: 77-84.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1993). A taxonomic key to the genus *Saccharomyces*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 113-119.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1998). *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn, edited by Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. Amsterdam: Elsevier. pp. 358-371.
- Vaughan-Martini A., Martini A. (2011). *Saccharomyces* meyen ex Reess (1870). In *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 5th edn, edited by Lodder, J. Amsterdam: Elsevier. pp. 733-746.
- Velours, J., Dautant, A., Salin, B., Sagot, I., Brèthes, D. (2009). Mitochondrial F1F0-ATP synthase and organellar internal architecture. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41: 1783-1789.
- Vevea, J.D., Swayne, T.C., Boldogh, I.R., Pon, L.A. (2014). Inheritance of the fittest mitochondria in yeast. *Trends. Cell Biol.* 24: 53-60.
- 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.
- Vezinhet, F., Blondin, B., Hallet, J-N. (1990). Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 568-571.
- de Vries, A.R.G., Pronk, J.T., Daran, J-M.G. (2019). Lager-brewing yeasts in the era of modern genetics. *FEMS. Yeast. Res.* 19: foz063

- de Vries, A.R.G., Voskamp, M.A., van Aalst, A.C.A., Kristensen, L.H., Jansen, L., van den Broek, M., Salazar, A.N., Brouwers, N., Abeel, T., Pronk, J.T., Daran, J.G. (2019). Laboratory Evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* × *S. eubayanus* Hybrid Under Simulated Lager-Brewing Conditions. *Front. Genet.* 10: 242.
- Vu, D., Groenewald, M., Szőke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., de Vries, M., Verkleij, G.J., Crous, P.W., Boekhout, T., Robert, V. (2016). DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Stud. Mycol.* 85: 91-105.
- Wang, X., Haber, J.E. (2004). Role of *Saccharomyces* single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair. *PLoS Biol.* 2: 104-111.
- Wang S-A., Bai, F-Y. (2008). *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 510-4.
- Wang, Y., Lo, W-C., Chou, C-S. (2017). A modeling study of budding yeast colony formation and its relationship to budding pattern and aging. *PLoS Comput. Biol.* 13: e1005843.
- Westermann, B. (2014). Mitochondrial inheritance in yeast. *BBA-Bioenergetics.* 7: 1039-1046.
- 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.
- Wilson, A., Xu, J. (2012). Mitochondrial inheritance: diverse patterns and mechanisms with an emphasis on fungi. *Mycology.* 3: 158-166.
- Wolters, J.F., Charron, G., Gaspary, A., Landry, C.R., Fiumera, A.C., Fiumera, H.L. (2018). Mitochondrial Recombination Reveals Mito-Mito Epistasis in Yeast. *Genetics.* 209: 307-319.
- Wu, X., Haber, J.E. (1996). A 700 bp *cis*-acting region controls mating-type dependent recombination along the entire left arm of yeast chromosome III. *Cell.* 87: 277-285.
- Wu, C., Weiss, K. Yang, C., Harris, M.A., Tye, B-K., Newlon, C.S., Simpson, R.T., Haber, J.E. (1998). Mcm1 regulates donor preference controlled by the recombination enhancer in *Saccharomyces* mating-type switching. *Genes Dev.* 12: 1726-1737.
- Xu, J., Li, H. (2015). Current perspectives on mitochondrial inheritance in fungi. *Cell Health and Cytoskeleton.* 7: 143-154.
- van Werven, F.J., Amon, A. (2011). Regulation of entry into gametogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 366.
- Weth, G., Michaelis, G. (1974). The size of mitochondrial DNA from a cytoplasmic *Petite* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 135: 269-272.

- Yaffe, M.P. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science*. 283: 1493-1497.
- Yan, L., Qi, Y., Ricketson, D., Li, L., Subramanian, K., Zhao, J., Yu, C., Wu, L., Sarsam, R., Wong, M., Lou, Z., Rao, Z., Nunnari, J., Hu, J. (2020). Structural analysis of a trimeric assembly of the mitochondrial dynamin-like GTPase Mgm1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117: 4061-4070.
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T., Shimizu, H. (2011). Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 28: 349-361.
- de Zamaroczy, M., Marotta, R., Faugeron-Fonty, G., Goursot, R., Mangin, M., Baldacci, G. Bernardi, G. (1981). The origins of replication of the yeast mitochondrial genome and the phenomenon of suppressivity. *Nature*. 292: 75-78.
- de Zamaroczy, M., Bernardi, G. (1986). The GC clusters of the mitochondrial genome of yeast and their evolutionary origin. *Gene*. 41: 1-22.
- Zassenhaus, H.P., Martin, N.C., Butow, R.A. (1984). Origins of transcripts of the yeast mitochondrial *var1* gene. *J. Biol. Chem.* 259: 6019–6027.
- Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P.S., Butow, R.A. (1995). An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *EMBO. J.* 14: 3268-3276.
- Zolan, M.E. (1995). Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol. Reviews*. 59: 686-698.

## 10. Függelék

### 10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

**Szabó, A.**, Antunovics, Z., Karanyicz, E., Sipiczki, M. (2020). Diversity and Postzygotic Evolution of the Mitochondrial Genome in Hybrids of *Saccharomyces* Species Isolated by Double Sterility Barrier. *Front. Microbiol.* 11: 838. (Impakt faktor: 5,6)

Sipiczki, M., Antunovics, Z., **Szabo, A.** (2020). *MAT* heterozygosity and the second sterility barrier in the reproductive isolation of *Saccharomyces* species. *Curr. Genet.* 5: 957-969. (Impakt faktor: 3,89)

Antunovics, Z., **Szabo, A.**, Heistinge, L., Mattanovich, D., Sipiczki, M. (2023). Synthetic two-species allodiploid and three-species allotetraploid *Saccharomyces* hybrids with euploid (complete) parental subgenomes. *Sci. Rep.* 1: 1112. (Impakt faktor: 4,99)



