

**ASPERGILLUS FAJOK PROTOPLASZTJAINAK INTRA- ÉS
INTERSPECIFIKUS FUZIÓJA**

Doktori értekezés

**Készítette és a József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Karához benyújtja**

Szegedi Mihály

**Készült
a József Attila Tudományegyetem Mikrobiológiai
Tanszékén**

Szeged, 1976.



TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	oldal
1. BEVEZETÉS	3.
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7.
2.1 ANYAGOK	7.
2.1.1 Mikroorganizmusok	7.
2.1.2 Tápoldatok és táptalajok	8.
2.1.3 Egyéb anyagok és eszközök	10.
2.2. MÓDSZEREK	12.
2.2.1 FONÁLANASZTOMÓZIS SORÁN BEKÖVETKEZŐ TULAJ- DONSÁGÁTADÁS VIZSGÁLATA FAJON BELÜL ÉS FAJOK KÖZÖTT	12.
2.2.2 A PROTOTRÓF TÖRZSEK PROTOPLASZTKÉPZÉSE ÉS RE- GENERÁCIÓJA	13.
2.2.2.1 Fiatal hifákból álló telepek nevelése	13.
2.2.2.2 Protoplasztképzés <i>Helix pomatia</i> gasztrális emésztőnedvével	13.
2.2.2.3 A protoplasztok regenerációja izoozmotikus közegben	15.
2.2.3 AZ AUXOTRÓF TÖRZSEK PROTOPLASZTKÉPZÉSÉNEK ÉS REGENERÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA	15.
2.2.4 TULAJDONSÁG ÁTADÁS PROTOPLASZTFUZIÓ SEGITSÉ- GÉVEL	17.
2.2.4.1 Az intraspecifikus fúzió kivitelezése	17.
2.2.4.2 Az interspecifikus fúzió megvalósítása	18.
2.2.5 A FUZIÓ BIZONYÍTÁSA, A FUZIÓS TELEPEK TULAJ- DONSÁGAINAK VIZSGÁLATA	18.
2.2.5.1 A fúziós telepek konidiumainak vizsgálata	19.
2.2.5.2 Szegregációs vizsgálata micéliumokkal	19.
2.2.5.3 Interspecifikus fúziós telepek szegregációjának vizsgálata protoplaszt képzéssel és regenerál- tatással	20.
3. EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE	21.
3.1 Fonálanasztomózis során bekövetkező komplemen- táció fajon belül és fajok között	21.
3.2 A PROTOTRÓF TÖRZSEK PROTOPLASZTKÉPZÉSE ÉS REGENERÁCIÓJA	22.

3.2.1 Protoplasztképzés <i>Helix pomatia</i> emésztő- nedvével	23.
3.2.2 A protoplasztok regenerációja izoozmotikus közegben	24.
3.3 AZ AUXOTRÓF TÖRZSEK PROTOPLASZTKÉPZÉSÉNEK ÉS REGENERÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA	26.
3.4 TULAJDONSÁGÁTADÁS PROTOPLASZTFUZIÓVAL	26.
3.4.1 Az intraspecifikus fúzió eredményeinek ismer- tetése	26.
3.4.2 Az interspecifikus fúzió eredményei	28.
3.5. AZ INTRA- ÉS INTERSPECIFIKUS FUZIÓ BIZONYÍTÁSA, A TELEPEK TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATA	30.
3.5.1 A protoplasztok fajon belüli fúziójának bi- zonyítása	32.
3.5.2 Az interspecifikus fúziós telepek tulajdonsá- gainak vizsgálata	34.
4. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	47.
5. ÖSSZEFOGLALÁS	52
6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	54.

1. B E V E Z E T É S

A gombák összetett, rugalmas sejtfalának kiméletes, enzimikus eltávolításának lehetőségéről elsőként GIAJA /1914, 1919, 1922/ adott hírt. Megfigyelte, hogy a kert csigák emésztőnedve rendelkezik az élesztősejtfal bontásának képességével.

A protoplasztok - sejtfaluktól teljesen megfosztott, csupán membránnal határolt sejtek - képzésére és tulajdonságaik vizsgálatára irányuló kísérletek megindítása NEČAS /1956/ valamint EDDY és WILLIAMSON /1957, 1959/ nevéhez fűződik.

A mikroorganizmusok sejtfalának enzimes lebontása iránti érdeklődést a következő problémák serkentették: protoplasztok előállítása fiziológiai vizsgálatokhoz; a sejtfalak bioszintézisének, a protoplasztok regenerációjának tanulmányozása; a natív és az izolált sejtfal analizise; a membránfunkció tanulmányozása és a genetikai vizsgálatok. A protoplasztok a fentieken kívül alkalmas objektumok hatóanyagvizsgálatokhoz, sejtszervek eltávolításához, izolálásához és átültetéséhez is.

A sejtfal eltávolítására általános módszert kidolgozni még nem sikerült, mivel azt egyértelműen megszabja a mikroorganizmus sejtfalának szerkezete, kémiai összetétele, a tenyészet fiziológiai kora és a körülmények /pH, hőmérséklet, ozmotikus viszonyok/. A jelenleg rendelkezésre álló módszereket az alábbiakban csoportosíthatjuk. /VILLANUEVA, GARCIA-ACHA, 1971/.

1. Mechanikai módszerek vagy autolitikus enzimek alkalmazása /NECAS, 1956/

2. Specifikus enzimek felhasználása:

a./ *Helix pomatia* gasztrális emésztőnedve.

Komponenseinek meghatározása során közel harminc enzimet sikerült kimutatni. Többek között glükánázt, mannánázt, kitinázt, poligalakturonázt, lipázt. Proteáz aktivitást nem tapasztaltak. Ennek jelentősége az, hogy a fal eltávolítása után a protoplasztot határoló membránrendszert nem éri károsodás.

/HOLDEN, TRACEY 1950/.

b./ Mikroorganizmusok által termelt exoenzimek:

Intakt vagy preparált sejtfalak oldása szempontjából igen aktív enzimeket szintetizálnak egyes *Streptomyces* törzsek /GASCÓN, VILLANUEVA 1963/, a *Bacillus circulans* /TANAKA, PHAEF 1967/ és a *Trichoderma viride* /DE VRIES, WESSELS 1972/.

c./ A fentiektől eltérő eredetű enzimpreparátumok:

EDDY /1958/ malátából preparált enzimek, valamint tripsin, papain felhasználásával valószínűleg részleges vagy teljes sejtfaloldást. Hasonló eredmény érhető el lipáz foszforiláz, hemicelluláz és glukanáz együttes alkalmazása esetén is.

3. A sejtfalszintézist közvetve vagy közvetlenül gátló vegyületek:

Alkalmazásuk abnormális sejtfalszerkezetekhez, vagy a sejtfalszintézis teljes megszűnéséhez vezethet. Bizonyos esetekben protoplasztképződést eredményezhet pl. a tápközeg magas szorbóz koncentrációja /DE TERRA, TATUM 1961/ vagy a 2-dezoxiglükóz jelenléte.

A membrán képtelen ellenállni a sejtbe áramló víz feszítő hatásának, a protoplaszt szétesik, ha csökkentjük a környezet ozmotikus értékét.

Stabilizált közegben kellő tápanyagellátottság mellett a szabályos gömbalaku protoplasztok, ha magot tartalmaznak, fajtól függően táptalaj felületen, táplevesben, vagy szilárd táptalajba keverve képesek új sejtfal szintézisére. A regeneráció rövid időn belül megindul, melynek eredményeként hamarosan megfigyelhetők a fajra jellemző morfológiai bélyegek.

A fenti módszerekkel ma már számos élesztő és fonalgombából képezhető protoplaszt, melyek regeneráltatása is megoldott.

Mivel a szexuális ciklussal rendelkező gombáknál azonos párosodási típuson belül, valamint fajok között a tulajdonságátadásnak a fal határozott gátat szab, továbbá ahol csak a paraszexuális folyamat ismert, a fonalak anasztomózisa véletlenszerű, ezért a figyelem a protoplaszt fúzióval megvalósítható tulajdonságátadás felé fordult.

Geotrichum candidum auxotróf mutánsainak első sikeres fúzióját FERENCZY és munkatársai 1972-ben valósították meg. A rendkívül alacsony heteroka-

rionképzés még 1974-ben is csak $1,6 \cdot 10^{-6}$ gyakoriságu volt /FERENCZY és mts. 1974/. A hideg-aggregáltatás módszerével *Aspergillus nidulans* lizin és metionin-igényes törzseinél már $2,5 \cdot 10^{-3}$ a fúziók gyakorisága és még ebben az évben CaCl_2 jelenlétében polyaethilénlikolt alkalmazva eléri a 40 %-ot, és tisztázódik számos, fuziót befolyásoló tényező szerepe is /FERENCZY és mts. 1976/.

A fentiek ismeretében célul tűztük ki, hogy megvalósítjuk a rendszertanilag egymástól távol álló *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus fumigatus* auxotróf mutánsok protoplasztjainak interspecifikus fúzióját.

E disszertációban kitűzött cél megvalósítása érdekében munkatársaimmal közösen végzett munka eredményeit szeretném ismertetni.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK:

2.1. ANYAGOK

2.1.1 MIKROORGANIZMUSOK:

Aspergillus nidulans SZMC 1011 /SZMC: Szegedi Mikrobiológiai Gyűjtemény, József Attila Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszék/

Eredete: The Hebrew University, Hadassah Medical School, Department of Microbiological Chemistry, Jeruzsalem, Izrael. Eredeti jelzése R-21 Genotípus a PABA⁻, γ. Növekedéséhez szervesetlen sókon és a szénforrásokon kívül para-amino-benzoesavat igényel. Továbbiakban: *A. nidulans*.

Aspergillus fumigatus SZMC 1012.

Eredete: Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, England. Továbbiakban: *A. fumigatus*.

A fenti törzsekől UV kezelés alkalmazásával számos mutánszt izoláltunk; kísérleteink során az alábbi auxotrofokkal dolgoztunk:

Aspergillus nidulans SZMC 1156.

Az SZMC 1011-es törzsből izolált adeninigényes auxotróf mutáns.

Továbbiakban: *A. nidulans* ade⁻

Aspergillus nidulans SZMC 1157

Az SZMC 1011-es törzsből izolált lizinigényes auxotróf mutáns.

Továbbiakban: *A. nidulans* liz⁻

Aspergillus fumigatus SZMC 1158

Az SZMC 1012-es törzsből izolált adeninigényes mutáns. Továbbiakban: *A. fumigatus* ade⁻

Aspergillus fumigatus SZMC 1159

Az SZMC 1012-es törzsből izolált lizinigényes mutáns.

Továbbiakban: *A. fumigatus* liz⁻

2.1.2 TÁPOLDATOK ÉS TÁPTALAJOK

A tápoldatok, táptalajok és a különböző oldatok kuktafazékban, 1,2 atm nyomáson 20 percig; az egyéb laboratóriumi eszközök sterilizése 2-3 óráig, 160-200 C⁰-on szárazon történt.

A pH-t sterilizés után 5 %-os HCl-al illetve 5 %-os NaOH-al állítottuk be.

A tápközegek 10 µg/ml koncentrációban antibakteriális hatóanyagot -sztreptomicint - tartalmaztak, amely ebben a koncentrációban a fonalasgombákra hatástalan.

T-1 teljes tápoldat:

5 g élesztőkivonat /Oxoid/
10 g glükóz at. REANAL
1000 ml deszt.vizben
pH: 5,5-6,0

T-2 komplett táptalaj:

5 g élesztőkivonat /Oxoid/
10 g glükóz
25 g agar /szálas/ /REANAL/
1000 ml deszt.vizben
pH: 5,5-6,0

T-3 minimál tápoldat:

5 g /NH₄/₂SO₄ alt. /REANAL/
1 g KH₂PO₄ alt. /REANAL/
0,5 g MgSO₄ · 7H₂O alt. /REANAL/
10 g glükóz
1 ml szintetikus vitaminoldat

T-4 minimál táptalaj

mint T-3

+ 25 g agar /Bacto/

T-5 vitamin mentes minimál táptalaj

mint T-4 de vitamin nélkül

T-6 regeneráltató táptalaj

5 g élesztőkivonat

10 g glükóz

44,7 g KCl /0,6M alt.

25 g agar /Bacto/

1000 ml deszt.vizben

T-7 fúziós táptalaj

mint T-4 + 44,7 g KCl /0,6M/

T-8 fúziós felülöntő

mint T-7 de csak 10 g agarral /Bacto/

T-9 adeninnel kiegészített minimál táptalaj

mint T-4 + 25 mg adenin alt. REANAL

T-10 lizinnel kiegészített minimál táptalaj

mint T-4 + 25 mg lizin alt. REANAL

T-11 adeninnel és lizinnel kiegészített minimál
táptalaj

mint T-4 + 25 mg adenin + 25 mg lizin

T-12 adeninnel kiegészített vitamin mentes minimál

mint T-5 + 25 mg adenin

T-13 lizinnel kiegészített vitamin mentes minimál
táptalaj

mint T-5 + 25 mg lizin

T-14 adeninnel és lizinnel kiegészített vitamin mentes
minimál

táptalaj

mint T-5 + 25 mg adenin illetve 25 mg lizin

T-15 adeninnel kiegészített fúziós táptalaj

mint T-2 + 25 mg adenin

T-16 lizinnel kiegészített fúziós táptalaj

mint T-7 + 25 mg lizin

2.1.3 EGYÉB ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK

Szintetikus vitaminoldat: /WICKERHAM-féle/: folsav 0,2 mg, Ca-pantotenát 40 mg, inozitol 200 mg, niacin 40 mg, para-amino-benzoésav 20 mg, piridoxin-HCl 40 mg, aneurin-HCl 40 mg, laktoflavin 20 mg, 10 ml deszt.vizben feloldott 2 mg biotin 1 ml-e, 100 ml deszt.viz.

Enzimpreparátum készítése Helix pomatia gasztrális emésztő nedvéből:

Két napig éheztetett éticsigák tápláléktól megtisztult gyomrát kiemeltük, és azt megnyitva a gasztrális folyadékot hűtött edényben összegyűjtöttük. A szennyező alakos elemeket centrifugálással eltávolítottuk. Az így nyert emésztőnedv szárazanyag tartalma 14-16 %-os volt. A preparátumot liofilizáltuk, porítottuk és felhasználásig 10°C alatti hőmérsékleten tároltuk. A kísérletek során 1 %-os oldatát használtuk, melyet cellulóz-acetát membránfilteren történő szűréssel sterilizáltunk /pórusátmérő 0,22 μ m/.

Polyaethylenglykol; /Hoechst, West Germany/; Ms: 4000,
25 %-os oldatát alkalmaztuk, amelyet 0,1 M CaCl_2 -vel
egészítettünk ki.

Karnovsky oldat:

25 ml 8 %-os vizes paraformaldehid oldat + 5 ml
50 %-os vizes glutáraldehid oldat + 50 ml 0,2M
foszfát puffer /pH 7,2/

0,2M foszfát puffer:

2,76 g NaH_2PO_4 oldva 100 ml deszt.vizben +
300 ml deszt.vizben oldott 16,08 g Na_2HPO_4

Milloning foszfát puffer pH 7,3

A: 2,26 %-os $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;

B: 2,52 %-os NaOH;

C: 5,4 %-os glükóz

D: 41,5 ml A + 8,5 ml B ; végső koncentráció:
5 ml C + 45 ml D

Ólomacetát oldat:

30 ml deszt.viz + 1,33 g $\text{Pb}/\text{NO}_3/2$ oldódása után
+ 1,76 g $\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7/.2\text{H}_2\text{O}$. Egy perces rázás után
30 percig állni hagyjuk majd keverés közben 11 ml
1N NaOH-ot, majd feltisztulás után 9 ml deszt.vizet
adunk a rendezerhez.

A preparátumok elektronmikroszkópos felvételekhez történő
előkészítése során alkalmazott vegyszerek: ozmiumtetroxid
/Merck/, propilénoxid /REANAL/ Durkupán I, II /Fluka/
uranilacetát /BDH/

Az elektronmikroszkópos felvételeket TESLA BS 500 tipu-
su készüléken a JATE Elektronmikroszkópos Laboratóriu-
mában Dr. Rojik Imre készítette.

2.2 MÓDSZEREK

2.2.1 Fonálasztozomózis során bekövetkező tulajdonségátadás vizsgálata fajon belül és fajok között:

Az anasztomózis vizsgálatakor az alábbi auxotróf párokkal kísérleteztünk:

Fajon belül: A. nidulans ade⁻ + A. nidulans liz⁻
A. fumigatus ade⁻ + A. fumigatus liz⁻

Fajok között: A. nidulans ade⁻ + A. fumigatus liz⁻
A. nidulans liz⁻ + A. fumigatus ade⁻

A párok komplett /T-2/ ferde tápágáron, 30 °C-on, 4 nap alatt kifejlődött konidiumaiból sűrű, kevert szuszpenziót készítünk. Ezzel oltottunk be komplett tápleves /T-1/ vékony folyadékrétegét. 24 órán át, 30 °C-on inkubáltunk. A kialakult fonalszövedéket steril deszt. vízzel, centrifugálással /3500 ford./perc, 3100 g, 10 °C, 5 perc/ többször átmostuk. A fonalakat steril körülmények között, üveglapon 1-2 mm átmérőjű gömböcskékre szedtük szét, melyeket minimál táptalajra /T-4/ helyeztük. Ezt 30 °C-on, 7 napos inkubálás követte.

Kontrolként, külön-külön a törzsek azonos módon előállított, és mosott fonalaival is elvégeztük a kísérletet.

A minimál táptalajon megjelenő heterokarionok által képzett konidiumok tulajdonságait minimál /T-4/, adeninnel /T-9/, lizinnel /T-10/ kiegészített minimál, valamint komplett /T-2/ táptalajra történő replikázással vizsgáltuk.

2.2.2 A prototróf törzsek protoplasztképzése és regenerációja:

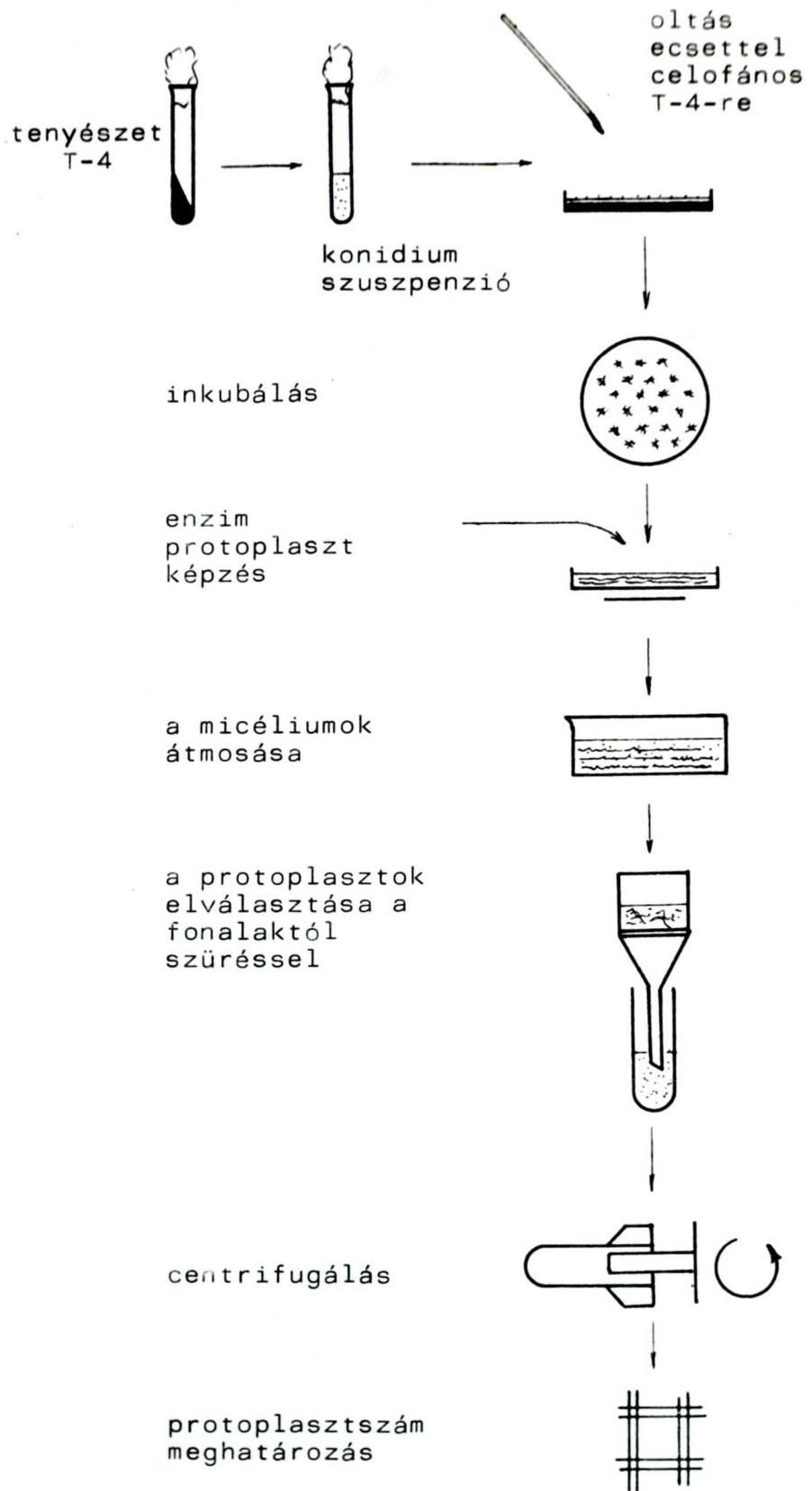
2.2.2.1 Fiatál hifákból álló telepek nevelése:

Az *A. nidulans* és az *A. fumigatus* törzsek 4-5 napos, 30°C-on, komplett /T-2/ ferde tápágáron kifejlődött tenyészetekről a konidiumokat 2 ml steril vízzel lemostuk. Ezzel a sűrű szuszpenzióval oltottuk be a komplett táptalajból /T-2/ Petri-csészékben készített lemezeket, melyekre előzőleg steril celofánt simítottunk. /1. ábra/ Az oltást steril ecsettel végeztük el, úgy hogy a szuszpenzióba mártott ecset hegyét éppen csak a celofánhoz érintettük. A cseppeket több sorban kb. 1 cm távolságra helyeztük el egymástól. 30°C-on, 18-20 óráig inkubáltunk.

2.2.2.2 Protoplasztképzés *Helix pomatia* gastrális emésztőnedvével:

A telepeket celofánnal együtt leemeltük a táptalajról és hármassával steril Petri-csészékbe helyeztük, majd 5 ml, 0,6M-os KCl-ban oldott, 1 %-os csigaenzim oldatot öntöttünk a tenyészetekre, úgy hogy buborékmentesen, egyenletesen lefedje azokat. A csészéket szobahőmérsékleten óvatosan rázattuk, hogy a képződő protoplasztoknak a fonalak közüli kiűzését elősegítsük. Egy óra eltelte után az enzimes szuszpenziókat összeöntöttük, a celofánon maradt hifátömeget 0,6M-os KCl-dal átmostuk. A protoplasztokat az intakt fonalaktól és a törmeléktől Jena Gl-es zeugotitott üvegezürő alkalmazásával /pórusméret 40-80 μ m/ szivás és nyomás nélkül elkülönítettük, majd centrifugálással összegyűjtöttük /2000 ford/perc, 1000 g, 4°C, 5 perc/. Ezt a stabilizáló oldatban, centrifugálással történő mosás követte.

A PROTOPLASZTKÉPZÉS LÉPÉSEI:



1. ábra

2.2.2.3 A protoplasztok regenerációja ozmotikusan stabilizált közegben

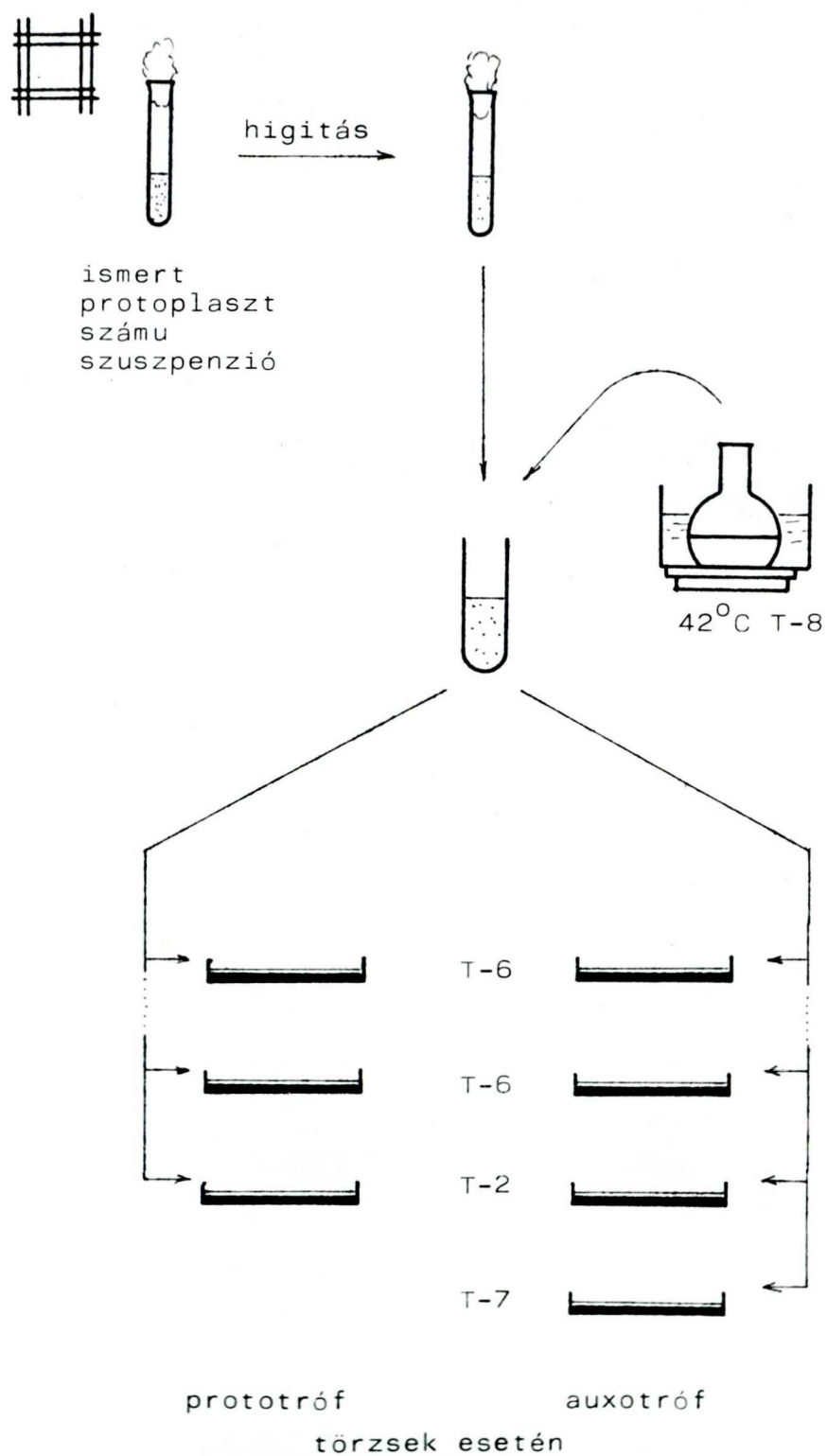
A felüluszó eltávolítása után a protoplaszt tömeget szuszpendáltuk, Bürker kamra segítségével meghatároztuk a koncentrációt és azt 10^3 /ml-re állítottuk be. /2. ábra/ Ebből a szuszpenzióból 0,05 illetve 0,1 ml-t mértünk be a 42°C -ra termosztált, stabilizált felülon-tó /T-8/ 5 ml-ébe, melyeket vékonyan egyrészt stabilizált /T-6/, másrészt nem stabilizált komplett /T-2/ táptalajra rétegeztünk, mint alaplemezekre. 30°C -on 48 óráig inkubáltunk, közben mikroszkóposan figyelemmel kísértük a regenerációt.

A T-2-es táptalajban a protoplasztok elpusztultak, viszont az esetleg jelenlévő konidumokból telepek képződhetnek. Számuk ismeretére szükség volt, hogy korrekcióként, a regeneráció mértékének megállapításakor figyelembe tudjuk venni. Ennek kiszámítása úgy történt, hogy a telepképzők számát a táptalajba oltott protoplasztszám százalékában fejeztük ki.

2.2.3 Az auxotróf törzsek protoplasztképzésének és regenerációjának vizsgálata:

A protoplasztképzést és a regenerációt a fentiekkel megegyező módon vizsgáltuk az *A. nidulans* ade^- és liz^- valamint az *A. fumigatus* ade^- és liz^- mutánsokkal is, ezzel a kiegészítéssel, hogy a protoplasztokat stabilizált minimál táptalajra /T-7/ is kioltottuk /2. ábra/. Ezzel is ellenőrizve stabilitásukat.

A REGENERÁCIÓS KISÉRLETEK KIVITELEZÉSE:



2. ábra

2.2.4 Tulajdonságátadás protoplaszt fúzió segítségével:

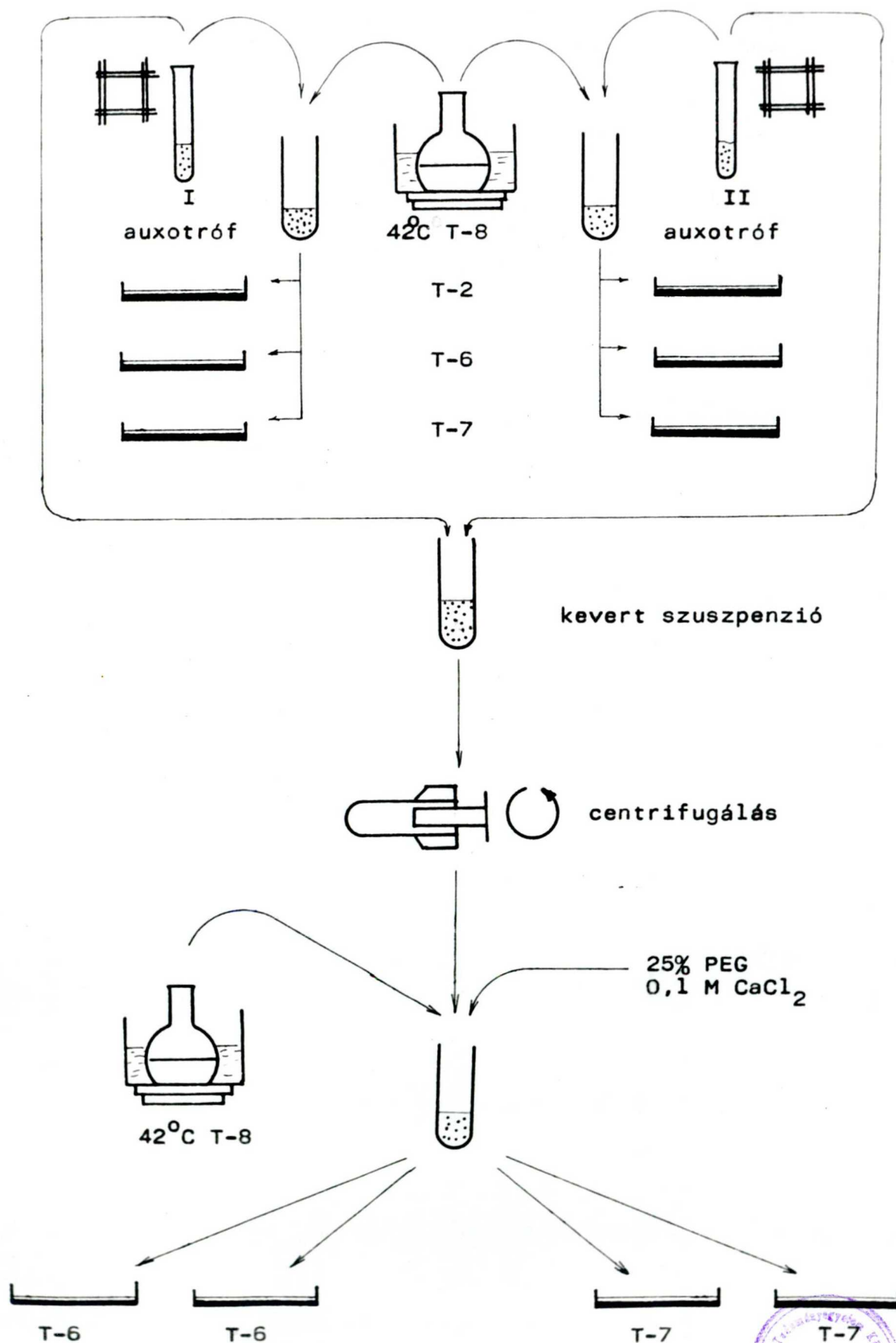
2.2.4.1 Az intraspecifikus fúzió kivitelezése:

A kísérletek menete a protoplaszt szám beállításáig megegyezett a 2.2.2.1 és a 2.2.2.2 pontban leírtakkal. Az *A. nidulans* ade⁻ és az *A. nidulans* liz⁻ valamint az *A. fumigatus* ade⁻ és *A. fumigatus* liz⁻ törzsekből képzett protoplasztokból kontrolként mintát vetünk és a megfelelő hígításban a felülöntőbe /T-8/ szuszpendált komplett /T-2/, stabilizált komplett /T-6/ és stabilizált minimál /T-7/ táptalajokra, mint alaplemezekre rétegeztük /3. ábra/.

Ezt követően egy faj auxotróf mutánsainak protoplasztjait olyan térfogatban kevertük össze, hogy számuk 10^7 /ml arányuk 1:1 legyen. Centrifugálással történő gyűjtés után /2000 ford./perc, 1000 g, 4°C, 5 perc/ a felülúszót vízlégszivattyú segítségével eltávolítottuk. A maradék - mintegy 0,05 ml - stabilizáló oldatban szuszpendáltuk a protoplasztokat, majd 1 ml 25 %-os, 0,1M CaCl₂ tartalmú PEG-et mértünk a rendszerhez. Rövid ideig tartó intenzív rázással igyekeztünk elérni, hogy a keletkező aggregátumok azonos nagyságúak legyenek és lehetőleg kevés protoplasztból álljanak.

Az aggregátum szuszpenzióból hígítást készítettünk, abból a célból, hogy a telepképző egységek, melyek a regeneráltató táptalajon /T-6/ telepet képesek létrehozni és a stabilizált minimál táptalajon /T-7/ megjelenő fúziósok számlálhatók legyenek. Mintáinkat a szokott módon az alaplemezekre rétegeztük. 30°C-on, három napig inkubáltunk.

A PROTOPLASZT FUZIÓ MEGVALÓSÍTÁSÁNAK LÉPÉSEI:



3. ábra



A minimál táptalajon megjelenő telepek számát, a komplett lemezeken kialakult telepek számának százalékában megadva jellemeztük a fúzió gyakoriságát.

2.2.4.2 Az interspecifikus fúzió megvalósítása:

A kísérletek technikai kivitelezése megegyezett az előző pontban leírtakkal az alábbi különbségekkel:

- a./ a fúziós partnerek *A. nidulans* ade⁻ + *A. fumigatus* liz⁻ illetve *A. nidulans* liz⁻ + *A. fumigatus* ade⁻ voltak.
- b./ alacsony fúziós gyakoriságra számítva, a PEG kezelést követően, a telepképzők számának megállapítására kivett minta után, a maradék sűrű aggregátum szuszpenziót teljes egészében felülöntőbe kevertük.
- c./ az aggregátum szuszpenziót vitamin mentes felülöntőbe szuszpendálva, vitamint /PABA-t/ nem tartalmazó minimál /T-5/ táptalajra is rárótegeztük.

2.2.5 A fúzió bizonyítása, a fúziós telepek tulajdonságainak vizsgálata:

A stabilizált minimál lemezeken /T-7/ kifejlődött fúziós telepeket a micéliumok csucsi részéből kivágott inokulummal, több ízben normál minimál /T-4/ táptalajon passzáltuk. Ezzel értük el, hogy a fonalak között nem maradhatott még nem regenerálódott, de életképes szülői protoplaszt, illetve "cross feeding" következtében növekvő fonalak.

2.2.5.1 A faajok közötti fúziós telepek konidumainak vizsgálata:

A steril celofánnal beborított minimál /T-4/ táptalajra Petri-csészénként egy-egy fúziós telep csúcsi fonalaiból kiemelt hifainokulumból helyeztünk, és 30°C-on 4 napig inkubáltunk. A kialakult kb. 3 cm átmérőjű telepet celofánnal együtt komplett /T-2/ táptalajra helyeztük át. Ezt 30°C-on 4 napos inkubálás követte. Az így kifejlődött telepről a konidiumokat minimál /T-4/, adeninnel /T-9/, lizinnel /T-10/, adeninnel és lizinnel /T-11/ kiegészített, valamint komplett /T-2/ táptalajra replikáztuk. 30°C-on 48 óráig inkubáltunk.

Hasonló módon jártunk el, a PABA mentes minimál /T-5/ táptalajról izolált fúziós telepekkel végzett kísérleteknél is csak a kiegészített minimál táptalajok /T-12, T-13, T-14/ PABA-t nem tartalmaztak.

2.2.5.2 Szegregáció vizsgálata micéliumokkal:

A minimál lemezekon /T-4/ kifejlődött telepek micéliumának csúcsi részéből kivágott mintákat minimál /T-4/, adenint /T-9/, lizint /T-10/, adenint és lizint /T-11/ tartalmazó, valamint komplett /T-2/ táptalajra helyeztük. 30°C-on 4 napig inkubáltunk. A létrejött telepek konidiummentes területeiről, a különböző összetételű táptalajokról megismételtük az oltást a felsorolt táptalajok mindegyikére. /T-4, T-9, T-10, T-11/. Az inkubálást a fentiekkel azonos módon hajtottuk végre.

Az eddig felsorolt módszereket számos esetben egyidőben is alkalmaztuk, tehát egy adott telepről a konidium mentes területéről vett micélium minta,

másrészt a fonálmentesre szűrt konidumok tulajdonságait vizsgáltuk.

2.2.5.3 Interspecifikus fúziós telepek szegregációjának vizsgálata protoplaszt képzéssel és regeneráltatással

A fúziós telepek miceliumaiból minimál /T-4/ táptalajra simított steril celofánra számos korongot oltottunk, majd 3 napig 30°C-on inkubáltunk. A létrejött fiatal hifákból a 2.2.2.2 pont alatt ismertett módon protoplasztokat képeztünk.

A regeneráltatást a megfelelően hígított protoplasztokkal a 2.2.2.3 pont szerint valósítottuk meg, úgy, hogy a protoplasztokat a felülöntőbe szuszpendálva stabilizált minimál /T-7/ adeninnel /T-15/ és lizinnel /T-16/ kiegészített valamint komplett /T-6/ alaplemezekre rétegeztük.

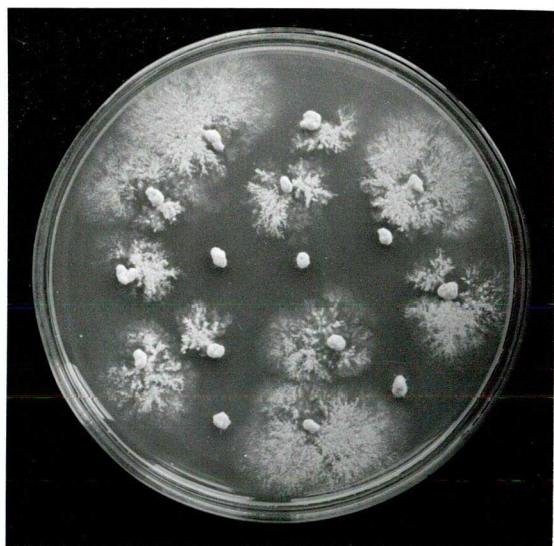
3. EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE:

3.1. Fonálanasztomózis során bekövetkező komplementáció fajon belül és fajok között:

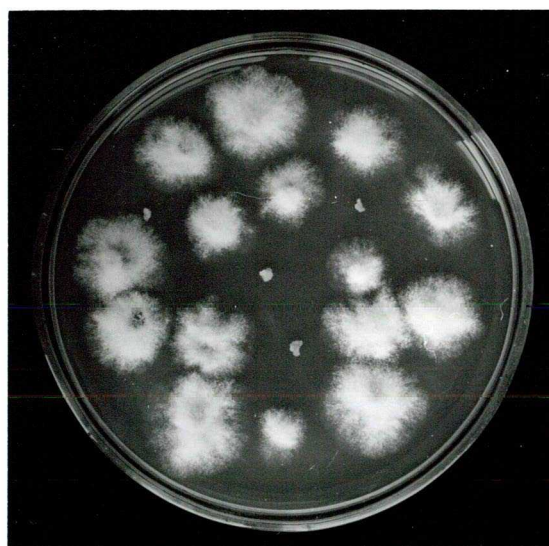
A 2.2.1 pontban ismertetett kísérletek során az *A. nidulans* ade^- és liz^- törzsei, valamint az *A. fumigatus* auxotróf mutánsai között - fajon belül - sikerült fonálanasztomózis segítségével heterokarion képzést indukálni.

Az *A. nidulans* törzsek kevert micéliumainak minimál táptalajra helyezett inokulumaiból egy vagy több ponton indult növekedésnek a legyező alakú telepet formáló heterokarion. /4. ábra/.

Az *A. fumigatus* esetén ez nem jellemző, de a telepek szabálytalan növekedése itt is eltér a szülői törzsek zárt telepképzésétől. /5. ábra/



4. ábra



5. ábra

A fonalakat minimál táptalajra tovább oltva a heterokarionikus állapot fenntartható. A telepeken képződött konidiumok viszont csak az egyik vagy a másik szülő

tulajdonságait hordozzák. Komplettnél és minimálnál táptalajon adenin, vagy lizin jelenlétében képesek telepképzésre.

Diploidképzést, rekombinációt valamint a heterokarionidium szegregáció mennyiségi viszonyait nem vizsgáltuk.

A mutáns törzsek, külön-külön, komplett táplevesben előnevelt, majd mosott micéliumai minimálnál táptalajon növekedést nem mutattak.

Fonálanasztomózis során bekövetkező, interspecifikus heterokarion képződést, komplementációt a két faj auxotróf mutánsai között nem tapasztaltunk.

3.2. A prototróf törzsek protoplasztképzése és regenerációja:

A fúzió sikeres megvalósításának érdekében ^{a protoplaz}képzéssel és regenerációjával kapcsolatban az alábbi követelményeket vettük figyelembe:

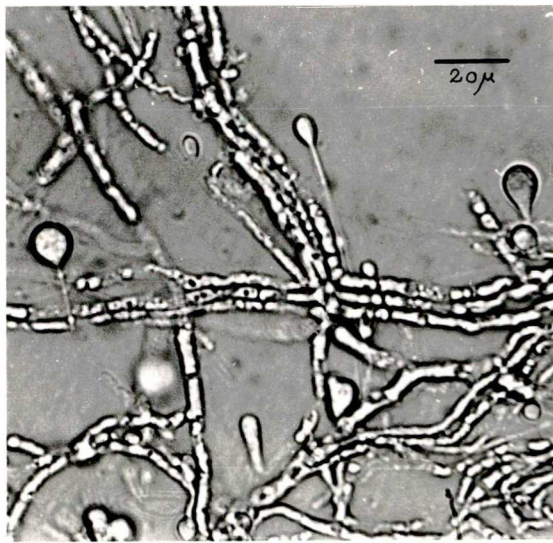
1. A tenyészet fiziológiai kora a képzés szempontjából kritikus. A túl fiatal vagy túl öreg fonalakból a fal leemészthető ugyan, de a rendszer ilyen esetekben törmelékeny, ami nagymértékben gátolja a membránnal határolt sejtfelületek illeszkedését és így a fúziót.
2. Konidiumok jelenléte a fúziós közegben jelentős zavaró tényező lehet. Egyrészt a protoplasztok közé ékelődve fizikailag távoltartják azokat egymástól, másrészt a komplett táptalajon hamis képet kapunk a protoplaszt-számról illetően.

2. Szükséges továbbá, hogy viszonylag rövid idő alatt nagymennyiségű protoplaszt képződjön. A képzési idő elhúzódásának eredményeként a kezdeti stádiumban létrejött protoplasztokon már megjelennek a fal kezdeményei. Az új sejtfalkezdemény szintén gátja a sejtek összeolvadásának.

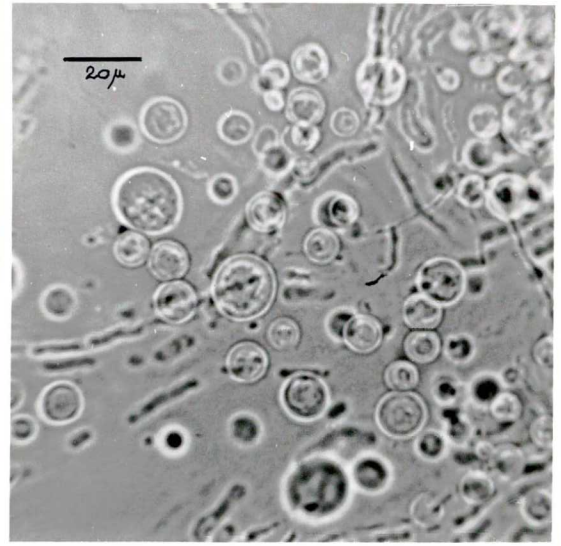
A 2.2.2.1 pontban ismertetett celofánlemezes módszerrel olyan, a protoplasztképzés idejének szempontjából optimális, fiatal hifákból álló, jelentős mennyiségű micéliumot tartalmazó telepeket kaptunk, melyeken még egyáltalán nem, vagy elhanyagolhatóan kevés konídium képződött.

3.2.1 Protoplasztképzés Helix pomatia gasztrális emésztő- nedvével:

Az *A. nidulans* és az *A. fumigatus* hifáiban, a harántfalakkal elválasztott, többmagvú sejtekben a protoplasztáló oldatba helyezéskor a plazma kontrakciója, egy sejten belül esetleg több egységre tagolódása figyelhető meg. /6. ábra/ Ennek magyarázata, hogy a sejtekből a környezet hiperozmotikus volta miatt víz lép ki. A protoplasztképződés az enzímbe helyezést követő 10 percen belül megindul. A protoplasztok lefűződése a harántfalak mentén és a fiatal fonalak apikális részén a legintenzívebb. Térfogatuk, méretük, vakuolizáltságuk szempontjából heterogének, változó számú sejtmagot tartalmaznak. /7. ábra/. A magnélküli protoplasztok száma kb. 5-10 %-.



6. ábra



7. ábra

3.2.2 A protoplasztok regenerációja izoozmotikus közegben:

A protoplasztok regenerációjának megvalósításához a következő lehetőségek állnak rendelkezésre:

1. izoozmotikus táptalaj felületén történő szélesztés
2. spray módszer, ami a felületre szélesztett protoplasztok vékony táptalajréteggel történő fedését jelenti.
3. az alaplemeznél alacsonyabb agar koncentrációju felülöntőbe szuszpendálás és ennek az alaplemezre rétegzése.

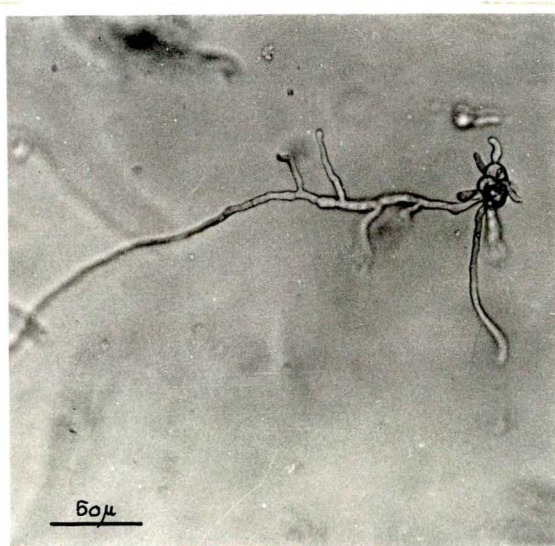
A fenti módszerek közül az utóbbit választottuk, mert ebben az esetben a protoplaszt számára a tér minden irányból biztosított az izoozmotikus környezet, és mechanikai szempontokból is ez a legkíméletesebb. Ebben az esetben átkerülhető a felületen történő szélesztésnél illetve a spray módszer alkalmazásakor

a felületre csapódó agarrészecskék mechanikus és hőmérsékleti károsító hatása is.

A felülöntő megszilárdulása után az agarba ágyazott protoplasztok regenerációja mikroszkópos megfigyeléssel jól követhető.

Az új fal szintézisének és a regenerálódott protoplaszt fejlődésének első jelei 8-12 óra után figyelhetők meg.

/8. ábra/



8. ábra

A gömbalaku protoplaszt egy vagy több pontján jellegzetes fonálkezdemény formálódik. Ezek megnyulnak, harántfalak, elágazódások képződnek. A regeneráció eredményeként kialakuló telepen jellegzetes egyenlőtlen növekedésű szektorok láthatók, kevés konidium képződik, a fonalak fehér színe dominál. Az ezeken a telepeken keletkezett konidiumokból kifejlődő telep viszont szabályos köralaku és konidiumképzése intenzív.

3.3 Az auxotróf törzsek protoplasztképzésének és regenerációjának vizsgálata:

A mutáció a sejtfal szerkezetében és szintézisében nem idézett elő olyan változást, amely a törzsek protoplasztképzését és regenerációját befolyásolta volna, előnyös tulajdonságaikat megtartották. A prototróf törzsekhez viszonyítva eltérést sem a képzés, sem a regeneráció folyamán nem tapasztaltunk.

3.4 Tulajdonságtadás protoplasztfúzióval

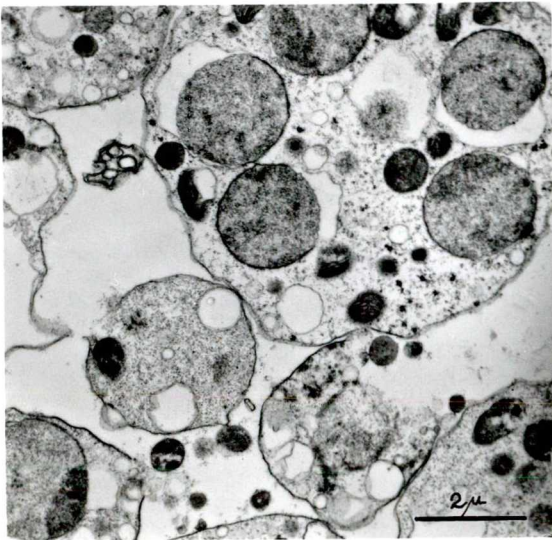
Miután tisztáztuk mikroorganizmusaink tulajdonságait a protoplasztképzés és regeneráció szempontjából, a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Ezekkel a törzsekkel megvalósítható-e fajon belül a nagy gyakoriságu fúzió, melyet a módezer kidolgozásakor az *A. nidulans* liz⁻ /SZMC 443/ és met⁻ /SZMC 442/ törzseinek fúziójakor tapasztaltunk /FERENCZY és mts. 1975/.
2. A fajok közötti sikertelen heterokarionképzésnek határozottan a sejtfal az oka, vagy más természetű inkompatibilitás következménye.

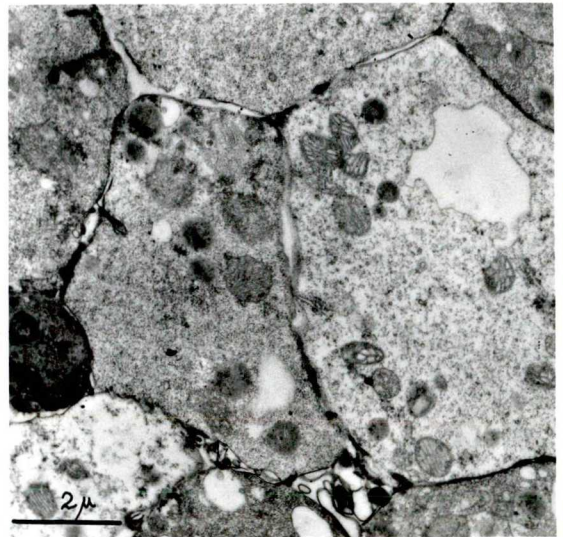
3.4.1 Az intraspecifikus fúzió eredményeinek ismertetése:

Kísérleteinket a 2.2.4.1 pontban leírtak alapján valósítottuk meg. PEG hatására a sűrű protoplaszt-szuszenzióban változó számú, csupán membránnal határolt sejtekből álló aggregátum képződött. A fúzió gyakoriságának növelése a PEG által nemcsak az intenzív

aggregátum képzésben, hanem ezen belül a membránok szoros egymásra szimításán alapszik. Ezt igazolják az elektronmikroszkópos felvételek, amelyek a PEG kezelés előtti /9. ábra/ illetve az azt követő állapotot szemléltetik. /10. ábra/



9. ábra

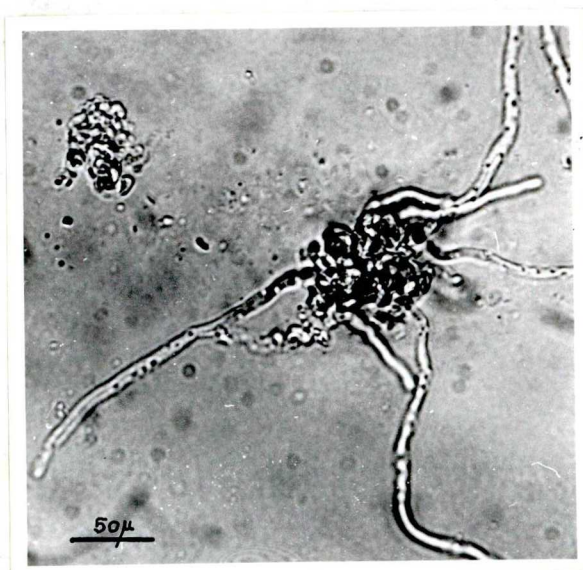


10. ábra

Kalcium ionok hiányában az aggregáció mértéke nem, de a fúzió gyakorisága csökken.

Az aggregátumokban az eltérő markerű protoplasztok egymás mellé kerülése véletlenszerű. Ezért nem minden aggregátumban játszódik le fúzió. Viszont a nagy-számu protoplasztból képződött aggregátumokban nemcsak egy protoplaszt-pár fúziója következhet be. Ezért mikroszkóposan több komplementálódott fonál növekedésének megindulása figyelhető meg. /11. ábra/

De mikroszkóposan ilyenkor ^{csak} is egy telepet kapunk.



11. ábra

Ez a jelenség természetesen csökkenti a fúziós gyakoriság általunk számított értékét.

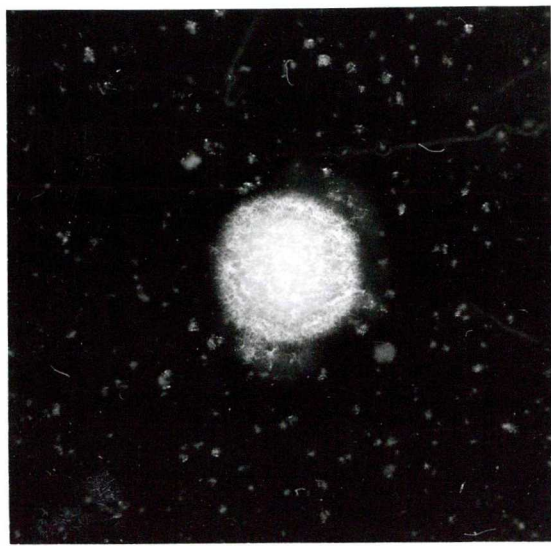
Az intraespecifikus fúzió gyakorisága - ha kísérletenként ingadozott is, de általában - *A. nidulans* valamint *A. fumigatus* auxotróf mutánsai között megközelíti a 30 %-ot.

3.4.2 Az interspecifikus fúzió eredményei:

A 2.2.4.2 pontban leírt kísérletek eredményeként minimál táptalajon 10^{-5} , PABA mentes minimál táptalajon pedig 10^{-8} gyakorisággal jelentek meg fajok közötti fúziós telepek. /12. ábra/



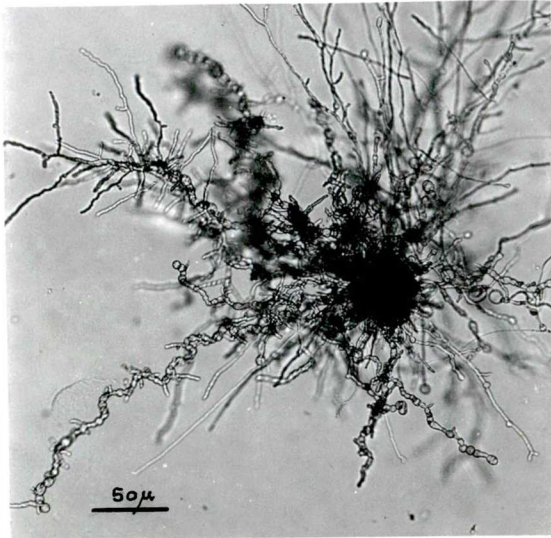
12. ábra



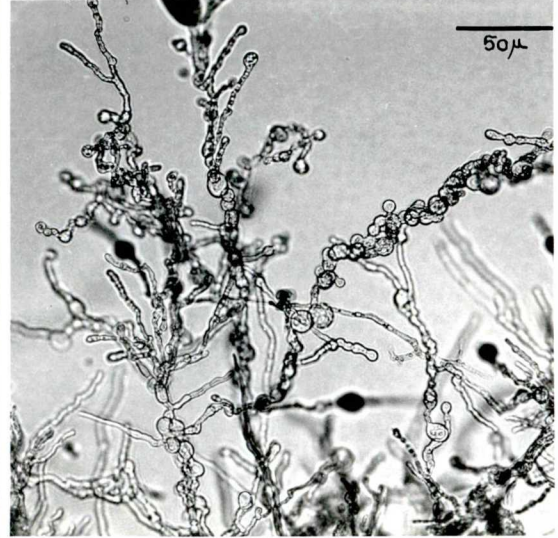
13. ábra

A fajok közötti fúziós kísérletekben PEG kezelést követően - szemben az intraspecifikus kísérletek során leírtakkal, - az aggregátum szuszpenziót hígítás nélkül szuszpendáltuk a felülöntőbe és úgy rétegeztük az alaplemezekre. A műveletek során viszont elkerülhetetlen a protoplasztok egyrészének pusztulása, minek eredményeként minimális mennyiségű adenin és lizin kerül a táptalajba. Ennek következménye, hogy a nem fuzionált protoplasztok regenerációja megindulhat és kismértékű fejlődést mutathatnak. Ezekből a "fúziós termékek" gyorsabb növekedésük eredményeként határozottan megkülönböztethetők. Ezt szemlélteti az előző ábrán látható fúziós telepről és környékéről készült közeli felvétel. /13. ábra/ A fajok közötti fúziós telep fejlődésének kezdeti szakaszában morfológiailag eltér a fajon belüli heterokarion mikroszkópos jellegzetességeitől. Ez egyrészt a telep rendkívül szabálytalan növekedésében /14. ábra/, másrészt egyes hifaszeg-

mentek hólyagos, göcsörtös fonalalkotásában nyilvánul meg. /15. ábra/



14. ábra



15. ábra

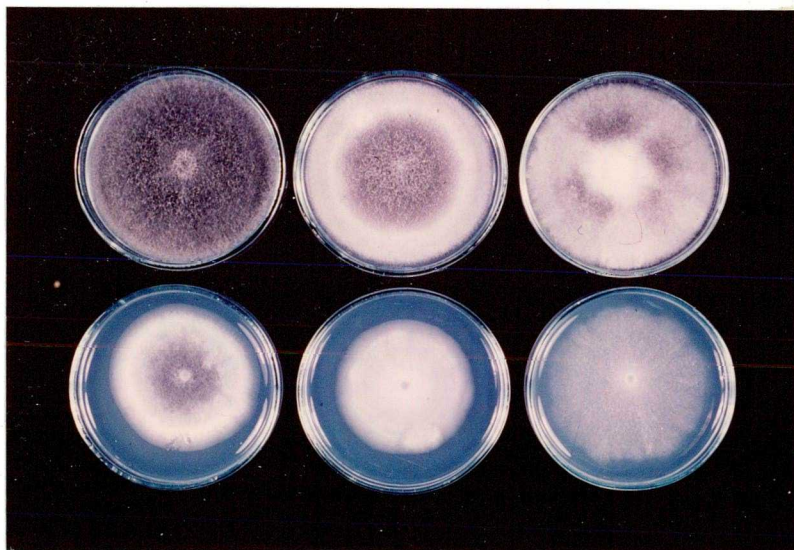
3.5. Az intra- és interspecifikus fúzió bizonyítása, a telepek tulajdonságainak vizsgálata:

A fúzió bizonyítására az *A. nidulans* és *A. fumigatus* prototróf, ade^- és liz^- törzseinek szín, morfológiai valamint genetikai markereiktől való eltérés vagy azok egyezése szolgáltak alapul, melyeket különböző összetételű táptalajokon micéliumokkal és konidiumokkal vizsgáltunk. A mikroorganizmusok jellegzetességeit $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 4 napos inkubálást követően *A. nidulans* esetén a 16., *A. fumigatus* esetén a 17. ábra szemlélteti. A felső sor mindkét esetben komplett táptalajon kialakult telepeket szemléltet. Az alsó

sorban elsőként a prototróf törzs minimál táptalajon,
majd az auxotróf törzsek adeninnel illetve lizinnel
kiegészített minimál táptalajon kialakult telepei
láthatók.



16. ábra

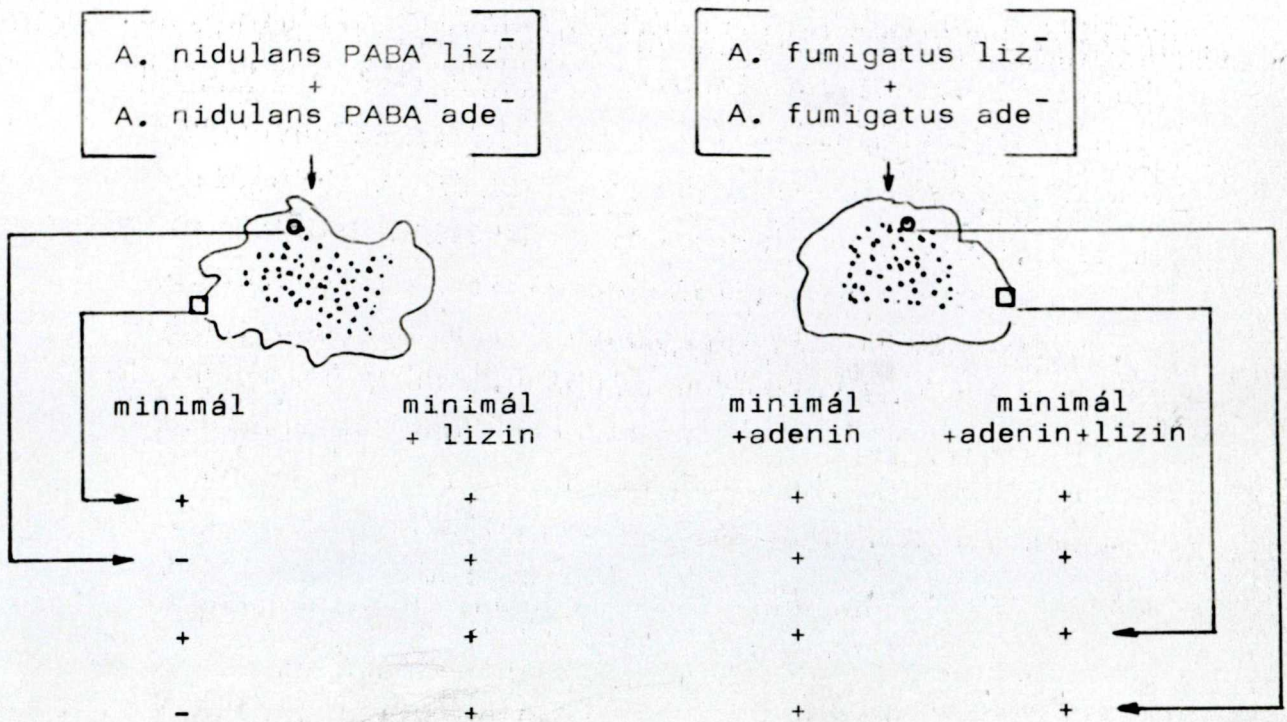


17. ábra

3.5.1 A protoplasztok faion belüli fúziójának bizonyítása:

A protoplasztfúzió után minimál táptalajon megjelenő telepek morfológiája laza fonálképzéssel, egyenlőtlen vékony növekedésű szektorokkal tagolva, eltér a szülői telepek teleptípusától, ha azokat a megfelelően kiegészített minimál táptalajon vizsgáljuk. Viszont úgy az *A. nidulans* mint az *A. fumigatus* esetében nagyon hasonlítanak a fonálasztomózis során képződött heterokarionokhoz. A konidiumok képződése mindkét esetben szegényes. A heterokariotikus állapot minimál táptalajon, micéliummal korlátlanul fenntartható.

A szegregációs vizsgálat eredményeit a 18. ábra szemlélteti. A telepeken a minimál táptalajon képződő protoplasztok csak a fúziós partnerek tulajdonságait hordozzák és csak a megfelelően kiegészített táptalajon képesek növekedésre. Ezek egymáshoz viszonyított arányát, mennyiségi viszonyait és a diploidképzést nem vizsgáltuk. A fonalakat minimál táptalajról komplettre oltva a heterokariotikus állapot felbomlik, a szülői tulajdonságok elkülönülnek.



18. ábra

Az intraspecifikus fúziós telepek szegregációjának kísérleti eredményei:

□ = oltás micéliummal; ○ = oltás konidiummal

+ = a konidiumok közel 100 %-os csírázása, illetve a micéliumok intenzív növekedése

- = nincs növekedés

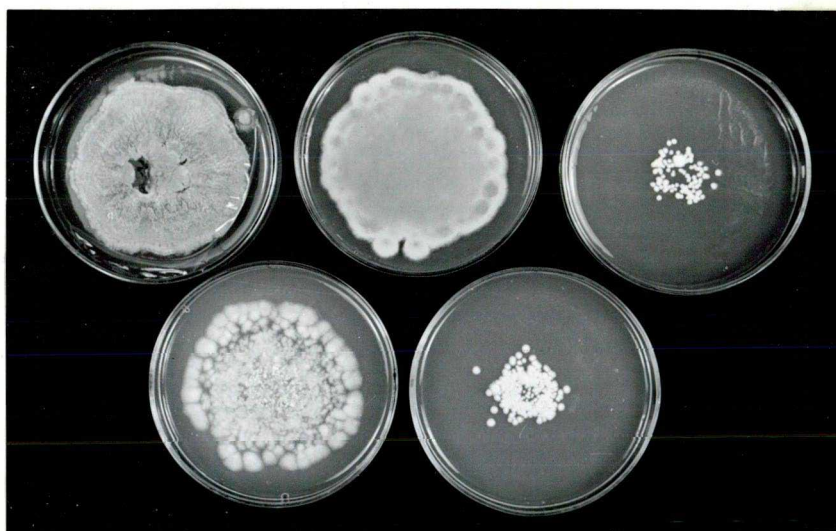
/+/- = erős /eltérés/ szórás az intenzíven növekedő hifák által lefűzött konidiumok csírázó képességében

3.5.2 Az interspecifikus fúziós telepek tulajdonságainak vizsgálata:

A különböző fajokhoz tartozó auxotróf mutánsok minimál táptalajon megjelenő fúziós produktumai - függetlenül attól, hogy *A. nidulans* ade^- + *A. fumigatus* liz^- vagy *A. nidulans* liz^- + *A. fumigatus* ade^- párosításban valósítottuk meg a protoplaszt fúziót - vagy *nidulans* vagy *fumigatus* karakterűek voltak.

Első lépésként a telepek konidiumképzésének jellegzetességeit vizsgáltuk a 2.2.5.1 pontban leírtak szerint.

Az eredményeket az *A. nidulans* liz^- + *A. fumigatus* ade^- protoplaszt fúziója eredményeként *nidulans* morfológiai bélyeget mutató telep példáján keresztül írjuk le és a 19. ábrán szemléltetjük.



19. ábra

Az ábrán látható Petri-csészék sorrendben a következő táptalajokat tartalmazzák: felső sor: komplett /rajta a telep celofánon volt kifejlesztve - 3 cm átmérőig előnevelés minimál táptalajon/+ Erről replikáztuk a konidiumokat a következő táptalajokra:

komplett minimál + adenin; /2. és 3. csésze a felső sorban/ minimál + lizin; minimál /az alsó sorban/. A komplett táptalajon növekvő telepen - a teljes replikázott felület a centrális rész kivételével - lefűződő nagyszámu konidium csak annak a törzsenek a tulajdonságait hordozza amelyre a fuzió partnerek közül a telep morfológiailag nagymértékben hasonlít. Példánkban ez az *A. nidulans* liz⁻ törzse. A konidiumok komplett, illetve lizinnel kiegészített minimál táptalajon indulnak fejlődésnek. Minimál és adeninnel kiegészített minimál táptalajon - a perifériás részeken - már nem képeznek telepet.

A minimál táptalajon történő növekedés közben kialakult viszonylag kevés számu konidium - centrális rész - viszont képes teleppé fejlődni minimál és adeninnel kiegészített minimál táptalajon is. /19. ábra/

/ Kis valószínűséggel ugyan de lehetséges, hogy a replikázás során fonáldarabkák is megtapadtak a bárszyon, melyek a táptalajra kerülve telepet formáltak./

A fenti telepektől eltérő tulajdonságokkal rendelkező *nidulans* és *fumigatus* morfológiájú telepeket 1-2 %-ban találtunk. A 20. ábrán a Petri-csészék sorrendje a táptalajok összetételét illetően megegyezik a 19. ábrán láthatókkal.



20. ábra

A telep szintén az *A. nidulans* liz⁺ + *A. fumigatus* ade⁺ törzsek protoplaszt fúziójának terméke, bár morfológiailag *nidulans* karakterű, de az előzőekben tárgyalt telepekhez képest jelentős eltéréseket mutat.

A komplett táptalajon növekvő teleprésről - perifériás gyűrű - lefűződő konidiumok nagyobb része a *nidulans* szülő tulajdonságait hordozza. Viszont az adeninnel kiegészített minimál, valamint a minimál táptalajon is megjelentek telepek. Ezek is olyan konidiumokból fejlődtek ki, amelyek szintén komplett táptalajon létrejött területen képződtek. Ezek a telepek is határozottan *nidulans* karakterűek, ennek ellenére szembetűnő különbségek figyelhetők meg. Ezek a telepátmérő ingadozásában, a telep formájában és színbeli árnyalatokban nyilvánulnak meg. Ez utóbbi a különböző mennyiségű konidiumképzés eredménye.

Vizsgálataink során megfigyeltünk egy harmadik teleptípust is, melyek *fumigatus* karakterűek, sem teljesen sem részlegesen nem hasadnak. Az alkalmazott táptalajok bármelyikén, mint alaplemezen képződő konidiumok a különböző összetételű táptalajokra replikázva telepformálásra képesek. A telepek telepmorfológia szempontjából minimális, konidiumképzés intenzitásában, és ennek következtében a színezettségben viszont jelentős eltéréseket mutatnak a szülői típustól. Mivel az alkalmazott törzseknél back-mutációt a folyamatos ellenőrzés ellenére sem tapasztaltunk, nagy a valószínűsége annak, hogy ezek a telepek is fúziós termékek.

A konidiumok tulajdonságainak vizsgálata során olyan esettel nem találkoztunk ahol a komplett táptalajon növekvő, ugyanazon fúziós telepen lefűződő konidiumok külön-külön, tisztán hordozták volna a szülői tulajdonságokat.

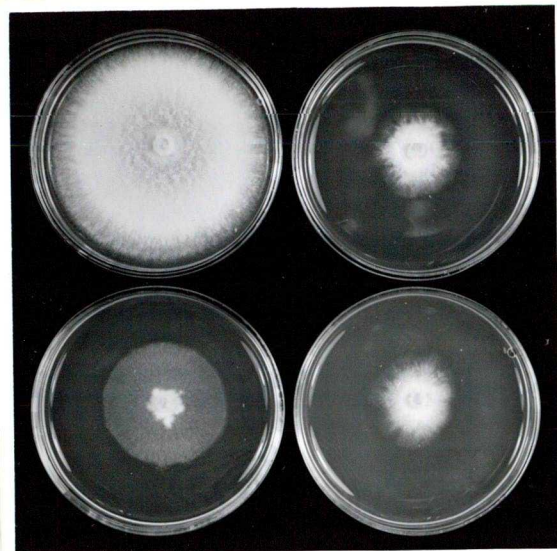
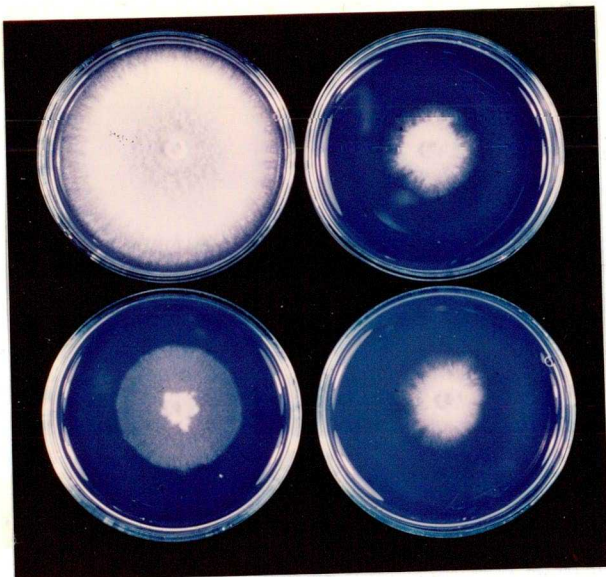
A fúziós telepek tulajdonságainak vizsgálatát micéliumokkal a 2.2.5.2 pontban leírtak alapján valósítottuk meg. Az eredmények nagymértékű hasonlóságot mutatnak a konidiumok vizsgálatakor tapasztaltakkal.

A szegregációs kísérletek eredményeit az *A. nidulans* ade⁻ + *A. fumigatus* liz⁻ protoplasztok által képzett *fumigatus* jellegzetességeket mutató telep esetén a 21. ábra, a *nidulans* karakterűét a 22. ábra szemlélteti./A Petri-csészékben a táptalajok összetétele valamennyi micélium szegregációt dokumentáló felvételen a következő: felső sor: komplett; minimál+adenin; alsó sor: minimál+lizin; minimál. A négy Petri-csészéből álló csoport alatt annak a táptalajnak az összetétele olvasható, amelyről az inokulumokat leemeltük és a fenti táptalajokra helyeztük./ A 21. ábra felvételein jól látható, hogy az *A. nidulans* ade⁻ + *A. fumigatus* liz⁻ párosításából eredő, *fumigatus* jellemvonásokkal rendelkező fúziós telepet minimál táptalajról minimál + lizin összetételűre oltva, a központi, kompakt, még fúziós tulajdonságokat hordozó micélium tömegből hogyan hasadnak ki a csupán egyik szülői tulajdonságot hordozó fonalak. Továbbá, hogy a minimál táptalajról komplettre oltott és azon kifejlesztett telepek pereméről kiemelt fonalak csak komplett, illetve lizinnel kiegészített minimál táptalajon képesek növekedésre.

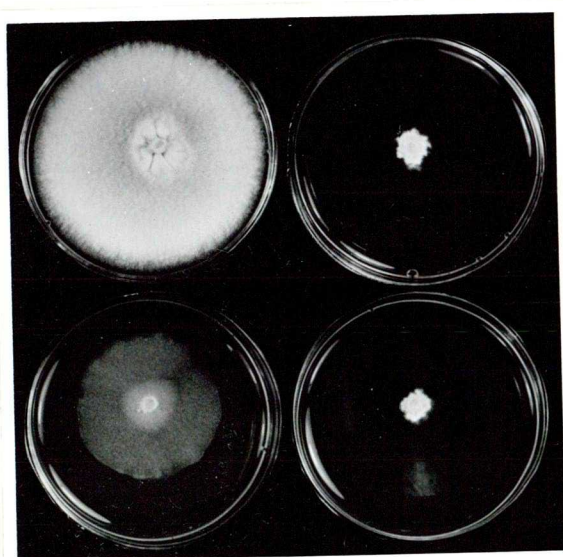
A 22. ábrán megfigyelhető, hogy a különböző összetételű táptalajokon a hasadás különböző intenzitású - komplett táptalajon már bekövetkezett, minimál + adeninen még folyamatban van.

Az *A. nidulans* liz⁺ + *A. fumigatus* ade⁻ törzsek protoplasztjainak fúziója következtében képződött *nidulans* karakterű telepből a karakternek megfelelő ezülő kihasadásának lépéseit ábrázolja a 23. ábra képsora. Az *A. nidulans* liz⁺ partner fonalainak elkülönülése különösen a minimál + lizin összetételű táptalajon szembevetendő.

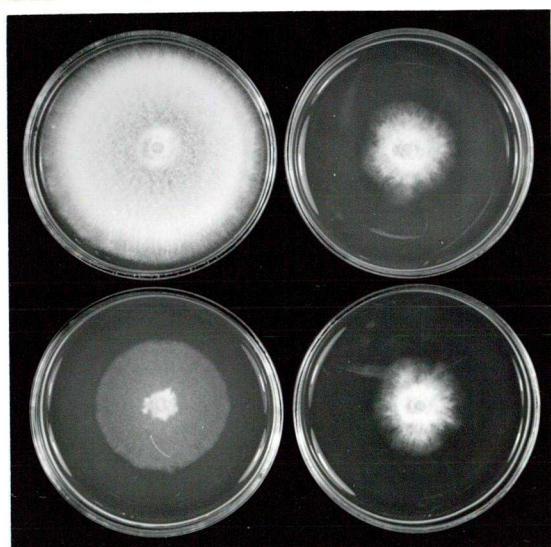
A 24. ábrán egy olyan telep szegregációs vizsgálatának eredményei láthatók, amely *A. nidulans* ade⁻ + *A. fumigatus* liz⁺ protoplaszt fúzió eredményeként izoláltunk. A *nidulans* karakterű fúziós termékek komplett táptalajon kifejlődött telepének micéliumaival - szemben az előzőekkel - megtartották azon képességüket, hogy újra minimál táptalajra oltva telepet képezzenek.



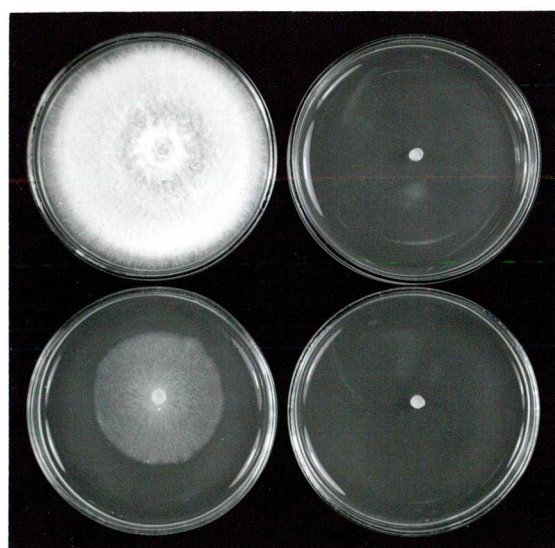
A típusstempel a különböző összetételű táptalajokon



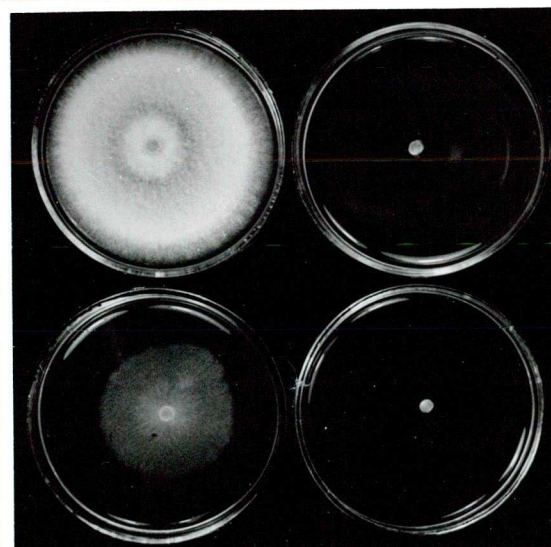
minimálról



minimál + adeninről

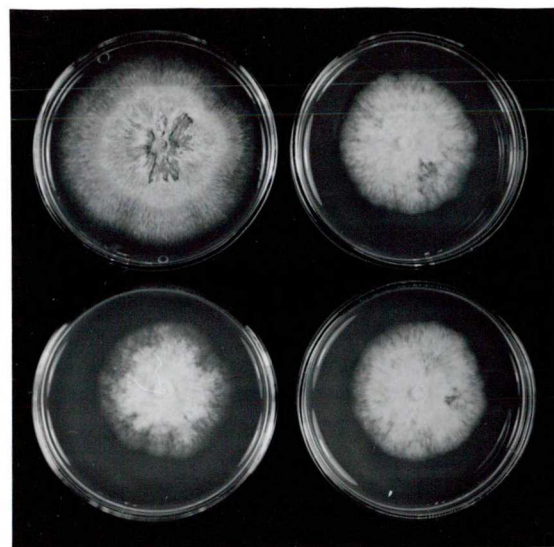


minimál + lizinről

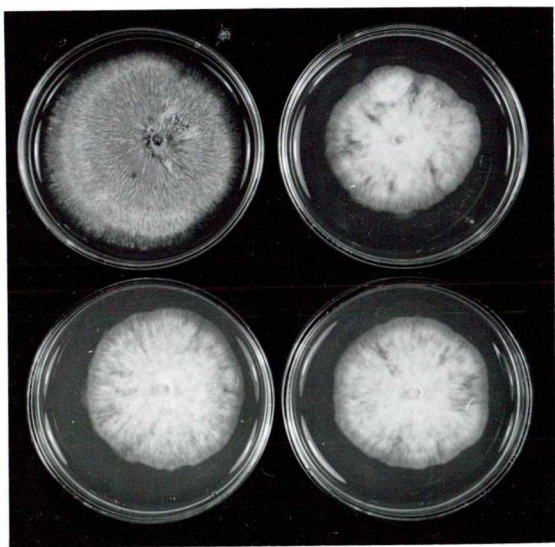


komplettről

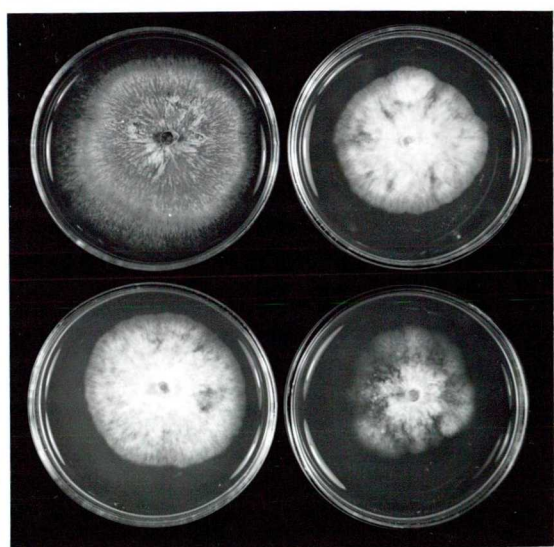
A. nidulans ade⁻ *A. fumigatus* liz⁻



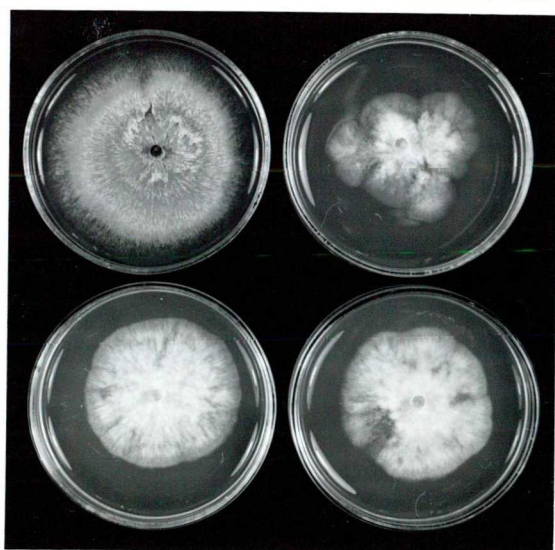
A típustelep morfológiája a különböző összetételű táptalajokon



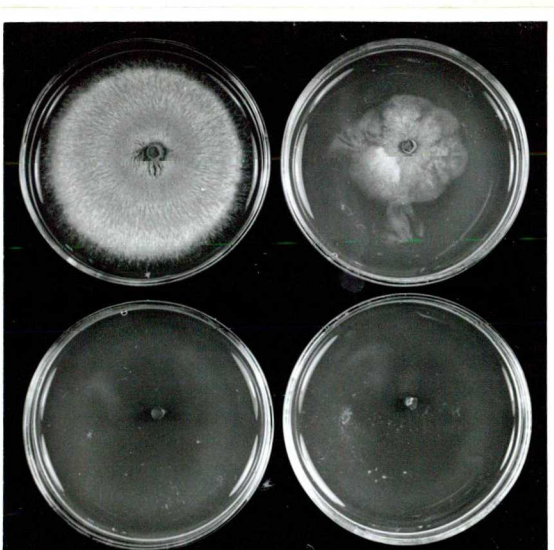
minimálról



minimál + adeninről



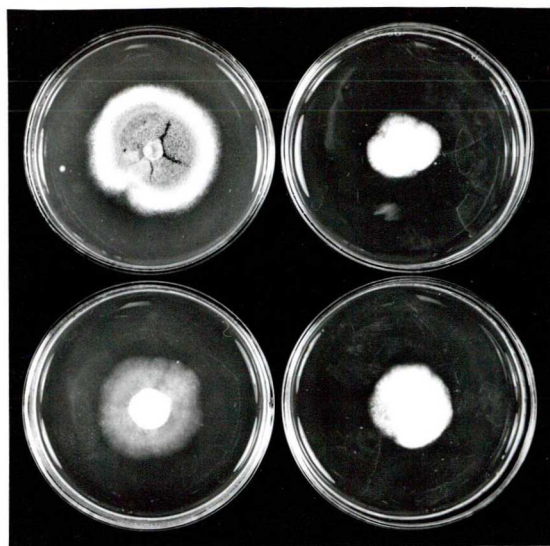
minimál + lizinről



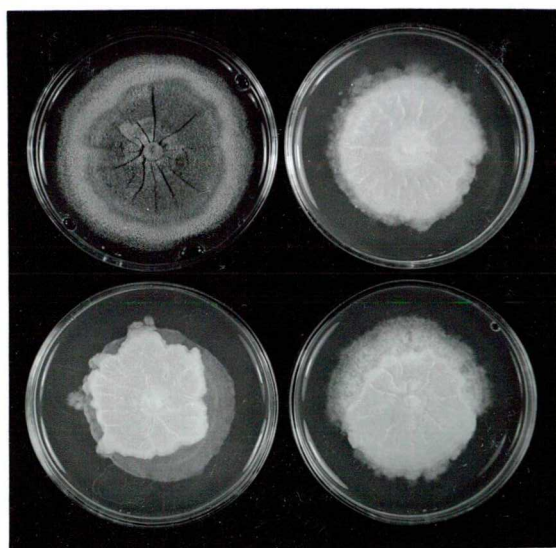
komplett táptalajról

A. nidulans ade⁺ + *A. fumigatus* liz⁻

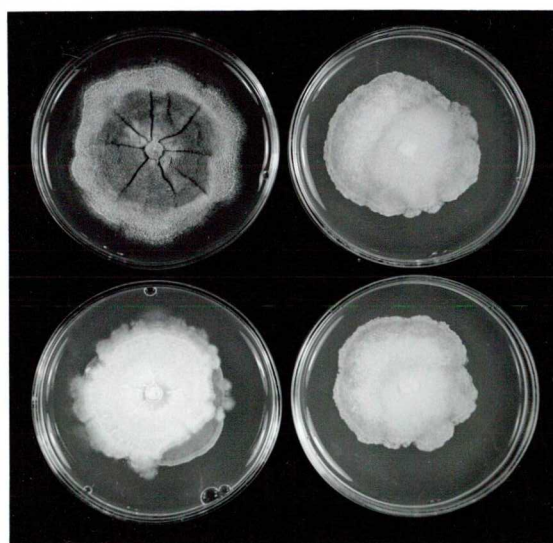
22. ébra



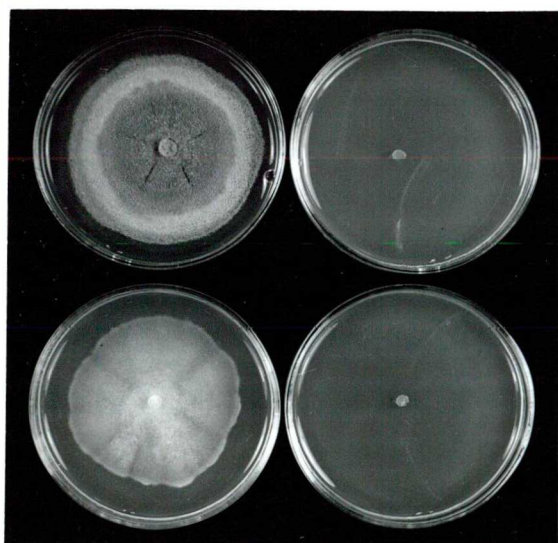
A tipustelep morfológiája a különböző összetételű táptalajakon



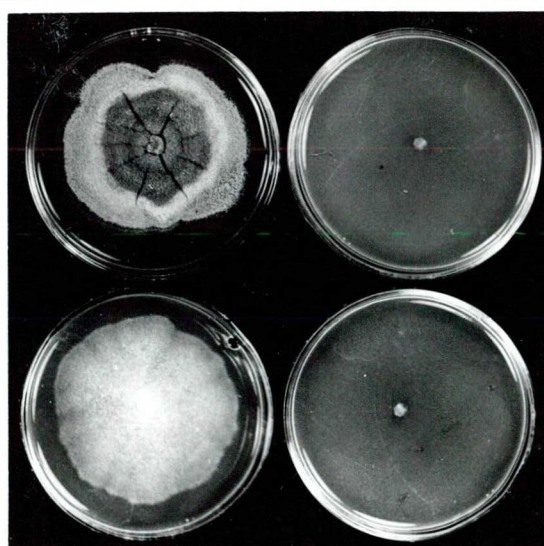
minimálról



minimál + adeninről

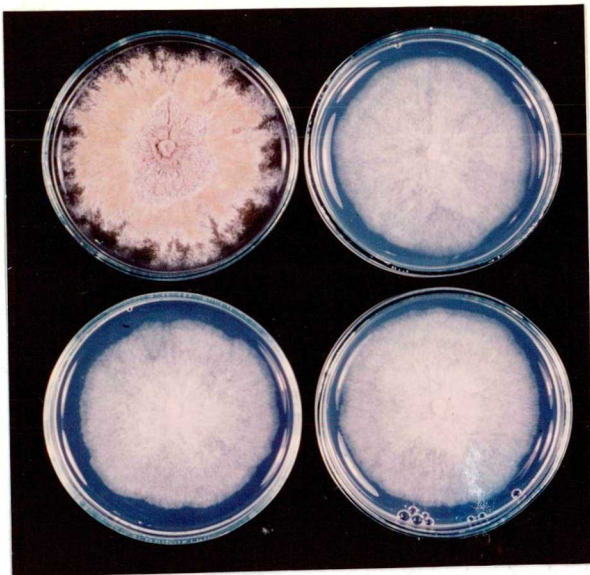


minimál + lizinről

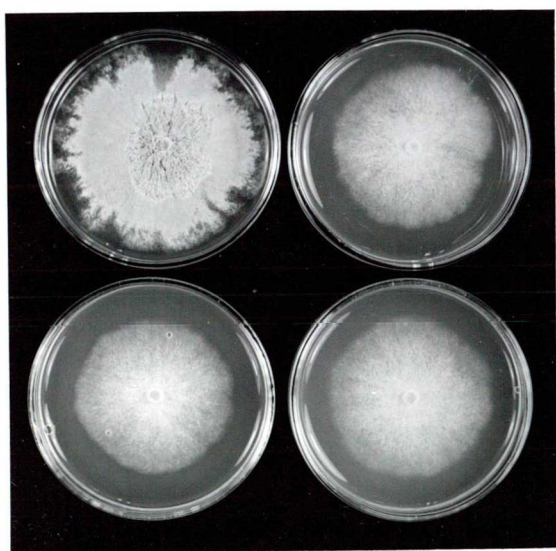


komplettről /táptalajról/

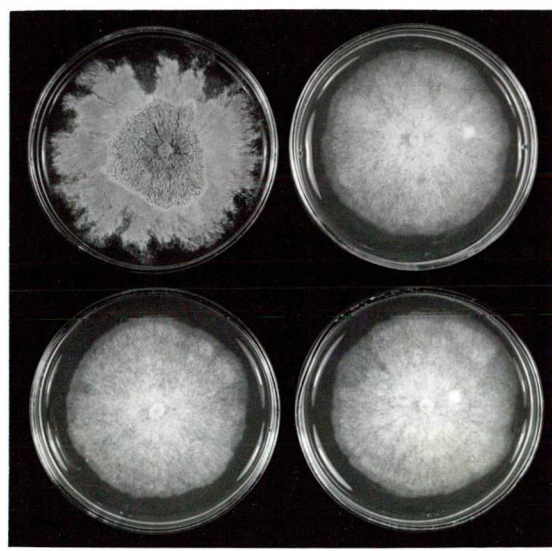
A. nidulans liz⁻ + *A. fumigatus* ade⁻



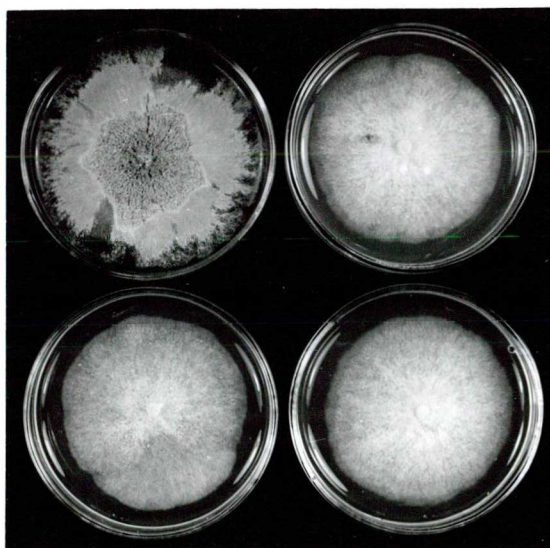
A típustelep morfológiája a különböző összetételű táptalajokon



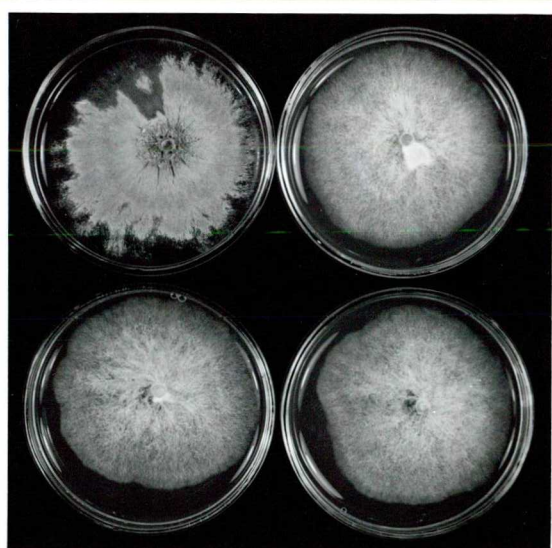
minimálról



minimál + adeninről



minimál + lizinről



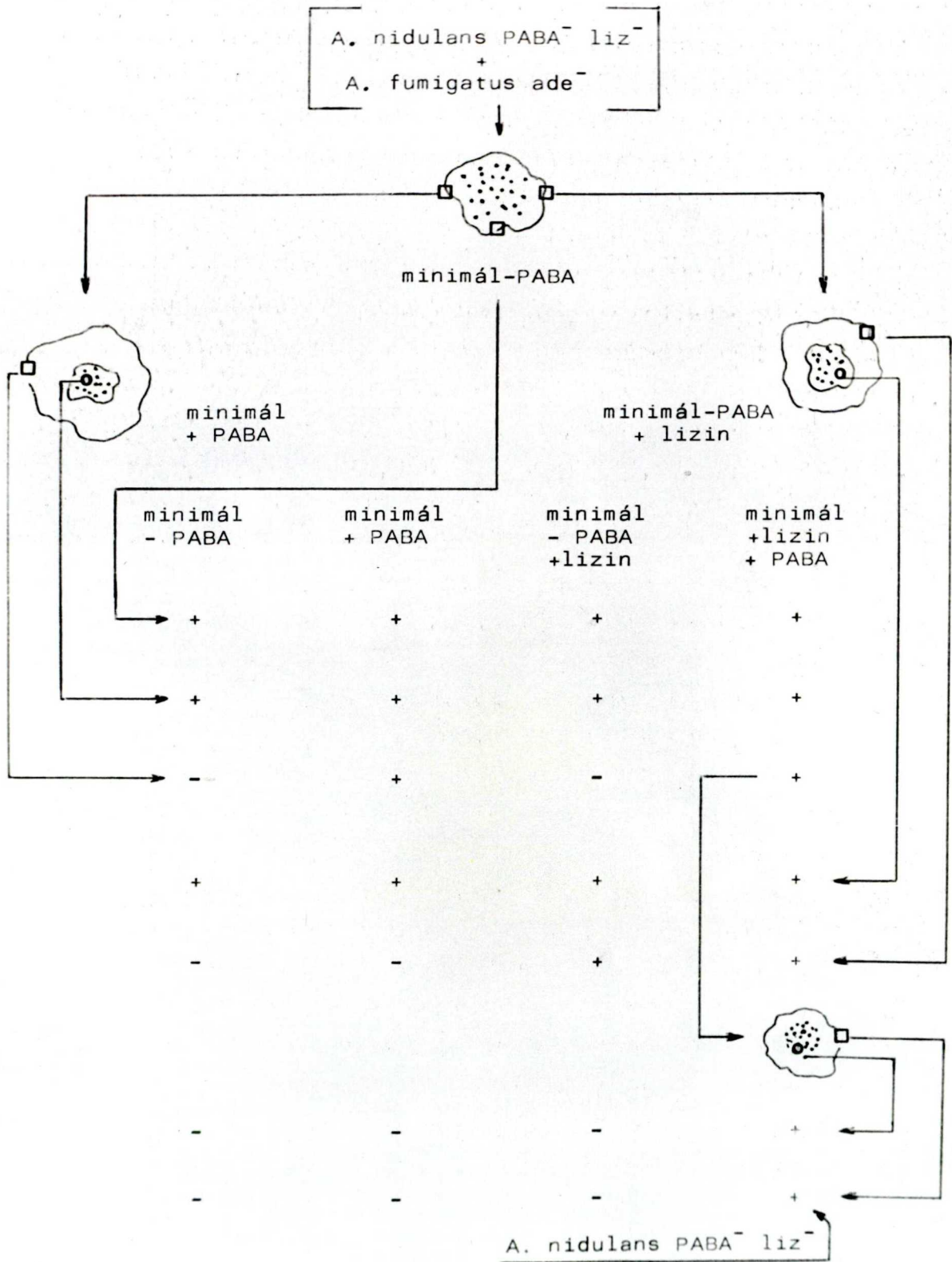
komplett táptalajról

A. nidulans ade^- + A. fumigatus liz^-
24. ábra

A 2.2.4.2/c pont alapján kivitelezett kísérletek eredményeként a PABA mentes minimál táptalajon megjelenő fúziós telepek *A. nidulans* morfológiát mutattak. Az *A. fumigatus* partnert ezekből a telepekből sem sikerült az alkalmazott módszerekkel kihasítani.

Korábbi eredményeink alapján feltételeztük, hogy a két hiányzó tulajdonság egyidejű komplementációja két idegen kromoszóma jelenlétének eredménye. Ebből viszont az következik, hogy szelektíven eliminálhatók a fúziós termékből, és ezt bizonyítottuk is. Kísérleteink sémája és eredményei a 25. ábrán láthatók.

A minimál + PABA összetételű táptalajon kifejlődött telep micéliumának csucci részéből vett fonál inokulum PABA-t nem tartalmazó táptalajon már képtelen a növekedésre. Ez azt jelenti, hogy PABA jelenlétében az *A. nidulans* PABA⁺ tulajdonságát komplementáló *A. fumigatus* kromoszóma kiiktatódik. Hasonló jelenség figyelhető meg a lizin⁺ tulajdonságot komplementáló *A. fumigatus* kromoszóma esetén is, lizin tartalmu táptalajon. A minimál + PABA táptalajról minimál + PABA + lizin összetételű táptalajon kifejlődött telep micéliumaiban eliminálódik a második idegen kromoszóma is és a fonálvégződésekből vett inokulum már csak PABA és lizin együttes jelenlétében képes telepképzésre.



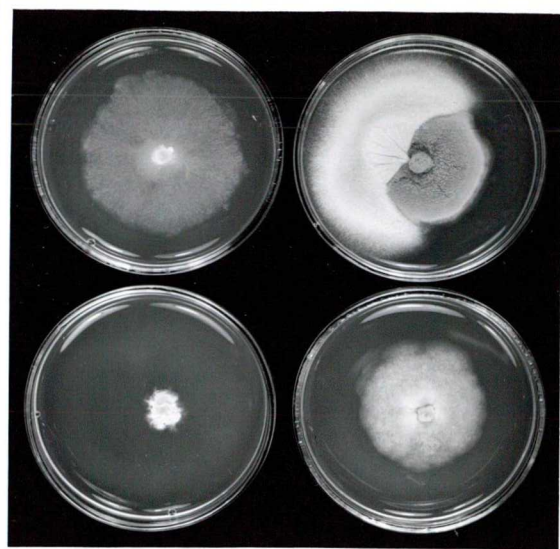
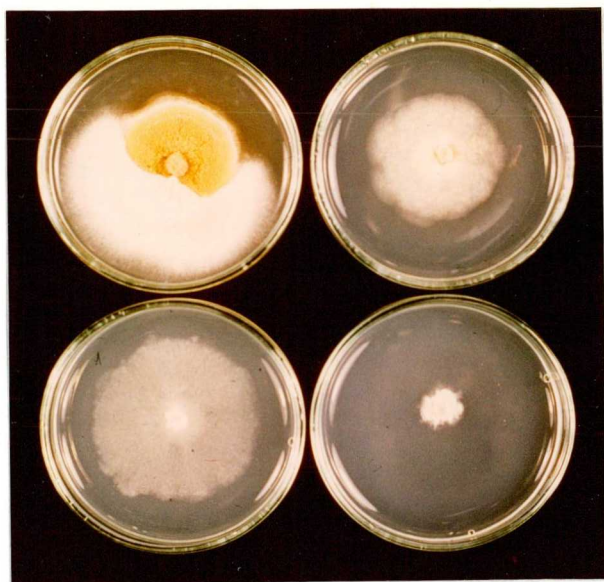
25. ábra

A színbóluok jelentése mint a 18. ábrán

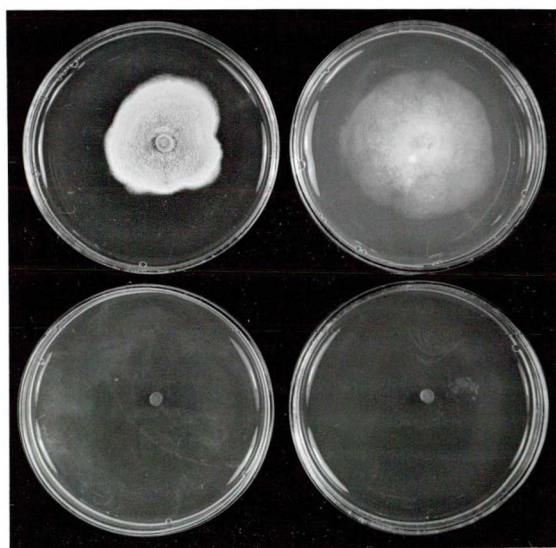
Feltételeztük, hogy a fúziós termékek fonalaiban, a haránt falakkal tagolt sejtekben, az egymást komplementáló két sejtmag elkülönülten is megtalálható, de ez a konidiumképzés során nem nyilvánul meg. Ebben az esetben a sejtfal enzimikus eltávolításának eredményeként létrejöhetnek olyan protoplasztok, amelyek csak az egyik, vagy csak a másik sejtmagot hordozzák. Stabilizált, és megfelelően kiegészített minimál illetve komplett táptalajon regeneráltatva ezeket, a fúziós termékből a két szülői törzse így tisztán kihasítható.

A 2.2.5.3 pontban leírt kísérleteink eredményei feltevéseinket nem igazolták. A protoplasztképzés és regeneráció után, a különböző összetételű táptalajokon csak az egyik szülői, illetve a fúziós termék tulajdonságait hordozó telepek jelentek meg.

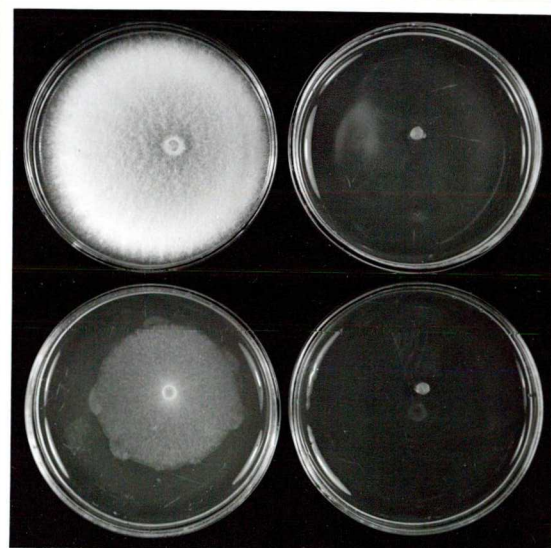
Fajok közötti heterokarionképzésre utaló jelenséget kísérleteink során csak egyszer észleltünk. Az *A. nidulans* ade⁻ és *A. fumigatus* liz⁻ törzsek protoplasztjainak fúziójaként minimál táptalajon megjelent majd azon többször passzált fúziós telepből a szegregációs kísérletek során komplett táptalajon kihasadtak a szülői partnerek. A kísérletek eredményeit szemléleteti a 26. ábra.



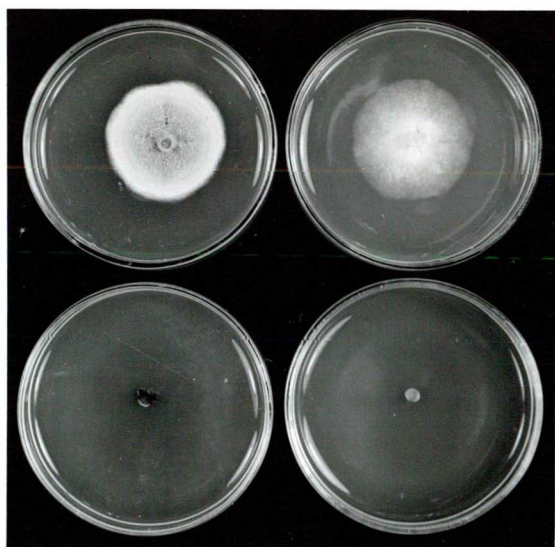
A típustelep morfológiája a különböző összetételű táptalajokon



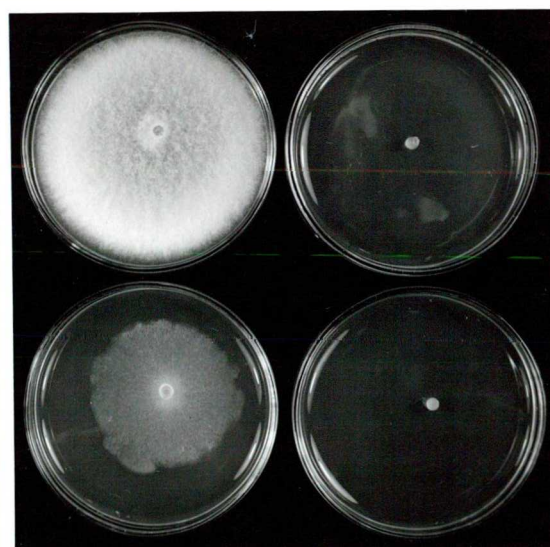
minimál + adeninről



minimál + lizinről



komplett táptalajról



komplett táptalajról

A. nidulans ade^- + *A. fumigatus* liz^-

4. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE:

A. nidulans PABA⁻liz⁻ és *A. nidulans* PABA⁻ ade⁻ valamint *A. fumigatus* liz⁻ és *A. fumigatus* ade⁻ mutánsai között fajon belül, ROPER által 1952-ben kidolgozott, a gombagenetikában ma már hagyományosnak számító módszerrel, anasztomozissal, sikerült heterokarionokat képezni. Ezzel a módszerrel, e rendszertanilag egymástól távol álló fajok /RAPER és FENNELL, 1965/ között tulajdonságátadás nem valószínűsíthető meg. Ezért megkíséreltük ezt csupán membránnal határolt sejtek, protoplasztok indukált fúziójával kivitelezni.

Protoplasztképzéskor és azok regeneráltatásakor, a korábban a tanszéken kifejlesztett módszereket alkalmaztuk.

A fiatal hifákból álló konidiummentes micéliumokból 0,6M KCl mint ozmotikus stabilizátor jelenlétében *Helix pomatia* gasztrális emésztőnedvével képeztünk protoplasztokat. Ezek regenerálódásának feltételeit izoozmotikus táptalajba keveréssel biztosítottuk.

Geotrichum candidum mutánsainak protoplasztfúziójáról $1,6 \cdot 10^{-6}$ gyakorisággal, 5,5 és 7 pH-n ozmotikusként 0,6 M KCl illetve 0,8 M-os mannitot alkalmazva elsőként Ferenczy és munkatársai számoltak be. /1972, 1974/ BINDING és WEBER 1974-ben *Phycomyces* protoplasztok képezését és mintegy $5 \cdot 10^{-5}$ gyakoriságú fúzióját valószínűsítette meg tengervíz valamint $\text{Ca/NO}_3/2$ jelenlétében. A különböző genetikai információt hordozó protoplasztok összeolvadásának gyakorisága $2,5 \cdot 10^{-3}$ -on volt, amikor ezt *Aspergillus* törzsek esetén hideg-aggregáltatással valószínűsítették meg. /FERENCZY és mts. 1975/

KAO és MYCHAJLUK 1974-ben megfigyelte, hogy a növényi protoplasztok intenzív aggregátumképzése és összeolvadása figyelhető meg PEG jelenlétében.

A vegyület gombaprotoplasztok aggregáltatására alkalmazva 0,1 M CaCl_2 jelenlétében *Aspergillus nidulans* lizin és metionin igényes törzsei között a komplementáció gyakorisága eléri a 40 %-ot /FERENCZY és mts. 1975/. Tiszta zódik ezámos vegyület, /KCl, NaCl, CaCl_2 , MgCl_2 / mint ozmotikus stabilizátor, valamint a különböző molekulasúlyu illetve koncentrációju PEG-nek a regenerációt és a gyakoriságát befolyásoló szerepe is. /FERENCZY és mts. 1976/.

ANNÉ *Penicillium* fajok protoplasztképzésének és regenerációjának megvalósítása után szintén PEG-et alkalmazott fuziót serkentő ágensként. /ANNÉ és mts. 1976/

Kísérleteink során a leghatékonyabb módszer alkalmazásával *A. nidulans* és *A. fumigatus* auxotróf mutánsok protoplasztjainak fuziójánál a komplementációt fajon belül 30 %-os, az interspecifikus komplementáció egy tulajdonság esetén 10^{-5} mindkét marker esetében 10^{-8} gyakoriságú volt. Az állandó ellenőrző kísérletek során backmutációt /minimál táptalajon növekedést/ egyik törzs esetében sem tapasztaltunk.

A komplementáció létrejöttét a fuzió minimál táptalajon megjelenő, és azon fejlődő telepek jelezték. Mikroszkopos vizsgálataink során közvetett bizonyítékként szolgált a fajok közötti fuzió eredményeként fejlődésnek indult telepek fonalainak, rendezetlen göcsörtös, lassu növekedése /14. és 15. ábra/. Ez a jelenség használt törzseknél és a fajon belüli fuzió telepeknél nem figyelhető meg.

A közvetlen bizonyítékot a fúziós produktumok különböző összetételű táptalajon növekvő fonalainak és az általuk lefűzött konidiumok tulajdonságainak vizsgálata szolgáltatja. Ennek alapját az *A. nidulans* és *A. fumigatus* prototróf, ade^- és liz^- törzseinek szín, morfológiai valamint genetikai markereiktől való eltérése vagy azok egyezése képezte.

Az interspecifikus fúziós telepek a párosítástól függetlenül morfológiailag vagy az egyik, vagy a másik partnerre hasonlítottak.

A szegregációs kísérletek során 200 telepet vizsgáltunk meg. A telepek 98 %-ából csak annak a törzsenek tulajdonságait hordozó partnert sikerült izolálni, amelyre morfológiailag hasonlított. Az eredmények meggyeztek, akár a micéliumok akár a konidiumok tulajdonságait vizsgáltuk.

Az intraspecifikus fúzió termékeként létrejött, minimál táptalajon növekedésre képes heterokarionok által képzett konidiumok a szülői markereket tisztán hordozzák - minimál táptalajon nem csíráznak ki. A fajok közötti fúziós termék minimál táptalajon lefűzött konidiumai viszont képesek telepformálásra adenin illetve lizin hiányában is.

Ezek a tények azt a feltételezést eredményezték, hogy fúziós telepeik aneuploidok, hiperhaploidok, a partner genetikai állományából egy vagy csak néhány kromoszómát hordoznak, a többi eliminálódott. A sejtekben lévő idegen kromoszómák viszont kiiktatódnak mielőtt a külső kényszerítő tényező - ebben az esetben a minimál táptalaj, illetve a lizin vagy az adenin hiánya megszűnik.



Hasonló jelenséget figyelt meg KÄFER 1960-ban, amikor anasztomózis során, kicsi gyakorisággal képződött *Aspergillus nidulans* diploidjait vizsgálta. Ezek között a nem stabil típusú diploidok szegregációiban a haploid garnitúrán kívül különböző számú, duplán jelenlévő kromoszómákat sikerült kimutatni. A megbomlott diploid állapot, különböző hiperhaploidokon keresztül, egész kromoszómák fokozatos eliminálása révén szűnt meg. Feltevéseink helyességét bizonyítják azok az eredmények amelyek a két tulajdonságra komplementálódott telepek vizsgálatánál kaptunk. A PABA lizin⁻ tulajdonságot komplementáló *A. fumigatus* kromoszómák megfelelő összetételű táptalajokon egymástól függetlenül eliminálhatók, az *A. nidulans* PABA⁻liz⁻ törzs micéliumai és konidiumai tisztán kihasíthatók.

Az a megfigyelés hogy a fúziós telepek növekedési sebessége a fúziót közvetlenül követő időszakban lényegesen kisebb, mint a szülő partnereké, de bizonyos idő elteltével a különbség fokozatosan csökken, szintén alátámasztja azt, hogy az idegen kromoszómák eliminálása a sejtekben folyamatosan megy végbe. Valószínű, hogy ennek a folyamatnak különböző stádiumai figyelhetők meg a 20. ábrán bemutatott telep esetén is.

Az olyan esetek magyarázatára amikor az izolált fúziós telepekből a morfológiájának megfelelő partner az alkalmazott módszerekkel nem volt kihasítható és prototróf jellemvonásokat mutatnak PONTECORVO /1956/, ROPER /1966/, KÄFER /1961/ munkája alapján több lehetőség kínálkozik. Azokra a kérdésekre, hogy a fenti telepek esetén spontán nem hasadó diploidképzés mitotikus crossing over következtében idegen kromoszóma szegment megőrzése és rekombináció vagy back mutáció történt, további munkánk során szeretnénk választ adni.

Kísérleteinkkel egyidőben J. ANNÉ, H. EYSEN és P. De SOMER 1976 *Penicillium roquefortii* és *Penicillium chrysogenum*; F. KEVEI és J.F. PÉBERDY 1976 *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus rugulosus* auxotróf mutánsok protoplasztjainak interspecifikus fúzióját valósították meg. Módszereik egyeztek az általunk alkalmazottakkal. Konklúzióik részben egyeznek részben eltérnek eredményeinktől. Számos fajok közötti diploidot és rekombinánst izoláltak. Ennek magyarázata, hogy az általuk alkalmazott törzsek - és ezt a szerzők is hangsúlyozzák - rendszertanilag egymáshoz közelálló fajok mutánsai, genuson belül azonos fajcsoportba tartoznak. /B. K. RAPER and D. I. FENNELL 1966/

5. ÖSSZEFOGLALÁS:

Aspergillus nidulans valamint *Aspergillus fumigatus* auxotróf mutánsok között, fajon belül, genetikai információ átadás anasztomóziással megvalósítható. Azonban e között a két, rendszertanilag egymástól távol álló faj között ezt a folyamatot megfigyelni vagy indukálni még nem sikerült. Ezért célul tűztük ki genetikai információ protoplaszt fúzió útján történő átadásának megvalósítását e két faj között.

A korábban kidolgozott - eddigi leghatékonyabb - módszereink; protoplasztképzés *Helix pomatia* gasztrális emésztőnedvével, ozmotikus stabilizátorként 0,6M KCl-t alkalmazva a csupán membránnal határolt sejtek fúziójának indukálása PEG-gel 0,1M CaCl_2 jelenlétében, regeneráltatás izoozmotikus táptalajba keveréssel lehetőséget nyújtottak célunk eléréséhez.

A fenti módszer alkalmazásával, intraspecifikusan az *A. nidulans* PABA⁻ade⁻ + *A. nidulans* PABA⁻liz⁻ valamint az *A. fumigatus* ade⁻ + *A. fumigatus* liz⁻ mutánsok fúzióját 30 %-os gyakorisággal valósítottuk meg.

Fajok között, *A. nidulans* PABA⁻ade⁻ + *A. fumigatus* liz⁻ illetve *A. nidulans* PABA⁻liz⁻ + *A. fumigatus* ade⁻ auxotrófok protoplasztjainak fúziójánál a komplementáció egy tulajdonság esetén 10^{-5} mindkét hiány esetében 10^{-8} gyakoriságu volt.

A minimál táptalajon megjelenő intra- és interspecifikus fúziós telepekt mikro- és makroszkóposan jellemeztük. A fúzió bizonyítása során a prototróf és mutáns törzsek szín, morfológiai valamint genetikai markereitől való eltérés vagy azok egyezése szolgáltak alapul.

A protoplasztok intraspecifikus fúziójának eredményeként kialakult telepek tulajdonságai mindkét faj esetében megegyeztek a fonalanasztomózis következtében létrejött heterokariotok morfológiai és genetikai jellemzőivel.

Az *A. nidulans* PABA⁻liz⁻ + *A. fumigatus* ade⁻ valamint az *A. nidulans* PABA⁻ ade⁻ + *A. fumigatus* liz⁻ párok protoplaszt-fúziójának eredményeként létrejött telepek morfológiailag az egyik vagy a másik partnerre hasonlítottak, de - szemben a szülői tulajdonsággal - képesek voltak minimál táptalajon növekedni.

A szegregációs vizsgálatok során a telepeket különböző összetételű táptalajokon tenyésztettük, majd egyrészt a kialakult telepek pereméről vett micélium mintát, másrészt a képződött konidiumokat replikázással, különböző összetételű táptalajokra vittük. A vizsgált telepek 98 %-ának konidiaiból és fonalaiból vagy csak az egyik vagy a másik fúziós partner volt kihasítható komplett, vagy megfelelően kiegészített táptalajon történő tenyésztés során. A telepek aneuploidok, hiperhaploidok, az egyik fúziós partner genetikai állományából csak néhány kromoszómát hordoznak. Ezt támasztja alá, hogy a két tulajdonságra komplementálódott termékekből, egymástól függetlenül a két idegen kromoszómát már nem hordozó fonalak illetve konidiumok megfelelően kiegészített minimál táptalajokon kihasíthatók.

Munkánk során bizonyítottuk, hogy a kidolgozott protoplasztfúziós technika lehetőséget teremt olyan genetikai rendszerek tanulmányozására, melyek megismerését a természet eddig limitálta, vagy megakadályozta. Továbbá olyan ipari mikroorganizmusok nemesítésére is melyek fajon belül és fajok között törzsek kedvező tulajdonságait egyesítik, illetve - kísérleti célokra - olyan élő rendszerek szelektálására melyek eddig nem álltak rendelkezésünkre.

6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Anné, J., H. Eyssen and R. De Somer. 1974. Formation and regeneration of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. *Arch. Microbiol.* 98: 159. 166.
- Anné, J. and J. F. Peberdy. 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J. gen. Microbiol.* 92: 413-417.
- Anné, J., H. Eyssen, R. De Somer. 1976. Somatic hybridization of *Penicillium roquefortii* with *Penicillium chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature /London/* 262: 719-721.
- Binding, G. H., H. J. Weber. 1974. The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Molec. gen. Genet.* 135: 273-276.
- Eddy, A.A., and D. H. Williamson. 1957. A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature /London/* 179: 1252-1253.
- Ferenczy, L., J. Zsolt, J. Téren, and I. Berek. 1968. Sensitivity of fungal protoplasts to various antibiotics. p. 95-99. In O. Nečas, and A. Svoboda /ed./ *Yeast protoplast*, Brno.
- Ferenczy, L., J. Zsolt, and F. Kevei. 1972. Forced heterokaryon formation in auxotrophic *Geotrichum* strains by protoplast fusion. p. 74. In J. R. Villanueva /ed./ *Third Intl. Symp. on Yeast Protoplasts*. R. Santi - Spiritus, Salamanca.
- Ferenczy, L., F. Kevei., J. Zsolt. 1974. Fusion of fungal protoplasts. *Nature /London/* 248: 793-794.

Ferenczy, L., F. Kevei, and M. Szegedi. 1975. Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia* 31: 50-52.

Ferenczy L., F. Kevei and M. Szegedi. 1975. High-frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia* 31: 1028-1029.

Ferenczy, L., F. Kevei., M. Szegedi., A. Frankó and I. Rojik. 1976. Factors affecting high-frequency fungal protoplast fusion. *Experientia* 32: 1156-1158.

Ferenczy, L., F. Kevei and M. Szegedi. 1976. Fusion of fungal protoplasts induced by polyethylene glycol. In: *Microbial and plant protoplasts* /Eds./ Peberdy J.F. A. H. Rose., H. J. Rogers., E. C. Cocking. Academic Press, London, New York, San Francisco. p. 177-187.

Ferenczy, L. 1976. Some characteristics of intra- and interspecific protoplast fusion products of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. In: *Cell genetics of higher plants. /Proceedings of an international training course /D. Dudits, G. Farkas P. Maliga /Ed^s/* p. 171-182.

Ferenczy, L., F. Kevei and M. Szegedi. Interspecific protoplast fusion and complementation in *Aspergilli*. *Experientia*. In press.

Giaja, J. 1914. Sur l'action de quelques ferments sur les hydrates de carbon de la levure. *C. r. Séanc. Soc. Biol.* 77: 2-4.

Giaja, J. 1919. Emploi des ferments dans les études de physiologie cellulaire le globule de levure dépouillé de sa membrane. *C. r. Séanc. Soc. Biol.* 82: 719-720.

- Giaja, J. 1922. Sur la levure dépouillé de membrane. C. r. Séanc. Soc. Biol. 86: 708-709.
- Holden, M. and M. V. Tracey. 1950. A study of enzymes that can break down tobacco-leaf components. Biochem. J. 47: 407-417.
- Kao, K. N., Michayluk, M. R. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta /Berlin/ 115: 355-367.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. cell. Biol. 27: 137A-8A.
- Kevei, F. and J.F. Peberdy. 1977. Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. In press.
- Käfer, E. 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. Nature /London/ 186: 619-620.
- Käfer, E. 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics. 46: 1581-1609.
- Necas, O. 1965. Regeneration of yeast cells from naked protoplasts Nature /London/ 177: 898-899.
- Pontecorvo, G. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5: 141-238.
- Pontecorvo, G. 1956. The parasexual cycle in fungi. Ann. Rev. Microbiol. 10: 394-400.

- Raper, B. K. and D. I. Fennell. 1965. In *The genus Aspergillus*. /Ed./ The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. cell. Biol.* 17: 208-12.
- Roper, J. A. 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14-15.
- Roper, J. A. in *The fungi*. 1966. /ed./ G. C. Ainsworth and A. S. Sussman, Academic Press, New York and London, vol. 2. p. 589.
- Tanaka, H. and H. J. Phaff. 1965. Enzymatic hydrolysis of yeast cell walls. *J. Bacteriol.* 89: 1570-1580.
- Villanueva, J. R. 1966. Protoplast of fungi. p. 3-62. In. G. C. Ainsworth, and A. S. Sussman /Eds./, *The fungi*. vol. 2. Academic Press Inc., New York.
- Villanueva, J. R., and I. Garcia-Acha. 1971. Production and use of fungal protoplasts. p. 665-718. In. C. Booth /ed. *Methods in microbiology*. vol. 4. Academic Press Inc., New York.
- de Vries, O. M. H. and J. G. H. Wessels. 1972. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.* 73: 13-22.

Végezetül köszönetet mondok Dr. Ferenczy Lajos tanszékvezető docensnek, Dr. Kevei Ferenc adjunktusnak önzetlen elméleti és gyakorlati tanácsaikért, Pölös Máriának és Forrai Tamásnének a technikai segítségért, Nagy Lajos Gergelynek a foto dokumentáció elkészítésében nyújtott segítségért, valamint a Mikrobiológiai Tanszék többi dolgozójának mert munkámat minden tekintetben támogatták.