

ASPERGILLUS NIDULANS ÉS *ASPERGILLUS QUADRILINEATUS*
ÖSSZEHASONLÍTÓ GENETIKAI ÉS BIOKÉMIAI ANALÍZISE

Készítette: Varga János
JATE Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

1990

TARTALOMJEGYZÉK

	TARTALOMJEGYZÉK	i
	RÖVIDÍTÉSEK	iii
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	iv
I.	BEVEZETÉS	1
II.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
II.1.	Interspecifikus hibridek létrehozása az <i>Aspergillus</i> nemzetségen belül	2
II.2.	Szegregációs analízis fajok közötti hibridekben	3
II.3.	Molekuláris markerek analízise	5
II.3.1.	Fehérje- és izoenzimanalízis	6
II.3.2.	RFLP-analízis	11
II.3.2.1.	Az RFLP-k alkalmazásai: Magi RFLP-k	13
II.3.2.2.	Az RFLP-k alkalmazásai: Mitokondriális RFLP-k	16
III.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
III.1.	Törzsek	19
III.2.	Táptalajok, tápközegek	20
III.3.	Protoplasztképzés, protoplasztfúzió	22
III.4.	Haploidizálás	22
III.5.	Izoenzimanalízis	24
III.6.	DNS-izolálás	25
III.6.1.	Össz DNS izolálása <i>Aspergillus</i> törzsekből	25
III.6.2.	Plazmid-DNS tisztítása <i>E. coli</i> -ből	27
III.7.	Baktérium-transzformáció	28
III.8.	Restrikciós emésztés, DNS-elektroforézis	29

III.9.	DNS-DNS hibridizálás	30
III.9.1.	A DNS átvitele a gélről nylon membránra	30
III.9.2.	DNS-jelölés	30
III.9.3.	Hibridizálás, autoradiográfia	31
IV.	EREDMÉNYEK	32
IV.1.	Haploidizálás	32
IV.2.	A szülői markerek megoszlása a szegregánsokban	42
IV.3.	Izoenzimanalízis	49
IV.4.	A szegregánsok RFLP-analízise	55
V.	ÖSSZEFOGLALÁS	60
VI.	IRODALOMJEGYZÉK	63

RÖVIDÍTÉSEK

ACP	savas foszfatáz
ADH	alkohol-dehidrogenáz
ALP	alkalikus foszfatáz
BSA	szarvasmarha szérumalbumin
Cat	kataláz
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
EST	arilészteráz
GDH	glutamát-dehidrogenáz
kbp	1000 bázispár
LDH	laktát-dehidrogenáz
MDH	malát-dehidrogenáz
NAD	nikotinsavamid adenin dinukleotid
NADP	nikotinsavamid adenin dinukleotid foszfát
PVP	polivinil-pirrolidon
RFLP	restrikciós fragment hossz polimorfizmus
RNáz	ribonukleáz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Tris	Tris(hidroximetil)aminometán

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Ferenczy Lajos tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki doktori értekezésem elkészítését lehetővé tette, elméleti és gyakorlati tanácsaival messzemenően támogatta. Hálával tartozom Dr. James H. Croftnak, akinek laboratóriumában elkezdhettem ezt a munkát, megtanulhattam az alapvető molekuláris technikákat, és Dr. Kálmánné Tóth Évának, akitől az izoenzimanalízis módszerét sajátíthattam el.

Köszönettel tartozom Szabóné Csanádi Katalin, Dobrovichné Ágoston Éva és Petrina Erzsébet laboránsoknak pontos és figyelmes munkájukért, Nagy Lajos Gergelynek az ábraanyag elkészítésében nyújtott segítségéért, és a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának tanácsaikért, munkám iránt tanúsított figyelmükért.

I. BEVEZETÉS

A nagy gyakorisággal indukált protoplasztfúziót fonalagombáknál először 1975-ben írták le Ferenczy és munkatársai (1975a, 1975b), valamint Anné és Peberdy (1975). Azóta számos fajra kidolgozták már ezt a módszert (megközelítőleg teljes irodalmi áttekintést ad Ferenczy 1986-os cikke, valamint Peberdy 1989-es összefoglalója). Közeli fajok fúziós termékei közül az *Aspergillus nidulans* fajcsoportba tartozó fajok között létrehozott hibrideket vizsgálták kiterjedten. Az *A. nidulans* x *A. rugulosus* és az *A. nidulans* x *A. nidulans* var. *echinulatus* hibridek esetében a klasszikus morfológiai, rezisztencia- és auxotróf markerek analízisét végezték el. A markerek új generációja, a molekuláris markerek - izoenzimek, mitokondriális és genomiális restrikciós fragment hossz polimorfizmusok (RFLP-k) - vizsgálatát csak néhány esetben alkalmazták interspecifikus hibridek analízise során.

Munkánk során egy *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus quadrilineatus* törzs között protoplasztfúzióval létrehozott hibrid analízisét végeztük el. A hibridet ("interspecifikus allodiploidot") különféle szegregáltató-anyagok jelenlétében haploidizáltuk, majd a létrejött szegregánsokat vizsgáltuk. Izoenzim- és RFLP-analízisnek vetettük alá a szegregánsok egy részét, hogy adatokat nyerjünk a szegregáció mechanizmusáról interspecifikus hibridek esetében.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. Interspecifikus hibridek létrehozása az *Aspergillus* nemzetségen belül

Az *Aspergillus* nemzetség különböző fajba tartozó törzsei közötti sikeres hibridizációs kísérletek nagy részét az *Aspergillus nidulans* fajcsoportba tartozó fajok között végezték. Az ide tartozó *A. nidulans*, *A. nidulans* var. *echinulatus*, *A. quadrilineatus*, *A. rugulosus*, *A. violaceus* fajok között Kevei és Peberdy (1977, 1984), ill. Kevei (1980) hozott létre sikerrel heterokaryonokat ill. allodiploid hibrideket, kivéve az *A. quadrilineatus* - *A. violaceus* és az *A. quadrilineatus* - *A. nidulans* var. *echinulatus* párosításokat. Ez utóbbi párosítás esetében Croft és Dales (1983) sikerrel hozott létre fúziós hibridet, így valószínű, hogy ezen öt faj bármilyen párosítása esetében szomatikus hibridet lehet előállítani. Croft és Dales (1983) szomatikus hibridet hozott létre *A. nidulans* és *A. nidulans* var. *acristatus*, ill. *A. nidulans* és *A. nidulans* var. *latus* törzsek között is, míg az *A. nidulans* - *A. stellatus*, *A. nidulans* - *A. unguis* és *A. nidulans* - *A. heterothallicus* kombinációk esetében nem kaptak fúziós terméket.

Távolabbi rokonságban lévő fajok fúziója esetében Croft és Dales (1983) negatív eredményeket kaptak, amikor *A. nidulans*-t próbáltak hibridizálni számos más *Aspergillus* génuszba tartozó fajjal (*A. terreus*, *A. versicolor*, *A. amstelodami*, *A. niger*); ez az eredmény ellentétes a

Penicillium nemzetség esetében észleltekkkel, ahol távoli rokonságban lévő fajok fúzióját több esetben is sikerrel hajtották végre pl. *P. chrysogenum* és *P. baarnense* között Mellon és mtsi (1983), *P. citrinum* és *P. cyaneo-fulvum* között Anné és Eyssen (1978), *P. chrysogenum* és *P. roqueforti* között Anné és Peberdy (1981).

Sikeres távoli fajok közötti fúziót írt le Ferenczy (1976) *A. nidulans* és *A. fumigatus*, Liang és Chen (1987) *A. niger* és *A. ficuum*, ill. *A. niger* és *A. oryzae* törzsek között.

II.2. Szegregációs analízis fajok közötti hibridekben

Az *Aspergillus* nemzetség fajai között létrehozott interspecifikus hibridek közül részletesebben az *A. nidulans* x *A. rugulosus* (Kevei és Peberdy, 1977, 1979, 1984; Bradshaw és mtsi, 1983) és az *A. nidulans* x *A. nidulans* var. *echinulatus* (Croft és mtsi, 1983; Croft és Dales, 1983; Croft, 1987) hibrideket vizsgálták. Az előbbi hibrid esetében az *A. nidulans* faj egy ún. "master"-törzsét (olyan törzs, mely valamennyi kromoszómáján hordoz szelektálható markereket) fuzionáltatták egy *A. rugulosus* törzssel, és a hibridet klorálhidrát ill. benomyl jelenlétében szegregáltatták (Kevei és Peberdy, 1979). A szegregánsokban az *A. nidulans* kromoszómák eloszlása véletlenszerű volt. A vizsgálatok alátámasztották azt a feltevést, mely szerint ez a két faj közeli rokonságban áll egymással. Bradshaw és mtsi (1983) egy *A. nidulans* "master"-törzset és az *A. rugulosus* faj több törzsét hibridizáltatták. A különböző kromoszómán lokalizált *A.*

nidulans gének minden kombinációban mutattak bizonyos fokú neokombinációt, de a szülői típusokat nagyobb arányban észlelték, mint az új kombinációkat. Ezt a két genom közti interspecifikus inkompatibilitással magyarázták. A szegregánsok vizsgálatából arra következtettek, hogy az *A. rugulosus* kromoszómaszáma eltér az *A. nidulans*-étől; az ún. homológia-térkép alapján három *A. rugulosus* kapcsoltsági csoport maradt azonosítatlan, így összesen 10 kromoszóma jelenlétét mutatták ki (Bradshaw és mtsi, 1983). Mivel a szegregánsok szexuális keresztezésekben nem voltak teljesen fertilisek, a két taxon külön fajnak tekintését indokoltnak tartják.

Az *A. nidulans* x *A. nidulans* var. *echinulatus* hibrid vizsgálata során Croft és Dales (1983) minden vizsgált marker esetében észlelt allélikus szegregációt a haploid utódokban, bár az allélarányok erősen eltértek a Mendel-törvények alapján vártaktól. Az *A. nidulans* III., V. és VIII. kromoszómáján lokalizált gének együtt szegregáltak; ezen kapcsoltsági csoportok esetében csak a szülői típust tudták izolálni. Ebből arra következtettek, hogy az *A. nidulans* var. *echinulatus* komplex transzlokációkat hordoz az *A. nidulans* III., V. és VIII. kapcsoltsági csoportjának megfelelő kromoszómáin. A részletesebb analízis további struktúrális különbségeket tárt fel, így eltér a két taxon az *A. nidulans* II., IV., VII. kromoszómájának megfelelő *A. nidulans* var. *echinulatus* kromoszómákon, és az *A. nidulans* var. *echinulatus* III.-V.-VIII. kromoszómakomplexén lokalizált heterokaryon inkompatibilitási (*het*) génekben is (Croft, 1987).

Egy *A. nidulans* és *A. quadrilineatus* törzsek között létrehozott fúziós terméket Dales és Croft (1983) vizsgált. Heterokaryotikus telepek (vöröses pigmentet termelő konídiummentes micéliumszövedék) mellett az *A. nidulans* I. kromoszómájának diszómiáját hordozó aneuploidokhoz igen hasonló morfológiát mutató szektorokat is észleltek, melyek valószínűleg interspecifikus aneuploidok voltak.

II.3. Molekuláris markerek analízise

Bármely szervezet genetikai analízise pontos, könnyen követhető markereket igényel. A múltban, mivel a természetben jelenlévő markerek nem voltak kielégítőek, mutagenézist használtak auxotróf, morfológiai ill. antibiotikum-rezisztens mutánsok előállítására. Ezen mutánsok segítségével számos aszkuszos gomba (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*) esetében hoztak létre viszonylag részletes genetikai térképeket, ill. alakítottak ki modellrendszereket a további genetikai analízisekhez. Újabban a molekuláris technikák fejlődése révén a lehetséges markerek újabb fajtái kerültek felszínre, melyek további kiterjedt analízist tesznek lehetővé fonalagombákban. Ilyenek az izoenzimek, mitokondriális, nukleáris ill. plazmidon kódolt RFLP-k, plazmidok és kétszálú RNS-molekulák jelenléte ill. hiánya. A molekuláris markereknek több előnye van:

1. számos markert lehet azonosítani;
2. a legtöbb molekuláris marker kodomináns (tehát a homozigóták elkülöníthetők a heterozigótáktól);

3. általában nincs káros ill. episztatikus hatásuk, több markert lehet vizsgálni egyidőben;
4. számos allél létezhet egyetlen marker esetében is;
5. az RFLP-markerek mint startpontok szolgálhatnak kromoszómatérképező stratégiákhoz.

A két leggyakrabban vizsgált molekuláris markertípus a fehérjék vizsgálata során detektálható izoenzim polimorfizmus és a DNS-analízisen alapuló restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP).

II.3.1. Fehérje- és izoenzimanalízis

A fehérjék kivonásának, elválasztásának metodikáját már igen korán kidolgozták; a sejtekből különböző anyagokkal (szerves oldószerek, mint pl. az etanol ill. aceton, detergenssek, víz) kioldott fehérjéket általában elektroforézissel választják el, és az így nyert protein-mintázatot vizsgálják. A fonalagombák körében Bent (1967) *Penicillium*, Chang és mtsi (1962) *Neurospora*, Glynn és Reid (1969) *Fusarium* fajok fehérjeösszetételét vizsgálták, és minden esetben sikerült fajok közötti polimorfizmusokat kimutatniuk. Az *Aspergillus* génusz fehérjéi közül Kulik és Brooks (1970) a vízben oldható fehérjéket vizsgálta, és jelentős inter- és intraspecifikus eltéréseket észlelt. Sorenson és mtsi (1971) is hasonló megfigyelést tettek öt fajra (*A. terreus*, *A. carneus*, *A. wentii*, *A. oryzae* és *A. flavus*) kiterjedő vizsgálatuk során, de a meglevő különbségeket nem találták elégségesnek, ahhoz, hogy a

fajokat megbízhatóan el lehessen különíteni csupán fehérjemintázatuk alapján.

A fehérjemintázatok vizsgálatánál hatékonyabb módszerek bizonyult egy adott enzim különböző formáinak, az ún. izoenzimeknek az analízise a közeli rokonságban lévő fajok ill. törzsek elkülönítésére. Az izoenzimek többféleképpen jöhetnek létre:

- a. több génlokusz különböző, de azonos funkciót ellátó polipeptidláncot kódol;
- b. egy lokusznak több allélja hozza létre a különböző formákat;
- c. poszt-transzlációs módosítások következményeként jönnek létre az ún. másodlagos izoenzimek (ilyen módosulások lehetnek pl. alkilezés, glikozilezés, a fehérjék amino-csoportjainak acilezése).

Az elmúlt 30 év során alakultak ki azok a technikák, melyek segítségével az izoenzimek analizálhatók. A sejthomogenizátumok fehérjéit poliakrilamid ill. keményítőgélen szeparálják, majd a gélt festik a specifikus enzimsávok megjelenítése érdekében. Az aminosavtartalom megváltozása hatással lehet a fehérje töltésviszonyaira ill. konformációjára, így megváltozik elektroforetikus mobilitása is. Bár több mint 57 enzim detektálására vannak megfelelő receptek, általában kevesebb mint 15 enzimrendszert találtak hasznosnak, de a legtöbb gombán végzett vizsgálatban még kevesebbet alkalmaztak. Ennek egyik oka, hogy minden enzimhez külön meg kell határozni az optimális extrahálási és pufferelési feltételeket.

A gombák több csoportját vizsgálták, általában taxonómiai céllal izoenzimösszetétel szempontjából. Összehasonlító munkák jelentek meg pl. *Penicillium* (Cruickshank és Pitt, 1987), *Sclerotinia* (Cruickshank, 1983), *Phytophthora* (Nygaard és mtsi, 1989), *Trichoderma* és *Gliocladium* (Stasz és mtsi, 1988), *Fusarium* (Kaiser és Gupta, 1976), *Phytium*, *Phytophthora*, *Saccharomyces*, *Fusarium* (Clare és mtsi, 1968) nemzetségek és több más fajcsoport, izolátum ill. génusz izoenzim-analíziséről.

Az *Aspergillus* génuszba tartozó fajokat is kiterjedten vizsgálták. Fajok közötti izoenzim-polimorfizmusokat észlelt Neelson és Garber (1967) az észterázok, foszfatázok és a leucin-aminopeptidázok mintázatában az *Aspergillus* nemzetség 15 faját reprezentáló 32 törzset vizsgálva; négy faj esetében intraspecifikus variabilitást is kimutatott, bár valamennyi polimorfizmust mutató faj esetében voltak a mintázatnak olyan invariábilis sávjai, melyek a fajra jellemzőek, és valamennyi, az adott fajba tartozó törzs mintázatában jelen voltak. Garber és Rippon (1968) 79 *A. nidulans* törzs észteráz és foszfatáz zimogramjait összevetve azt tapasztalta, hogy csupán két törzs tért el a többi törzsre (és ezzel együtt az *A. nidulans* fajra) jellemző mintázattól, 11 *A. heterothallicus* törzs hasonló vizsgálata során pedig egyáltalán nem észleltek polimorfizmust. Nasuno (1971) *A. nidulans*, *A. ustus* törzsekben két, míg a többi kilenc vizsgált *Aspergillus* faj esetében egy alkalikus proteáz jelenlétét mutatta ki, de intraspecifikus polimorfizmust nem észlelt a vizsgált fajokban. Hasonlóan fajspecifikusnak találta Nasuno (1972,

1973) az alkalikus proteínáz, celluláz, pektin-liáz és savas proteínáz zimogramokat *A. sojae* és *A. oryzae* fajokban. Ugyanakkor az amilázt, neutrális proteínázt, α - és β -glukozidázt, α - és β -galaktozidázt, valamint a leucin-aminopeptidázt alkalmatlannak találta a két vizsgált faj esetében taxonómiai célokra. Schmidt és mtsi (1977) *A. flavus* és *A. parasiticus* törzsek α -, β -arilészterázait és peroxidázát vizsgálta, és nem talált összefüggést az enzimaktivitások és az aflatoxin-termelés ill. nemtermelés, a szkleróciumok jelenléte, valamint a pigmentáltság foka között. Vasu és mtsi (1972) a ribonukleázok vizsgálata során ezt az enzimet hasznosnak találták az *Aspergillus* génusz fajcsoportjainak elkülönítésére. Kevei (1980), valamint Kevei és Peberdy (1985) *A. nidulans* és *A. rugulosus* törzsek észteráz zimogramjai között észlelt mind inter-, mind intraspecifikus eltéréseket. Fajok közötti és fajon belüli polimorfizmust egyaránt észlelt Kurzeja és Garber (1973) az amilázok, foszfatázok és aril-észterázok izoenzim-mintázatainak vizsgálata során. Az *A. nidulans* faj 90 különböző törzsét elemezték, és azt találták, hogy a vizsgált törzsek 90%-a (81 törzs) azonos foszfatáz- és észteráz-mintázatot mutat, míg amiláz-patternjeik kétfélék voltak. A két különböző amilázmintázatot mutató csoportba tartozó törzseket keresztezve heterokaryont, majd hibrid kleisztotéciumokat nyertek, bizonyítva ezzel, hogy egy fajról van szó. A fennmaradó kilenc törzs hét különféle mintázatot adott mind a három vizsgált enzim esetében. Ezeket a törzseket a szerzők kriptikus, illetve ún. "sibling" fajoknak tartják, melyek elkülönítésére igen

alkalmas módszerként írják le az izoenzimvizsgálatokat. De Souza és mtsi (1977) az *A. flavus* észteráz izoenzimjei esetében mutattak ki intraspecifikus variabilitást. Tsujita és Endo (1977) az *A. oryzae* törzsei között észlelt különbséget az extracelluláris savas proteázok esetében; szerintük a polipeptidláncokhoz kapcsolódó eltérő tulajdonságú poliszaharidok okozzák ezen enzimek heterogenitását. Martinelli és Bainbridge (1974) a fenoloxidázok heterogenitását írta le *A. nidulans* vad és mutáns törzseit vizsgálva. Sharma és mtsi (1988) a β -glukozidázok vizsgálata során észleltek izoenzim-polimorfizmust az *Aspergillus nidulans* fajon belül, és különböző *Aspergillus* fajok között is.

Az izoenzimanalízist felhasználták fajok közötti hibridek vizsgálata során is; Anné és Peberdy (1981) a *Penicillium chrysogenum* és a *Penicillium roqueforti* fajok közötti hibridjét és annak szegregánsait elemezte ezzel a módszerrel. Szinte valamennyi vizsgált enzim esetében eltérő izoenzimképet kaptak a két szülői törzsre; a hibridben és a szegregánsokban hol az egyik, hol a másik szülő mintázata uralkodott, néha a kettő keverékét kapták, míg egyes esetekben új, nem szülői izoenzimsávokat is észleltek. Tóth és mtsi (1986) az *A. nidulans* fajcsoportba tartozó négy faj (*A. quadrilineatus*, *A. nidulans* var. *echinulatus*, *A. violaceus*, *A. rugulosus*) *A. nidulans*-sal képzett hibridjeit, ill. az *A. nidulans* x *A. rugulosus* hibrid egyes szegregánsait vizsgálták izoenzimanalízissel. A szülői törzsek a legtöbb vizsgált enzimre különböző mintázatot adtak, a hibridekben pedig mindkét szülő

enzimsávjai előfordultak, míg egyes enzimeknél új izoenzimformák jelentek meg, melyek a két szülői genom kölcsönhatására utalnak az allodiploid hibrid sejtmagban. Szintén laboratóriumunkban az *Aspergillus nidulans* faj különböző vad típusú és mutáns, haploid és diploid törzseinek vizsgálata során nem észleltünk intraspecifikus variabilitást a savas foszfatáz, α - és β -amilészterázok, kataláz, NAD- és NADP-függő malát dehidrogenáz, glutamát dehidrogenáz, szuperoxid-dizmutáz esetében.

II.3.2. RFLP-analízis

A DNS-molekula polimorfizmusát elvileg többféle-képpen lehet detektálni, pl. szekvenciaanalízissel, vagy a molekula fizikai paramétereinek a mérésével. A gyakorlatban a restrikciós enzimekkel való emésztés a legcélravezetőbb megközelítés a variabilitás detektálására, bár így a szekvenciának csak egy kis részét vizsgálhatjuk. Mivel a restrikciós enzimek specifikus felismerőhellyel rendelkeznek a DNS-molekulán, ezért a DNS-szekvencia megváltozása az adott hasítóhely eltűnésével, ill. egy új hely létrejöttével járhat, vagy a hasítás után kapott fragmentek mérete megváltozik. A homológ kromoszómák megfelelő régióinak emésztése során létrejött restrikciós fragmentek mérete közötti különbségeket restrikciós fragment hossz polimorfizmusnak ("restriction fragment length polymorphism", RFLP) nevezzük. Az izoenzimeknek és az RFLP-knek eltérő technikai háttérigényük van; a DNS-preparálás időigényesebb és nehezebb is megfelelő tisztaságú DNS-t

előállítani, mint fehérjét, melynél egy egyszerű sejthomogenizátum elégséges az izoenzimdetektáláshoz. Ez behatárolja az RFLP-analízisnek alávethető egyedek számát. Az izolált DNS azonban hosszú ideig tárolható, és a nylon-membránhoz kötött DNS-mintát legalább tízszer vagy még többször lehet újabb próbákkal hibridizálni. Így 50 µg DNS-t több mint százszor lehet hibridizálni. Ennek alapján elmondható, hogy ha egyszer az idő- és munkaigényes izoláláson túljutottunk, az RFLP-analízissel több információhoz juthatunk.

Az RFLP-detektálás lépései általában:

1. a genomiális DNS tisztítása;
2. a genomiális DNS hasítása II. típusú restrikciós endonukleázokkal;
3. a fragmentek méret szerinti frakcionálása agaróz gél elektroforézissel;
4. a fragmentek átvitele nylon vagy nitrocellulóz membránra (ún. Southern-blot);
5. specifikus próba hibridizálása;
6. autoradiográfia.

Alternatív megoldások (direkt hibridizálás a géltre, ill. klónozott homológ szekvenciák gélen történő összehasonlítása) ritkábban kerülnek alkalmazásra. Néhány laboratóriumban sikerrel hasonlították össze különböző fajok ill. izolátumok össz DNS-ének hasítási mintázatát közvetlenül, hibridizáció nélkül; így mitokondriális és magi eredetű (a *Candida albicans* esetében bizonyítottan mitokondriális és riboszómális DNS-ből származó; Wills és mtsi, 1984) repetitív szekvenciákat észleltek (Klich és

Mullaney, 1987). A repetitív DNS szekvenciák a *Fusarium* (Coddington és mtsi, 1987), *Phytophthora* (Panabiéres és mtsi, 1989), *Candida* (Smith és mtsi, 1989; Scherer és Stevens, 1987, 1988) génusz és az *Aspergillus flavus* fajcsoport (Gomi és mtsi, 1989) izolátumainak elkülönítésére bizonyultak alkalmasnak. A legtöbb esetben mind intra-, mind interspecifikus variabilitást észleltek a szerzők.

II.3.2.1. Az RFLP-k alkalmazásai: Magi RFLP-k

Az RFLP-k egyik legfontosabb alkalmazása a géntérképezésben való felhasználásuk. Néhány aszkuszos gombának ismert a viszonylag részletes genetikai térképe, melyet auxotróf, antibiotikumrezisztens és egyéb biokémiai és morfológiai mutánsok felhasználásával konstruáltak (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* genetikai térképei). Más, a klasszikus genetika által kevésbé "preferált" fajok esetében a hosszadalmas mutánsizolálás helyett sikerrel alkalmazhatják ezt a molekuláris markert géntérképezésre, hiszen szinte végtelen számú RFLP szegregációját lehet analizálni egyetlen populáció esetében is. Igen részletes RFLP-térképet készítettek az emberi genom esetében (Gusella, 1986; Drayna, 1986; Botstein és mtsi, 1987; Watkins, 1988). Számos növényre is készültek RFLP-térképek (kukorica és paradicsom - Helentjaris és mtsi, 1986; *Arabidopsis thaliana* - Nam és mtsi, 1989). A gombák közül egyes fitopatogének térképezése folyamatban van (*Cochliobolus*

heterostrophus - Tzeng és mtsi, 1989; Hulbert és Michelmore 1987-es cikkében a következő fajokat említi: *Bremia lactucae* - Hulbert és Michelmore, publikálatlan eredmények; *Phytophthora infestans* - D. S. Shaw, személyes közlés; *Magnaporthe grisea* - S. Leong, személyes közlés).

A gombák körében nemcsak térképezési célokra használják az RFLP-eket. Egyes élesztők esetében pl. taxonómiai (Laaser és mtsi, 1989; Martens és mtsi, 1985; Seehaus és mtsi, 1985), ill. faj- és törzsazonosítási (Magee és mtsi, 1987; Pedersen, 1983, 1986a, 1986b) célokra használták ezt a markertípust. Leginkább törzsazonosításra alkalmazták ezt a markert a fitopatogén gombák (*Armillaria mellea* - Anderson és mtsi, 1987; *Fusarium* fajok - Kistler és mtsi, 1987, Manicom és mtsi, 1987; *Sclerotinia* - Kohn és mtsi, 1988), ill. egyes bazídiumos gombák (*Schizophyllum commune* - Specht és mtsi, 1984; *Coprinus* fajok - Weber és mtsi, 1986, Wu és mtsi, 1983) vizsgálata során. Az *Aspergillus* génuszba tartozó fajok körében csak néhány esetben vizsgálták ezt a markertípust. Bartoszewski és mtsi (1987) az 5S riboszomális RNS gének intraspecifikus polimorfizmusát írta le *A. nidulans* törzseknél. Croft (1987) közeli rokonságban lévő fajok (pl. *A. nidulans* és *A. quadrilineatus* vagy *A. nidulans* var. *echinulatus*) között inter-, az *A. nidulans* különböző heterokaryon inkompatibilitási csoportjai között pedig intraspecifikus RFLP-eket észlelt, random genomiális próbákat alkalmazva. Távolabbi rokonságban lévő fajok esetében (pl. *A. niger*) a használt EMBL3 lambda-vektorban klónozott *A. nidulans* random genomiális próbák az adott hibridizálási körülmények között egyáltalán nem

hibridizáltak a másik faj DNS-fragmentjeihez. A nem az *A. nidulans* csoportba tartozó *A. terreus* esetében sikerült autoradiográfiás jelet észlelni, ami az *A. nidulans* és az *A. terreus* fajoknak az eddig feltételezettnél közelebbi rokonságára utal. Ugyanakkor az *A. unguis* esetében nem sikerült hibridizációt elérni; ezen faj esetében a protoplaszt fúziós kísérletek és a mitokondriális DNS vizsgálata már korábban valószínűsítette, hogy ez a faj - bár az *A. nidulans* fajcsoportba sorolják - távolabbi rokonságban van csak az *A. nidulans* fajjal. Ezt a sejtést ez a vizsgálat megerősítette.

A magi RFLP-k detektálásának új lehetősége a kromoszómális méretű DNS-molekulák elválasztására alkalmas technikák alkalmazása. Carle és Olson (1984), valamint Schwartz és Cantor (1984) írtak le egy nagyméretű DNS-molekulák szétválasztására is alkalmas elektroforetikus elválasztási módszert. A módszer azon alapul, hogy a vándorló DNS-molekulát váltakozó irányú elektromos erőterbe helyezve a molekula az erőterek eredőjének irányába fog elmozdulni; a kisebb méretű DNS-molekulák gyorsabban képesek alkalmazkodni a változó irányú erőterhez, mint a nagyobbak. Az erőterek iránya, orientáltsága, az erőteret létrehozó elektródok elhelyezkedésének geometriája szerint többféle típusa létezik ennek a módszernek [pl. "orthogonal-field-alteration gel electrophoresis" (OFAGE), "pulsed-field gel electrophoresis" (PFGE), "transverse altering field electrophoresis" (TAFE), "field-inversion gel electrophoresis" (FIGE), "contour-clamped homogeneous

electric field electrophoresis" (CHEF), "rotating-field gel electrophoresis" (RFGE)]. A fonalas gombák közül eddig sikerrel alkalmazták ezen módszerek valamelyikét *Neurospora crassa* (Orbach és mtsi, 1988), *Phytophthora megasperma* (Howlett, 1989), *Cephalosporium chrysogenum* (Skatrud és Queener, 1989) és *Aspergillus nidulans* (Brody és Carbon, 1989) kromoszómális DNS-einek elválasztására. Megfelelő próbákkal lokalizálni lehet a megfelelő kromoszómákat a gélen, és ismeretlen próbákat lehet a nekik megfelelő kromoszómákhoz rendelni. A gélből izolált kromoszómális fragmentek a későbbiekben mint kromoszóma-specifikus próbák alkalmazhatók az RFLP-analízis során. Az OFAGE-t mindeztideig nem alkalmazták fonalas gomba hibridek vizsgálatára, de Hoffmann és mtsi (1987) különböző *Saccharomyces* törzsek hibridjeit vizsgálta ezzel a módszerrel. *Kluyveromyces marxianus* és *Saccharomyces cerevisiae* között létrehozott intergenerikus hibrideket és a szülői törzseket az OFAGE segítségével, random génpróbák felhasználásával vizsgálva Witte és mtsi (1989) egyrészt a *K. marxianus* törzs triploiditását és a kromoszómák kiterjedt polimorfizmusát, másrészt a hibridek esetében a szülői kromoszómák rekombinációját, hibrid kromoszómák megjelenését mutatták ki.

II.3.2.2. Az RFLP-k alkalmazásai: Mitokondriális RFLP-k

A mitokondriális DNS (mtDNS) igen vonzó markerforrás, mivel viszonylag könnyű tisztítani és nagy kópiaszámban fordul elő. Kis méretű, így emésztésekor egyszerű, könnyen

interpretálható mintázatokot kapunk. A mitokondriális RFLP-k alkalmazhatóságáról a gombák evolúciós biológiájában ill. taxonómiában Taylor (1986) publikált összefoglalót. A mtDNS polimorfizmusát több gombafajban leírták, pl. *Allomyces arbuscula* (Borkhardt és mtsi, 1987), *Candida parapsilosis* (Camougrand és mtsi, 1988), *Candida albicans* (Olivo és mtsi, 1988), *Claviceps purpurea* (Tudzynski és Esser, 1986), *Cochliobolus heterostrophus* (Garber és Yoder, 1984), *Coprinus cinereus* (Economou és mtsi, 1987), *Fusarium oxysporum* (Kistler és mtsi, 1987; Kistler és Benny, 1989), *Neurospora intermedia* (Rieck és mtsi, 1982; Collins és Lambowitz, 1983), *Phytophthora megasperma* (Förster és mtsi, 1988) és *Schizophyllum commune* (Specht és mtsi, 1983) esetében. Az *Aspergillus* fajok körében is vizsgálták a mitokondriális RFLP-k jelenlétét. Interspecifikus RFLP-ket írt le Kozłowski és Stepien (1982) különböző *Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. nidulans* var. *echinulatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. tamarisii*, *A. wentii*, *A. awamori*) fajok között. Croft és mtsi (1980), valamint Earl és mtsi (1981) az *A. nidulans* fajcsoportba tartozó fajok (*A. nidulans*, *A. quadrilineatus*, *A. nidulans* var. *echinulatus*) mtDNS-ei közötti variabilitást egyes intronok meglétével ill. hiányával hozzák kapcsolatba. Croft (1987) a fenti fajokon kívül az *A. heterothallicus*, *A. stellatus* és *A. unguis* mtDNS-ét is elemezte, és ezekben a fajokban jelentős eltéréseket talált az *A. nidulans* mtDNS fizikai térképéhez képest. A három utóbbi faj mtDNS-ei között is számos polimorfizmust észlelt, amiből azt a következtetést vontak le, hogy ezek távolabbi rokonságban vannak a fenti három

törzssel és egymással is. Intraspecifikus mitokondriális RFLP-eket az *Aspergillus* génuszon belül a mi laboratóriumi munkban észleltünk az *A. niger* fajcsoport törzseinek vizsgálata során (Varga és mtsi, 1989). Az *A. niger* komplexen belül észleltünk polimorfizmusokat. Ez némileg meglepő eredmény, mivel Croft (1987) számos *A. nidulans* törzs vizsgálata során nem tudott variabilitást kimutatni a mtDNS-ben ezen a fajon belül. Hasonló eredményeket kapott *A. nidulans* var. *echinulatus* törzsek vizsgálata során is (Croft, 1987).

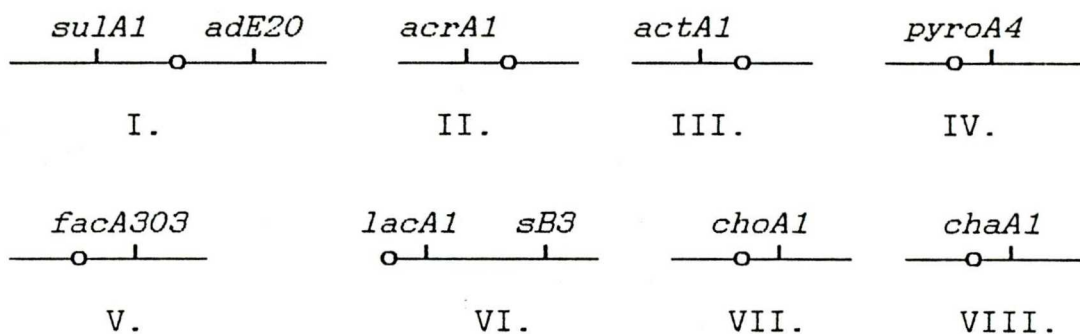
Earl és mtsi (1981), ill. Croft és Dales (1983) az *A. nidulans* és *A. nidulans* var. *echinulatus* között létrehozott szomatikus hibrid, és a szülők mtDNS-eit elemezték. A kísérletek során nem alkalmaztak szelekciós nyomást a mtDNS-ek rekombinációjának elősegítésére. A szomatikus hibridben a szülői mtDNS-ek spontán rekombinációját észlelték. Szelektív körülmények között is megpróbálták mtDNS-rekombinációt detektálni az *A. nidulans* fajcsoport számos tagja között létrehozott hibridekben, negatív eredménnyel. Mellon és mtsi (1983) *Penicillium chrysogenum* és *P. baarnense* hibridjében észlelték a szülői mtDNS-ek rekombinációját, új mtDNS-mintázat megjelenését.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Törzsek

<i>Aspergillus nidulans</i>	7-166 (FGSC 513)
<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	12-14
<i>Escherichia coli</i>	HB101
<i>Escherichia coli</i>	802

Az *A. nidulans* 7-166 törzs genotípusa:



Az *A. quadrilineatus* 12-14 törzs genotípusa:



Az *Aspergillus* törzsek jelzései megegyeznek J. H. Croft törzsgyűjteményének jelzéseivel. A mutánsok jelzésénél Clutterbuck (1974, 1987) instrukcióit követtük. A jelzések jelentése: *sulA* - szulfanilamid-rezisztencia; *adE* - adenin-auxotrófia; *acrA* - akriflavin-rezisztencia; *actA* - aktidion

auxotrófia; *acrA* - akriflavin-rezisztencia; *actA* - aktidion (cikloheximid)-rezisztencia; *pyroA* - piridoxin-auxotrófia; *facA* - fluoracetát-rezisztencia (acetáthasznosításban gátolt); *lacA* - laktózhasznosításban gátolt; *sB* - metionin-auxotrófia (szulfát-felvételben mutáns); *choA* - kolin-auxotrófia; *chaA* - "chartreuse" színű konídiumok; *y* - sárga színű konídiumok; *nic* - nikotinsav-auxotrófia. A törzseket ellenőrizték Raper és Fennell (1965) szerint.

III.2. Táptalajok, tápközegek

Minimál tápközeg (MM): 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% glükóz, 1 ml/l Wickerham-féle vitaminoldat.

Wickerham-féle vitaminoldat: 0.01% biotin, 0.01% piridoxin.HCl, 0.01% aneurin.HCl (tiamin), 0.01% riboflavin, 0.01% p-aminobenzoésav, 0.01% nikotinsav (Wickerham, 1951).

Pontecorvo-féle minimál tápközeg (PM): 0.6% NaNO_3 , 0.15% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KCl, 1% glükóz, 0.1% élesztőkivonat, nyomnyi mennyiségű FeSO_4 és ZnSO_4 (Pontecorvo és mtsi, 1953).

L-Broth (LB): 1% tripton, 0.5% élesztőkivonat, 0.5% NaCl, 1% glükóz.

Acetáthasznosítást tesztelő tápközeg (AC): 1.2% NH_4 -acetát, 0.2% NaCl, 0.05% MgSO_4 , 0.3% KH_2PO_4 , 1 ml/l nyomelem-oldat.

Nyomelem-oldat: 5% citromsav, 5% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05% H_3BO_3 , 0.05% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (kloroform fölött hosszabb ideig tárolható).

Laktózhasznosítást tesztelő tápközeg (LC): 1% laktóz, 0.1% K_2HPO_4 , 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 ml/liter "ásványi sók" oldat.

"Ásványi sók" oldat: 10% $NaNO_3$, 2.5% KCl , 2.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

Malátás gazdag tápközeg (MO): 0.5% malátakivonat, 0.5% élesztőkivonat, 1% glükóz.

Czapek-Dox minimál tápközeg (CZ): 0.2% $NaNO_3$, 0.05% KCl , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4 , 3% szaharóz, 10 mg/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 mg/l $CuSO_4$.

Kiegészített Czapek-Dox tápközeg (CZS): CZ kiegészítve 0.3% hidrolizált kazeinnel, 100 mg/l adeninnel és 10 ml/l Wickerham-féle vitaminoldattal.

Vogel-féle minimál tápközeg (V): 0.25% trinátriumcitrát, 0.5% KH_2PO_4 , 0.2% NH_4NO_3 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1% glükóz, 0.1 ml/l nyomelem-oldat, 0.05 ml/l biotin-oldat.

Biotin-oldat: 0.1 mg/ml biotin.

Szilárd táptalajok készítésekor 2% agarral egészítettük ki a megfelelő tápoldatot. A szegregánsok ellenőrzésére az 1. táblázatban felsorolt anyagokkal kiegészített CZ és MM, illetve a *lacA* és *facA* mutációk esetében kiegészített LC és AC szelektív táptalajokat alkalmaztunk.

III.3. Protoplasztképzés, protoplasztfúzió, regeneráció

Az *A. nidulans* x *A. quadrilineatus* interspecifikus hibridet protoplaszt fúzióval hoztuk létre Dales és Croft (1983) módszerével.

III.4. Haploidizálás

A haploidizálást az 1. táblázatban felsorolt anyagokkal kiegészített CZ, ill. MO táptalajokon végeztük. A táptalajhoz a 2. táblázatban szereplő rekombinogének törzsoldataiból különböző mennyiségeket adtunk csészeöntés előtt. A táptalaj megszilárdulása után a csészékre az allodiploid hibrid konídiumszuszpenzióját szélesztettük, ill. a csésze közepére vittük 10-10 μ l-nyi mennyiségét (kb. 10^3 konídium), és sterilfülke alatt beszárítottuk. 37 °C-on általában egy hétig inkubáltuk a csészéket, majd a létrejött szektorokból, ill. színes konídiumfejeket tartalmazó foltokból oltótüvel kiegészített MO-ra vittük a szegregánsokat, tizenhatot minden csészére. 16-tús inokulátorral legalább háromszor vittük másik csészére a kifejlődött telepeket, mielőtt szelektív táptalajokon ellenőriztük volna a genotípusukat. Erre azért volt szükség, hogy megbizonyosodhassunk a telepek homogenitásáról, ill. arról, hogy nem aneuploid-e valamelyik telep (az aneuploid telepekből haploid ill. diploid szektorok nőttek ki az inkubálás során). A szegregánsok ploiditásának ellenőrzésére a telepeket 0.8 μ g/ml benomylt tartalmazó MO-ra vittük, és 1 hétig inkubáltuk a csészéket 37 °C-on.

III.5. Izoenzimanalízis

A szülői törzseket, és a szegregánsokat kiegészített PM tápoldatban tenyésztettük 48 órán át, majd deszt. vizes

1. táblázat. A szelektív táptalajokban használt törzsoldatok

vegyület	rövi- dítés	koncentráció (mg/ml)	alkalmazott mennyiség (ml/100 ml)	végkoncent- ráció ($\mu\text{g/ml}$)
adenin	ade	10 (0.1 N HCl-ban)	1	100
akriflavin	acr	5	1	50
aktidion	act	10	1	100
kolin	cho	1	0.5	5
metionin	met	25	0.2	50
nikotinsav	nic	1	0.2	2
piridoxin	pyr	1	0.2	2
szulfanilamid	sul	5	3.5	175

2. táblázat. A haploidizálás során használt törzsoldatok

vegyület (forgalmazó)	rövi- vidítés	oldószer	konc. (mg/ml)	vizsgált konc. ($\mu\text{g/ml}$)
akridin sárga (SIGMA)	A	50% etanol	5	10-100
benomyl (CHINOIN)	B	DMSO	10	0.1-4
etanol (REANAL)	E	-	-	10000-100000
m-fluorofenilalanin (SIGMA)	m	H ₂ O	4	8-500
o-fluorofenilalanin (SIGMA)	o	H ₂ O	4	8-500
p-fluorofenilalanin (SIGMA)	p	H ₂ O	4	8-500
griseofulvin (P.L. Bioch.)	G	DMSO	1	1-40
klorálhidrát (REANAL)	H	H ₂ O	100	200-6000
metil-tiofanát (WAKO)	T	metanol	0.1	1-50
mikonazol (SIGMA)	M	DMSO	1	2-40
Na-deoxikolát (SIGMA)	D	H ₂ O	100	400-4000
széntetraklorid (BDH)	C	-	-	1000-20000

mosás után liofileztük a micéliumtömeget. 0.1 g szárazsúlyhoz 1-1.5 ml proteinextraháló puffert (0.37 M Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM Na₂EDTA, 5 mM β-merkaptoetanol, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid, 1% Triton X-100) adtunk, és üveggyöngyök jelenlétében vortexeltük a mintát. 30 perc jégen történő extrahálás után a sejttörmelékét centrifugálással eltávolítottuk (15.000xg, 30 perc, 4°C), és a felülúszóhoz egyharmadnyi mennyiségű glicerint és nyomnyi brómfenolkéket adtunk. A fehérje-elektroforézist lapgélen végeztük, Pharmacia GE-4 elektroforetikus készüléket alkalmazva. 6-15% grádiens gélt, illetve 7.5% szeparálógélt és 3% gyűjtőgélt használtunk, Davis (1964) leírása szerint. 20 perc előfuttatás után vittük fel a mintákat. A futtatást 40 mA-en végeztük, majd a jelzőfesték szeparálógélbe érkezésekor 60 mA-re növeltük az áramerősséget. Az izoenzimek megjelenítésére a következő leírásokat követtük: alkohol-dehidrogenáz - Clare és mtsi (1968); glutamát-dehidrogenáz - Anné és Peberdy (1981); malát- és laktát-dehidrogenázok - Brewer (1970); celluláz - Goren és Huberman (1976); észterázok és foszfatázok - Harris és Hopkinson (1976); kataláz - Woodbury és mtsi (1971); amiláz, RNáz - Brown és mtsi (1982), ill. Wilson (1969); szuperoxid-dizmutáz - Beauchamp és Fridovich (1971).

III.6. DNS-izolálás

III.6.1. Össz DNS izolálása *Aspergillus* törzsekből:

Két módszert alkalmaztunk sikerrel.

a. DNS-tisztítás céziumklorid grádiens ultracentrifugálással (Osman, 1987; a módszer Taylor és Powell 1982-es, növényekre kidolgozott DNS-izolálási eljárásán alapul):

1000 ml PM-ben 36-48 órán át 35 °C-on rázatott micéliumtömeget összegyűjtünk, mossuk csapvízzel, majd kinyomkodjuk. Folyékony nitrogénben elporítjuk (ilyen porított állapotban -70 °C-on hosszabb ideig tárolható a micéliumtömeg). 25 g-ra 100 ml forró extrakciós puffert (2% CTAB, 20mM Na₂-EDTA, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH=8.0) és 2 ml β-merkaptóetanolt öntünk, elkeverjük, és 55 °C-on tartjuk 20 percig. 13000xg-n 10 percig centrifugáljuk 20 °C-on, a felülúszót extraháljuk kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú elegyével. A vizes fázist bőszejű pipettával másik csöbe visszük, 0.1 térfogatnyi 10% CTAB-ot adunk hozzá, és megismételjük a kloroformos extrahálást. A vizes fázishoz feleslegben adunk precipitálópuffert (1% CTAB, 10 mM Na₂-EDTA, 1% β-merkaptóetanol, 50 mM Tris/HCl, pH=8.0) és desztillált vizet; a több mint kétszeres sókoncentráció-csökkenés miatt a DNS-CTAB komplex kicsapódik. Legalább egy órán át szobahőmérsékleten kell tartani a csövet, hogy a komplex kicsapódása minél teljesebb legyen. Ezután 4000xg-n 10 percig lecentrifugáljuk a csapadékot, és felszuszpendáljuk 12 ml TNE1-ben (1 mM Na₂-EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH=8.0). 12.4 g CsCl-ot és 1.0 ml etídium-

bromidot (5 mg/ml) adunk az elegyhez, és 42000 rpm-on centrifugáljuk 40 órán át. UV-lámpa alatt eltávolítjuk a sávba rendeződött DNS-t a centrifugacsöből, CsCl-dal telített izopropanollal kiextraháljuk a mintából az etidium-bromidot, és 4 °C-on 12 órán át TNE2-vel (10 mM Tris/HCl, 10 mM Na₂-EDTA, 1 mM NaCl, pH=8.0), majd néhány órán át TE-vel (10 mM Tris/HCl, 10 mM Na₂-EDTA, pH=8.0) szemben dializáljuk.

b. DNS-tisztítás Turner szerint (Turner és Croft, 1988):

500 ml PM-ben 24-48 órán át rázatott tenyészetet leszűrünk, mossuk csapvízzel, majd TSE-vel (150 mM NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH=8.0). Szárazra préseljük, majd folyékony nitrogénben megfagyasztjuk. 10 órán át liofilezzük a micéliumtömeget, majd porrá zúzzuk dörzsmozsárban. 25 ml/g extrakciós puffert (TSE+2% SDS és 0.2 térfogat toluol) adunk hozzá, és 72 órán át 1 ciklus/sec. sebességgel rázatjuk szobahőmérsékleten. 1000xg-n 15 percig centrifugálva eltávolítjuk a sejttörmelékét, majd a felülúszót kloroform:izo-amilalkohol 24:1 arányú elegyével extraháljuk. 10000xg-n 30 percig centrifugáljuk, majd a vizes fázishoz 1.1 térfogat -20 °C-os etanolt adunk. A kicsapódó DNS-t hajlított Pasteur-pipettára tekerve átvisszük egy steril csöbe. 5 ml TE-ben (1 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH=7.5) fel-szuszpendáljuk a DNS-t, 50 µg/ml RNázt és 100 µg/ml Proteináz K-t vagy 2 mg/ml 37 °C-on két órán át előemésztett pronázt adunk hozzá, és 37 °C-on két órán át

inkubáljuk. Ismét extraháljuk kloroformmal, kicsapjuk etanollal, majd vákuum alatt beszárítjuk a DNS-t. 1 ml TE-ben felszuszpendáljuk, extraháljuk fenol:kloroform:izoamil-alkohol 25:24:1 arányú elegyével, majd kétszer dietil-éterrel, és kicsapjuk 0.54 térfogat izopropanollal. A létrejövő DNS-"gubancot" friss csöbe visszük, beszárítjuk vákuum alatt, és kis mennyiségű TE-ben felvesszük.

III.6.2. Plazmid-DNS tisztítása *Escherichia coli*-ből:

a. Forralással, kis mennyiségű DNS kinyerésére (Osman, 1987, Holmes és Quigley, 1981 nyomán):

1 ml "overnight" baktériumtenyészetet centrifugálunk Eppendorf-centrifugán 30 másodpercig 4000xg-n, majd a sejteket 100 µl STET-ben (8% szaharóz, 50 mM Na₂-EDTA, 0.5% Triton X-100, 10 mM Tris/HCl, pH=8.0) felszuszpendáljuk. 10 µl lizozim-oldatot (10 mg/ml) adunk hozzá, elkeverjük, és 50 másodpercre forrásban levő vízbe tesszük a csövet. A sejttörmelékét 10 percig 4000xgn lecentrifugáljuk, steril fogpiszkálóval eltávolítjuk. A felülúszóból -70 °C-on izopropanollal (200 µl) kicsapjuk a DNS-t, 10 µl 3 M Na-acetát (pH=5.0) hozzáadása után. A kicsapást megismételjük, a DNS-t 70%-os etanollal mossuk, vákuumban beszárítjuk, és kis mennyiségű TE-ben vesszük fel.

b. Alkalikus lízissel, nagy mennyiségű DNS kinyerésére (Birnboim és Doly, 1979):

200 ml "overnight" baktériumtenyészetet centrifugálunk 8000xg-n 15 percig, a sejteket 10 ml GET-ben (50 mM glükóz, 20 mM Na₂EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH=8.0) felszuszpendáljuk, 2

mg/ml lizozimet adunk hozzá, és 30 percig jégen inkubáljuk. 2 ml lúgos SDS-t (0.2 M NaOH, 1% SDS), majd 5 perc múlva 15 ml 3 M Na-acetátot (pH=5.0) adunk az elegyhez. Az elkeverés után legalább 10 percig jégen tartjuk a csövet, majd centrifugáljuk 10000xg-n 20 percig, 4 °C-on. A felülúszót kloroformmal extraháljuk, -70 °C-on izopropanollal kicsapjuk, kétszer mossuk 70%-os etanollal, vákuumban beszárítjuk, és kis mennyiségű TE-ben felvesszük.

III.7. Baktérium-transzformáció (Cohen és mtsi, 1973 nyomán)

0.1 ml "overnight" tenyésztett *Escherichia coli*-val beoltunk 10 ml LB-t, és rázatjuk $OD_{600}=0.3-0.6$ -ig. 4000xg-n 5 percig centrifugáljuk 4 °C-on, 4 ml 10 mM NaCl-dal mossuk, majd 4 ml 100 mM CaCl₂-ban felfeszuspendáljuk a sejteket. Legalább 20 percig jégen tartjuk a szuszpenziót, majd a kompetens sejteket lecentrifugáljuk, és 1 ml 100 mM CaCl₂-ben felfeszuspendáljuk. 200 µl kompetens sejtet és 5-10 µl DNS-t elkeverünk, 20 percig jégen tartjuk, majd rövid, 1-2 perces hősokk (42 °C-on) után 1 ml LB-t adunk a sejtekhez. A plazmidon kódolt rezisztenciagének expresszá-lódása érdekében 1 órán át 37 °C-on tartjuk a szuszpenziót, majd 200 µl aliquotokat szélesztünk szelektív táptalajon (ami esetünkben 50 µg/ml ampicillint, illetve 15 µg/ml tetraciklint tartalmazó, 2% agarral kiegészített LB-n).

III.8. Restriktációs emésztés, DNS-~~elektroforézis~~

A restriktációs enzimeket az Amersham Int., ill. a Reanal cégtől szereztük be. Az emésztőelegyet az Amersham Int. instrukciói alapján állítottuk össze. Az elegyhez adott enzimoldat térfogata sosem érte el az emésztőelegy térfogatának 5%-át; így elkerülhető volt az enzimaktivitás gátlása, ill. az ún. csillagaktivitás megjelenése az enzimoldatban jelenlévő glicerinnel hatására. Az emésztéseket 37 °C-on végeztük. Az enzimeket szükség esetén 5 perces 70 °C-os hőkezeléssel, ill. a *HindIII* esetében fenol-kloroformos extrahálással inaktiváltuk.

Az emésztéseket agaróz gélelektroforézissel követtük nyomon. Az agarózt 0.6-1.2% koncentrációban alkalmaztuk. A mintákhoz 1/4 térfogatnyi mintapuffert (50% glicerinnel, 0.1 M Na₂EDTA, 1% SDS, 0.1% brómfenolkék) adtunk, majd gélrevittük. Horizontális futtatókádákat használtunk, elektródpufferként pedig TBE-t (89 mM Tris, 89 mM bórsav, 2.4 mM Na₂EDTA) alkalmaztunk. Mind a gélbe, mind az elektródpufferbe 0.5 µg/ml etídiumbromidot vittünk. Az elektroforézist 5-10 V/cm feszültségen végeztük, az agarózkoncentrációtól függően. Futtatás után a DNS-sávokat UV-átvilágítással tettük láthatóvá, és Pentacon sixTL fényképezőgéppel fotóztuk.

III.9. DNS-DNS hibridizálás

III.9.1. A DNS átvitele a gélről nylon membránra ("Southern blotting"; Southern, 1975):

A gélt fotózás után 10 percig rövid hullámhosszú UV-fénnyel besugározzuk, egy órára denaturáló oldatba (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) visszük szobahőmérsékleten, majd deszt. vizes mosás után a renaturáló oldatban (1 M Tris/HCl (pH=8.0), 1.5 M NaCl) tartjuk egy órán át. Ismételt deszt. vizes mosás következik, majd összeállítjuk a "blot"-ot. A nylon membránt (Hybond N, Amersham Int., ill. Zetaprobe, BioRad) és a Whatman 3MM szűrőpapírokat deszt. vízben, majd 10xSSC-ben (1.5 M NaCl, 0.15 M Na₂-citrát, pH=7.0) öblítjük, ezután helyezzük a gélre. A transzfert legalább 15 órán át végezzük. Ezután a membránt 2xSSC-ben öblítjük 10 percig, infralámpa alatt, 3MM szűrőpapíron megszárítjuk, majd szárítószekrényben 80 °C-on két órán át, 3MM szűrőpapírok között immobilizáljuk a DNS-t a membránon.

III.9.2. DNS-jelölés:

Kétféle módszert alkalmaztunk, az ún. "nick-transzlációt" (Rigby és mtsi, 1977), és a random oligonukleotid primeres jelölést (Feinberg és Vogelstein, 1983, 1984). Előbbihez a Boehringer Mannheim cég nick-transzlációs kitjét, utóbbihoz a SIGMA hexadeoxinukleotid-kitjét alkalmaztuk, a gyártók leírása szerint. Az P³² izotóppal α helyzetben jelölt ATP-t az IZINTA Izotópkereskedelmi Leányvállalattól vásároltuk.

III.9.3. Hibridizálás, autoradiográfia:

Előhibridizálást végeztünk 42 °C-on 24 órán át 10x Denhardt's oldat (100x Denhardt's törzsoldat: 2% Ficoll, 2% PVP, 2% BSA), 2xSSC, 0.1% SDS, 40% formamid és 75 µg/ml csirkevér DNS elegyében, majd ehhez az elegyhez adtuk a jelölt próbát. A hibridizálást 42 °C-on 24 órán át végeztük. A filtereket 3xSSC és 0.1% SDS elegyében mostuk háromszor 30 percig 60 °C-on, majd egyszer 2xSSC és 0.1% SDS oldatában szintén 30 percig, 60 °C-on. A filtereket folpackba csomagolva intenzifikáló lemezt tartalmazó kazettába tettük szűrőpapír és röntgenfilm közé, és -70 °C-on tartottuk, míg az autoradiográfias jel észlelhető nem volt a röntgenfilmen. A film előhívása után a filterekről eltávolítottuk a radioaktív próbát 42 °C-on 30 percig 0.2 M NaOH-ban, majd 0.5 M Tris/HCl (pH 7.5), 0.1% SDS és 0.1xSSC elegyében mosva.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Haploidizálás

Az *A. nidulans* x *A. quadrilineatus* hibridet protoplaszt fúzióval hoztuk létre egy *A. nidulans* master törzsből, mely mind a nyolc kapcsoltsági csoportján hordoz szelektálható markereket [ezen faj esetében Käfer (1958) genetikai, Elliott (1960) citológiai, míg Brody és Carbon (1989) biokémiai (elektroforetikus) módszerekkel mutatta ki nyolc kapcsoltsági csoport, azaz kromoszóma jelenlétét a haploid genomban], és egy *A. quadrilineatus* kettős auxotróf törzsből. Az *A. nidulans* x *A. quadrilineatus* hibrid lassan nőtt, igen kevés konídiumot hozott létre MM táptalajon, CZ és MO táptalajon pedig barnásvörös pigmentet termelt. Gazdag tápközegen a hibrid spontán szegregációja volt megfigyelhető, kis méretű foltok formájában. Ezt a jelenséget *A. nidulans* diploidokon is észlelték korábban, kevesebb mint 0.02% gyakorisággal (Käfer, 1960). Nagyobb gyakoriságú szegregáció érhető el kémiai indukcióval. Először Lhoas (1961) alkalmazott kemikáliát, nevezetesen a p-fluorofenilalanint *A. nidulans* diploidok haploidizálására; a későbbiekben számos vegyületet használtak ilyen célokra. Az *A. nidulans* x *A. quadrilineatus* hibridet a 2. táblázatban feltüntetett haploidizálószerekkel kezeltük. A táblázat első felében (3a. táblázat) az alkalmazott vegyületek irodalom szerinti, a táblázat második felében (3b. táblázat) az általunk észlelt aktivitás-értékeket

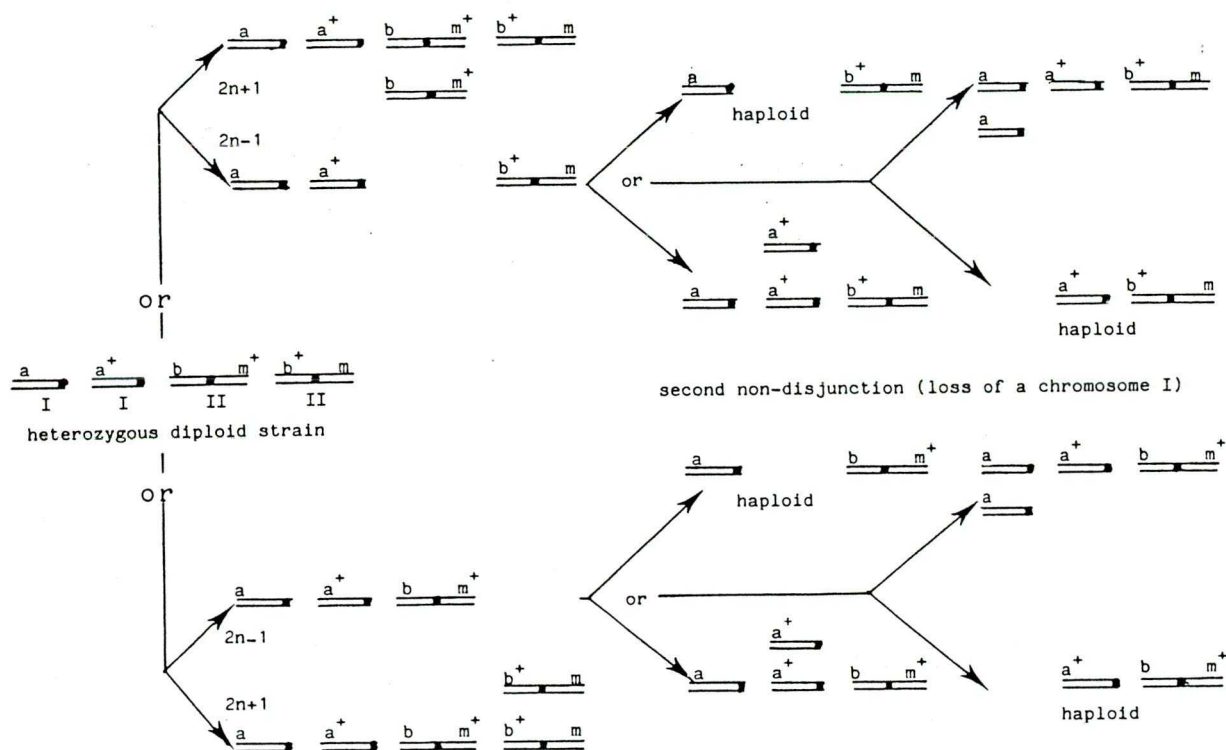
3a. táblázat. A vizsgált szegregáltatóanyagok aktivitása *Aspergillus nidulans* diploidokon az irodalom alapján (a LEDT és aktivitásértékek meghatározását lsd. Waters és mtsi, 1986; a rövidítéseket lsd. a 2. táblázatban)

Vegyület	LEDT (μM)	aktivitás (μM)	irodalom
A	219.14	2.66	Kinghorn és Pateman (1975)
A	255.66	2.59	Clutterbuck (1974)
B	0.52	5.29	Kappas (1978)
B	0.70	5.15	Bignami és mtsi (1977)
B	2.76	4.56	Morpurgo és mtsi (1979)
B	344.45	2.46	de Bertoldi és mtsi (1980)
C	32501.30	0.49	Gualandi (1984)
C	20000	0.70	Singh és Sinha (1976, 1979)
C	9974.61	1.00	Käfer (1985)
D	1544	1.81	Assinder és Upshall (1982)
E	1085304.97	-1.04	Morpurgo és mtsi (1979)
E	1302365.96	-1.11	Harsanyi és mtsi (1977)
E	651182.98	-0.81	Käfer (1984)
G	11.30	3.95	Kappas és Georgopoulos (1974)
M	10	4.00	Bellincampi és mtsi (1980)
T	9.00	4.05	Kappas és mtsi (1974)
P	1000	2.00	de Bertoldi és mtsi (1980)
P	20000	0.70	Shanfield és Käfer (1971)

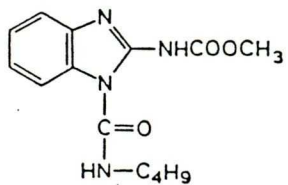
3b. táblázat. A vizsgált szegregáltatóanyagok aktivitása *Aspergillus nidulans* x *A. quadrilineatus* diploidon kísérleteink alapján.

Vegyület	LEDT ($\mu\text{g/ml}$)	LEDT (μM)	aktivitás (μM)
A	30	109.57	2.96
B	0.50	1.72	4.76
C	2000	32501.30	0.89
C	1500	9067.83	1.04
D	400	965.02	2.02
DMSO	100000	1279918.00	-6.11
E	20000	4434121.99	-0.64
G	6	17.01	3.77
M	10	24.02	3.62
T	2	5.84	4.23
m	400	2183.64	1.66
o	320	1746.92	1.76
p	160	873.46	2.06

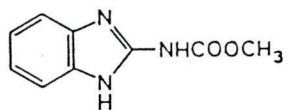
1. ábra. A haploidizáció mechanizmusa *A. nidulans* diploidok esetében, $2n=4$ kromoszómát ábrázolva. Csak az aneuploidokat és a haploidokat tüntettük fel (Bos, 1986 nyomán)



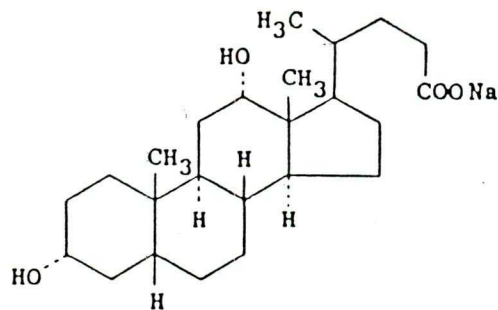
2. ábra. A haploidizálás során alkalmazott vegyületek, ill. köztitermékeik (lsd. a következő oldalon)



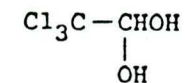
benomyl



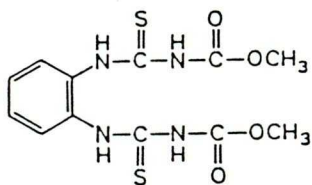
MBC (metil-2-benzimidazolkarbamát)



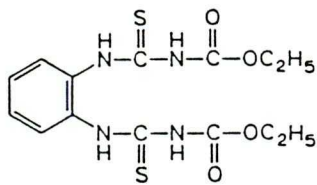
Na-deoxikolát



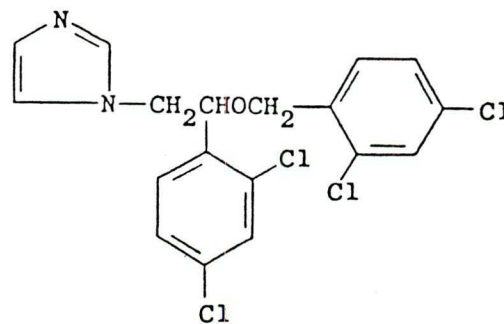
klorál hidrát



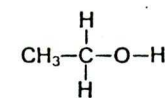
metil-tiofanát



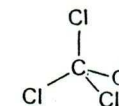
tiofanát



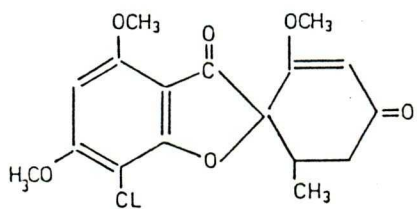
mikonazol



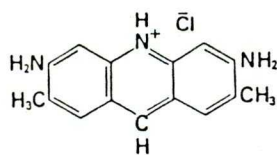
etanol



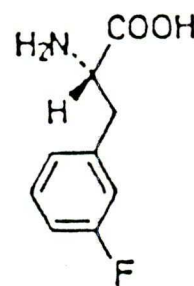
széntetraklorid



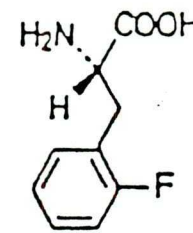
griseofulvin



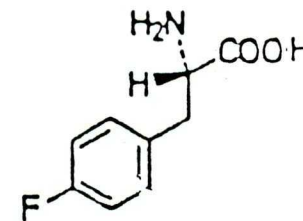
acridine yellow



m-fluorofenilalanin



o-fluorofenilalanin



p-fluorofenilalanin

tüntették fel (a táblázatban feltüntetett LEDT a legalacsonyabb vizsgált hatásos dózist jelenti; az aktivitás a $LEDT \times 10^{-5}$ érték tízes alapú negatív logaritmus).

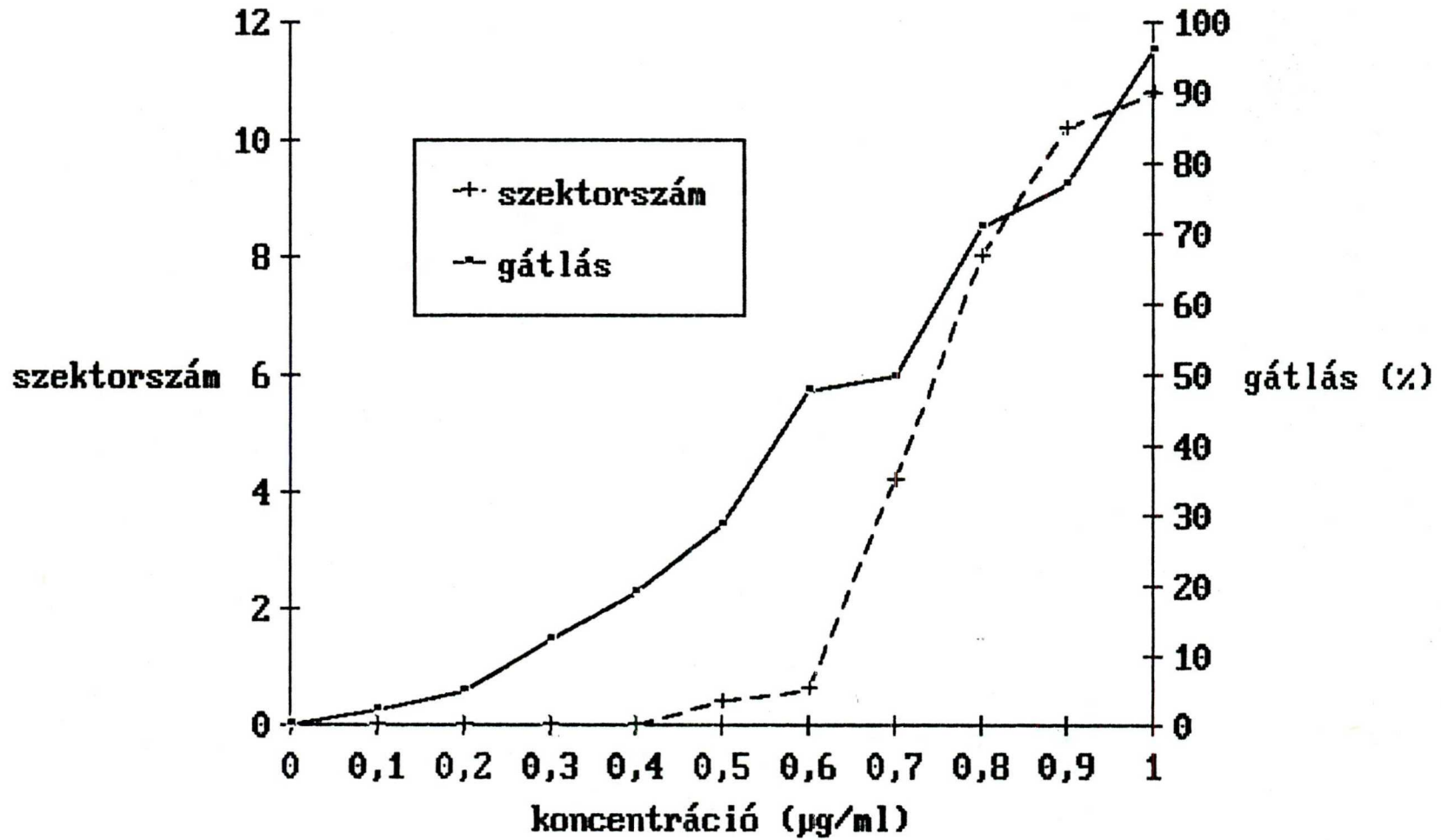
Ezen anyagok többségéről korábban már leírták, hogy *A. nidulans* diploidokban a mitózis során a kromoszómák aberráns szétválását (nondiszjunkcióját; Käfer, 1960, 1. ábra), és ezáltal haploidizációt váltanak ki (Morpurgo és mtsi, 1979), bár molekulaszervezetük (2. ábra), hatásmódjuk különbözik. A benomylról, metil-tiofanátról tudott, hogy a mikrotubulusokat felépítő tubulinhoz kötődnek, így megakadályozzák a mikrotubulusok összerendeződését (Dekker, 1977); mindkét vegyület egy közös köztiterméken, a metilbenzimidazol-2-il karbamáton (MBC) keresztül fejti ki hatását. A griseofulvin a mikrotubulusok és a mikrotubulus-asszociált fehérjék összekapcsolódását gátolja (De Carli és Larizza, 1988). A klorál-hidrát az osztódási orsó létrejöttét akadályozza (Mercer és Morris, 1975), a p-fluorofenilalanin a mitózis során a kromoszómák normális eloszlását gátolja (Shanfield és Käfer, 1971). A dezoxikólsav valószínűleg a sejtmagmembrán szerkezetének megváltoztatásán keresztül fejti ki hatását (Assinder és Upshall, 1982). Az etanol a sejtmembránra hat (Crebelli és mtsi, 1989), hasonlóan a mikonazolhoz (Bellincampi és mtsi, 1980). A széntetraklorid valószínűleg a szabad gyökök létrehozása révén, a mikrotubulusok szulfhidril-csoportjaival való közvetlen kölcsönhatás útján fejti ki hatását (Gualandi, 1984).

Megvizsgáltuk a kísérletekben használt anyagok hatását a hibrid növekedésére. A legerősebb gátlószernek a benomyl bizonyult; ez a vegyület gátolta a legkisebb koncentrációban a hibrid növekedését. A benomyl esetében a koncentráció növekedésének a szektorok számára kifejtett hatását is ábrázoltuk (3. ábra). A többi vegyület közül a metil-tiofanát és a griseofulvin bizonyult a leghatásosabbnak, míg az etanolt és a széntetrakloridot igen magas koncentrációban kellett alkalmaznunk, és a nyert szegregánsok száma még ekkor is igen kicsi volt. Ezen észleléseink egybevágnak az irodalmi adatokkal (3a. táblázat).

Az *A. nidulans* x *A. quadrilineatus* hibrid a különböző szegregáltatószerek jelenlétében eltérő morfológiát mutatott; benomyl jelenlétében viszonylag gyorsan nőtt, jól látható szektorokat hozott létre, míg klorál hidrát hatására növekedése lassúbb, a létrejött telepek kompaktabbak voltak. Griseofulvin jelenlétében kevés szektor jött létre, ezek nagyrésze azonos morfológiát mutatott, barnásnarancs színű volt. A metil-tiofanát igen erősen gátolta a hibrid növekedését, jól látható, de igen kompakt, kicsi szektorok jöttek létre.

A szegregánsokat az ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK fejezetben leírtak szerint izoláltuk, és szelektív táptalajokon végzett tenyésztési kísérletekben meghatároztuk genotípusukat (néhány, a későbbiekben felhasznált szegregáns viselkedését különböző szelektív táptalajokon a 4. táblázat mutatja). A haploid genom jelenlétét a szegregánsokban többféle

3 ábra. A benomyl hatása az *A. nidulans* x *A. quadrilineatus* hibrid szegregációjára



módszerrel próbáltuk bizonyítani. A bizonyítás alapjául a következő észlelések szolgáltak:

1. Benomyl-tartalmú táptalajon a haploid micéliumok jól növekednek, ellentétben a diploid, ill. aneuploid szegregánsokkal, melyek lassabban nőnek, szektorokat képeznek (Upshall és mtsi, 1977).

2. A diploid genommal rendelkező konídiumok térfogata átlagban kétszerese a haploidokénak, tehát a konídiumok átmérőjében átlagosan 1,3-1,4-szeres eltérés mutatkozik (Pontecorvo és mtsi, 1953). Ez a szabály azonban nem érvényes minden *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajra; pl. Ishitani és mtsi (1956) az *A. sojae* haploid és diploid konídiumai között nem talált eltérést sem a méret, sem a DNS-tartalom tekintetében, viszont a haploid konídiumok kétszerannyi sejtmagot tartalmaztak, mint a diploidok. A DNS-tartalom és a konídiumtérfogat között fennálló egyenes arányosság tehát ezen szervezet diploidjai esetében nem a konídiumátmérő növekedésén, hanem a magszám csökkenésén keresztül érvényesül. Hasonló észlelést tett Kevei *A. carbonarius* konídiumok esetében (személyes közlés).

3. A haploid egymagvú konídiumok feleannyi DNS-t tartalmaznak, mint a diploidok (Heagy és Roper, 1952).

A szegregánsokat 0.8 $\mu\text{g/ml}$ benomylt tartalmazó MO táptalajra oltottuk, és hét napos inkubálás után vizsgáltuk a létrejött telepeket. Kontrolként a szülői törzseket és a hibridet is hasonló kezelésnek vetettük alá. A hibrid minden esetben lassan nőtt és szektorokat hozott létre. A szülők és a haploid szegregánsok általában gyorsabban nőttek a hibridnél, és sohasem hoztak létre szektorokat.

Egyes szegregánsok telepéből kinöttek szektorok, ezek átlagban az összes szegregáns 5-6%-át tették ki. A legtöbb ilyen diploid ill. aneuploid szegregánst a metiltiofanáttal és a griseofulvinnal kezelt hibridből kaptunk (az izolált szegregánsok mintegy 10%-a mindkét esetben).

Meghatároztuk a hibrid, a szülői törzsek és néhány, a későbbiekben analizált szegregáns konídium-átmérőjét. Cellux szalag darabot ragasztós felével enyhén rányomtunk a telepek peremére, majd a tárgylemezre cseppentett vízbe helyeztük a konídiumokat. 100x nagyításnál 3.2 projektívvel fényképeztük őket. Az előhívott filmről Zeiss mikrofilmleolvasó segítségével határoztuk meg a konídiumátmérőket. A konídiumátmérőket és térfogatokat az 5. táblázatban mutatjuk be. Látható, hogy a hibrid konídiumok átmérője kb. 1.3-1.5-szöröse, térfogata kb. kétszerese a szülői törzsek konídiumátmérőinek, míg a vizsgált szegregánsok konídiumainak mérete megegyezik a szülői törzsekével.

Megpróbáltuk a konídiumok DNS-tartalma alapján is bizonyítani a szegregánsok haploid voltát, de a hibrid törzs gyenge spórázóképesége miatt próbálkozásunk nem járt sikerrel, mivel nem tudtuk a vizsgálatához szükséges konídiummennyiséget összegyűjteni. Mindazonáltal az előbbieket alapján joggal mondhatjuk, hogy a szegregánsok benomyl jelenlétében való viselkedésük és konídiumátmérőjük alapján haploidoknak tekinthetők.

4. táblázat. Néhány szegregáns viselkedése szelektív táptalajokon (az alaptáptalaj az 1. táblázatban feltüntetett mennyiségű adenint, piridoxint, nikotinsavamidot, metionint és kolint tartalmazó CZ, ill. LC a *lacA1*, és AC az *facA303* markerek jelenlétének vizsgálatához; + : nőtt; - : nem nőtt; y - sárga, w - vad típusú, cha - chartreuse, ycha - sárga és chartreuse kevert konídiumszín)

Törzs	+sul	-ade	+acr	+act	-pyr	AC	-nic	LC	-cho	szín
1	-	+	+	+	-	-	+	-	-	ycha
12	-	+	-	+	-	-	+	-	-	ycha
3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	w
215	+	-	+	-	-	-	+	-	-	cha
4	+	-	+	+	+	-	+	-	-	cha
15	-	+	+	+	-	+	-	-	-	ycha
223	-	+	+	+	-	+	-	-	-	ycha
6	+	-	+	+	-	-	+	+	-	cha
17	-	+	+	+	-	-	+	-	+	ycha
37	+	-	+	-	-	-	+	-	+	cha
8	+	-	-	+	-	-	+	-	-	w
2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	w
86	+	-	+	-	-	-	+	-	-	w

5. táblázat. A vizsgált *A. nidulans*, *A. quadrilineatus* törzseknek, azok interspecifikus hibridjeinek és szegregánsainak konídiumátmé-
rője és konídiumtérfogata.

Törzs	átmérő (μm)	térfogot (μm^3)
7-143	3.551 \pm 0.210	23.689 \pm 4.184
7-166	3.467 \pm 0.219	22.089 \pm 4.296
12	3.560 \pm 0.226	23.908 \pm 4.484
12-14	3.564 \pm 0.234	24.009 \pm 4.967
N x Q hibrid	4.289 \pm 0.317	41.990 \pm 9.205
N x Q2 hibrid	4.482 \pm 0.305	47.792 \pm 9.735
1	3.309 \pm 0.230	19.246 \pm 3.942
12	3.373 \pm 0.199	20.297 \pm 3.623
3	3.271 \pm 0.246	18.632 \pm 4.105
215	3.340 \pm 0.170	19.661 \pm 3.013
4	3.275 \pm 0.203	18.597 \pm 3.463
15	3.302 \pm 0.174	19.004 \pm 2.973
223	3.425 \pm 0.200	21.263 \pm 3.831
6	3.505 \pm 0.281	22.974 \pm 5.121
17	3.465 \pm 0.254	22.148 \pm 5.062
37	3.445 \pm 0.229	21.674 \pm 4.122
8	3.400 \pm 0.218	20.814 \pm 3.938
2	3.231 \pm 0.234	17.939 \pm 3.946
86	3.331 \pm 0.223	19.611 \pm 3.988

IV.2. A szülői markerek megoszlása a szegregánsokban

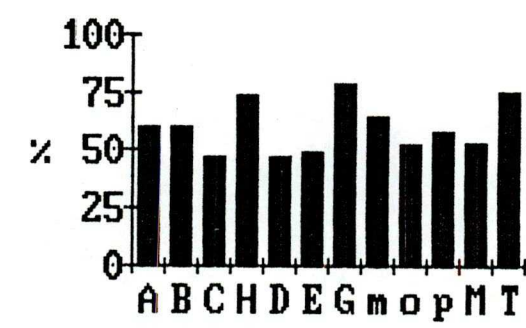
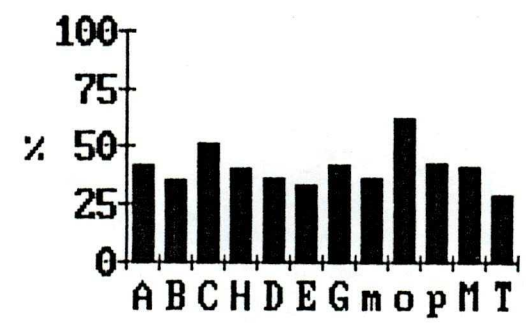
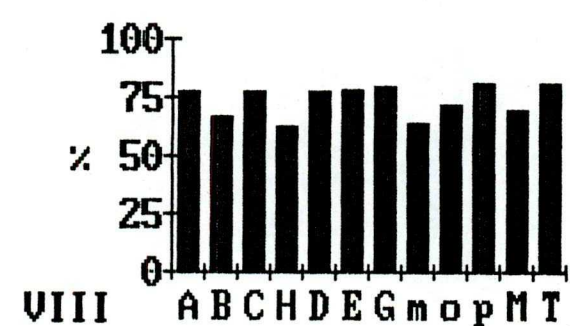
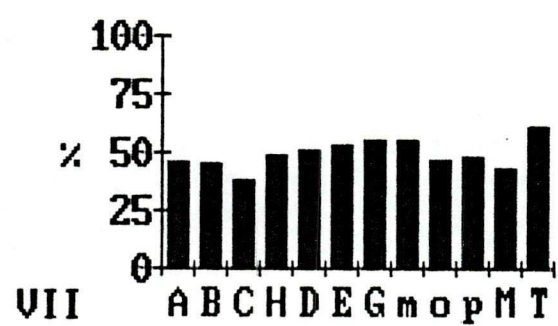
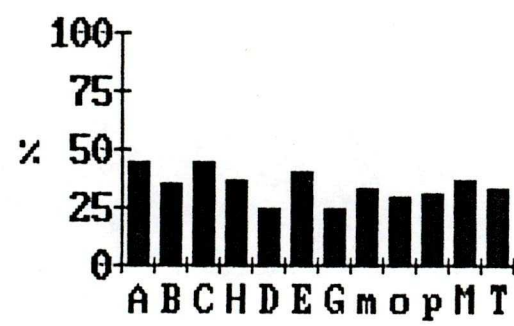
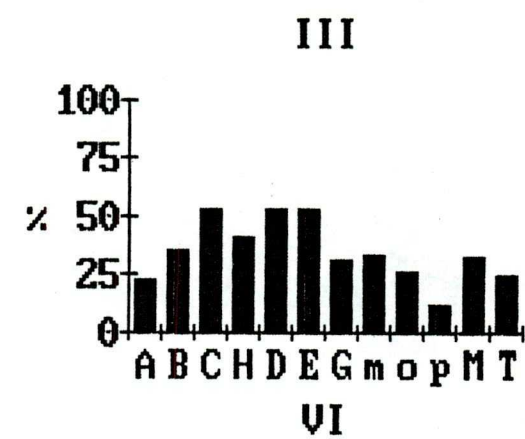
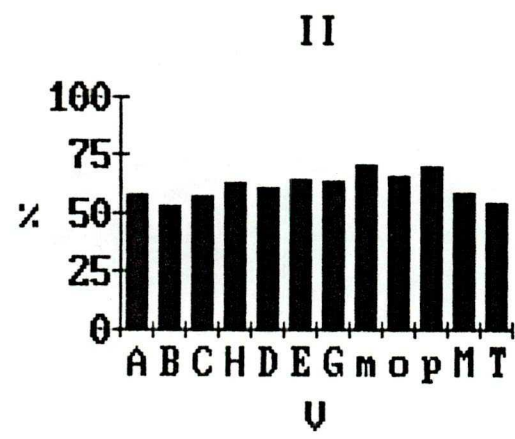
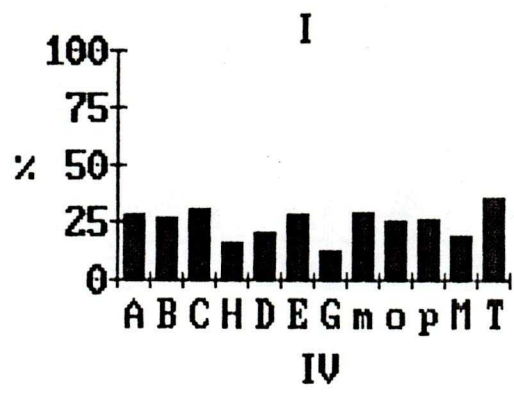
A szegregánsokat szelektív táptalajokon tenyésztve határoztuk meg a szülői markerek jelenlétét ill. hiányát. Az *A. quadrilineatus* kromoszómákon hordozott sárga konídiumszín és nikotinsav-igény alléljeit az *A. nidulans* I. ill. V. kromoszómáján hordozott vad típusú allélek komplementálták, az *A. nidulans* markereket pedig teljesen komplementálták az *A. quadrilineatus* kromoszómákon lévő megfelelő vad típusú allélek. Az *A. nidulans* I. ill. V. kromoszómáján hordozott *sulA1* és *ade20*, ill. *facA303* mutációk felváltva jelentek meg a *y-12.1* ill. *nic-12.1* markerekkel. Fentiek alapján a *y-12.1* markert az I., a *nic-12.1* markert pedig az V. *A. nidulans* kromoszómának megfelelő *A. quadrilineatus* kapcsoltsági csoporton lokalizáltuk.

A markerek megoszlását a 6. táblázat, ill. a 4. ábra mutatja, mint az *A. nidulans* kromoszómák százalékos jelenlétét a különböző haploidizálószerrel létrehozott szegregánsokban, a tenyésztési kísérletek alapján (a rekombinogének nevének rövidítéseit lsd. a 2. táblázatban). A különböző szegregáltatóanyagok eltérő arányban indukálták az *A. nidulans* markerek megmaradását az utód-szegregánsokban. A kromoszómák igen eltérő arányban származnak az *A. nidulans*-ból; a szegregánsok összességét tekintve pl. az *A. nidulans* I. kromoszómán hordozott markerek legfeljebb 36%-ban jelentek meg a szegregánsokban, a VI. kromoszómán lévő *lacA* marker viszont valamennyi haploidizáló vegyület esetében a szegregánsok több mint

6. táblázat. Az *A. nidulans* kromoszómák százalékos eloszlása a szegregánsokban különböző haploidizálószerrek hatására (a haploidizálószerrek rövidítéseit lsd. a 2. táblázatban)

Kromo- szóma	A	B	C	H	D	E	G	m	o	p	M	T
I.	28.9	27.8	30.9	16.9	20.7	29.0	12.8	30.0	26.1	26.5	19.4	36.0
II.	57.9	53.0	57.4	62.9	61.2	64.5	64.0	71.4	65.8	70.6	58.9	54.9
III.	22.3	35.1	52.9	41.1	52.9	53.3	31.2	33.6	26.1	11.8	32.3	25.0
IV.	44.6	35.5	45.1	37.1	24.7	40.2	24.8	33.6	29.7	30.9	37.1	33.5
V.	46.3	45.7	38.2	49.2	51.2	53.3	55.2	55.7	46.8	48.5	43.5	61.0
VI.	77.7	67.2	77.9	62.9	77.7	78.5	80.0	64.3	72.1	80.9	69.4	81.1
VII.	42.2	35.9	51.5	41.1	36.4	33.6	42.4	31.4	63.1	43.4	41.9	29.9
VIII.	61.2	60.9	47.1	74.8	47.5	49.5	79.3	65.2	53.2	59.1	54.0	76.2
összes vizsg. szegr.	121	1178	204	124	121	107	125	140	111	136	124	164

4. ábra. A különböző rekombinogén anyagok hatása az *A. nidulans* kapcsoltsági csoportok megjelenésére az utódszegregánsokban (lsd. a következő oldalon; a grafikonokon a fenti táblázattal megegyező sorrendben vannak feltüntetve a haploidizálószerrek)



50%-ában jelen volt; ez az arány a griseofulvin, p-fluorofenilalanin és metil-tiofanát esetében a 80%-ot is elérte. Erre a jelenségre nem tudtunk magyarázatot találni. Egyes *A. nidulans* kromoszómáknál valamennyi haploidizálószer esetében hasonló százalékos eloszlást észleltünk a létrejött szegregánsokban (pl. a II. és a VI. kromoszómák markerei esetében), míg másoknál igen eltérő eredményeket kaptunk. Pl. a III. kromoszómán hordozott cikloheximid-rezisztencia a haploid szegregánsok több mint 50%-ában jelen volt, ha a szegregánsokat széntetrikloriddal, Na-deoxikoláttal vagy etanollal indukáltuk, míg az összes többi haploidizálószer alkalmazása esetében jóval kisebb arányban hordozták ezt a markert a szegregánsok.

A markerek szabad szegregációját az *A. nidulans* kromoszómák páronkénti előfordulási gyakoriságának meghatározásával próbáltuk bizonyítani; a benomyl esetében ezeket az adatokat a 7. táblázat mutatja. Látható, hogy a kromoszómák valamennyi kombinációját észleltük a szegregánsokban, bár az észlelt arányok eltérnek a mendeli elvárásoktól (valóban szabad szegregáció esetében a páronkénti négy lehetséges kombinációnak azonos arányban kéne jelen lennie az utódszegregánsokban). Hasonló észlelést tett Croft és Dales (1983) egy *A. nidulans* x *A. nidulans* var. *echinulatus* hibrid vizsgálata során. Ezen hibrid esetében az *A. nidulans* III., V. és VIII. kromoszómáján lokalizált markerek együttes szegregációját is kimutatták; ezen markerek esetében csak szülői kombinációkat nyertek vissza a szegregánsokban. Ilyen jelenséget az NxQ hibrid esetében nem észleltünk. Bradshaw és mtsi (1983) az *A. nidulans* x *A.*

7. táblázat. Az NxQ hibrid szabad szegregációjának bizonyítása a benomylt alkalmazva szegregáltatószerként

Kromo- szóma	vizsgált szegregánsok száma	összes hordozók száma ¹	%
I.	1178	327	27.8
II.	1067	565	53.0
III.	1178	414	35.1
IV.	1178	418	35.5
V.	1178	538	45.7
VI.	1164	782	67.2
VII.	1178	423	35.9
VIII.	932	568	60.9

¹ : Azon szegregánsok száma, melyekben az adott kromoszóma az *A. nidulans*-ból származik.

Kromoszóma-párok	1/1	0/0	1/0	0/1	összes	npt:pt	chi
I.-II.	138	375	127	427	1067	1.08	0.7
I.-III.	123	560	204	291	1178	0.72	14.8
I.-IV.	148	581	179	270	1178	0.62	33.0
I.-V.	195	508	132	343	1178	0.68	21.9
I.-VI.	151	232	114	570	1164	1.79	42.2
I.-VII.	139	567	188	284	1178	0.67	23.0
I.-VIII.	154	447	111	355	932	0.98	0.03
II.-III.	167	321	398	181	1067	1.19	3.8
II.-IV.	203	331	362	171	1067	1.00	0
II.-V.	251	279	314	223	1067	1.01	0.02
II.-VI.	386	158	174	335	1053	0.94	0.5
II.-VII.	180	327	385	175	1067	1.10	1.3
II.-VIII.	261	124	188	248	821	1.13	1.5
III.-IV.	146	492	268	272	1178	0.85	4.0
III.-V.	214	440	200	324	1178	0.80	7.1
III.-VI.	270	241	141	512	1164	1.28	8.5
III.-VII.	263	604	151	160	1178	0.36	130.7
III.-VIII.	220	265	99	348	932	0.92	0.7
IV.-V.	218	440	200	320	1178	0.79	8.0
IV.-VI.	267	237	145	515	1164	1.30	10.3
IV.-VII.	162	499	256	261	1178	0.78	8.7
IV.-VIII.	232	264	100	336	932	0.88	1.9
V.-VI.	340	193	189	442	1164	1.18	4.0
V.-VII.	204	421	334	219	1178	0.88	2.1
V.-VIII.	274	214	150	294	932	0.91	1.0
VI.-VII.	271	236	146	511	1164	1.30	9.5
VI.-VIII.	311	81	279	247	918	1.34	9.6
VII.-VIII.	247	228	136	321	932	0.96	0.2

1/1: mindkét kromoszóma az *A. nidulans*-ból származik;
 0/0: egyik kromoszóma sem az *A. nidulans*-ból származik;
 1/0: az elöl lévő kromoszóma az *A. nidulans*-ból származik;
 0/1: a hátul lévő kromoszóma az *A. nidulans*-ból származik.

rugulosus hibridek vizsgálata során a szülői markerkombinációk túlsúlyát észlelte a vizsgált szegregánsokban, amit a két genom között fennálló ún. interspecifikus inkompatibilitással magyaráztak. Megvizsgáltuk chi-négyzet módszerrel (Rédei, 1987) a szülői és nemszülői kombinációk előfordulásának a várt 1:1 aránytól való eltérését a szegregánsokban; az eredményeket a 8. táblázat összegzi. Látható, hogy míg bizonyos esetekben valóban megfigyelhető a szülői markerkombinációk túlsúlya, más esetekben éppen a nemszülői kombinációk fordulnak elő nagyobb számban. A legerősebben a III-VII. kromoszómapár esetében észleltük a mért adatok eltérését a szabad szegregáció esetén várttól; szinte valamennyi haploidizálószer esetében igen magas értékeket kaptunk, aminek a szülői típusok túlsúlya volt az oka valamennyi esetben. Szintén a szülői típusok túlsúlyát észleltük az I., III., IV. és VII. kromoszómák valamennyi párosításában; ezeket az adatokat kiemeltük a táblázatban. A szülői típus túlsúlyát jól láthatóan az *A. quadrilineatus* kromoszómapároknak a szegregánsokban nagyobb számban való előfordulása idézte elő.

A szegregánsokban észlelt morfológiai változatosság meghaladta a szülőkben észleltékét. A morfológiai hasonlóságot néhány esetben bizonyos markerek, azaz kapcsoltsági csoportok jelenlétéhez ill. hiányához tudtuk kötni. A néhány szegregánsban megjelenő faközöld konídiumszín, mely emlékeztetett a vad *A. quadrilineatus* konídiumszínére, az *A. nidulans* II. és VI. kromoszómájának jelenlétével, és az I. és VII. kromoszómák hiányával volt

8. táblázat. A szülői és nemszülői kromoszómakombinációk előfordulása, és ezek chi-négyzet analízise

Kromoszóma-párok	1/1	0/0	1/0	0/1	npt:pt	chi-érték
I.-II.	345	775	311	1219	1.37	31.56
I.-III.	255	1322	463	721	0.75	27.83
I.-IV.	298	1341	389	626	0.62	73.12
I.-V.	367	1084	351	959	0.90	3.55
I.-VI.	481	601	206	1469	1.55	63.56
I.-VII.	332	1297	386	746	0.69	44.55
I.-VIII.	359	656	315	1108	1.40	33.97
II.-III.	565	741	999	345	1.03	0.26
II.-IV.	556	719	1008	367	1.08	1.85
II.-V.	807	631	757	455	0.84	9.55
II.-VI.	1110	280	449	797	0.90	3.88
II.-VII.	585	661	979	425	1.13	4.65
II.-VIII.	829	367	552	579	0.95	0.88
III.-IV.	342	1160	634	625	0.84	10.61
III.-V.	536	995	440	790	0.80	16.30
III.-VI.	670	476	303	1298	1.40	37.52
III.-VII.	631	1338	345	447	0.40	250.45
III.-VIII.	534	673	298	933	1.02	0.11
IV.-V.	460	928	507	866	0.99	0.04
IV.-VI.	661	479	300	1307	1.41	39.53
IV.-VII.	431	1147	536	647	0.75	28.11
IV.-VIII.	594	688	283	872	0.90	3.26
V.-VI.	913	375	404	1055	1.13	5.26
V.-VII.	466	823	860	612	1.14	6.00
V.-VIII.	704	535	436	763	0.97	0.31
VI.-VII.	752	459	851	685	1.27	19.11
VI.-VIII.	912	178	789	545	1.22	12.18
VII.-VIII.	652	587	384	815	0.97	0.31

1/1: mindkét kromoszóma az *A. nidulans*-ból származik;
 0/0: egyik kromoszóma sem az *A. nidulans*-ból származik;
 1/0: az elöl lévő kromoszóma az *A. nidulans*-ból származik;
 0/1: a hátul lévő kromoszóma az *A. nidulans*-ból származik.

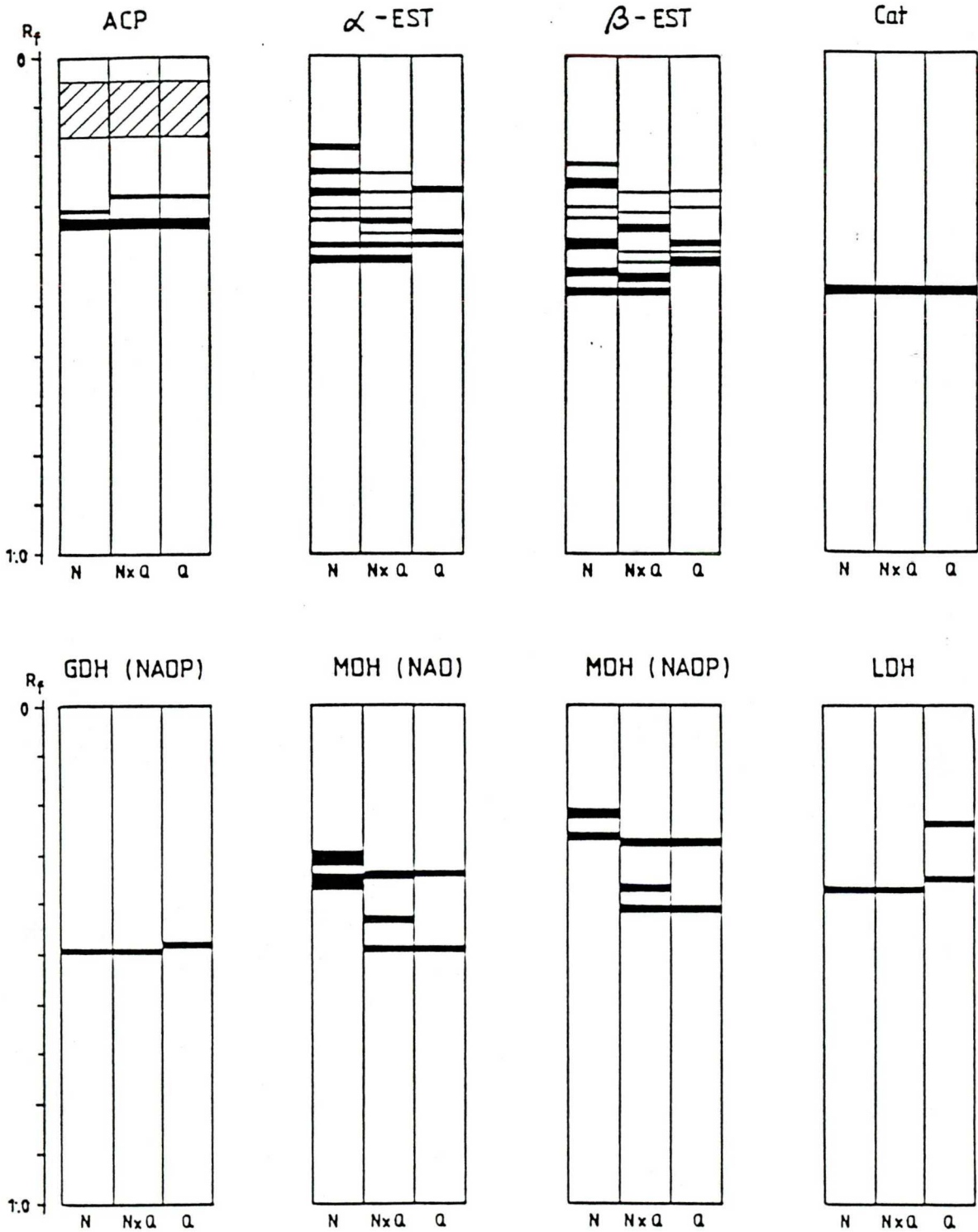
összefüggésben, a szegregánsok konídiumainak sötétbarna színe pedig az I., VI. és VII. *A. nidulans* kapcsoltsági csoportok hiányával függött össze. Hasonló jelenséget észlelt Croft és Dales (1983) egy *A. nidulans* x *A. nidulans* var. *echinulatus* szomatikus hibrid szegregánsaiban.

IV.3. Izoenzimanalízis

Laboratóriumunkban már korábban vizsgáltuk az *A. nidulans* és *A. quadrilineatus* szülők és hibridjük izoenzimképét, több enzimre (Tóth és mtsi, 1986). A szülők a kataláz kivételével valamennyi vizsgált enzim esetében különböző izoenzimképet mutattak (5.ábra). A hibrid a glutamát-dehidrogenáz és a laktát-dehidrogenáz esetében az *A. nidulans*, a savas foszfatáz esetében az *A. quadrilineatus* izoenzimintázatát mutatta. Az α -amilészteráz esetében a szülői izoenzimformák keveredését, a β -amilészteráz esetében emellett új izoenzimformák megjelenését is észleltük. A NAD- ill. NADP-függő malát-dehidrogenázok esetében a hibrid az *A. quadrilineatus* mintázatát mutatta, egy-egy új izoenzimforma megjelenése mellett.

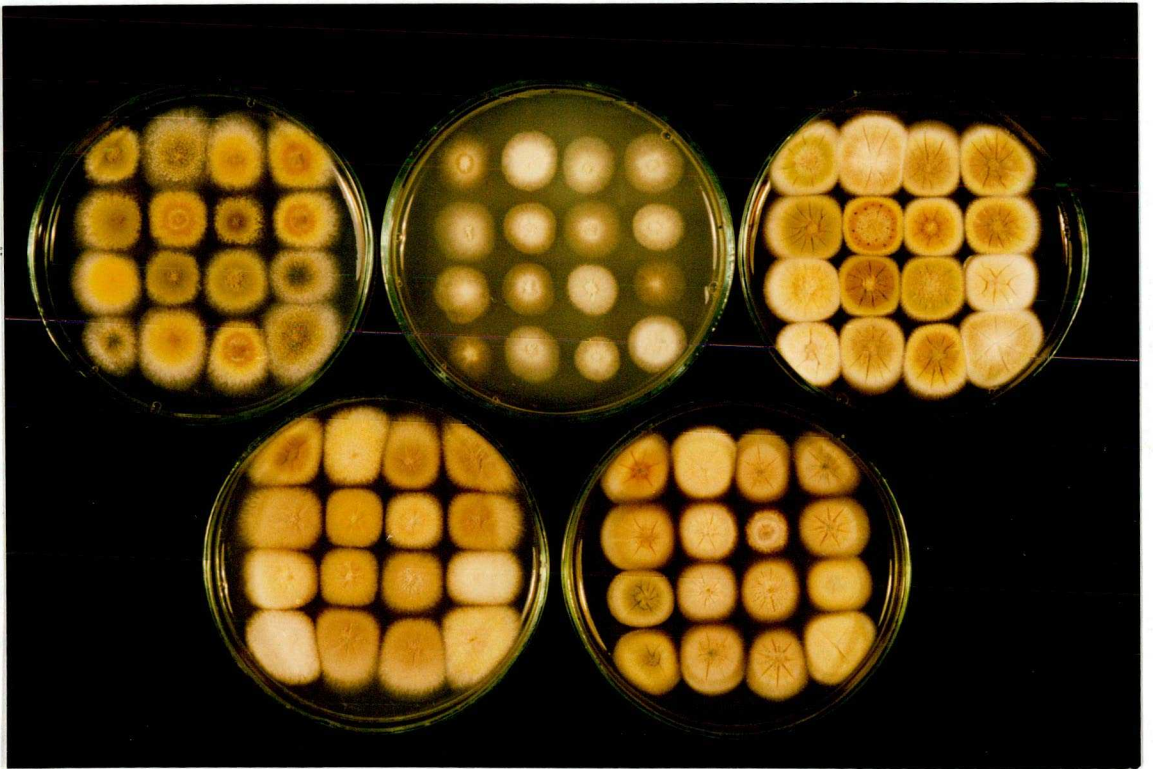
Az *A. nidulans* x *A. quadrilineatus* hibrid szegregánsai közül megpróbáltunk olyanokat találni, melyek az *A. nidulans* szülő valamennyi markerét hordozzák, kivéve egyet. Így olyan szegregánsokat szándékoztunk találni, melyekben valamennyi kromoszóma az *A. nidulans*-ból származik, kivéve egyet, mely az *A. quadrilineatus*-ból. Ez a próbálkozásunk az *A. nidulans* nyolc kromoszómája közül öt (az I., III.,

5. ábra. Az *A. nidulans*, *A. quadrilineatus* szülők és ezek interspecifikus hibridjének izoenzimmintázatai

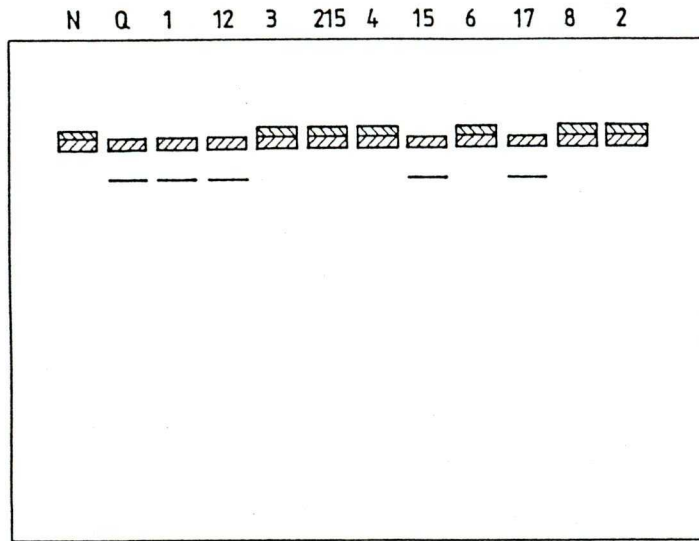


IV., VI. és VIII.) esetében járt sikerrel; a többi kromoszómára olyan szegregánsokat használtunk, melyekben két kromoszóma származott az *A. quadrilineatus*-ból (a felhasznált szegregánsok és szülői törzsek a 6. ábrán láthatók, különböző táptalajokon; szelektív táptalajokon mutatott viselkedésüket a 4. táblázat mutatja). Ezen szegregánsok és a szülői törzsek izoenzimintázatait vizsgáltuk (7. ábra). A szülők és a szegregánsok azonos izoenzimképet mutattak a kataláz, az alkohol-dehidrogenáz és a NADP-függő glutamát-dehidrogenáz esetében. Utóbbi enzim esetében korábban eltérő mobilitású formákat észleltünk a szülőkben 6-15% grádiens-gélt alkalmazva (5. ábra). A jelen esetben alkalmazott 7.5% gél valószínűleg nem volt megfelelő felbontású ahhoz, hogy az igen hasonló mobilitású sávokat el tudjuk különíteni. A NAD-függő malát-dehidrogenáz esetében két-két sávot észleltünk. Ezek közül az *A. quadrilineatus* gyorsabban futó enzimformáját az I. kromoszómán tudtuk lokalizálni, hasonlóan az *A. nidulans* lassabban futó izoenzimformájához, mellyel felváltva jelent meg a szegregánsokban az *A. quadrilineatus* izoenzim. Az arilészteráz izoenzimintázatok (8. ábra) három sávját tudtuk az I., V. ill. VII. kromoszómához kötni. A celluláz izoenzimek egyikét sikerült az *A. nidulans* III. kromoszómáján lokalizálni, a másik erősen festődött sáv mindkét szülőben és valamennyi szegregánsban azonos mobilitást mutatott. A savas foszfatáz esetében észlelt négy sáv közül kettő mutatott eltérő mobilitást a két szülő esetében. Ezek egyikét a III., másikat az I. *A. nidulans* kromoszómán tudtuk lokalizálni. A laktát-dehidrogenáz,

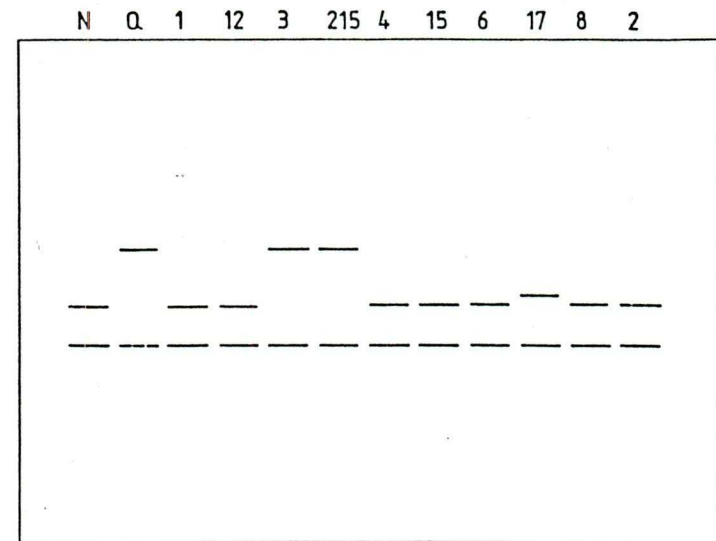
6. ábra. Az izoenzimanalízisben felhasznált szegregánsok viselkedése különböző táptalajokon (a táptalajok a csészék sorrendjében: CZ, MM, MO, PM, V)



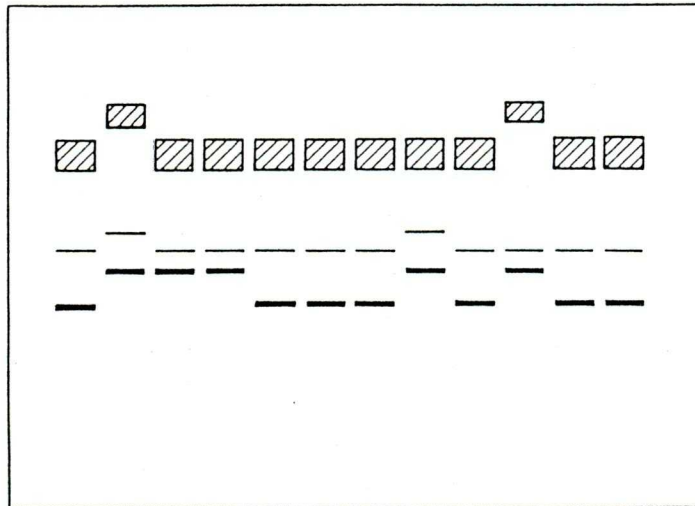
7. ábra. Az *A. nidulans*, *A. quadrilineatus* és az *A. nidulans* kapcsoltsági csoportokhoz rendelhető szegregánsok izoenzimeképe



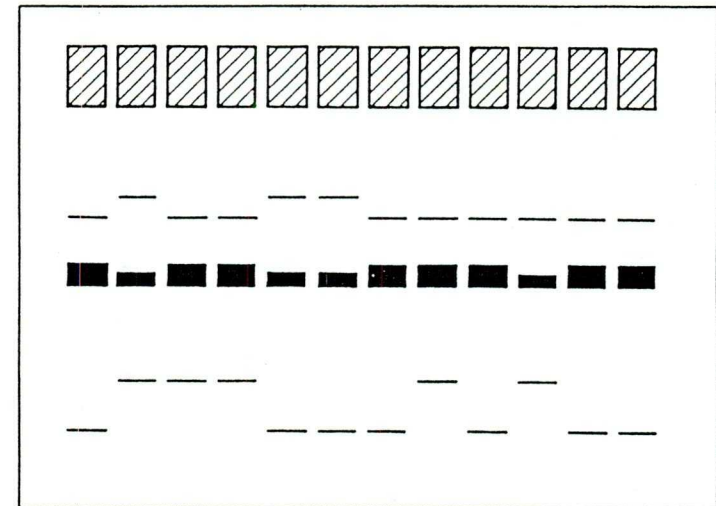
MDH



celluláz



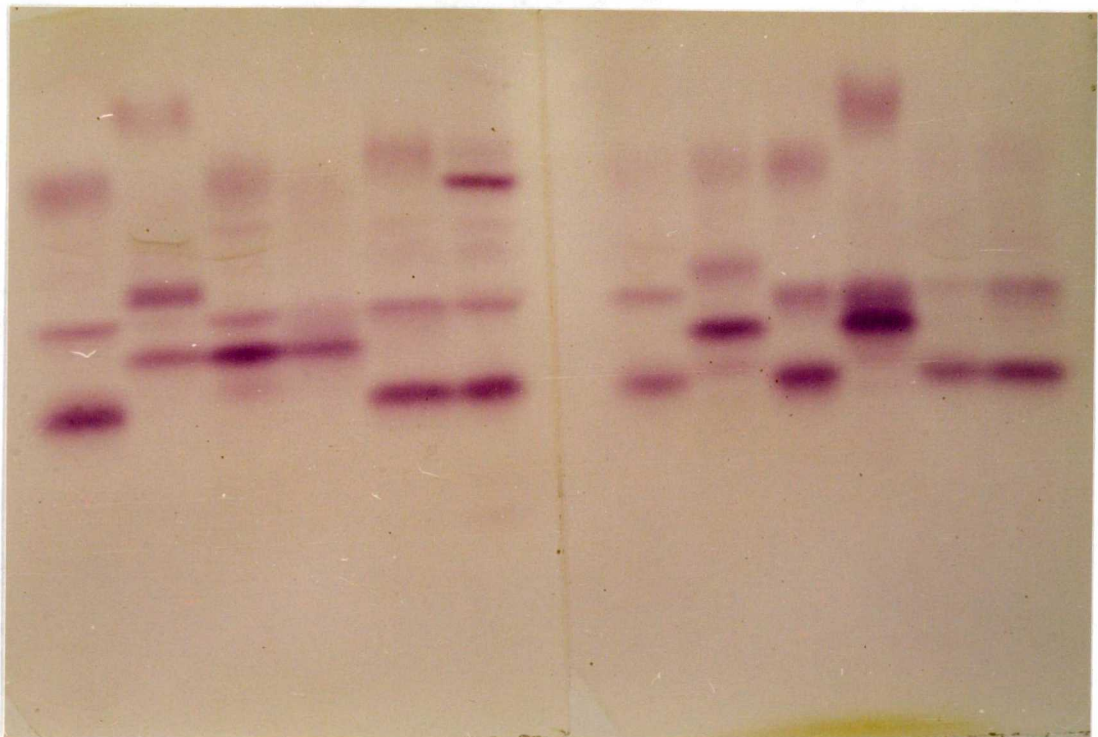
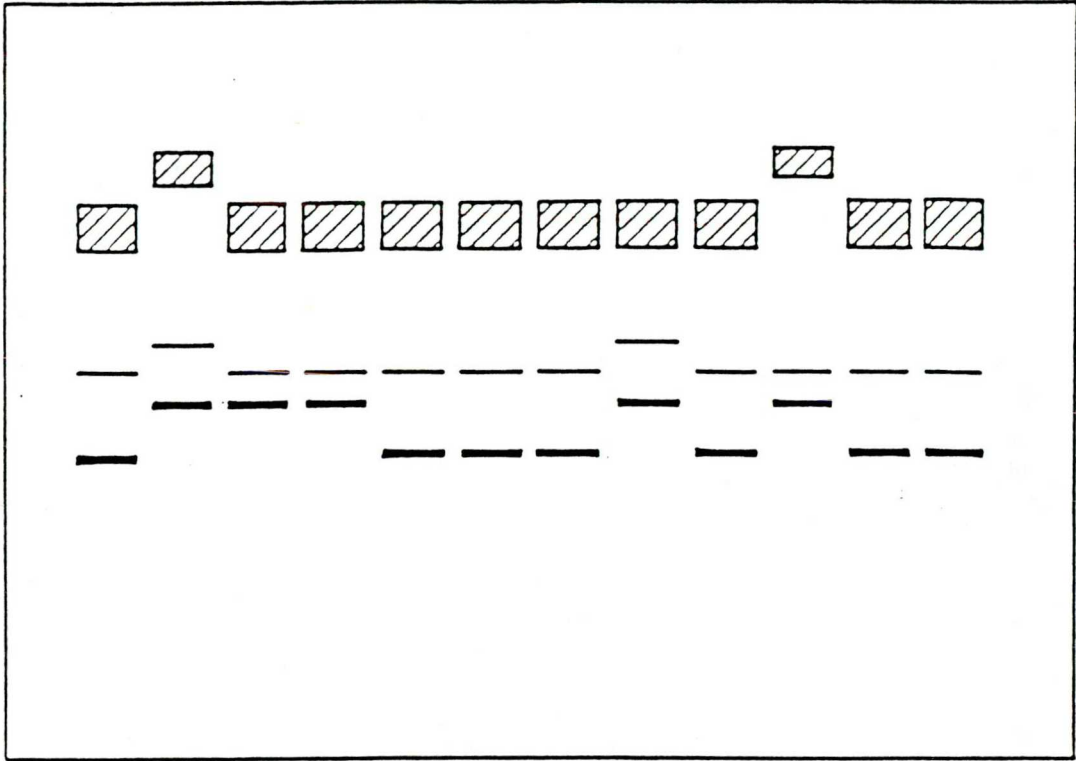
EST



ACP

8. ábra. Az arilészteráz izoenzimek mintázata

N Q 1 12 3 215 4 15 6 17 8 2



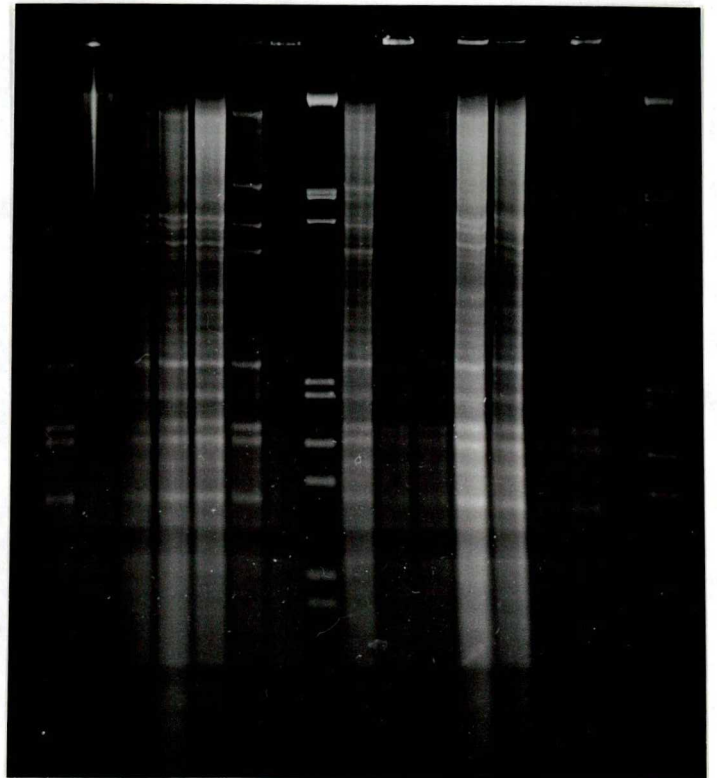
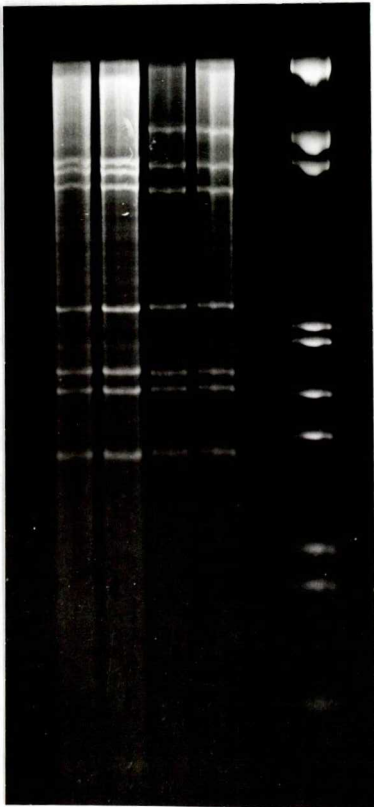
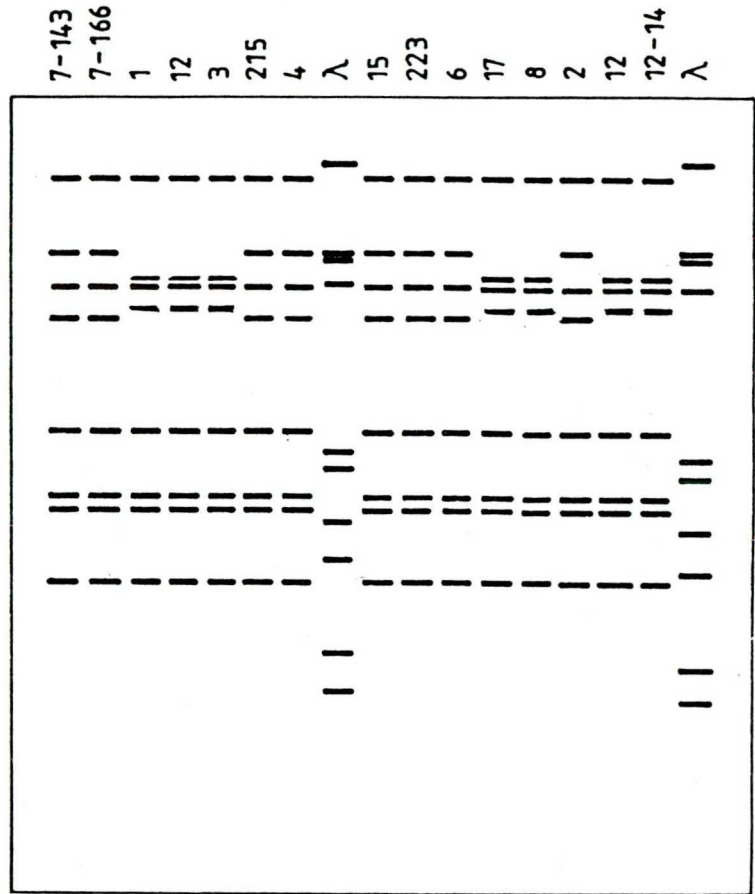
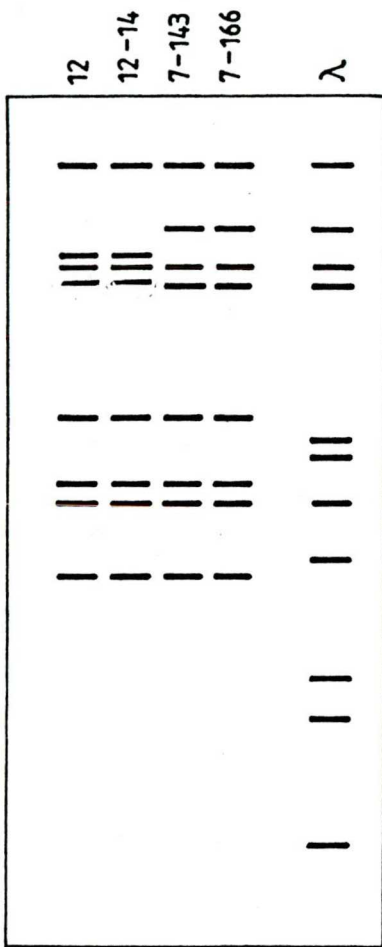
amiláz, RNáz, szuperoxid dizmutáz enzimek esetében nem tudtuk megfelelően detektálni az izoenzimformákat az alkalmazott elválasztási és festési módszerekkel.

IV.4. A szegregánsok RFLP-analízise

A törzsekből kétféle módszerrel tisztítottunk DNS-t; Lee és mtsi (1988) mini-prep módszerével, és Turner szerint (Turner és Croft, 1988). Mindkét módszerrel emészthető DNS-t tudtunk izolálni, de a gélen közvetlenül csak az utóbbi módszerrel tisztított DNS-minták esetében tudtunk repetitív szekvenciákat észlelni, ezért a későbbiekben ezt a módszert alkalmaztuk.

A szegregánsokból és a szülői törzsekből összDNS-t tisztítottunk, restriktív enzimmel emésztettük, majd géltre vittük. Az elektroforézis után az elválasztott DNS-fragmenteket lefotóztuk. A *Hind*III restriktív enzimmel generált mintázatokról feltételezhető, hogy az így nyert repetitív DNS azonos a mitokondriális DNS-sel (9. ábra); ezt alátámasztja, hogy a mintázat megegyezik az irodalomban korábban leírt, ill. az ismert hasítási térképek alapján létrehozható mintázatokkal (Stepien és mtsi, 1978; Croft és Dales, 1983), és a repetitív sávok összmérete megegyezik az irodalomban leírt mitokondriális DNS-méretekkel; így az *A. nidulans* mtDNS legújabb irodalom szerinti mérete 33.25 kbp (Dyson és mtsi, 1989), míg az általunk nyert sávok összmérete 33.32 kbp (korábbi irodalmi adatok az *A.*

9. ábra. A szülői törzsek és a szegregánsok *Hind*III-generált összDNS-mintázatai

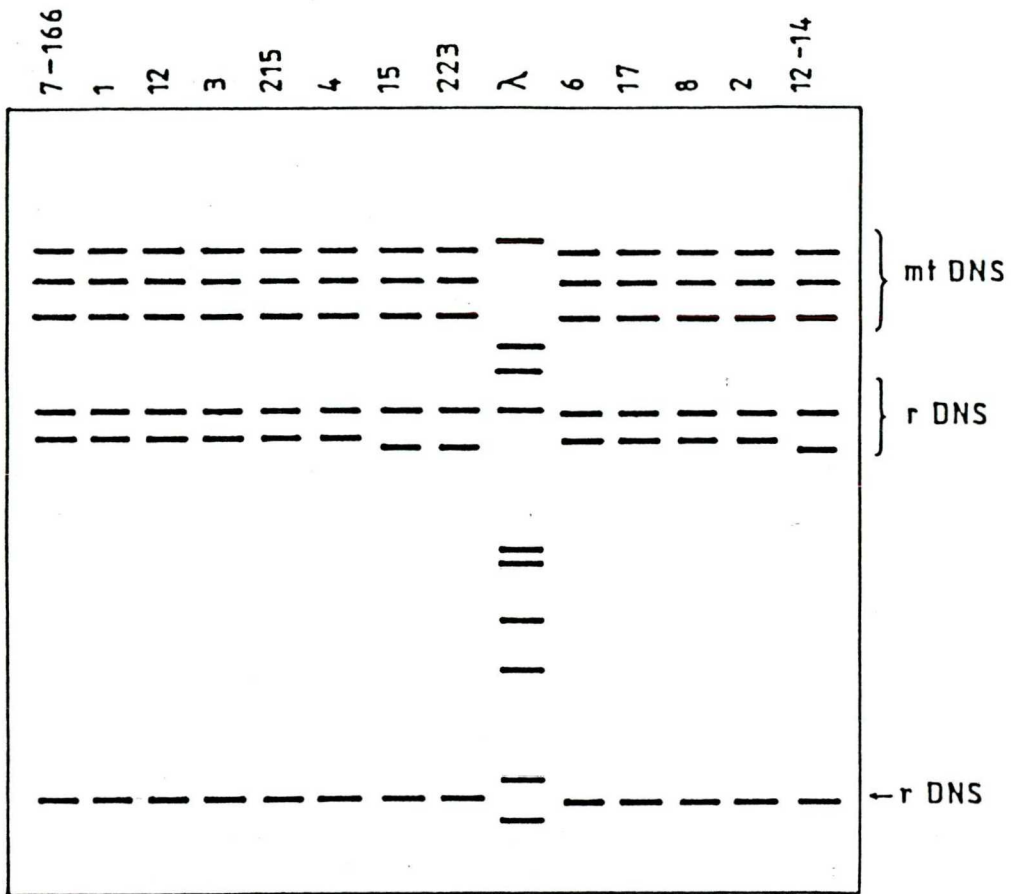


nidulans mtDNS méretét 31.5 és 35 kbp közt említik: Küntzel és mtsi, 1980; Croft és mtsi, 1983).

A szegregánsokban vagy az *A. nidulans*, vagy az *A. quadrilineatus* mtDNS-ét észleltük (9. ábra); ez arra utal, hogy a hibrid micéliumokban kevert mitokondrium-populáció van jelen. A szegregánsokban a mtDNS-ek megjelenését nem tudtuk egyik kromoszóma meglétéhez ill. hiányához sem kötni; véletlenszerűen észleltük vagy az egyik, vagy a másik szülőnek megfelelő mtDNS-mintázatot.

Az *EcoRI*-emésztett DNS-mintákat géltre vive hat sávot észleltünk (10. ábra), melyek mindegyike nem lehetett mtDNS-eredetű, mivel az *A. nidulans* mtDNS-e *EcoRI*-emésztéssel három fragmentet ad (Stepien és mtsi, 1978). Ezen három fragment mérete a mi emésztési képünkön lévő három nagy molekulásúlyú fragment méretével egyezik meg. CsCl-grádiens ultracentrifugálással (Osman, 1987) megszabadulva a mtDNS-től, három erős sávot észleltünk az *EcoRI*-emésztett DNS-t tartalmazó géleken, azonos helyen, mint ahova centrifugálás előtt az alsó sávok futottak; ezen fragmentek egyike az *A. quadrilineatus* vad és mutáns törzseiben, és az V. kromoszómát az *A. quadrilineatus* szülőből hordozó szegregáns esetében kisebb méretű volt, mint az *A. nidulans* és a többi szegregáns esetében. Ezt a három fragmentet riboszómális DNS eredetűnek gondoljuk, mivel ez az a DNS-szekvencia, amely nagy kópiaszámban fordul elő a genomban; a fragmentek együttes mérete 7.4 kbp, ami megegyezik az *A. nidulans* riboszómális repeat unit *EcoRI*-fragmentjeinek összméretével (Lockington és mtsi, 1982). Az is valószínűsíti ezen fragmentek

10. ábra. A szülői törzsek és a szegregánsok *EcoRI*-generált összDNS-mintázata



riboszómális DNS-eredetét, hogy Bainbridge és mtsi (1990) cikkében a *Saccharomyces cerevisiae* riboszómális DNS komplexét hibridizálva *EcoRI*-emésztett *A. nidulans* DNS-hez a gélfotón jól látható, általam is észlelt két sávval egy magasságban kaptak autoradiográfiás jeleket. Mindezen észlelések alapján feltételezhető, hogy az *A. nidulans* riboszómális repeat unit az V. kromoszómán lokalizált.

Az ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK fejezetben leírtak szerint Southern-transzfert hajtottunk végre, majd megfelelő próbával hibridizálást végeztünk. A hibridizálás során a 9. táblázatban felsorolt próbákat használtuk. Nem sikerült polimorfizmust észlelnünk a *gdhA* (Gurr és mtsi, 1986) és *amdS* (Hynes és mtsi, 1983) struktúrgént, és a 25 S riboszómális DNS-t (Lockington és mtsi, 1982) mint próbát hibridizálva az *EcoRI*- ill. *HindIII*-emésztett *A. nidulans* és *A. quadrilineatus* összDNS-hez. Polimorfizmust észleltünk a *benA* (May és mtsi, 1985) gén esetében, melyet a VIII. kromoszómán lokalizáltunk ezzel a módszerrel; ez egybevág az irodalmi adatokkal (Clutterbuck, 1987). Megpróbáltunk random próbákat is hibridizálni az *EcoRI*-emésztett mintákhoz; EMBL3 vektorban létrehozott *A. nidulans* génbankból (Osman, 1987) két random próbát izoláltunk, és ezeket használtuk, de ezek az erőfeszítéseink nem jártak sikerrel, mivel az egyik próba nem hibridizált az *Aspergillus* DNS-ekhez, a másik pedig többféle mintázatot adott a különböző szegregánsok esetében; valószínűleg utóbbi szekvencia nemcsak egy kromoszómán fordul elő.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

Egy *A. nidulans* és *A. quadrilineatus* között protoplaszt fúzióval létrehozott interspecifikus hibridet vizsgáltunk. A hibridet különböző szegregáltatószerekkel haploidizáltuk, majd az így nyert szegregánsokat jellemeztük. Vizsgáltuk az alkalmazott haploidizálószer (akridin sárga, benomyl, klorál hidrát, deoxikólsav, etanol, griseofulvin, m-, o- és p-fluorofenilalanin, mikonazol, metil-tiofanát, széntetraklorid) hatását a hibrid túlélésére, és a szülői markerek megjelenésére a szegregánsokban. Nem kaptunk jelentős különbséget a különböző szerekkel indukált szegregánsok vizsgálata során a kromoszómák eloszlásában. A szülői markerek eloszlása a szegregánsokban véletlenszerű volt; az *A. nidulans* különböző kromoszómán lokalizált markereinek együttes szegregációját, tehát azok kapcsoltságát az *A. quadrilineatus* genomában nem észleltük, és a szülői markerkombinációk túlsúlya sem volt megfigyelhető a szegregánsokban. Az *A. quadrilineatus* sárga konídiumszínt ill. nikotinsav-auxotrófiát meghatározó mutációit a szegregációs adatok alapján az *A. nidulans* I. és V. kapcsoltsági csoportjának megfelelő *A. quadrilineatus* kromoszómákon lokalizáltuk. Megállapítottuk, hogy a kísérleteinkben használt *A. nidulans* törzs által hordozott valamennyi mutációt komplementálni képes az *A. quadrilineatus* megfelelő vad típusú allélja. Egyes

fenotípusjegyek megjelenését kötni tudtuk bizonyos markerkombinációk jelenlétéhez ill. hiányához.

Megpróbáltunk létrehozni minden *A. nidulans* kromoszómára egyszeres helyettesítéses szegregánsokat, öt kromoszóma esetében sikerrel. Ezeket (és a többi három kromoszóma esetében kétszeres, ill. háromszoros helyettesítéses) szegregánsokat vizsgáltuk izoenzim- és RFLP-analízissel. A vizsgált 12 enzim közül három (kataláz, alkohol-dehidrogenáz és glutamát-dehidrogenáz) azonos mobilitású izoenzimformákat mutatott a szülőkből és a szegregánsokban. Négy enzim esetében (aril-észteráz, foszfatáz, malát-dehidrogenáz, celluláz) sikerült egyes izoenzimformákat kromoszómákon lokalizálni annak alapján, hogy melyik szegregánsban melyik szülőre jellemző mobilitású izoenzim jelent meg.

Az *A. nidulans* nyolc kromoszómájának megfelelő ún. egyszeres helyettesítéses szegregánsokból DNS-t tisztítva, majd ezt megfelelő restriktív enzimekkel emésztve és a fragmenteket gélen elválasztva a repetitív szekvenciák alapján megállapítottuk, hogy a mtDNS a szegregánsokban véletlenszerűen az egyik vagy a másik szülőből eredeztethető; a mtDNS-genomok rekombinációját nem észleltük. Ebből arra következtettünk, hogy a hibrid micéliumokban mindkét szülő mitokondriumi egyaránt jelen vannak. Az *EcoRI*-emésztéssel generált mintázaton felismerhető repetitív szekvenciák alapján az *A. nidulans* riboszomális repeat unitját az V. kromoszómán lokalizáltuk. Hibridizációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a vizsgált szegregánsokban valóban haploid kromoszómaszerelvény van

jelen, és hogy azon kromoszómák származnak az egyes szülőkből, melyekre a tenyésztési kísérletekből, a markerek eloszlásából következtettünk. A DNS-t filterre vive és megfelelő próbákkal hibridizálva megkíséreltünk struktúrgéneket kromoszómákon lokalizálni. A *gdhA*, *amdS* gének és a 25S riboszómális DNS szekvencia esetében nem észleltünk különbséget a két szülő és a szegregánsok autoradiogramjában, a *benA* gén esetében viszont sikerült polimorfizmust észlelni az *A. nidulans* és az *A. quadrilineatus* között, és a szegregánsok közül azokban detektáltuk az *A. quadrilineatus* szülőnek megfelelő mintázatot, melyekben a VIII. kromoszóma származott ettől a szülőtől. Így ezt a gént a VIII. kromoszómán lokalizáltuk ezzel a módszerrel, ami egybevág az irodalmi adatokkal.

A fenti eredmények alátámasztják, hogy ez a rendszer alkalmas ismert gének ill. random génpróbák kromoszómákon való lokalizálására, hasonlóan a nagyméretű DNS-fragmentek elválasztására alkalmas elektroforetikus technikákhoz (Brody és Carbon, 1989). Ugyanakkor ezzel a módszerrel izoenzimeket is lehet kromoszómákhoz rendelni, amire a fent említett módszer nem alkalmas.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

- Anderson, J.B., Petsche, D.M. és Smith, M.L. (1987) Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea*. *Mycologia* 79, 69-76.
- Anné, J. és Eyssen, H. (1978) Isolation of inter-species hybrids of *Penicillium citrinum* and *Penicillium cyaneofulvum* following protoplast fusion. *FEMS Microbiol. Letters* 4, 87-90.
- Anné, J. és Peberdy, J.F. (1975) Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol. *Arch. Microbiol.* 105, 201-205.
- Anné, J. és Peberdy, J.F. (1981) Characterisation of interspecific hybrids between *Penicillium chrysogenum* and *P. roqueforti* by iso-enzyme analysis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77, 401-408.
- Assinder, S.J. és Upshall, A. (1982) Mitotic aneuploidy induced by sodium deoxycholate in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 83, 101-108.
- Bainbridge, B.W., Spreadbury, C.L., Scalise, F.G. és Cohen, J. (1990) Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 113-118.
- Bartoszewski, S., Borsuk, P., Kern, I. és Bartnik, E. (1987) Microheterogeneity in *Aspergillus nidulans* 5S rRNA genes. *Curr. Genet.* 11, 571-573
- Beauchamp, C. és Fridovich, J. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287.
- Bellincampi, D., Gualandi, G., La Monica, E., Poley, C. és Morpurgo, G.P. (1980) Membrane-damaging agents cause mitotic non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 79, 169-172.
- Bent, K.J. (1967) Electrophoresis of proteins of 3 *Penicillium* species on acrylamide gels. *J. Gen. Microbiol.* 49, 195-200.
- Bignami, M., Aulicino, F., Velcich, A., Carere, A. és Morpurgo, G. (1977) Mutagenic and recombinogenic action of pesticides in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 46, 395-402.
- Birnboim, H.C. és Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Borkhardt, B., Pedersen, M.B. és Olson, L.W. (1987) Mitochondrial DNA in the aquatic fungus *Allomyces*. *Curr. Genet.* 12, 149-156.
- Bos, C.J. (1986) Induced mutation and somatic recombination as tools for genetic analysis and breeding of imperfect fungi. Ph. D. Thesis, Wageningen.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. és Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human Genet.* 32, 314-331.
- Bradshaw, R.E., Lee, K.-U. és Peberdy, J.F. (1983) Aspects of genetic interaction in hybrids of *Aspergillus*

- nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *J. Gen. Microbiol.* 129, 3525-3533.
- Brewer, G.J. (1970) An introduction to isoenzyme techniques. Academic Press, New York.
- Brody, H. és Carbon, J. (1989) Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6260-6263.
- Brown, T.L., Yet, M.-G. és Wold, F. (1982) Substrate-containing gel electrophoresis: sensitive detection of amylolytic, nucleolytic and proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 122, 164-172.
- Camougrand, N., Mila, B., Velours, G., Lazowska, J. és Guérin, M. (1988) Discrimination between different groups of *Candida parapsilosis* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Curr. Genet.* 13, 445-449.
- Carle, G.F. és Olson, M.V. (1984) Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alteration gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 12, 5647-5664.
- Chang, L.O., Srb, A.M. és Steward, F.C. (1962) Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. *Nature* 193, 756-759.
- Clare, B.G., Flentje, N.T. és Atkinson, M.R. (1968) Electrophoretic patterns of oxidoreductases and other proteins as criteria in fungal taxonomy. *Aust. J. Biol. Sci.* 21, 275-295.
- Clutterbuck, A.J. (1969) Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 55, 291-299.
- Clutterbuck, A.J. (1974) *Aspergillus nidulans*. In: Handbook of genetics (szerk. King, R.C.) 447-510. Plenum Press, New York.
- Clutterbuck, A.J. (1987) *Aspergillus nidulans*. In: Genetic maps 4 (szerk. O'Brien, S.J.) 325-337. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Coddington, A., Matthews, P.M., Cullis, C. és Smith, K.H. (1987) Restriction digest patterns of total DNA from different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* - an improved method for race classification. *J. Phytopathol.* 118, 9-20.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. és Hsu, L. (1973) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 69, 2110- .
- Collins, R.A. és Lambowitz, A.M. (1983) Structural variations and optional introns in the mitochondrial DNAs of *Neurospora* strains isolated from nature. *Plasmid* 9, 53-70.
- Crebelli, R., Conti, G., Conti, L. és Carere, A. (1989) A comparative study on ethanol and acetaldehyde as inducers of chromosome malsegregation in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 215, 187-195.
- Croft, J.H. (1987) Genetic variation and evolution in *Aspergillus*. In: Evolutionary biology of the fungi (szerk. Rayner, A.D.M., Braiser, C.M. és Moore, D.) 311-323. Cambridge University Press, Cambridge.
- Croft, J.H. és Dales, R.B.G. (1983) Interspecific somatic hybridisation in *Aspergillus*. In *Protoplasts 1983* (Proceedings of the 6th International Protoplast

- Symposium, Aug. 1983) (szerk. Potrykus, I., Harms, C.T., Hinnen, A., Hütter, R., King, P.J. és Shillito, R.D.) 179-186. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Croft, J.H., Dales, R.G.B., Turner, G. és Earl, A.J. (1980) The transfer of mitochondria between species of *Aspergillus*. In: Advances in protoplast research (szerk. L. Ferenczy és G.L. Farkas) 85-92. Akadémiai Kiadó, Budapest; Pergamon Press, Oxford.
- Croft, J.H., Evans, K.L., Dales, R.B.G. és Anwar, M.M. (1983) Detection and location of vegetative incompatibility genes operating between species of *Aspergillus*. In: Protoplasts 1983 (Poster Proceedings of the 6th International Protoplast Symposium, Aug. 1983) (szerk. Potrykus, I., Harms, C.T., Hinnen, A., Hütter, R., King, P.J. és Shillito, R.D.) 320-321. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Cruickshank, R.H. (1983) Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. Trans. Br. Mycol. Soc. 80, 117-119.
- Cruickshank, R.H. és Pitt, J.I. (1987) The zymogram technique: isoenzyme patterns as an aid in *Penicillium* classification. Microbiol. Sci. 4, 14-17.
- Dales, R.B.G. és Croft, J.H. (1983) Protoplast fusion and the genetical analysis of vegetative incompatibility in *Aspergillus nidulans*. In: Advances in protoplast research (szerk. L. Ferenczy és G.L. Farkas) 73-84. Akadémiai Kiadó, Budapest; Pergamon Press, Oxford.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sci. 121, 404-423.
- De Bertoldi, M., Griselli, M. és Barale, R. (1980) Different test systems in *Aspergillus nidulans* for the evaluation of mitotic gene conversion, crossing-over and non-disjunction. Mutation Res. 74, 303-324.
- De Carli, L. és Larizza, L. (1988) Griseofulvin. Mutation Res. 195, 91-126.
- Dekker, J. (1977) Effect of fungicides on nucleic acid synthesis and nuclear function. In: Antifungal compounds Vol. 2. Interactions in biological and ecological systems. (szerk. Siegel, M.R. és Sisler, H.D.) 365-398. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- De Souza, H.M.L., Baracho, I.R., Messias, C.L. és de Azevedo, J.L. (1977) Electrophoretic variation in esterases in 3 wild-type and respective mutant strains of *Aspergillus flavus*. Experientia 33, 1433-1434.
- Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T.P., Bowden, D.W., Smith, D.R., Lander, E.S., Botstein, D., Akots, G., Rediker, K.S., Gravius, T., Brown, V.A., Rising, M.R., Parker, C., Powers, J.A., Watt, D.E., Kauffman, E.R., Bricker, A., Phipps, P., Muller-Kahle, H., Fulton, T.R., Ng, S., Schumm, J.W., Braman, J.C., Knowlton, R.G., Barker, D.F., Crooks, S.M., Lincoln, S.E., Daly, M.J. és Abrahamson, J. (1987) A genetic linkage map of the human genome. Cell 51, 319-337.
- Drayna, D. (1986) Fine structure linkage mapping of the human genome using RFLP analysis. BioTechniques 4, 412-418.

- Dyson, N.J., Brown, T.A., Ray, J.A., Waring, R.B., Scazzocchio, C. és Davies, R.W. (1989) Processing of mitochondrial RNA in *Aspergillus nidulans*. *J. Mol. Biol.* 208, 587-599.
- Earl, A.J., Turner, G., Croft, J.H., Dales, R.B.G., Lazarus, C.M., Lünsdorf, H. és Küntzel, H. (1981) High frequency transfer of species specific mitochondrial DNA sequences between members of the *Aspergillaceae*. *Curr. Genet.* 3, 221-228.
- Economou, A., Lees, V., Pukkila, P.J., Zolan, M.E. és Casselton, L.A. (1987) Biased inheritance of optional insertions following mitochondrial genome recombination in the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. *Curr. Genet.* 11, 513-519.
- Elliott, C.G. (1960) The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. Camb.* 1, 462-476.
- Feinberg, A.P. és Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13; Addendum (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal. Biochem.* 137, 266-267.
- Ferenczy, L. (1976) Some characteristics of intra- and interspecific protoplast fusion products of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. In: *Cell genetics of higher plants* (szerk. Dudits, D., Farkas, G.L. és Maliga, P.) 171-181. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Ferenczy, L. (1984) Fungal protoplast fusion: basic and applied aspects. In: *Cell fusion: gene transfer and transformation* (szerk. Beers, R.F. és Bassett, E.G.) 145-169. Raven Press, New York.
- Ferenczy, L., Kevei, F. és Szegedi, M. (1975a) Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia* 31, 50-52.
- Ferenczy, L., Kevei, F. és Szegedi, M. (1975b) High frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia* 31, 1028-1030.
- Ferenczy, L., Szegedi, M. és Kevei, F. (1977) Interspecific protoplast fusion and complementation in *Aspergilli*. *Experientia* 33, 184-186.
- Förster, H., Kinscherf, T.G., Leong, S.A. és Maxwell, D.P. (1989) Restriction fragment length polymorphisms of the mitochondrial DNA of *Phytophthora megasperma* isolated from soybean, alfalfa, and fruit trees. *Canad. J. Bot.* 67, 529-537.
- Garber, A.D. és Rippon, J.W. (1968) Proteins and enzymes as taxonomic tools. *Adv. Appl. Microbiol.* 10, 137-154.
- Garber, E.D. (1974) Enzymes as taxonomic and genetic tools in *Phaseolus* and *Aspergillus*. *Israel J. Med. Sci.* 10, 268-277.
- Garber, R.C. és Yoder, O.C. (1984) Mitochondrial DNA of the filamentous ascomycete *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr. Genet.* 8, 621-628.
- Glynn, A.N. és Reid, J. (1969) Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in the genus *Fusarium*. *Can. J. Bot.* 47, 1823-1831.

- Goc, A., Dmochowska, A. és Weglenski, P. (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the *argB* gene. *Acta Microbiol. Pol.* 36, 29-38.
- Gomi, K., Tanaka, A., Iimura, Y. és Takahashi, K. (1989) Rapid differentiation of four related species of *koji* molds by agarose gel electrophoresis of genomic DNA digested with *Sma*I restriction enzyme. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 35, 225-232.
- Goren, R. és Huberman, M. (1976) A simple and sensitive staining method for the detection of cellulase isoenzymes in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 75, 1-8.
- Grossman, L.I. és Hudspeth, M.E.S. (1985) Fungal mitochondrial genomes. In: *Gene manipulations in fungi* (szerk. Bennett, J.W. és Lasure, L.L.) 65-103. Academic Press, Orlando.
- Gualandi, G. (1984) Genotoxicity of the free-radical producers CCl_4 and lipoperoxide in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 136, 109-114.
- Gurr, S.J., Hawkins, A.R., Drainas, C. és Kinghorn, J.R. (1986) Isolation and identification of the *Aspergillus nidulans* *gdhA* gene encoding NADP-linked glutamate dehydrogenase. *Curr. Genet.* 10, 761-766.
- Gusella, J.F. (1986) DNA polymorphism and human disease. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 831-854.
- Harris, H. és Hopkinson, D.A. (1976) *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics.* Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Harsanyi, Z., Granek, I.A. és MacKenzie, D.W.R. (1977) Genetic damage induced by ethyl alcohol in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 48, 51-74.
- Hastie, A.C. (1970) Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature* 226, 771.
- Heagy, F.C. és Roper, J.A. (1952) Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature* 170, 713-714.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A. és Nienhuis, J. (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72, 761-769.
- Hintz, W.E., Mohan, M., Anderson, J.B. és Horgen, P. A. (1985) The mitochondrial DNAs of *Agaricus*: heterogeneity in *A. bitorquis* and homogeneity in *A. brunnescens*. *Curr. Genet.* 9, 127-132.
- Hoffmann, M., Zimmermann, M. és Emeis, C.C. (1987) Orthogonal field alternation gelelectrophoresis (OFAGE) as a means for the analysis of somatic hybrids obtained by protoplast fusion of different *Saccharomyces* strains. *Curr. Genet.* 11, 599-603.
- Holmes, D.S. és Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- Howlett, B.J. (1989) An electrophoretic karyotype for *Phytophthora megasperma*. *Exp. Mycol.* 13, 199-202.
- Hynes, M.J., Corrick, C.M. és King, J.A. (1983) Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of

- structural and regulatory mutations. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1430-1439.
- Ishitani, G., Uchida, K. és Ikeda, Y. (1956) The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. *Exp. Cell Res.* 10, 737-740.
- Käfer, E. (1958) An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 9, 105-145.
- Käfer, E. (1960) High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature* 186, 619-620.
- Käfer, E. (1984) Disruptive effects of ethyl alcohol on mitotic chromosome segregation in diploid and haploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 135, 53-75.
- Käfer, E., Scott, B.R. és Kappas, A. (1986) Systems and results of tests for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 167, 9-34.
- Kaiser, S.A.K.M. és Gupta, P.K.S. (1976) Serological and electrophoretic studies of three *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67, 33-37.
- Kappas, A. (1978) On the mechanisms of induced somatic recombination by certain fungicides in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 51, 189-197.
- Kappas, A. és Georgopoulos, S.G. (1974) Interference of griseofulvin with the segregation of chromosomes at mitosis in diploid *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 334-335.
- Kappas, A., Georgopoulos, S.G. és Hastie, A.C. (1974) On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 26, 17-27.
- Kevei, F. (1980) *Aspergillus* protoplasztok és fúziójuk. Kandidátusi értekezés, József Attila Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszék, Szeged.
- Kevei, F. és Peberdy, J.F. (1977) Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* 102, 255-262.
- Kevei, F. és Peberdy, J.F. (1979) Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 170, 213-218.
- Kevei, F. és Peberdy, J.F. (1984) Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the *Aspergillus nidulans* group. *J. Gen. Microbiol.* 130, 2229-2236.
- Kevei, F. és Peberdy, J.F. (1985) Interspecies hybridization after protoplast fusion in *Aspergillus*. In: *Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics* (szerk. Peberdy, J.F. és Ferenczy, L.) 241-257. Marcel Dekker Inc., New York.
- Kinghorn, J.R. és Pateman, J.A. (1975) Mutations which affect amino acid transport in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 86, 174-183.
- Kistler, H.C. és Benny, U. (1989) The mitochondrial genome of *Fusarium oxysporum*. *Plasmid* 22, 86-89.

- Kistler, H.C., Bosland, P.W., Benny, U., Leong, S. és Williams, P.H. (1987) Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathol.* 77, 1289-1293.
- Klich, M.A. és Mullaney, E.J. (1987) DNA restriction enzyme fragment polymorphism as a tool for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae*. *Exp. Mycol.* 11, 170-175.
- Kohn, L.M., Petsche, D.M., Bailey, S.R., Novak, L.A. és Anderson, J.B. (1988) Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. *Phytopathol.* 78, 1047-1051.
- Kozłowski, M. és Stepien, P.P. (1982) Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 128, 471-476.
- Kulik, M.M. és Brooks, A.G. (1970) Electrophoretic studies of soluble proteins from *Aspergillus* spp. *Mycologia* 62, 365-376.
- Kurzeja, K.C. és Garber, E.D. (1973) A genetic study of electrophoretically variant extracellular amylolytic enzymes of wild-type strains of *Aspergillus nidulans*. *Can. J. Genet. Cytol.* 15, 275-287.
- Küntzel, H., Basak, N., Imam, G., Köchel, H., Lazarus, C.M., Lünsdorf, H., Bartnik, E., Bidermann, A. és Stepien, P.P. (1980) The mitochondrial genome of *Aspergillus nidulans*. In: The organization and expression of the mitochondrial genome (szerk. Kroon, A.M. és Saccone, C.) 79-86. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Laaser, G., Möller, E., Jahnke, K.-D., Bahnweg, G., Prillinger, H. és Prell, H.H. (1989) Ribosomal DNA restriction fragment analysis as a taxonomic tool in separating physiologically similar basidiomycetous yeasts. *System. Appl. Microbiol.* 11, 170-175.
- Lee, S.B., Milgroom, M.G. és Taylor, J.W. (1988) A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newslett.* 35, 23-24.
- Lhoas, P. (1961) Mitotic haploidization treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. *Nature* 190, 744.
- Liang, P. és Chen, K. (1987) Virus transmission through interspecies protoplast fusion in *Aspergillus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89, 73-81.
- Lockington, R.A., Taylor, G.G., Winther, M., Scazzocchio, C. és Davies, R.W. (1982) A physical map of the ribosomal DNA repeat unit of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 20, 135-137.
- Magee, B.B., D'Souza, T.M. és Magee, P.T. (1987) Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J. Bacteriol.* 169, 1639-1643.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. és Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning (A laboratory manual)*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Manicom, B.Q., Bar-Joseph, M., Rosner, A., Vigodsky-Haas, H. és Kotze, J.M. (1987) Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the *Fusaria*. *Phytopathol.* 77, 669-672.
- Martens, F.B., van den Berg, R. és Hartevelde, P.A. (1985) DNA fingerprinting of yeast strains. Proceedings of the 20th Congress of European Brewery Conn., 211-217.
- Martinelli, S.D. és Bainbridge, B.W. (1974) Phenoloxidasés of *Aspergillus nidulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 63, 361-370.
- May, G.S., Gambino, J., Weatherbee, J.A. és Morris, N.R. (1985) Identification and functional analysis of beta-tubulin genes by site specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* 101, 712-719.
- McCully, K.S. és Forbes, E. (1965) The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genet. Res. Camb.* 6, 352-359.
- Mellon, F.M., Peberdy, J.F. és MacDonald, K.D. (1983) Hybridization of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium baarnense* by protoplast fusion; genetic and biochemical analysis. In: Protoplasts 1983 (Poster Proceedings of the 6th International Protoplast Symposium, Aug. 1983) (szerk. Potrykus, I., Harms, C.T., Hinnen, A., Hütter, R., King, P.J. és Shillito, R.D.) 310-311. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Mercer, B. és Morris, N.R. (1975) The effect of chloral hydrate upon mitosis in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 88, 197-199.
- Michelmore, R.W. és Hulbert, S.H. (1987) Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25, 383-404.
- Morpurgo, G., Bellincampi, D., Gualandi, G., Baldinelli, L. és Crescenzi, O.S. (1979) Analysis of mitotic nondisjunction with *Aspergillus nidulans*. *Environ. Health Perspect.* 31, 81-95.
- Nam, H.-G., Giraudat, J., den Boer, B., Moonan, F., Loos, W.D.B., Hauge, B.M. és Goodman, H.M. (1989) Restriction fragment length polymorphism linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 1, 699-705.
- Nasuno, S. (1971) Polyacrylamide gel disc electrophoresis of alkaline proteases from *Aspergillus* species. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1147-1150.
- Nasuno, S. (1972) Differentiation of *Aspergillus sojae* from *Aspergillus oryzae* by polyacrylamide gel disc electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 71, 29-33.
- Nasuno, S. (1974) Further evidence on differentiation of *Aspergillus sojae* from *Aspergillus oryzae* by electrophoretic patterns of cellulase, pectin-lyase, and acid proteinase. *Can. J. Microbiol.* 20, 413-416.
- Nealson, K.H. és Garber, E.D. (1967) An electrophoretic survey of esterases, phosphatases, and leucin aminopeptidases in mycelial extracts of species of *Aspergillus*. *Mycologia* 59, 330-336.

- Nygaard, S.L., Elliott, C.K., Cannon, S.J. és Maxwell, D.P. (1989) Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology* 79, 773-780.
- Olivo, P.D., McManus, E.J., Riggsby, W.S. és Jones, J.M. (1988) Mitochondrial DNA polymorphism in *Candida albicans*. *J. Infect. Diseases* 156, 214-215.
- Orbach, M.J., Vollrath, D., Davis, R.W. és Yanofsky, C. (1988) An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1469-1473.
- Osman, K.E. (1987) Genetic and molecular studies of *Aspergillus*. Ph. D. Thesis, University of Birmingham, Birmingham.
- Panabières, F., Marais, A., Trentin, F., Bonnet, P. és Ricci, P. (1989) Repetitive DNA polymorphism analysis as a tools for identifying *Phytophthora* species. *Phytopathol.* 79, 1105-1109.
- Peberdy, J.F. (1989) Presidential address: Fungi without coats - protoplasts as tools for mycological research. *Mycol. Res.* 93, 1-20.
- Peberdy, J.F., Eyssen, H. és Anné, J. (1977) Interspecific hybridization between *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium cyaneo-fulvum* following protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 157, 281-284.
- Pedersen, M.B. (1983) DNA sequence polymorphisms in the genus *Saccharomyces*. I. Comparison of the *his4* and ribosomal RNA genes in lager strains, ale strains and various species. *Carlsberg Res. Commun.* 48, 485-503.
- Pedersen, M.B. (1986a) DNA sequence polymorphisms in the genus *Saccharomyces*. III. Restriction endonuclease fragment patterns of chromosomal regions in brewing and other yeast strains. *Carlsberg Res. Commun.* 51, 163-183.
- Pedersen, M.B. (1986b) DNA sequence polymorphisms in the genus *Saccharomyces*. IV. Homoeologous chromosomes III of *Saccharomyces bayanus*, *S. carlsbergensis*, and *S. uvarum*. *Carlsberg Res. Commun.* 51, 185-202.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. és Bufton, A. W. J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141-238.
- Raper, K.B. és Fennell, D.I. (1965) The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Rédei, P.G. (1987) *Genetika. Mezőgazdasági Kiadó-Gondolat*, Budapest.
- Rieck, A., Griffiths, A.J.F. és Bertrand, H. (1982) Mitochondrial variants of *Neurospora intermedia* from nature. *Can. J. Genet. Cytol.* 24, 741-759.
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. és Berg, P. (1977) Labeling DNA to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
- Scherer, S. és Stevens, D.A. (1987) Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 25, 675-679.
- Scherer, S. és Stevens, D.A. (1988) A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85, 1452-1456.

- Schmidt, A.L., Curtis, C.R. és Bean, G.A. (1977) Electrophoretic comparisons of mycelial enzymes from aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Can. J. Microbiol.* 23, 60-67.
- Schwartz, D.C. és Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Seehaus, T., Rodicio, R., Heinisch, J., Aguilera, A., Schmitt, H.D. és Zimmermann, F.K. (1985) Specific gene probes as tools in yeast taxonomy. *Curr. Genet.* 10, 103-110.
- Shanfield, B. és Käfer, E. (1971) Chemical induction of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 67, 209-219.
- Sharma, S., Sandhu, D.K. és Bagga, P.S. (1988) Isozyme polymorphism of beta-glucosidase in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Genet.* 26, 331-342.
- Singh, M. és Sinha, U. (1976) Chloral hydrate induced haploidisation in *Aspergillus nidulans*. *Experientia* 32, 1144-1145.
- Singh, M. és Sinha, U. (1979) Mitotic haploidization and growth of *Aspergillus nidulans* on media containing chloral hydrate. *J. Cytol. Genet.* 14, 1-4.
- Skatrud, P.L. és Queener, S.W. (1989) An electrophoretic karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene* 78, 331-338.
- Smith, R.A., Hitchcock, C.A., Evans, E.G.V., Lacey, C.J.N. és Adams, D.J. (1989) The identification of *Candida albicans* strains by restriction fragment length polymorphism analysis of DNA. *J. Med. Veter. Mycol.* 27, 431-434.
- Sorenson, W.G., Larsh, H.W. és Hamp, S. (1971) Acrylamide gel electrophoresis of proteins from *Aspergillus* species. *Amer. J. Bot.* 58, 588-593.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Southern, E.M. (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 100, 319-323.
- Specht, C.A., Novotny, C.P. és Ullrich, R.C. (1983) Isolation and characterization of mitochondrial DNA from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Exp. Mycol.* 7, 336-343.
- Specht, C.A., Novotny, C.P. és Ullrich, R.C. (1984) Strain specific differences in ribosomal DNA from the fungus *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* 8, 219-222.
- Stasz, T.E., Weeden, N.F. és Harman, G.E. (1988) Methods of isozyme electrophoresis for *Trichoderma* and *Gliocladium* species. *Mycologia* 80, 870-874.
- Stepien, P.P., Bernaerd, U., Cooke, H.J. és Küntzel, H. (1978) Restriction endonuclease cleavage map of mitochondrial DNA from *Aspergillus nidulans*. *Nucl. Acids Res.* 5, 317-330.
- Taylor, J.W. (1986) Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. *Exp. Mycol.* 10, 259-269.
- Taylor, B. és Powell, A. (1982) Isolation of plant DNA and RNA. *Focus (Publication of BRL, Maryland, USA)* 4, 4-6.

- Tóth, É., Varga, J. és Kevei, F. (1986) Characterization of inter- and intraspecific hybrids of some species belonging to the *Aspergillus nidulans* group by isozyme analysis. Congress of the Hung. Soc. of Microbiology, Gödöllő.
- Tsujita, Y. és Endo, A. (1977) Extracellular acid protease of *Aspergillus oryzae* grown on liquid media: multiple forms due to association with heterogeneous polysaccharides. J. Bacteriol. 130, 48-56.
- Tudzynski, P. és Esser, K. (1986) Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea*. II. Plasmids in various wild strains and integrated plasmid sequences in mitochondrial genomic DNA. Curr. Genet. 10, 463-467.
- Turner, G. és Croft, J.H. (1988) Genetics of *Aspergillus nidulans*. EMBO Practical Course Manual 1988. University of Bristol, Department of Microbiology.
- Tzeng, T., Chang, H. és Bronson, C.R. (1989) A restriction fragment length polymorphism map of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. Fungal Gen. Newsl. 36, 16.
- Upshall, A., Giddings, B. és Mortimore, I.D. (1977) The use of benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. J. Gen. Microbiol. 100, 413-418.
- Varga, J., Fekete, Cs., Kevei, F. és Croft, J. H. (1989) Studies on mitochondrial DNA polymorphism and protoplast fusion in black *Aspergilli*. 19th FEBS Meeting, Rome, Italy.
- Vasu, S., Hulea, S. és Vioria, L. (1972) The ribonucleases of the species groups of genus *Aspergillus*. Rev. Roum. Biochim. 9, 179-190.
- Verma, M. és Dutta, S.K. (1987) Phylogenetic implication of heterogeneity of the nontranscribed spacer of rRNA repeating unit in various *Neurospora* and related fungal species. Curr. Genet. 11, 309-314.
- Waters, M.D., Stack, H.F., Mavournin, K.H. és Dellarco, V.L. (1986) Genetic activity profiles of chemicals selected from the Aneuploidy Data Base. Mutation Res. 167, 171-188.
- Watkins, P.C. (1988) Restriction fragment length polymorphism (RFLP): Applications in human chromosome mapping and genetic disease research. BioTechniques 6, 310-320.
- Weber, C.A., Hudspeth, M.E.S., Moore, G.P. és Grossman, L.I. (1986) Analysis of the mitochondrial and nuclear genomes of two basidiomycetes, *Coprinus cinereus* and *Coprinus stercoarius*. Curr. Genet. 10, 515-525.
- Wickerham, L.J. (1951) Taxonomy of yeasts. Techn. Bull. No.1029, US. Dept. Agriculture.
- Wills, J.W., Lasker, B.A., Sirotkin, K. és Riggsby, W.S. (1984) Repetitive DNA of *Candida albicans*: nuclear and mitochondrial components. J. Bacteriol. 157, 918-924.
- Wilson, C.W. (1969) A rapid staining technique for detection of RNase after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 31, 506-511.
- Witte, V., Grossmann, B. és Emeis, C.C. (1989) Molecular probes for the detection of *Kluyveromyces marxianus* chromosomal DNA in electrophoretic karyotypes of

- intergeneric protoplast fusion products. Arch. Microbiol. 152, 441-446.
- Woodbury, W., Spencer, A.K. és Stanmann, M.A. (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. Anal. Biochem. 44, 301-305.
- Wu, M.M.J., Cassidy, J.R. és Pukkila, P.J. (1983) Polymorphisms in the DNA of *Coprinus cinereus*. Curr. Genet. 7, 385-392.
- Zolan, M.E. és Pukkila, P.J. (1986) Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. Mol. Cell. Biol. 6, 195-200.