B3445

MIKROSZKÓPIKUS GOMBÁK GENOMANALÍZISE PULZÁLTATOTT MEZEJŰ GÉLELEKTROFORÉZIS FELHASZNÁLÁSÁVAL

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

Készítette:

NAGY ÁGNES

József Attila Tudományegyetem

Mikrobiológia Tanszék

Szeged

1996

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS 4

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 5

2.1. A PFGE (PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS) TECHNIKA 5

2.1.1. A genetikai állomány vizsgálatának korlátai a mikroszkópikus gombáknál 5

2.2.2. Kromoszómális DNS molekulák elválasztása pulzáltatott gélelektroforézissel 6

2.2. A PFGE ELVE ÉS MECHANIZMUSA 7

2.3. A PULZÁLTATOTT ELEKTROMOS MEZEJŰ GÉLELEKTROFORETIKUS KÉSZÜLÉKEK BEMUTATÁSA 8

2.3.1. Nem változtatható reorientációs szögű készülékek 8

2.3.1.1. PFGE 8

2.3.1.2. OFAGE 9

2.3.1.3. FIGE 9

2.3.1.4. CHEF 11

2.3.1.5. TAFE 11

2.3.1.6. ZIFE 12

2.3.2. Változtatható reorientációs szögű készülékek 13

2.3.2.1. RGE 13

2.3.2.2. RFG 13

2.3.2.3. PHOGE 14

2.3.2.4. PACE 15

2.4. A KROMOSZÓMÁLIS DNS MOLEKULÁK ELVÁLASZTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK. 15

2.4.1. Pulzusidő 15

2.4.2.Feszültséggradiens 16

2.4.3. Hőmérséklet 16

2.4.4. Agaróz koncentrációja és típusai 17

2.4.5. Reorientációs szög 17

2.4.6. Puffer 18

2.4.7. A futási idő 18

2.5. A KÍSÉRLETEINKBEN FELHASZNÁLT MIKROSZKÓPIKUS GOMBÁK RÖVID JELLEMZÉSE 18

2.5.1. *Claviceps* 18

2.5.2. *Mucor* 19

2.5.3. *Penicillium* 20

2.5.4. *Phaffia* 21

2.6. A MIKROSZKÓPIKUS GOMBÁK KROMOSZÓMA HOSSZ POLIMORFIZMUSA 22

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 27

3.1. VIZSGÁLT MIKROORGANIZMUSOK 27

3.2. TÁPKÖZEGEK 28

3.3. KROMOSZÓMÁLIS DNS MINTA KÉSZÍTÉSE 29

3.3.1. Protoplasztképzés 29

3.3.2. Agarózblokk készítés 29

3.3.3. *In situ* protoplasztképzés 30

3.4. ELEKTROFORÉZIS 30

3.4.1. Agaróz 30

3.4.2. Puffer 30

3.4.3. Készülékek 31

3.5. FESTÉS ÉS FÉNYKÉPEZÉS 31

3.6. HIBRIDIZÁLÁS 31

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS 32

4.1. AZ INTAKT KROMOSZÓMÁLIS DNS IZOLÁLÁSÁNAK OPTIMALIZÁLÁSA 32

4.2. *IN SITU* ELJÁRÁS KIDOLGOZÁSA KROMOSZÓMÁLIS DNS KINYERÉSÉRE 32

4.3. A SZEPARÁLÓ GÉLMÁTRIX KÉSZÍTÉSÉHEZ HASZNÁLHATÓ AGARÓZTÍPUSOK VIZSGÁLATA 38

4.4. ELEKTROFORETIKUS KARIOTÍPUSOK MEGHATÁROZÁSA PULZÁLTATOTT GÉLELEKTROFORÉZISSEL 40

4.4.1. Markerként használt törzsek elektroforetikus kariotípusa 40

4.4.2. A *Phaffia rhodozyma* elektroforetikus kariotípusa 40

4.4.3. *Claviceps* fajok elektroforetikus kariotípusa 54

4.4.4. *Mucor* fajok elektroforetikus kariotípusa 55

4.4.5. *Penicillium* fajok elektroforetikus kariotípusa 64

4.5. A PROTOPLASZTFÚZIÓVAL LÉTREHOZOTT HIBRIDEK PFGE ANALÍZISE 69

5. ÖSSZEFOGLALÁS 73

6. IRODALOMJEGYZÉK 75

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 86

1. BEVEZETÉS

A kutatási program során, az elektroforetikus kariotipizálás segítségével, a magi kromoszómális állomány jellemzését végeztük el, továbbá a fajon belüli kromoszóma polimorfizmus (CLP) jellegét és mértékét vizsgáltuk néhány mikroszkópikus gomba esetében. A kísérletekbe olyan nemzetségek (*Aspergillus*, *Claviceps*, *Mucor*, *Penicillium* és *Phaffia*) képviselőit vontuk be, amelyek mind az elméleti kutatás, mind a gyakorlati felhasználás szempontjából fontosak. A rendszertanilag és sejtszerveződést tekintve is igen eltérő fajokkal elvégzett kísérleti munka bizonyította, hogy a pulzáltatott mezejű gélelektroforézis hatékonyan alkalmazható eljárás különböző mikroszkópikus gombák genetikai vizsgálataiban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A PFGE (PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS) TECHNIKA

2.1.1. A genetikai állomány vizsgálatának korlátai mikroszkópikus gombáknál.

A mikroszkópikus gombák esetében a genetikai analízis egyik alapfeltétele a könnyen alkalmazható genetikai markerek megléte. Klasszikus genetikai markerekkel (legtöbbször auxotrófia és rezisztencia marker) jelölt szervezetek alkalmazásával lehetőség nyílik különböző genetikai felépítésű gombatörzsek keresztezésére, hibridek, illetve rekombináns törzsek előállítására (Peberdy, 1985). Ez a megközelítés, számos esetben járult hozzá elméleti, vagy gyakorlati szempontból fontos gombatörzsek genetikai állományának megismeréséhez. Az ilyen markerek (mutációk) bevitele, elsősorban az ipari törzsek jelentős részében előnytelen (Ball, 1985). További akadálya lehet a klasszikus genetikai elemzésnek a szexuális ciklus hiánya is.

A genom analízis egy másik, a magasabbrendű eukariota sejtek esetében jól bevált módszere a kondenzált kromoszómák fénymikroszkópos vizsgálata. A gombák esetében a kisméretű metafázisos kromoszómák megnehezítik az ilyen citológiai kariotípus meghatározást (Mills és McCluskey, 1990). A kromoszómák számának és nagyságának precíz meghatározását az elektronmikroszkópos vizsgálatok sem biztosítják (Carle és Olson, 1985).

Mindezen korlátok eredményeként, a 80-as évekig csak néhány, a genetikai alapkutatásban intenzíven vizsgált gombafaj esetében állt rendelkezésre érdemi információ a genetikai állomány szerveződéséről. Ez a helyzet a PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis, a továbbiakban: PFGE; Schwartz és mtsi., 1982) megjelenésével drámaian megváltozott. Először vált lehetővé a gombasejt kromoszómális állományának közvetlen tanulmányozása.

2.1.2. Kromoszómális DNS molekulák elválasztása pulzáltatott gélelektroforézissel.

A 80-as évekig az egyedül alkalmazható DNS gélelektroforetikus módszer a hagyományos gélelektroforézis volt, amely viszonylag kisméretű DNS fragmentek elválasztását tette csak lehetővé (Cantor és mtsi., 1988; Heller és Pohl 1989). Ezen rendszerben a gélmatrix méret szerinti szeparáló képessége csak egy bizonyos molekulaméretig érvényesül. A kritikus küszöbértéknél (20 kb) nagyobb DNS molekuláknak már torzulniuk kell ahhoz, hogy a gélpórusokba beférhessenek, melynek következményeként az elektromos erőtér hatására megnyúlt molekulák nagyságtól függetlenül azonos sebességgel fognak vándorolni (Carle és mtsi., 1986; Lai és mtsi., 1989).

Az intakt kromoszómális DNS molekulák gélelektroforetikus elválasztásának ötlete már a 70-es évek végén megszületett (Fangman, 1978). Ezekben a korai kísérletekben az agarózkoncentráció, illetve a feszültséggradiens csökkentésével próbálták a gélelektroforetikus elválasztás hatékonyságát növelni. Több technikai problémát azonban nem sikerült kiküszöbölni: a gélben a DNS molekulák csak nagyon lassan haladtak, zavaró sáveltolódások jöttek létre, továbbá a 0,4%-nál alacsonyabb koncentrációjú gélek (0,1% - 0,2%) rendkívül képlékenyek, s emiatt nehezen kezelhetők voltak. Ugyanakkor, a különböző módosítások ellenére, a hagyományos gélelektroforézis néhány száz kilobázispárnál nagyobb DNS molekulák elválasztására nem alkalmas (Lai és mtsi., 1989).

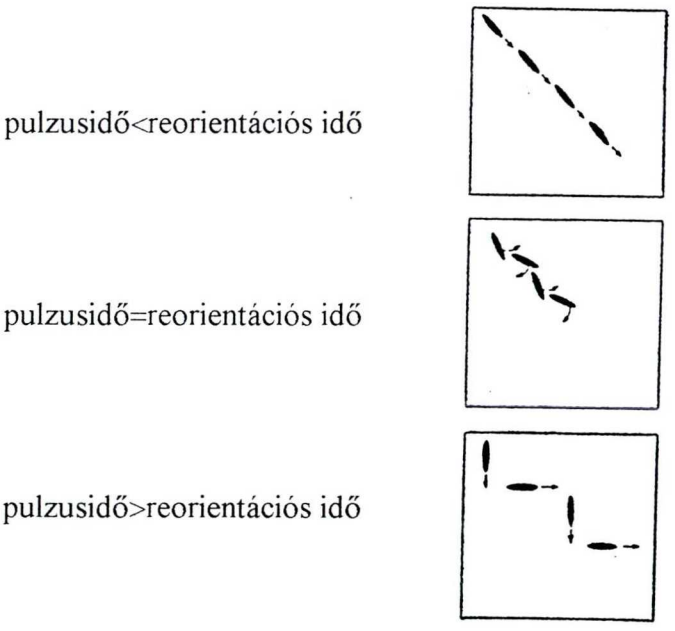
A PFGE technika megalapozói közé tartozik Klotz és Zimm (Klotz és Zimm, 1972), akik az általuk kidolgozott viszkoelasztikus technikával kimutatták, hogy az elektromos tér okozta feszültséggradiens hatására a DNS molekula eltorzul, megváltoztatja konformációját, majd az erőtér kikapcsolása után visszatér eredeti állapotába. Bizonyították, hogy egy bizonyos molekulanagyságon túl a DNS viszkoelasztikus relaxációs ideje arányos a molekulasúllyal.

A DNS konformáció megváltozásának és molekulasúly függő relaxációjának felismerése tette lehetővé annak az elválasztási technikának a kifejlesztését, melyet a 80-

-as évek elején Schwartz és munkatársai dolgoztak ki. A pulzáltatott mezejű gélelektroforézis (PFGE Pulsed Field Gel Electrophoresis) utat nyitott a rendkívül nagyméretű DNS molekulák elválasztásához, és közvetlenül vizsgálhatóvá váltak az eukarióták kromoszómális DNS készletei. (Dixon és Kinghorn, 1990).

2.2. A PFGE ELVE ÉS MECHANIZMUSA

Ezen eljárás lényege, hogy két, egymást váltó és egymással szöget bezáró elektromos tér hatására a töltéssel rendelkező DNS molekulák állandó orientálódásra és reorientálódásra kényszerülnek a vándorlásuk folyamán. Azt az időt, amely alatt egy adott irányú mező aktív, pulzusidőnek nevezzük (Smith és mtsi., 1988).



1. ábra. A DNS-vándorlás sematikus ábrázolása alternáló elektromos tér hatására (Smith és mtsi., 1986)

Minél nagyobb az elválasztandó DNS molekula, annál nagyobb a konformációváltozáshoz szükséges idő (Birren és Lai, 1993). A kisebb DNS molekulák tehát gyorsabban alkalmazkodnak a megváltozott elektromos térirányhoz és ezért gyorsabban haladnak mint a nagyobbak (Schwartz és Koval, 1989; Deutsch, 1988). A

kisebb molekulák ezen mobilitásbeli előnyéből következően, (feltéve, hogy a DNS molekulák konfiguráció változásaihoz szükséges idő rövidebb, mint a pulzusidő hossza) a DNS molekulák nagyság szerint elválnak (1. ábra).

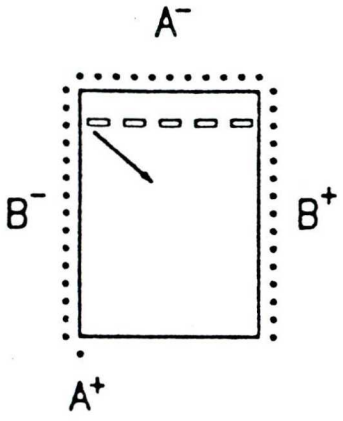
2.3. A PULZÁLTATOTT ELEKTROMOS MEZEJŰ GÉLELEKTROFORETIKUS KÉSZÜLÉKEK BEMUTATÁSA

A PFGE elvének gyakorlati megvalósítására több technikai megoldást is kidolgoztak; így például az OFAGE (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis; Carle és Olson, 1984), a FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis; Carle és mtsi. 1986) a CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field; Chu és mtsi. 1986), a TAFE (Transverse Alternating Field Electrophoresis; Gardiner és mtsi., 1986), a RFG (Rotating Field Gel Electrophoresis, Ziegler és mtsi., 1987), vagy a PACE (Programmable Autonomously Controlled Electrode; Clark és mtsi., 1988) rendszert. Lényegében valamennyi PFGE készülék az eredeti elektródgeometria valamilyen módosításával jött létre.

2.3.1. Nem változtatható reorientációs szögű készülékek

2.3.1.1. PFGE (Schwartz és Cantor, 1984)

Két elektromos erőtérből áll: egy katódsor és egy pontanód létrehozta inhomogén elektromos térből és egy katód- illetve anódsor előidézte homogén elektromos erőtérből. A módszer a gélelektroforézissel történő elválaszthatóság mértékét mintegy 40-szeresre növelte. A képződött sávok kvantitatív kiértékelése a sávok elhajlása miatt azonban nehézkes (2. ábra).



2. ábra. A PFG felépítésének vázlata

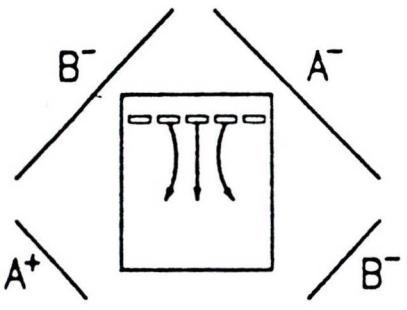
2.3.1.2. OFAGE (Carle és Olson, 1984)

Az OFAGE két hosszú platínium katódból és két rövid anódból álló, két inhomogén elektromos erőteret létrehozó készülék (3. ábra). Ez a felépítés az egyes futási sávok összehasonlíthatóságán javított, de a kiértékelés továbbra is nehézkes maradt. (Carle és Olson eredetileg úgy vélték, hogy az elválasztáshoz inhomogén erőtér kell.) Az elektromos erőtér inhomogenitása és a reorientációs szög változása miatt azonban a DNS molekulák különböző sebességgel mozdulnak el a gélben, mely a futási sávok torzulását okozza. A sávok különböző mértékű elhajlása lehetetlenné teszi a méretek pontos meghatározását.

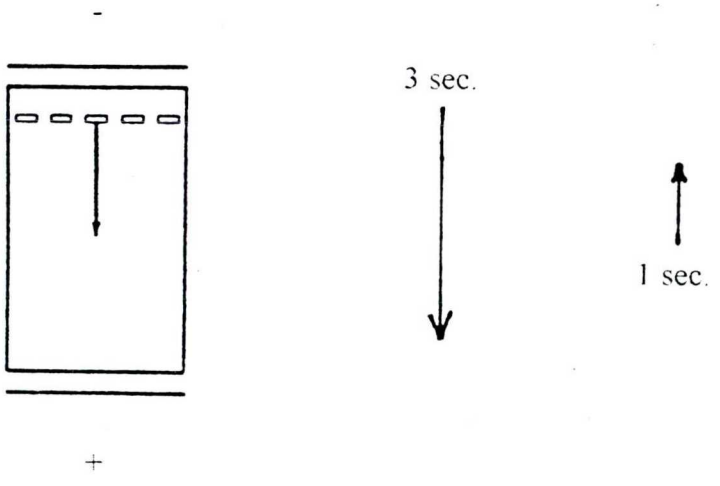
2.3.1.3. FIGE (Carle, Frank és Olson, 1986)

Ez a technika igazolta, hogy a kromoszómális méretű DNS molekulák elválasztásához nem szükséges az inhomogén erőtér. A FIGE elektroforetikus berendezésnél (4. ábra), mely 20 kb és 750 kb közötti molekulasúly tartományban alkalmazható igen jól, a 180°-os reorientációs szöget az elektromos mező megfordításával egyetlen elektródpár hozza létre (Roy és mts. 1988). Az előreható

pulzus kb. háromszor hosszabb időtartamú, mint a visszafelé ható pulzus (Heller és Pohl, 1989) (4. ábra). Ugyanakkor a FIGE nagy hátránya, hogy a DNS molekula mérete nem határozza meg egyértelműen a gélben történő elmozdulás mértékét, azaz teljesen különböző méretű molekulák gyakran azonos pozícióba vándorolnak (Carle, 1992).



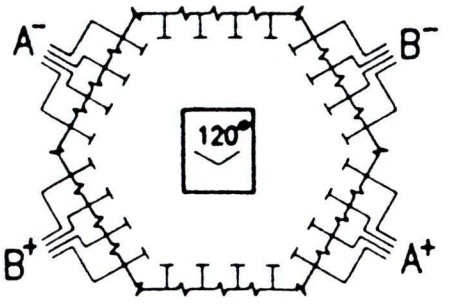
3. ábra. Az OFAGE felépítésének vázlata



4. ábra. A FIGE felépítésének vázlata

2.3.1.4. CHEF (Chu, Vollrath és Davis, 1986)

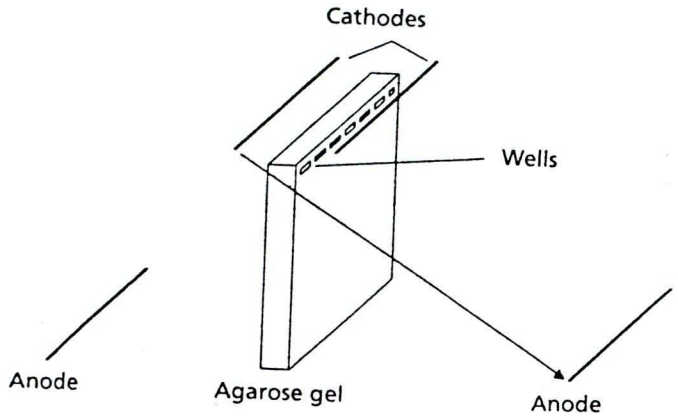
A CHEF rendszer esetében (5. ábra) a hexagonálisan elhelyezkedő 24 elektróda két szigorúan homogén elektromos erőteret hoz létre, amelyek 120°-os szögben váltakoznak. A CHEF alkalmas mintegy 80 kb-tól a 12-13 Mb-ig terjedő molekulasúly tartományba eső DNS molekulák elválasztására (Orbach és mtsi., 1988). A homogén elektromos erőtér hatására kialakuló párhuzamos futási sávok pontos kiértékelést tesznek lehetővé (Cantor és mts.1988).



5. ábra. A CHEF felépítésének vázlata

2.3.1.5. TAFE (Gardiner, Laas és Patterson, 1986)

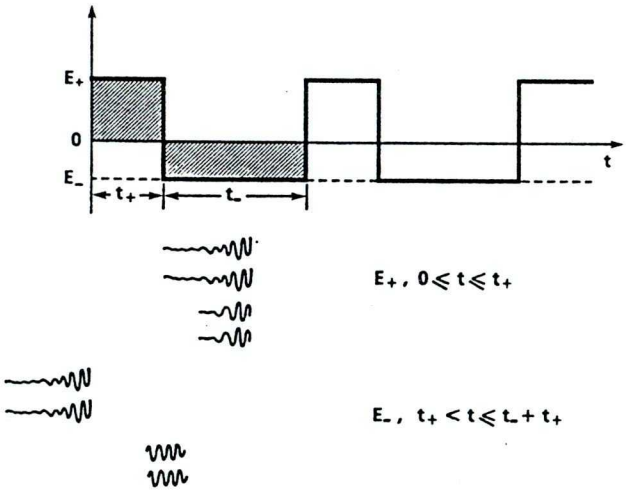
A többi PFGE módszerrel ellentétben a gél függőlegesen helyezkedik el az elektródpárok között (6. ábra). Az elválasztásnál a gél vastagsága játszik döntő szerepet, míg a gél hosszúsága nem befolyásoló tényező. Felhasználásával, az alkalmazott pulzusidőtől függően (1 s - 90 min), 2-9000 kb nagyságú DNS molekulák választhatók szét (Stewart és mtsi., 1988). A gél hosszában sem a reorientációs szög, sem az elektromos térerő nem állandó. A reorientációs szög a gél tetejétől az aljáig 115° - 165° - ig változik, míg a térerő ugyanilyen irányban csökken (Gardiner, 1992). A reorientációs szög és az elektromos térerő változása a DNS molekulák változó sebességű elmozdulását idézi elő, mely azonban éles sáv elválást és jó felbonthatóságot ad (Ferris és mtsi., 1989).



6. ábra. A TAFE felépítésének vázlata

2.3.1.6. ZIFE (Turmel, Brassard, Slater és Noolandi, 1990)

A FIGE elektroforetikus rendszer módosítása a ZIFE. Elmozdulás úgy jön létre, hogy a visszafelé ható elektromos erőtérnél alkalmazott kisebb feszültséggradiens és a hosszabb futási idő, valamint az előreható feszültség és pulzus idő szorzata közelítőleg egyforma (Noolandi és Turmel 1992) (7. ábra). Maximális felbontást akkor kapunk, amikor az előreható és a visszaható feszültség × pulzus idő aránya 1, vagy ennél nagyobb. A standard FIGE technikával összehasonlítva a ZIFE rendszert a minimális sáv-inverzió és az élesebb sávfelbontás jellemzi.

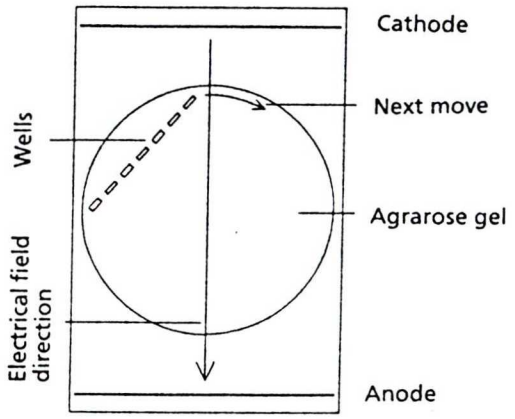


7. ábra. A ZIFE rendszer elektromos pulzusa.

2.3.2. VÁLTOZTATHATÓ REORIENTÁCIÓS SZÖGŰ KÉSZÜLÉKEK

2.3.2.1. RGE (Southern, Anand, Brown és Fletcher, 1987; Serwer, 1987)

A készülékben elhelyezkedő elektródpárok közötti szög változtatható. Az elválasztás során a gélt ebben a szabadon választható szögben periódikusan elforgatják (8. ábra). A gél forgatási frekvenciájának variálásával elsősorban az 50-7000 Kb közötti molekulák választhatók el jól (Lai és mts. 1989). A módszer hátránya, hogy a stabilitási követelmények miatt a gélforgató tálon 1%-nál kisebb koncentrációjú gélek nem használhatók (Eby, 1990), továbbá, hogy a szög és a pulzusidő csak manuálisan állítható és a mechanikus átfordulás is időveszteséggel jár.



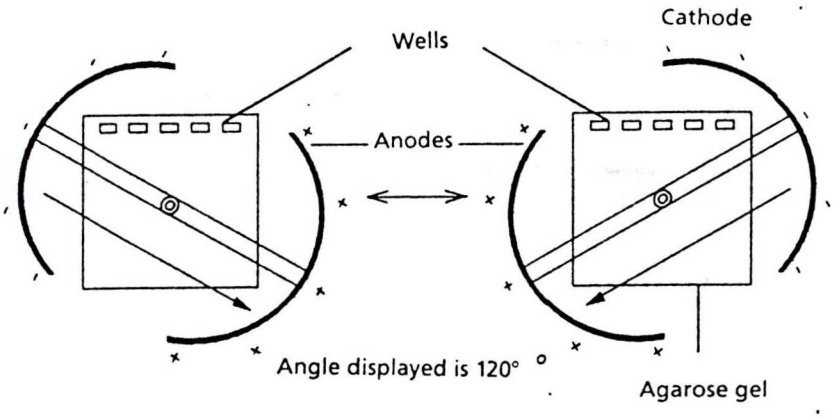
8. ábra. Az RGE felépítésének vázlata

2.3.2.2. RFG (Ziegler és mtsi., 1987)

A homogén erőteret létrehozó elektródpárok nem helyhez kötöttek, hanem mechanikailag szabadon mozgathatók (9. ábra). A Rotaphor® néven ismert készülék (Biometra, Németország) például 90° és 225° közötti szögtartományt képes átfogni (Ziegler és Voltz, 1992). Az elektródpárok közötti szög változtatása lehetővé teszi a nagyméretű DNS molekulák gyorsabb és kitűnő felbontást eredményező elválasztását. A Rotaphor® hatékonysága igazolja azt a felismerést, hogy a PFGE elválasztás egyik legjelentősebb befolyásoló tényezője a reorientációs szög (Birren és mtsi., 1988): 95°-nál

József Attila Tudományegyetem SZEGED

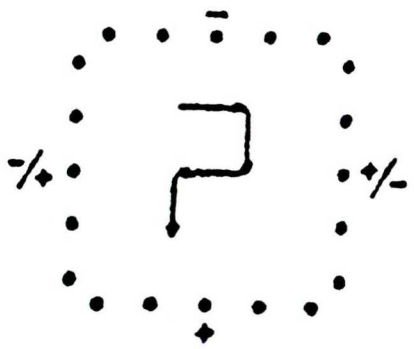
kisebb szögben a DNS molekulák nem válnak el; 95°-nál a DNS molekulák gyorsan haladnak a gélben, de nem adnak éles sávot; 160°-nál viszont a sávok nagyon élesek, de a vándorlás túl lassú. Optimális paraméterezéshez ezért fix szögbeállításnál 120°-t, míg szögalternáló futásnál 100°-tól 130°-ig változó szöget célszerű alkalmazni (Ziegler és Volz, 1992).



9. ábra. A RFG felépítésének vázlata

2.3.2.3. PHOGE (Bancroft és Wolk, 1988)

Ebben a kevésbé elterjedt rendszerben az elektromos tér inverziójával és pulzáltatásával a DNS molekulák ciklusonként négyszer reorientálódnak 90°-os szögben (10. ábra).



10. ábra. A PHOGE felépítésének vázlata

2.3.2.4. PACE (Clark, Lai, Birren és Hood, 1988)

A futtatás minden paraméterének külön beállíthatósága és pontos ellenőrzése adja a PACE rendszer flexibilitását (Lai és mtsi., 1989), amely gyakorlatilag korlátlan számú, homogenitású, feszültségű, orientációjú, illetve időtartamú elektromos tér létrehozására alkalmas. A CHEF rendszerrel ellentétben, az egyes elektródokon fellépő feszültség számítógép segítségével egymástól függetlenül szabályozható. Az így kialakult elektromos erőtér nagyságát az egyes elektródok feszültségeinek összege határozza meg. Optimális esetben az elválasztás valamennyi paramétere, köztük a reorientációs szög is változtatható, ami a 8-10 Mb-nál nagyobb kromoszómális DNS-ek elválasztását is lehetővé teszi. A rendszer nagy hátránya a bonyolult hardware rendszer miatti magas ár.

2.4 A KROMOSZÓMÁLIS DNS MOLEKULÁK ELVÁLASZTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

2.4.1. Pulzusidő

Schwartz és Cantor már 1984-ben felismerte, hogy ez az egyik legfontosabb tényező, amely a DNS molekulák szétválását befolyásolja. Egyszerűsítve: minél nagyobb a szeparálandó DNS molekula, annál nagyobb pulzusidőt kell alkalmazni. A FIGE-nél jelentkezett először a "switching time ramping" (röviden "ramping" = rámpa) fogalma (Carle és mtsi., 1986). A "rámpa" folytonosan (lineárisan vagy, logaritmikusan) emelkedő pulzusintervallumok sorozata, amely így a kisebb és a nagyobb DNS molekulák egyidejű elválasztását is lehetővé teszi. A pulzusidő minimális változtatása jelentős különbségeket hoz létre a DNS molekulák elmozdulásában (Vollrath és Davis, 1987). Rövidebb pulzusok megkönnyítik a DNS kilépését az agaróz blokkból a gélbe (Gunderson és Chu, 1991): ugyanezt a jelenséget tapasztalták a megnövelt térerősség esetében is.

2.4.2. Feszültséggradiens

A feszültséggradiens az elektródpárok között fellépő potenciálkülönbség, mely a gélben a DNS molekulák elmozdulását eredményezi. Az elektroforézis során a feszültség változtatásával nemcsak az elmozdulás mértékét, hanem a molekulák elválaszthatóságát is befolyásoljuk. Például a térerősség kétszeresre emelése négyszeresre növeli a vándorlási sebességet (Gunderson és Chu, 1991), vagy a fokozatosan emelkedő feszültségrámpák elősegíthetik a DNS molekulák egymástól történő szétválását (Smith és Cantor 1987). Lényeges azonban, hogy optimális elkülönülést csak a pulzusidő és a feszültséggradiens harmonikus összehangolása biztosíthat, amit "effective switching time"-nak nevezünk (Smith és mtsi., 1987). Alacsonyabb feszültség élesebb sávokat eredményez (Smith és mtsi., 1988), de összehasonlítható felbontást csak hosszabb pulzusidővel történő együttes alkalmazáskor kaphatunk. Az elválasztandó DNS molekulák mérettartománya megszabja az alkalmazható feszültséget (Birren és mtsi., 1988), ugyanis minél nagyobb a DNS molekula annál kisebb feszültséggradiens biztosít megfelelő elválasztást.

2.4.3. Hőmérséklet

A hőmérsékletet növelve csökken a puffer viszkozitása, melynek következtében megnő a DNS vándorlási sebessége (Serwer, 1987). Azonban, 34°C-nál magasabb hőmérsékleten a sávok diffúzzá válnak és élességük számottevően csökken (Birren és Lai, 1993). Mivel a DNS molekulák a hőmérséklettől függően különböző sebességgel mozdulnak el a gélben, a megfelelő elválasztáshoz mind a pulzusidőt és a feszültséggradienst, mind a puffer ionerősségét is módosítani kell. Magasabb hőmérséklet mellett rövidebb pulzusidő, kisebb feszültséggradiens és alacsonyabb ionerősség szükséges az azonos mértékű elmozduláshoz.

2.4.4 Agaróz koncentrációja és típusai

Az agarózkoncentráció növelése csökkenti a DNS molekulák vándorlási sebességét, ugyanakkor a pórusméret csökkenése jelentősen növeli a sávok élességét. Ezért az alkalmazott gélkoncentrációt mindig az elválasztandó DNS molekulák mérettartományának megfelelően kell megválasztanunk (Smith és mtsi., 1986). Általában nem célszerű a hőmérséklet emelésével és az agarózkoncentráció csökkentésével a vándorlási sebességet növelni. Az alkalmazott agaróz minősége, úgymint húzószilárdsága, töltéssel rendelkező alkotóelemeinek száma (EEO), valamint az agaróz tisztasága szintén nagy jelentőséggel bír (Cantor és mtsi., 1988). A nagyobb húzószilárdságú gél könnyebben kezelhető, az alacsony EEO-ú agarózból készült gélben a DNS gyorsabban fut mint a magas EEO értékűben (Lai és mtsi. 1989), az agarózban lévő szennyeződések pedig a DNS degradációját eredményezhetik. A 2.5 Mb-nál kisebb DNS molekulák elválasztásához bármely alacsony EEO-ú agaróz jól használható, míg az ennél nagyobb DNS molekulák szeparálásához, a futási időt jelentősen csökkentő, a PFGE technikákhoz ajánlott, speciális agaróz használható.

2.4.5. Reorientációs szög

Kisebb reorientációs szög alkalmazásával a futási időt jelentősen megrövidíthetjük (Biren és Lai, 1993). Ha a reorientációs szöget 120°-ról 96°-ra csökkentjük, a *Schizosaccharomyces pombe* (*Sch. pombe*) kromoszómális DNS molekulák 72 h helyett már 24 h alatt szeparálódnak (Lai és mtsi., 1989). Azokban a gélekben, ahol a reorientációs szög fokozatosan nő, a DNS molekulák vándorlási sebessége fokozatosan csökken. Az ilyen készülékek a változatlan reorientációs szögű rendszerekhez viszonyítva élesebb sávelválást és közelebb elhelyezkedő sávokat eredményeznek (Vollrath és Davis, 1987).

2.4.6. Puffer

A puffer összetételének és koncentrációjának változása az elektroforézis során, a DNS molekulák mobilitásbeli változását eredményezi. Alacsony ionerősségű puffereknél (pl. 0.5 x TAE, 0.5 x TBE) megnő a DNS vándorlási sebessége (Birren és Lai, 1993), ugyanakkor a fellépő pufferkapacitás csökkenés a puffer kimerülését, ezáltal az elválasztás hatékonyságának csökkenését eredményezi. A TAE pufferben a DNS fragmentek valamivel gyorsabban futnak mint TBE-ben, de a TAE-t, a puffer gyors kimerülése miatt sokkal gyakrabban kell cserélni.

2.4.7. A futási idő

Hangsúlyoznunk kell, hogy a pulzusidő hossza sokkal jobban befolyásolja az elválasztás mértékét, mint a futási idő, ugyanis a hosszabb futási idő csak növeli az egyébként is szétvált DNS molekulák között a távolságot, de nem segíti a felviteli helyhez közeleső szeparálatlan DNS fragmentek elválását. A puffer ionerősségének csökkentése (100-ról 40 mM-ra) a futási időt 160-ról 76 órára csökkenti (Eby, 1990) az előző pontban említett következmények mellett (2.4.6.).

2.5. A KÍSÉRLETEINKBEN FELHASZNÁLT MIKROSZKÓPIKUS GOMBÁK RÖVID JELLEMZÉSE

2.5.1. *Claviceps*

A *Claviceps* nemzetség tagjai rozson vagy egyéb gabonán élősködő, gyógyászati szempontból jelentős anyarozs-alkaloidokat (Rehácek, 1982) termelő fajok. Az indol-alkaloidok közé tartozó anyarozs-alkaloidok két formája különböztethető meg; az ergolinváz alapszerkezetű klavin-alkaloidok, és a lizergsav-alkaloidok: ez utóbbiakhoz tartozik a D-lizergsav és ennek sztereoizomerje, amely lényegében egy amidkötéssel

triciklikus peptidhez vagy egy aminoalkoholhoz kapcsolodó D-izolizergsav (Bianchi és mtsi., 1982).

A középkorban viszonylag sűrűn fellépő anyarozs-mérgezéseket (ergotizmus), a kenyérbe sütött anyarozstartalmú gabonamagvak okozták. Akut formában görcsöket, hányást, üszkösödő sebeket ("Szent Antal tüze") idéztek elő, míg súlyosabb esetben a betegségek halállal végződtek.

Napjaink gyógyászatában igen széleskörű a lizergsav-alkaloidok terápiás felhasználása (Esser és Düvell, 1984). Vajúdást segítő, méhösszehúzó hatásuk miatt jól használhatók a szülés segítésére; ugyanakkor ismertek olyan származékaik is, melyek csökkentik a simaizmok összehúzódását. A perifériás és a központi keringési zavarok gyógyítására és a migrén ellen is hatásosak. Megemlítendő, hogy a lizergsav-dietil-amid (LSD) az egyik legismertebb hallucinogén.

Az anyarozs-alkaloidokat kezdetben a parazita gombák szkleróciumaiból vonták ki (Esser és Tudzynski, 1978), míg napjainkban egyre jelentősebbé válik a szaprofita körülmények között történő alkaloidtermeltetés. A *Claviceps* szubmerz kultúrában a klavinok és egyszerű lizergsav-származékok kiválasztódnak, míg a peptid-alkaloidok túlnyomóan a micéliumban kötve maradnak (Bianchi és mtsi., 1982). A fermentációs körülmények optimalizálásával és intenzív törzsnemesítéssel (Pertot és mtsi., 1990) jelentősen fokozták a kivonható alkaloidok mennyiségét. A nagy termelőképességű törzsek gyakori degradálódása miatt a biztonságos alkaloidtermelés előfeltétele a gondos törzsfenntartás, valamint a jobb termelőképességű variánsok izolálása. Ez utóbbi vagy a hagyományos mutációs és a szelekciós módszerrel (Keller, 1983, Schumann és mtsi., 1987), vagy (az ivaros szaporodási fázis hiánya miatt) a protoplasztfúzió alkalmazásával történhet (Spalla és Marnati, 1982).

2.5.2. *Mucor*

A *Mucor* nemzetség tagjai elterjedt, elsősorban a talajból izolálható szaprofita gombák; az ismert *Mucor* fajok száma meghaladja a 60-at. Ezen gombák gyakran

vizsgált modell szervezetek, elsősorban különböző szabályzó mechanizmusok, szexuális folyamatok, vagy a gomba morfogenezis tanulmányozásakor (Orlowski, 1991). Közöttük számos orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk. Orvosi területen ezek a gombák, mint a mukormikózist okozó opportunista patogének érdemelnek figyelmet. Emberi és állati megbetegedést néhány mezofil *Mucor* pl. *M. ramossisimus*, *M. albo-ater*, illetve gyakrabban a termofil *Mucor* (*Rhizomucor*) fajok válthatnak ki. A mukormikózis viszonylag ritka, de igen nehezen kezelhető betegség (Whiteway és mtsi., 1979). Egyes *Mucor* törzsek jó extracelluláris enzimtermelők: amilázt, cellulázokat, észterázokat és lipázokat termelnek (Godtfredsen, 1990). Mások a szteroidvázas vegyületek mikrobiális transzformációjára képesek; sztereospecifikus hidroxilálóként kerülnek gyógyszeripari felhasználásra (Hogg, 1992). Nem elhanyagolható a szerepük egyes élelmiszeripari termékek (Devoyod, 1988), vagy különböző növényi eredetű mezőgazdasági termények károsításában. A *Mucor* fajok elsősorban alacsony hőmérséketen tárolt lédús terményeknél, mint másodlagos raktári kártevők képesek kártételre (Michailides, 1991). Az alkalmanként előforduló *M. circinelloides*, *M. fragilis*, *M. hiemalis*, *M. racemosus* és *M. strictus* mellett, elsősorban a *M. mucedo* és a *M. piriformis* azonosítható ilyen esetekben. Figyelembe véve az előfordulás gyakoriságát és a kártétel nagyságát, kiemelkedő fontosságúnak tekinthetők a *M. piriformis* okozta fertőzések (Michailides és Spotts, 1990).

2.5.3. *Penicillium*

A *Penicillium* nemzetség, az *Aspergillus*hoz hasonlóan, rendkívül nagy fajszámú, az egész világon elterjedt nemzetség (Alexopoullos és mtsi., 1996). Képviselői talajokban, valamint különböző szerves szubsztrátokon egyaránt megtalálhatók (Crackower és Bauer, 1971). Kiemelkedő gyakorlati fontossággal bírnak: egyes fajok olyan extracelluláris enzimeket termelnek, amelyek bizonyos sajtfélék (pl: Roquefort, Camember) vagy szalámifélék érésében működnek közre (Stepaniak és mtsi., 1980). Más esetekben ugyanakkor jelentős károkat okozhatnak tárolt termések (pl: citrusfélék, alma)

rothadási folyamataival, de megtalálhatók még lekváron, kenyéren, húson és egyéb élelmiszereken is. A szerves anyagok lebontásában is fontos szerepet játszanak bizonyos extracelluláris enzimjeik (celluláz komplex) révén (Hamlyn és mtsi., 1982).

A *Penicillium* fajok megbetegedéseket is kiválthatnak különböző mikotoxinok képzésével (citreoviridin, loliterm, penitrén, patulin, verrukologén), (Gallagher és Latch, 1977, Wilson és mtsi., 1968).

Egyes *Penicillium* fajok, így például a *P. notatum* és *P. chrysogenum,* penicillin termelők (Normansell és mtsi., 1979), míg a *P. griseofulvum* az antifungális griseofulvin (Harris és mtsi., 1976) termelésére képes.

2.5.4. *Phaffia*

A *Phaffia rhodozyma* (*Rhodomyces dendrorhous*) élesztőgombát először alaszkai, és Japán északi részéről származó mintákból izolálták (Miller és mtsi., 1976). Számos indirekt bizonyíték halmozódott fel, hogy ez a mikroszkópikus gomba a *Basidiomycetes* osztályba sorolható; ezek közé tartozik például a karotenoid szintetizáló és az urea hasznosító képesség, továbbá az inozitol hasznosításának hiánya, továbbá a sejtfal jellegzetes szerkezete (Yamada és mtsi., 1990). Számos vizsgálat próbálta feltárni a *Phaffia* nemzetség és más bazídiumos élesztők rokonsági kapcsolatait is. Elsősorban a sejfal szénhidrát komponenseinek vizsgálatára alapozott kemotaxonómiai elemzések sugallták azt, hogy a legszorosabb taxonómiai kapcsolat a *Cryptococcus* génusszal áll fenn (Weijman és mtsi., 1988); ugyanakkor a két nemzetség egyértelműen elkülöníthető a 18S és 26S rRNS szekvencia vizsgálatok alapján (Yamada és mtsi., 1990). A közvetett bizonyítékok után, a közelmúltban sikerült laboratóriumi körülmények között, kísérleti úton is bizonyítani, hogy ez az élesztő a *Basidiomycetes*be tartozik (Golubev, 1995); a bazídiumképzést poliol tartalmú táptalajon sikerült indukálni.

A *P. rhodozyma* iránti növekvő érdeklődés elsődleges oka, hogy a mikroszkópikus gombák között egyedülálló módon, fő színanyagként asztaxantint (3,3′-dihidroxi-4,4′ dioxo-β-karotin) szintetizál (Andrewes és mtsi., 1976). Ez a vegyület a természetben

viszonylag ritkán előforduló pigment; bár néhány édesvízi, illetve tengeri algában is megtalálható. A mikroszervezeteken kívül egyes madarakban, rákokban, pisztrángban és lazacban fordul elő. Az asztaxantin gazdasági jelentősége ez utóbbi előfordulással kapcsolatos. A mesterséges körülmények között nevelt lazac évi mennyisége ma már több mint 200.000 tonna (An, és Johnson 1990), amelynek nélkülözhetetlen, ugyanakkor a legdrágább takarmánykiegészítője az asztaxantin. Bár szintetikusan is előállítható, de rendkívül drágán; ráadásul a fogyasztói elvárásoknak jobban megfelel egy természetes eredetű színezőanyag. Az asztaxantin igen jó antioxidáns tulajdonsága (Schroeder és Johnson, 1993), tovább fokozza a vegyület iránti érdeklődést. Mivel a vad típusú *P. rhodozyma* törzsek asztaxantin tartalma alacsony (200-300μg asztaxantin/g szárazanyag, An és Johnson, 1990), igen nagy az igény a pigmenttermelés fokozására, amely a gazdaságosabb előállítás előfeltétele. Az eddigi kísérletek legfőbb akadálya a *P. rhodozyma* teljesen ismeretlen genetikai háttere volt. A pigmenttartalom emelését egyaránt megkísérelték mutagén kezeléssel és szelekcióval (Adrio és mtsi., 1993; An és mtsi., 1991), valamint protoplasztfúzióval (Chun és mtsi., 1992), de ezek a próbálkozások a korábban említett okok folytán nem hozhatták meg a várt eredményt. Munkánk eredményeként, laboratóriumunkban sikerült először megbízható adatokat kapnunk a *P. rhodozyma* faj genetikai állományáról (Nagy és mtsi., 1994).

2.6. A MIKROSZKÓPIKUS GOMBÁK KROMOSZÓMA HOSSZ POLIMORFIZMUSA (CLP)

Egy gombataxont reprezentáló törzsek genetikai állománya szükségszerűen kisebb, vagy nagyobb mértékben eltérő (McCluskey és Mills, 1990, Skinner és mtsi., 1991). Ennek oka elsősorban azokban a spontán mutációs eseményekben keresendő, amelyek minden örökítőanyagban lejátszódnak. Ilyen mutációs esemény például a kromoszómák strukturális mutációja, amely nem mindig kapcsolódik fenotípusos változáshoz; ez ugyanakkor az elektroforetikus kariotípus vizsgálatával könnyen kimutatható lehet (Bidenne és mtsi., 1992; Ono és Ishino-Arao, 1988).

A kromoszómális szerkezeti átrendeződések egyaránt lehetnek interkromoszómális, vagy intrakromoszómális jellegűek. Többféle kromoszóma átrendeződési esemény vezethet a CLP kialakulásához (Zolan, 1995). Lehetnek olyan intrakromoszómális események, melyek során az azonos orientációban lévő ismétlődő szekvenciák rekombinációja delécióhoz, illetve egyenlőtlen kromoszómacseréhez vezet. A kromoszómatörés ugyanakkor rövidülést és a letört darab elvesztését, illetve transzlokációját eredményezheti.

A nem homológ kromoszómák ismétlődő szekvenciái között bekövetkező rekombináció transzlokációt okozhat, míg a kromoszómavégek variabilitását a szubtelomer régiók közötti rekombináció eredményezi. Végül, teljes kromoszóma-vesztés is történhet olyan esetekben, ha ez a vesztés nem létfontosságú szekvenciákat érint. A gombák genomja gyakran olyan szekvenciákat tartalmaz, melyek a fent leírt folyamatok valamelyikével hozzájárulnak CLP kialakulásához.

Kistler és Miao (1992) hipotézise szerint, a meiozis szelekciós hatású a kromoszómaaberrációkkal szemben, vagyis a meiozis előfordulásának gyakorisága fordítottan arányos a CLP mértékével. A hipotézist támogató és ellene szóló példákat egyaránt találhatunk (Geiser és mtsi., 1994; Plummer és Howlett, 1993), bár tény, hogy a transzlokáció ritkábban fordul elő a szexuális folyamatokat mutató gombáknál. Egy adott fajon belül lejátszodó ivaros folyamatokra gyakorolt hatásának tanulmányozását a kromoszómapolimorfizmusra azonban megnehezíti, hogy viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre a CLP kialakulásához vezető molekuláris folyamatokra.

Néhány kivételtől eltekintve, egy adott gombatörzs kariotípusa stabil és az egymást követő mitotikus magosztódások során nem változik (Chu és mtsi., 1993; Talbot és mtsi., 1993). A kivételek közé tartozik Longo és Vezinhet (1993) megfigyelése: két vizsgált *S. cerevisiae* törzs közül az egyik törzs kariotípusa változatlan maradt, míg a másik törzsnél gyakran kromoszómavesztést észleltek. Ezt a kromoszómavesztést úgy értelmezték, hogy ez utóbbi diploidnak feltételezett törzs néhány kromoszómájára nézve

triszóm. Ez esetben tehát egy instabil aneuploid állapot eredményezte egy új kariotípus megjelenését.

A CLP kialakulásához vezető egyéb folyamatokat kutatva kiderült, hogy gyakran közvetlen kapcsolat van a CLP és a rDNS ismétlődő egységek számában bekövetkező változások között. A rDNS-t tartalmazó kromoszómák kétszer olyan gyakran változnak, mint a többi kromoszóma. Ezen változás, amely gyakran a vizsgált gomba növekedési sajátosságaiban is változást eredményez: *Neurospora crassa*-nál (Russell és Rodland, 1986) a rDNS ismétlődő egységek számának radikális csökkenése vagy növekedése a törzsek lassabb fejlődését eredményezi. Hasonló kapcsolatot találtak a *Kluyveromyces lactis* esetében is (Maleska és Clark-Walker, 1990), ahol a gyorsabban növő telepek rDNS ismétlődő szekvenciája csak 43-55%-a a lassabban növekvő törzsekének.

Több olyan megfigyelés is van, amikor a kariotípusváltozáshoz vezető folyamatok nem tisztázottak. Rustchenko és munkatársai (1993) hosszan tartó hidegkezelés hatását vizsgálva, olyan *C. albicans* spontán mutánsokat találtak, melyeknél a kariotípus változása nemcsak a rDNS géneket tartalmazó, hanem más kromoszómákat is érintett. Kromoszómaváltozást eredményezhet a tenyésztési körülmények bizonyos módosítása (pl. korlátozott mennyiségű organikus foszfát, vagy kizárólagos szénforrásként a szorbóz, arabinóz alkalmazása), mely a megváltozott körülményekhez történő valamiféle alkalmazkodó mechanizmusnak tekinthető (Rustchenko és mtsi., 1994). Az eltérő tenyésztési körülményekhez alkalmazkodó *Candida* mutánsoknál olyan hipermutabilis állapot kialakulását figyelték meg, amely a stabil kariotípust fenntartó szabályozás elvesztésével járt együtt.

Az említettek mellett a transzformáció, a transzformáló DNS kromoszómába történő integrálódása is változást eredményezhet a gombák kariotípusában.

A kariotípusok stabilitása és az egyes törzsek közötti variabilitás megléte egymásnak ellentmond. Ezen ellentmondás feloldása lehet, ha feltételezzük, hogy a kismértékű kromoszómális különbség ellenére, az eltérő kariotípust mutató gombák

több-kevesebb ideig szeparáltan fejlődtek. Ez esetben a korábban említett, illetve egyéb, még nem ismert mechanizmusok révén eltérések alakulhatnak ki az egyes törzsek kromoszómális állományában. Ennek valószínűsége egyes feltételezések szerint még jobban megnő, ha a különböző gomba sejtvonalak eltérő környezeti feltételek közé kerülnek: bizonyos fizikai körülmények (pl. éhezés) a szigorú mitotikus szabályozásában, valamint egyes DNS-javító funkciókban olyan "ellenőrzéscsökkenést" eredményezhetnek, amely elősegítheti a kariotípus megváltozását. Az ivaros szaporodást mutató gombáknál a fent bemutatott folyamatok szintén megtalálhatók, amelyekhez (a transzlokációk gátlásával egyidejűleg) hozzáadódhatnak a meiotikus rekombinációk. Sok kariotípusváltozás a gombáknál genetikailag hátrányos, vagy közömbös, illetve a megváltozott környezeti feltételek között az alkalmazkodásban az új kapcsoltsági csoportok kialakulása miatt előnyös is lehet.

A kromoszómaprofilok állandósága, a törzsspecifikus kariotípus a genetikai, orvosi, epidemológiai és mezőgazdasági vizsgálatok igen fontos módszerévé tették az elektroforetikus kariotipizálást. Elmondható, hogy az ismertetett korlátok ellenére az elektroforetikus kariotipizálás napjaink egyik leghatékonyabb törzsidentifikálási eljárása.

1. táblázat. PFGE alkalmazása mikroszkópos gombák kariotipizálására

Mikroszkópikus gomba	Genomméret (Mb)	Kromoszómális DNS mérettartománya (Mb)	Kromoszóma szám
Acremonium chrysogenum	33	2,6-6,4	8
Agaricus bisporus	34	1,2-4	13
Aspergillus nidulans	31	0,4-4	10-15
Aspergillus niger	35,5-38,5	3,5-6,6	8
Aspergillus oryzae	35	2,8-7	8
Beauveria nivea	26-33	0,9-6,6	8-10
Candida utilis	NM*	0,4>3,5	>8
Candida albicans	16-17	0,66-4,3	8-9
Cercospora kikuchii	28,4	2,0-5,5	8
Cladosporium fulvum	44	1,9-5,4	11
Cochliobolus heterostrophus	35	1,3-3,7	15 vagy 16
Colletotrichum gloeosporioides	NM*	0,27-6	13-15
Coprinus cinereus	37,5	1-5	13
Cryptococcus neoformans	21-24,5	0,77-3,9	12-13
Fusarium oxysporum	41-51,5	0,8-6,7	11-14
Fusarium solani	40	0,4-6	13
Histoplasma capsulatum	NM*	0,5>5,7	>7
Leptosphaeria maculans	17,5-23	0,7-3,7	6-14
Magnoporthe grisea	40	3-10 (0,47-2,2)	7+1-4 (minikromoszóma)
Mucor circinelloides	39	2,3-8,1	>8
Nectria haematococca	8,5	0,6-7	10-15
Neurospora crassa	47	4-12,6	7
Phaffia rhodozyma	15-23	0,8-3,5	7-13
Phanerochaete chrysosporium	15	1,8-5	7
Pneumocystis carinii	7-8	0,3-0,7	14-16
Pythium sylvaticum	37-38	1,9-5,1	>13
Pythium ultimum	23,7-37,6	1,28-4,6	9-14
Saccharomyces cerevisiae	13,5-14,5	0,24-3	16
Schizophyllum commune	34-35	1,2-5,1	11
Schizosaccharomyces pombe	14	3,5-5,7	3
Septoria nodorum	28-32	0,5-3,5	14-19
Septoria tritici	29,5-32,6	0,33-3,5	14-18
Tilletia caries	32,25-39,88	0,29-4,49	14-20
Tilletia indica	24	1->3,3	>11
Trichoderma longibrachiatum	33	2,8-6,9	7
Ustilago hordei	18,4-25,9	0,17-3,15	16-21
Ustilago maydis	NM*	0,3->2	20

NM* nem határozták meg

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. VIZSGÁLT MIKROORGANIZMUSOK:

lásd 2. táblázat.

2. táblázat. A kísérleteink során vizsgált gombatörzsek.

ÉLESZTŐK	FONALASGOMBÁK
Candida albicans vizsgálati anyag	*Aspergillus nidulans* 1156 x 1157
C. krusei ATCC 6258	*A. nidulans* SzMC 1156
Hansenula anomala CBS 5759	*A. nidulans* SzMC 1157
Kluyveromyces lactis SZMC 1226	*A. nidulans* R 21
Phaffia rhodozyma CBS 5905 (1)*	*Claviceps fusiformis* 487/1
P. rhodozyma CBS 5908 (2)	*Cl. fusiformis* 6000
P. rhodozyma CBS 6938 (3)	*Cl. fusiformis* M13/8
P. rhodozyma ATCC 24203 (4)	*Cl. purpurea* CK-178/1
P. rhodozyma ATCC 24229 (5)	*Cl. purpurea* T-181/1
P. rhodozyma ATCC 24261 (6)	*Mucor plumbeus* NRRL 687 (M2)*
Saccharomyces cerevisiae RXII	*M. plumbeus* CCFC DAOM 144780 (M4)
S. cerevisiae S288C	*M. circinelloides* FRR 2480 (M 17)
S. cerevisiae YGSC YP 80	*M. circinelloides f. lusitanicus* ATCC1216b (M 20)
S. kluyveri SZMC 3082	*M. circinelloides* FRR 2479 (M 23)
S. unisporus SZMC 0398	*M. circinelloides* CNCTC 1350 (M 34)
Schizosaccharomyces pombe	*M. circinelloides f. gryseocyanus* NRRL A-7420 (M50)
	M. racemosus WRL CN(M) 162 (M 28)
	M. racemosus f. racemosus NRRL 3640 (M 52)
	M. bainieri NRRL A-11496 (M 51)
	M. mucedo WRLCN(M) 122 (M 25)
	Penicillium notatum NRRL 821 (21)
	P. notatum NRRL 831 (31)
	P. chrysogenum ATCC 1003 (03)
	P. chrysogenum NRRL 807 (07)
	P. chrysogenum P2 (P2)
	P. chrysogenum Q176 (Q176)
	*P. chrysogenum*NRRL 1951B 25 (B25)
	P. chrysogenum NRRL1951 (51)

* A zárójelbe tett szám, vagy betű és szám együttese az általunk használt kódot jelöli.

3.2. TÁPKÖZEGEK:

CM : - 0,25% élesztőkivonat
- 0,25% pepton
- 0,50% maláta
-1% glükóz

MM :- 1,00% glükóz
- 0,50% $[NH_4]_2SO_4$
- 0,10% KH_2PO_4
- 0,05% $MgSO_4$
-0,10% Wickerham-féle vitamintörzsoldat

Wickerham-féle vitamintörzsoldat:

- 0,2 mg fólsav
- 0,2 mg biotin
- 40,0 mg Ca-pantotenát
- 200,0 mg inozitol
- 40,0 mg niacin
- 20,0 mg p-aminobenzoesav
- 40,0 mg piridoxin.HCL
- 40,0 mg aneurin.HCL
- 20,0 mg riboflavin
- 100,0 ml desztillált víz

Szilárd tápközegek készítésekor a tápoldatot 2% agarral egészítettük ki.

3.3. KROMOSZÓMÁLIS DNS MINTA KÉSZÍTÉSE

3.3.1. Protoplasztképzés

Protoplaszt képzéshez az élesztőtörzseket CM rázatott folyadékkultúrában (29°C, 180 rpm) tenyésztettük, míg a fonalas gombákat CM táptalaj felszínére helyezett celofánon neveltük (Ferenczy és mtsi., 1975). A protoplasztképzés körülményeit valamennyi általunk vizsgált törzsre optimalizáltuk (3. táblázat)

3. táblázat. A protoplasztképzés optimális körülményei különböző gombafajok esetében.

	OZMÓTIKUS STABILIZÁTOR	SEJTFALOLDÓ ENZIM
ÉLESZTŐK		
Phaffia	0,7 M KCl	0,5% csigaenzim 0,25% Novozym 234
Egyéb élesztők	0,8 M KCl	1 % csigaenzim
FONALASGOMBÁK		
Aspergillus	0,7 M KCl	1% csigaenzim
Claviceps	0,8M KCl	1% csigaenzim 0,1% β-merkaptoetanol
Mucor	1 M szorbitol	1,5 % csigaenzim
Penicillium	1,3 M KCl	0,5% csigaenzim, 0,5% Novozym 234

3.3.2. Agarózblokk készítés

A protoplaszt szuszpenziót (4×10^8 protoplaszt/ml) alacsony olvadáspontú agarózzal (1,3 -1,4%) (Sigma 4018, VII típusú LGT) a megfelelő ozmótikus stabilizátor jelenlétében elegyítettük, majd dermedés után az agaróz blokkokat proteolitikus enzimmel kezeltük. Az enzimes kezelést 0,5 M EDTA (pH 9,5), 10 mM Tris (pH 9,5),

1% nátrium-lauril-szarkozinát és 1 mg/ml (élesztők) vagy 2 mg/ml (fonalas gombák) proteináz K-t (Sigma 4914, XXVIII) ill. proteináz E-t (Sigma 6911, XXV) tartalmazó oldatban ("inkubációs puffer") végeztük, amelyben 50°C-on 48 h-ig inkubáltuk az agaróz blokkokat.

3.3.3. *In situ* protoplasztképzés

Az élesztősejteknél a DNS mintaprepalálás másik igen hatékony módja az un. *in situ* protoplasztképzés, valamint az intakt sejtek közvetlen proteolitikus enzimkezelése. Az *in situ* protoplasztképzés során az agarózba ágyazott sejteket (5x 10^8 sejt/ml) 6 órán át 37°C-on megfelelő stabilizátor jelenlétében sejtfaloldó enzimekkel (csigaenzim, Novozym 234) kezeltük. Többszöri mosás után a proteolitikus enzimkezelést 4.3.2. szerint végeztük.

3.4. Elektroforézis

3.4.1. Agaróz

A következő agarózfajtákat teszteltük, összevetve felbontási képességüket és elválasztási gyorsaságukat:

- Serva 11404, "DNA electrophoresis analytical grade"
- Bio-Rad "Chromosome grade agarose" (CGA)
- FMC "Fast Lane agarose"

3.4.2. Puffer

Alacsony (1 x TAE) vagy magas (0.5 x TBE, 1 x TBE) ionerősségű puffer alkalmazásával (Sambrook és mtsi., 1989) biztosítottuk a megfelelő pH érték és a specifikus vezetőképesség fenntartását.

3.4.3. Készülékek

Kísérleteinkben kétféle PFGE rendszert alkalmaztunk:

- CHEF készülék (CHEF-DR™ II, Bio-Rad)
- az OFAGE hexagonális feltéttel (Pulsaphor LKB)

Az elektroforézis körülményeit az egyes gombatörzseknél a kromoszómáik mérettartományától függően választottuk meg.

3.5. Festés és fényképezés

A géleket ethidiumbromid oldatban (Sambrook és mtsi. 1989) festettük 20 percig, majd a felesleges festéket desztillált vizes mosással (10-12 óra) távolítottuk el. A géleket ultraibolya fényben megvilágítva (Transilluminator, 254 nm) fényképeztük.

3.6. Hibridizálás

A hibridizálást kétféle módszerrel végeztünk; az egyik Serwer és mtsi (1992) által leírt ugynevezett "in-gel" DNS-DNS hibridizálás. Ennél a hibridizálásnál a DNS-próba a *M. circinelloides leu*A génjét tartalmazó pMCL 1302-es plazmid (Roncero és mtsi., 1989) 2,0 és 2,9-kb nagyságú *Bam*HI fragmentjei voltak, melyeket [α^{32}P]dATP izotóppal, a random priming módszer segítségével (Feinberg és Vogelstein, 1983) jelöltünk.

A másik alkalmazott módszer a Southern transzfer-hibridizálás volt (Southern, 1975), ahol az elektroforézis során szeparált DNS molekulákat az alkalikus transzfer-módszerrel Hybond-N^+ (Amersham) nylon membránra vittük át. Hibridizációs próbaként az *A. nidulans* 7,8 Kb nagyságú rDNS fragmentjét (5,8S, 18S és 26S rRNS) tartalmazó pNM1 plazmidot használtuk (Borsuk és mtsi. 1982). A jelölést és a hibridizálást digoxigenines DNS-jelölő rendszer (Boehringer Mannheim) leírása alapján végeztük.

József Attila Tudományegyetem SZEGED

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

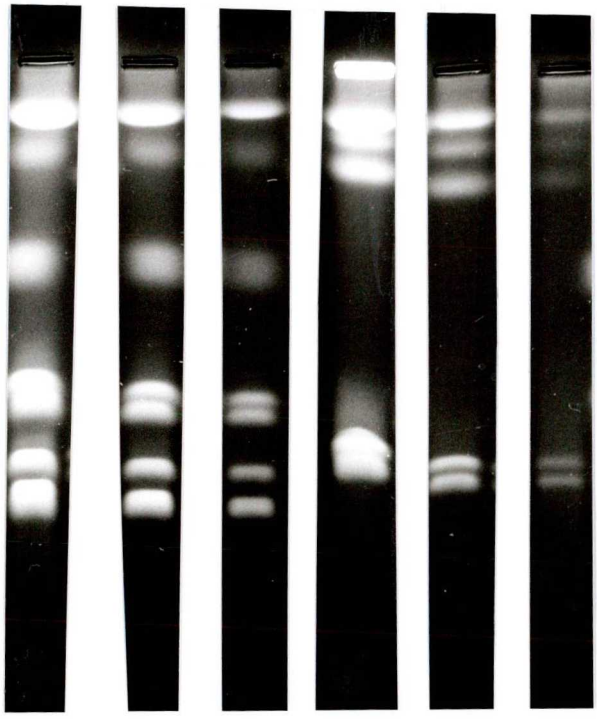
4.1. AZ INTAKT KROMOSZÓMÁLIS DNS IZOLÁLÁSÁNAK OPTIMALIZÁLÁSA

Az intakt, nagy molekulasúlyú DNS izolálásának Schwartz és mtsi. (1984) által kidolgozott módszerének lényege az élesztő protoplasztok nagy tisztaságú agarózmátrixban történő szétejtése. Proteináz K és detergens hozzáadásával degradálták a DNS-hez kötött és más fehérjéket, illetve szétejtették a mag- és a citoplazmatikus membránokat (Lai és mtsi. 1989). EDTA hozzáadásával megkötötték a nukleázaktivitáshoz szükséges kétértékű ionokat. Az agaróz matrix lehetővé teszi az enzim és a detergens szabad diffundálását, ugyanakkor megakadályozza, hogy a protoplasztokból kiszabaduló DNS makromolekulákat olyan mechanikai hatás érje, amely a feldarabolódásukhoz vezet.

A kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy a DNS-mintakészítés egyik legfontosabb tényezője az intakt sejt-, vagy protoplasztszuszpenzió kiindulási sejtkoncentrációja. Az elválasztott DNS molekulák jól detektálhatók és kiértékelhetők, ha a kiindulási sejtkoncentráció megközelíti a 6 x 10^8 sejt/ml értéket. Abban az esetben, ha a sejtszám 10^9 sejt/ml vagy ennél az értéknél nagyobb, a futási sávok túlterheltek. Ugyanakkor, ha a sejtszám 5 x 10^7 sejt/ml vagy ennél alacsonyabb, az elválasztás eredménye már nem értékelhető ki (11. ábra).

4.2. AZ *IN SITU* ELJÁRÁS KIDOLGOZÁSA KROMOSZÓMÁLIS DNS KINYERÉSÉRE

Az élesztőknél a kromoszómális DNS minta preparálása többféle módon is történhet. Az egyik gyakran alkalmazott, de csak néhány élesztőfaj esetében eredményes módszer: az agarózba ágyazott intakt élesztősejtek közvetlen proteolitikus enzimkezelése.



11. ábra. ***Candida albicans*** **és** ***C. krusei*** **törzsek kromoszómális DNS-ének gélelektroforetikus mintázata különböző kiindulási sejtkoncentráció alkalmazásakor (OFAGE).**

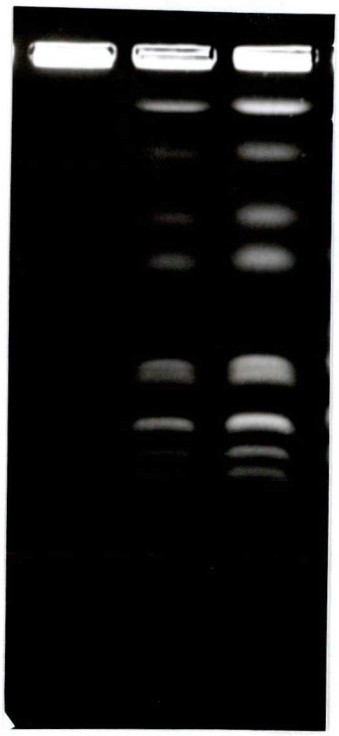
1.-3. sáv: *C. albicans*; 4.-6. sáv: *C. krusei*; agarózba ágyazott protoplasztok proteolitikus enzimkezelés után, a kiindulási sejtkoncentrációk: 1,2 x 10^9, 6 x 10^8 és 2 x 10^8 sejt/ml.

Elválasztási körülmények; feszültség: 100 V; pulzusidő: 450 s; futási idő: 72 h; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.

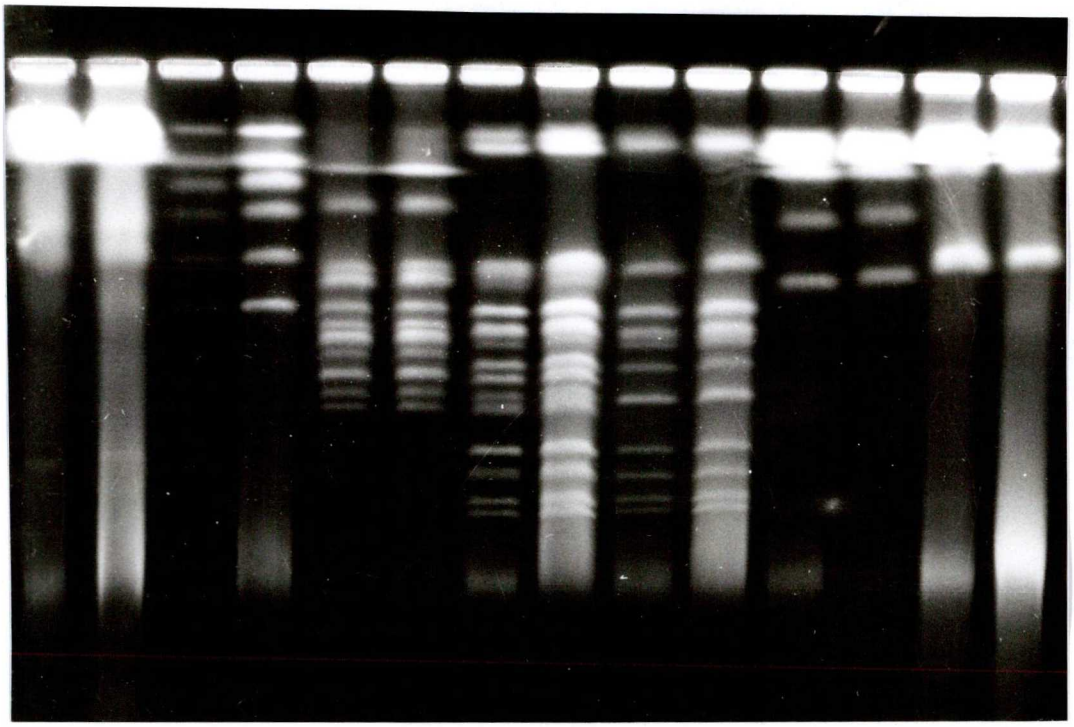
Kísérleteink során egy új, úgynevezett *in situ* eljárást dolgoztunk ki a *Phaffia rhodozyma* élesztőből történő DNS mintakészítésre (12. ábra). A későbbiekben bebizonyítottuk azt is, hogy ez az eljárás egyéb élesztők esetében is jól alkalmazható (13. ábra). A módszer lényege, hogy a sejtfal eltávolítását, azaz a protoplasztképzést magában az agaróz blokkban végezzük. Az *in situ* eljárás előnye, hogy kis térfogatokkal lehet dolgozni, és a módszer viszonylagos egyszerűsége nagyszámú minta egyszerre történő, gyors vizsgálatát is lehetővé teszi.

Az élesztőknél és a fonalasgombáknál egyaránt jól alkalmazható a kromoszómális DNS preparálás klasszikus módszere, az agarózba ágyazott protopasztok proteolitikus enzimkezelése. A eljárás egyik kritikus tényezője a protoplaszt képzés optimális körülményeinek megteremtése. Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy még megfelelő tisztaságú (faltöredéktől mentes) protoplaszt preparátum előállítása esetén is értékelhető elektroforetikus kariotípust csak 2 x 10^8 protoplaszt/ml koncentráció feletti minta ad.

Vizsgálataink szerint a mintakészítést befolyásoló tényezők közül számottevő hatása van az EDTA és a nátrium-lauril-szarkozinát jelenlétének, valamint a sejtfaloldó enzimek koncentrációjának és az enzimkezelés időtartalmának. Kísérleteket végeztünk annak feltárására, hogy az eltérő kromoszómális mintakészítési módszereket a mintapreparálás egyes kritikus tényezőinek megváltoztatása milyen módon befolyásolja. A 14. ábra mutatja, hogy az *in situ* eljárás során a DNS, ha az inkubációs puffer a proteolitikus enzimkezelés során nem tartalmaz EDTA-t és nátrium-lauril-szarkozinátot, teljes mértékben degradálódhat. Ezzel szemben, még kiértékelhető elválasztást kapunk, ha hasonló inkubációs körülmények között intakt élesztősejteket kizárólag proteináz K-val kezelünk (14. ábra 1., 2. sáv). Ennek valószínű magyarázata, hogy a protoplasztok proteolítikus enzimkezelése a membránstruktúra gyors szétesése révén hirtelen jelentős nukleázaktivitás emelkedést eredményez, mely a DNS nagymértékű degradációját okozza. Intakt sejtek esetében a fehérjejellegű sejtkomponenseket fokozatosan emésztő proteináz K kezelés képes a nukleázokat is semlegesíteni.



12. ábra. ***P. rhodozyma*** **törzs három különböző módon készített kromoszómális DNS mintájának OFAGE elválasztása.**
1. sáv: intakt sejtek sejtfaloldó enzimkezelés nélkül; 2. sáv: agarózba ágyazott protoplasztok proteolitikus enzimkezelés után; 3. sáv: *in situ* eljárással készített DNS minta.
Elválasztási körülmények; lásd 11. ábra.

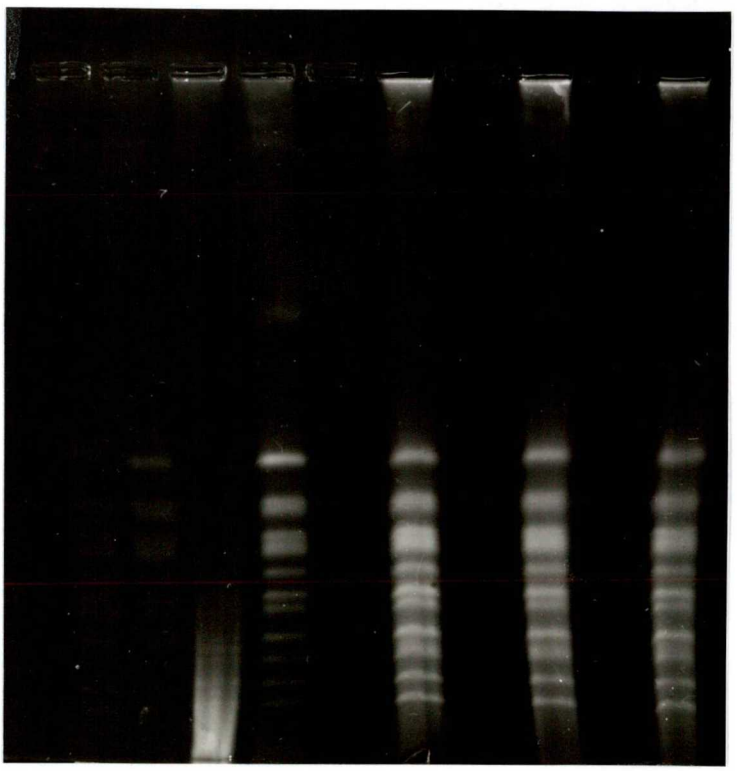


13. ábra. Biotechnológiai szempontból jelentős élesztőfajok néhány törzsének elektroforetikus kariotípusa (CHEF).

1., 3., 5., 7., 11., 13. sáv: agarózba ágyazott protoplasztok; 2., 4., 6., 8., 10., 12. sáv: *in situ* protoplasztképzés és DNS minta készítés. Azonos kiindulási sejtkoncentrációt alkalmaztunk.

1., 2. sáv: *H. anomala* CBS 5759; 3., 4. sáv: *S. kluyveri* SZMC 3082; 5., 6. sáv: *S. unisporus* SZMC 0398; 7., 8. sáv: *S. cerevisiae* R XII; 9., 10. sáv: *S. cerevisiae* S288C; 11., 12. sáv: *P. rhodozyma* CBS 6938; 13., 14. sáv: *K. lactis* SZMC 1226.

Elválasztási körülmények; feszültség: 180 V és 100 V; pulzusidő: 125 s; futási idő: 24 h és 16h; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.



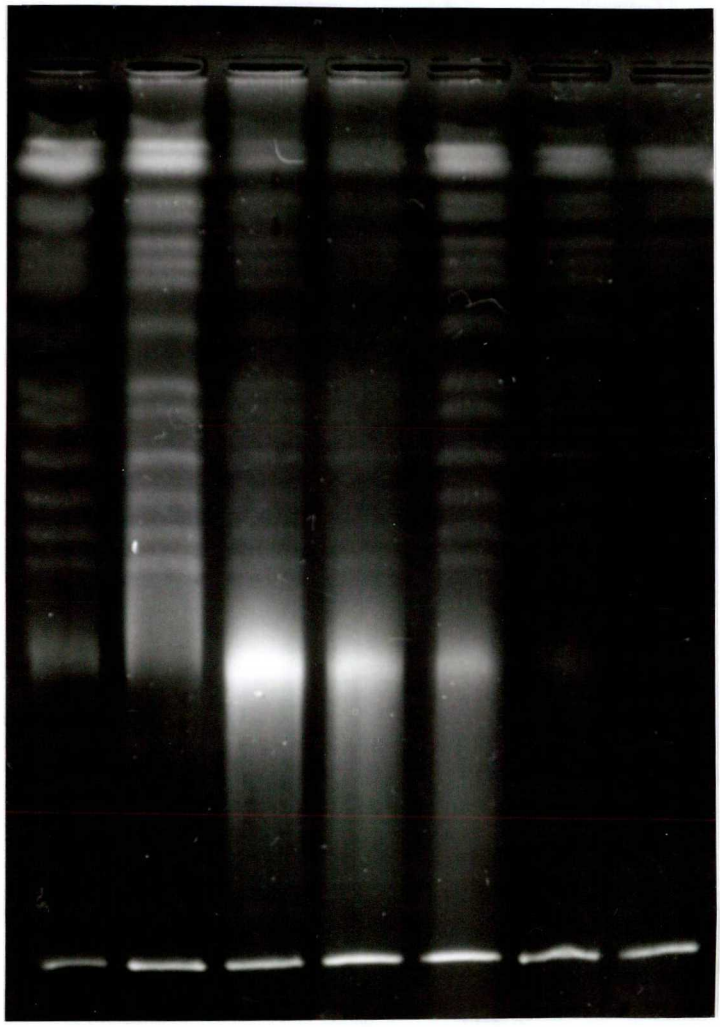
14. ábra. Az inkubációs pufferben az EDTA és detergens hiányának, illetve jelenlétének hatása a *S. cerevisiae* YGSC YP 80 kariotípusára. (OFAGE). 1., 3., 5., 7., 9. sáv: az inkubációs puffer nem tartalmaz EDTA-t és detergenst; 2., 4., 6., 8., 10. sáv: a puffer 0,5 M EDTA-t és 1 % nátrium-lauril-szarkozinátot is tartalmaz.
1., 2. sáv: agarózba ágyazott intakt sejt; 3., 4. sáv: agarózba ágyazott protoplasztok. *In situ* eljárással készített DNS minták: 5., 6. sáv: 12 órás, 7., 8. sáv: 24 órás, 9., 10. sáv: 36 órás proteináz K kezelés után.
Elválasztási körülmények; feszültség: 180 V; pulzusidő: 125 s; futási idő: 24 h; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.

Bizonyítottuk azt is, hogy viszonylag rövid idejű (12 óra) proteináz K (1 mg/ml) kezelés már elegendő a DNS kiszabadításához, és a nem kívánt sejtalkotók lebontásához (14. ábra 6. sáv).

A sejtfaloldó enzimek koncentrációja és az enzimkezelés időtartalma is jelentősen befolyásolja a mintakészítés eredményességét, ugyanis a protoplasztképzéshez felhasznált enzimpreparátumok többsége jelentős nukleázaktivitással is rendelkezik (Peberdy, 1985). Ebből következően az *in situ* mintakészítésnél minden esetben optimalizálni kell az enzimkezelés körülményeit. A vizsgált élesztőfajok esetében a sejtfaloldó enzimkoncentráció háromszorosra emelése (1,5% csigaenzim és 0,75% Novozym 234) már a DNS teljes lebomlását eredményezte, míg az általunk későbbiekben is használt enzimkoncentráció (0,5% csigaenzim, 0,25% Novozym 234) nem okozott számottevő DNS degradációt. (15. ábra).

4. 3. A SZEPARÁLÓ GÉLMÁTRIX KÉSZÍTÉSÉHEZ HASZNÁLHATÓ AGARÓZTÍPUSOK VIZSGÁLATA

Az azonos kísérleti körülmények között tesztelt három agaróztípus között a futási gyorsaság és a DNS molekulák közötti szeparáló képesség alapján a Bio-Rad cég által gyártott "Chromosomal grade" agaróz (CGA) bizonyult a legjobbnak (16. ábra). Nagyobb húzószilárdsága miatt a gél könnyen kezelhető, az alacsony EEO értéke következtében a DNS gyorsabban fut ebben a gélben, ugyanakkor a DNS degradációt okozó szennyeződések mennyisége elhanyagolható. A CGA gélen a *Sch. pombe* genomjának tökéletes elválasztását lehet elérni, míg azonos kísérleti feltételek esetén a "DNA electrophoresis analytical grade" agarózból (Serva) készített gélen három helyett csak két elektroforetikus mobilitási csoport detektálható. A "Fast Lane" agaróz (FMC) használatakor a három kromoszómális DNS elkülöníthető ugyan, de a szétválás kevésbé tökéletes, mint a CGA agarózon.



15. ábra. A sejtfaloldó enzim koncentrációjának hatása *S. cerevisiae* YGSC YP 80 kariotípusára (OFAGE).

1. sáv: agarózba ágyazott protoplasztokból készített DNS minta; 2.-7. sáv: *in situ* eljárással készített DNS minták. A protoplasztáláshoz használt enzimek koncentrációja: 2., 3., 4. sáv: 0,5 %, 1 %, 1,5 % csigaenzim; 5., 6., 7. sáv: 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % Novozym 234.
Elválasztási körülmények; lásd 14. ábra.

Penicillium fajok kromoszómális DNS elválasztására (lásd még a 5.4.6. pontban), felbontási képesség emelése céljából, 0,1%-os agaróz gélt is alkalmaztunk. Ez a rendszer azonban, amellett, hogy a gél nagyon rossz mechanikai sajátosságai miatt igen nehezen kezelhető volt, a kromoszómális sávok nagymértékű eltorzulása miatt lehetetlenné tette a pontos kiértékelést. Elfogadható elváláshoz legalább 0,5 %-os agaróz koncentrációt kell használnunk még a CGA agarózból is.

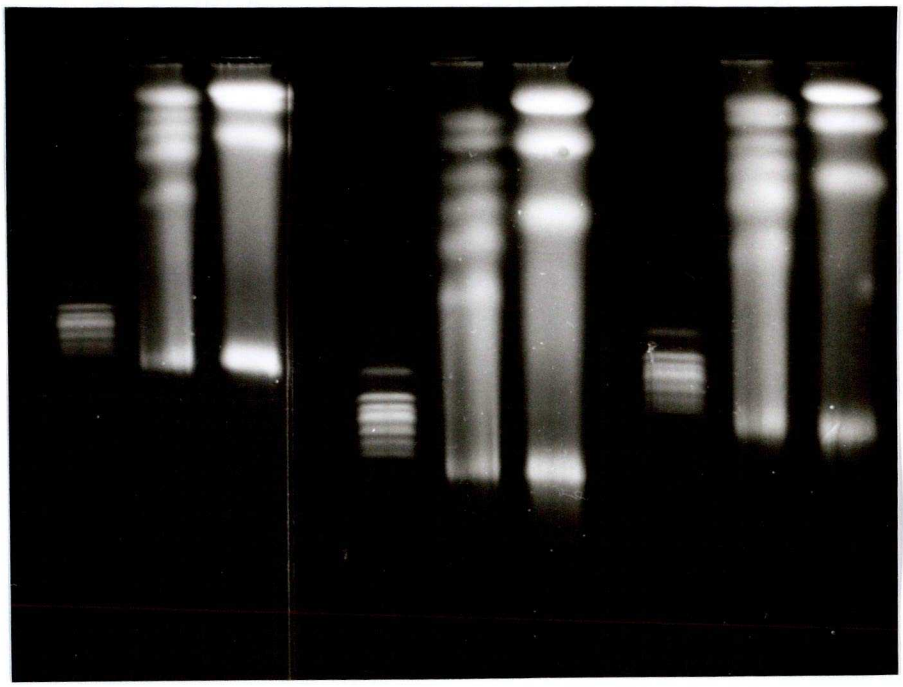
4. 4. ELEKTROFORETIKUS KARIOTÍPUSOK MEGHATÁROZÁSA PULZÁLTATOTT GÉLELEKTROFORÉZISSEL

4. 4. 1. Markerként használt törzsek elektroforetikus kariotípusa

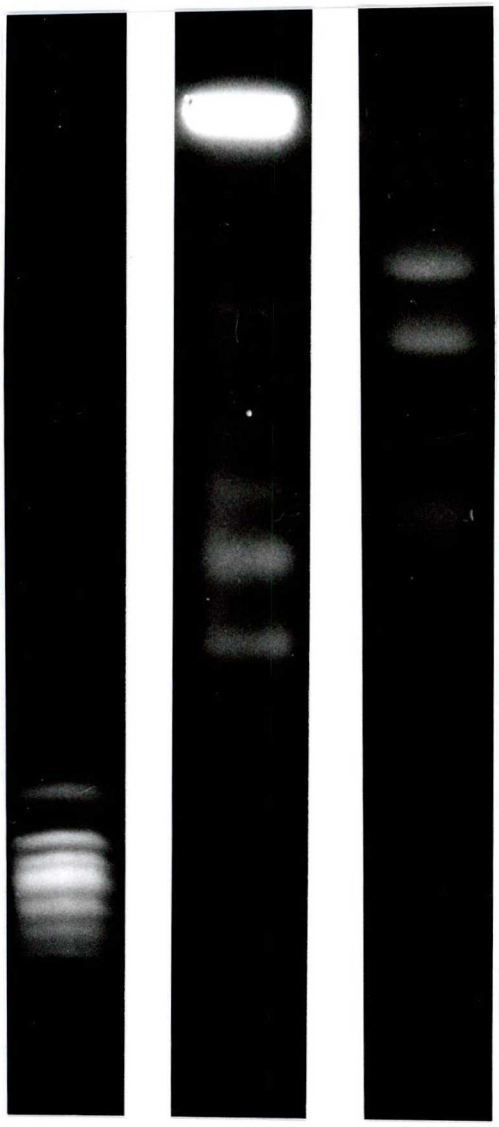
Az elválasztási körülmények optimalizálása és a szeparáló rendszerek tesztelése végett néhány már korábban vizsgált mikroszkópikus gomba (Brody és Carbon, 1989; Debets és mtsi., 1990) kromoszómális szerveződését is analizáltuk. Ezen "modellszervezetek" kromoszómális sávjait a későbbiekben molekulasúly markerként is alkalmaztuk ismeretlen nagyságú kromoszómális DNS-ek méretének meghatározásához. A 17. ábra szemlélteti három, ebből a célból vizsgált gombatörzs karakterisztikus kromoszómamintázatát. A *S. cerevisiae* (YNN 295) kromoszómális DNS-einek nagysága 0,24 és 2,2 Mbp között változik; a genom teljes mérete ≈13,7 Mb. A *Sch. pombe* (972 h^-) és *A. nidulans* (R 21) törzsek legnagyobb DNS molekulái 5,7, illetve 5,0 Mb nagyságúak. A *Sch. pombe* 972 h^- teljes genom nagysága ≈13,8 Mb, míg az *A. nidulans* R 21 teljes genom nagysága ≈33,7 Mb.

4.4.2. A *Phaffia rhodozyma* elektroforetikus kariotípusa

Munkánk eredményeként, az OFAGE és a CHEF technika alkalmazásával először sikerült adatokat nyernünk a *P. rhodozyma* genetikai állományáról.



16. ábra. ***S. cerevisiae*** **YNN295,** ***A. nidulans*** **R21,** ***Sch. pombe*** **972 h⁻ fajok kromoszómális DNS-ének gélelektroforetikus mintázata az agaróz típustól függően azonos paraméterek alkalmazása mellett. (CHEF)**. Agarózok a tesztelés sorrendjében: "DNA electrophoretic analytical grade" (SERVA); "Chromosomal grade" (Bio Rad), "Fast lane" (FMC). 1., 4., 7. sáv: *S. cerevisiae* YNN 295; 2., 5., 8. sáv: *A. nidulans* R21; 3., 6., 9. sáv: *Sch. pombe* 972 h⁻.
Elválasztási körülmények; feszültség: 45 V; pulzusidő: 3200→1800 s; futási idő: 160 h; puffer: 0,5 x TBE.



17. ábra. Három markerként használt gombafaj egy-egy törzsének kromoszómális DNS mintázata (CHEF).

1. sáv: *S. cerevisiae* YNN 295; 2. sáv: *A. nidulans* R21; 3. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-.

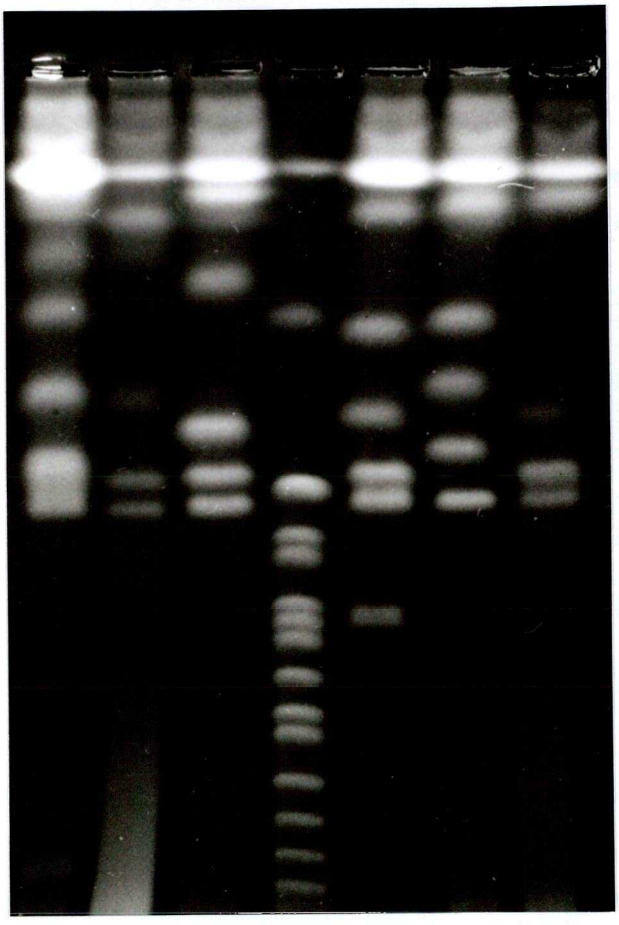
Elválasztási körülmények; feszültség: 45 V; pulzusidő: 5000 s, 3600 s, 3000 s, 2700 s, 2200 s; futási idő: 100 h, 40 h, 73 h, 14 h, 63 h; agaróz koncentráció: 0,8 % CGA; puffer: 0,5 x TBE.

Olyan elválasztási körülmények (paraméterek) meghatározására törekedtünk, melyek alkalmasak mind a kis, mind a nagy DNS molekulák egyidejű elválasztására. Előzetes kísérleteinket a gyorsabb elválasztásra lehetőséget adó, OFAGE rendszerrel végeztük. Azt tapasztaltuk, hogy a rövid pulzus- és futási idő, valamint a nagy feszültség (125 s, 16 h és 24 h, valamint 100 V és 180 V) együttes alkalmazása a 2,2 Mb-nál kisebb kromoszómális DNS molekulák elválasztásánál hatékony (18. ábra). Ugyanakkor, a nagy kromoszómális DNS-ek elválasztását biztosító alacsonyabb feszültség (60 V), hosszabb pulzusidő (800 s) és futási idő (120 h) a 2,2 Mb-nál kisebb DNS molekulák elválasztására nem alkalmas (19. ábra). Az OFAGE rendszerrel elérhető legjobb elválasztást (100 V, 72 órán át, 450 s pulzusidő) a 20. ábra mutatja be. CHEF alkalmazásakor (a futási paraméterek futás közbeni változtatásával) elérhető a kromoszómális mobilitási csoportok azonos mértékű elkülönülése, de csak lényegesen hosszabb futási idő felhasználásával (75 V, 72 órán át, 700 s pulzusidővel, majd 100 V 48 órán át, 500 s pulzusidővel és végül 100 v 24 órán át, 150 s pulzusidővel) (21.ábra).

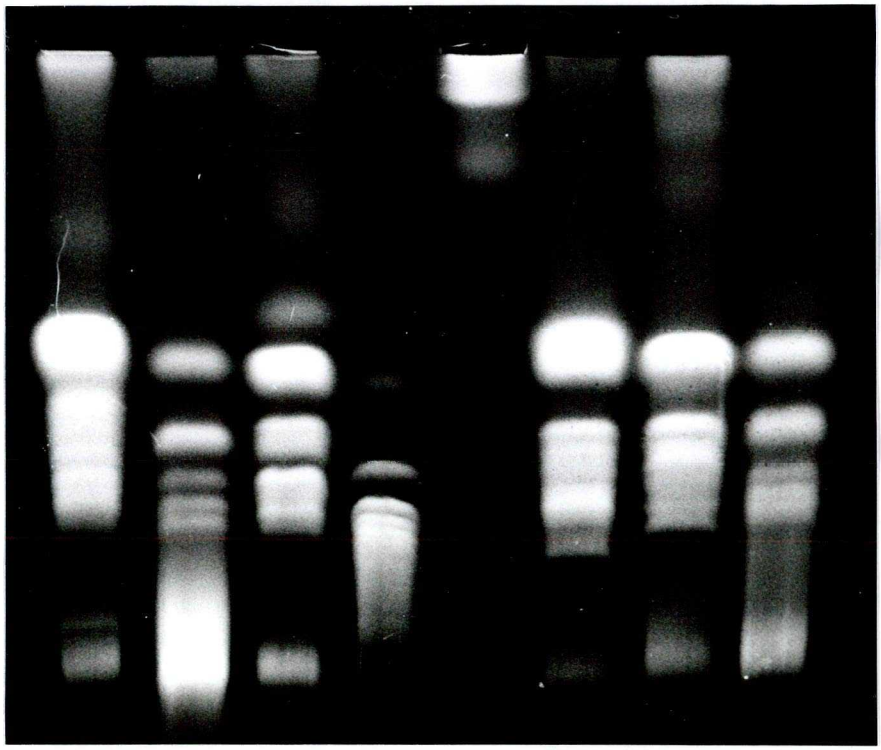
A rendelkezésünkre álló *Phaffia* törzsek vizsgálata azt is lehetővé tette, hogy meghatározzuk a kromoszómális mintázatban fajon belül mutatkozó eltéréseket. Nagy intraspecifikus kromoszóma hossz polimorfizmust mutattunk ki: valamennyi vizsgált törzs eltérő elektroforetikus kariotípust mutatott (20. ábra, 4. táblázat). Hét kromoszómális mobilitási csoport különíthető el a 2-es és 5-ös, nyolc a 3-as és a 6-os, kilenc a 4-es és tizenkettő az 1-es törzsnél. A kromoszómális DNS-ek számát, nagyságát, valamint a teljes genom méretét a 4. táblázat tartalmazza.

Az etídium bromidos festés utáni fluoreszcencia relatív intenzitása alapján valószínűsíthető, hogy az 1, 2, 5 és 6-os *Phaffia* törzsek kariotípusában bizonyos sávok két eltérő kromoszómából származó DNS azonos pozícióba vándorlása révén jöttek létre (21. ábra, 4. táblázat).

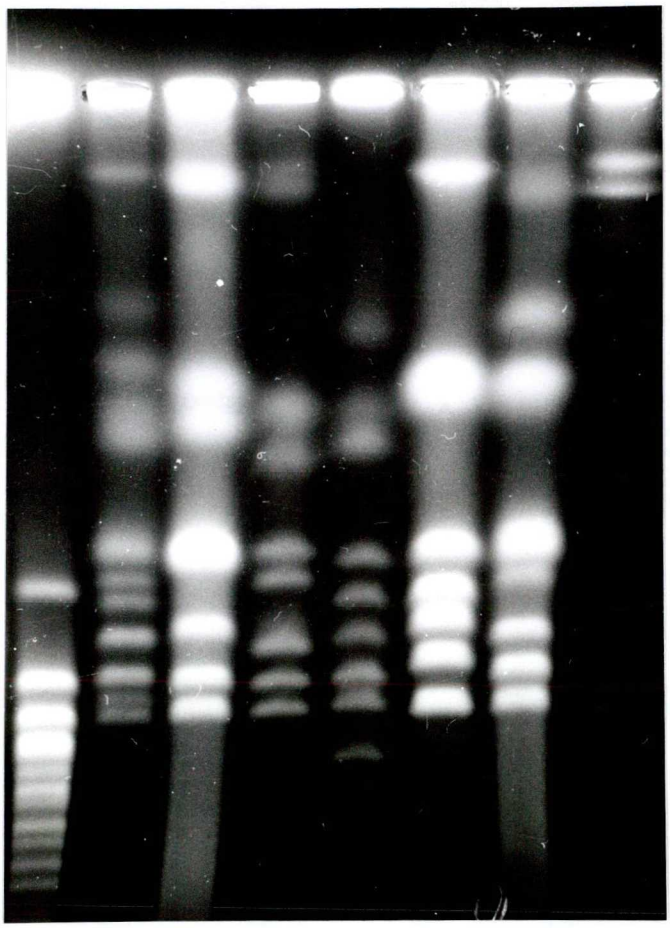
A 4. táblázat adataiból is látható, hogy a vizsgált *Phaffia* törzsek többségének genommérete (a kromoszóma számban és méretben mutatkozó eltérések ellenére) meglehetősen hasonló: a kromoszómák száma 8-9, míg a genommérete 15,5-17,0 Mb



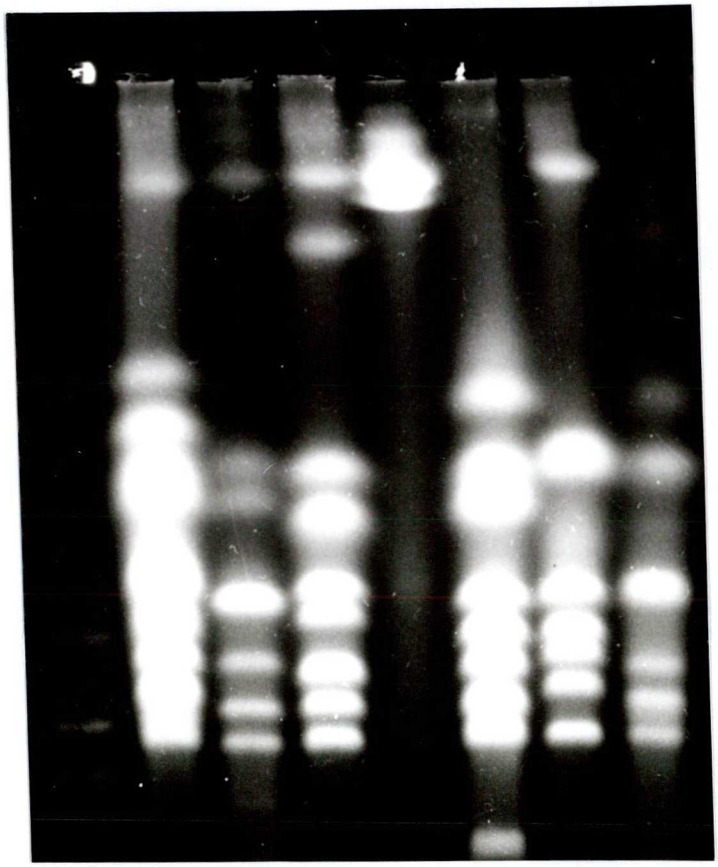
18. ábra. ***P. rhodozyma*** **törzsek elektroforetikus kariotípusa (OFAGE).** 1.-3. és 5.-7. sáv: *P. rhodozyma* 1-6 törzsek; 4. sáv: *S. cerevisiae* YNN 295; Elválasztási körülmények; feszültség: 100 és 180 V; pulzusidő: 125 s; futási idő: 16 és 24 h; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.



19. ábra. ***P. rhodozyma*** **törzsek elektroforetikus kariotípusa (OFAGE).** 1.-3. sáv és 6.-7. sáv: *P. rhodozyma* 1-6 törzsek; 4. sáv: *S. cerevisiae* YNN 295; 5. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-.
Elválasztási körülménye; OFAGE; feszültség: 60 V; pulzusidő: 800 s; futási idő: 120 h; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.



20. ábra. ***P. rhodozyma*** **törzsek elektroforetikus kariotípusa (OFAGE).** 1. sáv: *S. cerevisiae* YNN 295; 2.-7. sáv: *P. rhodozyma* 1-6 törzsek; 8. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-.
Elválasztási körülmények; feszültség: 100 V; pulzusidő: 450 s; futási idő: 72 h; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.



21. ábra. ***P. rhodozyma*** **törzsek elektroforetikus kariotípusa (CHEF).**
1. sáv: *S. cerevisiae* YNN 295; 2.-4. és 6.-8. sáv: *P. rhodozyma* 1-6 törzsek; 5. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-.
Elválasztási körülmények; feszültség: 75 V, 100 V és 100 V; pulzusidő: 700 s, 500 s és 150 s; futási idő: 72 h 48 h és 24h; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.

József Attila Tudományegyetem SZEGED

között mozog. Rendkívül meglepő módon, a faj típustörzseként nyilvántartott izolátum, genommérete (23,2 Mb) és kromoszómáinak száma (12) az egyedüli, ami ettől igen jelentősen eltér. A kapott eredmények felvetették azt a kérdést, hogy a kromoszóma polimorfizmus nem jelent-e (legalábbis egyes törzsek esetében) ploiditási szintbeli eltéréseket is, illetve azt, hogy milyen szerepük lehet a korábban ismertetett kromoszómaszerkezeti változásoknak ezen igen jelentős (lényegében másfélszeres) genomméret és kromoszómaszám létrejöttében. Az eddigi, izolált kromoszómális DNS-t, valamint heterológ génpróbát felhasználó hibridizációs kísérleteink, ezen szerkezeti változások természetére, még nem adtak egyértelmű magyarázatot.

4. táblázat. A kromoszómális DNS-ek és a genom mérete *P. rhodozyma* törzsekben

Törzsszám	1	2	3	4	5	6
Gyűjtemény száma	CBS 5905	CBS 5908	CBS 6938	ATCC 24203	ATCC 24229	ATCC 24261
	3,5*	3,35*	3,45*	2,90*	3,45*	3,25*
	2,65	2,60	2,55	2,50	**2,60**	2,85
	2,35	2,45	2,30	2,35	1,80	2,55
	2,29	**1,80**	1,85	1,75	1,60	**1,80**
	1,80[b]	1,35	1,70	1,65	1,38	1,30
	1,60	1,15	1,30	1,33	1,20	1,15
	1,38	1,08	1,15	1,15	1,08	1,10
	1,33		1,08	1,08		1,08
	1,20			0,83		
	1,15					
	1,10					
	1,08					
Genom-méret (Mb)	23,23	15,58	15,38	15,54	15,51	16,88

* Hibridizáció a pMN1 plazmiddal.
[b]Kiemelve adjuk meg a feltételezett kromoszómális komigrációkat.

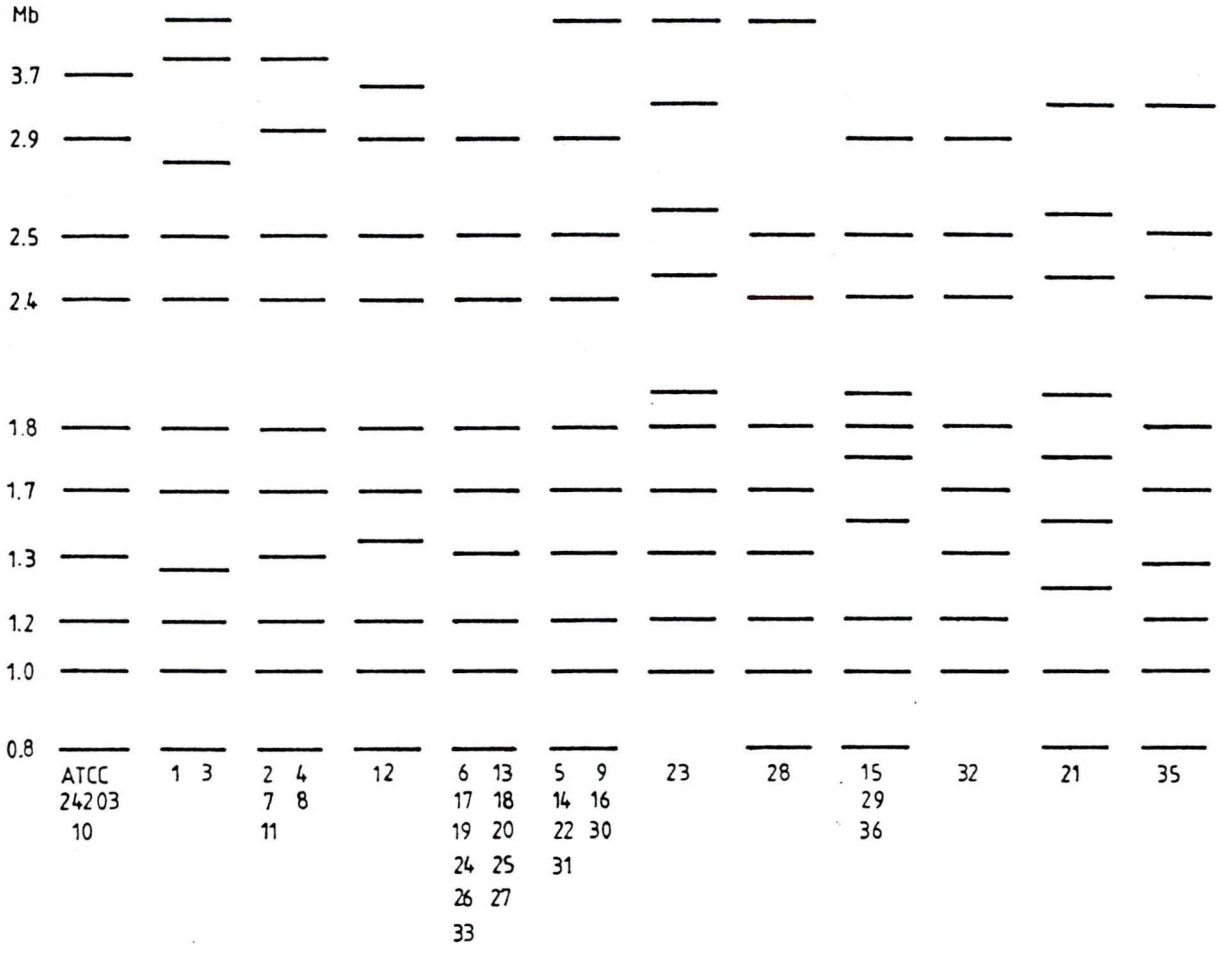
A *Phaffia* típustörzs kariotípusának erősen eltérő volta mellett egy másik meglepő eredmény a 2-es és a 4-es törzs eltérő kariotípusa. Ezek ugyanis egyetlen izolátumból származó, csak két különböző törzsgyűjteményben fenntartott törzsek.

A digoxigeninnel jelölt pMN1 plazmid, amely az *A. nidulans* magi rRNS-ket kódoló régióját tartalmazza (Borsuk és mtsi., 1982), a *Phaffia* törzsek legnagyobb kromoszómáihoz hibridizált elsősorban (4. táblázat). Egyéb gombafajoknál leírtakhoz hasonlóan (*Absidia glauca*; Kayser és Wöstemeyer, 1991; *Podospora anserina*; Javerzat és mtsi., 1993), egyes *Phaffia* törzseknél további halvány hibridizációs jel is megfigyelhető volt (2-es törzs 1,8 Mb, a 3-as 1,3 Mb és a 4-es 1,15 Mb méretű kromoszómális DNS sávnál). Ez azt jelzi, hogy bár a rDNS régió nagyobbrészt a legnagyobb kromoszómán található, de kisebb kópiaszámban ezeken a kromoszómákon is előfordul.

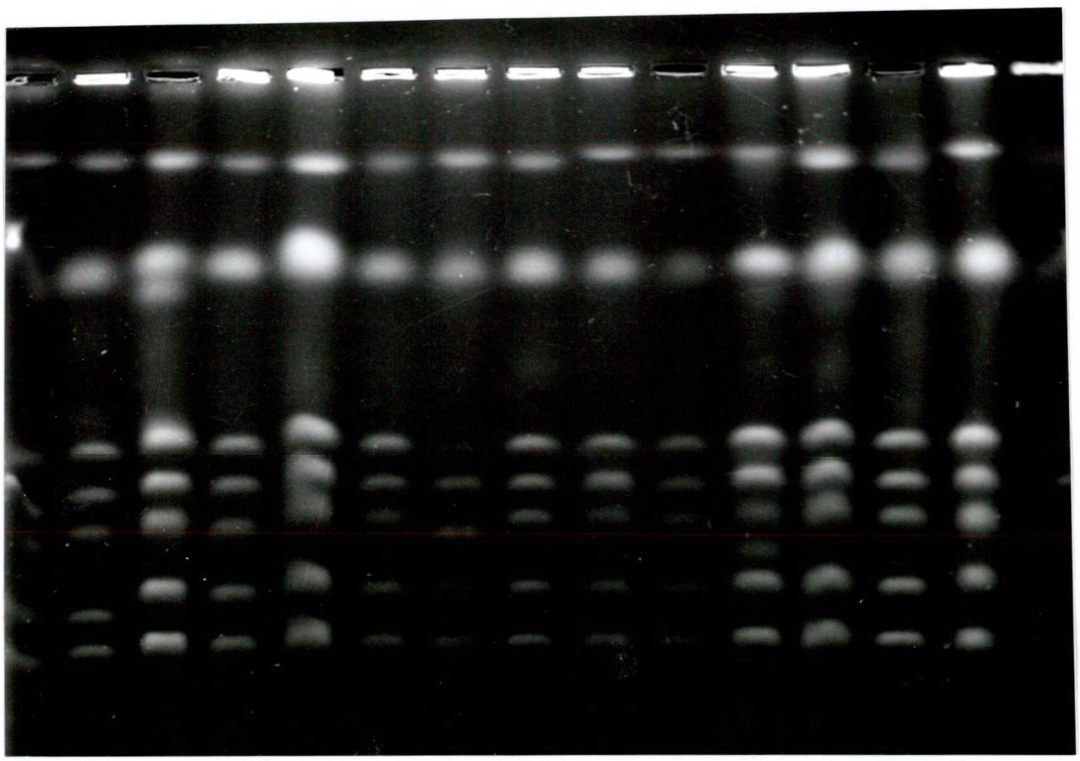
Az eddig ismertetett eredményeink azt sugallták, hogy a *Phaffia rhodozyma* genomja nagyon "plasztikus": gyakran játszódtak le stabil kromoszómális szerkezeti változást eredményező események. Ennek vizsgálatára egy új kísérleti megközelítést alkalmaztunk. Mutagenézissel olyan törzseket hoztunk létre, amelyek egyaránt hordoztak szelekciós hatású mutációkat (pl. auxotrófia) és kromoszóma szerkezeti átrendeződéseket (5. táblázat). A speciális mutánspark létrehozása (Palágyi és mtsi., 1995) γ- és UV-sugárzással történt: ez esetben várható a kromoszómális szerkezeti átrendeződéshez szükséges lánctörések gyakori lejátszódása.

5. táblázat. Két *P. rhodozyma* törzs mutánsainak száma, típusa valamint az előállításukhoz szükséges besugárzási idő

Törzsek	10% túléléshez szükséges besugárzási idő (óra)	Az izolált auxotróf mutánsok típusa és száma	A színmutánsok száma	Rezisztencia mutánsok száma
ATCC 24203 (4)	3,4	Ade$^-$(1), Arg$^-$(2), Lys$^-$(3)	86	-
ATCC24229 (5)	3,5	Arg$^-$(2), Met$^-$(3)	81	4

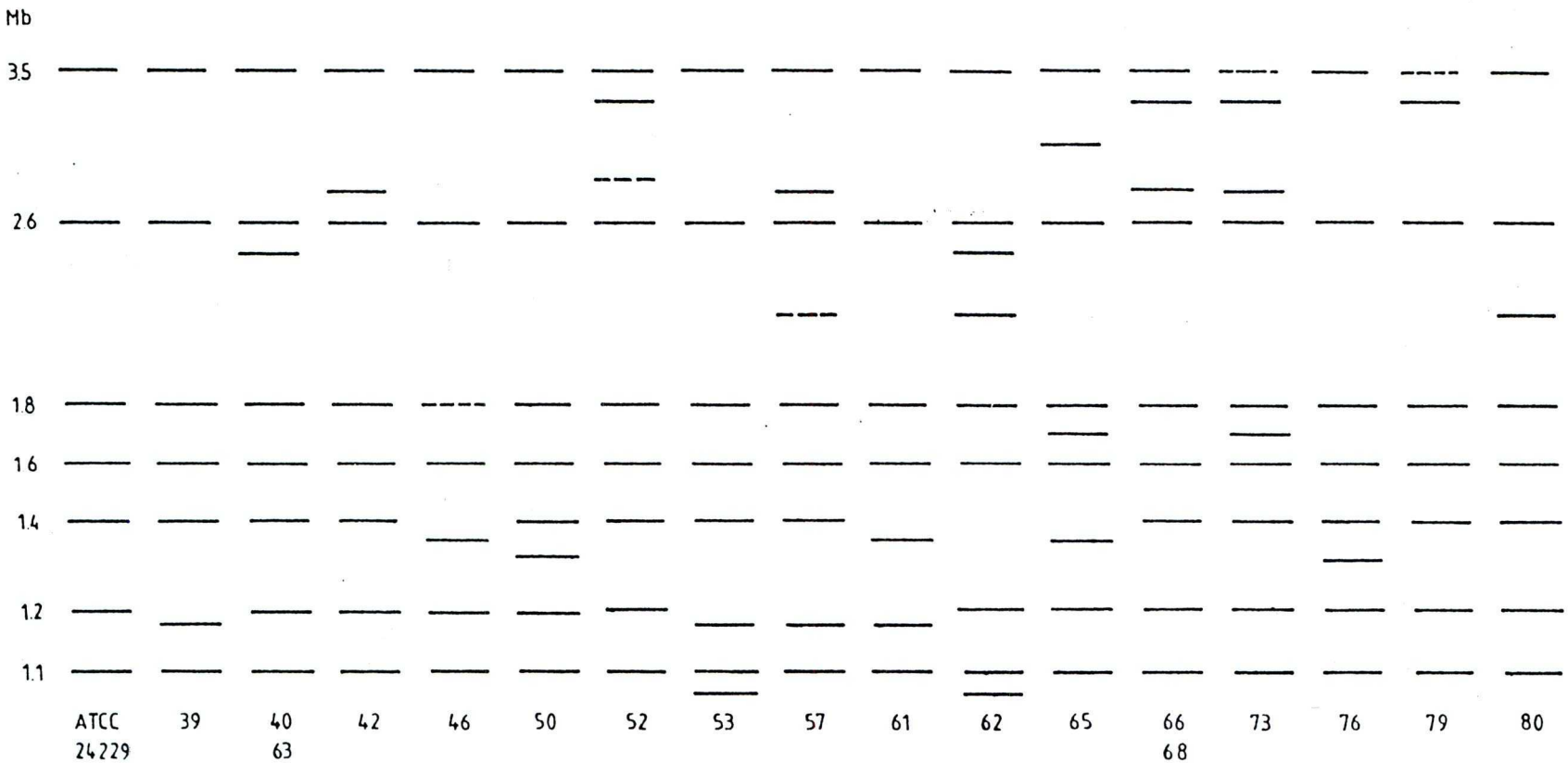


22. ábra. Az ATCC 24203 *Phaffia* törzs (4) és UV, illetve γ-mutációval készített auxotróf és színmutánsainak elektroforetikus kariotípusa diagrammatikus ábrázolásban.



23. ábra. Az ATCC 24229 *Phaffia* törzs (5) és UV, illetve γ-mutációval készített auxotróf és színmutánsainak elektroforetikus kariotípusa. (CHEF)

Elválasztási körülmények; feszültség: 125 V; pulzusidő: 450 s; futási idő: 96 h; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.



24. ábra. Az ATCC 24229 *Phaffia* törzs (5) és auxotróf és színmutánsainak elektroforetikus kariotípusa diagrammatikus ábrázolásban.

52

Elektroforetikus kariotipizálás segítségével jellemeztük a kiindulási "vad törzseket" és a mutánsokat is (22. ábra, 23. ábra, 24. ábra). Több kérdésre is szerettünk volna választ kapni: milyen gyakorisággal következik be kromoszómális átrendeződés egy mutációs kezelés során; vannak-e eltérések a kromoszómaszerelvény egyes tagjainak viselkedésében, azaz vannak-e olyan kromoszómák, amelyek gyakrabban vagy éppen ritkábban szenvednek szerkezeti módosulást; lehet-e statisztikai összefüggést találni egy mutációval kiépített valamely fenotípusos jelleg és bizonyos kromoszómaaberrációk között.

A mutációs gyakoriságot vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 4-es törzsből kapott mutánsok 97 %-ában következett be kromoszómális átrendeződés (22. ábra). A kromoszómális átrendeződések elemzése pedig megerősítette azt a korábbi feltételezésünket, hogy a 2,9 Mb mobilitási csoport két eltérő kromoszómális DNS-hez rendelhető. Az 5-ös törzsnél ellenben, csak a mutánsok 36 %-a mutatott kromoszóma átrendeződést (23. és 24. ábra). Megbizonyosodtunk, hogy az etidiumbromidos festés alapján, "duplának" vélt 2,6 Mb kromoszómális mobiliási csoport valóban komigráció eredménye. A mutánsok kariotípusának elemzése azonban azt jelzi, hogy a 3,5 Mb-os sáv is kettős: ebben az esetben a genomméret 19,3 Mb-ra módosul. A kapott eredmények felvetették azt a kérdést, hogy heterológ kromoszómákról van-e szó vagy erre a kromoszómára nézve aneuploidok a törzsek. A kromoszóma aberrációk bekövetkezése után az életképes mutánsok elektroforetikus kariotípusának elemzése az aneuploiditás tényét látszik igazolni. A genetikailag már sokat elemzett *Saccharomyces cerevisiae* esetében is igen nagy gyakorisággal detektálható aneuploidia (Bidenne,és mtsi., 1992). Az ilyen törzsek egy vagy több kromoszómájukra nézve diszómiát, triszómiát vagy akár tetraszómiát is mutathatnak. Felmerül a kérdés, hogy ezen aneuploid állapot oka esetleg egy korábbi kromoszóma darab elvesztése; a több példányban jelenlevő kromoszómák már nem teljes értékűek, hanem egymást funkcionálisan kiegészítők. Ezt a feltevést, lényegében alig, vagy egyáltalán nem vizsgálták, holott alapvető információkat tárhat fel a genom működéséről. Felvetődik az

kérdés is, hogy a dogmaszerűen haploidnak tartott szervezetek között milyen gyakoriságú lehet az aneuploidia. Bizonyos kromoszómáknál gyakrabban következik be szerkezeti változás, ahol viszont nem detektálható elképzelhető, hogy az itt bekövetkező kromoszóma aberrációk életképtelen utódot eredményeznek.

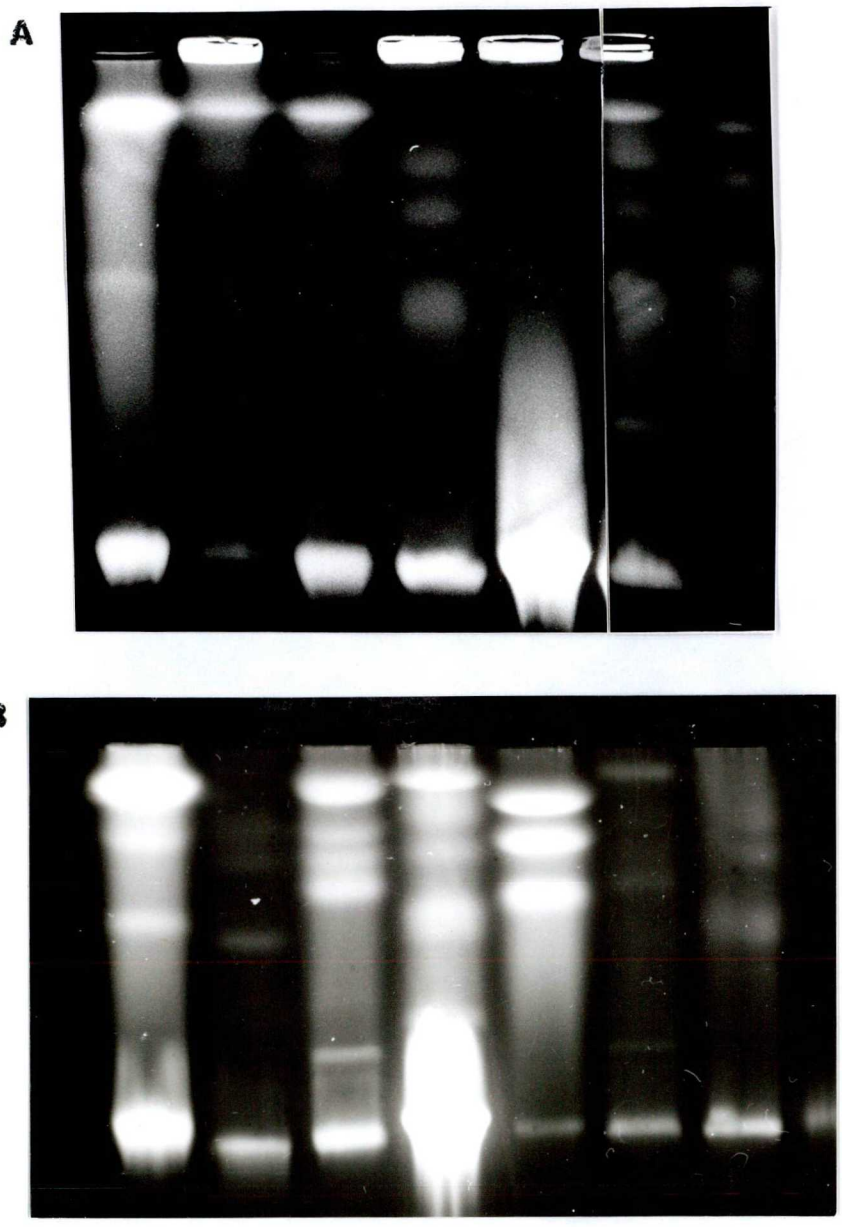
Kísérleteink során nem sikerült összefüggést találnunk egy adott, a mutagenezis után megjelenő fenotípusos jelleg és a kimutatható kromoszóma aberrációk között.

4.4.3. *Claviceps* fajok elektroforetikus kariotípusa

A *Claviceps* nemzetség tagjainak genomszerveződéséről igen keveset tudunk. Kísérleteink eredményeivel a következő kérdésekre kívántunk választ adni. Milyen elektroforetikus mintázatot adnak az azonos fajhoz tartozó, de különböző alkaloidot termelő törzsek. Van-e eltérés az azonos fajhoz tartozó, azonos alkaloidot, de eltérő mennyiségben termelő *Claviceps* törzsek elektroforetikus mintázatában.

A 25. ábra szemlélteti, hogy az azonos fajhoz tartozó, de alkaloid termelésükben különböző törzsek eltérő mintázatot adnak Az ergotamint termelő *Cl. purpurea* (T181/1) törzsnél öt különböző kromoszómális DNS molekulát különítettünk el (1,9; 4,0; 4,7, 5,1 és 6,2 Mb), ugyancsak értékelhető felbontást kaptunk az ergokrisztin termelő *Cl. purpurea* (CK178/1) törzsnél is (3,2; 4,7; 5,7; 6,2 Mb). A szaprofita és a parazita *Cl. paspali* (Cp 5/3 és Cp 27/3) törzseknél egyaránt három kromoszómális sáv (3,2; 4,0 és 4,7 Mb nagyságú) volt elkülöníthető.

Nem volt értékelhető kromoszómális mintázatbeli különbség abban az esetben, ha a törzsek között csak az alkaloidtermelés mértékében volt eltérés. Kis bizonytalanságra adhat okot, hogy a *Claviceps* törzsek bizonyos kromszómái a PFGE rendszer elválaszthatósági határán találhatók (25. ábra). Azok az elimoklavint termelő *Cl. fusiformis* törzsek, amelyek csak az alakloid termelés mennyiségében térnek el egymástól egységesen négy kromoszómális DNS sávval rendelkeznek. A három, jól elkülönülő kromoszóma 3,0 4,6 és 6,0 Mb nagyságú. A legnagyobb kromoszómális DNS sáv



25. ábra. ***Claviceps*** **törzsek elektroforetikus kariotípusa (CHEF).**

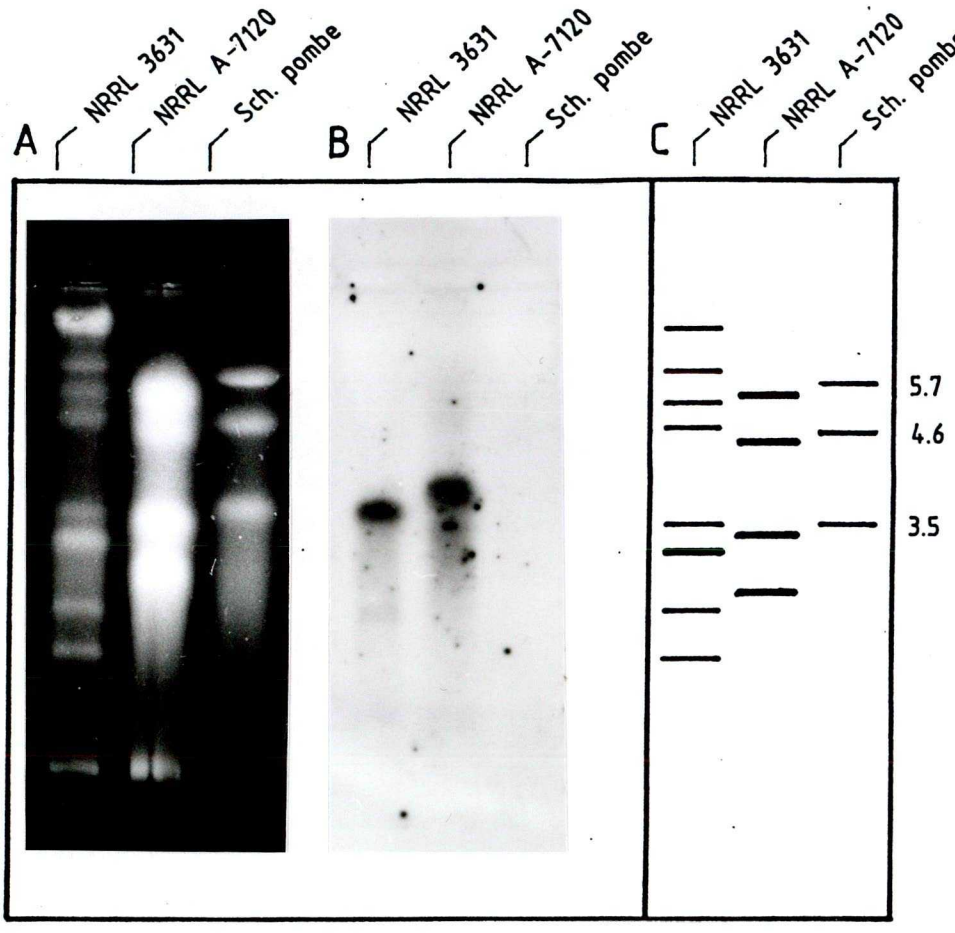
A: 1. sáv: *Cl. fusiformis* (6000γ/ml), 2. sáv: *Cl. fusiformis* (M13/8), 3. sáv: *Cl. fusiformis* (390/5), 4. sáv: *Cl. paspali* (Cp 27/3), 5. sáv: *Cl. purpurea* (T181/1), 6. sáv: *Cl. purpurea* (CK178/1), 7. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-.
Elválasztási körülmények; feszültség: 45 V; pulzusidő: 5000-2000 s; futási idő: 240 h; agaróz koncentráció: 0,8 % CGA; puffer: 0,5 x TBE.

B: 1. sáv: *Cl. fusiformis* (M13/8), 2. sáv: *Cl. paspali* (Cp5/3), 3. sáv: *Cl. purpurea* (T181/1), 4. sáv: *Cl. purpurea* (CK178/1), 5. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-, 6. sáv: *Cl. purpurea* (T181/1), 7. sáv: *Cl. paspali* (Cp 27/3).
Elválasztási körülmények; feszültség: 43 V; pulzusidő: 5000-2000 s; futási idő: 184 h; agaróz koncentráció: 0,8 % CGA; puffer: 0,5 x TBE.

azonban, lényegesen nagyobb, mint a *Sch. pombe* legnagyobb kromoszómája (5,7 Mb). A futási körülmények módosítása ellenére (hosszabb pulzusidő és futási idő valamint kisebb feszültség) sem sikerült ezt a kromoszómális mobilitási csoportot felbontani, annak ellenére, hogy feltehetőleg több, eltérő kromoszómális DNS-t tartalmazó sávról van szó.

5.4.5. *Mucor* fajok elektroforetikus kariotípusa

Mindazok a korábbi próbálkozások, amelyek klasszikus citológiai módszerek alkalmazásával kísérelték meg kondenzált kromoszómák kimutatását, valamely *Mucor* törzsből, sikertelenek voltak. A megelőző időszak munkájának eredményeként, az elektroforetikus kariotipizálás módszerét alkalmazva, először laboratóriumunkban sikerült megbízható adatokat nyerni különböző *Mucor* fajokat reprezentáló törzsek kromoszómaszámára, a kromoszómális DNS méretére és a genom nagyságára vonatkozóan. Ezeket a vizsgálatokat először az egyik leggyakrabban tanulmányozott *Mucor* faj (Linz, és Orlowski, 1991; DiSanto és mtsi., 1992; Schramke és Orlowski, 1993), a *M. circinelloides* két törzsén végeztük el (26. ábra). A vizsgált két törzs teljesen eltérő elektroforetikus mintázatot mutatott; egyetlen kromoszómális mobilitási csoportjuk sem bizonyult azonosnak (6. táblázat). Nyolc elektroforetikus mobilitási csoportra vált szét az NRRL 3631 és négyre az NRRL A-7420 számú törzs. *Sch. pombe* kromoszómális DNS-hez viszonyíva a DNS molekulák mérete az NRRL 3631 törzsnél 2,3 Mb és 8,1 Mb között mozgott, míg az NRRL A-7420 törzs esetében 3,0 és 5,4 Mb között változott. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy az NRRL 3631-es törzs legnagyobb kromoszómája (8,1 Mb) lényegesen nagyobb a DNS markerként használt *Sch. pombe* legnagyobb kromoszómájánál (5,7 Mb), így a kapott értéket csak körülbelüli becsült értéknek tekinthetjük. A fluorescens festés intenzitása alapján az NRRL 3631 törzs 3,1 Mb nagyságú kromoszómáját kettős kromoszómát tartalmazónak tekintettük: ebben az esetben a genomméret 38,7 Mb.



26. ábra. **Két *M. circinelloides* törzs elektroforetikus kariotípusa és hibridizációs analízise(CHEF).**
Az etidium-bromiddal festett gél (A). *Leu* A gén fragmentjével hibridizált filter (B). A kariotípusok diagrammatikus reprezentációja (C). A feltételezett kromoszómális komigrációt vastag vonal jelzi.
Elválasztási körülmények; feszültség: 43, 45 és 47 V; pulzusidő: 5000, 3000 és 2100 s; futási idő: 72, 72 és 72 h; agaróz koncentráció: 0,8 % CGA; puffer: 0,5 x TBE.

Az NRRL A-7420 törzsnél, ha az észlelet négy elektroforetikus mobilitási csoport mindenegyikét mint két eltérő kromoszómális DNS-t vesszük figyelembe, a genomméret 32,6 Mb. Abban az esetben viszont, ha a 3,0 és a 3,4 Mb nagyságú elektroforetikus mobilitási csoportok esetélben három kromoszómális DNS komigrációjával számolunk, a genomméret 39,0 Mb. A kromoszóma szám ilymódon, az NRRL 3631 törzs esetében 9, míg az NRRL A-7420 törzsnél 8, illetve 10 (attól függően, hogy kettő vagy három kromoszómális DNS molekula komigrációjával számolunk).

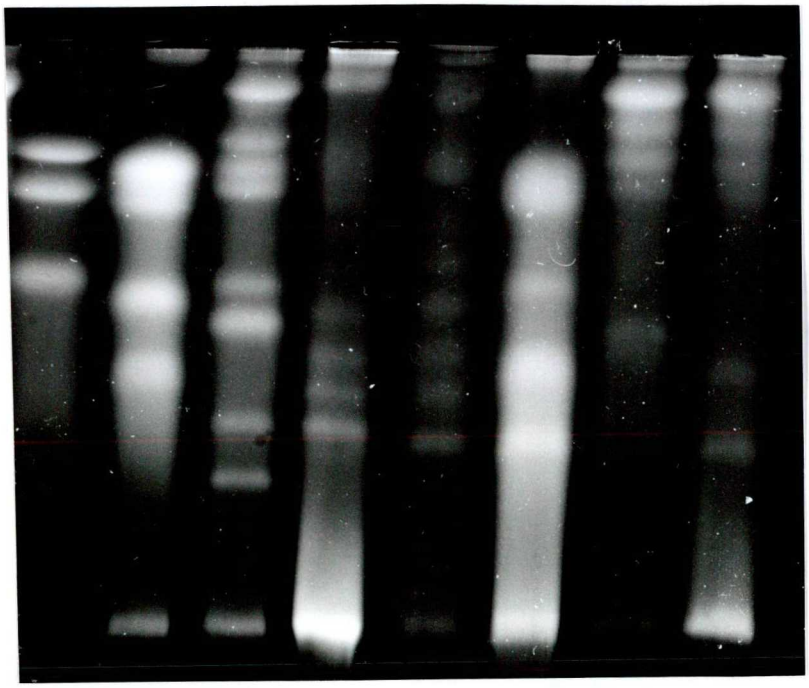
A *M. circinelloides* klónozott *leu*A génjével történő hibridizálás során, a jelölt DNS az NRRL 3631-es törzs esetében a 3,1 Mb kromoszómális sávhoz, az NRRL A-7420 törzsnél pedig a 3,4 Mb nagyságú kromoszómális sávhoz kötődött, addig a *Sch. pombe* egyik kromoszómájához sem hibridizált a *Mucor* gén.

6. táblázat. A kromoszómális DNS-ek és a genom nagyságának becsült értéke két *M. circinelloides* törzs esetében

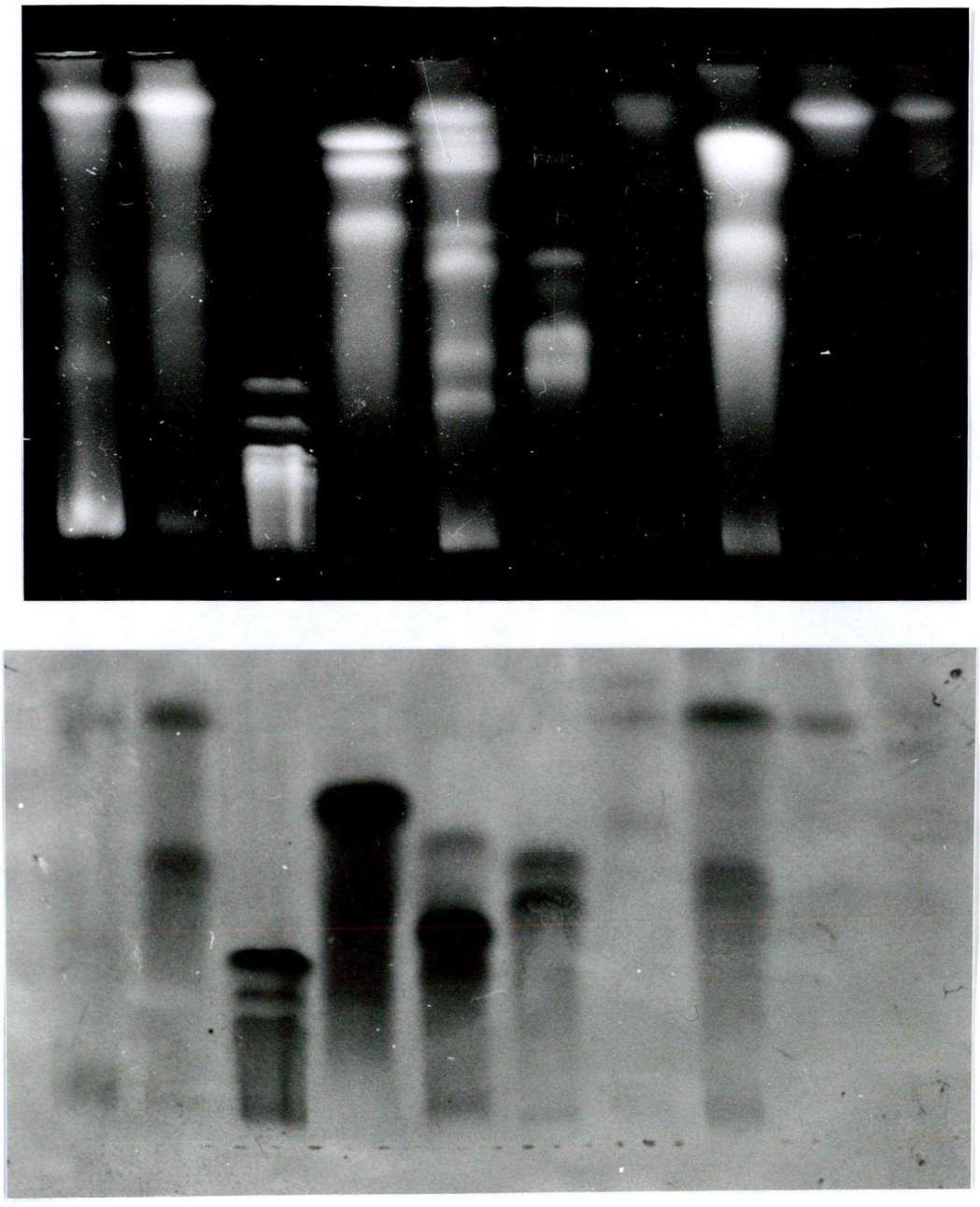
Kromoszómális mobilitási csoport	Törzs NRRL3631	Törzs NRRL A-7120	*Sch. pombe*
1	8,1	5,4*	5,7
2	5,9	4,5*	4,6
3	5,3	**3,4***	3,5
4	4,8	3,0*	
5	3,5		
6	**3,1*[a]**		
7	2,6		
8	2,3		
Genomméret (Mb)	38,7	32,6 vagy 39	13,8

* A feltételezett kromoszómális komigrációkat csillag jelzi.
[a] A klónozott *leu*A próbával jelölődő kromoszómákat kiemelve adjuk meg.

A vizsgálatainkat további izolátumok bevonásával folytattuk (2. táblázat). Ezeket úgy választottuk ki, hogy mind a fajon belüli (*M. circinelloides*), mind a fajcsoport (*M. racemosus-circinelloides* csoport), mind a génusz szintű kromoszóma hossz polimorfizmusról információt kapjunk. Igen nagy kromoszóma polimorfizmust tártunk fel, lényegében törzsszintű különbségek létét jelezve. A 27. és 28. ábrán jól látható, hogy



27. ábra **Hét a *Mucor circinelloides* fajcsoportba tartozó törzs elektroforetikus kariotípusa (CHEF).**
1. sáv: *Sch. pombe* 972 h^- ; 2., 3., 4., 5., 6. sáv: *Mucor circinelloides* fajcsoport tagjai (M50, M20, M34, M23, M17); 7., 8. sáv: *M. plumbeus* (M2, M4).
Elválasztási körülmények; lásd 26. ábra.



28. ábra **Nyolc *Mucor* törzs elektroforetikus kariotípusa és az *A. nidulans* rDNS próbával történő hibridizációs mintázata (CHEF).**
1., 2. sáv: *M. plumbeus* (M2, M4); 3. sáv: *S. cerevisiae* YNN295; 4. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-; 5., 6. sáv: *M. circinelloides* (M20, M25); 7. sáv: *M. racemosus* (M28); 8. sáv *M. circinelloides f. gryseocyanus* (M50); 9. sáv: *M. bainieri* (M51); 10. sáv: *M. mucedo* (M25).
Elválasztási körülmények: lásd 26. ábra.

valamennyi törzs eltérő kromoszómális DNS futási mintázatot adott. Legkevesebb eltérést a két *M. plumbeus* izolátum (M2, M4) elektroforetikus kariotípusában találtunk: azonos kromoszómaszám mellett csak a két legkisebb méretű kromoszómális DNS méretében figyelhető meg különbség. A további megvizsgált *M. circinelloides* törzsek (M17, M20, M23, M34, M50) kromoszómaszáma és nagysága ugyanakkor már jelentősen eltér egymástól. (7. táblázat; 27. ábra). Igen különbözőnek bizonyult a vizsgált *M. racemosus* és *M. mucedo* törzs kromoszómáinak száma is (7, illetve 11) (28. ábra).

A rendelkezésünkre álló homológ és heterológ génpróbák segítségével megkezdtük különböző gének kromoszómához rendelését. Ezen kísérletek eredményeként, kellő számú hibridizációs próba (pl. klónozott gének, RAPD amplifikációs termékek) alkalmazásával, valamennyi elektroforetikus mobilitási csoporthoz gének, illetve bizonyos szekvenciák rendelhetők, ami rendkívüli módon megkönnyítheti ezen törzsek genetikai térképezését. Ez ugyanis az eddig vizsgált *Zygomycetá*knál, a többmagvú meiospórák bonyolult kariotikus állapota és igen rossz csírázási képessége miatt klasszikus genetikai eljárásokkal rendkívül nehéznek, vagy éppen lehetetlennek bizonyult. Munkánk során először a meglehetősen konzervatívnak tartott *A. nidulans* magi rRNS kódoló régiójának kromoszómához rendelését kezdtük meg. A 29. ábra szemlélteti, hogy a jelölt DNS régió nem egy, hanem több kromoszómális DNS sávhoz is kapcsolódik jelezvén, hogy a törzsek genomjában ez a gén több kópiaszámban fordul elő.

Mivel az előkészítő munkánk eredményeként már jelentős számú, eltérő párosodási képességgel rendelkező izolátum is a rendelkezésünkre áll, ezek PFGE-vel történő jellemzése a későbbiekben segíthet megválaszolni azt a kérdést is, hogy van-e valamilyen szerepük a *Mucor* és rokon nemzetségbe tartozó fajok ivaros folyamatainak a kromoszómális polimorfizmus mértékének befolyásolásában.

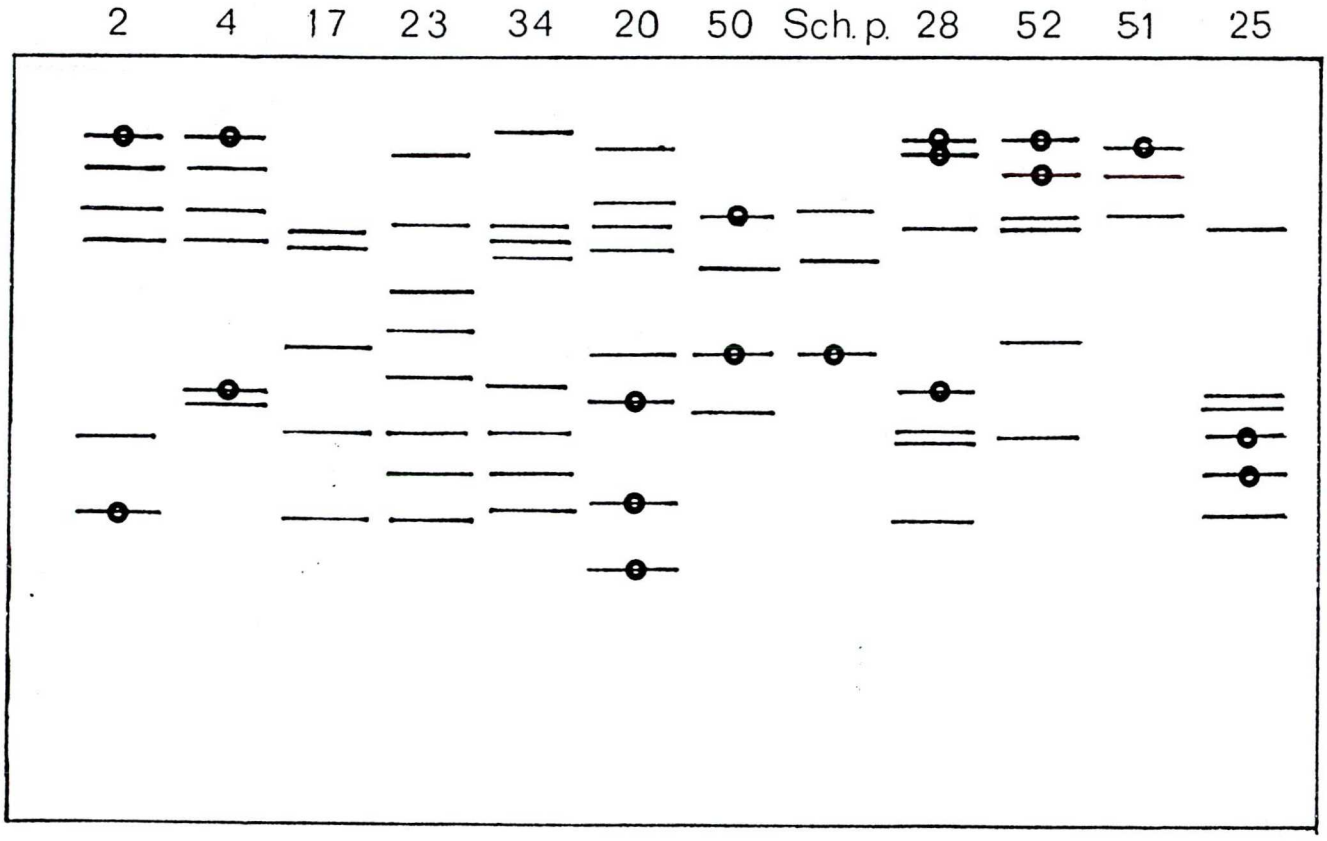
7. táblázat. A kromoszómális DNS-ek és a genom nagyságának becsült értéke 11 *Mucor* törzs esetében.

M2	*M4*	*M17*	*M20*	*M23*	*M34*	*M50*	*M28*	*M52*	*M51*	*M25*	*Sch. pombe*
8,7	8,7	5,1*	8,1	7,7	9,3	5,4*	8,7	8,7*	8,4**	4,8	5,7
7,0	7,0	4,8*	5,9	5,3	5,3	4,5*	7,9	7,0	7,0	3,6	4,6
5,7	5,7	3,6	5,3	4,1	4,9	3,4**	4,4	4,8	5,4	3,1*	3,5
4,9	4,9	2,9*	4,8	3,7	4,6	3,0**	3,2	4,4		2,9	
2,9	3,2	2,5*	3,5	3,3	3,2		3,0	3,6		2,7**	
2,5	3,1		3,1*	2,9	2,9		2,8	2,9		2,4**	
			2,6	2,7	2,7		2,4				
			2,3	2,5	2,5						
31,7[a]	32,6	34,2	38,7	32,2	35,4	39	32,4	40,1	37,6	32,8	13,8
6[b]	6	9	9	8	8	10	7	7	5	11	3

* A feltételezett kromoszómális komigrációkat csillag jelzi.
a Genommérete (Mb)
bKromoszómák száma

SZBGD

62



29. ábra. 11 *Mucor* törzs elektroforetikus kariotípusának diagrammatikus ábrázolása.
A körökkel a klónozott rDNS (pMN1) próbával jelölődő kromoszómákat jeleztük.

4.4.6. *Penicillium* fajok elektroforetikus kariotípusa

Sajátos problémát jelentett a *Penicillium* fajok elektroforetikus kariotípusának megállapítása. Kísérleteinkből úgy tűnt, hogy a vizsgált *P. chrysogenum* törzsek kromoszómális DNS molekulái igen nagyok, a legkisebb is nagyobb, mint az *Sch. pombe* legnagyobb kromoszómája (5,7 Mb). A legnagyobb *Penicillium* kromoszómákat pedig az eddig elválasztott minden DNS molekula méretét meghaladónak becsültük. Valószínű, hogy ez az oka annak, hogy az egyre nagyobb PFGE irodalomban a *P. chrysogenum* kromoszómális DNS molekuláinak elválasztásával kapcsolatban viszonylag hosszú idő elteltével jelent meg az első közlemény (Fierro és mtsi., 1993). Ebben a közleményben is a kapott kromoszómális sávok nagyságrendje a kalibrációs hiányosságok és a nem lineáris elválasztási tartományok megléte miatt inkább csak becsült értéknek (10,4 Mb) tekinthető, amely a további vizsgálatok során még nagymértékben változhat.

Az általunk végzett kísérletekben az igen nagy kromoszómális DNS molekulák elválasztására új, az eddigiektől eltérő megközelítési módot próbáltunk találni. Több elválasztási paramétert a szokásos alkalmazási tartományon túl is változtattunk. Ezek a paraméterek a következők voltak:

-az agaróz koncentrációja

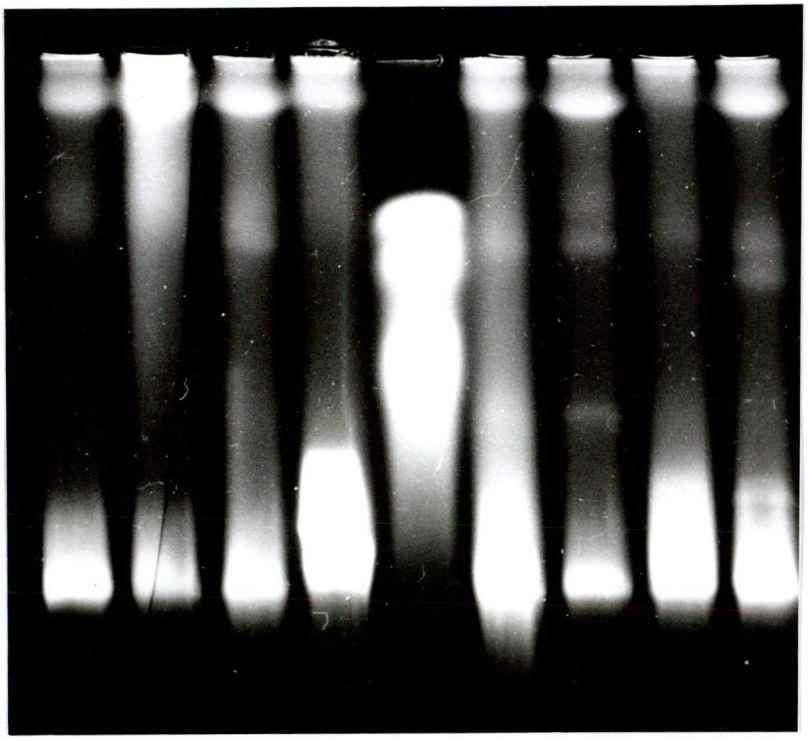
-szeparálási idő

-pulzusidő

-Az agarózkoncentráció csökkentése a várt eredményt nem hozta meg. (lásd a 5.3. fejezet).

-A futási idő növelése, akár 15 napig. A hosszú futási idő alatt az elválasztandó kromoszómális DNS molekulák jelentős mértékben degradálódtak. Az átlagos futási időnél lényegesen hosszabb idő a kontrollként használt *Sch. pombe* kromoszómák elválasztását is erősen rontotta.

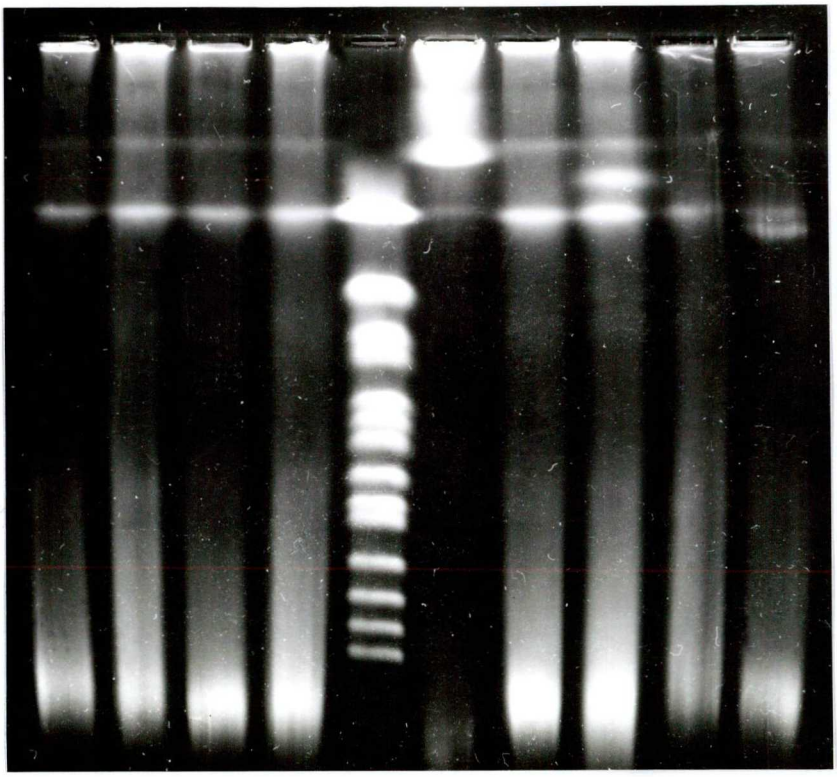
-Nem javított az elválasztás eredményességén a hosszabb pulzusidő (8000 s vagy ennél hosszabb) alkalmazása sem. Hosszabb, illetve rövidebb pulzusidők együttes kombinálása sem hozta meg a kívánt eredményt (30. ábra).



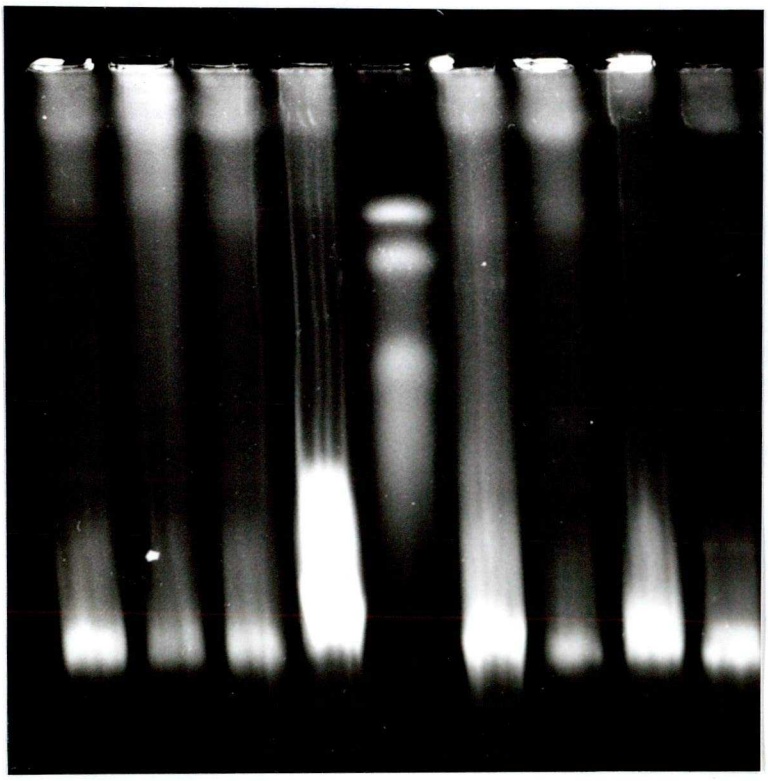
30. ábra. **Nyolc *Penicillium* törzs elektroforetikus kariotípusa (CHEF).**
1.-4. sáv: *P. chrysogenum* (51, B25, Q176; 03); 5. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-, 6.-7. sáv: *P chrysogenum* (P2, 807); 8.-9. sáv: *P. notatum* (21, 31)
Elválasztási körülmények; feszültség: 40 V; pulzusidő: 7200→6000 és 3600→3000 s; futási idő: 164 és 123 h; agaróz koncentráció: 0,6 % CGA; puffer: 0,5 x TBE.

Felmerült a ritka hasítási helyű restrikciós enzimek (pl. *Not*I, *Sfi*I) alkalmazása és a segítségükkel előállított kisebb kromoszómális DNS molekulák PFGE-vel történő szétválasztása. Azonban ez a megközelítés is csak akkor hozhatott volna megfelelő eredményt, ha az intakt kromoszómális DNS molekulákat már előzőleg szét tudtuk volna választani, és így lehetőség nyílt volna nagyszámú DNS fragment megbízható azonosítására.

A különböző módon paraméterezett PFGE elválasztások során minden esetben egy széles, intenzív sávot kaptunk a legalsó régióban. Ez a diffúz sáv a kész kontrollokban (Bio Rad) nem, vagy csak alig kimutathatóan jelent meg. Feltételeztük, hogy a mintapreparálás során keletkezett kettős szálú DNS molekulákról van szó; ezek a sávok ugyanis sem RN-áz kezelés, sem S1 nukleáz emésztés során nem tűntek el. Ezen alsó sávozottság vizsgálata során, olyan futási paraméterek alkalmazására is sor került, melyek a *S. cerevisiae* kromoszómális DNS molekuláit képesek szétválasztani (31. ábra). Ekkor derült ki, hogy az általunk vizsgált *Penicillium* fajok a *Sch. pombe* kromoszómáinál is kisebb, illetve a 3,5 - 5,7 Mb mérettartományba eső kromoszómális DNS molekulákkal is rendelkeznek. Ugyanakkor a legnagyobb kromoszómák az eddig PFGE-vel elválasztott kromoszómális DNS molekula méretét meghaladó tartományba esnek (>≈12 Mb; 32. ábra). Ez azt jelenti, hogy a *Penicillium* törzsek kromoszómális DNS molekuláinak elválasztása igen nehéz: nehezen képzelhető el minden egyes kromoszómának egy PFGE szeparáláson belüli megfelelő szétválása.



31. ábra. **Nyolc *Penicillium* törzs elektroforetikus kariotípusa (CHEF).**
1.-4. sáv: *P. chrysogenum* (51, B25, Q176; 03); 5. sáv: *S. cerevisiae* YNN 295, 6. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-, 7.-8. sáv: *P. chrysogenum* (P2, 807); 9.-10. sáv: *P. notatum* (21, 31)
Elválasztási körülmények; feszültség: 200 és 50 V; pulzusidő: 75, és 1800 s; futási idő: 20, és 48 h; agaróz koncentráció: 0,9 % CGA; puffer: 0,5 x TBE.

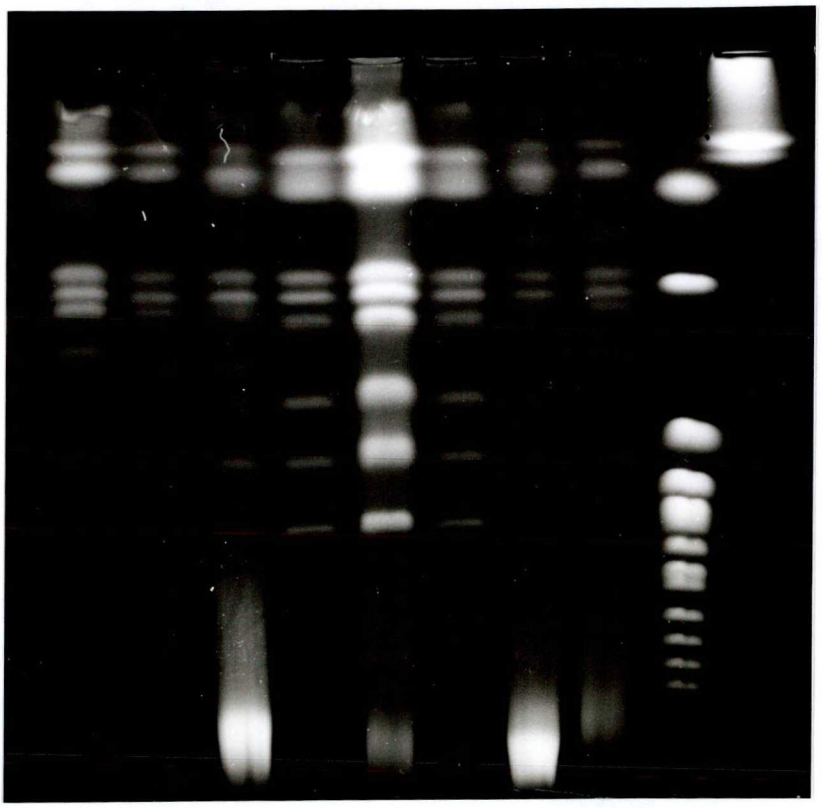


32. ábra. **Nyolc *Penicillium* törzs elektroforetikus kariotípusa (CHEF).**
1.-4. sáv: *P. chrysogenum* (51, B25, Q176; 03); 5. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-, 6.-7. sáv: *P. chrysogenum* (P2, 807); 8.-9. sáv: *P. notatum* (21, 31).
Elválasztási körülmények; feszültség: 43 V; pulzusidő: 7200, 3500, 2500 és 2200 s; futási idő: 120, 72, 48, és 48 h; agaróz koncentráció: 0,6 % CGA; puffer: 0,5 x TBE.

4.5. A PROTOPLASZTFÚZIÓVAL LÉTREHOZOTT HIBRIDEK PFGE ANALÍZISE.

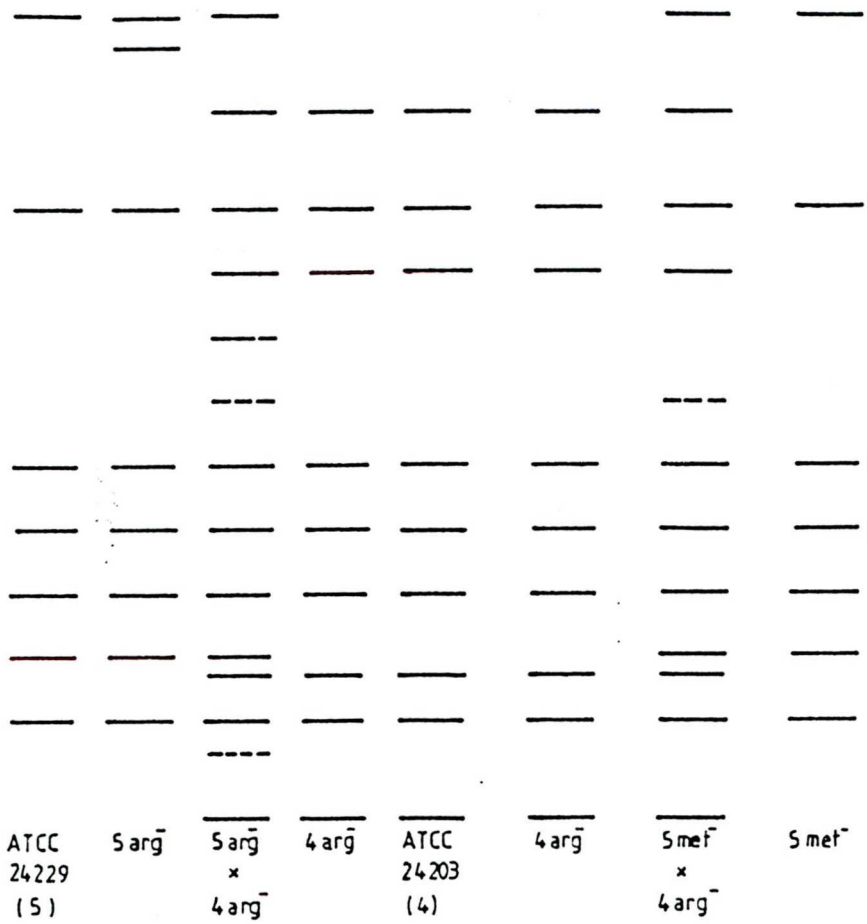
A kutatási program keretében azt is megvizsgáltuk, hogy alkalmas-e a PFGE a hibridizációs kísérletek eredményeinek nyomonkövetésére. Ezeket a vizsgálatokat *Phaffia rhodozyma* és *Aspergillus nidulans* megfelelően markerezett auxotróf törzseiből kiindulva végeztük. A *Phaffia* ATCC 24203 (4) és az ATCC 24229 (5) törzse esetében a kromoszómális mintázat eltérései miatt az elektroforetikus kariotipizálás segítségével analizálni tudtuk a létrehozott hibrid kromoszómaállományát és bizonyítani lehetett fúziós termék voltát (33. és 34. ábra).

Hasonlóképpen tanulmányoztuk két haploid *A. nidulans* törzs és diploid fúziós termékük kromoszómamintázatát is (35. ábra). A két, auxotrófia és színmarkerekkel rendelkező törzs (SzMC 1156; y, paba$^-$, ade$^-$ és SzMC 1157; y, paba$^-$, lys$^-$) az R 21 jelű törzs származék, ahol az SzMC 1156 DNS molekulái azonos számúak és nagyságúak (2,9; 3,3; 3,8; 4,2; 4,5; 5,0 Mb) az R 21 szülői törzsével, míg az SzMC 1157 legnagyobb kromoszómális DNS fragmentje 5,3 Mb nagyságú. Ez a kariotípusbeli különbség lehetővé tette a hibridizációs folyamat nyomonkövetését, igazolását.

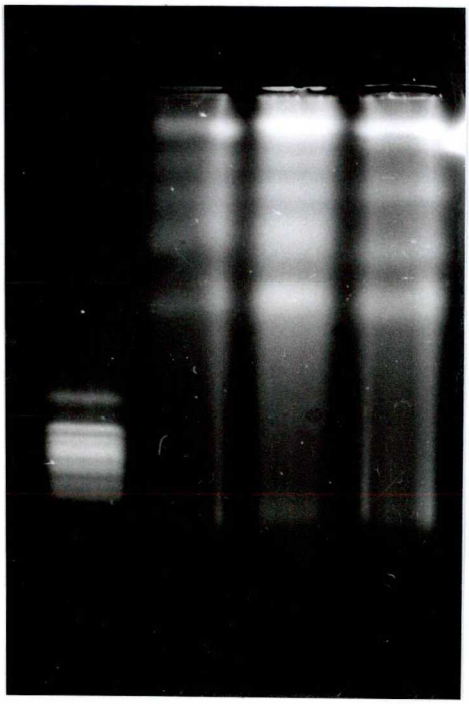


33. ábra **Protoplasztfúzióval létrehozott hibrid és szülői törzsek elektroforetikus kariotípusa (CHEF).**

1. sáv: *P. rhodozyma* (5); 2. sáv: 5 arg^-; 3. sáv: 5 arg^- x 4 arg^-; 4. sáv: 4 arg^-; 5. sáv: *P. rhodozyma* (4); 6. sáv: 4 arg^-; 7. sáv: 5 met^- x 4 arg^-; 8. sáv: 5 met^-; 9. sáv: *S. cerevisiae* YNN295, 10. sáv *Sch. pombe* 972 h^-.
Elválasztási körülmények; feszültség: 180 és 140 V; pulzusidő: 100, 300 s; futási idő: 16 és 24; agaróz koncentráció: 0,9 % SERVA; puffer: 0,5 x TBE.



34. ábra. **Protoplasztfúzióval létrehozott hibrid és szülői törzsek elektroforetikus kariotípusának diagrammatikus ábrázolása.**



35. ábra. Haploid és diploid *Aspergillus* törzsek elektroforetikus kariotípusa (CHEF).

1. sáv: *Sch. pombe* 972 h^-; 2. sáv: *A. nidulans* SzMC 1157 (haploid); 3. sáv: *A. nidulans* R21; 4. sáv: *A. nidulans* SzMC 1156, 5. sáv: *A. nidulans* 1156 x 1157 (diploid).

Elválasztási körülmények; feszültség: 47 V; pulzusidő: 4000 →1200 s; futási idő: 162 h; agaróz koncentráció: 0,8% CGA; puffer: 0,5 x TBE.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleti programunk során elméleti és gyakorlati jelentőségű mikroszkópikus gombák genomszerveződését vizsgáltuk pulzáltatott gélelektroforézis (PFGE) segítségével.

- Munkánk eredményeként adatokat nyertünk a biotechnológiai szempontból jelentős *Phaffia rhodozyma* élesztőgomba ezt megelőzően teljesen ismeretlen genetikai állományáról: meghatároztuk a magi genom méretét, a kromoszómális DNS-ek számát és nagyságát. Több izolátum elektroforetikus kariotípusának összhasonlító analízisével kimutattuk, hogy a *P. rhodozyma* fajon belül jelentős kromoszóma hossz polimorfizmus létezik; vizsgáltuk ennek jellegét és mértékét.

- Nagyszámú *P. rhodozyma* mutáns előállításával és elektroforetikus kariotípusuk elemzésével vizsgáltuk, hogy milyen gyakorisággal következik be kromoszómális átrendeződés az alkalmazott mutációs kezelés (esetünkben γ- és UV-besugárzás) során; továbbá, hogy milyen eltérések vannak a kromoszómaszerelvény egyes tagjainak viselkedésében, valamint lehet-e összefüggést találni egy mutációval kiépített valamely fenotípusos jelleg és bizonyos kromoszómaaberrációk között. Információkat nyertünk ezen élesztőgombák ploiditási szintjéről is.

- Eredményeink révén először nyertünk betekintést egy *Mucor* törzs kromoszómális állományának szerveződésébe. Meghatároztuk a *M. circinelloides* faj több törzsének kariotípusát; feltártuk a fajon belüli kromoszóma hossz polimorfizmus mértékét és jellegét. Össszesen 5 különböző *Mucor* faj (*M. bainieri*, *M. circinelloides*, *M. mucedo*, *M. racemosus*, *M. plumbeus*) több törzsét vizsgálva, szereztünk adatokat a genom szerveződéséről és a génuszon belüli kromoszómális polimorfizmusról.

- A *Phaffia rhodozyma* és a vizsgált *Mucor* fajok esetében (ahol a klasszikus genetikai eljárások alkalmazása nehéz, vagy éppen lehetetlen) megkezdtük a genom kromoszómális génlokalizáció révén történő markerezését. Ez megnyitja az utat a további részletes genetikai elemzés előtt ebben a két fontos nemzetségben.

- Először tudtunk érdemi információt szerezni a *Claviceps* génuszba tartozó fajok genom méretéről és kromoszómaszámáról.

- Eredményeket értünk el ipari *Penicillium* törzsek elektroforetikus kariotipizálásában.

- A PFGE eljárást nemcsak vad törzsek és mutáns származékaik jellemzésére használtuk fel, hanem két gombafaj esetében (*P. rhodozyma* és *A. nidulans*) sikerrel alkalmaztuk hibridizációs események (protoplasztfúzió) nyomonkövetésére is. Analizáltuk a fúziós partnereket, a belőlük létrehozott hibridek, illetve rekombináns törzsek kromoszómális állományát. Bizonyítottuk, hogy a PFGE segítségével követni és igazolni lehet a fúziós esemény lejátszódását, az egyes kromoszómák szegregációját.

- Kidolgoztunk új, illetve tökéletesítettünk olyan kísérleti technikákat, amelyek elősegítik mikroszkópikus gombák elektroforetikus kariotipizálását.

A felsorolt eredmények számos új összefüggéssel bővítik a mikroszkópikus gombák genomszerveződésével kapcsolatos ismereteinket. Segítik a tanulmányozott gombákkal folytatott genetikai kutatást éppúgy, mint a gyakorlati célú törzsnemesítést.

6. IRODALOMJEGYZÉK

Adrio, J.L., Veiga, M., Casqueiro, J., López, M. and Fernandez, C. (1993). Isolation of *Phaffia rhodozyma* auxotrophic mutants by enrichment methods. J. Gen. Appl. Microbiol. 39, 303-312.

Alexopoullos, C.J., Mims, C. W. and Blackwell, M. (eds.) (1996). Introductory Mycology 291-295. John Wiley and Sons, Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapure.

An, G.-H. and Johnson, E.A. (1990). Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol., 57, 191.

An, G.-H., Bielich, J., Auerbach, R. and Johnson, E.A. (1991). Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. BioTechnology 9, 70-73.

Andrewes, G., Phaff, H.J. and Starr, M.P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. Phytochem. 15, 1003-1007.

Ball, C. (1985). Perspectives for protoplasts in genetics of industrially important fungi. 337-345. *In* Fungal protoplasts: Application in Biochemistry and Genetics. Peberdy, J.F. and Ferenczy, L. (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.

Bancroft, I. and Wolk, C.P. (1988). Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE). Nucleic Acids Res. 16, 7405-7418.

Bianchi, M.L., Cattaneo, P.A:, Crespi-Perellino, N., Guicciardi, A., Minghetti, A. and Spalla, C. (1982). Mechanisms of control in the qualitative biosynthesis of lysergic acid alkaloids.235-242. *In* Overproduction of Microbial Products. Krumphanzl, V., Sikyta, B. and Vanèk, Z. (eds.). Academic Press, London, New York.

Jósef Attila Tudományegyetem SZEGED

Bidenne, C. Blondin, B., Dequin, S. and Vezinhet, F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* Curr. Genet. 22, 1-7.

Birren, B. and Lai, E. (1993). Pulsed field gel electrophoresis: A practical guide. 107-121. *In* Pulsed field gel electrophoresis Birren, B. and Lai, E. (eds.). Academic Press, Inc. San Diego, New York.

Birren, B.W., Lai, E., Clark, S.M., Hood, L. and Simon, M.I. (1988). Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. Nucleic Acids Res. 16, 7563-7582.

Borsuk, P. A., Nagieç, M. M., Stepien, P. P. and Bartnik, E. (1982). Organization of the ribosomal RNA gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Gene 17, 147-152.

Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G.K. and Braun, M.J. (1993). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. Methods Enzymol. 224, 294-309.

Brody, H. and Carbon, J. (1989). Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6260-6263.

Cantor, C.R., Smith, C.L. and Mathew, M.K. (1988). Pulsed-field gel electrophoresis of very large molecules. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17, 287-304.

Carle, G.F. (1992) Field-inversion gel electrophoresis 3-18. *In* Pulsed-field gel electrophoresis. Methods in Molecular Biology, Vol. 12 Burmeister, M. and Ulanovsky, L. (eds.). The Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Carle, G.F., Frank, M. and Olson, M.V.(1986). Electrophoretic separations of large molecules by periodic inversion of the electric field. Science 232, 65-68.

Carle, G.F. and Olson, M.V. (1984). Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field alternation gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 12, 5647-5664.

Carle, G.F. and Olson, M.V. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3756-3760.

Chu, W., Magee, B.B. and Magee, P.T. (1993). Contruction of an *Sfi*I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. J. Bacteriol. 175, 6637-6651.

Chu, G., Vollrath, D. and Davis, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Sience 234, 1582-1585.

Chun, S.B., Chin, J.E., Bai, S. and An, G.-H. (1992). Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. FEMS Microbiol. Lett. 93, 221-226.

Clark, S.M., Lai, E., Birren, B.W. and Hood, L. (1988). A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric field. Science 241, 1203

Crackower, S. and Bauer, H. (1971). Mitosis in *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium notatum*. Can. J. Microbiol. 17, 605-608.

Debets, A.J.M., Holub, E.F., Swart, K., van den Broek, H.W.J. and Bos, C.J (1990). An electrophoretic karyotype of *Aspergillus niger*. Mol. Gen. Genet. 224, 264-268.

Deutsch JM: Theoretical studies of DNA during gel electrophoresis. Science 240, 922-924, 1988.

Devoyod, J.J. (1988). Microbial accidents in cheese making due to *Mucor*. Microbiologie-Aliments-Nutrition 6, 25-29.

DiSanto, M. E., Li, Q., Longan, D. A. (1992). Purification and characterization of a developmentally-regulatedcarboxypeptidase from *Mucor racemosus*. J. Bacteriol. 174, 447-455.

Dixon, R. and Kinghorn, J.R. (1990). Separation of large DNA molecules by pulsed field gel electrophoresis. Soc. Gen. Microbiol. Quart. 17(4), 86-88, 1990.

Eby, M.J.(1990). Pulsed-field separations: continued evolution. Bio/Technology 8, 243-245.

Esser, K. and Düvell, A. (1984). Biotechnological exploitation of the ergot fungus (*Claviceps purpurea*) Process Biochem. 19, 142-149.

Esser, K. and Tudzynski, P. (1978). Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. Theor. Appl. Genet. 53, 145-149.

Fangman, W.L.(1978). Separatios of very large DNA molecules by gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 5(3), 654-665.

Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132, 6-13.

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

Ferris, S., Freeby, S., Zoller, P., Ragsdale, C. and Stevens, A. (1989). A megabase DNA electrophoresis system. IBL 7, 24-27,

Fierro, F., Gutiérrez, S., Díez, B. and Martín, J.F. (1993). Resolution of large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9,6 Mb) in *Penicillin notatum* and chromosome I (10,4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*.

Gallagher, R.T. and Latch, G.C.M. (1977). Production of tremorgenic mycotoxins verruculogen and fumitremorgin B by *Penicillium piscarum* Westling. Appl. Environ. Microbiol. 33, 730-731.

Gardiner, K. (1992). Transverse alternating-field electrophoresis 51-61. *In* Pulsed-field gel electrophoresis. Methods in Molecular Biology, Vol. 12: Burmeister, M. and Ulanovsky, L. (eds.). The Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Gardiner, K., Laas, W. and Patterson, D. (1986). Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. Somatic Cell Mol. Genet. 12, 185-195.

Geiser, D.M., Arnold, M.L. and Timberlake, W.E. (1994). Sexual origins of British *Aspergillus nidulans* isolates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2349-2352.

Godtfredsen, S.E. (1990). Microbial lipase. 255-274. *In* Microbial enzymes and biotechnology. Fogarty, W.M. Kelly, C.T. (eds) Elsevier Applied Science Publishers, London

Golubev, W.I. (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Yeast 11, 101-110

Gunderson, K. and Chu, G. (1991). Pulsed-field electrophoresis of megabase-sized DNA. Mol. Cell. Biol. 11, 3348-3353.

Hamlyn, P.F., Wales, D.S. and Sagar, B.F. (1982). Extracellular enzymes of *Penicillium*. 245-284. *In. Penicillium* and *Acremonium* Biotechnology Handbooks. Peberdy J.F. (eds.). Plenum Press New York and London.

Harris, C.M., Robertson,J.S. and Harris, T. M. (1976) Biosynthesis of griseofulvin. J. Am. Chem. Soc. 98, 5380-5386.

Heller, C. and Pohl, F.M. (1989). A systematic study of field inversion gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 17(15), 5989-6002.

Hogg, J.A. (1992). Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. Steroids 57, 593-616.

Javerzat, J. P., Jacquier, C. and Barreau, C. (1993). Assignment of linkage groups to the electrophoretically-separated chromosomes of the fungus *Podospora anserina* Curr. Genet. 24, 219-222.

Kayser, T., and Wöstemeyer, J. (1991). Electrophoretic karyotype of the zygomycete *Absidia glauca*: evidence for differences between mating types. Curr. Genet. 19, 279-284.

Keller, U. (1983). Highly efficient mutagenesis of *Claviceps purpurea* by using protoplasts. Appl. Environ. Microbiol. 46, 580-584.

Kistler, H.C. and Miao, V.P.W. (1992). New modes of genetic change in filamentous fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 30, 131-152.

Klotz, L.C. and Zimm, B.H. (1972). Retardation times of deoxyribonucleic acid solutions. II. Improvements in apparatus and theory. Macromolecules 5, 471-481.

Lai, E., Birren, B.W., Clark, S.M., Simon, M.I. and Hood, L.(1989) Pulsed field gel electrophoresis. Bio/Techniques 7(1), 34-42.

Linz, J. E., and Orlowski, M. (1991).Differential gene expression and evidence of selective translation during anaerobic germinations *Mucor racemosus* sporangiospores. J. Gen. Microbiol. 137, 827-835.

Longo, E. and Vezinhet, F. (1993). Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 59, 322-326.

Maleska, R. and Clark-Walker, G.D. (1990). Magnification of the rDNA cluster in *Kluyveromyces lactis*. Mol. Gen. Genet. 223, 342-344.

McCluskey, K. and Mills,D. (1990). Identification and characterization of chromosome length polymorphisms among strains representing fourteen races of *Ustilago hordei*. Mol. Plant-Microbe Interact. 3, 366-373.

McCluskey, K., Russell, B.W. and Mills, D. (1990). Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplasts. Curr. Genet. 18, 385-386.

Michailides, T.J.(1991). Characterization and comparative studies of *Mucor* isolates from California and Chile. Plant. Dis. 75, 373-380.

Michailides, T.J. and Spotts, R.A. (1990). Transmission of *Mucor piriformis* to fruit of *Prunus persica* by *Carpophilus spp.* and *Drosofila melanogaster*. Plant Dis. 74, 287-291.

Miller, M.W., Yoneyama, M. and Soneda, M. (1976). *Phaffia* a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomyces). Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 286-291

Mills, D. and McCluskey, K. (1990). Electrophoretic karyotypes of fungi: The new cytology. Mol. Plant-Microbe Interact. 3, 351-357.

Moody, S.F. and Tyler, B.M. (1990). Use of nuclear DNA restriction fragment length polymorphisms to analyse the diversity of *Aspergillus flavus* group: *A flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*. Appl. Enviroment. Microbiol. 56, 2453-2461.

Nagy, Á., Garamszegi, N., Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy L. (1994). Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains FEMS Microbiol. Lett. 123, 315-318.

Noolandi, J. and Turmel, C. (1992). Preparation, manipulation, and pulse strategy for one-dimensional pulsed field gel electrophoresis (ODPFGE) 73-103. *In* Pulsed-field gel electrophoresis. Methods in Molecular Biology, Vol. 12. Burmeister, M. and Ulanovsky, L. (Eds.). The Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Normansell, P.J.M., Normansell, I.D. and Holt, G. (1979). Genetic and biochemical studies of mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin biosynthesis. J. Gen. Microbiol. 112, 113-126.

Ono, B. and Ishino-Arao,Y. (1988). Inheritance of chromosome length polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 14, 413-418.

Orbach, M.J., Vollrath, D., Davis, R.M. and Yanofsky, C. (1988) An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. Mol. Cell. Biol. 8, 1469-1473.

Orlowski, M. (1991). *Mucor* dimorphism. Microbiol. Rev. 55, 234-258.

Palágyi, Zs., Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy, L. (1995). A new mutation protocol for obtaining auxotrophioc mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Techiques. 9, 401-402.

Peberdy, J.F. (1985). Fungal protoplasts: Application in Biochemistry and Genetics. 31-44. Fungal protoplasts. Peberdy, J. F. and Ferenczy, L. (eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.

Pertot, E., Gaberc-Porekar, V. and Socic, H. (1990). Isolation and characterization of an alkaloid-blocked mutant of *Claviceps paspali*. J. Basic Microbiol. 30, 51-56.

Plummer, K.M. and Howlett, B.J. (1993). Major chromosomal length polymorphisms are evident after meiosis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* Curr.Genet. 24, 107-113.

Rehácek, Z. (1982). Physiology of ergot alkaloid production in submerged *Claviceps* cultures. 221-234. *In* Overproduction of Microbial Products Krumphanzl, V., Sikyta, B. and Vanèk, Z. (eds.). Academic Press, London, New York.

Roncero, M.I.G., Jepsen, L. P., Strøman, P., Heeswijck, R. (1989). Characterization of a LeuA gene and ARS elements from *Mucor circinelloides*. Gene 84, 335-343.

Roy, G., Wallenburg, J.C. and Chartrand, P. (1988). Inexpensive and simple set-up for field inversion gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 16, 768.

Russell, P.J. and Rodland, K.D. (1986). Magnification of rRNA gene number in a *Neurospora crassa* strain with a partial deletion of the nucleolus organizer. Chromosoma 93, 337-340.

Rustchenko, E.P., Curran, T.M. and Sherman (1993). Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 175. 7189-7199.

Rustchenko, E.P., Howard, D.H. and Sherman, F. (1994). Chromosomal alternations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. J. Bacteriol. 176, 3231-3241.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (eds.): Molecular cloning: a laboratory manual. (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schramke, M. L. and Orlowski, M. (1993). Mitochondrial genome of the dimorphic zygomycete *Mucor racemosus*. Curr. Genet. 24, 337-343.

Schroeder, W.A. and Johnson, E.A. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 139, 907-912.

Schumann, B., Maier, W. és Gröger, D. (1987). Characterization of some *Claviceps* strains derived from regenerated protoplasts. Z. Naturforsch 42, 381-386.

Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37, 67-75.

Schwartz, D.C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. and Cantor, C.R. (1982). New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 189-195.

Schwartz, D.C. and Koval, M. (1989). Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis. Nature 338, 520-522.

Serwer, P. (1987). Gel electrophoresis with discontinous rotation of the gel: an alternative to gel electrophoresis with changing direction of the electric field Electrophoresis 8, 301-304.

Serwer, P., Watson, R.H. and Son, M. (1992). In-gel detection of DNA. 333-343. In Pulsed-field electrophoresis. Methods in molecular biology 12. Burmeister, M. Ulanovsky, L. (eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey.

Skinner, D.Z., Budde, A.D. and Leong, S.A. (1991). Molecular karyotype analysis of fungi 86-103. *In* More gene manipulations in fungi. Bennett, J.W., Lasure, L.L. (eds). Academic Press, San Diego.

Smith, C.L. and Cantor, C.R. (1987). Preparation and manipulation of large DNA molecules: advances and applicationes. TIBS 12, 284-287.

Smith, C.L., Klco, S.R. and Cantor, C.R. (1988). Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large molecules, 41-72. *In* Genome analysis: A practical approach. Davis, K.E. (eds.). IRL Press, Oxford, Washington.

Smith, C.L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S.R., Fan, J.-B., Yanagida, M. and Cantor, C.R. (1987). An electrophoretic karyotype of *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 15, 4481-4489.

Smith, C.L., Warburton, A.G., Gaal, A. and Cantor, C.R. (1986). Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed field gradient gel electrophoresis, 45-70. *In* Genetic engineering. Vol. 8. Setlow, J.K. and Hollaender, A. (eds.). Plenum Publishing Corp., New York.

Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A., and Fletcher, D.S. (1987). A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis Nucleic Acids Res. 15, 5925-5943.

Spalla, C. and Marnati, P. M. (1982). Aspects of the inter-specifeic fusion of protoplasts of alkaloid-producing strains of *Claviceps pupurea* and *Claviceps paspali*. 563-

568. *In* Overproduction of Microbial Products. Krumphanzl, V., Sikyta, B. and Vanèk, Z. (eds.). Academic Press, London, New York.

Stepaniak, L., Kornacki, K., Grabska, J., Rymaszewski, J. and Cichosz, G. (1980). Lipolytic and proteolytic activity of *Penicillium roqueforti, Penicillium candidum* and *Penicillium camemberti* strains. Acta Aliment. Pol. 6, 155-164.

Stewart, G., Furst, A. and Avdalovic, N. (1988). Transvers alternating field electrophoresis (TAFE) BioTechniques 6, 68-73.

Talbot, N.J., Salch, Y.P., Ma, M. and Hamer, J.E. (1993). Karyotypic variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Appl. Environ. Microbiol. 59, 585-593.

Tudzynski, P. and Welting, K.-M. (1993). Molecular genetics of phytopathogenic fungi. 358-372. *In* Progress in Botany, 54. Behnke, H.-D., Esser, K., Kubitzki, K., Runge, M., Zingler, H. (eds.) Springer, Berlin, Heidelberg.

Turmel, C., Brassard, E., Slater, G.W. and Noolandi, J. (1990). Molecular detrapping and band narrowing with high frequencz modulation of pulsed field electrophoresis. Nucleic Acids Res. 18, 569-575.

Vollrath, D. and Davis, R.W. (1987). Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. Nucleid Acids Res. 15, 7865-7876.

Weijman, A.C., de Miranda, L.R. and van der Walt, J.P. (1988). Redefinition of *Candida* Brekhout and the consequent emendation of *Cryptococcus* Kützing and *Rodotorula* Harrison. Antonie van Leewenhoek 54, 545-553

Whiteway, D.E., Virata, R.L. and Wriss, L.C. (1979). Mucormycosis. Arch. Intern. Med. 139, 944-956.

Wilson, B.J., Wilson, C.H. and Hayes, A.W. (1968). Termogenic toxin from *Penicillium cyclopium* grown on food materials. Nature. 220, 77-78.

Yamada, Y., Nagahama, T., Kawasaki, H. and Banni, I. (1990). The phylogenetic relationship of the genera *Phaffia* Miller, Yoneyama et Soneda and *Cryptococcus*

Kutzing emened. Phaff et Spencer (Cryptococcaceae) based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. J. Gen. Appl. Microbiol. 36, 403-414.

Ziegler, A., Geiger, K.-H., Ragoussis, J., and Szallay, G. (1987). A new electrophoresis apparatus for separating very large DNA molecules. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 25, 578-579.

Ziegler, A. and Volz, A. (1992). Rotating field gel electrophoresis (ROFE). 63-72. *In* Pulsed-field gel electrophoresis. Methods in Molecular Biology, Vol. 12. Burmeister, M. and Ulanovsky, L. (eds.) The Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Zolan, M.E. (1995). Chromosome-length polymorphism in fungi. Microbiological Reviews 59, 686-698.

József Attila Tudományegyetem SZEGED

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik dolgozatom elkészítését lehetővé tették, és munkámat támogatták.

Nagyon köszönöm témavezetőmnek, Dr. Ferenczy Lajos akadémikus, tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken lehetővé tette számomra a Ph.D. dolgozat elkészítését és hasznos elméleti és gyakorlati tanácsaival munkámat messzemenően segítette.

Köszönöm Dr. Szegedi Mihálynak és Dr. Zalai Károlynak, hogy a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt. részéről a kutatási lehetőség megteremtésével biztosították a JATE-n folytatott tanulmányaimat és a Ph.D. dolgozatom elkészítését.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Vágvölgyi Csaba adjunktusnak, aki a gyakorlati problémák megoldásában segítségemre volt és türelemmel segítette munkámat.

Hasonlóképpen köszönet illeti Dr. Palágyi Zsuzsanna tudományos munkatársat, valamint Nagy Lajos Gergely tudományos ügyintézőt, továbbá a Mikrobiológia Tanszék összes dolgozóját, hogy munkámat segítették, ezáltal hozzájárultak dolgozatam létrejöttéhez.