



*Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces uvarum*  
interspecifikus  
fertilis hibridjének és néhány utódnemzedékének molekuláris  
genetikai vizsgálata

Antunovics Zsuzsa

Doktori (Ph.D) értekezés

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Kar  
Debrecen, 2005

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Tartalomjegyzék</b>                                                                               | <b>5</b>  |
| <b>2. Bevezetés és célkitűzés</b>                                                                       | <b>9</b>  |
| <b>3. Irodalmi áttekintés</b>                                                                           | <b>13</b> |
| 3.1. A <i>Saccharomyces</i> genus                                                                       | 13        |
| 3.1.1. A <i>Saccharomyces</i> 'sensu stricto' csoport                                                   |           |
| <i>S. cerevisiae</i> és <i>S. uvarum</i>                                                                | 15        |
| 3.2. Steril interspecifikus <i>Saccharomyces</i> hibridek a természetből                                | 22        |
| 3.3. Interspecifikus <i>Saccharomyces</i> hibridek a laboratóriumból-<br>biotechnológiai felhasználásuk | 25        |
| <b>4. Anyagok és módszerek</b>                                                                          | <b>30</b> |
| 4.1. Alkalmazott plazmid                                                                                | 30        |
| 4.2. Törzsek és táptalajok                                                                              | 30        |
| 4.2.1. Felhasznált törzsek                                                                              | 30        |
| 4.2.2. Alkalmazott tápközegek                                                                           | 31        |
| 4.3. Alkalmazott oldatok                                                                                | 33        |
| 4.4. Kísérleti módszerek                                                                                | 35        |
| 4.4.1. Élesztők izolálása erjedő mustból                                                                | 35        |
| 4.4.2. Élesztő törzsek taxonómiai azonosítása                                                           | 35        |
| 4.4.3. Auxotróf mutánsok izolálása                                                                      | 36        |
| 4.4.4. Molekuláris markerek                                                                             | 36        |
| 4.4.5. Interspecifikus keresztezés és hibridizolálás                                                    | 37        |
| 4.4.6. Spórázás vizsgálata                                                                              | 38        |
| 4.4.7. Tetrádanalízis                                                                                   | 38        |
| 4.4.8. Az utódnemzedékek vizsgálata                                                                     | 39        |
| 4.4.9. Asszimilációs és fermentációs vizsgálatok                                                        | 39        |
| 4.4.10. Geneticin-érzékenység vizsgálata                                                                | 40        |
| 4.4.11. Genomiális DNS tisztítása                                                                       | 40        |
| 4.4.12. PCR                                                                                             | 41        |

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.13. PCR-RFLP                                                       | 41        |
| 4.4.14. mtDNS-RFLP                                                     | 43        |
| 4.4.15. Pulzáló erőterű gélelektroforézis                              | 44        |
| 4.4.16. Southern transzfer és Southern hibridizálás                    | 45        |
| 4.4.17. Szekvenálás és szekvencia analízis                             | 46        |
| <b>5. Eredmények</b>                                                   | <b>48</b> |
| 5.1. A keresztezéshez használt szülői törzsek izolálása és jellemzése  | 48        |
| 5.2. Mutánsizolálás és hibridizolálás                                  | 48        |
| 5.3. A hibrid és utódnemzedékének vizsgálata                           | 50        |
| 5.3.1. A hibrid és a keresztezéshez használt szülők vizsgálata         | 51        |
| 5.3.1.1. Növekedési és fermentációs tesztek                            | 51        |
| 5.3.1.2. Geneticin-érzékenység vizsgálata                              | 52        |
| 5.3.1.3. CHEF elektrokariotipizálás és Y'-próba                        | 54        |
| 5.3.1.4. <i>MET2</i> PCR-RFLP                                          | 57        |
| 5.3.1.5. <i>ITS1</i> -5,8S rDNS- <i>ITS2</i> PCR-RFLP                  | 58        |
| 5.3.1.6. <i>NTS2</i> PCR-RFLP                                          | 59        |
| 5.3.1.7. <i>HIS4</i> PCR-RFLP                                          | 60        |
| 5.3.1.8. <i>YCL008c</i> PCR-RFLP                                       | 60        |
| 5.3.1.8. <i>URA3</i> <sub>uva</sub> PCR                                | 61        |
| 5.3.1.9. <i>URA3</i> <sub>cer</sub> PCR                                | 64        |
| 5.3.1.10. <i>LEU2</i> PCR                                              | 64        |
| 5.3.1.11. <i>MET10</i> PCR                                             | 66        |
| 5.3.1.12. mtDNS-RFLP                                                   | 66        |
| 5.3.2. Az első utódnemzedék vizsgálata                                 | 67        |
| 5.3.2.1. Növekedési és fermentációs tesztek<br>az első utódnemzedékben | 67        |
| 5.3.2.2 CHEF elektrokariotipizálás és Y'-próba                         | 70        |
| 5.3.2.3. <i>MET2</i> PCR-RFLP                                          | 71        |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3.2.4. <i>ITS1</i> -5,8S rDNA- <i>ITS2</i> PCR-RFLP                            | 72 |
| 5.3.2.5. <i>NTS2</i> PCR-RFLP                                                    | 73 |
| 5.3.2.6. <i>HIS4</i> PCR-RFLP                                                    | 73 |
| 5.3.2.7. <i>YCL008c</i> PCR-RFLP                                                 | 74 |
| 5.3.2.8. <i>URA3</i> uva PCR                                                     | 75 |
| 5.3.2.9. <i>URA3</i> cer PCR                                                     | 75 |
| 5.3.2.10. <i>MET10</i> PCR                                                       | 76 |
| 5.3.3. A második utódnemzedék vizsgálata                                         | 77 |
| 5.3.3.1. Növekedési és fermentációs tesztek<br>a második utódnemzedéken          | 77 |
| 5.3.3.2. CHEF elektrokariotipizálás, Y'-próba                                    | 78 |
| 5.3.3.3. <i>MET2</i> PCR-RFLP                                                    | 80 |
| 5.3.3.4. <i>ITS1</i> -5,8S rDNA- <i>ITS2</i> PCR-RFLP                            | 80 |
| 5.3.3.5. <i>HIS4</i> PCR-RFLP                                                    | 81 |
| 5.3.3.6. <i>YCL008c</i> PCR-RFLP                                                 | 81 |
| 5.3.3.7. <i>URA3</i> uva PCR                                                     | 82 |
| 5.3.3.8. <i>URA3</i> cer PCR                                                     | 82 |
| 5.3.3.9. <i>MET10</i> PCR                                                        | 83 |
| 5.3.4. A harmadik és negyedik utódnemzedék vizsgálata                            | 83 |
| 5.3.4.1. Növekedési és fermentációs tesztek<br>a harmadik és negyedik nemzedéken | 84 |
| 5.3.4.2. CHEF elektrokariotipizálás, Y'-próba                                    | 84 |
| 5.3.4.3. <i>MET2</i> PCR-RFLP                                                    | 86 |
| 5.3.4.4. <i>ITS1</i> -5,8S rDNA- <i>ITS2</i> PCR-RFLP                            | 86 |
| 5.3.4.5. <i>HIS4</i> PCR-RFLP                                                    | 87 |
| 5.3.4.6. <i>YCL008c</i> PCR-RFLP                                                 | 87 |
| 5.3.4.7. <i>URA3</i> uva PCR                                                     | 88 |
| 5.3.4.8. <i>URA3</i> cer PCR                                                     | 88 |

|                                                                          |            |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3.4.9. <i>MET10</i> PCR                                                | 88         |
| 5.4. A vizsgált utódnemzedékek összehasonlítása                          | 89         |
| 5.4.1. Növekedési és fermentációs tesztek                                | 89         |
| 5.4.2. CHEF elektrokariotipizálás, Y'-próba                              | 90         |
| 5.4.3. Molekuláris markerek a különböző kromoszómákon<br>(PCR, PCR-RFLP) | 93         |
| <b>6. Az eredmények megbeszélése</b>                                     | <b>96</b>  |
| <b>7. Összefoglalás</b>                                                  | <b>110</b> |
| <b>8. Summary</b>                                                        | <b>114</b> |
| <b>9. Köszönetnyilvánítás</b>                                            | <b>117</b> |
| <b>10. Irodalomjegyzék</b>                                               | <b>118</b> |
| <b>11. A doktori munka során megjelent publikációk</b>                   | <b>131</b> |

## 2. Bevezetés és célkitűzés

Történészek szerint a borkészítés egyidős az emberi civilizációval: a kaukázusi és mezopotámiai kultúrákban már bizonyosan készítettek bort és az egyiptomi és föníciai régészeti leletek között is találtak borkészítésre való utalásokat Kr.e.: 5000-ból. Majd Kr.e.: 2000-től már Krétán és Görögország más területein is elterjedtek a borok. A Római birodalom terjedésével pedig szinte egész Európába, így hazánkba is eljutott a szőlészet-borászat.

Az elmúlt 150 év során nagyon sokat megtudtunk a mustok borrá való erjedésének biokémiai folyamatairól. 1863-ban Louis Pasteur írta le először az élesztők, mint fermentációért felelős mikroorganizmusok szerepét, melyek glükózból és fruktózból alkoholt, szén-dioxidot és egyéb kisebb - de a bor minősége szempontjából lényeges - metabolitokat állítanak elő.

Az élesztők nagy része a szőlőről és a szüreti,- valamint a pincészetben használatos munkaeszközökről kerül a mustokba (Pretorius, 2000; Mortimer és Polsinelli, 1999). Az erjesztés kezdeti fázisában a szőlőszemekről származó *Kloeckera*, *Hanseniaspora* és *Candida* fajok dominanciája a jellemző (Bisson és Kunkel, 1993; Cocolin és mtsi., 2000), az alkohol koncentrációjának 3-5%-ra való növekedésével azonban a *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* és *Pichia* fajok kerülnek előtérbe. A fermentáció második harmadára pedig szinte már csak az alkohol toleráns *Saccharomyces*-fajok maradnak meg (Fleet és Heard, 1993; Schutz és Gafner, 1994) nekik köszönhetően a must fokozatosan borrá válik

Tokaj-hegyalján és más bortermelő vidékeken a hagyományos borászatban a boros gazdák a természetre bízták mustjaik érlelését. A leszüretelt szőlő a présből mustként a pincészetek boros hordóiba került és ott ért borrá, mindenféle további beavatkozás nélkül.

Napjainkban azonban a mustok szárított élesztő-kultúrákkal („starter”) való beoltásával a fermentáció felgyorsítását, az erjedési folyamatok ellenőrizhetővé tételét és befolyásolását érte el a biotechnológia. A különböző starter-élesztőknek stabil genetikai állománnyal kell rendelkezniük, hogy alkalmazásuk során a bor minőségét befolyásoló jellegeik ne változzanak és ugyanazt a megbízható íz-, aroma-, és zamatminőséget produkálják. A borászatban leggyakrabban alkalmazott startereket a *Saccharomyces cerevisiae* és *S. uvarum* élesztőfajok változataiból (törzseiből) állítják elő.

Tokaj-hegyalja pincészeteiből évek óta izolál tanszékünk különböző élesztőfajokat. A *Saccharomyces cerevisiae* mellett a késői erjedési fázisból, illetve a *botrytizált* szőlőkből származó mustokból nagy mennyiségű *Saccharomyces uvarum* törzset is sikerült izolálnunk. Igen valószínű, hogy a jellegzetes „tokaji íz” kialakulásához ez az élesztő is jelentősen hozzájárul. Sikerült a mintavételek során néhány – feltehetőleg - e két faj (*Saccharomyces cerevisiae* és *S. uvarum*) természetes hibridjét is fellelnünk, azonban ezeknek a hibrideknek a további genetikai vizsgálata akadályba ütközött, mivel nem képeztek spórát, vagy nagyon gyengén spóráztak.

Az interspecifikus hibridek előfordulása a természetben evolúciósan nagyon érdekes jelenségnek számít, hiszen néhány ritka kivételtől eltekintve sterilek: a keletkezett kombinált szülői génállomány csupán egyetlen nemzedékbe adódik tovább. De, amellett, hogy egyfajta „luxus”-t

jelentenek a természet részéről, mégis kialakulásuk valószínűleg egy új faj keletkezésének egy lehetséges útja - néhány ezer év során. Az ilyen élesztőhibridek az érdeklődés középpontjába kerültek a modern borászatban is (Zambonelli et al., 1997; Masneuf et al., 2003). Biotechnológiai jelentőségük, hogy a kiválogatott, borászati szempontból nagyon jó tulajdonságokkal bíró élesztőfajok keresztezésével, azok előnyös tulajdonságainak kombinálódásával egy sikerebb erjesztő „hibridfajt” lehet létrehozni, melynek a genetikai állománya is stabil (Caridi et al., 2002).

Célkitűzésünk volt, megpróbálni betekinteni az interspecifikus kereszteződés genetikai hátterébe, ezért elkezdük az említett két élesztőfaj mesterséges keresztezését és a kapott hibridek és utódaik vizsgálatát.

Keresztezési kísérleteinkkel megpróbáltuk feltárni a két, evolúciósan már külön fajként említett *Saccharomyces* élesztőfaj közötti hibrid létrejöttének lehetséges molekuláris hátterét. Kísérleteink érdekessége, hogy a vizsgált *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridünk fertilis utódnemzedéket hozott létre, sőt egészen a negyedik utódnemzedékig nyomon követhettük a generációkat.

Eredményeinkkel ellentmondunk annak a tézisnek, miszerint a *Saccharomyces* genus tagjai egymással való zigótaképzése életképtelen utódokat eredményez (Naumov, 1987; Masneuf és mtsi., 1998; Fisher és mtsi., 2000; Marioni és mtsi., 1999; de Barros Lopez és mtsi., 2002; Zambonelli és mtsi., 1997; Delneri és mtsi., 2003).

Kísérleteink során fajok közötti szabályos rekombinációt mutattunk ki. Alátámasztottnak látszik az a hipotézisünk, miszerint a kapott interspecifikus hibridünk allotetraploid genommal rendelkezik, utódnemzedékei pedig allodiploidok. Ehhez hasonló eredményeket kaptak

Sebastiani és mtsi. (2002) is, egy szintén *S. cerevisiae* x *S. uvarum* interspecifikus hibrid létrehozásakor.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A *Saccharomyces* genus

Az élesztőként emlegetett egysejtű gombák rendszertana nagyon összetett és rengeteg változáson ment át és meg napjainkban is keresztül. A legkorábbi élesztők közötti elkülönítésre tett kísérletek a múlt századba nyúlnak vissza. A Hansen által kezdeményezett elkülönítés alapja az élesztők spóráképzése, illetve a spóráképzés elmaradása volt (Hansen, 1891).

A borászatban hasznos élesztők csoportjával, a *Saccharomyces* genussal foglalkozó első rendszerek között van a Guilliermond-féle rendszerezés, amely szerint a genuson belül 46 fajt találhatunk 6 csoportba sorolva négy kiválasztott monoszacharid és diszacharid fermentációs képesség vizsgálata alapján (Guilliermond, 1912). A napjainkban érvényes definíció szerint egy „faj”-ba sorolt élesztők olyan élőlények csoportja, melyeknek morfológiai, fiziológiai és genetikai jellegük döntő része azonos. Minden fajnál kijelölnek egy „típustörzset”, amit a faj reprezentáns képviselőjének tekintenek. A típustörzseket nemzetközi törzsgyűjteményben tartják fenn, ahonnan megvásárolhatók. Az újonnan izolált élesztők faji hovatartozását úgy határozzák meg, hogy a tulajdonságaikat összehasonlítják a típustörzsek tulajdonságaival. (pl. Lodder és Kregger-Van Rij, 1952).

Az élesztők rendszertanával foglalkozó kutatók a faji identifikálást először morfológiai és fiziológiai jegyek alapján (fenotípusosan) végezték: ilyen a sejt alakja és mérete, spóráképzés, a telep színe és formája, illetve fermentációs és asszimilációs tesztek, növekedési faktorok igénye és cycloheximid-rezisztencia (Lodder és Kregger-Van Rij, 1952; Ribéreau-Gayon és mtsi., 1975).

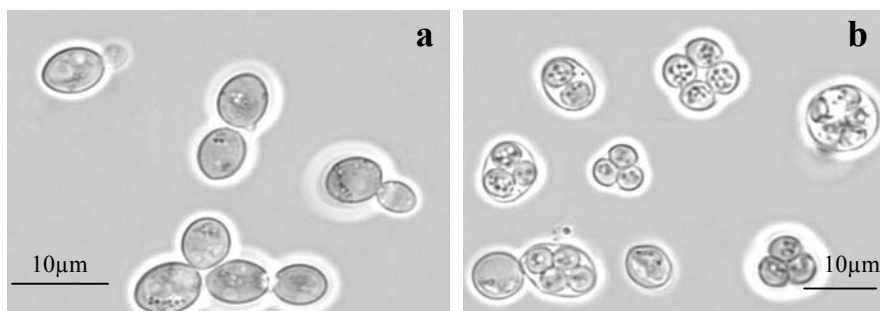
A kezdeti fiziológiás tesztek után tovább tökéletesítették *csak* bizonyos fermentációs, asszimilációs tesztekre, melyek elégségesnek bizonyultak a faji szintű elkülönítésre (Lafon-Lafourcade és Joyeux, 1979; Cuinier és Leveau, 1979). A mai gomba rendszertan az élesztők *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* és *Deuteromycetes* rendjeibe osztja a mintegy 81 nemzetség 590 fajt (Kregger-Van Rij, 1984; Barnett és mtsi., 1990) melyből – szerencsére - a borászatban csupán 15 faj érdekelt érdemben a bor erjesztése, vagy a borhibák kialakulása végett.

Maga a *Saccharomyces* genus is jelentős változtatáson ment keresztül a kezdetektől napjainkig. A kezdetek fenotípusos elemzéseit még 30 fajta sorolták a genusba (Lodder és Kregger-Van Rij, 1952). Yarrow munkája következtében (Yarrow és Nakase, 1975), amikor az élesztők DNS-ének G-C %-os aránya alapján állapították meg a rokonsági viszonyt, ez a szám 7-re csökkent, és 17 azelőtt külön fajba sorolt élesztő került egyazon fajcsoportba (fajba), a *Saccharomyces cerevisiae*-be. Mivel ezt a fajta taxonomizálást sokan túlságosan mesterkéltnek találták, igen megnőtt a faj alatti kategóriák, a variánsok, alfajok és változatok száma, ezzel további nehézségeket okozva a rendszert átlátni kívánó számára.

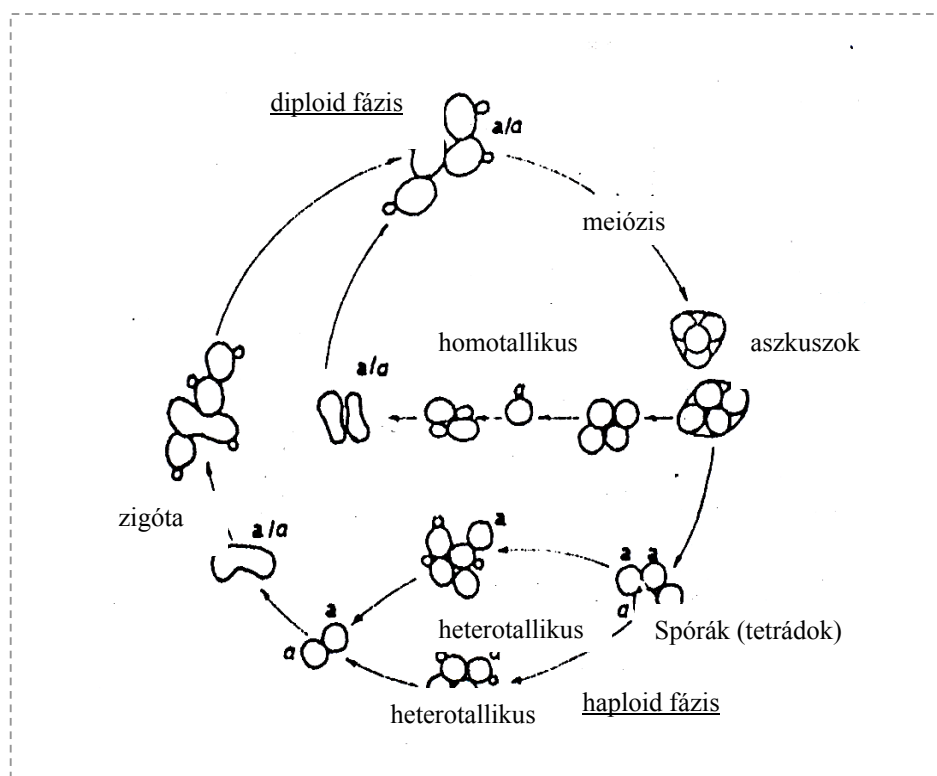
A legutóbbi rendszertani elemzések a genetika (fajok közötti hibridizációs kísérletek, Naumov, 1987) és molekuláris taxonómia (DNS/DNS reasszociációs teszt, Vaughan-Martini és Martini, 1987, Barnett és mtsi., 1990) adta lehetőségeket is felhasználva a *Saccharomyces* genust jól elkülöníthető 'sensu stricto' és egy evolúciósan régebben elvált élesztőket magába foglaló 'sensu lato' csoportokra osztják.

### 3.1.1. A *Saccharomyces* 'sensu stricto' csoport *S. cerevisiae* és *S. uvarum*

A *Saccharomyces* 'sensu stricto' csoport nagyon közel rokon fajokat foglal magában. A csoportba napjainkban a *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* (egy korábbi változatát ma külön fajként emlegetjük: *S. uvarum*), *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* fajokat soroljuk (Barnett, 1992; Vaughan-Martini és Kurtzman, 1985; Pulvirenti és mtsi., 2000). A morfológiájukat tekintve kerekded, ovális vagy citrom alakú, 8-10 $\mu$ m-es sejtek vegetatívan bimbózással szaporodnak (**1. ábra, a**). A bimbók vagy sarjak egyes fajoknál a sejt két végén, másoknál annak bármely részén kialakulhatnak. A természetből izolált törzsek között a diploid állapot a jellemzőbb. A diploidok meiózissal haploid spóráképzésre képesek (4db askospórárt tartalmazó askuszkok: **1. ábra b**), és amennyiben az askuszból kiszabadult spórák egymással konjugálni tudnak (homotallikus tulajdonság), újra visszaáll a diploid állapot. Az askuszkokból kiszabaduló haploid spórákban egy bonyolult, párosodásért felelős géneket tartalmazó lokuszokban történő rekombinációs mechanizmussal kialakulhat a kétféle párosodási típus: a és  $\alpha$  (heterotallikus tulajdonság). A haploid sejtek ugyanúgy bimbózással vegetatív szaporodásra képesek - ekkor haploidok is maradnak - de egymással való párosodással diploid zigótákat is létrehozhatnak (**2. ábra**) (J.F.T. Spencer és D.M. Spencer, 1997).



**1. ábra (a)** Vegetatívan szaporodó *S. cerevisiae* sejtek fénymikroszkópos felvétele. **(b)** *S. cerevisiae* tetraspórás és trispórás aszkuszainak fénymikroszkópos felvétele.



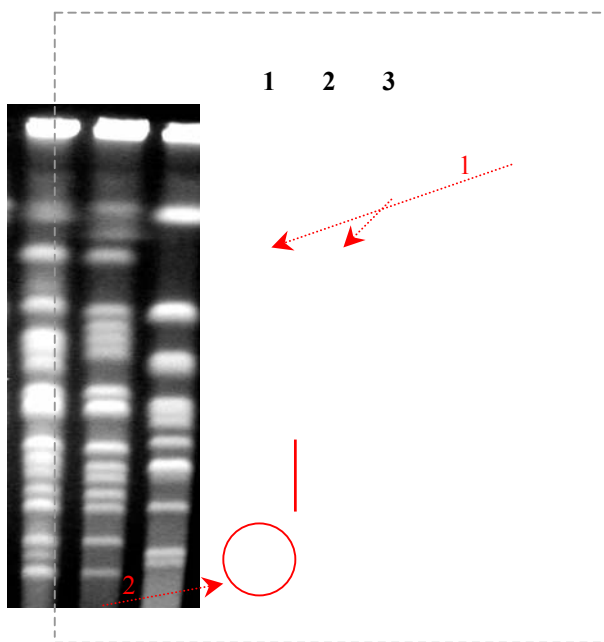
**2. ábra** A *S. cerevisiae* életciklusa. (J.F.T. Spencer és D.M. Spencer, 1997 alapján)

A 'sensu stricto' tagjaiként felsorolt fajok morfológiailag szinte elkülöníthetetlenek egymástól. Alapvető fiziológiás jegyeik is nagyon hasonlóak, illetve sok esetben változataik variabilitása miatt nem egyértelműen összevethetők egymással és a leírt típus törzsekkel. Azonban annyi biztosan elmondható, hogy vitamin mentes SMA (minimál) táptalajon csak a *S. bayanus* és *S. uvarum* fajok, 37°C-on a *S. paradoxus* és *S. cerevisiae* fajok növekednek (Vaughan-Martini és Martini, 1998), melibióz fermentációs képességgel pedig elsősorban a *S. uvarum* törzsei rendelkeznek (Pulvirenti, 2000). A természetből izolált *Saccharomyces* élesztőtörzsek egyértelmű faji identifikálása hagyományos módszerekkel (telep és sejt morfológiai jellemzés, növekedési és fermentációs tesztek) igen könnyen hibás eredményre vezethetnek egyes fiziológiás jelegek változékonysága (Nguyen és mtsi., 2000, Vaughan-Martini és Martini., 1993) miatt. Ezért napjainkban egyre gyakrabban használunk modern molekuláris genetikai technikákat ezen a területen is (Giudici és Pulvirenti, 2002; Sipiczki, 2002; Rainieri és mtsi, 2003).

A csoport identifikálásának elterjedten használatos eszköze a pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogram (Vaughan-Martini és Martini, 1993). A technika segítségével kromoszómákat lehet egymástól méretük alapján elkülöníteni. A kapott elektrokariogramokon a kromoszómák száma és mérete fajra jellemző mintázatot mutat (Cardinali és Martini, 1994; Fisher és mtsi., 2000). Az elektrokariogramokról pedig könnyen nylon membránra juttathatjuk a DNS-t, amin további speciális szekvenciák, gének meglétét mutathatjuk ki Southern-hibridizációs technika segítségével (Sambrook és mtsi., 1989). A 'sensu stricto' csoportban felsorolt fajok kromoszóma mintázata könnyen elkülöníthető a nem-*Saccharomyces* fajokétól (pl. Vaughan-Martini és mtsi., 1993;

Masneuf és mtsi., 1998; Nguyen és mtsi., 2000). Tagjainak jellemzően (legalább) 16 kromoszómája van (pl. Masneuf és mtsi., 1998; Fisher és mtsi., 2000;).

A kromoszómák hossza azonban még egy fajon belül is nagyon változatos lehet, köszönhető ez elsősorban az élesztők körében elterjedt kromoszóma-hossz polimorfizmus jelenségének (Zolan, 1995; Codón és mtsi., 1998; Johnston és Mortimer, 1986). Az iparban használatos élesztőtörzseknél a több generáción keresztüli vegetatív növekedés során is megfigyelhetők különböző kariotípus-változások, tehát a mitózis során történő átrendeződések sem különleges jelenségek az élesztők körében (Longo és Vezinhet, 1993). Mégis a csoporton belül, és egymástól is biztosan elkülöníthető a kevésbé polimorf „*bayanus*-csoport” (*S. uvarum* és *S. bayanus*) az említett technika segítségével (Nguyen és Gaillardin, 1997; Sipiczki és mtsi., 2001). A **3. ábrán** a dolgozatban használt kontroll törzsek pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogramjai láthatók. Piros függőleges vonal jelzi a *S. bayanus*-ra és *S. uvarum*-ra specifikus 5 db kromoszóma jellegzetes elhelyezkedését (370-700kb). Az 1 számmal jelölt kétfelé ágazó nyíl a *S. bayanus* és *S. uvarum*-ra specifikus nagy méretű kromoszómákat jelöli, ebben a mérettartományban *S. cerevisiae* kromoszóma nem található. A 2 számú nyíl pedig a *S. bayanus*-specifikus három darab kromoszómára mutat, a középső kromoszóma a *S. uvarum* esetén hiányzik (245-370kb) (Ryu és mtsi., 1996; Nguyen és Gaillardin, 1997; Sipiczki és mtsi., 2001).

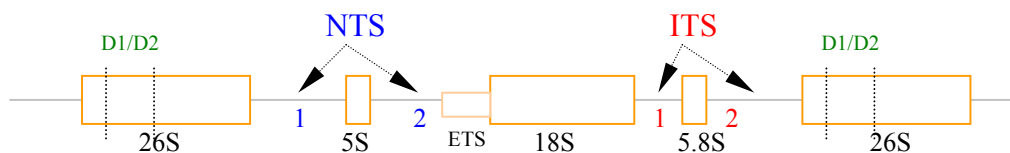


**3. ábra** Pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogram.  
1.: CBS 380 (*S. bayanus*); 2.: CBS395 (*S. uvarum*); 3.: S288c (*S. cerevisiae*).

A DNS/DNS reasszociációs vizsgálatok és a 18S és 26S rDNS részek szekvencia analízise (Kurtzman és Robnett, 1991 és 1998) a legmegbízhatóbb technikák a *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* és *S. pastorianus* fajok egymástól való elkülönítésére. A genetikai technikák, mint a spóra-spóra keresztezés, ami szintén egy elfogadott faji identifikálási és rokonsági fok megállapítására használatos technika (Naumov és mtsi, 1993) és a random spóra - és tetrádanalízis nehezen kivitelezhető technikák, ha a vizsgálandó faj gyengén, vagy egyáltalán nem spórázik (pl.: CBS 380, a *S. bayanus* típustörzse vagy a természetből izolált *S. pastorianus* fajok) (Banno és Kaneko, 1989). Ráadásul e technikák igen időigényesek is. A faji identifikálásnál akkor járunk el helyesen, ha több technikával párhuzamosan vizsgáljuk az izolátumot, így

elkerülhetjük azt, hogy csak bizonyos megvizsgált sajátság alapján soroljuk be élesztőinket az egyik vagy másik típusörzs kategóriájába.

Elsősorban a genotípus analízisével a mai rendszerezés sokkal pontosabb besorolást tesz lehetővé és eljutott a fajon belüli változatokig is. Kutatók kedvelt objektuma az RNS-t kódoló DNS (rDNS), mellyel a nagyon változatosan jelen lévő élesztők és magasabb rendű gombák faji szinten való elkülönítésére is lehetőség nyílt (Baleiras és mtsi., 1995; Johnson és mtsi., 1994; O'Donnel és Gray, 1995; Williams és mtsi., 1995). A megközelítés alapja a rDNS konzervatív mivolta: az egyazon fajhoz tartozó egyedek ugyanazzal, vagy nagyon hasonló szekvenciával rendelkeznek, míg a filogenetikai távolság mértékével az rDNS szekvencia-beli különbség nő. A rDNS NTS2 (non-transcribed spacer sequence; NTS2=IGS2) PCR-RFLP analízise 3 restrikciós endonukleáz használatával elegendő a 'sensu stricto' testvér fajok egymástól való elkülönítésére (Nguyen és Gaillardin, 1997). A rDNS ITS (internal transcribed spacer) PCR-RFLP analízise 2 restrikciós endonukleázzal a *S. bayanus*-*S. pastorianus* páros kivételével szintén alkalmas a csoporton belüli faji identifikálásra (McCullogh és mtsi., 1998). A **4. ábrán** a rDNS egy sematikus szakaszát mutatjuk be, jelölve a faji identifikáláshoz (ribotipizáláshoz) használatos régiókat.



**4. ábra** A faji identifikáláshoz használt rDNS sematikus szakasza, az ITS és NTS régiókkal.

További faji identifikálási alap a mitokondriális DNS vizsgálata. A mtDNS részeinek szekvencia elemzése és mérete (pl.: *S. paradoxus* 75kb, *S. bayanus* 65kb) lehet klasszifikálási alap, illetve a mtDNS restriktációs endonukleázzal való emésztésével kapott fragmentek mintázata is alkalmas erre a célra (Piskur és mtsi., 1995; Piskur és mtsi., 1998; Nguyen és mtsi., 2000). Konjugálás után a zigóta mindkét szülőtől kapott genom- és mitokondriális DNS anyagot tartalmazza, majd a meiózis után a szülői eredetű kromoszómák egyenértékű készletei kerülnek tovább a leánysejtekbe, míg a mtDNS molekulák a 'sensu stricto' x 'sensu stricto' keresztezésekkor csak az egyik szülőtől adódnak tovább, illetve szegregáció előtt még rekombinálódhatnak, ezzel egy új variációt létrehozva (Marioni és mtsi., 1999; Piskur, 1994).

Az említett technikákon túl az egyedi gének szekvencia analízise, illetve restriktációs fragment-hossz analízise segítségével tehetünk még könnyen különbséget *S. cerevisiae* és *S. uvarum* (*S. bayanus*) fajok között. Ilyen pl. a *MET2*; *MET10*; *YCL008c* vagy a *HIS4* (Hansen és Kielland-Brandt, 1994; Casaregola és mtsi., 2001).

A *S. bayanus* és *S. uvarum* törzsek közötti faji szintű elkülönítés napjainkban újra felmerült, noha már a kezdeti taxonómusok is külön fajként említették (Lodder és Kreger van Rij., 1952) őket. Azóta azonban újabb rendszerezők egyetlen törzs, a *S. bayanus* változataként tekintettek a *S. uvarum*-ra (*S. bayanus* var. *uvarum*), mivel mindkettő elsősorban az alacsony hőmérsékleten való édes borok erjesztésekor izolálható nagyobb számban (pl.: Sipiczki és mtsi., 2001) illetve az erjesztés késői, magas alkohol koncentrációval jellemezhető fázisában (pl.: Giudici és mtsi., 1998) és a *botrytizált* szőlőből készült mustokban gyakoriak (pl.: Sipiczki, 2002). Alapvető fiziológiás különbség a két említett törzs között a melibióz fermentációs képesség, mellyel a *S. bayanus* nem rendelkezik, a

*S. uvarum* igen (Pulvirenti és mtsi., 2000). A két törzs között némi különbséget figyelhetünk meg a kariotípusuk alapján, amely egyetlen kis kromoszómát illet: a *S. uvarum* nem rendelkezik azzal a középső kromoszómával, melyet a *S. bayanus*-nál megfigyelhetünk a 245-370kb mérettartományban (**3. ábrán** bekarikázva látható) (Nguyen és Gaillardin, 1997; Sipiczki és mtsi., 2001; Ryu és mtsi., 1996). Ezen kívül nagyon hasonló a két törzs kariotípusa, 13 izomorf kromoszómájuk van. A CBS 380 *S. bayanus* hat kromoszómája hibridizál is *S. uvarum* kromoszómákkal (Nguyen és mtsi., 2000)

Napjainkban bizonyítottá vált a *S. bayanus* hibrid mivolta (Nguyen és mtsi., 2000). Y' hibridizációval a CBS 380, *S. bayanus* típustörzs elektrokariogramjáról készült membránon 4db jelölt kromoszómát láthatunk, ami a kromoszómák *S. cerevisiae* eredetéről árulkodik. A *S. uvarum* esetén nem kapunk ilyen jelölést (Jager és Philipsen, 1989, Codón és mtsi., 1997). Mitokondriális DNS-ük is különbözik egymástól (Nguyen és mtsi., 2000).

Újabban tehát ismét két külön fajként kezeljük a *S. bayanus* és *S. uvarum* élesztőtörzseket (Pulvirenti és mtsi., 2000; Nguyen és mtsi., 2000). A dolgozatban a keresztezéshez felhasznált, erjedő mustból izolált m9 *S. uvarum* törzs identifikálását az utóbbi (Pulvirenti és mtsi., 2000; Nguyen és mtsi., 2000) rendszertani revíziók alapján végeztük.

### 3.2. Steril interspecifikus *Saccharomyces* hibridek a természetben

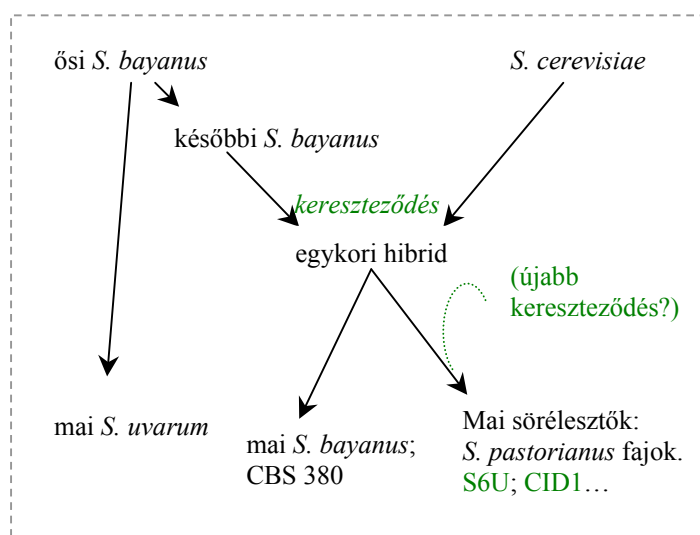
A borok erjesztésénél leggyakrabban izolált élesztő, az erjesztés középső fázisában emelkedett arányban, annak végső fázisa felé csökkenő sejtszámmal jelen lévő *S. cerevisiae*. Mellette az erjedés késői fázisában, illetve a *botrytizált* szőlőből alacsony hőmérsékleten készült édes borok erjedésekor a *S. uvarum* törzsek is nagyobb számban vannak jelen

(Sipiczki és mtsi., 2001; Antunovics és mtsi., 2001; Frezier és Dubordieu, 1992).

Nem túl gyakran ugyan, de előfordulnak a természetben e két élesztő interspecifikus hibridjei is. A „leg híresebbeket”, a S6U törzset erjedő szőlőmustból (Ciolfi, 1994) a CID1 törzset almamustból (Hansen törzsgyűjtemény) izolálták. A későbbi, pulzáló erőterű gélelektroforézis kísérletek során kiderült róluk, hogy kromoszóma számuk 20 fölötti. Elektrokariogramjukat a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* típustörzsek kariogramjaival összehasonlítva a típustörzsek kromoszómáinak komplett keverékét lehetett megfigyelni. *MET2* PCR-RFLP analízisük és *MET2* szekvencia elemzésük is mindkét szülőre jellemző gének jelenlétét erősítette meg. Mitokondriális DNS vizsgálatuk azonban azt sejtették, hogy nem csupán egy egyszeri hibridizálódásról lehetett szó (Masneuf és mtsi., 1998). Meglepetésre a S6U törzs spórázott és közel 100%-os spóra-életképességet mutatott (C. Baccari, J. Gaine és R. Mortimer nem publikált adat). Ez nem jellemző egy interspecifikus hibridre (Naumov, 1996). A kapott spórák azután egymással nem konjugáltak és további spóráztatásuk eredményeként is csak életképtelen utódokat produkáltak. Ebből a S6U törzs allotetraploid mivoltára következtethetünk (C. Baccari, J. Gaine és R. Mortimer nem publikált adat).

A csoport tagjai között - mai ismereteink szerint - a *S. bayanus* és a *S. pastorianus* típus törzsei (**5. ábra**) is természetes interspecifikus hibridek (Vaughan-Martini és Kurtzman, 1985; Barnett, 1992; Nguyen és mtsi., 2000; Hansen és Kiellard-Brandt, 1994; Tamai és mtsi., 1998; Vaughan-Martini és Martini, 1987). A ribotipizálás mindkettőjükénél egyéni mintázatot ad. Kromoszóma számuk ugyan általában megfelel a 16-nak, azonban kromoszómáikon az Y' próbájuk szerint egyértelműen tartalmaznak *S. cerevisiae* eredetű DNS anyagot is. A mtDNS-ük eredete

nem ismert, de nem *S. cerevisiae* eredetű (Nguyen és mtsi., 2000; Masneuf és mtsi., 1998). A *S. pastorianus* esetében pedig több egyedi génre tervezett PCR termék RFLP analízise is a *S. cerevisiae*-re és *S. uvarum*-ra jellemző mintázatot egyszerre mutatta (Casaregola és mtsi., 2001). Interspecifikus hibrid mivoltukat támasztja még alá az a tény is, hogy sterilek (Banno és Kaneko, 1989; de Barros Lopes és mtsi., 2002).



**5. ábra** A mai természetes élesztő-hibridek kialakulásának feltételezett folyamata. (Casaregola és mtsi., 2001; Masneuf és mtsi., 1998 alapján).

A *Saccharomyces* élesztők interspecifikus hibridjeit a ló és szamár utódjára, az öszvérre hasonlíthatjuk: a 'sensu stricto' élesztőfajok ugyanis egymás között keresztezhetők, és - bár különböző arányban - életképes hibridet képeznek. Az életképes hibridek aránya annál magasabb, minél közelebbi rokon fajokat hibridizáltattak egymással (Marioni és mtsi., 1999; Masneuf és mtsi., 1998). A kapott életképes hibridek viszont, csak igen ritka kivételektől eltekintve (Sebastiani és mtsi., 2002) sterilek (Naumov, 1987; Fisher és mtsi., 2001). A sterilitás oka pedig a

kromoszómális átrendeződéseknek, elsősorban a reciprok transzlokációknak tudható be, melyek egyszerűen post-zigotikus gáthoz vezetnek azzal, hogy a meiózis során több mint két kromoszóma párosodását okozzák, és az ilyen csoportok centromernél való elválasztása aneuploid genomot eredményez az utódban (White, 1978). A reciprok transzlokációkat elsősorban közel-rokon *Saccharomyces*-eknél mutatták ki, míg az evolúciósan régebben elvált fajok genomja sokkal inkább homológ génsorrendű, amiből arra következtethetünk, hogy ezek a transzlokációk önmagukban nem előfeltételei a fajok szétválásának (Fisher és mtsi., 2000), de a legjelentősebb génátrendeződési folyamatoknak tekinthetők a 100 millió éve történetelt teljes élesztő genomot érintő génduplikáció óta (Wolfe és Shields, 1997).

A *S. cerevisiae* genomjához képest Fisher és mtsi. (2000) betérképezték a többi *Saccharomyces* fajban található reciprok transzlokációkat. Előttük Ryu és mtsi. (1996; 1998) már vizsgálták a *S. cerevisiae*-*S. bayanus* fajok szétválását eredményező transzlokációkat. A *S. bayanus* és a *S. cariocanus* vizsgált törzsei négy ilyen transzlokációval, a *S. mikatae* IFO1816 törzse pedig két ilyen transzlokációval rendelkezik. Delneri és mtsi. (2003) egy laboratóriumi HY73 *S. cerevisiae* törzs azon kromoszómáit, melyeken a *S. mikatae* említett transzlokációi találhatóak, úgy alakították át, hogy azok génsorrendje a *S. mikatae* IFO1816 törzsének génsorrendjével megegyezzen. Az ezután elvégzett spóra-spóra keresztezés nagy számú életképes spórutódokat adott, míg eredetileg a két törzs zigótája életképtelen spórákat képzett.

### 3.3. Interspecifikus *Saccharomyces* hibridek a laboratóriumól - biotechnológiai felhasználásuk

Az előző fejezetben bemutatott két, természetből izolált interspecifikus hibrid (S6U és CID1)  $\beta$ -fenil-etil alkohol és  $\beta$ -fenil-etil acetát termelését is megvizsgálták. A *S. uvarum* fajok által 10-szer nagyobb koncentrációban termelt zamat-képző észterek túl magas aránya nem kívánatos a bor érése során. A vizsgált hibridek a két szülői érték közötti mennyiségben termelték az említett anyagokat (Kishimoto, 1994; Sinohara és mtsi., 1994; Masneuf és mtsi., 1998).

A *S. cerevisiae* és *S. uvarum*, mint általunk is leggyakrabban izolált élesztők növekedési és fermentációs optimuma különbözik: a *S. uvarum* optimális növekedési hőmérséklete 28°C alatt van és maximális növekedési hőmérséklete 37°C alatti. Továbbá alacsony hőmérsékleten, 5-30°C fermentál kitűnően (=kriotoleráns vagy kriofil). Ezzel szemben a *S. cerevisiae* optimális növekedési hőmérséklete 30°C felett van és maximális növekedési hőmérséklete is magasabb mint 37°C, amihez szintén magasabb, 12-36°C közötti optimális fermentációs hőmérséklet társul (=nem kriotoleráns, mezofil) (Stokes, 1971; Walsh és Martin, 1977). Az interspecifikus keresztezésbe vitt *S. cerevisiae* és *S. uvarum* élesztők *steril* hibridjei a két szülő optimális növekedési pontja közötti tartományban gyorsan növekedtek (Zambonelli és mtsi., 1993; Kishimoto, 1994), illetve még egyaránt jól növekedtek mind 6°C, mind 37°C-on, ezzel „versenyképesebbek” lettek, mint a szülői törzsek voltak (Giudici és mtsi., 1998).

A vizsgált interspecifikus hibridélesztők fermentációja 6°C-on, bár a *S. uvarum* szülőhöz képest lassabban, de tökéletesen végbement (a *S. cerevisiae* szülő ezen a hőmérsékleten nem tudta befejezni a fermentációs folyamatot) (Zambonelli és mtsi., 1997). A két szülő fermentációs

optimuma közötti hőmérsékleten a hibridek versenyképesebbek, és gyorsabb fermentálók voltak a szülői törzseknél. Végül a *S. cerevisiae* fermentációs optimumának felső határán, 36°C-on még ugyancsak versenyképeseknek bizonyultak (Zambonelli és mtsi., 1997). Továbbá vitamin mentes minimál táptalajon növekedtek és melibióz fermentációs képességgel is rendelkeztek, mely tulajdonságok eredetileg csak a *S. uvarum* szülő sajátjai voltak (Vaughan-Martini és Martini, 1987; Kishimoto és Goto, 1995; Pulvirenti és mtsi., 2000). A kriotoleráns élesztők még további tulajdonságaikban is különböznek nem-kriotoleráns társaiktól: nagyobb mennyiségű glicerol, borkósav, almasav és 2-fenil-etanol, valamint alacsonyabb mennyiségű ecetsav termelése jellemző rájuk (de nem különböznek egymástól az alkohol termelés tekintetében) (Castellari és mtsi., 1992; Castellari és mtsi., 1994; Bertolini és mtsi., 1996). Hibridjeikre pedig a két szülőre jellemző termelt érték közötti átlagos érték jellemző (Zambonelli és mtsi., 1997).

Az interspecifikus hibridek sterilitása a genetikai anyag állandóságát biztosítja, ezzel a biotechnológiai szempontból fontos kombinált szülői tulajdonságok igen értékes ipari élesztők előállítását teszi lehetővé.

Egy másik olasz kutató csoport vörös bor erjesztését vizsgálta az általuk készített interspecifikus élesztőhibridekkel (Caridi és mtsi., 2002).

A vizsgált tényezők között voltak az etanol, az ecetsav és a glicerol képződés mértéke, de ugyanúgy vizsgálat folyt a képződött bor szín intenzitásáról, és aroma minőségéről is. A kapott eredmények az etanol képzés esetén nem mutattak lényeges különbséget a kontrollként használt starter (K1) *S. cerevisiae* törzshöz képest, az ecetsav vizsgálata esetén azonban kevésbé savképzőnek bizonyultak a hibridek. A glicerol termelést illetően voltak a kontroll törzsnél erősebb és gyengébb glicerol termelők

is, ahogy a szín intenzitás is változónak, de nem jelentősen különbözőnek bizonyult. A polifenol tartalom, ami a Gaglioppo szőlőből készült vörös bor (Dél-Olaszország) legmeghatározóbb karakterét adja, a hibridélesztők esetében volt a legkiválóbb (Caridi és mtsi., 2002).

Kísérletek alapján tehát a borászatban már ki lehet választani olyan genetikailag stabil élesztőhibrideket, melyek a borok minőségi jellegeit a bortermelők, és nemkevésebbé szakértő borfogyasztók igényeihez igazítják (Marullo és mtsi., 2004; Caridi és mtsi., 2002).

Lényeges megjegyzés még az interspecifikus élesztőhibridekkel kapcsolatban, hogy az ilyen hibrid törzsek *természetesen* rendelkeznek az egyik és a másik szülő tulajdonságaival, nem pedig génmanipulációval létrehozott *mesterséges* rekombinánsokról van szó. A génmanipulált szervezetek élelmiszeripari felhasználásával szemben álló fogyasztók számára is elfogadható, ha hibridizálással hozunk létre jobb teljesítményre képes borászati élesztőtörzseket.

Keresztezési kísérleteinkkel megpróbáltunk betekinteni az interspecifikus kereszteződés genetikai hátterébe. Eredményeinkkel ellentmondunk annak a tézisnek, miszerint a *Saccharomyces* genus tagjai egymással való zigótaképzése életképtelen utódokat eredményez (Naumov, 1987; Masneuf és mtsi., 1998; Fisher és mtsi., 2000; Marioni és mtsi., 1999; de Barros Lopez és mtsi., 2002; Zambonelli és mtsi., 1997; Delneri és mtsi., 2003).

Kísérleteink során fajok közötti szabályos rekombinációt mutattunk ki. A magas életképességű és fertilis utódnemzedéket produkáló interspecifikus hibridünk nagy valószínűséggel allotetraploid genommal rendelkezik, utódnemzedékei pedig allodiploidok. Ehhez hasonló eredményeket kaptak Sebastiani és mtsi. (2002) is, egy szintén *S. cerevisiae* x *S. uvarum* interspecifikus hibrid létrehozásakor.

Mesterségesen létrehozott hibridélesztőinket szeretnénk kipróbálni a borászatban is a közeljövőben.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Alkalmazott plazmid:

pJY5 (Lavallée és mtsi., 1994) pTZ18R plazmid, a pSZ220 Y' fragmentjevel kiegészítve Huu-Vang Nguyentől.

### 4.2. Törzsek és táptalajok

#### 4.2.1. Felhasznált törzsek

A kísérleteink során felhasznált törzsek listáját az **1. táblázatban** foglaltuk össze.

**1. táblázat** A kísérleteink során felhasznált élesztőtörzsek listája.

| törzs<br>megnevezése  | törzskönyvi<br>szám | megjegyzés      | hivatkozás                    |
|-----------------------|---------------------|-----------------|-------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i>  | 10-170              | a <i>leu2</i>   | YGSC* X4005-11A,              |
| <i>S. bayanus</i>     | 10-198              |                 | CBS** 380                     |
| <i>S. paradoxus</i>   | 10-336              |                 | CBS 432                       |
| <i>S. uvarum</i> T4/4 | 10-408              | HO              | '98 Tolcsva, kevert szőlőmust |
| <i>S. uvarum</i> (m9) | 10-522              | HO, <i>ura3</i> | 10-408-ből UV mutagenézissel  |
| <i>S. uvarum</i>      | 10-512              | HO              | CBS 395                       |
| <i>S. pastorianus</i> | 10-560              |                 | CBS 1513                      |

\*: Yeast Genetic Stock Center, Berkley, USA

\*\* : Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsala, Netherlands.

Fajnevek rövidítései:

***S. cerevisiae***: *Saccharomyces cerevisiae*

***S. bayanus***: *Saccharomyces bayanus*

**S. uvarum:** *Saccharomyces uvarum*

**S. pastorianus:** *Saccharomyces pastorianus*

**S. paradoxus:** *Saccharomyces paradoxus*

#### 4.2.2. Alkalmazott tápközegek

A kísérleteink során használt tápfolyadékok és táptalajok összetételét, valamint a használt kiegészítő oldatokat a **2. és 3. táblázatok** tartalmazzák (Gutz és mtsi., 1974; Sipiczki és Ferenczy, 1977; Alfa és mtsi., 1993; Egel és mtsi., 1994)

**2. táblázat** A kísérleteink során használt tápfolyadékok és táptalajok.

| Tápfolyadékok (desztillált vízben):                                              |                                                      |                                                              |                      |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------|
| YPL                                                                              | SML                                                  | EMML                                                         |                      |
| 1% élesztő kivonat                                                               | 0,5% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,3% Kálium-hidrogén ftalát                                  |                      |
| 1% pepton                                                                        | 0,1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0,55% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O |                      |
| 2% glükóz                                                                        | 0,05% MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O         | 0,5% NH <sub>4</sub> Cl                                      |                      |
|                                                                                  | 1% glükóz                                            | 2% glükóz                                                    |                      |
|                                                                                  | 0,1% sárga                                           | 2% sóoldat                                                   |                      |
|                                                                                  | vitaminkeverék                                       | 0,1% vitaminoldat                                            |                      |
|                                                                                  |                                                      | 0,01% nyomelem oldat                                         |                      |
| Táptalajok:                                                                      |                                                      |                                                              |                      |
| YPA                                                                              | SMA                                                  | EMMA                                                         | Spóráztató           |
| YPL+2% agar                                                                      | SML+2% agar                                          | EMML+2% agar                                                 | 1% Kálium-acetát     |
|                                                                                  |                                                      |                                                              | 0,1% élesztő kivonat |
|                                                                                  |                                                      |                                                              | 0,05% glükóz         |
|                                                                                  |                                                      |                                                              | 2% agar              |
| Aminosav kiegészítés (Alfa és mtsi., 1993) SMA táptalajhoz:                      |                                                      |                                                              |                      |
| 50 mg/l mindegyik féleből (750 mg/100ml steril desztillált vizes törzsoldatból). |                                                      |                                                              |                      |

**3. táblázat.** Az egyes tápfolyadékokhoz használt kiegészítő oldatok összetétele

|                     | <b>Kiegészítő oldat neve:</b>                                                                                                                                               |                                                                        |                                                                                                                                        |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     | Sárga vitaminkeverék<br>100ml                                                                                                                                               | Vitaminoldat<br>(1000x) 100ml                                          | Sóoldat<br>(50x) 100ml                                                                                                                 |
| <b>Összetétele:</b> | 0,2 mg folsav<br>0,2 mg biotin<br>40 mg Ca-pantotenát<br>200 mg inozitol<br>40 mg niacin<br>20 mg aminobenzoésav<br>40 mg pyridoxin-HCl<br>40 mg tiamin<br>20 mg riboflavin | 0,1 g pantoténsav<br>1 g nikotinsav<br>1 g myo-inozitol<br>1 mg biotin | 5,25 g MgCl x 6 H <sub>2</sub> O<br>73,5 mg CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>5 g KCl<br>0,2 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |

### 4.3. Alkalmazott oldatok

Kísérleteink során használt oldatok összetételét a **4. táblázat** tartalmazza.

**4. táblázat** A kísérleteink során felhasznált oldatok összetétele:

|                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><u>10x SDS oldat:</u></p> <p>10% SDS (Sigma L 5750) szűrt (Millipore) vízben.</p> <p>Szobahőmérsékleten tároljuk.</p>                                                                           | <p><u>Lízis puffer:</u></p> <p>10mM Tris (BioRad 161-0719) pH:8</p> <p>0,45M EDTA (Sigma E 5134) pH:8</p> <p>1% SDS (Sigma L 5750)</p> <p>Szobahőmérsékleten tároljuk.</p>    |
| <p><u>20x SSC oldat:</u></p> <p>3M NaCl (Sigma S 7653)</p> <p>0,3M Nátrium-citrát (Sigma S 5770) szűrt (Millipore) vízben. pH:7.</p> <p>Szobahőmérsékleten tároljuk.</p>                           | <p><u>Zymoliase 20T enzim törzsoldat:</u></p> <p>Zymoliase 20T (ICN 320921) enzim</p> <p>10mg/ml oldatát citrát-foszfát pufferben készítjük el.</p> <p>-20°C-on tároljuk.</p> |
| <p><u>1x TE oldat:</u></p> <p>1ml 1M Trizma<sup>®</sup> Base (Sigma T 6066) oldat</p> <p>200µl 0,5M-os EDTA (Sigma E 5134)</p> <p>98,8ml szűrt (Millipore) víz. pH:8.</p> <p>Hűtőben tároljuk.</p> | <p><u>Proteinase K enzim törzsoldat:</u></p> <p>20mg/ml Proteinase K (Sigma P 2308)</p> <p>enzimet desztillált vízben oldunk.</p> <p>-20°C-on tároljuk.</p>                   |
| <p><u>RNase enzim törzsoldat:</u></p> <p>Ribonuclease A (Sigma R 4875) 10mg/ml koncentrációt állítunk be 1x TE oldatban.</p> <p>-20°C-on tároljuk.</p>                                             | <p><u>T1 oldat:</u></p> <p>1M Sorbit</p> <p>0,1M EDTA. (Sigma E 5134) pH:8</p> <p>Hűtőben tároljuk.</p>                                                                       |
| <p><u>CPE:</u></p> <p>40mM citromsav</p> <p>120mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></p> <p>20mM EDTA</p> <p>Hűtőben tároljuk.</p>                                                                      | <p><u>T2 oldat:</u></p> <p>1mM Tris/HCl pH:7,5</p> <p>1mM EDTA (Sigma E 5134) pH:8</p> <p>Hűtőben tároljuk.</p>                                                               |

|                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>RB puffer:</u><br>1,2M szorbit<br>50mM EDTA<br><u>A puffer:</u><br>0,5M szorbit<br>10mM EDTA<br>50mM Tris pH:7,5<br>Hűtőben tároljuk.                                                      | <u>100x Denhardt oldat:</u><br>2% Ficoll® 400 (Sigma F 4375)<br>2% BSA (Sigma A 2153)<br>2% PVP (Polyvinil-pyrrolidone) (Sigma P 2307)<br>-20°C-on tároljuk |
| <u>B puffer:</u><br>100mM NaCl<br>10mM EDTA<br>1% Na-Laurylsarcosine (Sigma L-5125)<br>50mM Tris pH:7,8.<br>Hűtőben tároljuk.                                                                 | <u>NaPi:</u><br>1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . pH:6,5<br>Szobahőmérsékleten tároljuk.                         |
| <u>Hibridizációs oldat:</u><br>12,5ml 20x SSC<br>5ml 50x Denhardt<br>2,5ml NaPi<br>2,25ml szűrt (Millipore) víz<br>0,75ml 10ng/ml denaturált lazac sperma DNS<br>25ml Formamid (Sigma F 9037) | <u>Random priming:</u> (MegaPrimeKit, Amersham)<br>36µl víz<br>5µl 50mM Tris (pH:8)<br>50 ng/ml pJY5 plazmid DNS (4µl)<br>5µl primer                        |
| <u>Blokkoló oldat:</u><br>50µl 0,1M EDTA<br>30µl 2,5M Na-acetát<br>50µl 3mg/ml lazac sperma DNS<br>425µl hűtött etanol.                                                                       | <u>Jelölő frakció:</u> (MegaPrimeKit, Amersham)<br>10µl puffer<br>3µl dCTP α <sup>32</sup> P<br>2µl Klenow enzim<br>35µl víz                                |

|                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| <u>1. mosó oldat:</u>        | <u>1x TBE:</u>                 |
| 400ml végtérfogatra (vízben) | 10,1% Tris-Base (Sigma T-6066) |
| 40ml 20x SSC                 | 5,56% Bórsav (BioRad 161-0751) |
| 4ml 10% SDS                  | 0,5M EDTA pH: 8,3              |
| <u>2. mosó oldat:</u>        | Szobahőmérsékleten tároljuk.   |
| 100ml végtérfogatra (vízben) |                                |
| 0,5ml 20x SSC                |                                |
| 1ml 10% SDS                  |                                |

#### 4.4. Kísérleti módszerek

##### 4.4.1. Élesztők izolálása erjedő mustból

A munkánk során felhasznált élesztő törzsek egy része a Tokaj-hegyalja borvidékeiről, természetes erjedéssel készülő mustokból származnak. Az erjedő mustból 2-3-ml-nyi mennyiséget veszünk steril pipettával. A laboratóriumban ebből steril körülmények között 10-10µl-t szélesztünk leégetett platinakacs segítségével YPA táptalajra úgy, hogy néhány napos 25°C-on való inkubálást követően különálló telepeket kapjunk. Az így kinőtt telepeket ezután számozással nevezzük el és törzskönyvbe vezetjük.

##### 4.4.2. Élesztőtörzsek taxonómiai azonosítása

A természetből izolált, majd elnevezett törzseket legelőször lizines YPA-n, 37°C-on és vitamin-mentes SMA-n való növekedés alapján vizsgáljuk. Ezután következik a glükóz nélküli SMA + a glükózt helyettesítendő különböző hozzáadott cukrok, mint alternatív szénforrások jelenlétében való növekedés vizsgálata. A taxonómiai identifikálást

Kregen-van Rij (1984), és Kurtzman és Fell (1998) leírása alapján végeztük.

#### 4.4.3. Auxotróf mutánsok izolálása

Mind a természetből származó, mind a homotallikus diploid laboratóriumi élesztőtörzsek mutánsainak izolálását spórázó tenyészeteken UV besugárzással végeztük. A spóra tenyészetből  $10^3$  sejtet YEA táptalajra szélesztünk. Majd 254nm-es UV fénnel, Cole-Parmer 9815 típusú lámpával 20cm-es távolságból sugározzuk a 10%-os túlélést adó besugárzási dózissal (ami tapasztalaink alapján  $10''$ -es besugárzási idő). A 4. nap után kinőtt telepeket steril bársonnyal SMA táptalajra replikázzuk. Az SMA-n nem kinőtt telepeket kiválogatjuk. Ezek az auxotróf mutánsok. Fenotípusokat papírkorongos módszerrel határozzuk meg: SMA táptalajra minden egyes mutáns-gyanús izolátumból pázsitot öntünk, majd megszáradás után egyenlő távolságokban aminosav- illetve nukleotid-bázis oldatokba mártott steril papírkorongokat helyezünk el a felületen. Amelyik korong körül 4 nap elteltével növekedést tapasztalunk arra az aminosavra auxotróf a vizsgált mutáns. A mutánsokat a genetikai markerként leggyakrabban használt 6 fenotípusra (uracil-, leucin-, adenin-, hisztidin-, lizin-, arginin auxotrófia) vizsgáljuk.

#### 4.4.4. Molekuláris markerek

Csupán növekedési tesztek, vagy kariotipizálás segítségével az interspecikus hibrid hibrid-mivoltát igazolhatjuk ugyan, de mélyrehatóbb elemzésükhöz szükségesek a molekuláris genetikai markerek. Ilyen markerek lehetnek egy-egy gén, génszakasz, vagy összekötő szekvenciák, melyeken PCR, PCR-szekvenálás vagy PCR-RFLP technika segítségével vizsgálhatók. Segítségükkel olyan fajok, illetve változatok közti DNS

szekvencia-beli különbségekre is fény derül, amelyeket a növekedési tesztek és a kariogramok elemzése nem tesz lehetővé. Az általunk használt molekuláris markerek listáját az **5. táblázat** tartalmazza.

**5. táblázat** A kísérletek során használt molekuláris markerek

| Elhelyezkedés                                                      | marker                                             | detektálás módszere                        |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> III. kromoszómáján                            | <i>HIS4</i><br><i>YCL008c</i><br><i>LEU2</i>       | PCR-RFLP<br>PCR-RFLP<br>PCR és szekvenálás |
| <i>S. cerevisiae</i> IV. kromoszómáján                             | <i>MET2</i><br><i>MET10</i>                        | PCR-RFLP<br>PCR                            |
| <i>S. cerevisiae</i> V. kromoszómáján                              | <i>URA3</i>                                        | PCR és szekvenálás                         |
| <i>S. cerevisiae</i> XII. kromoszómáján                            | <i>ITS1</i> -5,8S rDNS- <i>ITS2</i><br><i>NTS2</i> | PCR-RFLP                                   |
| <i>S. cerevisiae</i> valamennyi kromoszómájának telomer régiójában | Y' szekvencia                                      | Southern hibridizálás                      |

#### 4.4.5. Interspecifikus keresztezés és hibridizolálás

Kísérleteink során az irodalomban leírtakkal (Naumov, 1987) ellentétben nem spóra-spóra keresztezéseket végeztünk, hanem a természeteshez inkább hasonló körülmények közötti megoldást választottuk. Folyadékban, szabadon keveredve (mass-mating) hagytuk a különböző élesztő fajokat egymással konjugálni. Eppendorf csövekbe, steril vízbe oltunk egy-egy kacsnyi exponenciális fázisú élesztőt mindkét auxotróf markerrel ellátott keresztezni szánt törzsből. Óvatos keverés után 1,5-2-2,5 órás szobahőmérsékleten való inkubálást követően mikroszkópban vizsgáljuk a konjugáló sejteket. A konjugáló sejtek aránya ugyan alacsony volt, de elég gyakori ahhoz, hogy mikroszkópban

megfigyelhessük. Miután ilyen sejteket már láttunk, a tenyészetből steril kaccsal minimál táptalajra (SMA) szélesztünk mintákat úgy, hogy néhány nap elteltével különálló telepeket kaphassunk. Az SMA táptalajon így kinőtt telepek prototrófok, tehát nagy valószínűséggel hibridek.

Hibridek izolálására alkalmas módszer még a keresztbe-replikázás is: komplett táptalajokra a keresztezni kívánt törzsekből kaccsal külön-külön csíkokat húzunk, majd egy-két nap múlva minimál táptalajon egymásra merőlegesen átreplikázzuk azokat úgy, hogy egy-egy keresztezési pontban a szülő törzsek egymással érintkezzenek. Sikeres keresztezés eredményeként az ilyen érintkezési pontokban telepek nőnek ki. Kísérleteink során az előbbi módszert hatékonyabbnak találtuk; az utóbbiaknál gyakran izoláltunk rekombináns telepeket. A dolgozatban részletesen tárgyalt 10-170 x m9 keresztezés is a mass-mating módszerrel készült.

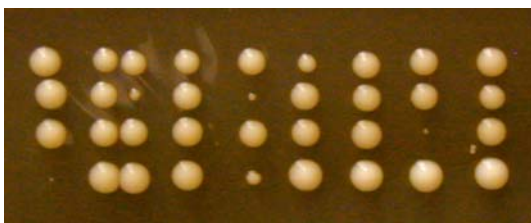
#### 4.4.6. Spórázás vizsgálata

A *Saccharomyces* élesztők spórázását a tápközeg alacsony pH értéke és tápanyagszegénysége indukálja. Spóráztató táptalajra exponenciális fázisban lévő élesztőtörzseket oltunk és 4-5 napig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd a keletkezett askospórákat mikroszkóppal vizsgáljuk.

#### 4.4.8. Tetrádanalízis

Zymoliase 20T (ICN 320921) enzimmal kezelt spórázó tenyészetből steril kaccsal YPA táptalajra csíkot húzunk. Mikromanipulátorral ebből egy-egy askuszt húzunk ki, majd ennek a sejtfal lízise után kiszabaduló különálló spóráit szintén kihúzzuk, egymástól egyenlő távolságokra, hogy külön telepeket képezhessenek (pl.: Romano és mtsi., 1995; Johnston és mtsi., 2000), mint ahogy az a **6. ábrán** is látható. Az ábra egy-egy

oszlopát egy-egy tetraspórák aszkuszból kihúzott spórák által képzett telepek alkotják. Az így növekvő különálló telepek genetikai vizsgálata a tetrádanalízis. A négyspórák aszkuszkok a tetrádok.



**6. ábra** Mikromanipulátorral szétválasztott aszkospórák által képzett telepek.

#### 4.4.7. Az utódnemzedékek vizsgálata

A mikromanipulátorral izolált és szétválasztott tetrádtagok életképességét négy nap elteltével vizsgáljuk és százalékosan értékeljük. A kinőtt spóratagok növekedési vizsgálata a 37°C-on való növekedés, SMA-n illetve a szülők auxotróf markereinek megfelelő aminosavval kiegészített SMA-n való növekedés. A fermentációs teszteket csak azoknál a teljes tetrádoknál végeztük el, melyek molekuláris elemzését is folytattuk. A molekuláris vizsgálat alatt a tetrádtagok pulzáló erőterű gélelektroforézise, annak Y'-próba Southern hibridizációja, a **6. táblázatban** összefoglalt PCR és PCR-RFLP analízise, illetve mitokondriális DNS RFLP analízise értendő.

#### 4.4.9. Asszimilációs és fermentációs vizsgálatok

Cukorasszimilációs tesztek esetén az SMA táptalajba glükóz helyett a vizsgálandó cukrot tesszük felhasználható szénforrásként, majd 4 napos 25°C-on való inkubálás után vizsgáljuk a növekedést. A fermentációs tesztek 5-5ml tápfolyadékban végezzük, Durham csövekkel kiegészítve. A tápfolyadékok alapja YPL, de a glükózt itt is a vizsgálni kívánt cukorral

helyettesítjük. Fermentáló tenyészetek esetén a Durham csövekbe CO<sub>2</sub> kerül, míg a nem fermentálóknál nem keletkezik ilyen buborék.

#### 4.4.10. Geneticin-érzékenység vizsgálata

Geneticin (Sigma, G 5013) törzsoldatból YPA-hoz adjuk a megfelelő koncentrációt a táptalaj sterilizését követően akkor, amikor az már 50°C-ra hűlt. A megdermedő táptalaj felszínére szélesztünk 10<sup>2</sup> sejtet és néhány nap múlva összehasonlítjuk a kapott telepszámot a geneticint nem tartalmazó YPA-ra szélesztett kontroll telep számával.

#### 4.4.11. Genomiális DNS tisztítása

A genomiális DNS sejtekből való kivonását Querrol és mtsi (1992) leírása alapján végezzük. Egy éjszakás, 25°C-on inkubált 5ml-nyi sejtenyészet centrifugálása és mosása után a pelletet 200µg/ml Zymoliasse 20T (ICN)-t tartalmazó 500µl T1 oldatban oldjuk és 1 órán át 37°C-on tartjuk. Centrifugálás után az üledéket 50µl 10% SDS-t tartalmazó 500µl T2-ben szuszpendáljuk és ismét inkubáljuk 30 percig 60°C-on. 200µl 5M K-acetát hozzáadása és azonnali jégre helyezése, és 30 perc jégen tartása után a lecentrifugált folyadék felülúszóját 700µl izopropanolt adunk, maximális sebességgel való centrifugálás után a kapott csapadékot 70%-os etanollal tisztítunk. Az etanol eltávolítása után a csapadékot 400µl desztillált vízben oldjuk. Végül 2,5M Na-acetát-100% etanos kicsapással és a centrifugálást követő 70%-os etanos mosással fejezzük be a DNS kivonását. A kapott DNS-t TE-ben oldjuk és RNase-zal (Sigma R 4875, 10mg/ml törzsoldatból 1-1µl) kezeljük (37°C-on fél óráig). 1%-os agaróz gélben, 1x TBE pufferben 120V-on futtatjuk.

#### 4.4.12. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Kísérleteink során a következő reakció elegyet mértük össze UV-vel sterilizett Eppendorf csőbe:

35,5 µl szűrt (Millipore) desztillált víz

5µl PCR puffer 10x (Fermentas MBI)

4µl 25mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas MBI)

2µl dNTP mix (5mM dATP, 5mM dTTP, 5mM dGTP, 5mM dCTP) (Fermentas MBI)

1-1µl a megfelelő forward és reverse primer (0,5µM)

0,3 µl Taq Polymerase enzim (Fermentas MBI) (5u/ µl)

a reakció elegyhez 1,5-3 µl (10pg-1µg) genomiális DNS-t adunk.

A kapott PCR terméket 1%-os agaróz gélben 1x TBE pufferben 120V-on futtatjuk. A PCR-reakció paramétereit lásd később. A felhasznált primerek listáját a **6. táblázat** tartalmazza

#### 4.4.13. PCR-RFLP

(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Lenght Polymorphism)

A PCR-RFLP technikát faji identifikálásra, illetve fajok közötti hibridek vizsgálatára használjuk (Oda és mtsi., 1997; Guillamon és mtsi., 1994; McCulloch és mtsi., 1998; Fernandez-Espinar és mtsi., 2000). Restrikciós endonukleázos emésztést végzünk a kapott PCR termékeken. Az egyes enzimek a különböző eredetű PCR-termékeket különbözőképp vágják, hiszen felismerőhelyeik is más-más helyen vannak, ezért eltérő hosszúságú fragmenteket kapunk a különböző fajok esetén.

MET2 PCR-RFLP: PCR: 94°C 2'; 30x: 94°C 1', 54°C 45'', 72°C 2'; 72°C 5'. A kapott PCR termékeket *EcoRI* és *PstI* (Fermentas MBI) restrikciós endonukleázokkal 2,5 órán át 37°C-on emésztjük. A PCR termékeket 1%-os, az emésztett fragmenteket 1,4%-os 5µg/ml hozzáadott ethidium-bromidot (Sigma E 8751) tartalmazó agaróz (Merck 1.01236.0500) gélben 120V-on, 1x TBE pufferben futtatjuk, majd a géleket UV lámpa fölött vizsgáljuk. A felvételeket Olympus (Camedia C-4000 Zoom) digitális fényképezőgéppel készítjük.

ITS1-5,8S-ITS2 PCR-RFLP: PCR: 94°C 2'; 30x: 95°C 1', 60°C 1', 75°C 5' és 72°C 15'. A kapott PCR-termékeket *HaeIII* enzimmal emésztjük, az emésztési és futtatási paraméterek ugyanazok, mint az előbb leírt MET2 esetén.

HIS4 PCR-RFLP: PCR: 94°C 2'; 28x: 94°C 1'; 51°C 1', 72°C 5' és 72°C 10'. A kapott PCR termékeket *HindIII* és *EcoRV* enzimekkel emésztjük. Az emésztési és futtatási paraméterek szintén megfelelnek az előbb leírtaknak.

YCL008c PCR-RFLP: PCR: 94°C 2'; 28x: 94°C 1'; 48°C 1', 72°C 5' és 72°C 10'. A kapott PCR termékeket *EcoRV* és *PstI* enzimekkel emésztjük. Az emésztési és futtatási paraméterek az előbb leírtakkal megegyezők.

MET10 PCR: 94°C 2'; 28x: 94°C 1'; 41°C 1', 72°C 5' és 72°C 10'.

URA3 PCR: 94°C 2'; 28x: 94°C 1'; 48°C 1', 72°C 5' és 72°C 10'. A futtatási paraméterek az előbbiekkal azonosak.

**6. táblázat:** A munkánk során használt primerek listája:

| primer                 | Szekvencia (5'-3')                                               | Eredet, specifitás                                                                              |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MET2-U<br>MET2-L       | -CGA AAA CGC TCC AAG AGC TGG-<br>-GAC CAC GAT ATG CAC CAG GCA G- | <i>S. pastorianus</i> , <i>S. cerevisiae</i> MET2 gén<br>(Hansen & Kielland-Brandt, 1994).      |
| ITS1<br>ITS4           | -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-<br>-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-      | <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pastorianus</i> ITS1-5,8S<br>rDNS-ITS2 (McCullogh és mtsi., 1998). |
| NTS2-U<br>NTS2-L       | -AAC GGT GCT TTC TGG TAG-<br>-TGT CTT CAA CTG CTT T-             | <i>Saccharomyces 'sensu stricto' NTS2</i><br>(Nguyen és Gaillardin, 1997)                       |
| HIS4-U<br>HIS4-L       | -ACT CTA ATA GTG ACT CCG-<br>AAC TTG GGA GTC AAT ACC-            | <i>S. pastorianus</i> és <i>S. cerevisiae</i> HIS4 gén<br>(Casaregola és mtsi., 2001).          |
| YCL008c-U<br>YCL008c-L | -TTC GTT GGA TGT GCC ATC G-<br>-GGA GCC ACC AAG GGA TGG-         | <i>S. pastorianus</i> és <i>S. cerevisiae</i> YCL008c<br>gén (Casaregola és mtsi., 2001).       |
| MET10-U<br>MET10-L     | -ATC ACT TAT GGG TCT TT-<br>-TTC TTC CTT TAT TAT CC-             | <i>S. cerevisiae</i> MET10 gén specifikus<br>(Casaregola és mtsi., 2001).                       |
| MET10pa-U<br>MET10pa-L | -TAT GGG TCT TTG GAA TC-<br>-TCA GGT CTC AGT TTG TT              | <i>S. pastorianus</i> MET10 gén specifikus<br>(Casaregola és mtsi., 2001).                      |
| URA3cer-U<br>URA3cer-L | -GCA CAG AAC AAA AAC CT-<br>-TCA TTA CGA CCG AGA TT-             | <i>S. cerevisiae</i> URA3 gén specifikus<br>(Casaregola és mtsi., 2001).                        |
| URA3uva-U<br>URA3uva-L | -TAC GGT GCA AAA TCT TCC-<br>-ATA TTT TCA TTT TGG CTC CC-        | <i>S. uvarum</i> URA3 gén specifikus.<br>(www.yeastgenome.org)                                  |
| LEU2-U<br>LEU2-L       | -ATG TCT GCC CCT AAG AAG AT-<br>-CTT AAC TTC TTC GGC GAC AG-     | nemspecifikus <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. uvarum</i><br>LEU2 gén. (www.yeastgenome.org)        |

#### 4.4.14. mtDNS-RFLP

Vezinhet és mtsi (1990) leírását követjük kisebb módosításokkal: 50mM EDTA-val mosott, majd másodszorra centrifugált, egy éjszakán át 25°C-on inkubált 30 ml tenyészet pelletjét 5ml „RB puffer”-ben szuszpendáljuk, amihez 2%  $\beta$ -merkaptóetanolt (Sigma M3148) adunk és 37°C-on inkubáljuk. Az inkubációs időt követő cetrifugálás után 5ml „A puffer”-ben vesszük újra fel a pelletet, amihez 200 $\mu$ g/ml Zymoliase 20T (ICN) enzimet adunk, amivel 37°C-on 1 órán át inkubálunk. Az inkubálást

követő centrifugálás eredményeként kialakult felülúszó ismételt centrifugálásával kapunk egy DNS tartalmú üledéket, mely a genomiális DNS és a mitokondriális DNS keveréke. Ennek DNázos (DNase I; Fermentas MBI) kezelése és 600µl „B puffer”-ben való oldása után Fenol-Kloroform-os (Fenol: Kloroform: Isoamil alkohol 25: 24: 1; Sigma P 2069) kicsapása, illetve alkoholos (70% Etil alkohol 96%-os Etanol: Spektrum 64-17-5 hígításával) mosása után RNázzal (RNase A; Sigma R 4875, 10mg/ml törzssoldatból 1-1µl) kezeltük a TE-ben felvett DNS-t. Az így kapott mtDNS-t *EcoRV* restrikciós endonukleázzal emésztjük 37°C-on 3 órán át, majd 0,7%-os agaróz gélben, 120V-on, 1x TBE pufferben futtatjuk.

#### 4.4.15. Pulzáló erőterű gélelektroforézis

Munkánk során BioRad CHEF DR II (BioRad 170-3612) illetve CHEF DR III (BioRad 170-3695) és CHEF-Mapper XA System (170-3670) pulzáló erőterű gélelektroforézis rendszereket használunk. A rendszerek közötti különbség az elválasztás finomságában van.

A minták előkészítése minden esetben ugyanaz (Nguyen és Gaillardin leírása alapján, 1997): egy éjszakán át 25°C-os vizes rázó inkubátorban inkubált tenyészetből  $1,3-1,5 \times 10^9$  sűrűségnyi sejttenyészetet centrifugálunk, majd az üledéket 50mM EDTA-val mossuk. Ezt követően 500ml-nyi 250µg/ml Zymolias 20T (ICN) enzimmal és 5mM DTT-vel kiegészített CPES pufferben vesszük fel a sejteket, és a szuszpenzióhoz 500ml 50°C-ra hűlt 1,5%-os Low Melt (BioRad 162-0017) agarózt keverünk, amit 200µl térfogatú formákba öntünk. Az így megszilárdult, agarózba ágyazott sejteket CPE pufferbe 2 órára 37°C-ra helyezzük. A protoplasztálódott, agarózba ágyazott mintákon a puffert „lízis puffer”-re cseréljük, ami 0,5mg/ml Proteinase K (Sigma P 2308) fehérjebontó

enzimet tartalmaz, egész éjszakai inkubálásra 50°C-ra helyezzük. Másnap a „lízis puffer”-t háromszor TE-re cseréljük, majd a minták futtatásra azonnal felhasználhatók, ellenkező esetben 0,25M EDTA-ban 4°C-on fél évig tárolhatók.

A futási paraméterek a következők: 40-120 sec lineáris ramping 26 órán át, futás 1%-os agaróz (BioRad 162-0126) gélben, 200V-on, 5V/cm, 14°C-os 0,5x TBE pufferben.

A futást követően a gél 5µg/ml ethidium-bromidot tartalmazó szűrő (Millipore) vízben 30 percig festjük és steril desztillált vízben mossuk. 1-2 óra elteltével UV fény fölött Olympus Camedia (C-4000 Zoom) digitális fényképezőgéppel fényképezzük.

#### 4.4.16. Southern blott és Southern hibridizálás

A technikát a CHEF-Mapper XA System (170-3670) pulzáló erőterű gélelektrofororézis rendszerben futtatott gélben elválasztott kromoszómákon a Y' telomer szekvenciák azonosítására használtuk (Jager és Philipsen, 1989; Codón és mtsi., 1997 ; Louis és mtsi., 1994) A lefényképezett gél 15 percig 1,25M HCl-ben áztatjuk, majd vízzel öblítjük és 2x 20 percen át 0,5M NaOH-1,5M NaCl-oldatban áztatjuk. Ezt követően kapilláris transzfert eredményező „blott”-ot építünk: egy nagy kristályosító tábla 0,5M NaOH-1,5M NaCl-oldatot öntünk, a tálon keresztül egy üveglapot helyezünk, amire gél-szélességű papírcsíkot teszünk (Whatman 3MM), melynek a két vége beleér a folyadékba. Erre helyezzük a gél, amire nylon membránt (Hybond™-N+) és három újabb gél-nagyságú szűrőpapírt helyezünk. Ezek tetejébe 8-10cm vastagságban papírszalvéta réteget helyezünk és egy éjszakán át így hagyjuk. Másnap a membránt 10, majd 20 percig 50mM NaPi-val mossuk. A DNS-t a membránba UV lámpával fixáljuk (Cole Parmer, UV 254nm; 0,1

mW/cm<sup>2</sup>, 8sec) és 2mM EDTA-0,1% SDS oldatba helyezzük néhány percre. Tároláshoz nedvesen befóliázzuk, vagy rögtön felhasználhatjuk hibridizáláshoz.

A Southern transzfer után a membránt hibridizációs oldatban 43°C-on fél órán át mossuk. Közben az Amersham MegaPrime Kit leírását követve elkészítjük a jelölendő DNS-próbát, amit 5 percig 100°C-on denaturálunk és ehhez adjuk a random priming jelölő frakcióját, amit 20-30 percig 37°C-on inkubálunk (a random primerekkel a Klenow enzim segítségével indul a polimerációs reakció, és jelölt dCTP kerül a szintetizált DNS láncba). A reakciót 50µl 0,1M EDTA hozzáadásával blokkoljuk, majd 5 percig maximális fordulaton 4°C-on centrifugáljuk, a felülúszót leszívjuk, a pelletet 800µl 50mM-os Tris-ben vesszük fel, amit 5 percig 100°C-on tartunk és aztán rögtön jégre tesszük szintén 5 percre, majd ezután adjuk hozzá a hibridizációs oldathoz. Az oldatban egyenletesen eloszlatjuk a hozzáadott jelölő frakciót és állandó rázatással egy éjszakán át 43°C-on hagyjuk. Másnap két mosást végzünk 1. és 2. mosó oldatokkal. A mosások idejét és a hőmérsékletét is a radioaktív jelölés erőssége szabja meg (42°C-52°C; 10perc-30perc), amit számlálóval határozzuk meg.

Végül sötét helységben a membránra egy jól záródó tokban Kodak BioMax (MS-1 Film) érzékeny filmet helyezünk és -70°C-on tartjuk. Pár óra elteltével és az előhívó oldatok segítségével a filmen a sikeres jelölés eredményeként sötét sávokat kapunk.

#### 4.4.17. Szekvenálás és szekvencia analízis

A szekvenálás automata ABI PRISM szekvenátorral történik az SZBK szolgáltató laborjának segítségével. A kapott szekvencia elemzését OMIGA1.1 szoftver csomag (Oxford Molecular Group) segítségével végezzük. A nukleinsav szekvenciákhoz a homológiát az NCBI

adatállományban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) illetve a SGD  
adatállományban keresünk (<http://www.yeastgenome.org>).

## 5. Eredmények

### 5.1. A keresztezéshez használt szülői törzsek izolálása és jellemzése

Az 1998-ban, Tolcsván, esszenciából izolált T4/4, (törzskönyvi száma: 10-408) majd laboratóriumban mutagenizált (=m9, törzskönyvi száma: 10-522) *S. uvarum* törzs első lépésként elvégzett növekedési tesztjeinek eredményeit a **7. táblázat** tartalmazza. A másik szülőként használt 10-170 *S. cerevisiae* törzs az amerikai Yeast Genetic Stock Center (katalógus száma: X4005-11A) törzsgyűjteményéből származik. Alapvető fenotípusos tulajdonságait szintén a **7. táblázat** tartalmazza.

**7. táblázat** A keresztezéshez használt *S. uvarum* és *S. cerevisiae* szülő növekedési és spórázó képességének vizsgálata.

| Törzs neve: | növekedés  |      | Fermentáció* |      |      |     | spórázás |
|-------------|------------|------|--------------|------|------|-----|----------|
|             | auxotrófia | 37°C | mel          | malt | mann | gal |          |
| m9 (10-522) | ura-       | -    | +            | +    | -    | +   | +        |
| 10-170      | leu-       | +    | -            | +    | -    | +   | -        |

\*mel: melibióz; malt: maltóz; mann: mannit; gal: galaktóz fermentáció.

Keresztezésük előtt mindkét szülő elektrokariogramjának és további genetikai markerekre vonatkozó tulajdonságainak vizsgálatát elvégeztük, mely eredményeket „A hibrid és utódnemzedékének vizsgálata” fejezetben mutatjuk be részletesen.

### 5.2. Mutánsizolálás és hibridizolálás

Ahhoz, hogy nyomon követhessük a kereszteződés eseményét, illetve a szülői tulajdonságok utódaikba való örökítését, szükségünk van jól

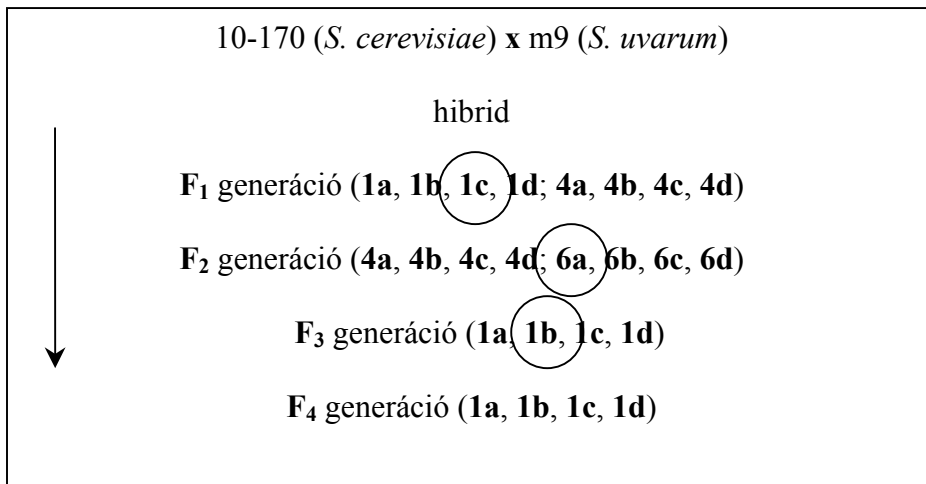
követhető és könnyen detektálható stabil markerekre. A legegyszerűbb ilyen markerek az auxotrófia mutációk, amelyek egy aminosav vagy bázis előállításának bioszintetikus útjában való sérülések. Az ilyen mutánsok ugyanis egyszerű minimál táptalajon nem, csak olyan minimál táptalajon fognak kinőni, amely tartalmazza azt az aminosavat vagy a bázist, amely előállítására azok nem képesek. UV-mutagenézissel könnyen előállíthatók ilyen mutánsok. A mutagenézishez pedig azért használunk spórázó tenyészetet, mert abban nagyobb valószínűséggel vannak jelen haploid sejtek, amelyeken a mutáció azonnal, fenotípusosan kimutatható.

A kiválasztott T4/4-es jelű *S. uvarum* törzs spórázó tenyészetéből UV-mutagenézissel, 10 másodperces sugárzási idővel sikerült 19db auxotróf mutánst izolálnunk, közülük 2 adenin-, 1 arginin-, a további 16 uracil-auxotróf volt. A mutánsokat m1-m19-ig elneveztük, és törzskönyvbe vettük. A keresztezési kísérleteinkhez közülük az m6, m9, és m18 uracil-auxotrófokat használtuk, ezeknek a kiválasztott mutánsoknak stabil auxotróf markerük és jó spórázó képességük volt. A későbbiekben azért használtuk fel a dolgozatban részletesen bemutatott keresztezéshez kizárólag az m9-es *S. uvarum* törzset, mert ennél figyeltük meg a legmagasabb spóraéletképességet (96 %). A többi mutáns esetén 2:2 szegregáció volt jellemző az életképes és neméletképes spóraklónok között a tetrádokban.

A dolgozatban a továbbiakban egy laboratóriumi leu<sup>-</sup> *S. cerevisiae* (10-170) és egy ura<sup>-</sup> tokaji *S. uvarum* (m9) keresztezéséből származó egyetlen hibrid vizsgálatát mutatjuk be részletesen. A hibridet 21db SMA-n kinőtt telep közül választottuk ki. A prototrófia a két auxotróf szülő sikeres kereszteződésére utal. Emellett a hibridre jellemző volt a 37°C-on való növekedés is, ami eredetileg a *S. cerevisiae* szülő sajátossága (Vaughan-Martini és Martini, 1987).

### 5.3. A hibrid és utódnemzedékének vizsgálata

A **7. ábrán** a keresztezés eredményeként létrehozott hibridből származtatott utódnemzedékeket és a dolgozatban részletesen bemutatott tetrádtagokat tüntetjük fel. Bekarikázva azokat a spóratagokat láthatjuk, melyekből spóráképzéssel a következő generációkat izoláltuk. A hibrid nagyon jól spórázott (50-60%; 6 nap után) a belőle húzott első utódnemzedék **1c** spóratagja szintén jó spóráképzőnek bizonyult (45-50%; 6 nap után). Belőle származtattuk a második generációt, melynek **4a** és **6a** tagjaiból (60-70%-os spóráképzés; 6 nap után) is létrehoztunk egy-egy harmadik generációt amiből a dolgozatban a **6a**-ból származott utódnemzedékkel foglalkozunk részletesen. Az így létrejött harmadik generáció **1b** spóratagjából izoláltuk a negyedik generációt. A jó spóráképző utódokat választottuk ki a következő generációk izolálásához.



**7. ábra** A hibridből származtatott utódnemzedékek a dolgozatban bemutatott tetrádokkal.

### 5.3.1. A hibrid és a keresztezéshez használt szülők vizsgálata

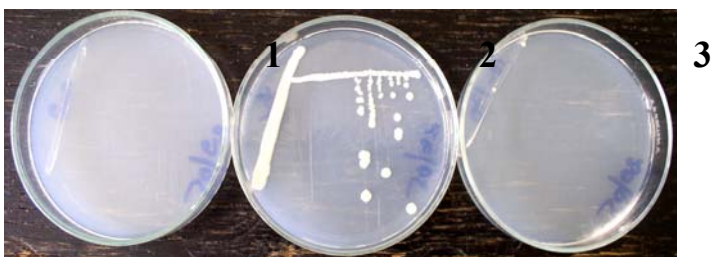
#### 5.3.1.1. Növekedési és fermentációs tesztek.

A faji identifikálási lépéseket növekedési és fermentációs tesztekkel kezdjük, majd az eredményeket Kregen van Rij (1984) és Martini (1993) taxonómiai táblázataival vetjük össze. A 37°C-on növekedő, de minimál táptalajon nem növekvő törzseket *S. cerevisiae*, a 37°C-on nem, de minimál táptalajon növekedést mutató törzseket *S. uvarum*-ként azonosítjuk be. A fermentációs tesztek esetében nagyobb a változatosság, egy törzsön belüli különböző változatok léteznek. **A 8. táblázat** a 10-170, m9 szülők, és a hibrid növekedési és fermentációs eredményeit mutatja be. A hibrid növekszik 37°C-on és minimál táptalajon is, jól spórázik, illetve melibióz fermentáló képessége is van, akárcsak *S. uvarum* szülőjének.

**8. táblázat** A keresztezett szülők, és a hibrid növekedési- és fermentációs vizsgálata.

| Törzs neve: | növekedés  |      | spórázás | fermentáció |      |     |
|-------------|------------|------|----------|-------------|------|-----|
|             | auxotrófia | 37°C |          | mel         | malt | gal |
| 10-170      | leu-       | +    | -        | -           | +    | +   |
| hibrid      | +          | +    | +        | +           | +    | +   |
| m9          | ura-       | -    | +        | +           | +    | +   |

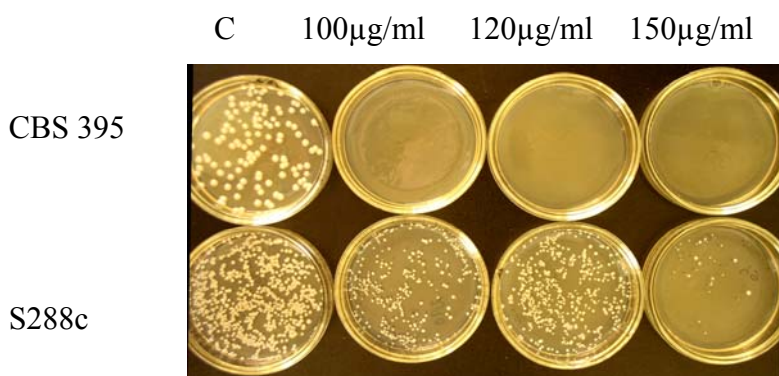
Minimál táptalajon való növekedést mutat be az **8. ábra**. A két auxotróf szülő természetesen nem mutat növekedést, a hibrid viszont prototróf lévén növekszik.



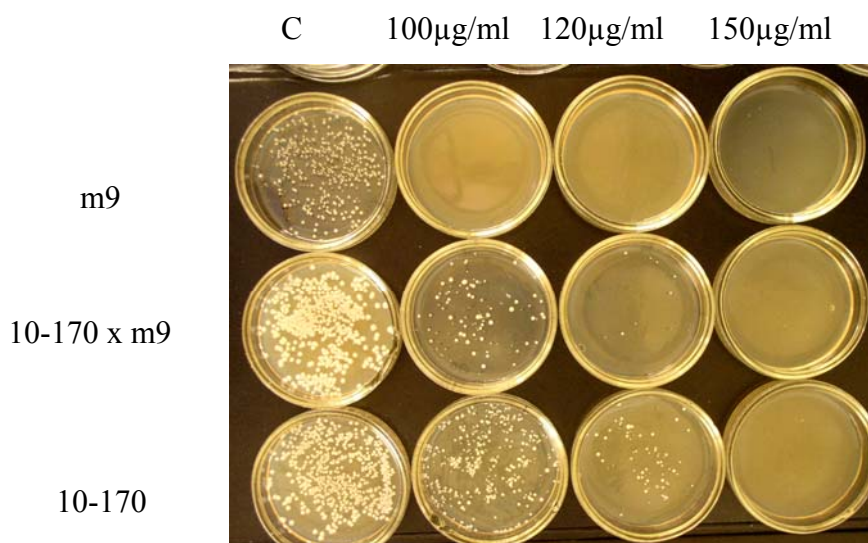
**8. ábra** A keresztezett szülők és a hibrid növekedési tesztje minimál táptalajon. 1.: 10-170; 2.: hibrid; 3.: m9.

### 5.3.1.2. Geneticin-érzékenység vizsgálata

A G418 eukarióta antibiotikum, a polipeptid szintézist a protein elongáció folyamatában gátolja. Elsősorban a neomicin vagy kanamicin rezisztencia gént tartalmazó sejtek szelekciójára, illetve az ilyen tenyészetek fenntartására használandó. Mi is egy stabil *S. uvarum* diszruptáns  $ura^-$  mutáns létrehozása (az eredményeket ez a dolgozat nem tartalmazza) miatt kezdtünk geneticin-érzékenységi teszteteket vizsgálni, miközben észrevettük, hogy a *S. cerevisiae* sejtek ellenállóbbak a méreggel szemben, mint a *S. uvarum* sejtek (**9. ábra**). Ennek a „természetes” markernek az utódokban való megnyilvánulását is megvizsgáltuk a keresztezésbe vitt szülők, azok hibridje és első utódnemzedéke esetében is. Az eredményeket a **9. táblázat** tartalmazza, a szülők és a hibrid növekedési tesztjeinek fényképeit pedig a **10. ábrán** mutatjuk be. A geneticin-érzékenység egyszerű intermedier-szerű öröklésmenettel magyarázható, a hibrid az m9 szülőhöz képest jobban, a 10-170 szülőhöz képest kevésbé jól nő. A vizsgált első utódnemzedék egy teljes tetrádjának tagjai közül kettő hibridre hasonló telepszámot mutat (**1c, 1d**) a másik két tetrád tag az m9 szülőhöz hasonló növekedést mutat.



**9. ábra** Geneticin-érzékenység vizsgálata a kontroll törzseken.



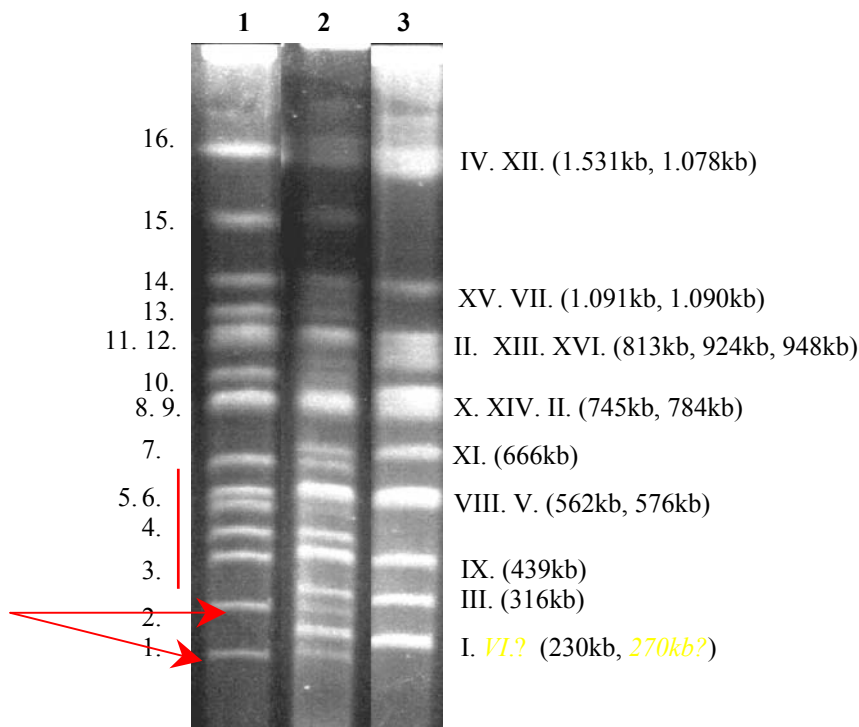
**10. ábra** Geneticin-érzékenység vizsgálata a keresztezésbe vitt 10-170, m9 szülői törzseken, és hibridjükön.

**9. táblázat** A szülők, a hibrid és az első utódnemzedék egy teljes tatrádjának genecicin-érzékenységi vizsgálata.

| törzs                    | Kinőtt telepek száma |         |          |          |          |
|--------------------------|----------------------|---------|----------|----------|----------|
|                          | 0                    | 80µg/ml | 100µg/ml | 120µg/ml | 150µg/ml |
| 10-170                   | 145                  | 120     | 39       | 24       | -        |
| hibrid                   | 90                   | 48      | 43       | 6        | -        |
| m9                       | 134                  | 32      | -        | -        | -        |
| F <sub>1</sub> <b>1a</b> | 132                  | 95      | 1        | -        | -        |
| <b>1b</b>                | 130                  | 37      | -        | -        | -        |
| <b>1c</b>                | 95                   | 22      | 42       | 6        | -        |
| <b>1d</b>                | 138                  | 18      | 18       | 4        | -        |

### 5.3.1.3. CHEF elektrokariotipizálás és Y'-próba

A pulzáló erőterű gélelektroforézissel (Counter Clamped Homogeneous Electric Field-rendszerekkel) készített elektrokariogramok a mai élesztő-taxonómia igen fontos részévé váltak (Vaughan-Martini és mtsi., 1993; Cardinali és Martini, 1994; Kishimoto és Goto, 1995; Fisher és mtsi., 2000). A kariogramokon az egyes minták molekulásúly alapján elválasztott kromoszómái vizsgálhatók. A módszer nem csak a különböző fajok elkülönítésére, hanem a fajon belüli változatok közötti kromoszóma szám és méret közötti különbségek, valamint kromoszóma-átrendeződések vizsgálatára és interspecifikus hibridek elemzésére is alkalmas (Ryu és mtsi., 1996; Longo és Vezinhet, 1993; Giudici és mtsi., 1998). Azonban ezek a kromoszóma-átrendeződések a természetből izolált törzsek között olyan gyakoriak, hogy sokszor csupán e technika alkalmazása - szekvencia analízis nélkül - félrevezető is lehet (Sipiczki és mtsi., 2001).



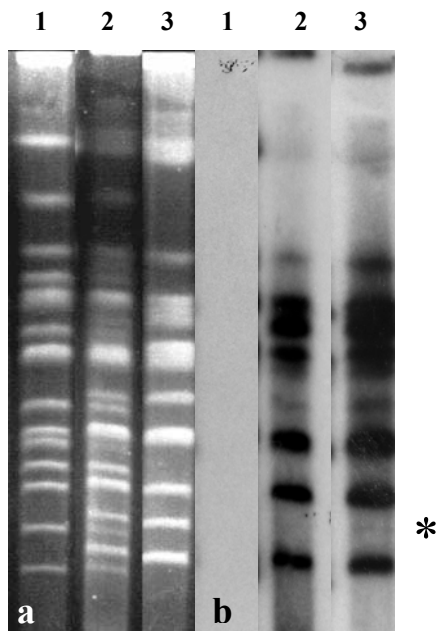
**11. ábra** Pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogram. 1.: m9 *S. uvarum*; 2.: 10-170 x m9 hibrid; 10-170 *S. cerevisiae*. Bal oldalon van feltüntetve a *S. uvarum* kromoszómáinak számozása arab számokkal, jobb oldalon pedig a *S. cerevisiae* kromoszómáinak számozását láthatjuk római számokkal jelölve. A nevezéktan Ryu és mtsi., 1996; Nguyen és mtsi., 2000 által használt számozást követi.

A **11. ábrán** a keresztezett szülők és közöttük kettőjük hibridjének elektrokariogramját mutatjuk be. A középen látható minta kromoszóma száma kb. a jobb és bal oldali minták összege. Jól látható a sok, sávok által jelölt kromoszómák eredeti helye is a szülők mintáin. Az ábrán megfigyelhető továbbá a 10-170 *S. cerevisiae* „hiányossága” is: kromoszóma száma valószínűleg nem a normális 16, hanem annál kevesebb: a VI. kromoszómája, illetve annak részei transzlokáció eredményeként más régióba kerülhetett, azonban ezt az elektrokariogramon nem tudjuk kimutatni. A *S. uvarum* kariogramján

viszont jól látható a fajra jellemző kromoszóma-mintázat: 5db kromoszóma elhelyezkedése a 400-700kb tartományban (vonallal jelölve) illetve a 220-320kb régió két kis méretű kromoszómája (nyíl jelöli) (Kishimoto és Goto, 1995; Ryu és mtsi., 1996).

A hibrid kariogramján az erősebb sávok a két szülőtől származó egyforma méretű kromoszómák együttes jelenlétének köszönhetőek. A *S. cerevisiae* kromoszómáit hagyományosan római számokkal jelöljük, a *S. uvarum* esetén az arab számokkal való jelölés terjedt el (Ryu és mtsi., 1996; Nguyen és mtsi., 2000).

Az Y'-nek nevezett rövid, változó kópia számban ismétlődő szubtelomerikus szekvencia jól alkalmazható a *S. cerevisiae* eredetű kromoszómák azonosítására (Lavallée és mtsi., 1994). A helikázok kódolásáért felelős DNS-hez hasonló szekvenciát mutató Y' valamennyi *S. cerevisiae* kromoszómáéig közelében megtalálható, míg a *S. uvarum* eredetileg nem rendelkezik ilyen szekvenciákkal (Casaregola és mtsi., 2001). Az interspecifikus hibridek esetén kapott jel tehát a *S. cerevisiae* eredetű szubtelomerikus részt jelöli. Ez jól látható a **12. ábrán**, ami az előbb bemutatott szülői elektrokariogramról készített Y' Southern hibridizációt mutatja be a (b) ábrarészen. A középső minta a hibridről készült, mellette jobbra a 10-170 *S. cerevisiae* szülő mintáját láthatjuk, a kettő teljesen azonos hibridizációs sávozottságot mutat, míg a bal oldali m9 *S. uvarum* szülő kromoszómáival egyáltalán nincs hibridizáció. Feltűnik az ábrán az is, hogy a 10-170 *S. cerevisiae* III. kromoszómája nem hordoz Y' telomer szekvenciát (\*).

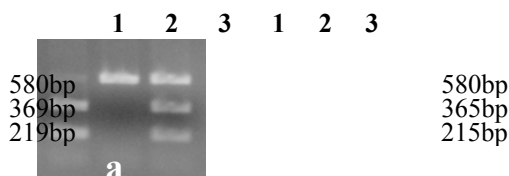


**12. ábra.** Pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogram (a) és Y' hibridizáció (b). 1.: m9 *S. uvarum*, 2.: 10-170 x m9 hibrid, 3.: 10-170 *S. cerevisiae*. \* jelöli azt a *S. cerevisiae* kromoszómát, mely nem hibridizált az Y' telomer próbával

#### 5.3.1.4. *MET2* PCR-EFLP

A *S. cerevisiae* IV. kromoszómáján található *MET2* génre tervezett primereket (6. táblázat) használva hasonló méretű (~580bp) PCR termékeket kapunk a *S. cerevisiae* és *S. uvarum* esetében. *S. cerevisiae* és *S. uvarum* *MET2* fragmentuma között a PCR-RFLP-vel gyorsan és egyszerűen különbséget tehetünk, ha azokat *EcoRI* és *PstI* enzimekkel emésztjük. A két enzim különbözőképp emésztí a két faj *MET2* génjét: az *EcoRI* enzim a *S. cerevisiae* *MET2* génjét 211bp és 369bp fragmentumokra hasítja, míg a *S. uvarum* esetén nincs felismerő helye. A *PstI* enzim esetén pont fordított a helyzet: a *S. uvarum* génjében van felismerő helye (365bp és 215bp a kapott fragmentek hossza) míg a *S. cerevisiae* génjében nincsen (Kiellard-Brandt, 1994; Masneuf és mtsi.,

1996). Interspecifikus *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hibridek esetén pedig mindkét enzimmel való emésztés után 3 sávot várhatunk: az egyik szülő nem emésztett PCR termékét és a kisebb fragmentekre emésztett másik szülő PCR termékét. A **13. ábrán** a szülők és hibridjük *Eco*RI és *Pst*I emésztett *MET2* PCR-RFLP analízisét mutatjuk be. A hibrid mintázata mindkét esetben a két szülő mintázatának kombinációja.



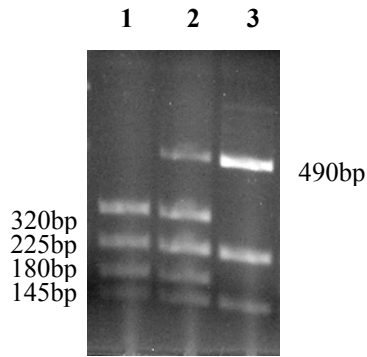
**13. ábra** A keresztezett szülők és a hibrid *MET2* PCR-RFLP analízise.

1.: 10-170, 2.: m9, 3.: hibrid; (a) *Eco*RI emésztés;

(b) *Pst*I emésztés.

#### 5.3.1.5. *ITS1*-5,8S rDNA-*ITS2* PCR-RFLP

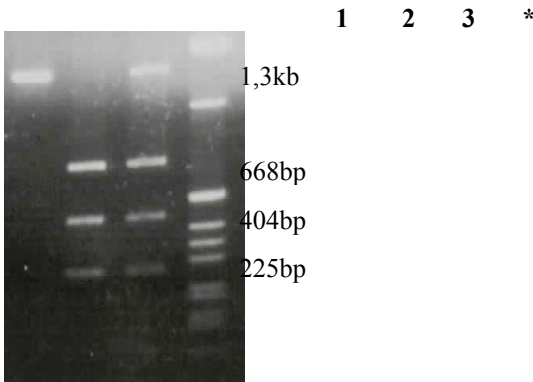
Az *ITS1*-5,8S-*ITS2* PCR-RFLP analízise az *ITS* (intergenic transcribed spacer) PCR-ribotyping. *ITS1* és *ITS4* primereket használva a PCR reakció termékeit *Mae*I (Roche) és *Hae*III (Fermentas NBI) enzimekkel történő emésztése alkalmas a *Saccharomyces* genus szinte valamennyi taxonjának egymástól való elkülönítésére (McCullogh és mtsi., 1998; Kurtzman és Robnett, 2003). Számunkra a *S. cerevisiae* és *S. uvarum* elkülönítése volt a fontos, ezért elegendő volt csupán a *Hae*III enzim használata, mely enzim a kb. 860bp-nyi PCR termékeket a *S. cerevisiae* esetében 320bp-225bp-180bp-145bp-nyi kisebb fragmentekre, míg a *S. uvarum* esetében 490bp-225bp-145bp-nyi szakaszokra vágja. A **14. ábrán** a keresztezésbe vitt szülők és a hibridjük *ITS1*-5,8S rDNA-*ITS2* PCR-RFLP analízise látható. A középső hibrid jól láthatóan mindkét szülői mintázattal rendelkezik.



**14. ábra** A keresztezett szülők és a hibrid *ITS1-5,8S rDNA-ITS2* PCR-RFLP analízise. 1.: 10-170; 2.: hibrid; 3.: m9. A PCR termékeket *HaeIII* enzimmel emésztettük.

#### 5.3.1.6. *NTS2* PCR RFLP

Az *NTS2* PCR-RFLP analízise: az *NTS2-U* és *NTS2-L* primereket használva a PCR reakció termékeit *BanI* (Gibco BRL) enzimmel emésztve szintén alkalmas a *Saccharomyces* genus taxonjainak egymástól való elkülönítésére (Nguyen és Gaillardin, 1997).



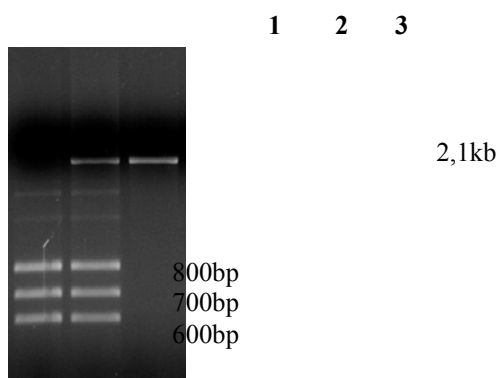
**15. ábra** *NTS2* PCR-RFLP. 1.: m9; 2.: hibrid; 10-170; \*: 1kb-léptékű DNS molekula marker (Gibco BRL).

A **15. ábrán** a keresztezett szülők és hibridjük *NTS2* PCR-RFLP analízise látható. A *BanI* restrikciós endonukleáz a *S. cerevisiae* *NTS2* PCR termékét 668-404-225bp-nyi kisebb fragmentumokra vágja, míg ugyanez az enzim nem rendelkezik felismerőhellyel az *S. uvarum* esetén.

A középen látható hibrid mindkét szülő *NTS2* szekvenciájával rendelkezik.

#### 5.3.1.7. *HIS4* PCR-RFLP

Valamennyi *Saccharomyces* faj esetében egy 2,1kb-nyi PCR terméket kapunk a *HIS4U*-és *HIS4L* primer párokkal (ld. **6. táblázat**) dolgozva. A *S. cerevisiae* esetében ezt a PCR terméket *HindIII* enzimmel (Fermentas MBI) vágva három kisebb (800-700-600bp) fragmentet kapunk, míg ugyanez az enzim a *S. uvarum HIS4* PCR terméke esetében nem rendelkezik felismerőhellyel (Casaregola és mtsi., 2001). A keresztezésben használt szülők és a hibridjük *HIS4* PCR-RFLP analízisét a **16. ábrán** mutatjuk be. A középen látható hibrid rendelkezik mindkét szülői *HIS4* génnel: egy vágatlan *S. uvarum* PCR termékkel és a három kisebb fragmentre vágott *S. cerevisiae* PCR termékkel.

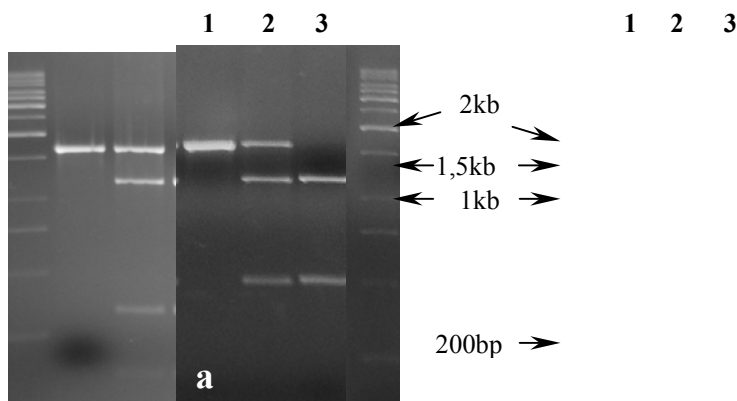


**16. ábra** A keresztezett szülők és a hibrid *HIS4* PCR-RFLP analízise. 1.: 10-170; 2.: hibrid; 3.: m9. *HindIII* enzimmel emésztve.

#### 5.3.1.8. *YCL008c* PCR-RFLP

*S. cerevisiae*-ben a III. kromoszómán található *YCL008c* (*STP22*, *VSP23*) általános *YCL008c* primerekkel (**6. táblázat**) 1,6kb-nyi PCR terméket ad. A kapott PCR termék *EcoRV* enzimmel való emésztése 1,1

és 0,5kb fragmenteket ad, míg *Pst*I enzim felismerő helye nincsen. *S. uvarum* esetén az *Eco*RV enzimnek nincsen felismerő helye, de a *Pst*I enzimmel való emésztés 1,2kb-nyi, 0,3kb-nyi és 140bp-nyi fragmentumokat eredményez (Casaregola és mtsi., 2001). A **17. ábra** (a) részén *Eco*RV enzimmel, (b) részében *Pst*I enzimmel való emésztés eredményeként kapott fragmentumokat láthatjuk. A mindkét esetben középen futtatott hibrid - ugyanúgy, mint eddig - mindkét szülő mintázatát egyaránt mutatja.

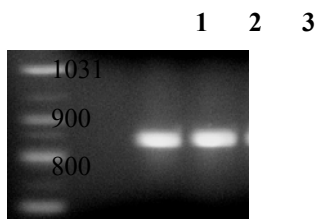


**17. ábra.** A keresztezésbe vitt szülők és hibridjük *YCL008c* PCR-RFLP analízise. (a) 1.: m9; 2.:hibrid; 3.: 10-170; *Eco*RV emésztés. (b) 1.: 10-170; 2.: hibrid; 3.: m9; *Pst*I emésztés.

#### 5.3.1.9. *URA3*<sub>uva</sub> PCR

A *S. uvarum* szülő eredetileg *ura*<sup>-</sup> fenotípusú és a *leu*<sup>-</sup> *S. cerevisiae* szülővel keresztezve vad típusú hibridet kaptunk. Ahhoz, hogy kimutathassuk a *S. uvarum* szülő *ura3* génjének jelenlétét a hibridben, illetve az utódgenerációban, *S. uvarum* *URA3* génre specifikus primerek tervezésére volt szükség. A speciális primerekkel végzett PCR reakció termékeit a **18. ábra** mutatja be. A *S. uvarum* *URA3* génje jelen van a hibridben. A primerek segítségével kapott szülői *URA3* PCR termék

kontroll törzs adatbázisbeli szekvenciájával való összehasonlítását a **19. ábra** mutatja be. Az adatok az SGS adatbázisából származnak.



**18. ábra** *S. uvarum*-specifikus primerekkel készült *URA3* PCR-reakció termékek. 1.: 10-170; 2.: hibrid; 3.: m9.

|                 |                                                             |        |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|--------|
| 1 URAUVARU.sdn  | GCCGAATTATCATGCAAGGGATCTTTAGCCACTGGGGAGTACACCAAGGG          | 350    |
| 3 URAm9Urr.gel  | GCCGAATTATTATGCAAGGGATCTTTAGCCACTGGGGAGTACACCAAGGG          | GGCAGA |
| CONSENSUS       | GCCGAATTATTATGCAAGGGATCTTTAGCCACTGGGGAGTACACCAAGGG          | GGCAGA |
| 1 URAUVARU.sdn  | GTGAAACTGCAGTACTCATCAGGTGTATATAGAATAGCCGAGTGGGCAGA          |        |
| -3 URAm9Urr.gel | GTGAAACTGCAGTACTCATCAGGTGTATATAGAATAGCCGAGTGGGCAGA          |        |
| CONSENSUS       | GTGAAACTGCAGTACTCATCAGGTGTATATAGAATAGCCGAGTGGGCAGA          |        |
|                 | 360 370 380 390 400                                         |        |
| 2 URAm9Url.gel  | CATCACGAATGCGCACGGTGTGGTGGGTCCCGGTATCGTCAGCGGGCTAA          |        |
| 4 URAhyUrl.gel  | CATCACGAATGCGCACGGTGTGGTGGGTCCCGGTATCGTCAGCGGGCTAA          |        |
| 1 URAUVARU.sdn  | CATC <u>AC</u> CAATGCGCACGGTGTGGTGGGTCCCGGTATCGTCAGCGGGCTAA |        |
| -3 URAm9Urr.gel | CATC <u>AC</u> CAATGCGCACGGTGTGGTGGGTCCCGGTATCGTCAGCGGGCTAA |        |
| CONSENSUS       | CATCACGAATGCGCACGGTGTGGTGGGTCCCGGTATCGTCAGCGGGCTAA          |        |
|                 | 410 420 430 440 450                                         |        |
| 2 URAm9Url.gel  | AAGCAGCCGCAGAGGAGGTACCAAGGAACCTAGAGGCCTTCTGATGCTA           |        |
| 4 URAhyUrl.gel  | AAGCAGCCGCAGAGGAGGTACCAAGGAACCTAGAGGCCTTCTGATGCTA           |        |
| 1 URAUVARU.sdn  | AAGCAGCCGCAGAGGAGGTACCAAGGAACCTAGAGGCCTTCTGATGCTA           |        |
| -3 URAm9Urr.gel | AAGCAGCCGCAGAGGAGGTACCAAGGAACCTAGAGGCCTTCTGATGCTA           |        |
| CONSENSUS       | AAGCAGCCGCAGAGGAGGTACCAAGGAACCTAGAGGCCTTCTGATGCTA           |        |
|                 | 460 470 480 490 500                                         |        |
| 2 URAm9Url.gel  | GCCGAATTATTATGCAAGGGATCTTTAGCCACTGGGGAGTACACCAAGGG          |        |
| 4 URAhyUrl.gel  | GCCGAATTATTATGCAAGGGATCTTTAGCCACTGGGGAGTACACCAAGGG          |        |

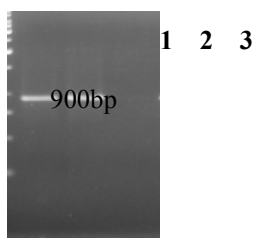
**19. ábra** Az m9 uracil auxotróf mutáns és az adatbázisbeli *S. uvarum* URA3 génjeinek összehasonlítása. URAm9Url: az m9 URA3 PCR-termékének forward szekvenálásának eredménye, URAhyUrl: a 10-170 x m9 hibrid URA3 PCR-termékének forward szekvenálásának eredménye, URAm9Urr: az m9 URA3 génjének reverse szekvenálásának eredménye, URA3UVARU: az adatbázisbeli *S. uvarum* URA3 szekvenciája. Az adatok a [www.genelevures.fr](http://www.genelevures.fr) adatbázisból származnak. Aláhúzással és bekeretezéssel a mutációs helyeket jelöltük.

A keresztezésbe vitt m9, uracil auxotróf mutáns szekvencia elemzése közben találtunk rá a mutációt okozó bázis cserére. Ezt a szekvencián aláhúzással és bekeretezéssel jelöljük. A 460. helyen lévő TCA (eredeti *S. uvarum* szekvencia) TTA (m9 *S. uvarum* szekvencia) triplet báziscseréje szerint helyett leucin aminosavat jelent. A másik, aláhúzással jelölt

báziscsere nem jelent egyben aminosav cserét is: a 355. helyen lévő ACC és ACG kodon egyaránt treonint kódol.

#### 5.3.1.10. *URA3*cer PCR

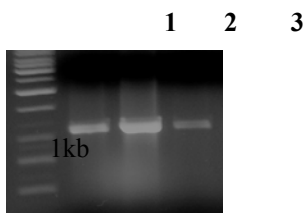
A *S. cerevisiae*-specifikus primerekkel készített PCR reakcióval azt akartuk ellenőrizni, hogy a hibridben, illetve az utódnemzedék tagjaiban meg van-e a vad típusú *S. cerevisiae URA3* gén. A **20. ábrán** az említett PCR reakció termékeit mutatjuk be, és jól látható, hogy a hibrid rendelkezik a *S. cerevisiae* szülőtől kapott *URA3* génnel.



**20. ábra** *S. cerevisiae*-specifikus primerekkel készített *URA3* PCR-reakció termékei. 1.: 10-170; 2.: hibrid; 3.: m9.

#### 5.3.1.11. *LEU2* PCR

A 10-170 *S. cerevisiae* szülő eredetileg leu2<sup>-</sup> fenotípusú, a vele keresztezett *S. uvarum* viszont leu2<sup>+</sup> génnel rendelkezik. A kettőjük hibridje vad fenotípusú; mindkét szülő *LEU2* génjével rendelkezik. A **21. ábrán** a szülők és hibridjük LEU2-U és L primerekkel készített *LEU2* PCR termékeit láthatjuk.



**21. ábra** A szülők és a hibrid *LEU2* PCR termékei. 1.: 10-170; 2.: hibrid; 3.: m9.

A kapott PCR termékeket szekvenáltattuk (**22. ábrán** mutatjuk be) a szekvencia analízis alapján különbséget tudtunk tenni a különböző eredetű szülői gének között. Csupán egyetlen eltérést találtunk: a 283. bázis helyén, ahol az m9 szülő az adatbázisbeli *YCL018w*-vel (*S. cerevisiae LEU2*) megegyezően adenint, míg a 10-170 szülő és a hibrid ugyanitt timint tartalmaz. Az említett szekvencia-beli különbséget azonban nem tudtuk a későbbiekben a vizsgált hibridnél és spóra utódainál azok *LEU2* eredetének vizsgálatára kihasználni, mivel nem találtunk olyan endonukleázt, amely ezen a helyen vágóhellyel rendelkezne. Ez a báziscsere AAA helyett TAA tripletet jelent, ami lizin kodon (AAA) helyett egy stop kodon (TAA) létrejöttéhez vezet. Ez okozhatja a 10-170 leucin auxotróf mutációját. A hibrid is rendelkezik ugyanezzel a mutációval, de prototróf lévén rendelkeznie kell a *S. uvarum*-tól kapott vad alléllal is.

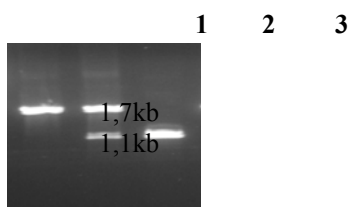
283.

|          |                                                               |
|----------|---------------------------------------------------------------|
| 10-170-L | AGAG--GCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCC--AAGGAACCTGGGATA-ACGGAGGC   |
| M9-L     | AGAG--GCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCC--AAGGAACCTGGGATA-ACGGAGGC   |
| Hyb-L    | AGAG--GCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCC--AAGGAACCTGGGATA-ACGGAGGC   |
| 10-170-U | AGTGTTAGACCTGAACAAGGTTTACTATAAATCCGTAAAGAACTTCAATTGTACGCCAAC  |
| Hyb-U    | AGTGTTAGACCTGAACAAGGTTTACTATAAATCCGTAAAGAACTTCAATTGTACGCCAAC  |
| M9-U     | AGTGTTAGACCTGAACAAGGTTTACTATAAAATCCGTAAAGAACTTCAATTGTACGCCAAC |

**22. ábra** A 10-170 leucin auxotróf és az adatbázisban talált *S. cerevisiae LEU2* szekvenciák összehasonlítása. A mutáció helyét vastag betűvel és keretezéssel jelöltük.

#### 5.3.1.12. *MET10* PCR

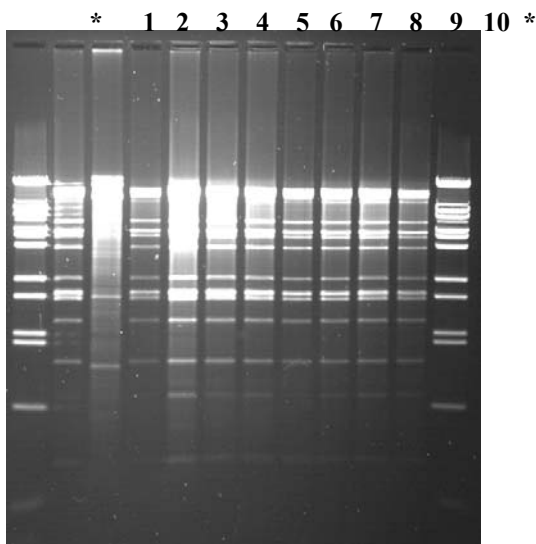
A IV. kromoszómán található *MET10* gént *S. cerevisiae*-re és *S. pastorianus*-ra tervezett primerek (lsd. **6. táblázat**) keverékével amplifikáltuk. A *S. cerevisiae* esetén egy 1,7kb-nyi fragmentet kapunk, a *S. pastorianus* esetében 1,1kb-nyi a PCR termék (Casaregola és mtsi., 2001). Ahol mindkét *Saccharomyces* eredetű *MET10* gén megtalálható, ott kettő fragmentumot kapunk. A *S. cerevisiae* szülő (10-170) 1,7kb-os fragmentumát és a *S. uvarum* szülő (m9) 1,1kb-os fragmentumát egyaránt megfigyelhetjük kettejük hibridje esetében (**23. ábra**). A természetes hibrid *S. pastorianus* (*S. cerevisiae* x *S. uvarum*) *MET10* génje valószínűleg *S. uvarum* eredetű (Casaregola és mtsi., 2001).



**23. ábra** A keresztezésbe vitt szülők és hibridjük *MET10* PCR-termékei. 1.: 10-170; 2.: hibrid; 3.: m9.

#### 5.3.1.13. mtDNS RFLP

A mitokondriális DNS RFLP mintázata alapján is végezhetünk taxonómiai identifikálást. A fajon belüli változatok kimutatására is alkalmas módszert (Piskur és mtsi., 1998; Nguyen és mtsi., 2000) mi arra használtuk, hogy kiderítsük, hogy a hibridünk mely szülőtől örökölte a mitokondriumait, illetve az utódokba való örökítése során történt-e kimutatható változás. Egyöntetű mintázatot kaptunk az utódok esetében, ami megegyezett a hibrid és az eredeti *S. cerevisiae* szülő mintázatával is. A **24. ábrán** bemutatott fotót Huu-Vang Nguyen hozzájárulásával mutatjuk be.



**24. ábra** A keresztezéshez használt 10-170 és m9 szülők, hibridjük, valamint néhány utód mtRFLP-je. A kivont mitokondriális DNS *EcoRV* enzimmel van emésztve. \*:  $\lambda$  *BstEII* marker; 1.: 10-170; 2.: m9; 3.: hibrid; 4.: **F<sub>1</sub> 1a**; 5.: **1b**; 6.: **1c**; 7.: **1d**; 8.: **F<sub>2</sub> 6a**; 9.: **F<sub>3</sub> 1b**; 10.: **F<sub>4</sub> 1a**.

### 5.3.2. Az első utódnemzedék vizsgálata

Az első utódnemzedéket a 10-170 x m9 hibrid spóráztatásával nyertük. A spórázó tenyészetből mikromanipulációval tetrádokat izoláltunk, a tetrádok tetraspóráinak életképességét százalékban értékeltük és azokat további vizsgálatoknak vetettük alá, amit a jelen fejezet részleteiben tárgyal.

#### 5.3.2.1. Növekedési és fermentációs tesztek az első utódnemzedékben.

Az első utódnemzedék valamennyi kihúzott és kinőtt tetrádjának elvégeztük a növekedési vizsgálatát. Fermentációs vizsgálatokat azoknál a tetrádoknál végeztünk, amelyeket molekuláris módszerekkel is tovább elemeztük. Az első utódnemzedék életképessége: 70% volt. 30% teljes

tetrád; 40% három életképes, 20% kettő életképes spórataggal rendelkező tetrád; és 10%-ban kaptunk egyetlen életképes spóratagot tartalmazó tetrádokat. Az **10. táblázat** tartalmazza azokat az összefoglalt eredményeket, melyek a növekedési, spórázási, és néhány spórautód esetében a fermentációs tesztek mutatják be. 37°C-on valamennyi spórautód nőtt. Az életképes utódok 54%-a prototróf és 46%-a leucinra auxotróf volt. A *S. uvarum* uracil auxotróf markerét egyetlen spóra utód sem mutatta. Az életképes spóráklónokban az átlagos spórázó képesség 67% volt.

**10. táblázat** Növekedési, spórázási és fermentációs tesztek az F<sub>1</sub> spórautódokon.

|  | növekedés                           |                | fermentáció |      |     | spórázás |
|--|-------------------------------------|----------------|-------------|------|-----|----------|
|  | SMA                                 | 37°C           | mel         | malt | gal |          |
|  | F <sub>1</sub>                      |                |             |      |     |          |
|  | 54% prototróf: 46% leu <sup>-</sup> | 100% növekedés | +           | +    | +   | 67%      |

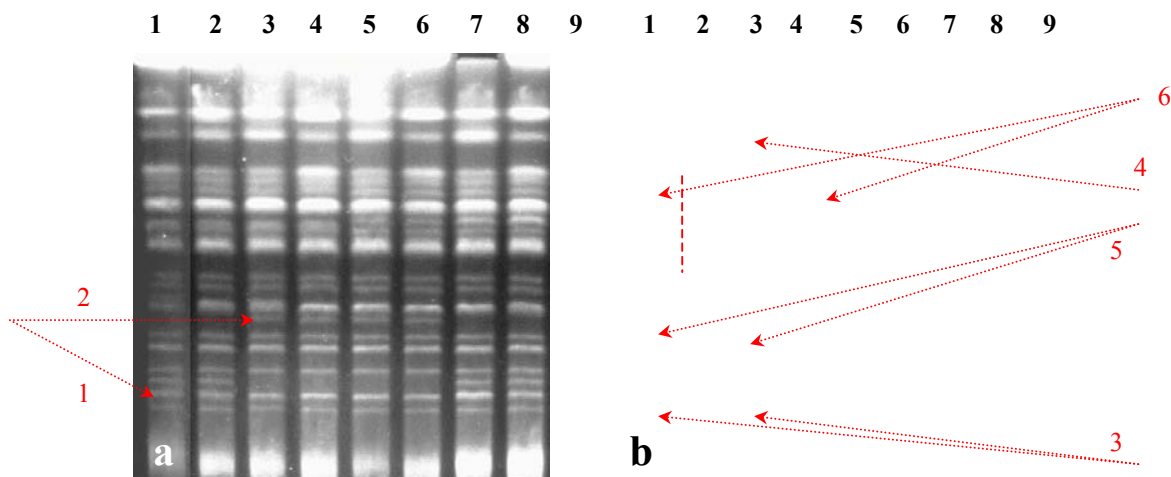
A **25. ábra** az első utódnemzedék első teljes tetrád tagjainak minimál táptalajon való növekedési vizsgálatát mutatja be. A fényképen is jól látható, hogy a tetrád **a** és **b** tagja prototróf, **c** és **d** tagja nem növekszik minimál táptalajon, tehát auxotróf.



**25. ábra** Az első utódnemzedék egy teljes tetrád tagjainak növekedési tesztje. a: **F<sub>1</sub> 1a** jelű spóratag; b: **F<sub>1</sub> 1b** jelű spóratag; c: **F<sub>1</sub> 1c** jelű spóratag; d: **F<sub>1</sub> 1d** jelű spóratag. Az élesztő növedékek SMA táptalajra vannak oltva.

### 5.3.2.2. CHEF elektrokariotipizálás és Y'-próba

A **26. ábrán** az első utódnemzedék két teljes tetrádjának (az 1. és 4. számú tetrádok) elektrokariogramját és mellette Y' Southern hibridizációját láthatjuk.



**26. ábra** Az első utódnemzedék két teljes tetrádjának elektrokariogramja (a) és Y' Southern hibridizációja (b). 1.: **F<sub>1</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**; 5.: **4a**; 6.: **4b**; 7.: **4c**; 8.: **4d**; 9.: hibrid. Az 1. és 2. számú nyíl az elektrokariogramon látható kromoszóma-átrendeződéseket jelöli. A 3. 4. 5. és 6. számú nyilak a kariogramról készült membránon az újonnan megjelenő hibridizációs sávokat jelölik. A szaggatott függőleges vonal a nagyobb kromoszómák mérettartományában látható jelölődés-intenzitás beli különbségekre hívja fel a figyelmet.

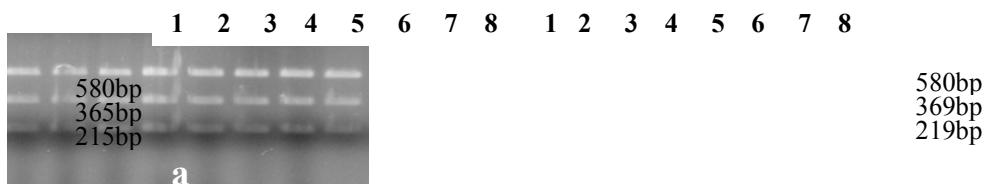
A **26. ábra** (a) részét vizsgálva feltűnik egy kromoszóma-átrendeződés (nyilakkal jelölve): az **1.** számú tetrád **a** és **b** tagjának harmadik legkisebb kromoszómája (1. nyíl) (*S. uvarum* mintázat szerinti számozást alkalmazva) a tetrád **c** és **d** tagjainál hiányzik. Azoknál viszont a 7. kromoszóma jelen van (2. nyíl), ami az **a** és **b** tagoknál nem látható (a kromoszóma számok itt a hibrid kariogramján látható sorrend alapján tekintendők, amit alulról, a legkisebb kromoszómával kezdünk). Ugyanez az átrendeződés figyelhető meg a 4. számú tetrád tagjainál, csak itt épp fordítva: 4a-4b spóratagoknál nem látható a harmadik legkisebb

kromoszóma, de a 7. kromoszóma igen, a 4c-4d spóra tagoknál pedig helyén van a harmadik kromoszóma, de a 7. kromoszóma nem látható. A nagyobb kromoszómák régióiban nem figyelhető meg egyéb átrendeződés. Az ábrán a 9. minta a hibridé. Összehasonlítás végett került ide: jól látható, hogy a hibrid esetében mind a 3., mind a 7. kromoszóma a helyén van. Kevésbé jól látható viszont az eredetileg *S. uvarum*-tól kapott 15. kromoszóma, amely valamennyi vizsgált első utódnemzedék tagnál megfigyelhető.

Az ábra (b) része ennek az elektrokariogramnak az Y' telomer hibridizációját mutatja be. A két teljes tetrád tagjai igen hasonlóak a hibrid mintájához és egymáshoz is, néhány újabb sáv megjelenését kivéve (nyilakkal jelölve). Összevetve az **12. ábra** *S. uvarum* elektrokariogramját és annak Y' Southern hibridizációját ezzel az ábrával egyértelművé válik, hogy az újonnan megjelenő hibridizációs sáv (3. nyíl) egy eredetileg *S. uvarum*-tól kapott kromoszóma helyét jelöli. Egy kevésbé látványos másik újabb sáv (4. nyíl) látható az **1c** spóratagnál, ami szintén eredetileg az m9 *S. uvarum* szülőtől származik és annak 15. kromoszómáját jelöli. Az 5. nyíllal szintén újonnan megjelenő sávokra hívjuk fel a figyelmet, az erősebb jelölődés két sávnak felel meg, az **1a** és **1c** spóratagoknál. A 6. nyíl pedig az **1a** és **1d** spóratagok esetén mutat új jelölődésre. Ebben a régióban (szaggatott vonal) jelentős jelölés-intenzitásbeli különbségek is megfigyelhetők.

#### 5.3.2.3. *MET2* PCR-RFLP

Az első utódnemzedék két teljes tetrádjának elvégeztük a *MET2* PCR-RFLP analízisét, amelyet a **27. ábrán** mutatunk be.

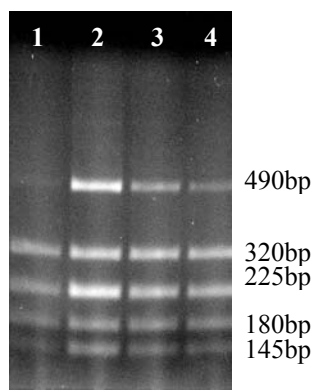


**27. ábra** Az első utódnemzedék két teljes tetrádjának *MET2* PCR-RFLP analízise. 1.: **F<sub>1</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**; 5.: **4a**; 6.: **4b**; 7.: **4c**; 8.: **4d**; (a) *Pst*I enzimmal való emésztés; (b) *Eco*RI enzimmal való emésztés.

Az ábrán jól látható, hogy minden egyes tetrád tag mindkét emésztést tekintve a hibrid mintázatával rendelkezik: egyszerre van jelen mindkét szülői *MET2* gén.

#### 5.3.2.4. *ITS1*-5,8S rDNS-*ITS2* PCR-RFLP

Az első utódnemzedék első teljes tetrádján elvégeztük az *ITS1* PCR-RFLP analízist, amit a **28. ábrán** mutatunk be.

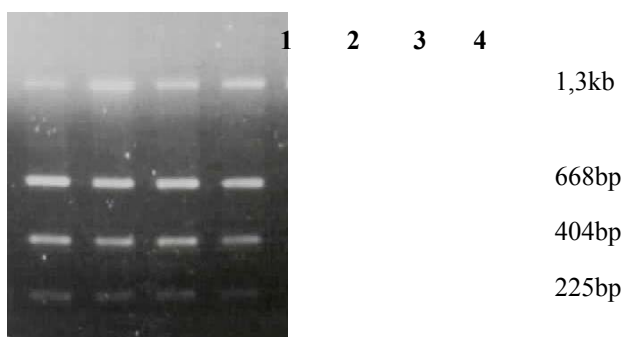


**28. ábra** Az első utódnemzedék egy teljes tetrádjának *ITS1*-5,8S rDNS-*ITS2* PCR-RFLP analízise. 1.: **F<sub>1</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**. A PCR termékeket *Hae*III enzimmal emésztettük.

A **28. ábrán** megfigyelhető, hogy a tetrád tagok közül az **1a** csupán a *S. cerevisiae* szülői mintázatot mutatja, míg a tetrád többi tagjai hibrid-szerű mintázattal rendelkeznek.

#### 5.3.2.5. *NTS2* PCR-RFLP

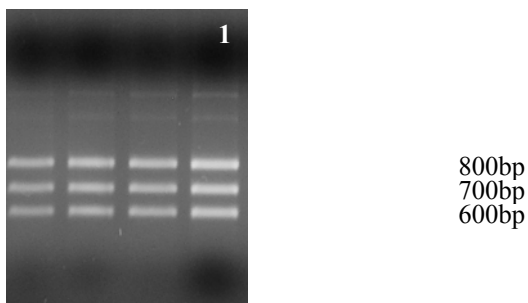
Az első utódnemzedék első teljes tetrádjának *NTS2* PCR-RFLP analízisét a **29. ábrán** mutatjuk be. A PCR termékek *BanI* restrikciós endonukleázzal voltak emésztve. Az ábrán jól látható, hogy minden tetrád tag hibrid-szerű mintázattal rendelkezik.



**29. ábra** Az első utódnemzedék egy teljes tetrádjának *NTS2* PCR-RFLP analízise 1.: **F<sub>1</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**. A PCR termékeket *BanI* enzimmal emésztettük.

#### 5.3.2.6. *HIS4* PCR-RFLP

Az első utódnemzedék első teljes tetrád tagjainak elvégeztük a *HIS4* PCR-RFLP analízisét, amit a **30. ábrán** mutatunk be.

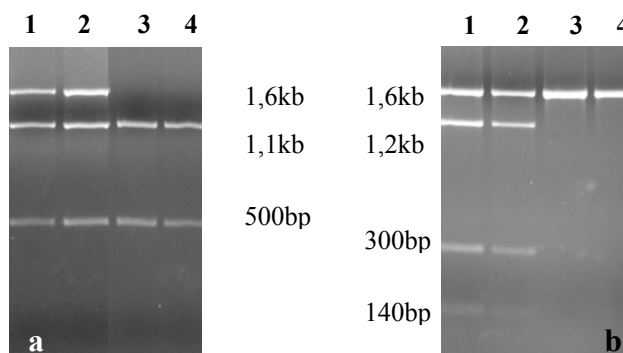


**30. ábra** Az első utódnemzedék egy teljes tetrádjának *HIS4* PCR-RFLP analízise. 1.: **F1 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**. A PCR termékeket *Hind*III enzimmal emésztettük.

A **30. ábrán** jól látható a tetrádtagok egyöntetű *S. cerevisiae*-szerű mintázata. Míg a hibrid esetén mindkét szülői mintázat megjelenik, az első utódnemzedék tagjainak egyike sem rendelkezik a *S. uvarum* szülőtől származó vágatlan 2,1kb-nyi *HIS4* fragmentummal.

#### 5.3.2.7. *YCL008c* PCR-RFLP

Az első utódnemzedék első teljes tetrádjának *YCL008c* PCR-RFLP analízisét a **31. ábrán** mutatjuk be.

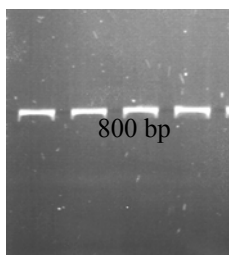


**31. ábra** Az első utódnemzedék egy tetrádjának *YCL008c* PCR-RFLP analízise. 1.: **F1 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**.  
(a): *Eco*RV enzimmal való emésztés; (b): *Pst*I enzimmal való emésztés.

A **31. ábráról** látható, hogy a YCL008c markerünk az első utódnemzedék tagjaiban nem mutat egynemű mintázatot. A tetrád **1a** és **1b** tagjai hibrid mintázatot mutatnak mindkét enzimmel való emésztést követően. A tetrád **1c** és **1d** tagjai azonban *S. cerevisiae* szülői mintázatot mutatnak ugyancsak mindkét enzimes emésztés esetén.

#### 5.3.2.8. *URA3*uva PCR

Az *S. uvarum*-ra tervezett *URA3* primerekkel való PCR reakciót az első utódnemzedék első teljes tetrádja esetén is elvégeztük. A **32. ábrán** látható az eredmény.

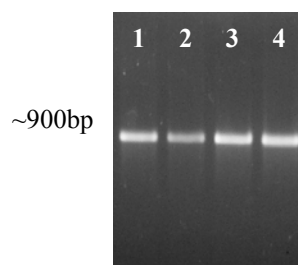


**32. ábra** *S. uvarum* *URA3* génjére tervezett primerekkel készült PCR reakció termékei az első utódnemzedék egy teljes tetrádja esetén. 1.: F<sub>1</sub> **1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**.

A **32. ábra** alapján tehát az első utódnemzedék vizsgált tetrádjainak mindegyike - akárcsak a hibrid - rendelkezik az m9 szülőtől kapott *S. uvarum* *URA3* génnel.

#### 5.3.2.9. *URA3*cer PCR

A *S. cerevisiae*-re tervezett *URA3* primerekkel való PCR reakciót az első utódnemzedék első teljes tetrádja esetén is elvégeztük, az eredményt a **33. ábrán** mutatjuk be.

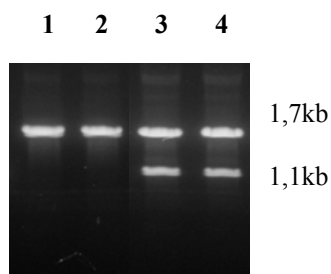


**33. ábra** *S. cerevisiae* *URA3* génjére tervezett primerekkel készült PCR-reakció termékek az első utódnemzedék egy teljes tetrádján. 1.: **F<sub>1</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**.

A **33. ábra** szerint az első utódnemzedék vizsgált tagjainak mindegyike rendelkezik a *S. cerevisiae* szülő *URA3* génjével is.

#### 5.3.2.10. *MET10* PCR

Az első utódnemzedék első teljes tetrádján elvégeztük a *MET10* gén kevert primerekkel való PCR analízisét. A **34. ábrán** bemutatott tetrádtagok látványos szegregációt mutatnak erre a markerre nézve: az **1a** és **1b** tetrád tagok csupán a *S. cerevisiae* szülő *MET10* génjével rendelkezik, a tetrád **1c** és **1d** tagjai a hibridhez hasonlóan mindkét szülői génnel rendelkeznek.



**34. ábra** Az első utódnemzedék egy teljes tetrádjának *MET10* PCR analízise 1.: **F<sub>1</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**.

### 5.3.3. A második utódnemzedék vizsgálata

Az első utódnemzedék spóratagjainak spóráztatásával nyertük a második utódnemzedéket. Az **1c** spóratagot jól spórázó képessége miatt választottuk és spóráztatásával nyertük a második utódnemzedéket, melynek részletes vizsgálatát ebben a fejezetben tárgyaljuk.

#### 5.3.3.1. Növekedési és fermentációs tesztek a második utódnemzedéken

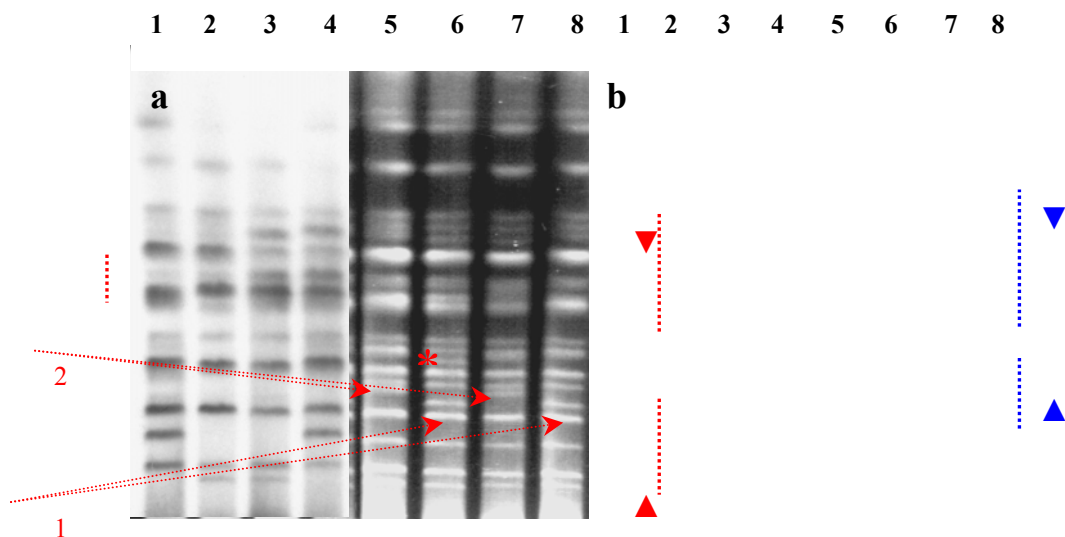
A második utódnemzedék spóratagjainak életképessége 96% volt, 16% volt a háromspórási aszkuszkok aránya a tetraspórási aszkuszkoké pedig 84%. A növekedési és fermentációs vizsgálatokat a **11. táblázat** tartalmazza. Valamennyi utód egyöntetűen leucin auxotróf volt, növekedett 37°C-on és a spórázó képesség 75% volt.

**12. táblázat** A második utódnemzedék spóratagjainak növekedési és fermentációs vizsgálata.

|                      | növekedés |                | fermentáció |      |     | spórázás |
|----------------------|-----------|----------------|-------------|------|-----|----------|
|                      | SMA       | 37°C           | mel         | malt | gal |          |
| <b>F<sub>2</sub></b> | 100% leu- | 100% növekedés | +           | +    | +   | 75%      |

### 5.3.3.2. CHEF elektrokariotipizálás és Y'-próba

A második utódnemzedék tagjai közül kiválasztottunk két teljes tetrádot, melyek elektrokariogramját és Y' Southern hibridizációját a **35. ábrán** mutatjuk be.



**35. ábra.** A második utódnemzedék két teljes tetrájának pulzáló erőterű gélelektroforéise (a) és Y' Southern hibridizációja (b). 1.: F<sub>2</sub> **4a**; 2.: **4b**; 3.: **4c**; 4.: **4d**; 5.: **6a**; 6.: **6b**; 7.: **6c**; 8.: **6d**. Az elektrokariogramon az 1. és 2. számú nyíl kromoszóma-átrendeződésre mutat. Egy plusz kromoszómára mutat az ábrán a csillag, a szaggatott függőleges vonallal pedig a nagyobb kromoszómák mérettartományában látható átrendeződésekre utalunk. Az elektrokariogramról készült membránon a piros és kék háromszögekkel, illetve a szaggatott vonalakkal újonnan megjelenő hibridizációs sávokra mutatunk.

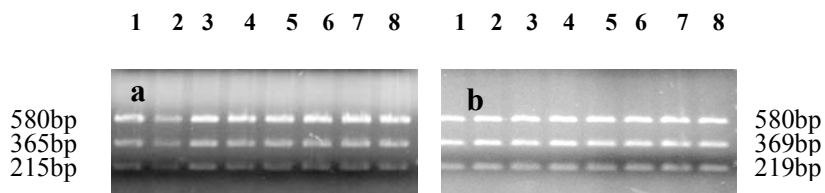
A **35. ábra** (a) része a második utódnemzedék 4-es és 6-os teljes tetrájának elektrokariogramját mutatja be. A 4-es tetrád tagjainak elektrokariogramja elég egységes képet mutat, a piros szaggatott vonallal jelölt kromoszóma-régiót kivéve. Itt a **4a** és **4d** tetrád tagoknál a 11.-12. kromoszómák méretei egymáshoz hasonlóbbak, ezért együtt futnak, amit a képen az erősebb fényes sáv jelöl. Ugyanezek a kromoszómák a **4b-4c** tetrád tagjainál szépen elválnak. A 6-os tetrád tagjai között sokkal

színebb a polimorfizmus: az 1. nyíl egy szabályos szegregációs kromoszómaátrendeződést jelöl a 6. kromoszóma esetében, ami a **6b** és **6d** (1. nyíl erre mutat) esetén az 5. kromoszómához közel helyezkedik el. Ugyanez a kromoszóma a **6a** és **6c** tetrád tagok esetén a 7. kromoszómához áll közelebb (2. nyíl jelöli): hosszabb, mint az előbb említett **6b** és **6d** esetében. Emellett a szabályosnak tűnő átrendeződés mellett a 6-os tetrád **b** tagja a többi spórataghoz, illetve a 4. tetrád tagjaihoz képest egy plusz kromoszómával is rendelkezik (csillaggal jelölve). Ugyancsak színes képet mutat az elektrokariogramról készült membrán Y' próba hibridizációja is. A 4. tetrád tagjai között szabályos szegregáció figyelhető meg a piros ▲-gel jelölt szaggatott vonal menti kromoszóma-régióban. **4a** és **4d** tetrád tagok esetén a legkisebb kromoszómák régiójában a jelölődések egyformán a 2., 3., 4. kromoszómákon vannak. A **4c** és **4b** tetrád tagoknál a középső sáv (3. kromoszóma) helyett a legkisebb kromoszóma telomerjén történt a jelölt Y' fragmenttel hibridizáció. A másik szaggatott vonal (▼-gel jelölve) a nagyobb kromoszómák régiójában elsősorban a jelölődés intenzitásának tetrád tagokon belüli eltérésére hívja fel a figyelmet, ami szintén kromoszóma átrendeződés következménye is lehet. A 6-os tetrád tagjai között az előbbi 4-es tetrádra leírt (piros szaggatott vonallal és ▲-gel jelölt régió) kisebb kromoszómák régiójában történt átrendeződés nem jellemző, itt valamennyi tetrád tag legkisebb kromoszómája és a középső kromoszóma is jelölődött. Azonban a közepes kromoszóma-méret tartományban (kék szaggatott vonal és ▲ jelöli) a 6. kromoszóma esetén láthatunk szabályos átrendeződést: a tetrád **a** és **c** tagjainak ezen a kromoszómán van jelölődése, míg a **b** és **d** tetrádtagok 6-os kromoszómája nem jelölődött. A nagyobb kromoszómák régiójában (szaggatott vonallal

és ▼-gel jelölve) is jelölődés intenzitás-beli különbséget láthatunk, ami ugyancsak utalhat kromoszóma átrendeződésekre is.

#### 5.3.3.3. *MET2* PCR-RFLP

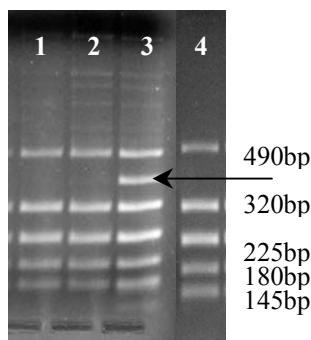
A második utódnemzedék két teljes tetrádján is elvégeztük a *MET2* PCR-RFLP analízist, amelyet a **36. ábrán** mutatunk be. Az ábrán látható, hogy minden egyes tetrád tag mindkét emésztést tekintve a hibrid mintázatával rendelkezik: egyszerre van jelen mindkét szülői *MET2* gén.



**36. ábra** A második utódnemzedék két teljes tetrádjának *MET2* PCR-RFLP analízise. 1.: F<sub>2</sub> **4a**; 2.: **4b**; 3.: **4c**; 4.: **4d**; 5.: **6a**; 6.: **6b**; 7.: **6c**; 8.: **6d**; (a) *Pst*I enzimmel való emésztés; (b) *Eco*RI enzimmel való emésztés.

#### 5.3.3.4. *ITS1*-5,8S rDNA-*ITS2* PCR-RFLP

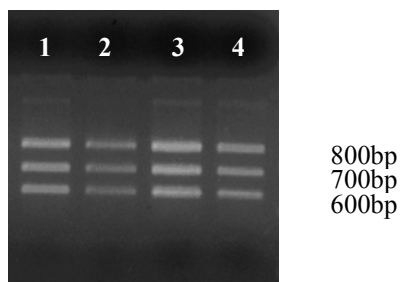
A második utódnemzedéken elvégzett *ITS1* PCR-RFLP sem mutat teljesen egységes képet a vizsgált 6. tetrád tagjai között. A **37. ábrán** láthatjuk, hogy a **6c** tetrád tag nem ugyanazzal a hibrid mintázattal rendelkezik, mint a tetrád többi tagja és nem az egyik szülőhöz hasonlóan kevesebb vágóhellyel rendelkezik, hanem egy újabb vágóhely jelenik meg, ami egy kb. 400bp-nyi újabb fragmentet eredményez (nyíllal jelölve).



**37. ábra** A második utódnemzedék egy vizsgált teljes tetrádjának *ITS1-5,8S rDNA-ITS2* PCR-RFLP analízise. 1.: **F<sub>2</sub> 6a**; 2.: **6b**; 3.: **6c**; 4.: **6d**.

#### 5.3.3.5. *HIS4* PCR-RFLP

A második utódnemzedék tagjain elvégzett *HIS4* PCR-RFLP analízis a tetrád tagok között egyforma fragment-hossz mintázatot mutat (a **38. ábrán** mutatjuk be). A mintázat pedig megegyezik a 10-170 szülő, illetve az **F<sub>1</sub>** generáció mintázatával, egyik sem hasonló a hibridre.

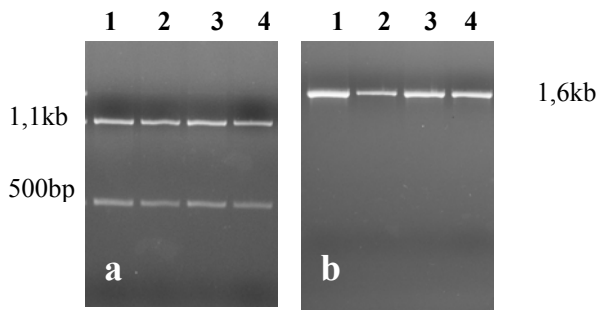


**38. ábra** A második utódnemzedék vizsgált tetrádjának *HIS4* PCR-RFLP analízise. 1.: **F<sub>2</sub> 6a**; 2.: **6b**; 3.: **6c**; 4.: **6d**.

#### 5.3.3.6. *YCL008c* PCR-RFLP

A második utódnemzedék *YCL008c* PCR-RFLP analízisét a **39. ábrán** mutatjuk be. A második utódnemzedék *YCL008c* PCR-RFLP analízise

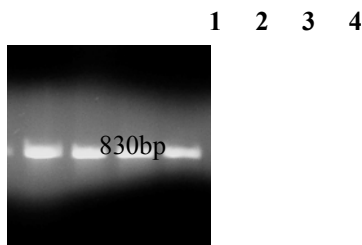
során megint csak egyöntetűen *S. cerevisiae* szülőtől kapott gént találtunk a 6. tetrád tagjai között



**39. ábra** A második utódnemzedék egy teljes tetrádjának *YCL008c* PCR-RFLP analízise. 1.: **F<sub>2</sub> 6a**; 2.: **6b**; 3.: **6c**; 4.: **6d**. (a) *EcoRV*; (b) *PstI* emésztés.

#### 5.3.3.7. *URA3*uva PCR

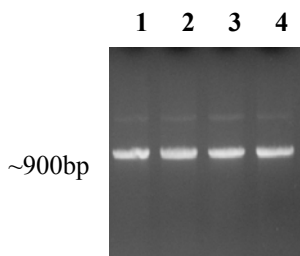
A második utódnemzedék vizsgált tetrádjának tagjai a hibridhez hasonlóan rendelkeznek a *S. uvarum* szülőtől kapott *URA3* génnel. PCR terméküket a **40. ábrán** mutatjuk be.



**40. ábra** *S. uvarum* *URA3* génjére tervezett primerekkel készített PCR-reakció termékek a második utódnemzedék tetrádján. 1.: **F<sub>2</sub> 6a**; 2.: **6b**; 3.: **6c**; 4.: **6d**.

#### 5.3.3.8. *URA3*cer PCR

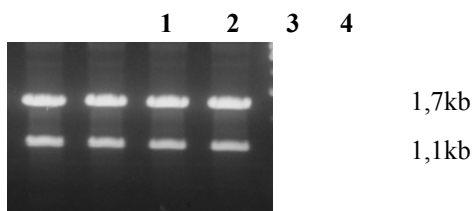
A második utódnemzedék vizsgált tetrádjának tagjai a hibridhez hasonlóan rendelkeznek a *S. cerevisiae* szülőtől kapott *URA3* génnel is. PCR terméküket a **41. ábrán** mutatjuk be.



**41. ábra** *S. cerevisiae* *URA3* génjére tervezett primerekkel készített PCR-reakció termékek a második utódnemzedék tetrádján. 1.: **F<sub>2</sub> 6a**; 2.: **6b**; 3.: **6c**; 4.: **6d**.

#### 5.3.3.9. *MET10*PCR

A második generáció vizsgált tetrádjá esetén a *MET10* PCR termékek minden esetben hibrid-szerűek: a két szülő 1,7kb-nyi és 1,1kb-nyi DNS-ét egyaránt tartalmazzák (**42. ábra**)



**42. ábra** A második utódnemzedék vizsgált tetrádjának *MET10* PCR-reakció termékei. 1.: **F<sub>2</sub> 6a**; 2.: **6b**; 3.: **6c**; 4.: **6d**.

#### 5.3.4. A harmadik és negyedik utódnemzedék vizsgálata

A harmadik utódnemzedéket a második utódnemzedék **6a** spóratagjából származtattuk, a negyedik utódnemzedéket pedig a harmadik nemzedék **1b** spóratagjából.

#### 5.3.4.1. Növekedési és fermentációs tesztek a harmadik és negyedik nemzedéken

A harmadik és negyedik utódnemzedék tetrád tagjai továbbra is magas spóra életképességűek voltak. Harmadik generáció: 100% spóra életképesség; 100% leucin auxotróf; mindegyik nő 37°C-on, spórázó képesség: 75%. Negyedik generáció: 95% életképesség; 100% leucin auxotróf; mindegyik nő 37°C-on; spórázó képesség: 91%. Az eredményeket a **12. és 13. táblázatban** foglaltuk össze.

**12. táblázat** Növekedési és fermentációs tesztek és spórázó képességi vizsgálatok összefoglalója a harmadik utódnemzedéken.

|                      | növekedés |                | fermentáció |      |     | spórázás |
|----------------------|-----------|----------------|-------------|------|-----|----------|
|                      | SMA       | 37°C           | mel         | malt | gal |          |
|                      | 100% leu- | 100% növekedés | +           | +    | +   |          |
| <b>F<sub>3</sub></b> |           |                |             |      |     | 75%      |

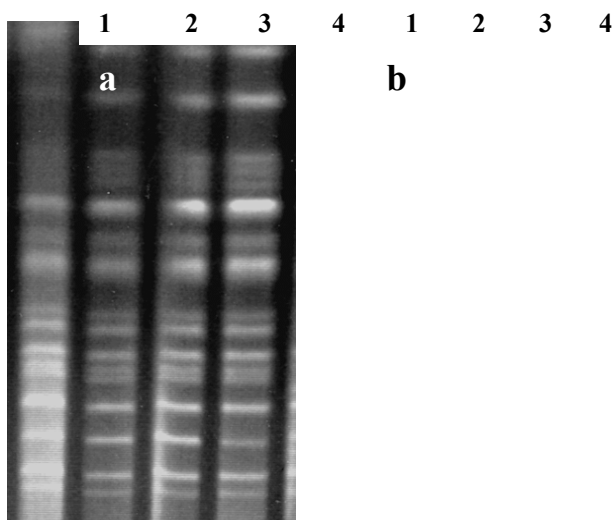
**13. táblázat** Növekedési és fermentációs tesztek és spórázó képességi vizsgálatok összefoglalója a negyedik utódnemzedékben.

|                      | növekedés |                | fermentáció |      |     | spórázás |
|----------------------|-----------|----------------|-------------|------|-----|----------|
|                      | SMA       | 37°C           | mel         | malt | gal |          |
|                      | 100% leu- | 100% növekedés | +           | +    | +   |          |
| <b>F<sub>4</sub></b> |           |                |             |      |     | 91%      |

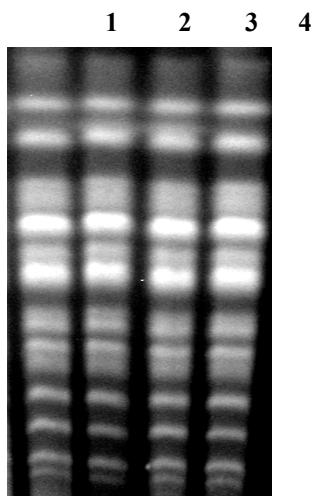
#### 5.3.4.2. CHEF elektrokariotipizálás és Y'-próba

A harmadik és negyedik utódnemzedék elektrokariogramját a **43. és 44. ábrákon** mutatjuk be. A **43. ábra** (a) részén látható elektrokariogram egységes kariotípusú tetrád tagokat mutat be. Leszámítva, hogy az **1a** tetrád tag mintája nagyobb mennyiségű DNS-t tartalmaz, a kromoszómák méretei teljesen egyformának tűnnek. Az ábra (b) része sem mutat egyetlen kromoszóma-átrendeződésre utaló sáv mintázatbeli változást

sem. A negyedik generáció vizsgált tetrádjának elektrokariogramja is egységes képet (**44. ábra**) mutat, erről azonban nem készült Southern blot.



**43. ábra** A harmadik utódnemzedék egy tetrádjának pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogramja (a) és Y' Southern hibridizációja (b) 1.: **F<sub>3</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**.



**44. ábra** A negyedik generáció egy tetrádjának pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogramja. 1.: **F<sub>4</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**.

#### 5.3.4.3. *MET2* PCR-RFLP

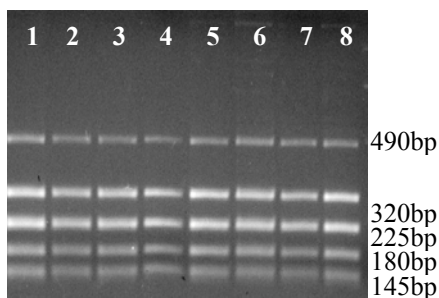
A harmadik és negyedik utódnemzedék egy-egy teljes tetrádján is elvégeztük a *MET2* PCR-RFLP analízist, amelyet a **45. ábrán** mutatunk be. Az ábrán megint csak az látható, hogy minden egyes tetrád tag mindkét emésztést tekintve a hibrid mintázatával rendelkezik: egyszerre van jelen mindkét szülői *MET2* gén.



**45. ábra** A harmadik és negyedik generáció tetrádjainak *MET2* PCR-RFLP analízise. 1.: **F<sub>3</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**; 5.: **F<sub>4</sub> 1a**; 6.: **1b**; 7.: **1c**; 8.: **1d**. (a) *EcoRI* emésztés, (b) *PstI* emésztés.

#### 5.3.4.4. *ITS1*-5,8S rDNA-*ITS2* PCR-RFLP

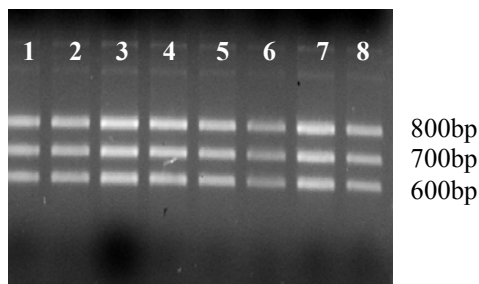
A harmadik és negyedik utódnemzedéken elvégzett *ITS1*-5,8S rDNA-*ITS2* PCR-RFLP már teljesen egységes képet mutat a vizsgált tetrádok tagjai között. A **46. ábrán** látható, hogy mind a harmadik, mind a negyedik utódnemzedék tetrád tagjai a hibridhez hasonló - mindkét szülőre jellemző - mintázattal, mindkét szülő DNS-ével rendelkezik.



**46. ábra** A harmadik és negyedik utódnemzedék *ITS1*-5,8S rDNA-*ITS2* PCR-RFLP analízise. 1.: **F<sub>3</sub> 1a**; 2.: **1b**; 3.: **1c**; 4.: **1d**; 5.: **F<sub>4</sub> 1a**; 6.: **1b**; 7.: **1c**; 8.: **1d**;

#### 5.3.4.5. *HIS4* PCR-RFLP

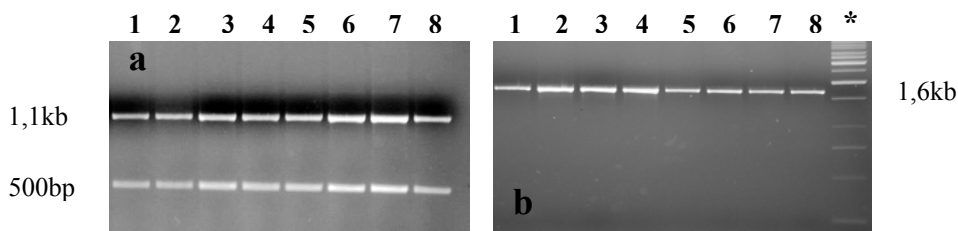
A harmadik és negyedik utódnemzedék tagjain elvégzett *HIS4* PCR-RFLP analízis (**47. ábra**) szintén egyforma fragment-hossz mintázatot mutat a tetrád tagok között. A kapott fragmentek hossza pedig megegyezik a 10-170 szülőre, illetve az  $F_1$  generáció tagjaira jellemző fragment hosszokkal. Egyik sem hasonló a hibridre.



**47. ábra** A harmadik és negyedik generáció két tetrádjának *HIS4* PCR-RFLP analízise. 1.:  $F_3$  1a; 2.: 1b; 3.: 1c; 4.: 1d; 5.:  $F_4$  1a; 6.: 1b; 7.: 1c; 8.: 1d.

#### 5.3.4.6. *YCL008c* PCR-RFLP

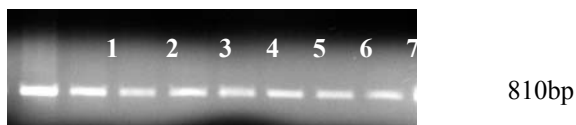
A harmadik és negyedik utódnemzedék *YCL008c* PCR-RFLP analízisét a **48. ábrán** mutatjuk be. A vizsgált utódnemzedékek tetrádjai esetében a *YCL008c* PCR-RFLP analízise során megint csak egyöntetűen *S. cerevisiae* szülőtől kapott gént találtunk.



**48. ábra** A harmadik és negyedik utódnemzedék két tetrádjának *YCL008c* PCR-RFLP analízise. 1.:  $F_3$  1a; 2.: 1b; 3.: 1c; 4.: 1d; 5.:  $F_4$  1a; 6.: 1b; 7.: 1c; 8.: 1d. (a) *EcoRV*; (b) *PstI* emésztés.

#### 5.3.4.7. *URA3*<sub>uva</sub> PCR

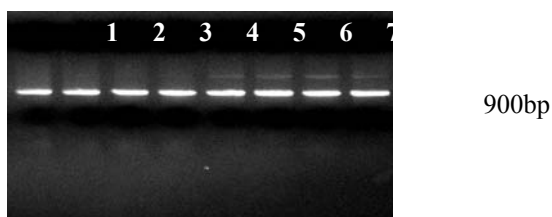
A harmadik és negyedik utódnemzedék vizsgált tetrádjának tagjai a hibridhez hasonlóan rendelkeznek a *S. uvarum* szülőtől kapott *URA3* génnel. PCR terméküket a **49. ábrán** mutatjuk be.



**49. ábra** *S. uvarum* *URA3* génjére tervezett primerekkel készített PCR. 1.: F<sub>3</sub> 1a; 2.: 1b; 3.: 1c; 4.: 1d; 5.: F<sub>4</sub> 1a; 6.: 1b; 7.: 1c; 8.: 1d.

#### 5.3.4.8. *URA3*<sub>cer</sub> PCR

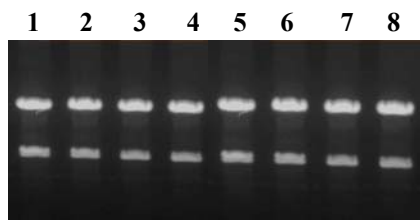
A harmadik és negyedik utódnemzedék vizsgált tetrádjának tagjai a hibridhez hasonlóan rendelkeznek a *S. cerevisiae* szülőtől kapott *URA3* génnel is. PCR terméküket a **50. ábrán** mutatjuk be.



**50. ábra** *S. cerevisiae* *URA3* génjére tervezett primerekkel készített PCR. 1.: F<sub>3</sub> 1a; 2.: 1b; 3.: 1c; 4.: 1d; 5.: F<sub>4</sub> 1a; 6.: 1b; 7.: 1c; 8.: 1d.

#### 5.3.4.9. *MET10*PCR

A harmadik és negyedik generáció vizsgált tetrádjai esetén is minden esetben hibrid-szerű mintázatot kaptunk a *MET10* PCR analízisre. (**51. ábra**).



**51. ábra** A harmadik és negyedik generáció vizsgált tetrádjainak *MET10* PCR termékei. 1.: F3 1a; 2.: 1b; 3.: 1c; 4.: 1d; 5.: F4 1a; 6.: 1b; 7.: 1c; 8.: 1d.

#### 5.4. A vizsgált utódnemzedékek összehasonlítása

##### 5.4.1. Növekedési és fermentációs tesztek.

A **15. táblázat**ban a szülők, a hibrid és a vizsgált utódnemzedékek növekedési tesztjeinek összehasonlítása látható.

**15. táblázat** Növekedési és fermentációs tesztek összehasonlító táblázata

|                      | növekedés                           |                | fermentáció |      |     | spórázás |
|----------------------|-------------------------------------|----------------|-------------|------|-----|----------|
|                      | SMA                                 | 37°C           | mel         | malt | gal |          |
| <b>10-170</b>        | leu-                                | +              | -           | +    | +   | -        |
| <b>hibrid</b>        | prototróf                           | +              | +           | +    | +   | 50%      |
| <b>m9</b>            | ura-                                | -              | +           | +    | +   | 80%      |
| <b>F<sub>1</sub></b> | 46% prototróf: 54% leu <sup>-</sup> | 100% növekedés | +           | +    | +   | 67%      |
| <b>F<sub>2</sub></b> | 100% leu <sup>-</sup>               | 100% növekedés | +           | +    | +   | 75%      |
| <b>F<sub>3</sub></b> | 100% leu <sup>-</sup>               | 100% növekedés | +           | +    | +   | 75%      |
| <b>F<sub>4</sub></b> | 100% leu <sup>-</sup>               | 100% növekedés | +           | +    | +   | 91%      |

A prototróf hibrid első utódnemzedékében a 10-170 *S. cerevisiae* auxotróf markere 54%-ban kifejeződik. Az ezt követő utódnemzedékek az 1c leu<sup>-</sup> auxotróf utódai, és egyöntetűen leu<sup>-</sup> auxotróf is valamennyi. A hibrid növekedik 37°C-on, akár csak a 10-170 szülő, és valamennyi

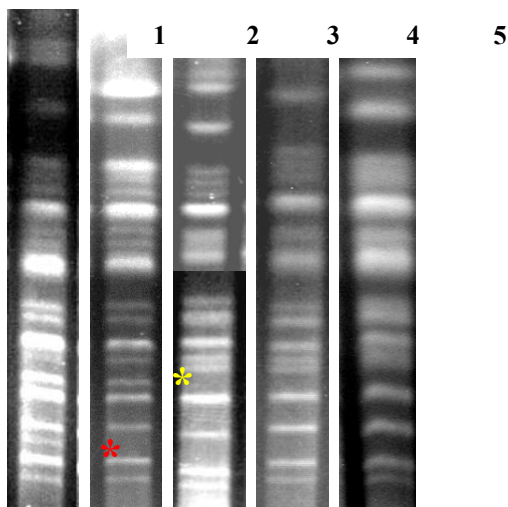
utódnemzedék tagjai is növekszenek a szelektív hőmérsékleten. Az utódnemzedékek fermentációs vizsgálatai a hibridre hasonlítanak: melibiózt, maltózt és galaktózt egyaránt fermentál minden utód. A spóráképzés hatékonysága és az életképes spórák aránya a növekedést mutat az egymást követő generációk során.

Fontos megjegyezni, hogy eredményeink nem általános jellegűek: ha az F<sub>2</sub>-t nem az F<sub>1</sub> **1c** spórájából izoláljuk, hanem egy másik, például egy prototróf klónból, akkor az utódok között sem valószínű, hogy az F<sub>1</sub> generációban történt eredetileg *S. uvarum* kromoszómavesztéssel járó auxotrófia ilyen mértékben jelenik meg.

#### 5.4.2. CHEF elektrokariotipizálás és Y'-próba

A keresztezésbe vitt 10-170 és m9 szülők kromoszóma számainak körülbelüli összege figyelhető meg a hibridnél, amely 20-22 megszámlálható kromoszómával rendelkezik (**11. ábra**). Az első utódnemzedék tagjai a hibrid spóráztatásával jöttek létre. A hibrid és a belőle származtatott utódnemzedékek elektrokariogramjainak összehasonlítását a közepes és kis méretű kromoszómák mintázatai alapján végeztük el. (A nagy méretű kromoszómák összehasonlítása végett több, különböző futtatási paraméterrel kell dolgozni. Ilyen eredményeket a dolgozat nem tartalmaz.) Az F<sub>1</sub> **1c** **tetrád tag** (amelyből a második utódnemzedék származtatott) és a hibrid kariotípusának összehasonlítása során a harmadik legkisebb kromoszóma hiánya tűnik fel (**52. ábrán** piros csillaggal jelölve). Az F<sub>1</sub> **1c** és a következő nemzedékbeli **6a** kariotípusának összehasonlítása során a 7. kromoszóma elhelyezkedése mutat kisebb változást: az F<sub>2</sub> **6a** esetében nagyobb méretű, mint az F<sub>1</sub> **1c** illetve a hibrid esetén volt (**52. ábrán** sárga csillaggal jelölve). Ez az állapot marad fenn a következő generáció F<sub>3</sub> **1b** tagja esetén is, azaz újabb

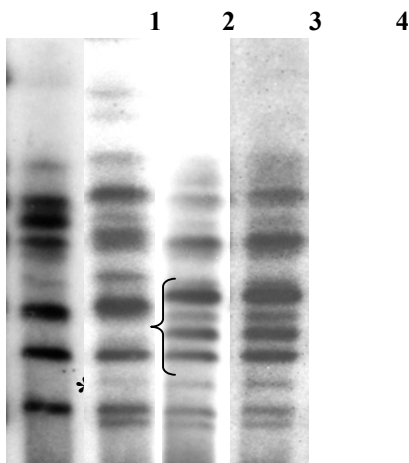
kromoszóma mintázat-beli átrendeződés nem figyelhető meg. Újabb átrendeződést a negyedik generáció **1a** tagjában sem látunk.



**52. ábra** Pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogramok összehasonlítása. 1.: hibrid; 2.: **F<sub>1</sub> 1c**; 3.: **F<sub>2</sub> 6a**; 4.: **F<sub>3</sub> 1b**; 5.: **F<sub>4</sub> 1a**.

A Southern hibridizációs analízis hasonló eredményeket produkált. Az első utódnemzedékben megjelenik egy új sáv a negyedik kromoszómát jelölve (**53. ábra**) és jelölt marad a második és harmadik utódnemzedékben is. A második utódnemzedékben a közepes kromoszómák mérettartományában van jelentős átrendeződés: az eredeti 3 sáv helyett 5 sáv jelenik meg a 6.-10. kromoszómák táján. Ez az átrendeződés (ábrán kapcsos zárójellel jelölve) szintén megmarad az előbbi új sáv megjelenésével együtt, és nem is változik a harmadik generációban sem.

Természetesen itt is meg kell jegyeznünk, hogy nem általánosíthatóak az eredményeink. A kiragadott elektrokariogramok csak az általunk vizsgált **F<sub>1</sub>**, **F<sub>2</sub>**, **F<sub>3</sub>** és **F<sub>4</sub>** reprezentáns képviselői, illetve a következő generáció elődei. Más spóráklónok spóráztatásával és azokból való utódnemzedék izolálásával lehetséges, hogy más mintázatu elektrokariogramokat kapnánk, más kromoszóma-átrendeződésekkel.



**53. ábra** Y' telomer szekvenciával kapott Southern hibridizációs mintázatok összehasonlítása néhány kiválasztott klónnál. 1.: hibrid; 2.: **F<sub>1</sub> 1c**; 3.: **F<sub>2</sub> 6a**; 4.: **F<sub>3</sub> 1b**. A \* és a kapcsos zárójel újonnan megjelenő hibridizációs sávokat jelöl.

#### 5.4.3. Molekuláris markerek a különböző kromoszómákon (PCR, PCR-RFLP)

##### -MET2 PCR-RFLP

A IV. kromoszómán lévő *MET2* gén eredetére vonatkozó PCR-RFLP analízis eredményei szerint a hibrid és minden vizsgált utódnemzedékbeli tetrad tag rendelkezik mindkét szülő génjével.

##### -ITS1-5,8S rDNS-ITS2 PCR-RFLP

A XII. kromoszómán elhelyezkedő, molekuláris markerként használt *ITS1-5,8S rDNS-ITS2* esetén a PCR-RFLP analízis során a *S. cerevisiae* eredetű DNS mindenhol megvan; az első utódnemzedék **1a** spóratagja csak ezzel rendelkezik, a második utódnemzedék **2c** tagja pedig egy plusz - egyik szülőre sem jellemző - vágóhellyel is. A többi klón hibrid-szerű mintázatot mutat: mindkét szülői eredetű DNS jelen van bennük.

##### -NTS2 PCR-RFLP

A XII. kromoszómán a ribotipizáláshoz használt másik szekvenciát csupán a hibrid és az első utódnemzedék esetében használtuk. A hibrid és az első utódnemzedék valamennyi vizsgált tagja esetén mindkét szülői eredetű szekvenciát kimutattuk.

#### -*HIS4* PCR-RFLP

A III. kromoszómán található *HIS4* gén szintén mindkét szülőtől jelen van a hibrid esetében. Az utódokban azonban kivétel nélkül csak a *S. cerevisiae*-eredetű DNS-t tudtuk kimutatni.

#### -*YCL008c* PCR-RFLP

A szintén a III. kromoszómán található *YCL008c* molekuláris analízise érdekes eredményt hozott. A hibrid mindkét szülő DNS-ével rendelkezik, az utódok között azonban csak az első utódnemzedék **1a-1b** spóra tagjai rendelkeznek hibrid-jellegű kevert DNS-sel. A tetrad többi tagja és a további utódnemzedékek tagjai is csakis a *S. cerevisiae* eredetű DNS-sel rendelkeznek.

#### -*MET10* PCR

A IV. kromoszóma *MET10* molekuláris marker vizsgálata újabb variációt hozott: az első utódnemzedék **1a-1b** spóratagjai csak *S. cerevisiae* eredetű génnel rendelkeznek, mind az **1c-1d**, mind a további utódnemzedékek vizsgált tagjai hibrid-szerűen mindkét DNS-sel bírnak.

#### -*URA3*<sub>uva</sub> PCR és *URA3*<sub>cer</sub> PCR

A *S. uvarum* eredetű mutáns *ura3<sup>-</sup>* és a *S. cerevisiae* eredetű vad *URA3* allél is jelen van mind a hibridben, mind a következő generációk valamennyi vizsgált tagjában.

A bemutatott, vizsgált molekuláris markereink esetén kapott *S. cerevisiae*-re vagy a hibridre jellemző, mindkét szülő szekvenciájának jelenléte és a szegregációjuk nem általánosítható eredmények.

Az egyes generációkból mindig csak egy-egy spóraklont ragadtunk ki, melyből a következő generációt izoláltuk. Valószínű, hogy a dolgozatban bemutatott eredményektől eltérő eredményeket is kaphattunk volna, ha egy generációból több, akár valamennyi spóraklónból izoláltunk volna következő generációkat. Ennek kivitelezése azonban nagyon időigényes lenne és túl nyúlna a doktori dolgozat keretein.

**16. táblázat** A különböző PCR-RFLP mintázatok összefoglaló összehasonlítása.

| <b>Törzs illetve<br/>spóráklón</b> | <b>MET2 PCR-RFLP</b><br>IV. kromoszóma | <b>ITS1-5,8S rDNS-ITS2 PCR-RFLP</b><br>XII. kromoszóma | <b>HIS4 PCR-RFLP</b><br>III. kromoszóma | <b>YCL008c PCR-RFLP</b><br>III. kromoszóma | <b>MET10 PCR-RFLP</b><br>IV. kromoszóma |
|------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>10-170</b>                      | <i>S. cerevisiae</i>                   | <i>S. cerevisiae</i>                                   | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | <i>S. cerevisiae</i>                    |
| <b>hibrid</b>                      | hibrid                                 | hibrid                                                 | hibrid                                  | hibrid                                     | hibrid                                  |
| <b>m9</b>                          | <i>S. uvarum</i>                       | <i>S. uvarum</i>                                       | <i>S. uvarum</i>                        | <i>S. uvarum</i>                           | <i>S. uvarum</i>                        |
| <b>F<sub>1</sub> 1a</b>            | hibrid                                 | <i>S. cerevisiae</i>                                   | <i>S. cerevisiae</i>                    | hibrid                                     | <i>S. cerevisiae</i>                    |
| <b>1b</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | hibrid                                     | <i>S. cerevisiae</i>                    |
| <b>1c</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>1d</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>F<sub>2</sub> 6a</b>            | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>6b</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>6c</b>                          | hibrid                                 | rekombináns                                            | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>6d</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>F<sub>3</sub> 1a</b>            | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>1b</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>1c</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>1d</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>F<sub>4</sub> 1a</b>            | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>1b</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>1c</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |
| <b>1d</b>                          | hibrid                                 | hibrid                                                 | <i>S. cerevisiae</i>                    | <i>S. cerevisiae</i>                       | hibrid                                  |

## 6. Eredmények megbeszélése

A *Saccharomyces* 'sensu stricto' a *Saccharomyces* genuson belül egy viszonylag egységes, a genus többi tagjaitól jól elkülöníthető élesztők alkotta csoport. A taxon homogén mivolta valószínűleg annak köszönhető, hogy tagjai később váltak el egymástól az evolúció során. A csoport tagjai morfológiájukban nagyon hasonlóak egymáshoz, fiziológiás jellegeik azonban egy fajon belül is nagy számú változékonyságot mutat. Kromoszóma számuk jellemzően legalább 16.

Az evolúció során egymástól „nem olyan régen” elvált 'sensu stricto' fajok között még nem alakult ki szigorú interspecifikus barrier. A 'sensu stricto' külön fajba sorolt tagjai ugyanis képesek egymással konjugálni, de az interspecifikus kromoszómapárosodás – néhány ritka kivételtől eltekintve - aneuploid genomot eredményez a meiózis eredményeként kialakuló spórákban. Az így létrejött spórutódók ezért életképtelenek lesznek, a hibrid tehát steril.

A *Saccharomyces*ek pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogramjukon megfigyelhető, fajra jellemző kromoszóma mintázatuk a fajon belül is igen változatos képet mutat. Mégis viszonylag biztonsággal használhatók a fajok közötti elkülönítésre. Legkönnyebben a *S. cerevisiae*, *S. bayanus* és *S. uvarum* törzsek identifikálhatók így. A természetből izolált *Saccharomyces* interspecifikus hibridek is azonosíthatók ezzel a technikával, mivel kromoszómaszámuk az eredeti 16-nál látványosan több.

Az ilyen, természetben talált interspecifikus élesztőhibridek elég ritkák és általában ezek is sterilek. Azonban leírtak már fertilis interspecifikus hibridet is, amely nagyon valószínű, hogy

allotetraploid genommal rendelkezett, az általa képzett spórák pedig allodiploidok lehettek. Ez az állapot már összeegyeztethető az étellel.

Néhány mai 'sensu stricto' csoportbeli élesztő törzs kialakulását is egy/vagy több egykori interspecifikus hibridizációs eseménnyel magyarázzák. A *S. pastorianus* vagy a *S. bayanus* genomjában (mindkét törzset interspecifikus hibridként ismerjük) egyaránt fellelhetők *S. cerevisiae*-től és egy másik *Saccharomyces* élesztőtől származó szekvenciák.

A Naumov, orosz kutató által kidolgozott spóra-spóra keresztezési technikát a csoporton belüli fajok közötti elkülönítésre, illetve rokonsági fokok megállapítására használják. A Naumov-féle spóra-spóra keresztezés során két külön fajnak feltételezett élesztő spóráit mikromanipulátorral egymáshoz olyan közel helyezik, hogy közöttük fizikai kontaktus legyen, majd néhány óra elteltével, ha megtörtént a zigóta képzés, a kialakult zigótát spóráztató táptalajra helyezik át (Naumov, 1987). Ha nem egy fajhoz tartozik a két keresztezett spóratag gyakori, hogy nem is történik zigóta képzés, vagy ezután spóráképzés. Ha a spóráképzést követő vizsgálatok alapján a szétválasztott spórák életképeseknek bizonyulnak, akkor az eredeti dogma szerint a keresztezésbe vitt két spóra egyazon faj törzseiből származhat (Naumov, 1987).

A tanszékünk által évek óta vizsgált tokaji borvidék természetes *botrytizált* mikroflórájában néha találunk olyan élesztőket is, melyek a taxonómiai tesztek alapján nem illenek be a *Saccharomyces* 'sensu stricto' egyik fájába sem. Alaposabb vizsgálatuk során pedig úgy tűnik, hogy valamely *Saccharomyces* fajok természetes hibridjével állunk szemben. Saját tapasztalataink és mások eredményei azt

mutatják, hogy az ilyen természetes hibrideknek a többsége nehezen, vagy egyáltalán nem spórázik ami megnehezíti genetikai vizsgálatukat. Annak érdekében, hogy jobban átláthassuk az interspecifikus kereszteződések genetikai és evolúciós hátterét laboratóriumban állítottunk elő néhány ilyen hibridet, mégpedig nem a faji kritériumként is használt spóra-spóra keresztezéssel (Naumov, 1987), hanem egy sokkal természetközelibb technikával, a mass-matingnek nevezett módszerrel. Ennek a lényege, az, hogy a két faj sejtjeit egyszerre oltjuk be folyékony tápközegbe, ahol szabadon konjugálhatnak egymással.

A mass-matingre alapuló keresztezésnél elengedhetetlen feltétel, hogy legyen valamilyen szelekciós rendszer a hibridek identifikálására a nem-konjugáló sejtek között. Erre a célra olyan genetikai markereket lehet felhasználni, amelyek valamilyen érzékenységet, illetve tápanyagigényt okoznak. Ha a kereszteződő törzsek markerei eltérnek egymástól, akkor a hibridjük valószínűleg nem lesz érzékeny, illetve nem fogja igényelni a kérdéses tápanyagot (komplementáció). Megpróbáltunk természetes markereket találni, vagyis olyan sajátságokat amelyek tekintetében a keresztezendő törzsek eltérnek egymástól. Ilyen érzékenységi vizsgálatot végeztünk a geneticinre, melyre a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* eltérő érzékenységet mutat. A *S. cerevisiae* törzsek ellenállóbbak, míg a *S. uvarum* törzsek érzékenyebbek. Hasonlóképpen természetes markernek lehet tekinteni a 37°C-ra, valamint a táptalaj vitamin hiányára való érzékenységet (37°C-on a *S. uvarum* nem nő; vitamin mentes táptalajon a *S. cerevisiae* nem nő). A markerek számának gyarapítása érdekében mutagenizáltuk is

a *S. uvarum* törzset, amivel auxotrófiát hoztunk létre benne. A *S. cerevisiae* partnerben már volt egy másik auxotrófia.

A dolgozatban bemutatott egyetlen, mass-matinggel készült keresztezéshez egy Tokajból izolált *S. uvarum* (általunk *ura3<sup>-</sup>* auxotrófiával ellátott) törzset kereszteztünk egy laboratóriumi *leu2<sup>-</sup>* *S. cerevisiae* törzsszel. A keresztezett *S. cerevisiae* haploid genommal rendelkezett. Érdekes sajátága volt, hogy a IV. kromoszómájának megfelelő sáv nem jelent meg a kariogramján. A jelenség mögött feltehetőleg valamilyen kromoszóma-átrendeződés állhat. A *S. uvarum* törzsünk homotallikus diploid volt. Az általuk kialakított hibrid minimál táptalajon és 37°C-on növekedett (37°C-on a *S. uvarum* nem nő [Walsh és Martin, 1977]) valamint melibiózt fermentált (ami a *S. uvarum* fajra jellemző [Vaughan Martini és Martini, 1998]). Molekuláris elemzése során kiderült, hogy 20-22 megszámlálható kromoszómával és mindkét szülő *MET2-*, *ITS1-*, *HIS4-* és *YCL008c*; PCR-RFLP mintázatával rendelkezett. Ezen kívül kimutattuk benne mindkét szülő *MET10* génjét, és *URA3* génjét. A *S. cerevisiae* specifikus Y' telomer-próba analízise kimutatta a hibridben a 10-170 *S. cerevisiae*-től kapott kromoszómák jelenlétét. Mindezek alapján elmondható, hogy a hibrid nagy valószínűséggel tartalmazza mindkét faj nukleáris genomját. Ezt a konklúziót erősítette meg az is, hogy a prototróf hibridben megtaláltuk a *S. uvarum* szülő *ura3<sup>-</sup>* mutáns alléljának, valamint a *S. cerevisiae* szülő *leu2* mutáns alléljának szekvenciáját.

Meglepődve tapasztaltuk viszont, hogy a 10-170 *S. cerevisiae* egy kromoszómáján (III) nem visel Y' telomer szekvenciákat, holott a *S. cerevisiae*-re jellemzően valamennyi kromoszómáján ki kellene tudnunk mutatni a szekvenciák meglétét (Jáger és Philipsen, 1989;

Louis és mtsi., 1994; Codón és mtsi., 1997). Valószínűleg a 10-170 ezt a kromoszómáját egy nem-*cerevisiae* őstől örökölte, például éppen egy *uvarum*-tól.

A hibrid mitokondriális DNS-e a 10-170 *S. cerevisiae* szülőtől származott. Ennek alapján úgy tűnik, hogy a genom extrakromoszómális részére nézve nem következett be hibridizáció. Természetesen nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a zigóta még tartalmazta mindkét faj mitokondriális DNS-ét, de a vegetatív szaporodás során szegregáció következett be. Ha ezt feltételezzük, akkor azt is fel kell tételeznünk, hogy azok a szegregánsok lehettek sikeresebbek, amelyekben a *S. cerevisiae* mitokondriuma maradt fenn.

A természetből izolált és a Naumov-féle spóra-spóra keresztezési módszerrel előállított interspecifikus hibridekkel ellentétben az általunk izolált hibrid nagyon jól spórázott (50%), és – ami még kivételesebb jelenség – a kapott spórákra magas spóra-életképesség (70%!) volt jellemző. Ezekből a spórákból képződött klónok (F<sub>1</sub>) pedig ugyancsak jól spóráztak így előállíthattuk a következő utódnemzedéket (F<sub>2</sub>), majd az azt követőt (F<sub>3</sub>) is az előző nemzedék spóráztatásával, és így tovább, egészen a negyedik (F<sub>4</sub>) generációig. Ahhoz azonban, hogy ilyen magas arányban kapjunk életképes spórákat a keresztezésbe vitt 10-170 *S. cerevisiae*-nek és az m9 *S. uvarum*-nak a zigótaképzése előtt, vagy alatt egy teljes genom-duplikációt kellett „csinálnia”, ugyanis csak így magyarázható, a meiózis első profázisában bekövetkezett kromoszóma-párosodás, ami nélkül a meiózis nem tud végbe menni. Ha elmarad a meiózis, vagy abnormálisan játszódik le, akkor vagy nem képződnek spórák, vagy életképtelen genommal jönnek létre (de Barros Lopez és mtsi.,

2002; Delneri és mtsi., 2003; Fisher és mtsi., 2000; Marioni és mtsi., 1999; Masneuf és mtsi., 1998; Naumov, 1987; Zambonelli és mtsi., 1997;). Esetünkben a spórák életképesek voltak, azaz a zigóta és a belőle kifejlődött hibrid ploiditásának szintje  $2n$ -nél magasabb lehetett. Nagy valószínűséggel allotetraploid. Feltételezésünket megerősítette az időközben megjelent közlemény, amelyben Sebastiani és mtsi. (2002) életképes fertilis spórákat képző interspecifikus hibridről számol be. Feltételezésük szerint a hibrid allotetraploid volt.

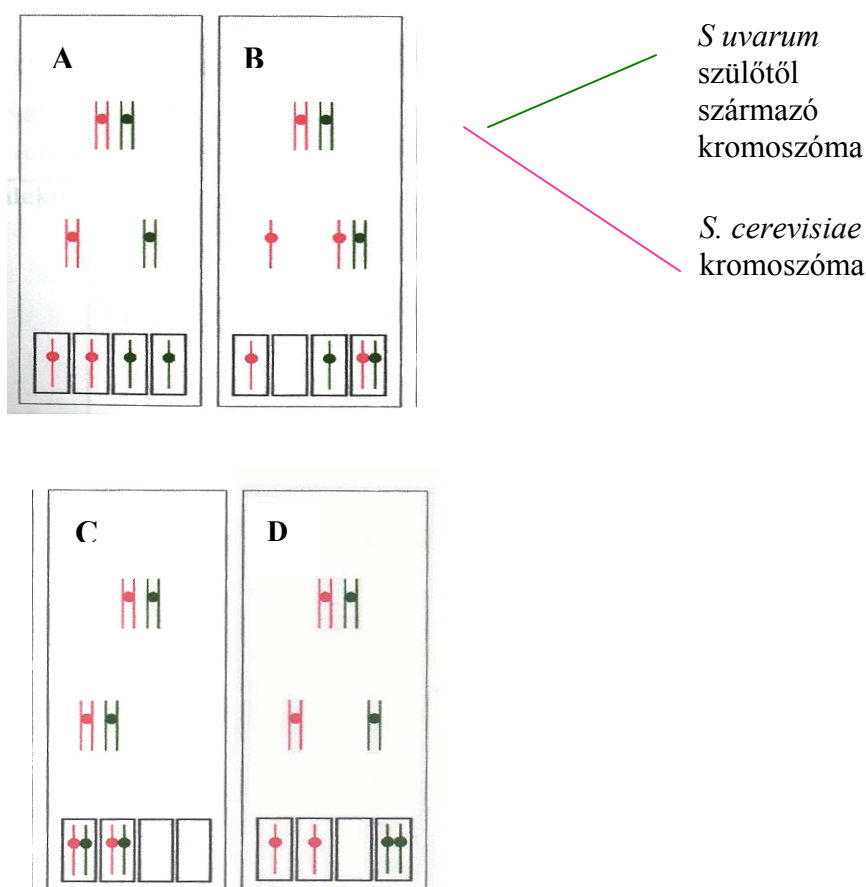
Az allotetraploidnak feltételezett hibridünk genomjának analízise érdekében elvégeztük négy utódgeneráció genetikai és molekuláris elemzését.

A 10-170 x m9 hibridből izolált  $F_1$  generáció tagjai továbbra is növekedtek  $37^\circ\text{C}$ -on, és melibióz fermentációs vizsgálatuk is a hibridhez hasonlóan pozitív volt. A geneticin érzékenység 2:2 szegregációt mutatott, ami az öröklődés monogénes jellegére utal. Minimál táptalajon az auxotróf markerek szegregációját illetően a *S. cerevisiae leu2* szintén szabályosan, ~50%-ban jelenik meg. E két jelleg 2:2-es szegregációja arra utal, hogy esetükben szétválnak a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* génjei a meiózis során. Ezzel szemben a *S. uvarum ura3<sup>-</sup>* markere nem jelenik meg az  $F_1$  spórákban. Történik ez annak ellenére, hogy a hibridben sikerült kimutatnunk a *S. uvarum ura3<sup>-</sup>* alléljének a jelenlétét. Következésképpen az *URA3* szintjén nem válik szét a két faj genomja. Tehát szabályos szegregációról vagy korai testvér kromatid szeparációról (PSSC) nem beszélhetünk (54. ábra). Mindkét esetben kellene *ura3<sup>-</sup>* spórának képződnie. A *S. uvarum ura3<sup>-</sup>* markere a későbbi generációkban sem kerül elő, ezért

az I. típusú non-diszjunkció sem lehet magyarázat az *ura3<sup>-</sup>* jelleg hiányára az F<sub>1</sub> spórákban. Az I. típusú non-diszjunkció (54. ábra C) esetünkben csak akkor állhatna fenn, ha a *S. cerevisiae* genomja egyszer zigótaképzés előtt még megduplázódna, és ekként kerülhetne *S. cerevisiae* marker az ábra két üres négyzetébe. Így 2 *S. cerevisiae* : 2 hibrid szegregációt kapnánk, amit egyébként az első utódnemzedék esetén az auxotrófia : prototrófia arányoknál és néhány molekuláris markernél is megfigyelhetünk (lsd. később). Ezek között a szegregációk között azonban nem találtunk összefüggést. Molekuláris elemzéseink alkalmával nem sikerült egyetlen esetben sem kizárólag *S. uvarum* szülőre jellemző mintázatot kapni, még az utódnemzedékek vizsgálata során többször is akadtunk csakis *S. cerevisiae* eredetű DNS-re. Erre egyelőre nem tudunk bizonyítható magyarázatot adni.

Az első utódnemzedék tagjainak elektrokariogramjai - a hibridhez hasonlóan - még rendelkeznek a két szülő összeadott kromoszómaival, sejtetve, hogy a hibrid allotetraploid lehet. Ezek az F<sub>1</sub> spórák és klónjaik tehát maguk is alloploidok. Érdekes viszont, hogy kisebb átrendeződések megfigyelhetők bennük. Szabályos, 2:2 szegregációban a harmadik legkisebb kromoszóma hiánya a 7. kromoszóma jelenlétével párosul, míg a tetrád másik két tagjában a harmadik legkisebb kromoszóma megléte párosul a 7. kromoszóma hiányával. (A kromoszómák számozását az utódnemzedékek esetében a hibrid látható kromoszómái szerint végeztük, a legkisebb kromoszómától a legnagyobb felé.) Az első utódnemzedék tagjainak harmadik kromoszómája egyébként *S. uvarum* eredetű. Elképzelhető, hogy a sikeres kromoszóma-párosodásban is szerepe lehet ennek az átrendeződésnek (A dolgozatban nem bemutatott

eredményeink szerint más *S. cerevisiae*-vel párosított m9 *S. uvarum* keresztezések esetén a kapott spóra-életképesség mindig 10% alatti volt). A vizsgált tetrádok közül  $leu2^-$  fenotípust észleltünk ott, ahol ez a kis kromoszóma hiányzott. Tehát ez a kromoszóma hordozza a *S. uvarum* *LEU2* génjét, ami a hibridben komplementálni tudta a *S. cerevisiae*  $leu2^-$  mutációját.



**54. ábra** Szegregációk típusai: A: szabályos szegregáció; B: korai testvér kromatid szeparáció (a meiózis-I. során); C: I. típusú non-diszjunkció (a meiózis-I. során); D: II. típusú non-diszjunkció (a meiózis-II. során).

Az első utódnemzedék Y'-próba analízise során annak tagjai között megjelenik két új, hibridizációt mutató sáv. Az újonnan megjelenő sávok az eredetileg *S. uvarum*-tól kapott kromoszómákon tűnnek fel: annak legkisebb kromoszómájára, illetve 15. kromoszómájára látványosan hibridizál az eredetileg *S. cerevisiae*-eredetű Y'-telomer szekvenciákat kimutatni hivatott jelölés (Lavallée és mtsi., 1994). A nagyobb mérettartományban lévő kromoszómák nem tökéletes elválasztása miatt ebben a régióban inkább a jelentős jelölődés intenzitása miatti különbségből lehet újabb hibridizációkra következtetni. A megfigyelt jelenség egy lehetséges magyarázata az, hogy a hibridben lejátszódó meiózis során rekombináció következett be a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* kromoszómái között. A rekombináció következtében *S. cerevisiae*-típusú telomerhez jutnak *S. uvarum* kromoszómák is. Ilyen rekombináció létrejöttének az a feltétele, hogy a meiózis első profázisában *S. uvarum* kromoszómák párosodjanak *S. cerevisiae* kromoszómákkal. Mivel a fajok közötti rekombinációval létrejött kromoszómákkal rendelkező spórák klónjai életképes spórákat hoztak létre, fel kell tételeznünk, hogy a rekombináció az allopoloid genom egyensúlyát nem zavarja. A fentieket összefoglalva úgy tűnik, hogy az F<sub>1</sub> spórák is allopoloidok, a számcsökkenő meiózis miatt valószínűleg allodiploidok.

Az F<sub>1</sub> utódnemzedék tagjainak diploid jellegét tűnik alátámasztani a *MET2* és *NTS2* PCR-RFLP analízis is. Az F<sub>1</sub> generáció minden vizsgált tagja rendelkezik mindkét szülőtől származó DNS-sel a vizsgált régióban. Az *ITS1* PCR-RFLP vizsgálat során az **1a** tetrádtag csupán a *S. cerevisiae* szekvenciájával rendelkezik, a többiek mindkét szülő

szekvenciájával. A *HIS4* PCR-RFLP vizsgálat szerint az F<sub>1</sub> vizsgált tagjai csak *S. cerevisiae* szülő *HIS4* génjével rendelkeznek. A *YCL008c* markert tekintve, az **1a** és az **1b** tetrád tag mindkét szülő DNS-ével, az **1c** és az **1d** tetrád tag csak *S. cerevisiae* DNS-ével rendelkezik. A *MET10* gén vizsgálata alapján pedig az **1a** és az **1b** csupán *S. cerevisiae*-eredetű génnel, az **1c** és az **1d** tetrád tagok viszont mindkét szülői eredetű génnel rendelkeznek. Összességében elmondható, hogy a *MET2*, az *NTS2*, az *ITS1*, a *YCL008c* és a *MET10* gének esetében kimutatható mindkét szülői szekvencia jelenléte a vizsgált tetrádban, ami megerősíti a korábbi feltételezésünket, hogy a hibrid allopoloid. A *MET2*-re és az *NTS2*-re nézve az F<sub>1</sub> spórák is allopoloidok. A többi génre viszont már nem mondható el ugyanez, mivel egyes spórák egyes génekre nézve „kitisztulnak”, azaz autoploiddá válnak. Talán ez a „kitisztulási” tendencia tükröződik abban is, hogy a spórák életképessége egyre nagyobb az egymást követő generációkban.

A fentiek ismeretében érdemes ismét megemlíteni, hogy a természetből izolált S6U interspecifikus élesztőhibridről is feltételeztük, hogy allotetraploid genommal rendelkezik, mivel nagyszámú életképes spórautódot hozhatott létre. A spóráit azonban egymással nem tudták konjugáltatni, és önmagukban életképtelen spórákat képeztek. Tehát az S6U hibrid első utódnemzedéke lett steril, nem maga a hibrid. Ezek a spórautódok allopoloidok lehetnek, amelyekben a meiózis már nem tudott normálisan végbemenni (C. Baccari, J. Gaine és R. Mortimer nem publikált adat). Ezzel szemben a mi eredményeink alapján a 10-170 x m9 hibrid F<sub>1</sub> utódai olyan klónok voltak, amelyekben a meiózis életképes utódokhoz vezetett. Fel kell tételeznünk, hogy bennük a meiózist megelőzően

egy diploidnál nagyobb ploiditásfok alakul ki, mely révén a meiózis végbe tud menni és a spórákba valamilyen – élettél összeegyeztethető – allopoliploid (feltételezhetően allodiploid) genom adódik tovább. Azt feltételezzük, hogy a homotallikus, önmagát spóráképzés után egyébként is diploidként fenntartó m9 *S. uvarum* genomja mellett a 10-170 *S. cerevisiae* genetikai anyaga is újra duplázódik így biztosítva a hibrid allotetraploid állapotát.

Hasonló feltételezésekhez jutottak Sebastiani és mtsi. (2002) is, akik spóra-spóra keresztezéssel egy feltételezett allotetraploid *S. uvarum* és *S. cerevisiae* interspecifikus hibridet kaptak magas spóra-életképességű első utódnemzedékkel. A kapott spórák egyikét azután visszakeresztették a haploid szülőkkel, és az így létrejött zigótát spóráztatva igen alacsony életképességű utódnemzedékhez jutottak, amely egy tetrádjának molekuláris vizsgálata annak allotriploid mivoltát bizonyította (Sebastiani és mtsi., 2002).

Hibridünk második utódnemzedékét ( $F_2$ ) az  $F_1$  tetrád egyik spórájából hoztuk létre. Emiatt természetes, hogy a legtöbb marker esetében az  $F_2$  spórák klónjai ehhez az  $F_1$  spóráklónhoz hasonlítottak. Növekednek 37°C-on, fermentálják a melibiózt és auxotrófok leucinra. A *HIS4* és *YCL008c* PCR-RFLP analízise szintén ugyanazt az eredményt adta, mint az  $F_1$  1c esetén láthattunk: minden vizsgált második utódgeneráció beli tag az *S. cerevisiae* szülőre jellemző mintázattal jellemezhető csupán. A *MET2* PCR-RFLP, az *ITS1* PCR-RFLP és a *MET10* PCR termékek elemzése kimutatta, hogy a mindkét szülőre jellemző fragment-hossz mintázattal bíró 1c-ből izolált  $F_2$  tagok hasonlóan hibrid-szerűek. Kariotípusuk is hasonló az  $F_1$  1c-hez, amennyiben hibridnek tűnnek

és a harmadik legkisebb kromoszóma hiánya állandósul bennük. A Y' telomer hibridizációs próbája alapján azonban újabb rekombinációs eseményekre következtethetünk. Ezek a rekombinációk is jellegzetesen 2:2 szegregációban jelennek meg. Egyre több *S. uvarum* eredetű kromoszóma jelölődik a *S. cerevisiae* Y' telomer szekvenciájára tervezett próbával, vagyis egyre több bizonyított fajok közötti rekombinációs eseményt detektáltunk.

A második utódnemzedék spóráképzése és a spórák életképessége, meglepetésünkre továbbra is nagyon magas volt, amiből arra gondolhatunk hogy egy autodiploidizációs folyamat játszódhat le a sejtekben a meiózis előtt, így egy stabil allodiploid F<sub>3</sub> utódnemzedéket kapunk.

A következő, harmadik generáció tagjait is egyetlen F<sub>2</sub> spórából hoztuk létre. Így itt sem meglepő az előző generáció tulajdonságainak újbóli megjelenése. Az F<sub>3</sub> tagjai is növekednek 37°C-on, fermentálják a melibiózt, illetve leucin auxotrófok valamennyien. Épp olyan PCR-RFLP mintázattal jellemezhetőek tagjai, mint az a F<sub>2</sub> **6a** esetén (a harmadik generáció ennek a második generációs spóratagnak a spóráztatásából származnak) volt jellemző. A *HIS4*, *YCL008c* PCR-RFLP analízisük csakis *S. cerevisiae*-szerű mintázatot mutatott. A *MET2*; *ITS1* PCR-RFLP és *MET10* PCR termékek mind hibrid-genomról árulkodnak. A kariotípus elemzése már nem mutat újabb átrendeződést, a második generációra jellemző 7. kromoszóma átrendeződése állandósul ebben a generációban. A Y' hibridizációs jelölődés a legtöbb kromoszómára jellemző, és nincs a vizsgált tetrád tagjai között szegregáció. A harmadik generáció tagjai is nagyon jól spóráznak,

illetve a kapott spórák életképessége majdnem 100%-os lett. Emiatt itt is fel kell tételeznünk, hogy egyfajta autodiploidizációs folyamat játszódhat le a meiózis előtt.

A negyedik generációt egyetlen  $F_3$  spóra klónjából izoláltuk, nem meglepő tehát, hogy ugyanazokkal a tulajdonságokkal jellemezhetjük, mint az előbbi, harmadik generációt. Növekedés  $37^\circ\text{C}$ -on, melibióz fermentáció, leucin auxotrófia. A *HIS4* és a *YCL008c* PCR-RFLP *S. cerevisiae*-szerű mintázatot mutatott. A *MET2*; az *ITS1* PCR-RFLP és a *MET10* PCR termékek mind hibrid-jellegűek. A negyedik generáció tagjai is jól spóráztak, kísérleteinket azonban itt abbahagytuk és újabb utódgenerációt már nem vizsgáltunk. A későbbiekben elképzelhető a kísérlet folytatása, de a harmadik generációval teljesen azonos genetikai markerek és elektrokariotípus alapján nem tűnt szükségesnek a következő generáció létrehozása és elemzése.

Úgy tűnik tehát, hogy a 10-170 x m9 hibridünk allotetraploid genommal rendelkezik. Ezért kaphattunk nála és az első utódnemzedékénél olyan magas életképességű spórákat. A hibrid genomja azonban nem stabil. A meiózis során szegregál és genomátrendeződésre hajlamos. A legérdekesebb átrendeződések és szegregációk a legelső utódnemzedékre, a hibrid közvetlen leszármazottjaira (meiózisának közvetlen termékeire) jellemzőek. A következő utódnemzedékek során fokozatos stabilizálódás figyelhető meg. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a 10-170 x m9 interspecifikus élesztőhibrid első utódnemzedéke után második, harmadik és negyedik utódnemzedékeket is izolálhattunk (további

utódnemzedékek izolálása történik majd a közeljövőben). Az utódnemzedékekben minimális kromoszómavesztést észleltünk, és a harmadik generációhoz képest a negyedik generációban már semmi kromoszóma átrendeződést sem tudtunk kimutatni. A vizsgált kromoszómákon található szondáink PCR-RFLP analízisei pedig szintén alátámasztják valamennyi generáció allodiploid mivoltát.

## 7. Összefoglalás

A Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék tagjai évek óta vizsgálják a tokaji borvidék mustjaiban jelenlévő mikroflórájának erjesztésben szerepet játszó élesztőit. Az erjesztés késői fázisában már szinte csak az alkohol toleráns *Saccharomyces* fajok maradnak meg. A legnagyobb mennyiségben kimutatható *S. cerevisiae* fajok mellett a botrytizált szőlőből készült mustokban nagy számú *S. uvarumot* is izolálunk. Néhány ritka esetben sikerült interspecifikus hibrid *Saccharomyces* fajokra is rátalálnunk, melyek elektrokariogramján legalább 22 megszámlálható kromoszómát láttunk a *Saccharomyces*ekre jellemző 16 helyett.

Az interspecifikus *Saccharomyces* élesztőhibridek egy egyszerű „véletlen” jelenségen kívül egy új faj kialakulási folyamatának evolúciós „köztes-termékei” is lehetnek. A mai *Saccharomyces* komplex egyes tagjainak kialakulását egyébként is előszeretettel magyarázzák meg a kutatók ősi fajok hibridizációs eseményeivel, amit napjaink molekuláris biológiai technikáival meg is erősítenek. Az evolúció során már szétvált *Saccharomyces* fajok közötti kereszteződés során egy post-zigotikus gát jelenségét figyelték meg. A post-zigotikus gát hátterében olyan genetikai folyamatok állnak, melyek a két külön fajba tartozó élesztők konjugációját és zigótaképzését még engedélyezik, de a hibrid kromoszómáinak az utódokba való örökítését már nem teszik lehetővé. Az, hogy a kereszteződési folyamat és zigótaképződés létrejöhessen arra utalhat, hogy nem olyan nagyon régen történt a valamikor egy fajba tartozó *Saccharomyces* élesztők külön fajjává való szétválása.

Tanszékünkön az ilyen interspecifikus hibridek létrejöttének genetikai hátterét szerettük volna vizsgálni, de a természetből izolált hibridjeink sterilitása miatt ez lehetetlen volt. Ezért keresztezési kísérletekbe kezdtünk, azonban nem a faj-kritériumként is használt spóra-spóra keresztezési technikát alkalmaztuk, hanem mass-matinggel állítottunk elő stabil interspecifikus hibrideket. Azért választottuk ezt az utóbbi technikát, mert elképzeléseink szerint a mustokban található rengeteg élesztő között is nagyobb valószínűséggel történik sejt-sejt közötti konjugáció, mint spóráképzést, és azt követő spóra-spóra kereszteződés. Ráadásul a már leírt, bizonyítottan interspecifikus hibridek genomjának vizsgálata alapján is ez tűnik valószínűbbnek.

Több, laborban előállított hibridünk közül kiválasztottuk a legmagasabb %-os spóra-életképességet mutató 10-170 x m9-et, és a dolgozatban ennek, valamint utódnemzedékeinek molekuláris-genetikai elemzését mutattuk be.

Számos, párhuzamosan végzett kísérlet alapján is ugyanarra a következtetésre jutottunk, hogy a keresztezésbe vitt 10-170 *S. cerevisiae* szülő különleges a *S. uvarum*mal való kereszteződés szempontjából, más *S. cerevisiae* törzsekkel való keresztezés esetén nem kaptunk hasonlóan magas spóra-életképességet. Ebben a különlegességben szerepet játszhat, hogy a 10-170 III. kromoszómájának telomer régiója nagy valószínűséggel nem *S. cerevisiae* eredetű, továbbá a VI. kromoszómáját sem tudtuk kimutatni.

Összesen 4 különböző kromoszómán található 5, markerként használt szekvencia PCR, valamint PCR-RFLP analízise alapján a hibridünkről bebizonyosodni látszik, hogy allotetraploid genommal

rendelkezik, utódnemzedékei pedig stabil allodiploidok. Az első utódnemzedékben gyakorta kaptunk szegregációkat: *S. cerevisiae* és hibrid tulajdonságokra. A *S. uvarum* markereit sehol sem kaptuk vissza egyedül, csakis a hibrid sajátság összetevőjeként fordult elő. A 10-170 szülő zigótaképzés előtti autodiploidizációja is nagyon valószínűnek tűnik.

Y' telomer próba analíziseinkkel fajok közötti szabályos rekombinációs eseményeket bizonyítottunk. A kísérletek eredményei szerint a *S. cerevisiae*-eredetű telomer részek generációról generációra egyre több *S. uvarum* eredetű kromoszómákra kerülnek át. Egyetlen biztos kromoszómavesztést figyelhetünk meg: az eredetileg *S. uvarum* második legkisebb kromoszómáját már az első utódnemzedék néhány tagja elveszíti, és ez tovább adódik a második generációba is. Ez a kromoszóma hordozza a *S. uvarum* vad LEU2 génjét, mely elvesztésével az utódok leu2<sup>-</sup> auxotrófok lesznek, akár a *S. cerevisiae* szülő.

A mai sörélesztő fajok keletkezését is egy *S. cerevisiae* x *S. bayanus* fajok közötti hibridizációs esemény következményeként írták le, ahol az egyik, vagy mindkét szülő eredeti kromoszómakészletének napjainkra csak részletei maradtak meg

A későbbiekben szeretnénk tokaji borvidékről izolált *S. cerevisiae* törzset Tokajból izolált *S. uvarum* törzzsel keresztezni, és az általuk képzett hibridet borászatban is kipróbálni. Az interspecifikus hibridek biotechnológiai jelentősége, hogy a kiválogatott, borászati szempontból nagyon jó tulajdonságokkal bíró élesztőfajok keresztezésével, azok előnyös tulajdonságainak kombinálódásával egy sikeresebb erjesztő hibridfajt tudnak létrehozni, melynek a genetikai állománya is stabil. Az így

létrehozott interspecifikus hibrdek *természetesen* rendelkeznek a szülők tulajdonságaival, és nem génmanipulált *mesterséges* rekombinánsok, amit a genetikailag manipulált organizmusok ellen kiálló emberek is könnyebben elfogadnak.

## 8 Summary

Yeasts, in the microflora of Tokaj vineries' grape juice, play important roles in the fermentation, has been examined by the members of the Department of Genetics and Molecular Biology of the University of Debrecen since many years. Almost only the alcohol tolerant *Saccharomyces* yeast strains survive in the must at the late fermentation phase. We have isolated a lot of *S. uvarum* strains with the most frequently presented *S. cerevisiae*, from the grape juice made by *botrytized* grape. In some very rare cases we succeeded in isolating several interspecific hybrid *Saccharomyces* strains, with at least 22 chromosomes in their electrokaryograms, instead of the typical 16 chromosomes of this genus.

These interspecific *Saccharomyces* yeast strains may be possible "mid-products" of the process of new strains arising by the evolution. Normally researchers explain the origin of some nowadays' strains of the 'sensu stricto' complex by hybridisation events between ancient yeast strains, what is verified by today's molecular biologic techniques. Researchers found the presence of a post-zygotic barrier in the course of the mating event between yeasts, already separated in the past evolution. There are genetical processes at the background of the post-zygotic barrier, which allow the conjugation and zygote formation between the two different yeast strains, but do not allow the inheritance of the hybrid genome to the descendants. The existence of this barrier may be explained by these strains' separation evolutionary events, did not happen very long time ago.

We would study the genetical background of the arising interspecific hybrids, but we could not manage it, thanks to the

sterility or the poor spore formation ability of these strains. For that reason to understand the interspecific events we started artificial crosses between *S. cerevisiae* and *S. uvarum* strains in the laboratory. We did not do the crosses by the spore to spore technique, which is also used for taxonomisation, but by the mass-mating we created stable interspecific hybrids. We chose the latter technique, because its more natural behaviour. Moreover it is likely, that the well-known, natural interspecific hybrids are also came from a crossing event between haploid or diploid cells and not between two spores.

We selected the hybrid 10-170 x m9, who has showed the best spore viability among the several artificial hybrids we made in the laboratory. In the present study we showed the molecular genetical analysis of this hybrid and its progenies. We found that the strain 10-170 *S. cerevisiae* may have a special character from the hybridisation point of view. This strain lost its VI. chromosome and does not wear Y' sequence on its III. chromosome, which can origin from an other non-*cerevisiae* ancestor. We did not find any similar results, produced by hybridisation with other *S. cerevisiae* strains for the percent of spore viability.

It seems to be verified, that our hybrid 10-170 x m9 has an allotetraploid genome and its progenies are stable allodiploid, by 5 marker sequences used in PCR and PCR-RFLP analysis on four different chromosomes. We found several 2:2 segregation among the first generations members for the hybrids and the *S. cerevisiae* parents characters. We did not find the *S. uvarum* parents auxotrophic marker or its molecular markers in any generation. The *S. uvarum* parents marker was detectable only just like a component

of the hybrid nature. We suppose the autodiploidisation of the 10-170 parent before or during the zygote formation.

We proved regular segregation between different species by the Y' telomer probe analysis. According to our results generation by generation more and more telomeric region of *S. cerevisiae* recombine onto the *S. uvarum* parents telomeric site. We noticed one chromosome lost, the originally *S. uvarum*'s second chromosome, which wears the LEU2 gene. With this chromosome lost the spore clones were *leu*<sup>-</sup> auxotrophic mutants, just like the *S. cerevisiae* parent.

Nowdays' lager yeasts' origin is explained by a hybridisation event between a *S. cerevisiae* and a possible *S. uvarum* ancestor. These strains possess only portions of one or both parental chromosome sets, resulted by the chromosome lost events.

In the near future we would like to cross *S. cerevisiae* and *S. uvarum* strains, isolated from Tokaj vineries and to try the hybrids in the fermentation.

The technological importance of the interspecific *Saccharomyces* yeast strains is that they can summarise the advanced parental properties and we can isolate a better fermentor strain, use in the vine technology, which genom is stable, thanks to the hybrids sterile character. Interspecific yeast hybrids are naturally recombinants and not genetically manipulated organisms, why people against the gene manipulated organisms can accept them easily.

## **9. Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm Dr. Sipiczki Mátyás témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított doktori munkám elvégzéséhez, valamint hasznos tanácsaival mindvégig segítette és irányította munkámat. Köszönet illeti a Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársait.

Hálásan köszönöm Dr. Huu Vang Nguyennek, hogy tanácsaival szakmai fejlődésem segítette.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm szüleimnek, hogy már gyerekkoromban belém oltották a biológia szeretetét.

## 10. Irodalomjegyzék

- 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.
- Baleiras, C.M., Vogels, J.T., Hofstra, H, Huis., J.H. és Vossen, J.M. (1995) Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. J. Appl. Bacteriol. 79: 525-535.
- Banno, I., Kaneko, Y. (1989) A genetic analysis of taxonomic relation between *Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces bayanus*. Yeast 5: 373-377.
- Barnett, J.A. (1992) The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Rees: a short review for non-taxonomists. Yeast 8: 1-23.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. (1990) Yeasts: Characteristics and Identification, 2nd edn. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- de Barros Lopes, M., Bellon, J.R., Shirley, N.J., Ganter, P.F. (2002) Evidence for a multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. FEMS Yeast Res. 1: 323-331
- Bertolini, L., Zambonelli, C., Giudici, P., Castellari, L. (1996) Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. Am. J. Enol. Vitic. 47: 343-345.

- Bisson, L.F., Kunkee, (1993) Microbial interactions during wine production. In: Mixed cultures in Biotechnology, eds. J.G. Zeikus és E.A. Johnson. New York, McGraw-Hill pp: 37-68.
- Cardinali, G. és Martini, A. (1994) Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 791-797.
- Casaregola, S., Nguyen, H.V., Lapathitis, G., Kotyk, A., Gaillardin, C. (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelometric sequence hybridisation. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1607-1618.
- Castellari, L., Feruzzi, M., Margrini, A., Giudici, P., Passarelli, P., Zambonelli, C. (1994) Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. Vitis 33: 49-52.
- Castellari, L., Pachioli, G., Zambonelli, C., Tini, V., Grazia, L. (1992) Isolation and initial characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. Italian J. Food Sci. 3: 179-186
- Caridi, A., Cufari, D. Ramondino, D. (2002) Winemaking from Gaglioppo grapes with hybrid strains of *Saccharomyces*. Folia Microbiol. 47 (4), 407-408.
- Ciolfi, G., (1994) Selezione di uno stipite di lievito *Saccharomyces* della razza fisiologica *uvarum* e suo impiego enologico allo stato secco. L'Enotecnico 71-76.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in the wine fermentation. FEMS Microbiol. Lett. 189: 81-87.

- Codón, A.C., Benítez, T. és Korhola, M. (1997) Chromosomal reorganisation during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Curr. Genet.* 32: 247-259.
- 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.
- Cuinier, C., Leveau, J.Y. (1979) Evolution de la microflore au cours de la vinification des vins de Chinon. *Vignes Vins* 283: 44-49
- 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.
- 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.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. (2000) RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rDNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78: 87-97.
- Fisher, G., James, S.A., 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) Growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed. by: G.H. Fleet. Chur. Harwood pp: 27-54..

- Frezier, V., és Dubordieu, D. (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 375-380.
- Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A., Rainieri, S. (1998) Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperature profiles. *J. Appl. Microbiol.* 84: 811-819.
- Giudici, P., Pulvirenti, A. (2002) Molecular methods for identification of wine yeasts. In: *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Ed. By M. Ciani. Research Signpost, Kerala, India. pp: 35-52.
- Guillamon, J.M., Barrio, M.E., Huerta, T., Querol, A. (1994) Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 708-714.
- Guilliermond, A. (1912) *Les Levures*. Encyclopédie Scientifique. O. Doin et. Fils., Paris.
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loperino, N. (1974) *Schizosaccharomyces pombe*, In: *Handbook of genetics*. Ed by R. C. King. Plenum Press, New York, pp: 395-446.
- Hansen, E. C. (1891) Sur la germination des spores chez les *Saccharomyces*. *Ann. Micrographic.* 3: 449-474
- Hansen J. és Kielland-Brandt M.C. (1994) *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional *MET2* alleles similar to homologous from *S. cerevisiae* and *S. monacensis*. *Gene* 140: 33-40
- Johnson, C.G. Aust, S.D. (1994) Detection of *Phanerochaete chrysosporium* in soil by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2350-1254.

- Jager, D. és Philipsen, P. (1989) Many yeast chromosomes lack the telomere-specific Y' sequence. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5754-5757.
- Johnston, J.R., Baccari, C., Mortimer, R.K. (2000) Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res. Microbiol.* 151: 583-590.
- Johnston, H.L., Mortimer, R.K. (1986) Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strain of *Saccharomyces* and other yeasts. *Int. J. Syst. Bact.* 36: 569-572.
- Kaneko, I., Banno, I. (1989) Isolation and genetic characterisation of mutants in *Saccharomyces bayanus*. *IFO Res. Comm.* 14: 104-110.
- Kielland-Brandt, M., Nillson-Tillgren, C., Gjermansen, C., Holmberg, S., Pedersen, M. B. (1995) Genetics of brewing yeasts. In: A. H. Rose, E. Wheals and J. S. Harrison (ed.), *The yeasts*. Vol: 6. Academic Press, London, United Kingdom.
- Kishimoto, M. (1994) Fermentation characteristics of hybrids between the cryophilic wine yeast *Saccharomyces bayanus* and the mesophilic wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferm. Bioeng.* 77: 432-435.
- Kishimoto, M., Goto, S. (1995) Growth temperatures and electrophoretic karyotyping as tools for practical discrimination of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41: 239-247.
- Kreger-van Rij N.J.W. (1984) *The Yeasts, a Taxonomic study*. Elsevier Science Publishers, B.V Amsterdam.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (1998) *The yeasts: a taxonomic study*, 4th edition. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1991) Phylogenetic relationship among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal DNA sequences. *Yeast* 7: 167-172.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (2003) Phylogenetic relationship among yeast of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* 1554: 1-16
- Lafon-Lafourcade, S., Larue, F., Ribéreau-Gayon, P. (1979) Evidence for the existence of „Survival Factors” as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of higher sugar concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1069-1073
- Lavallée, F., Salvas, Y., Lamy, S., Thomas, D.Y., Degre, R., Dulau, L. (1994) PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 86-91.
- Lodder, J. és Kreger-van Rij, N.J.W. (1952) *The Yeasts - a taxonomic study*. Amsterdam, North-Holland.
- Longo, E. és Vezinhet, E. (1993) Chromosomal rearrangement during vegetativ growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 322-326.
- Louis, E. J., Naumova, E. S., Lee, A., Naumov, G. I., Haber, J. E., (1994) The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* 136: 789-802.
- Marioni, G., Manuel, M., Petersen, R.F., Hvidtfeldt, J., Sulo, P., Piskur, J. (1999) Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. *J. Bact.* 181: 6488-6496.

- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Promenade, I., Aigle, M., Dubordieu, D. (2004) Inheritable nature of enological quantitative traits in demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 4: 711-719
- Masneuf, I., Aigle, M., Dubordieu, D. (1996) Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 239-244.
- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., Dubourdieu, D. (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 3887-3892.
- Masneuf, I., Murat, M.L., Naumov, G.I., Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2003) Hybrids *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of *Vitis vinifera* Sauvignon Blanc vines. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 36: 1-8.
- McCulloch, M.J., Clemons, K.V., McCusker, H.J., Stevens, D.A. (1998) Intergenic Transcribed Spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1035-1038.
- Mortimer, R., Polsinelli, M. (1999) On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150: 199-204.
- Naumov, G.I. (1987) Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts. *Stud. Mycol.* 30: 469-475.

- Naumov, G.I. (1996) Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. J. Ind. Microbiol. 17: 295-302.
- Naumov, G.I., Nikonenko, T.A. (1989) Occurrence and physiological characteristics of biological species *Saccharomyces bayanus* from hybridological analysis. Microbiol. 57: 526-530
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Korhola, M. (1992) Genetic identification of natural *Saccharomyces sensu stricto* yeasts from Finland, Holland and Slovakia. Antonie van Leeuwenhoek 61: 237-243.
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., Gaillardin, C. (1993) Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeast isolated in France and Italy. Syst. Appl. Microbiol. 16: 74-279.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Antunovics, Z, Sipiczki, M. (2002) *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 727-730.
- 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., Lépling, A., Gaillardin, C. (2000) Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. Syst. Appl. Microbiol. 23: 71-85.

- Oda, Y., Yabuki, M., Tonomura, K., Fukunaga, M. (1997) A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S-28S rDNA spacer regions. *Yeasts* 13: 1243-1250.
- O'Donnel, K., Gray, L.E. (1995) Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* phaseoli inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 709-716.
- Piskur, J. (1994) Inheritance of yeast mitochondrial genome. *Plasmid* 31: 229-241.
- Piskur, J., Mozina, S., Stenderhup, J., Bohl Petersen, M. (1995) A mitochondrial molecular marker ori-rep-tra, for differentiation of yeast species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2780-2782.
- Piskur, J., Smole, S., Petersen, R.F., Petersen, M.B. (1998) Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1015-1022.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium; novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeasts* 16: 675-729.
- Pulvirenti, A., Nguyen, H.V., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S., Zambonelli, C. (2000) *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces* sensu stricto. *FEMS Microbiol. Lett.* 192: 191-196.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramon, D. (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2948-2953.

- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. (1975) *Traité d'Enologie. Sciences et techniques du vin Vol 2.* Dunod Paris.
- Ryu, S.L., Murooka, Y., Kaneko, Y. (1996) Genomic reorganization between two sibling yeast species, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12: 757-764.
- Ryu, S.L., Murooka, Y., Kaneko, Y. (1998) Reciprocal translocation at a duplicated RPL2 loci might cause separation of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 33: 345-351.
- Schutz, M., Gafner, J. (1994) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 551-558.
- Sebastiani, F., Barberio, C., Casalone, E., Cavalieri, D., Polsinelli, M. (2002) Crosses between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* generate fertile hybrids. *Res. Microbiol.* 153: 53-58.
- Sinohara, T., Saito, K., Yanagida, F., Goto, S. (1994) Selection and hybridisation of wine yeasts from improved winemaking properties: fermentation rate and aroma productivity. *J. Ferment. Bioenerg.* 77: 428-431.
- Sipiczki, M. (2002) Taxonomic and physiological diversity of *Saccharomyces bayanus*. In. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Ed. By M. Ciani. Research Signpost, Kerala, India. pp: 53-69..

- Sipiczki, M., Ferenczy, L. (1977) Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating type. *Mol. Gen. Genet.* 151: 77-81.
- Sipiczki, M., Miklos, I., Leveleki, L., Antunovics, Z. (2000) Genetic and chromosomal stability of wine yeasts. In: *Food Microbiology Protocols*. Ed. by J.F.T. Spencer és A.L Ragout de Spencer, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. pp: 1-9.
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., Antunovics, Z. (2001) Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 97-105.
- Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. (1997) The Yeasts: Sex and nonsex. Life Cycles, Sporulation and Genetics. In: *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Ed. By J.F.T. Spencer és D.M. Spencer, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg pp: 133-152.
- Stokes, J.L. (1971) Influence of temperature on growth and metabolism of yeasts. In *The Yeasts*, Vol. 2. Ed. by A.H. Rose és J.S. Harrison. London and New York: Academic Press. pp. 119-134.
- Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H., Kaneko, Y. (1998) Co-existence of 2 types of chromosome in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* 10: 923-933.
- Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C.P. (1985) Deoxiribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces* sensu stricto. *Int. J. System. Bact.* 35: 508-511.
- 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 for the genus *Saccharomyces*. System. Appl. Microbiol. 16: 113-119.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1998) *Saccharomyces* Meyen ex Rees. In: The yeasts, a taxonomic study. Ed by C.P. Kurtzman, és J.W. Fell, Elsevier Science B.V., Amsterdam. pp: 358-371.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A., Cardinali, G. (1993) Electrophoretic karyotyping as a tool in the genus *Saccharomyces*. Antonie van Leeuwenhoek 63: 145-156.
- Vezinhet, F., Blondin, B., Hallet, J.N. (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tool for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 568-571.
- Walsh, R.M., Martin, P.A. (1977) Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a gradient temperature incubator, J. Inst. Brew. 83: 169-175.
- Williams, D.W., Wilson, M.A., Potts, A.J. (1995) Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment lenght polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. J. Clin. Microbiol. 33: 2476-2479.
- White, M. (1978) Modes of speciation. Freeman, San Francisco, 1978.
- Wolfe, K.H., Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. Nature 387: 708-713.
- Yarrow, D., Nakase, T. (1975) DNA base composition of species of the genus *Saccharomyces*. Antonie van Leeuwenhoek 41: 81-88
- Zambonelli, C., Passarelli, P., Rainieri, S., Bertolini, L. (1997) Technological properties and temperature response of interspecific *Saccharomyces* hybrids. J. Sci. Agric. 74: 4-12.

- Zambonelli, C., Passarelli, P., Rainieri, S., Giudici, P. (1993)  
Taxonomic and technological implications of sterility in hybrids  
from cryotolerant and non-cryotolerant *Saccharomyces* strains.  
Ann. Microbiol. Enzimol. 43: 217-223.
- Zolan, M.E. (1995) Chromosome-length polymorphism in fungi.  
Microbiol. Reviews 59: 686-698.

## 11. A doktori munka során megjelent publikációk

### Cikkek:

- Z. **Antunovics**, H. Csoma, M. Sipiczki (2003) Molecular and genetic analysis of the yeast flora of botrytized Tokaj wines. Bulletin de l'O.I.V. Vol. 76: 380-397.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., **Antunovics**, Z., Sipiczki, M. (2002) *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 727-730.
- Sipiczki, M., Miklos, I., Leveleki, L., **Antunovics**, Z. (2000) Genetic and chromosomal stability of wine yeasts. In: Food Microbiology Protocols. Ed. by J.F.T. Spencer, és A.L Ragout de Spencer, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. pp: 1-9.
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., **Antunovics**, Z. (2001) Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. Antonie van Leeuwenhoek 79: 97-105.

### Előadások:

- Antunovics** Zs., Sipiczki M. *Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces uvarum* fajok közötti keresztezésből származó stabil hibridek és utódaik genetikai vizsgálata. Magyar Genetikusok Egyesülete, Szeged, 2003.
- Antunovics** Zs., Sipiczki M. Tokajból izolált *Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces uvarum* fajok közötti mesterséges hibridek és utódaik molekuláris genetikai vizsgálata. Tudomány Napja Konferencia, Debrecen, 2003.

**Z. Antunovics**, M. Sipiczki Study of fertile hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* XXVIIIth Congress of Vine and Wine. Vienna, 2004.

**Antunovics Zs.**, Sipiczki M. Interspecifikus *Saccharomyces* élesztő hibridek molekuláris genetikai vizsgálata Tudomány Napja Konferencia, Debrecen, 2004.

#### **Poszterek:**

**Antunovics, Z.**, Sipiczki, M. Analysis and hybridisation of *Saccharomyces bayanus* from Tokaj wine. Acta. Microbiol. Immunol. Hung. 49: 409, 2002

**Antunovics, Z.**, Nguyen, H-V., Gaillardin, C. Sipiczki, M. Hybridisation between *S. uvarum* and *S. cerevisiae* gives stable, fertile hybrids. Young researchers Marie Curie meeting. Paris, 2003.

**Antunovics, Z.**, Irinyi, L., Sipiczki, M. Molecular taxonomic analysis of *Saccharomyces bayanus*-like yeast strains from Tokaj. XXVIIIth Congress of Vine and Wine. Vienna, Congress Abstracts p. 105, 2004.

**Antunovics, Z.**, Remenyik, Z., Radacsi, A., Sipiczki, M. Genetic segregation of hybrids of *Saccharomyces uvarum* wine strains with *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains. XIth International Congress on Yeasts, Rio de Janeiro, Book of Abstracts p. 132, 2004.

*Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces uvarum*  
interspecifikus fertilis hibridjének és néhány  
utódnemzedékének molekuláris genetikai vizsgálata

Értekezést a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a BIOLÓGIA tudományágban

Írta: Antunovics Zsuzsa  
okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Biológiai doktori iskolája  
(Bioreguláció Molekuláris és Fiziológiai Szerveződése és  
Biotechnológiai vonatkozásai programja) keretében

Témavezető: Dr. Sipiczki Mátyas

A doktori szigorlati bizottság:

|        |          |       |
|--------|----------|-------|
| elnök: | Dr. .... | ..... |
| tagok: | Dr. .... | ..... |
|        | Dr. .... | ..... |

A doktori szigorlat időpontja: 200... ..

Az értekezés bírálói:

|          |       |
|----------|-------|
| Dr. .... | ..... |
| Dr. .... | ..... |
| Dr. .... | ..... |

A bírálóbizottság:

|        |          |       |
|--------|----------|-------|
| elnök: | Dr. .... | ..... |
| tagok: | Dr. .... | ..... |
|        | Dr. .... | ..... |
|        | Dr. .... | ..... |
|        | Dr. .... | ..... |

Az értekezés védésének időpontja: 200... ..