B4212

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar

Néhány fekete *Aspergillus* faj mitokondriális genom vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette:
JUHÁSZ ÁKOS

Témavezető:
Dr. Kevei Ferenc
Dr. Kozma-Bognárné Dr. Hamari Zsuzsanna

Mikrobiológiai Tanszék, Szegedi Tudományegyetem, Szeged

2006
Szeged

SZTE Egyetemi Könyvtár
SZEGED
B 42/2
13.

1. TARTALOMJEGYZÉK

2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK 4

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 8

3.1. Az *Aspergillus* nemzetség 8

3.2. Vegetatív kompatibilitási viszonyok 11

3.3. A mitokondriális DNS szerveződése gombákban 14

3.4. Az intronok általános jellemzése 18

3.5 A mitokondriumok öröklődése, mtDNS rekombináció gombákban 22

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 28

4.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek 28

4.2. A felhasznált táptalajok és tápoldatok 29

4.3. A felhasznált enzimek, pufferek, oldatok és primerek 30

4.4. Vizsgálati módszerek, kísérleti technikák 39

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS 50

5.1 *Aspergillus niger* és *Aspergillus tübingensis* törzsek mtDNS szerveződése, és a belőlük protoplasztfúzióval létrehozott mitokondriális rekombinánsok elemzése 50

5.1.1 Az *A. niger* és *A. tübingensis* törzsek mtDNS-ének szerveződése 50

5.1.2 Az *A. niger* és *A. tübingenzis* törzsek mtDNS-ének szekvencia szintűelemzése 51

5.1.3 A restrikciós térképek szekvenciaszintű elemzése 57

5.1.4. *A. niger* 1a → *A. tübingensis* 2b törzsek között protoplasztfúzióval

létrehozott rekombináns utódok szekvenciaszintű vizsgálata 60

5.2 *A. tübingensis* izolátumok mtDNS variabilitás vizsgálata 67

5.2.1 *A tübingensis* izolátumok mtDNS RFLP mintázat polimorfizmusa 67

5.2.2 A különböző mtDNS RFLP típusok térképezése 69

5.2.3 A hat *A. tübingensis* típus részletes szekvenciaszintű elemzése 71

5.3 Instabil mitokondriális rekombináns *A. japonicus* izolátumok vizsgálata 76

5.3.1 Protoplasztfúzióval megvalósított mitokondrium átviteli kísérletek 76

5.3.2 Az utódok RFLP mintázat meghatározása 79

5.3.3 A rekombináns mtDNS-t hordozó utódok fenotipikus jellegeinek vizsgálata 80

5.3.4 A recipiens mag öröklődésének vizsgálata 84

5.3.5 A rekombinációs események vizsgálata 87

6. ÖSSZEFOGLALÁS 93

7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÁS (SUMMARY) 99

8. IRODALOMJEGYZÉK 106

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 119

2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A gomba protoplasztok fúzióján alapuló génátvitel tanulmányozása a SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszékének egyik tradicionális kutatási területe. A témában elért jelentős eredmények vezettek a paraszexuális keresztezések során megnyilvánuló inkompatibilitás jelenségének vizsgálatához. Az *Aspergillus niger* fajaggregátum molekuláris jellemzése során ismertté vált, hogy az imperfekt fekete *Aspergillus* fajok extrakromoszómális elemei (mitokondriumok, RNS vírusok, plazmidok) erőteljes polimorfizmust mutatnak, szemben a teljes életciklussal bíró fajokkal, pl. *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*. A paraszexuális ciklus felfedezése új távlatokat nyitott az imperfekt gombák kutatásában, de a teljes életciklussal bíró fajok esetében is bővíti az elemzések lehetőségét. A paraszexuális ciklus jól használható többek közt az extrakromoszómális elemek rekombinálódásának vizsgálatára. Felhasználhatóságának egyedüli korlátja az imperfekt gombák (így a fekete *Aspergillus*ok) körében tapasztalt széleskörű intraspecifikus vegetatív inkompatibilitás, melynek oka nagyfokú genetikai diverzitás. Inkompatibilitás esetén az anasztomózis útján létrejövő heterokarion állapot nem tud kialakulni. Bizonyos esetekben a heterokariotikus állapot gátja az anasztomózisra való képtelenség, és ilyenkor protoplasztfúzió alkalmazásával mesterségesen heterokariotikus állapot hozható létre. A vegetatív inkompatibilitási rendszer megakadályozhatja a nukleáris állományok keveredését, ugyanakkor lehetőséget nyújt az extrakromoszómális elemek transzmissziójára, és azok esetleges rekombinálódására.

Tanszékünkön jelenleg is folynak a különböző *Aspergillus* fajok összehasonlító feno- és genotipikus elemzései. A törzsek jellemzésére többféle módszer került alkalmazásra: izoenzim analízis, a sejtmagi riboszómális RNS gének (rDNS) RFLP (restriction fragment length polymorphism), illetve a mitokondriális DNS (mtDNS) RFLP vizsgálata, továbbá a RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA, polymerase chain reaction) analízis. A

fajok közötti jelentős diverzitás mellett határozott intraspecifikus polimorfizmust detektáltak, mely különösen az imperfekt fajok esetében volt erőteljes. A legszembetűnőbb genetikai variabilitást az extrakromoszómális elemek mutatták. Sem a nukleáris, sem az extrakromoszómális polimorfikus bélyegek és az inkompatibilitás jelensége és szintje között eddig közvetlen ok-okozati kapcsolatot nem sikerült bizonyítani, azonban a vírusok, mitokondriumok sikeres transzmissziója nem kompatibilis kapcsolatokban jelentősen hozzájárultak a kompatibilitási viszonyok értelmezéséhez.

Az *Aspergillus* nemzetségen belül a *Nigri* szekcióban kezdődtek el a legrészletesebb vizsgálatok. Az imperfekt fekete *Aspergillus* fajok gazdasági szempontból a nemzetség legfontosabb tagjai, taxonómiájukkal kapcsolatban azonban még sok a tisztázatlan kérdés. Számos, viszonylag jól körülhatárolt faj (*A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A. aculeatus*, stb) mellett több iparilag is fontos fajt az *Aspergillus niger* fajaggregátumba soroltak. Az *A. niger* fajaggregátum körében jellemezték először a polimorfikus bélyegeket. A fajaggregátum 400 gyűjteményes törzsének és szabadföldi izolátumának sejtmagi rDNS és a mtDNS RFLP mintázatai alapján három fő csoportba tudták sorolni, név szerint *A. niger*, *A. tübingensis* és *A. brasiliensis*. A fő csoportokon belül további alcsoportokat tudtak elkülöníteni a mtDNS *Hae*III-*Bgl*II restrikciós endonukleázokkal történő emésztésével. Az *A. niger* fajon belül öt, az *A. tubingensis* fajon belül pedig hat különböző mtDNS RFLP mintázatot észleltek.

A mtDNS RFLP mintázatbeli eltérések mellett jelentős méretbeli polimorfizmust is tapasztaltak. A mitokondriális DNS mérete a fajaggregátumon belül az *A. brasiliensis* kivételével 30-33 kb között változott, míg a szekció egy másik tagja, az *A. japonicus* esetében a fajon belül a polimorfizmus igen nagymértékű (45-60 kb, itt hét eltérő RFLP mintázatú csoportot azonosítottak). Korábbi vizsgálatok a teljes életciklussal rendelkező *A. nidulans* esetében intraspecifikus polimorfizmust még heterokarion inkompatibilis törzsek között sem

tudtak kimutatni. Közeli rokon fajok között kismértékű mtDNS polimorfizmust észleltek, a jelenséget intronok jelenlétével vagy hiányával, szám és méretbeli eltérésével magyarázták.

Elkezdődtek a kísérletek, amelyben fekete *Aspergillus*ok különböző mtDNS RFLP csoportjaiba tartozó inkompatibilis törzsei között oligomycin rezisztenciára alapozott mitokondrium átvitelt kíséreltek meg (fajon belül, és fajok közt is). Megpróbálták a mitokondriális oligomycin rezisztencia direkt szelekciós lehetőségét kihasználva igazolni a mitokondriális rekombináció bekövetkezését olyan esetekben, amikor semmiféle kommunikáció nincs a két partner sejtmagja között. A kapott eredmények ellent mondtak az *A. nidulans* fajcsoportnál tapasztaltakkal, ahol a mitokondriális rekombináció csak a sejtmagok kommunikációja mellett valósul meg. A mitokondrium átviteli kísérletek legtöbb esetben sikeresek voltak, és nagy variációban mtDNS rekombinánsokat eredményeztek. A kutatások e fázisában kapcsolódtam be szakdolgozóként, majd doktorandusz hallgatóként a Dr. Kevei Ferenc irányította csoport munkájába. E témából korábban már két doktori disszertáció és számos szakdolgozat született. Részben ezen munkák folytatását, részben pedig további fekete *Aspergillus* fajok elemzését végeztem el.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A hat különböző mtDNS RFLP mintázattal rendelkező *A. tübingensis* izolátum mitokondriális genomjai között megfigyelt polimorfizmus vizsgálata a mtDNS fizikai és funkcionális térképezésével és szekvencia szintű elemzéssel.
2. Az *A. niger* – *A. tübingensis* mitokondrium transzmisszió során létrejött utódok mitokondriális DNS-ének jellemzése fizikai térképek elkészítésével. Célunk az volt, hogy ezeket az eredményeket összehasonlítva a két szülői mtDNS szerveződésével a rekombinációs események molekuláris szintű magyarázatát adjuk. A pontos vizsgálatok elvégzéséhez el akartuk végezni a két szülői törzs teljes mitokondriális DNS-ének szekvencia meghatározását.
3. Néhány korábban nem elemzett *A. japonicus* izolátumok között protoplasztfúzióval végrehajtott mitokondrium transzmisszió során létrejött utódok mtDNS-einek térképezése, és az eltérések szekvenciaszintű magyarázata.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az *Aspergillus* nemzetség

Az *Aspergillus* nemzetség teleomorf, szexuálisan szaporodó alakjai az aszkuszos gombák *Eurotiales* rendjének *Trichocomaceae* családjába tartoznak (Webster, 1986; Alexopoulos és mtsi, 1996). A nemzetség anamorf alakjait a gombák Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) osztályába sorolják. Az Alexopoulos-féle taxonómiai kézikönyv 1996-ban megjelent negyedik kiadása (Alexopoulos és mtsi, 1996) a rend és család besorolás érintetlenül hagyásával, az *Aspergillus*-okat a valódi gombák (Kingdom *Fungi*) országán belül az *Ascomycota* törzsnek abba a *Filamentous Ascomycetes* osztály rangú csoportjába sorolja, amelyre a kleisztotéciumos termőtest képzés jellemző.

Az *Aspergillus* nemzetség az eukarióta fonalas mikroszervezetek egyik legintenzívebben vizsgált csoportja. A nemzetség tagjai jelentőségüket több tényezőnek is köszönhetik. Egyrészt ipari termelésben hasznosak, többféle metabolit gazdaságos előállítására alkalmazhatók. Számos fajukat alkalmazzák különböző enzimek (pl. amiláz, pektinázok, proteázok, glükóz oxidáz), szerves savak (pl. citromsav, glukonsav) termeltetésére, távolkeleti étel fermentációkban, illetve gyógyászatban alkalmazott vegyületek, pl. antibiotikumok, vagy a lovasztatin előállítására. *Aspergillus* fajokat alkalmaznak szteroidok biokonverziójára, illetve pl. inzulin, kimozin heterológ expressziójára is (van Gorcom és mtsi, 1994). Számos faj szkleróciumai rovarellenes vegyületek forrásai (Wicklow és mtsi, 1994). Az *Aspergillus* nemzetség gazdasági szempontból legjelentősebb csoportját a fekete *Aspergillus* fajok képezik, melyeket pl. citromsav, amiláz, pektináz, proteáz, glükóz oxidáz előállítására alkalmaznak a fermentációs iparban. Közülük az *A. niger* rendelkezik az US Food and Drug Administration által adható "generally regarded as safe"

(GRAS) minősítéssel, azaz e faj alkalmazásával létrehozott termékek (enzimek, szerves savak) felhasználhatóak ételadalékként (Roehr, 1992; Berka és mtsi, 1992). Az *Aspergillus* fajok közül még az *A. oryzae* és *A. sojae* rendelkeznek ilyen "bizonyítvánnyal".

Az *Aspergillus* fajok által okozott kártétel is jelentős. Számos *Aspergillus* faj alacsony vízaktivitás érték mellett is képes szaporodni (pl. *A. chevalieri, A. amstelodami, A. restrictus*), ezért e fajok a tárolt gabonafélék raktári kártevőiként súlyos gazdasági károkat okoznak. Néhány *Aspergillus* faj (*A. flavus, A. parasiticus*) a gyapot, kukorica és földimogyoró elsődleges szántóföldi kórokozója a szubtrópusi régiókban (Cotty és mtsi, 1994). Vizsgálataink alanyai, a fekete *Aspergillus* fajok mint gyengültségi paraziták jelentősek, mandulafák koronarothadását, hagyma feketepenészes rothadását, alma lágyrothadását idézik elő. A dohányfermentáció során is tetemes károkat okozhatnak.

Az *Aspergillus* fajok humán opportunista kórokozóként is jelentősek, az aspergillosis különböző formáinak előidézői (pl. a tüdőmikózis az *A. fumigatus* faj idézi elő). Fekete *Aspergillus* fajok is előidézhetnek mikózisokat, sőt akár tüdőmikózis kialakításában is részt vehetnek. Extrém foglalkozási betegségként jegyezték fel a fűszerpaprika kézi feldolgozása időszakában a paprika hasítását végző asszonyok kezén kialakuló körömágy mikózist, amit a szárítás során elszaporodó, elsősorban *A. niger* okozott. Egyes biotópokon nagy tömegben elszaporodva, lokálisan nagymennyiségű *Aspergillus* spóra (konídium) levegőbe kerülésével igen erős allergén lehet, sokszor faji hovatartozástól függetlenül is.

Néhány faj az emberre és állatokra veszélyes mikotoxinokat termel, melyek szintén súlyos gazdasági károkat okoznak világszerte. Elsősorban a gabonafélék fertőzöttsége okozhat problémát. Az import növényi termékek között a földimogyoró és a kávé komoly szennyezésével kell számolnunk, de az utóbbi idők „paprikabotrányaiért" is e toxinok a felelősek. A gazdasági szempontból legfontosabb mikotoxinok közé tartoznak pl. az *A. flavus, A. parasiticus* és *A. nomius* fajok által termelt karcinogén hatású aflatoxinok, illetve az *A.*

ochraceus és számos más faj, így a fekete *Aspergillus* fajok (pl. *A. carbonarius, A. niger*) által is termelt nefropatikus ochratoxinok (Abarca és mtsi, 1994; Téren és mtsi, 1996).

Az *Aspergillus* nemzetség elméleti, biológiai fontosságát az adja, hogy a nemzetségen belül egyaránt találkozhatunk olyan szekciókkal, amelyekbe teljes életciklusú szervezetek tartoznak (sectio *Nidulantes*) és olyanokkal, ahová csak imperfekt fajok sorolhatók (sectio *Nigri*), és vannak, amelyekbe imperfektek mellett perfekt fajok is találhatók (sectio *Fumigati*). A nemzetség biológiai szempontból legjobban ismert faja az *A. nidulans* (teleomorfja *Emericella nidulantes*), amelyet a fonalas aszkuszos gombák között a *Neurospora crassa*-val, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgombákkal együtt a legrészletesebben tanulmányozott eukarióta modellszervezetként tartanak számon (Smith és mtsi, 1977).

A taxonómusok a nemzetség tagjait úgynevezett fajcsoportos rendszerbe sorolták. Az egyes fajcsoportokat a csoportok legismertebb fajáról nevezték el: *A. flavus, A. nidulans, A. niger* fajcsoport stb. (Raper és Fennell, 1965). Az *A. niger* fajcsoportot - amelybe vizsgálati objektumaink is tartoznak – a szakzsargon "fekete *Aspergillus*"-okként említi sötétbarna-fekete konídium- és telepszínük miatt. A nemzetközi botanikai kód szabályai szerint újabban a szekció elnevezést használják (Gams és mtsi, 1985), pl. *Nigri* szekció, *Fumigati* szekció. A *Nigri* szekcióba tartozó fajok közül az *A. japonicus* és *A. aculeatus* konídiumtartóin csak egy sor sterigma található, ellentétben a többi idesorolt fajjal (Raper és Fennell, 1965). Ettől eltekintve a többi faj morfológiai bélyegek alapján igen nehezen különíthető el. Al-Musallam (1980) ezen nehezen elkülöníthető fekete *Aspergillus* fajokat az úgynevezett *A. niger* fajkomplexbe sorolta (pl. *A. awamori, A. phoenicis, A. kawachi, A. foetidus, A. schiemannii, A. pseudocitricus, A. inuii, A. usamii, A. satoi,* stb.). Az arra vonatkozó összehasonlító elemzések, hogy a külön fajként leírt egyedi izolátumok halmazán belül a valódi fajhatárokat próbálják körülírni, mindössze 7 faj elkülönítését eredményezték (Croft és mtsi, 1984). Az *A.*

japonicus és *A. aculeatus* fajok intraspecifikus variabilitásával Hamari és mtsi (1997) foglalkoztak behatóan. Az *A. niger* fajkomplexbe tartozó fajokat molekuláris markerek, úgymint a sejtmagi rDNS *Sma*I és a mtDNS *Hae*III-*Bgl*II restrikciós endonukleázok által létrehozott RFLP mintázatai alapján sorolták később az *A. niger, A. tübingensis* és az *"A. brasiliensis"* fajokba (Kusters van Someren és mtsi, 1991; Varga és mtsi, 1993, 1994). Az I, II és III jelzésű rDNS típusok megfelelnek az 1, 2 és 3 jelzésű mtDNS csoportoknak. Ezeket a molekuláris markerek alkalmazásával azonosított fajokat morfológiai bélyegeik alapján nem, vagy csak nehezen lehet elkülöníteni egymástól. A mtDNS RFLP szempontjából az *A. niger* faj öt (1a-1e), az *A. tübingensis* faj pedig hat (2a-2f) csoportba sorolható. Az *"A. brasiliensis"* fajt néhány Brazíliából származó szabadföldi izolátum reprezentálja, melyet legalább kétféle mtDNS restrikciós profil jellemez (Varga és mtsi, 1993, 1994; Tóth és mtsi, 1997). Az utóbbi években azonban számos új, az *A. niger* fajaggragátumba tartozó fekete *Aspergillus* fajt irtak le (Samson és mtsi, 2000; Yu és mtsi 2004; Cabanes és mtsi 2004), jelenleg összesen 15 fajt sorolnak az *A. niger* fajcsoportba.

3.2. Vegetatív kompatibilitási viszonyok

A fekete *Aspergillus* fajok imperfektek, szexuális életciklussal nem rendelkeznek, rekombináció egyedül a paraszexuális ciklus során játszódik le e törzsekben. A paraszexuális ciklus fő lépései az anasztomózis, a következményeként létrejött heterokariotikus állapot és kis gyakorisággal (10^{-5}-10^{-9}, a gyakoriságot a kereszteződő törzsek tulajdonságai befolyásolják) bekövetkező kariogámia. A szomatikus diploidban a mitózis során a homológ kromoszómapárok között ritka eseményként mitotikus crossing over játszódik le. Ezt követően spontán haploidizáció történik. A haploidizáció a heterozigóta diploidnak a haploid állapotba történő visszatérését jelenti. A meiózistól eltérően, a haploidizáció a szülői

kromoszómapárok tökéletlen szétválásának (nondiszjunkció) következménye és a szülői kromoszóma készlet véletlenszerű újrarendeződését eredményezi. Ennek során aneuploidok: hiperdiploidok vagy hiperhaploidok jönnek létre. A haploidizáció többlépcsős folyamat, instabil aneuploidok fokozatos kromoszóma szám csökkenése után eredményezi a stabil haploid utódokat. Az utódok közt lehetnek szülőivel megegyező és attól eltérő kromoszóma kombinációkkal rendelkezők, a véletlenszerű kromoszóma szétválás következtében.

A paraszexuális ciklusnak azonban a sejtmagi rekombinációtól függetlenül is jelentős szerepe van, ugyanis lehetővé teszi az extrakromoszómális elemek (így a mitokondriális genom) szabad rekombinációját. A mitokondriális genom rekombinációja csak akkor történhet meg, ha nincs külső korlátozó tényező, mely ezeket a folyamatokat megakadályozhatja. Ilyen tényező a szexuális ciklus létezése. A teljes életciklussal bíró mikroorganizmusok mitokondriumai a szexuális keresztezések során uniparentális (főként maternális) öröklődést mutatnak (Birky, 1978; 1983; 1994; Smith és mtsi, 1990; Yang és Griffiths, 1993; Boynton és mtsi, 1987; Kawano és mtsi, 1995). A szexuális ciklus gátolja a mtDNS rekombinációját, így az imperfekt gombák azok a szervezetek, amelyek szexuális ciklus hiányában nem rendelkeznek a mitokondriális genom rekombinációját korlátozó mechanizmusokkal. Részben ez eredményezi a természetben előforduló imperfekt gombákat jellemző erős mtDNS polimorfizmust. Az előzőekben említett okok részben a már meglévő polimorfikus változatok eliminálódását, másrészt fennmaradását és gazdagodását biztosítják, de a természetes mitokondriális DNS változatok keletkezése az evolúciós léptékű mutációs események következménye.

A paraszexuális úton történő genetikai információcserét azonban az imperfekt gombák körében a nagyfokú heterokarion inkompatibilitás korlátozza, melynek hátterében összetett genetikai rendszer áll. Egyes esetekben az inkompatibilitás az úgynevezett „post-killing" effektusra vezethető vissza. Ebben az esetben a növekvő hifák a találkozás vonalában

proteolízis révén dezorganizálódnak, úgynevezett barrage-t képeznek. Ilyen jelenséget pl. *Podospora*, *Neurospora* fajokban figyeltek meg (Esser és Blaich, 1994). Más esetekben az inkompatibilitás kiváltó okaként sejtfallal asszociált gátló mechanizmusokat feltételeznek, ez esetenként protoplaszt fúzió segítségével áthidalható. Számos fajban, így a fekete *Aspergillusok* között is olyan gátló mechanizmusok működnek, melyek protoplaszt fúzióval sem kerülhetők ki. Az anasztomózist gátló mechanizmusokért a kompatibilitási gének rendszere felelős. E gének (vic vagy het) által meghatározott csoportokat h-c, v-c vagy VCG csoportoknak nevezik, fajtól függően. A kompatibilitási rendszer lehet allélikus, és nem-allélikus (illetve átfedő). Egy-egy mikroorganizmus faji hovatartozástól függően rendelkezhet nem-allélikus (*Heterobasidion annosum*; Chase és Ullrich, 1990a; 1990b), vagy allélikus kompatibilitási rendszerrel (*A. nidulans*; Esser és Blaich, 1994), illetve egyszerre mindkettővel (*P. anserina*; Turcq és mtsi, 1990; Esser és Blaich, 1994). A nem allélikus rendszer esetében több génhez kapcsolható a kompatibilitás. Az allélikus rendszerek esetében több gén számos alléljának összessége határoz meg egy kompatibilitási genotípust. Teljes értékű heterokarion csak akkor jöhet létre, ha a két szervezet minden kompatibilitási génjének minden allélja megegyezik. Ha egy génjükben is eltérést mutatnak, akkor az eltérő gén inkompatibilitásban betöltött agresszivitásától függően vagy kizárja a heterokarion képzést, vagy pedig kisebb gyakorisággal képes életképes heterokariont létrehozni (Glass és Kuldau, 1992; Leslie és mtsi, 1993). Az *Aspergillus* fajok közül az *A. nidulans*-ban vizsgálták részletesen az inkompatibilitási rendszert. Több száz izolátum vizsgálata során 20 különböző h-c csoportot azonosítottak. A kompatibilitási rendszer allélikus, nyolc het lokuszt azonosítottak. Ezek közül a hetC három, a hetB négy alléles, a többi biallélikus (Anwar és mtsi, 1993; Dales és mtsi, 1993).

Az inkompatibilitási rendszer tehát megakadályozza a nukleáris állományok keveredését, ugyanakkor bizonyos körülmények között lehetőséget nyújt az

extrakromoszómális elemek transzmissziójára, így azok esetleges rekombinálódására. A paraszexuális ciklus jól használható genetikai vizsgálatokban kapcsoltsági viszonyok meghatározására és extrakromoszómális elemek rekombinálódásának vizsgálatára. A fekete *Aspergillus* fajokra jellemző intra- és interspecifikus mtDNS polimorfizmus kitűnő kísérleti objektumokká teszi őket a mtDNS rekombinációk vizsgálatára. Egyes fajok esetében kiterjedt a fajon belüli heterokarion inkompatibilitás; rokon fajok között nem, de még egy fajba tartozó izolátumok között is csak ritkán hozhatók létre heterokarionok. Az inkompatibilitás nem hidalható át protoplaszt fúzió alkalmazásával, heterokarionok nem jönnek létre, de mitokondrium transzmisszió megvalósítható.

3.3. A mitokondriális DNS szerveződése gombákban

A mitokondriumok az eukarióta sejt elsődleges energiatermelői; bennük megy végbe az oxidatív foszforiláció, melynek révén ADP-ből ATP keletkezik, ami a sejtek egyik fő energiaforrása. A mátrixban helyezkednek el a zsírsav oxidáció és a citrátkör enzimei, amelyek az anyagcsere folyamán két-szénatomos vegyületekre lebontott tápanyagok oxidációját végzik. Bár a mitokondriumnak saját genetikai rendszere van, mégsem önálló. A mitokondrium biogeneziséhez – felépítéséhez, összerendeződéséhez, működéséhez – szükséges fehérjék mintegy 90%-a a nukleáris genomban kódolt. Tehát a funkcionáló mitokondrium létrejöttéhez szükséges a mitokondriális és sejtmagi genom szoros együttműködése. A mtDNS kutatása az utóbbi években ismét előtérbe került, részben annak köszönhetően, hogy számos emberi megbetegedés esetében kimutatták, hogy a mtDNS mutációi is szerepet játszanak a kórkép kialakításában (Hammans, 1994).

A mtDNS-ből mitokondriumonként egy, vagy néhány molekula fordul elő. A gombák többségénél cirkuláris szerveződést mutat, néhány faj azonban lineáris mtDNS-t hordoz

(Grossman és Hudspeth, 1985; Nosek és mtsi, 2003). A mtDNS kódoló és nem kódoló régiókat hordoz. A nem kódoló egységeket intergénikus régióknak nevezték el, ezek a kódoló régiókat összekötő szekvenciákat jelentik. Értelmes információtartalmuk nincs, de fajra jellemző szekvenciamotívumokat hordozhatnak. Ilyen ismert motívumok a magas kópiaszámban ismétlődő repeat szekvenciaként megjelenő GC kluszterek a *S. cerevisiae*-ben, a *Sac*II helyek a *Kluyveromyces lactis*-ban, a GC gazdag elemek az *Allomyces macrogynus*-ban, a *Pst*I palindromok a *N. crassa*-ban és a MUSE elemek (mitochondrial ultra short elements) a *P. anserina*-ban (Koll és mtsi, 1996).

A gombák mitokondriális genom mérete igen változó (Burger és mtsi, 2003). A *Schizosaccharomyces pombe* 17,4 kb-os mitokondriális genomjától az *Agaricus bitorquis* 174 kb-os mtDNS-éig változó méretűekkel találkozhatunk (Hudspeth, 1992). A gombák mtDNS mérete a növény- és állatvilág mitokondriális genomjához képest középutat jelent. Az állatok minimális mtDNS mérete (16,5 kb) kisebb, mint a gombáké, a növények mtDNS mérete pedig jóval túlhaladja azt (több száz kb). Egyes parazita fajok mitokondriális genomja még kisebb lehet (Plazmodium sp – 6kb, Feagin, 2000). A genom méretek között közel rokon fajok esetében is jelentős eltérés lehet (*S. cerevisiae*: 72-78 kb, *S. exiguus*: 23,7 kb; *Coprinus cinereus*: 43 kb, *Coprinus stercorarius*: 91 kb) (Grossman és Hudspeth, 1985).

Bendich és mtsi (1993) megfigyelése szerint a gombák mtDNS-ei általában a "rolling circle" mechanizmus szerint replikálódnak. A replikáció során hosszú lineáris molekulák alakulhatnak ki, melyek konkatamerek formájában tartalmazzák a mtDNS-t.

A mitokondriális DNS bázisösszetételére egyes csoportoknál (Ascomycota) az AT gazdagság jellemző. Ez kódhasználati eltérést eredményez (pl. az általában stop kódot jelentő UGA kodon a gombák mitokondriumaiban a triptofánt kódolja). Különböző mitokondriumok között is észleltek kódhasználati eltéréseket (Hudspeth, 1992). Az univerzális kódhasználattól való eltérés más, nem gomba mitokondriumban is előfordul, pl. a humán mitokondriumban,

ugyanakkor nem találtak kódhasználati eltérést a növények esetében (Alexopoulos és mtsi, 1996).

A kódoló géneket két csoportra oszthatjuk: mitokondriális funkciókat biztosító, illetve magát a mitokondriális fehérjeszintézist irányító génekre. Az előbbiek közé tartoznak: a citokróm b-t (*cob*), a citokróm c oxidáz 1-3 alegységét (*cox*1-3), a NADH dehidrogenáz különböző alegységeit (*ndh* 1-6) fajonként eltérőket, az ATP szintáz (*atp*) 6, 8 és 9 alegységét kódoló gének. A második csoportba tartoznak a kluszterekbe rendezett tRNS gének, rRNS gének és a riboszómális fehérjéket kódoló gének. Számos gén kódoló szekvenciáit nemkódoló DNS szakaszok szakítják meg, melyeket intronoknak nevezünk (Gilbert, 1978). A gének egy harmadik csoportját alkotják a nem azonosított URF-ek (unidentified reading frame), melyek funkciója jelenleg még nem ismert (pl. az *A. nidulans* URFA3 génje) (Hauswirth és mtsi, 1987). Végül külön kell említeni az intronok ORF-jait (open reading frame), amelyek a mtDNS-ről átíródó mRNS érésében fontos szerepet játszanak.

Ha az endoszimbionta elméletből kiindulva úgy tekintünk a mtDNS ősére, mint egy prokarióta információhordozó egységre, akkor napjaink mtDNS-e feltűnően kevés információt tartalmaz. Az evolúció során információ átáramlás történt az eukarióta sejtmagba, ezáltal számos addig kizárólag mitokondriális gén kódja a sejtmagba került át, illetve magi gének termékei a mitokondriumba transzportálódva ott látnak el funkciókat. Az, hogy a sejtmagba történő génáramlás milyen géneket érintett, még nemzetségen belül is eltérő lehet. A jól ismert *S. cerevisiae* élesztőgomba, és számos rokon fajának mtDNS-e nem kódolja a NADH dehidrogenáz enzim alegységeit, szemben a jól ismert fonalas gombákkal, ahol jelenlétük általános (Hudspeth, 1992). A *S. cerevisiae* ATP-áz 9 alegysége mtDNS-ben kódolt, míg a fonalas gombáké lehet mtDNS-ben (*Aspergillus*), sejtmagban (*Podospora*), vagy mindkettőben kódolt (*Neurospora*). Utóbbi esetben a működő gén vagy a sejtmagi, vagy

a mitokondriális kópia, vagy pedig alternatívan életciklushoz kötötten vagy az egyik, vagy a másik gén fejeződik ki (Ridder és mtsi, 1991; Brown és mtsi, 1984).

Számos fonalas gomba mtDNS szerveződését részletesen felderítették. Az *Aspergillus* nemzetségen belül az *A. nidulans* genomszerveződése a legismertebb (Brown és mtsi, 1985). A mtDNS cirkuláris, mérete 33 kb. A mtDNS által kódolt gének: a nagy és kis rRNS alegységek, a *cox*1-3, *cob*, *ndh*1-6, *atp* 6., 8. és 9. alegységek, valamint 28 tRNS gén. A mtDNS öt I. típusú intront tartalmaz; a *cox*1 génben három, míg a *cob* és *rnl* génekben egy-egy intron található. A transzkripció során - hasonlóan az állatoknál észleltekhez – kis számú, hosszabb transzkriptumok keletkeznek, melyek utóérésen mennek át; az érés során valószínűleg az állati mtDNS-hez hasonlóan a tRNS-eknél hasítódik a mRNS.

Egyes mitokondriális gének intronokkal erősen tagoltak, a gének között pedig kiterjedt spacer régiók lehetnek, így a közel rokon fajok esetében is a mtDNS jelentős méretbeli különbségeket mutathat. A fonalas gombák intron tartalma variábilis. Az *Aspergillus nidulans* 33 kb, a *Neurospora crassa* 63 kb, a *Podospora anserina* pedig 102 kb nagyságú mitokondriális genommal rendelkezik. Ez a nagy méretbeli különbség nem a kódoló régiók eltéréseiből, hanem a hordozott intronok számából adódik. Cummings és munkatársai (1990) a *Podospora anserina* 102 kb nagyságú mtDNS-ének szekvenálásával kimutatták, hogy *az A. nidulans* mtDNS méretéhez viszonyított 70 kb-nyi eltérést tisztán intronális szekvenciák okozták. Intront hordozó gének lehetnek az energianyerés folyamatában szerepet játszó fehérje gének, riboszómális RNS gének, továbbá tRNS gének. Bizonyos génekre jellemző, hogy intronokat hordoznak (*cox*1, *cox*2, *rnl*), míg vannak olyan gének, melyekben az intronok előfordulása ritka (*atp*9, *atp*8, *atp*6). A *P. anserina cox*1 génje tizenhat intront tartalmaz, a teljes gén 6,55%-a kódoló rész, 93,45%-a pedig intron. Az a tény, hogy az intronok képesek extrém módon benépesíteni a mtDNS-t, részben alátámasztja az intronok mobilitására

vonatkozó elképzeléseket, továbbá a különböző gombafajok mtDNS-ének diverzitásában betöltött szerepét.

3.4. Az intronok általános jellemzése

A gének kódoló szekvenciáit megszakító nem kódoló DNS szakaszokat közbevetett szekvenciáknak, intronoknak nevezzük. Az intronok minden esetben precízen ki tudnak vágódni a mRNS transzkriptumból (splicing), és így a kódoló régiók (exonok) eredeti olvasási keretük megváltozása nélkül újra illeszkedve érett formába kerülnek. A megfigyelt splicing mechanizmusok alapján az intronokat négy kategóriába sorolják: I. és II. típusú intronok, magi mRNS és tRNS intronok (Lambowitz és Belfort, 1993; Cech, 1990). Az I. és II. típusú intronok egyben ribozimek is, tehát enzim aktivitással bíró RNS-nek tekinthetjük őket, mely aktivitás révén önmaguk precíz kivágódását tudják végrehajtani. Ezt az önkivágó aktivitást a szaknyelv self-splicing-nak nevezi. A magi mRNS-ek úgynevezett splice-szómákban szabadulnak meg intronjaiktól, ahol számos segítő molekula (pl.: U1, U2 kis magi ribonukleoproteinek) katalizálja az intronok kivágódását. A magi tRNS-ek intronjai számos enzim segítségével vágódnak ki (endonukleáz, kináz, ligáz, foszfatáz).

Az I. és II. típusú intronok nem csak arról nevezetesek, hogy saját kivágódásukat katalizálni tudják, hanem mobilitásukról is, ezért mobil genetikai elemeknek tekintik őket (Lambowitz és Belfort, 1993; Lambowitz és Zimmerly, 2004; Haugen és mtsi 2005). Mobilitásuk alatt azt értjük, hogy intronmentes allélokat intronhordozóvá alakíthatnak, saját környezetüktől eltérő új szekvenciális környezetbe is be tudnak épülni, ugyanakkor introntartalmú gének elveszthetik intronjaikat. Mobilitásuk függ az általuk kódolt fehérjék jelenlététől, melyekre amellett, hogy maturáz aktivitással is rendelkezhetnek, azaz magát az intron kivágódását segítő funkciót láthatnak el, az I. típusú intronok ORF-jei esetében az

endonukleáz aktivitás, a II. típusú intronok ORF-jei esetében pedig a reverz transzkriptáz aktivitás jellemző. Ezek az intron kódolt enzimek teszik mobilissé, mozgékonnyá az I. és II. típusú intronokat (Lambowitz és Belfort, 1993; Dujon, 1989; Lambowitz és Zimmerly, 2004; Haugen és mtsi 2005). Az intron ORF-ek önmagukban is mobilisek, azaz egy adott ORF képes megjelenni új szekvenciális környezetben is (Sellem és mtsi, 1996). Az intron ORF-ek önálló mozgását gyakran az intronnal szomszédos két exonnak az intronnal határos néhány nukleotidjának megváltozása kíséri. Ezek az exonális átrendeződések feltehetően evolúciós szereppel is bírnak, mivel változást okoznak a kódolt fehérje aminosav szekvenciájában.

A mobilis intronok széleskörben elterjedtek (Lambowitz és Zimmerly, 2004; Haugen és mtsi 2005). Az I. és II. típusú intronokat számos szekvenciakörnyezetben lokalizáltak különböző szervezetekben (eukarióták mitokondriális, kloroplaszt vagy sejtmagi DNS-ében, de baktériumok és bakteriofágok tRNS és mRNS-eiben is előfordulnak). Számos taxonómiai egységben elterjedtek, beleértve a gombákat, növényeket, protozoákat és a prokariótákat is. Ma már a metazoákat is az intronhordozók körébe sorolják, bár korábban ennek a lehetőségét az addigi eredmények birtokában kizárták (Beagley és mtsi, 1996). Létezik egy III. típusú intronnak nevezett csoport is, melyek protiszták plazmidjaiban fordulnak elő. Ezek az intronon rövidek, és a II. típusú intronokhoz nagymértékben hasonlítanak (jellegzetességük, hogy intronokon belül is hordozhatnak intronális szekvenciákat). Ha szekvencia-környezetüket tekintjük, akkor azt láthatjuk, hogy egy adott intron különböző organizmusban megjelenhet ugyanazon gén ugyanazon szekvenciakörnyezetében, illetve megjelenhet más génben is. Ez a jelenség közvetve alátámasztja a mobilitásukkal kapcsolatos elképzeléseket (Dujon, 1989). A mobilitást igazolja az a tény is, hogy számos fajban (bakteriofágok, gombák, növények) elterjedtek, mely horizontális géntranszfer segítségével valósulhatott meg (Haugen és mtsi 2005).

Manapság csupán I. típusú intronból mintegy 1500 ismeretes, melyek jelentős része növények és gombák organellumaiban található. Ezeket a bennük kódolt homing endonukleázok aminosav szekvenciáji alapján négy nagy csoportba sorolják: his-lys box, LAGLIDADG (mely típus a leggyakoribb), GIY-YIG, HNH családok.

Mind az intron nyerés (intron acquisition), mind az intron vesztés (intron loss) folyamata ismert, molekuláris mechanizmusukról a szakirodalom részletesen beszámol (Lambowitz és Belfort, 1993; Dujon, 1989). Az ORF-et hordozó I. típusú intronok körében az intronnyerés folyamata nagy gyakorisággal bekövetkező esemény. ORF-ük általában endonukleáz aktivitással bír, melynek mind szekvenciafelismerőhelye, mind pedig a restrikciós hasítóhelye specifikus. Az előbbi 18 bp vagy annál több nukleotidnyi motívumot takar, az utóbbi pedig néhány bázispárnyi (4 bp) szekvenciához kötött (Dujon és mtsi, 1989). Az endonukleáz, ha ép hasítóhellyel találkozik, akkor elvégzi feladatát, azaz hasítja a kettősszálú DNS-t. Ezt követően a jól ismert DSBR (double strand break repair) mechanizmus javítja a DNS törést. A mechanizmus során először az eltört DNS 5'-3' és 3'-5' exonukleázok által emésztődik, agresszív túlnyúló egyszálú DNS-ek keletkeznek, melyek homológ szekvenciákhoz próbálnak elsősorban illeszkedni. A túlnyúló egyszálú DNS-ek befúrják magukat homológ kettős szálú párjukba, és létrehozzák a rekombinációs folyamatok kezdeti stádiumára jellemző D-loop struktúrát. A túlnyúló egyszálú DNS-ek a továbbiakban a homológjaikkal párosodva primerként szolgálnak a DNS polimeráz számára, mely templátnak a homológ szekvenciát tekinti. Kialakul a kettős Holliday struktúra, a DNS polimerázok feltöltik a degradálódott törött végek közötti rést, majd kettős „crossing over" zárja a folyamatot, melynek eredményeképpen kettő darab kettős szálú DNS molekula jön létre. Amennyiben a templátként felhasznált homológ DNS szakasz az adott gén intront hordozó vátozata, akkor a DSBR révén az addig intronmentes exonális szekvencia intronhordozóvá válik. Ez a mechanizmus ha beindul a mitokondriumban, ahol a mtDNS több tucat

kópiaszámban lehet jelen, kaszkádszerűen intronhordozóvá tehet egy exonális régiót, ami addig nem tartalmazott intront. Ha az intron a származási helyével azonos környezetbe és helyre épül be, azt a szakirodalom "intron homing"-nak, azaz az intron hazatérésének nevezi. Idegen, azaz új környezetbe is beépülhet az intron, ha a felismerőhely és a restrikciós hasítóhely motívumok ezt lehetővé teszik, illetve ha nem homológ rekombináció történik a DSBR során. Ekkor intron transzpozícióról beszélünk.

Az intronvesztés jelensége a fent idézett szakirodalmak adatai szerint sokkal összetettebb, és nagyságrendekkel ritkábban bekövetkező esemény, mint az intron nyerés. E szerint a már érett mRNS reverz transzkriptáz aktivitás révén egyszálú cDNS-sé íródik át, mely intronhordozó homológjával rekombinációra lép. Ily módon az introntartalmú forma intronját elveszti. A homológ rekombináció "kiterjedtsége" (extenziója) változó, így egy, kettő vagy több szomszédos intron egyidejű elvesztése történhet meg (Dujon, 1989; Lambowitz és Belfort, 1993; Moran és mtsi, 1994; Derr és mtsi, 1991). A folyamat sikeres kimeneteléhez szükséges reverz transzkriptáz aktivitást gyakran a kloroplaszt DNS, vagy a mtDNS-ben jelen levő II. típusú intronok ORF-jeiben kódolt reverz transzkriptázok (Baltimore, 1985), illetve reverz transzpozonok aktivitása biztosítja.

A génterápia szempontjából is fontossá vált az intronvesztés kérdésének tanulmányozása. Számos humán betegséget, tünet együttest tudnak kötni intronális mutációkhoz (Huang, 1998; Smyth és mtsi, 1998). Elégtelen sejtműködéshez, enzimfunkciók hiányához vezethet, ha egy introntartalmú gén intronja mutáció következtében képtelen kivágódni, azaz nem tud érett mRNS létrejönni (Moran és mtsi, 1994). Súlyos betegségek alakulhatnak ki, ha egy jelmolekula, másodlagos hírvivő, vagy egyéb fontos funkciókat ellátó molekula iktatódik ki ily módon a szervezetből. A természet azonban tudja gyógyítani önmagát. Kísérletesen igazolt tény (Moran és mtsi, 1994), hogy a sérült, self-splicing-ra képtelen intron ellenére nagyon minimális szinten, de képződik érett mRNS. A róluk reverz

transzkripcióval készült cDNS rekombinálódása a homológ szekvenciákkal úgyszólván gyógyítja a defektes régiókat. Extrakromoszómális elemek genomjában (plazmidok, kloroplaszt és mtDNS) is detektálták az intronvesztés eseményét (Wallace és mtsi, 1996; Freyer és mtsi, 1995; De Jonckheere és mtsi, 1994), kísérletesen igazolták molekuláris mechanizmusát (Derr és mtsi, 1991), de továbbra is ritka eseménynek tartják, és nem vetődött fel az, hogy az organellumok örökítő anyaga a magas kópiaszám ellenére homogénné tud válni intronvesztett jellegére nézve.

Manapság a mobilis intronok vektorként való alkalmazása is elég elterjedt. Az II. típusú intronok úgy ismerik fel a célszekvenciát, hogy DNS-RNS bázispárosodás alakul ki, így az intron szekvenciájának változtatásával a célgén is megváltoztatható (Eskers és mtsi 1997; Guo és mtsi 1997, 2000). Többek közt *Lactobacillus lactis* L1.LtrB intronjából készített vektort (targeton) alkalmazták mind Gram+ mind Gram- baktériumok génjei esetében (Karberg és mtsi 2001; Zhong és mtsi 2003).

3.5. A mitokondriumok öröklődése, mtDNS rekombináció gombákban

A sejtmagi és az organelláris DNS öröklődése között jelentős eltérés tapasztalható. Míg a sejtmagi DNS szigorúan szabályozottan, a mendeli öröklésmenetnek megfelelően adódik át az utódokba, az extranukleáris mtDNS és kloroplaszt DNS öröklődése kevésbé szigorú szabályok szerint, ún. "relaxed" módon történik (több kópia lehet belőle, aszinkronban osztódhat). Az endoszimbionta elmélet alapján, ha a szimbionta nagyobb kópiaszámban van jelen, nagyobb eséllyel kerül az utódsejtekbe (szelekció a nagyobb kópiaszámra).

Az organellum-öröklődésnek többféle típusa ismert. A leggyakoribb az uniparentális öröklődés, ezen belül az anyai öröklődés, amikor az organellumok az anyától származnak.

Néhány faj esetében az organellumok apai öröklődést mutatnak (Birky, 1978, 1983, 1994). Apai öröklődés létrejöhet ritka esetekben anyai öröklődést mutató fajoknál ("paternal leakage"), illetve mint reguláris öröklődési típus jellemző lehet egy-egy fajra (pl. *Daucus* kloroplasztiszok, illetve *Sequoia* mitokondriumok öröklődése). A reguláris apai öröklődés mechanizmusa nem ismert. Az organellumok öröklődhetnek biparentálisan is, amikor mindkét szülőből kerül az utódokba az adott organellumból (pl. *Chlamydomonas, Pelargonium, Oenothera* fajok mitokondriumai). Ebben az esetben a mendeli öröklésmenethez hasonlóan mindkét szülő genomja részt vesz az utód létrehozásában, de az öröklődés nem a mendeli szabályok szerint történik.

A gombák körében szexuális szaporodásuk során általában anyai öröklődést észleltek [pl. *Neurospora* fajok (Mitchell és Mitchell, 1952; Mannella és mtsi, 1979), *Aspergillus nidulans* (Rowlands és Turner, 1976; Coenen és mtsi 1996), *Pythium sylvaticum* (Martin, 1989)]. *Phytophthora infestans* esetében uniparentális öröklődés a jellemző, szegregációt, rekombinációt illetve heteroplazmiát nem észleltek (nem lehetett megállapítani, hogy apai illetve anyai öröklődésről van-e szó, mivel nem állnak rendelkezésre megfelelő markerek; Whittaker és mtsi, 1992, 1994). Apai öröklődést *Allomyces arbusculus* x *A. macrogynus* keresztezésekben (Borkhardt és Olson, 1983), illetve *Neurospora intermedia*-ban mutattak ki (paternal leakage; May és Taylor, 1989; Yang és Griffiths, 1993). Biparentális öröklődés jellemző a bazídiumos gombákra (*Coprinus cinereus*, May és Taylor, 1988; *Schizophyllum commune*, Specht és mtsi, 1992; *Agaricus bitorquis*, Hintz és mtsi, 1988; *Armillaria mellea*, Smith és mtsi, 1990; *Stereum hirsutum* és *S. complicatum*, Ainsworth és mtsi, 1992). Ha a mitokondrium nem vándorol a sejtmagokkal a dikarionban, úgynevezett mitokondriális mozaikok jönnek létre. Fentiekkel ellentétben, az *Agaricus bisporus* esetében uniparentális öröklődést észleltek, amit az egyik szülő mitokondriális genomjának a dikarionból való szelektív kizárásával, illetve eliminálásával magyaráznak (Jin és Horgen, 1994).

Laboratóriumi kísérletek során az a szülő örökítette át a mitokondriumát, amelyik gyorsabb növekedést mutatott, kivéve azt az esetet, mikor a lassúbb növekedésű partnert néhány napig előnevelték: ekkor ez a partner örökítette át mtDNS-ét.

MtDNS rekombinációt először *Saccharomyces cerevisiae*-ben észleltek (Thomas és Wilkie, 1968). Később olyan gombáknál észlelték gyakran, ahol a sejtek vagy hifák fúziója a szexuális ciklus alapfeltétele (élesztőkben, illetve bazídiumos gombákban, mint pl. *Coprinus cinereus*-ban: Baptista-Ferreira és mtsi, 1983; Economou és mtsi, 1986; *Agrocybe aegerita*-ban: Barroso és mtsi, 1992; *Pleurotus ostreatus*-ban: Matsumoto és Fukumasa-Nakai, 1996). *Saccharomyces cerevisiae*-nél és általában az élesztő gombáknál az uniparentális organellum-öröklődést Birky (1978) szerint általában az okozza, hogy a zigótából csak az a mitokondrium öröklődik át, amelyből több van vagy gyorsabban replikálódik; annak a szülőnek a mtDNS-e kerül az utódokba, melyből több került a zigótába ("input bias"). Emellett feltételezések szerint más faktorok is szerepet játszanak. Több keresztezés esetében 9:1 arányban észlelték a két mtDNS-t az utódokban; valószínűtlen, hogy ilyen arányban kerültek a mitokondriumok a szülőkből a zigótába. A sarjak pozíciója is hatással van az utódba kerülő mtDNS típusára (a zigóta végén elhelyezkedő sarj általában az egyik szülő mtDNS-ét örökli, míg a középen létrejövő sarjban általában rekombináns mtDNS-t észleltek; Strausberg és Perlman, 1978). A modell nem tudja megmagyarázni az egyes keresztezések esetében észlelt uniparentális öröklődést sem. Zweifel és Fangman (1991) azonosítottak egy sejtmagi gént (MGT1), amelynek mutációja a ρ- mtDNS privilegizált transzmisszióját megszünteti. Ha mindkét párosodó haploid sejtmag hordozza ezt a mutációt, akkor a ρ- mtDNS alig detektálható az utódokban. Feltételezik, hogy ez a gén a mtDNS replikációjában játszik szerepet. Később a gén termékét, egy CCE1 endonukleázt azonosítottak, mely a Holliday struktúrát képes hasítani (Kleff és mtsi, 1992).

Aspergillus amstelodami és *A. nidulans* fajok szexuális keresztezése esetében az uniparentális öröklődést genetikai módszerekkel, drogrezisztens mutánsok alkalmazásával bizonyították (Lazarus és mtsi, 1980; Rowlands és Turner, 1974, 1975). Heterokarion kompatibilis *A. nidulans* törzsek közötti keresztezések esetében (ha különböző mtDNS-ek voltak a szülőkben) szülői és rekombináns mtDNS-eket egyaránt észleltek. Inkompatibilis törzsek közötti keresztezéseknél csak szülői mtDNS-eket detektáltak az utódokban; egy termőtest csak egyféle mtDNS-t tartalmazott. Rekombinánsokat nem észleltek. Fajok közötti szexuális keresztezés esetében (*A. nidulans* x *A. quadrilineatus*; a két faj heterokarion inkompatibilis egymással, de szexuális keresztezések kivitelezhetők köztük) különböző morfológiájú utódokat találtak. A kis sötétbíbor színű telepek (diploidok vagy aneuploidok) szegregánsai valamennyien az *A. nidulans* mtDNS-t hordozták; sem rekombináns, sem *A. quadrilineatus* mtDNS-t hordozó szegregánst nem találtak (Jadayel, 1986). Következtetésként levonható, hogy kompatibilis törzsek esetében a heterokarionban a két szülő mtDNS-ei szabadon keverednek és rekombinálódnak, míg inkompatibilis törzsek esetében a szexuális keresztezés során a mtDNS uniparentális öröklődése figyelhető meg, rekombináció és keveredés nincs.

A paraszexuális ciklus során számos gombafajban észleltek mitokondriális DNS átrendeződést. Ilyen szempontból a legbehatóbban vizsgált a teljes életciklussal rendelkező *Aspergillus* csoport, az *A. nidulans* faj és rokonai. Ezen fajok esetében az intraspecifikus mtDNS rekombináció követésére mitokondriális mutációkat (oligomycin, kloramfenikol, hidegtűrés) alkalmaztak, mivel intraspecifikus polimorfizmust még heterokarion inkompatibilis csoportok között sem tudtak kimutatni (Croft és Dales 1984; Croft 1987; Coenen és mtsi, 1996). Fajon belüli inkompatibilis törzsek között protoplaszt fúzióval sikeresen hoztak létre heterokarionokat, ezek segítségével vizsgálták a mtDNS rekombináció

jelenségét. Rokon fajok között (*A. quadrilineatus, A. rugulosus, A. nidulans var. echinulatus*) kismértékű mtDNS polimorfizmus tapasztalható, mely az intronok számbeli eltérésére vezethető vissza (Croft és mtsi, 1987; Earl és mtsi, 1981; Turner és mtsi, 1982). Protoplaszt fúzióval a *Nidulantes* szekció közeli rokon fajai között interspecifikus fajhibridek hozhatók létre. Amikor a mtDNS rekombináció követésére antibiotikum szelekciót alkalmaztak, a heterokarionokban a kevert mitokondriális populáció homoplazmonként stabilizálódott és minden keresztezés esetében csak egyféle rekombináns mtDNS-t detektáltak (Croft és mtsi, 1980; Earl és mtsi, 1981). A mtDNS rekombináció kettős szülői sejtmagi kontroll mellett szelekciós nyomás nélkül is bekövetkezett. Az interspecifikus átvitelek során az allodiploidokban rekombináns mitokondriális genomokat észleltek. Ezekben az allodiploidokban és haploid szegregánsaiban a rekombináció folyamata nagyrészt a szülői mtDNS-ek szerveződésétől függ, és szelekciós nyomás által nem irányított. Az átvitelek során a különböző rekombinánsok kis mértékű variabilitást mutattak (Dales és mtsi, 1983; Croft és Dales, 1984; Croft, 1987). *A. nidulans* x *A. quadrilineatus* protoplaszt fúzióval nyert szomatikus hibridekben, amennyiben az *A. nidulans* mtDNS-re szelektáltak, nem történt rekombináció (*A. quadrilineatus* sejtmag + *A. nidulans* mtDNS → életképes), míg fordított esetben a mtDNS-ek rekombinációja következett be (*A. nidulans* sejtmag + *A. quadrilineatus* mtDNS → életképtelen) (Jadayel, 1986) Hasonló megfigyeléseket tettek más fajok esetében is (pl. *A. nidulans* var. *echinulatus*). Ha a donor mtDNS-e (amire szelektáltak) nagyobb volt, mint az akceptoré, a transzfer rekombináció nélkül ment végbe (*A. nidulans* var. *echinulatus* > *A. nidulans* > *A. quadrilineatus*). Ha a donor mtDNS-e kisebb volt, akkor ennek csak egy része inszertálódott az akceptor mtDNS-be, így rekombinánsok jöttek létre. Heteroplazmonokat nem észleltek (Earl és mtsi, 1981).

Ha nem szelektáltak egyik mtDNS-re sem, az *A. nidulans* x *A. nidulans* var. *echinulatus* fúzió esetében rekombinánsokat észleltek, míg az *A. nidulans* x *A. violaceus* fúzió

esetében az utódokban csak az *A. nidulans* mtDNS-ét észlelték (Osman, 1987). Az *A. violaceus* mtDNS kisebb mint az *A. nidulans* mtDNS-e, így ezen fúzió esetében is a fentebb említett "szabály" szerint öröklődött a mtDNS.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A kísérletek során alkalmazott törzsek

4.1.1 A vizsgált gombatörzsek jellemzőit az 1. táblázat mutatja.

Faj	Törzsszám	Törzsek eredete	Izolátum eredete	mtDNS típusa *
A. japonicus	1126	IMI 119894	-	1
A. japonicus	1287 lys- white	Kevei F.	mutagenezis	1
A. japonicus	1287 oliR	"	szelekció 1287-ből	1
A. japonicus	IN10	"	India	2
A. japonicus	427	J.H.Croft	Tunézia	3
A. japonicus	Fr.1.2.1	B. Megnegneau	Franciaország	4
A. japonicus	557	J.H.Croft	Ausztrália	5
A. japonicus	564	"	"	6
A. aculeatus	IN19	Kevei F.	India	7
A. japonicus	440	Szegedi M.	Ausztrália	8
A. tübingensis	No70	CBS 117.32	-	2a
A. tübingensis	0932	P. Lhoas	-	2b
A. tübingensis	0767	J.H.Croft	Anglia	2c
A. tübingensis	550	"	Ausztrália	2d
A. tübingensis	554	"	"	2e
A. tübingensis	566	"	"	2f
A. niger	N400	CBS 120.49	-	1a
A. niger	N909 oliR	A. Coenen	Szelekció N400-ból	1a

1. táblázat: A felhasznált *Aspergillus* törzsek. *: *A. japonicus* esetében nyolc eltérő mtDNS RFLP típust azonosítottak (ekkor még az *A. aculeatus*t is magába foglalta); *A. tübingensis* esetén hat csoport, jelük: 2a-2f; *A niger* esetén öt csoport, jelük: 1a-1e

4.1.2. Baktérium transzformáció során használt törzsek:

Escherichia coli DH5-α és XL1-Blue törzse

4.2 Felhasznált táptalajok és tápoldatok

4.2.1 Gombatörzsek fenntartásához és szaporításához alkalmazott táptalaj:

Maláta táptalaj: 1,00% glükóz

1,00% malátakivonat

0,50% élesztőkivonat

1,00% Bactoagar

4.2.2 Fonalasgombák rázólombikos tenyésztéséhez használt módosított Pontecorvo minimál tápoldat (Pontecorvo és mtsi, 1953):

0,25% $NaNO_3$

0,10% KH_2PO_4

0,05% $MgSO_4$

0,05% KCl

2,00% glükóz

0,50% élesztőkivonat

4.2.3 Protoplaszt képzéshez és regeneráláshoz alkalmazott táptalajok:

Mint 4.2.2 élesztőkivonat nélkül, 2 % agarral kiegészítve, illetve 4.2.1, 2 % agarral kiegészítve.

A táptalajokat ozmotikus stabilizálóként 0,7 M KCl-dal egészítettük ki.

4.2.4 *E. coli* tenyésztésére használt táptalaj/tápoldat:

LB táptalaj/tápoldat: 1,00% trypton

1,00% NaCl

0,50% élesztőkivonat

2,00% agar (táptalajként)

4.3 Felhasznált enzimek, pufferek, oldatok és primerek

4.3.1 Protoplasztképzéshez és protoplasztfúzióhoz használt oldatok és enzimek:

Protoplasztképzéshez: 0,02 % Novozym (Novo Trade Industry, Denmark), *A. niger* sejtfal-kivonattal indukált *Trichoderma harzianum* fermentlében oldva (Kevei és Peberdy 1984) 0,7 M KCl oldattal kiegészítve.

Protoplaszt fúzióhoz: 25 % PEG (Ms 4000) 0,1 M $CaCl_2$

Stabilizáló oldat: 0,7 M KCl

4.3.2 Totál DNS izoláláshoz használt anyagok:

LETS: 10 mM EDTA pH 8

10 mM Tris

0,1 M $LiCl_2$

0,5 % SDS

TE: 10 mM Tris pH 8

1 mM EDTA

Fenol oldat (PCI): fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke (Maniatis és mtsi 1982)

Kloroform: kloroform-izoamilalkohol (24:1)

4.3.3 A mtDNS preparáláshoz használt oldatok (Láday és mtsi, 2001):

ETS-1: 10 mM Tris pH 7,5

5 mM EDTA

0,44 M szacharóz

ETS-2: 10 mM Tris pH 8

10 mM EDTA

0,44 M szacharóz

MTS: 20 mM Tris pH 7,5

0,44 M szacharóz

5 mM $MgCl_2$

TS: 50 mM Tris pH 8

10 % szacharóz

TESDS: 0,25 mM Tris pH 8

100 mM EDTA

1 % SDS

TE: 10 mM Tris pH 8

1 mM EDTA

4 M Na-acetát

5 M NaCl

4.3.4 Mini- és maxilizátum készítés (plazmid tisztítás) oldatai (Kovalenko és mtsi. 1994):

Lízis puffer: 50 mM glükóz; 25 mM Tris (pH 8); 10 mM EDTA; kiegészítve 2 mg/ml lizozimmel

Alkalikus SDS oldat: 1 % SDS; 0,2 M NaOH

„High salt" oldat: 3 M Na-acetát, pH 4,5-re állítva ecetsavval

4.3.5 DNS blottoláshoz és hibridizációhoz használt oldatok

A hibridizációs kísérletek során a Boehringer-Mannheim cég "DIG DNA Labeling and Detection Kit"-jét használtuk. A reagensek és oldatok nagy részét már elkészített formában hozza forgalomba a cég.

0,25 M HCl

0,4 M NaOH

0,2 M EDTA, pH 8

4 M LiCl

20xSSC (0,3 M Na-citrát; 3 M NaCl, pH 7)

Hibridizációs puffer (5xSSC; 0,1% N-laurylsarcosine; 0,02% SDS; 1% blocking reagens)

Mosó pufferek:

2xSSC; 0,1% SDS

0,1xSSC; 0,1% SDS

1. puffer (0,1 M maleinsav; 0,15 M NaCl, pH 7,5)

2. puffer (1% blocking reagens 1. pufferben oldva)

3. puffer (0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; 50 mM $MgCl_2$, pH 9,5)

dimetil-formamid

4.3.6 Gélelektroforézishez használt anyagok:

TBE puffer: 1 l-hez: 10,8g Tris (pH 8); 5,5g bórsav; 0,75g EDTA

TAE puffer: 1 l-hez: 4,84g Tris (pH 8); 0,37g EDTA; 1,14 ml jégecet

Agaróz gél: 0,8 és 1% agaróz TBE illetve TAE pufferben

Etídium-Bromid (SIGMA) törzsoldat: 10 mg/ml desztillált vízben oldva

„Loading" oldat: 40 % szacharóz; 0,25 M brómfenolkék; 0,2 M EDTA; pH 8

4.3.7 Kompetens sejt készítéshez és baktérium transzformációhoz használt oldatok:

50 mM $CaCl_2$ oldat

TCM puffer: 10mM Tris (pH 7,5); 10 mM $CaCl_2$; 10 mM $MgCl_2$

X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid): 25mg/ml dimetilformamidban

IPTG: 25mg/ml steril desztillált vízben oldva

4.3.8 RAPD-PCR-hoz felhasznált anyagok:

CORE puffer (20 reakcióra): 10-10 µl dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Sigma)

50 µl 10x inkubációs puffer

50 µl $MgCl_2$

10 µl steril desztillált víz

COCTAIL (10 reakcióra) 1 µl Taq polimeráz (5U/µl)

5 µl primer (10 mM)

144 µl steril desztillált víz

45 µl ásványi olaj/1 reakció

4.3.9 Egyéb felhasznált oldatok, anyagok, reagensek és enzimek:

Oligomycin (Reanal): 10 mg/ml törzsoldat

Agaróz (Reanal)

RNáz (Sigma, bovin pancreas): 10 mg/ml törzsoldat

DNáz (Sigma, bovin pancreas)

T4 DNS ligáz (Boehringer Mannheim, Fermentas Ltd.)

Taq polimeráz (ZENONBio)

Pfu DNS polimeráz (Stratagene)

Ampicillin (Sigma): 50 mg/ml törzsoldat

Lizozim (Reanal): 10 mg/ml törzsoldat

RNA Plus oldat (Q-Biogene) RNS izoláláshoz

Restrikciós endonukleázok (Amersham International, Fermentas Ltd.):

*Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hin*dIII, *Hae*III, *Pst*I, *Xho*I, *Bam*HI, *Xba*I

A restrikciós enzimes emésztésekhez a gyártó cég által forgalmazott puffereket használtuk.

4.3.10 Felhasznált tisztító és izoláló kit-tek:

RevertAidTM First Stand cDNA Synthesis Kit (FERMENTAS) - cDNS készítéshez

Enhanced Avian RT-PRC Kit (Sigma) - cDNS készítéshez

Bio101 Geneclean Spin Kit (Q-Biogene) - DNS tisztításához

GeneElute PCR Clean-up Kit (Sigma) - PCR termék tisztításához

4.3.11 A Southern hibridizációban felhasznált DNS próbák:

4.3.11.1. *A. nidulans* FGSC A4 (Glasgow törzs) mitokondriális DNS-éből (Brown és mtsi, 1985) készített heterológ génpróbák (Hamari és mtsi 1999):

rnl:	6,7 kb *Eco*RI fragmentum
rns:	1,44 kb *Hin*dIII-*Bgl*II fragmentum
*cox*1:	4,3 kb *Hin*dIII-*Bgl*II fragmentum
*cox*2-*ndh*3-*atp*9:	5,5 kb *Bam*HI fragmentum
*cox*3-*ndh*6:	2,72 kb *Hin*dIII-*Pvu*II fragmentum
cob:	1,17 kb *Bgl*II fragmentum
*ndh*1-*ndh*4:	1,78 kb *Hin*dIII-*Hha*I fragmentum
*ndh*4-*atp*8-*atp*6:	2,17 kb *Hin*dIII fragmentum
A4-A5-*orf364*:	2,77 kb *Hin*dIII-*Pvu*II fragmentum (A4 és A5 a *ndh2* gén részei)
A6:	0,55 kb *Hin*dIII-*Pvu*II fragmentum (az *ndh2* gén 300bp-os része)

4.3.11.2 *A. carbonarius* 1118-as izolátumból származó génpróbák (Hamari és mtsi 1999):

*ndh*5: 1,66 kb *Eco*RI-*Bam*HI fragmentum

*ndh*41: 828 bp *Pst*I-*Xba*I fragmentum

4.3.11.3 *A. tübingensis* 0932-es törzséből készített génpróbák:

A következő génekhez készítettünk génpróbákat *A. nidulans*ból származó heterológ primerek segítségével (2. táblázat): *cox*1, *cox*2, *cox*3, *atp*6, *atp*8, *atp*9, *nad*1, *nad*3, *nad*4, *nad*4L, *nad*5, *nad*6, *cob*, *rns*

4.3.12 PCR-hoz, RAPD-PCR-hoz felhasznált primerek

Az Operon random primer kit C primereit (Operon Technologies, Inc., Alameda, California, USA) alkalmaztuk DNS szekvenciák amplifikálásához. Kísérleteinkben a következő dekamereket használtuk:

OPC-01 (5'-TTCGAGCCAG-3')	OPC-11 (5'-AAAGCTGCGG-3')
OPC-02 (5'-GTGAGGCGTC-3')	OPC-12 (5'-TGTCATCCCC-3')
OPC-04 (5'-CCGCATCTAC-3')	OPC-13 (5'-AAGCCTCGTC-3')
OPC-05 (5'-GATGACCGCC-3')	OPC-14 (5'-TGCGTGCTTG-3')
OPC-06 (5'-GAACGGACTC-3')	OPC-15 (5'-GACGGATCAG-3')
OPC-07 (5'-GTCCCGACGA-3')	OPC-16 (5'-CACACTCCAG-3')
OPC-08 (5'-TGGACCGGTG-3')	OPC-18 (5'-TGAGTGGGTG-3')
OPC-09 (5'-CTCACCGTCC-3')	OPC-19 (5'-GTTGCCAGCC-3')
OPC-10 (5'-TGTCTGGGTG-3')	OPC-20 (5'-ACTTCGCCAC-3')

4.3.13 A felhasznált specifikus primerek

Az alkalmazott primereket a 2. táblázat mutatja.

eredet	célgén	reverse (5'->3')	forward (5'->3')
A gének méreteinek meghatározására készített primerek:			
An X00790	*cox1*	ttacgattgtactggtaaactc ctgtactaataattcccaaccctg	gtgtagttcaatggtagaacagc ctgattcttcggacacccagagg
An X15441	*cox2*	ccttccatttgatctcttaatcata	ggacacattctaatggatgcaccaa
An J01390	*cox3*	cagtataagattcctgattcgtatc	caccatcaccttgaccattatttac
An AH001255 and J01388	*cob*	ccggggaaatcgaatccctatattt	tgctctgtaaataatgcaactttaa
An J01390	*atp6*	ttgagcttgaataaatgcgata	tctttaaatgctaatgtattagggaa
An J01390	*atp8*	ttataatttatttatatatatacgtg	atgccacaactagtaccattc
An M35967	*atp9*	aaaaagccatcattaaagcaaata	caatcagctagaataataggaacagg
An J01390	*rns*	ttttctagataattcatcccgtgcaattt	ttttctagaaaattttgagtttgatgatggc
An J01390	*rnl*	atccctagcgtaacttttttctataa	cgaagtgaattgaaatatcttagta
An V00650	*nad1*	ggtattatacctagaccatatac	gaaggtctttagtaattgttcctgc
An X15441	*nad3*	gcaaaacctaatgttcctac	ccagtattagcaataatcttgc
An V00650	*nad4*	atattatatattaaataagaaactg	ggtgtaataactatattatatgc
An X15011	*nad5*	ctcttagaagtttgaccacc	gtaggagtaacaggtgcac
An J01390	*nad6*	gttattactatggcacctaccattcc	ctctaatggattattagagg
Az intergénikus részek meghatározására készített primerek:			
An J01390	*rnl/ tRNA-Met*	ctaccgattgaactatcttggc	ggcatggtaggaaggctacg
An X00790 and X15441	*cox1/nad3*	ccacattcaaatgcactatc	gagtgatgtttaactagccc
An X15441	*nad3/cox2*	gtggtgaggcactatcttg	caaatgggatatatggtttag
An X15011 Tr Y18476	*nad5/nad2*	ctcttcttaaactaagagaattag	ggtaaattaagcactagtg
Tr Y18476	*nad2/cob*	ggccgttcatcaaaaaatagtcc	ccaattctttatctgttcc
An J01389 And V00650	*cob/nad1*	cctacagcattaggacctaatc	ggtgcaaaacacgttgaaactc
An V00650	*nad1/nad4*	ccataattaccttgtaatgttac	ctttccctagaatacgttttg
An J01390	*nad4/atp6*	ctgttgcatatatagcttcttggc	ccctgctcctattttagatgg
An J01390	*rns/nad6*	cagatacaacagggtttctac	ggtgttaagtcgaaatatgg
An J01390	*atp6/rns*	ccccttactttaaggtagcc	ctcaggattagagttagctatcgc
Egyéb – a teljes mitokondriális genom megszekvenálásához szükséges – primerek:			
2b AF271619	*cox1*	ggcccatatgagcaactacgtagtaag ctaactctgtactctggag catagtagacaacaacctaaaaacatag gtagtatcatttaatctgttc	 gttcttccagagactacacgcccaaag cagggttgggaattattagtacag gcatttcactcattagatgc ctaataatacactaaatcttg

2. táblázat: A primereket az NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) adatbázisában lévő szekvenciák alapján készítettük. Jelölések: *A. niger* N909-es törzs (1a), *A. tübingensis* 0932-es törzs (2b), *A. nidulans* (An) és *Trichophyton rubrum* (Tr), *A. tübingensis* 566-os törzs (2f). A génnevek rövidítéseit a 3. táblázat tartalmazza.

eredet	célgén	reverse (5'->3')	forward (5'->3')
2b AF271619	*cox1* intron1	cctctgggtgtccgaagaatcag	gagaagtccaggtatacgtttacac
2b AF271619	*cox1* intron2	ccaccataacatgtagctaatc	gagtcccacgccccgaagtctc
2b AF271619	*cox1* intron3	gtgatcgtatgataatcc	ggaggattaagtggtgttg
1a AF177534	*tRNS-His/ tRNS-Met*	gctgttctaccattgaactacac	gccaagatagttcaatcggtag
1a AF271620	*atp6*	ttgagcttgaataaatgcgata	tctttaaatgctaatgtattagggaa
1a AY771642	*nad1*		gagtatgtagcaccaacacaagc
1a AY525763	*orf2/nad4*	gggatggataggattgtttgc	
1a AY525763	*orf1/orf2*	cctcattgtgttcctggag	
1a AY525763	*nad4*		ggtgatgtaactagaagag gctcacgttgtatcaccaaaatc
1a AY525764	*nad5*	ggagctaatgcaaatactgatac	ctatatagaattattttataac
1a AY525764	*nad4L/ nad5*	ctcctacttttctaccaag	
2b AY525762	*cob/nad1*	atgtttaaataagctaaaag	
2b AY525762	*nad1*	ccatatgtagctatagcac	
2b AY525762	*nad1/orf1*		tagtcaatgattaaatgtc
2b AY525762	*orf1/orf2*		gcgttatcaggtataataattgc
2b AY525762	*nad4*	gataatattgctataggc	cctaaagcttctttaaactatac
2b	*nad4/atp8*		ggtgatgtaactagaagag ggtatacactattcagtttc
2b	*nad5*	ctttagaatagaatccagtc	tagtagaattggaatatagg cttttagacgtgatactgc
An V00650	*nad1*	ggtattatacctagaccatatac	gaaggtcttttagtaattgttcctgc
An V00650	*nad1/nad4*	ccataattaccttgtaatgttac	ctttccctagaatacgttttg
An V00650	*nad4*	atattatatattaaataagaaactg gcatataatatagttattacacc ggtggtaatatactctcaaaaaag	ggtgtaataactatattatatgc ctttttgagagtatattaccacc gtaacattacaaggtaattatgg
2f	*nad5/nad2*		gtttctttaatcaaagattc
2f	*nad1/cob*	ctatttaacctctattaagc	
2b	*cox3*	catgatccgtaaacactatcag	
2b	*rns*		ggtttaaagggtacctagacgg ggaattactagtagtaatcgtg
2f	*cob*	caggtggagtttgcattggg ctaataatgatccaaagtttc cattatttggttatcacgg	
2f	*nad2*		gtattgggttatttggaggg gaaataacaacatatatacc cagatggtattctctgcagc
2b	*nad6*	gttataactattgcacctacc	
2b	*atp6/rns*	caatacgaaatttactgctctc	
1a	*tRNS-Ser/ rnl*		taagagagttggctgagtgg

2. táblázat (folytatás)

eredet	célgén	reverse (5'->3')	forward (5'->3')
1a	*nad2/cob*	gaggcttttatataaactattaacc	
2b	*cox3/rnl*	ctaagatatttcaattcacttcg	
1a	*nad4L*	cctaaacctattgcagattc ccttccatttgttctcttaatc	
1a	*cox2*	ttaatgaataaccacttcaag	taaatcttgaagtggttattc
2b	*nad3*	gtatatgcacttaccacata	
1a	*atp9*	gccatcattaacgcaaataa	
An X06961	*rnl1334*	gccttagaggaaggttcccc	ggggaaccttcctctaaggc
An X06961	*rnl1814*	gtaaagtcactacaacccccg	cgggggttgtagtgactttac
An X06961	*rnl1702*	ccctccttatcccgaagttacg	cgtaacttcgggataaggaggg
An X06961	*rnl2469*	catatgccccgcttacgcaagtg	cagttgcgtaagcggggcatatg
An X06961	*rnl4258*	cgaggtgccaaaccgcgcactc	gagtgcgcggtttggcacctcg
1a	*rnl*		gaatgctgacatgagtaacg cctgtagcaagtagattag ctatatggtaaatagatg cttttggtgttaaaggttg gcccggttsgcstssssgtsstg

2. táblázat (folytatás)

atp6	ATP szintetáz 6. alegység	*cob*	citokróm b	A	alanin tRNS génje
atp8	ATP szintetáz 8. alegység	*rnl*	riboszómális RNS nagy elegység	R	arginin tRNS génje
atp9	ATP szintetáz 9. alegység	*rns*	riboszómális RNS kis elegység	N	aszparagin tRNS génje
nad1	NADH dehidrogenáz 1. alegység	*orf*	azonosítatlan leolvasási keret	Q	glutamin tRNS génje
nad2	NADH dehidrogenáz 2. alegység	M	metionin tRNS génje	E	glutaminsav tRNS génje
nad3	NADH dehidrogenáz 3. alegység	H	hisztidin tRNS génje	L	leucin tRNS génje
nad4	NADH dehidrogenáz 4. alegység	K	lizin tRNS génje	F	fenilalanin tRNS génje
nad4L	NADH dehidrogenáz 4L alegység	G	glicin tRNS génje	C	cisztein tRNS génje
nad5	NADH dehidrogenáz 5. alegység	D	aszparagin tRNS génje	T	treonin tRNS génje
nad6	NADH dehidrogenáz 6. alegység	S	szerin tRNS génje	Y	tirozin tRNS génje
cox1	citokróm-c oxidáz 1. alegység	W	triptofán tRNS génje	V	valin tRNS génje
cox2	citokróm-c oxidáz 2. alegység	I	izoleucin tRNS génje		
cox3	citokróm-c oxidáz 3. alegység	P	prolin tRNS génje		

3. táblázat: A mitokondriális gének és tRNS-ek rövidítései.

4.4. Vizsgálati módszerek, kísérleti technikák

4.4.1 Protoplasztképzés

Fonalas gomba sejtek protoplaszt képzését szilárd maláta-élesztőkivonatos táptalaj felületére helyezett celofánon (Kevei és Peberdy, 1984) nevelt tenyészetekből végeztük. A sejtfal oldására 0,02% NovoZym-mel kiegészített saját készítésű, indukált *Trichoderma* törzsekkel termeltetett lítikus enzimet alkalmaztunk. A lítikus enzim termelésének indukciójára szénforrásként csak *A. niger* sejtfalpreparátumot tartalmazó Pontecorvo minimál tápoldatot használtunk. Az egy hetes inkubációs irázatva nevelt *Trichoderma harzianum* kultúrából nyertük, a fermentlé besűrítésével (Kevei és Peberdy, 1984). A protoplasztáló enzimoldatot 0,7 M KCl-dal egészítettük ki, a protoplasztok stabilizálása érdekében.

4.4.2 Protoplasztfúzió és regeneráció (Kevei és Peberdy, 1977; Kevei és mtsi, 1988)

A fúziós partnerek frissen izolált protoplasztjainak 1:1 arányú keverékét ($5x10^6$ protoplaszt/ml páronként) centrifugálással ülepítettük, majd a stabilizáló oldat eltávolítása után 25% PEG oldatban felszuszpendáltuk úgy, hogy az aggregálódás előtti protoplaszt szám 10^7/ml érték körül volt. A 0,7 M KCl oldattal stabilizált, 0,1 és 0,5 μg/ml oligomycin tartalmú Pontecorvo minimál táptalajokra 5-5 ml 0,8% agar tartalmú fedőagart öntöttünk, melyek a regeneráltatandó mintát tartalmazták (auxotróf törzseknél a regenerációs táptalajt a mutánsok igényeinek megfelelően kiegészítettük különböző aminosavakkal és vitaminokkal 50 μg/ml koncentrációban). A regeneráció értékelése a mikroba növekedési gyorsaságától függően a leoltástól számított 3-10 napon történt. A kísérleteket megfelelő kontrollok alkalmazása mellett végeztük. Vizsgáltuk a szülői protoplasztok regenerációs képességét, az esetleges „back mutációt" és a spontán sejtmagi rezisztencia kialakulását, valamint a donor és a recipiens törzsek protoplasztjainak PEG kezelés utáni regenerációs gyakoriságát.

4.4.3 Totál DNS izolálása (Leach és mtsi, 1986)

A 0,2 g liofilezett micéliumot dörzsmozsárban elporítottunk, 2 ml LETS pufferben alaposan felkevertük. Ezután 2 ml PCI-t adtunk az elegyhez, majd a vortexelést követően 4°C-on 10 percig 3000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszóhoz kétszeres mennyiségű etanolt adtunk. A DNS-t 30 percig -70°C-on kicsaptuk, majd centrifugálással (10 perc, 3000 g, 4°C) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, majd 800 µl TE oldatban felszuszpendáltuk. Az így kapott DNS oldatot többszöri fenolozással, majd kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keverékével tovább tisztítottuk. A DNS-t kétszeres mennyiségű etanollal ismét kicsaptuk, végül 100 µl TE pufferben szuszpendáltuk fel.

4.4.4 Totál DNS izolálás optimalizálása saját törzseinkre

A 0,02 g liofilezett micéliumot dörzsmozsárban elporítottunk, 0,6 ml LETS pufferben alaposan felkevertük. Ezután 0,6 ml PCI-t adtunk az elegyhez, majd a vortexelést követően 10 percig 12000 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszóhoz kétszeres mennyiségű etanolt adtunk. A DNS-t 30 percig -70°C-on kicsaptuk, majd centrifugálással (mint előbb) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, majd 0,6 ml TE oldatban felszuszpendáltuk. Az így kapott DNS oldatot 30 percen keresztül 37°C-on kezeltük RNáz oldattal (10 mg/ml-es törzsoldatból 4 µl hozzáadásával). Ezután egy újabb fenolozással, majd kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keverékével tovább tisztítottuk. A tisztított DNS már használható emésztéshez és PCR reakcióhoz, de szükség esetén a DNS-t kétszeres mennyiségű etanollal ismét kicsaptuk, végül 100 µl TE pufferben szuszpendáltuk fel.

4.4.5 Mitokondriális DNS izolálása (Láday és mtsi, 2001)

Fonalas gomba 36 órás micélium tenyészetét szűréssel összegyűjtöttük, hideg csapvízzel, majd ETS-1 oldattal mostuk. A sejtfeltárást üveggyöngyök hozzáadásával Bead-

RECEIVED

Beaterrel (Biospec Products) 2,5 percen keresztül jégfürdős hűtéssel ETS-1 oldatban végeztük, majd a sejtfaltörmelékeket 15 perc 3000 rpm centrifugálással távolítottuk el. A mitokondriumokat 40 perc 12000 rpm centrifugálással ülepítettük, majd DNáz kezelés céljából 30 ml MTS oldatba szuszpendáltuk fel 6 mg/ml DNáz hozzáadásával. 1 óra 4°C-on történő kezelés során az ép mitokondriumok mellől a magi eredetű nukleinsavakat eliminátuk. A reakciót 80 ml ETS-2 oldat hozzáadásával állítottuk le, majd a mitokondriumokat ismét összegyűjtöttük 15 perc 18500 rpm centrifugálással. A pelletet 1 ml TS oldatban felszuszpendáltuk, majd 16 ml TESDS oldat hozzáadásával 15 percig 65°C-on inkubálva feltártuk a mitokondriumokat. 3 ml 5 M NaCl oldat hozzáadásával megnöveltük a sókoncentrációt, előbb 30 perc 15500 rpm centrifugálással, majd 2 ml 4 M Na-acetát oldat hozzáadása után 5 perc 15500 rpm centrifugálással tisztítottuk a mintát. A felülúszóhoz azonos térfogatú izopropanolt adva 1 éjszakán át -20°C-on kicsaptuk a mitokondriális DNS-t, melyet azután 15 perc 12000 rpm centrifugálással ülepítettünk. A DNS-t 1 ml TE-ben oldottuk fel, 1 órán át RNáz kezeltük 10 µl 10 mg/ml RNáz-zal 37°C-on, majd többször fenolozva tisztítottuk. Ezt követően a DNS-t etanollal kicsaptuk, végül 100 µl TE-ben oldottuk.

4.4.6 DNS izolálása agaróz gélből

Agaróz gélen elválasztott DNS fragmentek izolálása Benore és Anderson (1995) által leírt módszer alapján történt. A visszaizoláláshoz mindig TAE pufferben végeztük az elektroforézist. A szükséges fragmentumokat UV lámpa alatt kivágtuk, feldaraboltuk, majd liofileztük (fagyasztva szárító berendezésben). A degradált térhálós szerkezetű beszárított géldarabot 750 µl TE : abszolút etanol 1:1 arányú keverékében rázattuk másfél órán át, majd 15 perc 12000 rpm centrifugálással kiülepítettük a géltörmeléket. A felülúszót, amely a gélből kiázott DNS-t tartalmazta óvatosan eltávolítottuk, úgy hogy a gélcsapadékkal ne szennyezzük

be. A DNS-t 1/10 térfogatnyi 3 M Na-acetát és kétszeres térfogatnyi abszolút etanol segítségével kicsaptuk (-70°C, minimum 1 óra), 12000 rpm centrifugálás, és a pellet beszárítását követően TE pufferben vettük fel, és így tároltuk.

A későbbiekben egy másik, sokkal gyorsabb módszert is alkalmaztunk. Visszaizoláláshoz itt is TAE pufferben végeztük az elektroforézist. A megfelelő elválasztás után a szükséges fragmentumokat UV lámpa alatt kivágtuk, majd akváriumi szűrővattával bélelt PCR csőbe helyeztük, mely alján kis lyuk található, ezt pedig egy Eppendorf csőbe tettük. 16 perces fokozatos centrifugálással (4000-12000 rpm) kivontuk a gélből a DNS-t, amely az Eppendorf cső alján gyűlt össze. A DNS tartalmú folyadékhoz 1/10 térfogatnyi 3 M Na-acetátot adtunk, majd kétszeres térfogatú abszolút etanollal kicsaptuk a DNS-t -70°C-on legalább 30 percig inkubálva. Ezt követően a csapadékot centrifugálással kiülepítettük, (12000 rpm, 10 perc), a felülúszó eltávolítása után beszárítottuk, végül 10 µl TE-ben vettük fel és így tároltuk.

4.4.7 Nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel, méretük meghatározása

A nukleinsavak elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk. A fragmentumokat 0,8 illetve 1 %-os agaróz gélen választottuk el egymástól (Sambrook és mtsi. 1989). A gélt TBE pufferben futtattuk. A futtatás paraméterei nagy kád (16x20 cm) esetén: 70 mV, 108 mA. A DNS fragmentumok láthatóvá tételéhez etídium-bromid oldatot (1 µg/ml) alkalmaztunk. Méretük meghatározását "GelBase/GelBlot Pro" (Ultra Violet Product Ltd) géldokumentáló- és kiértékelő szoftver segítségével végeztük el.

4.4.8 Restrikciós térképek készítése Hamari és mtsi (1999) alapján

A restrikciós térképezéshez használt módszerek során figyelembe vettük a vizsgált organizmus mitokondriális DNS-ének méretét. Ez alapján a kicsi, 40 kb mitokondriális

DNS-el rendelkező izolátumok térképezését a leggyorsabban **A** és **B** restrikciós enzimmel történő preparatív emésztés során kapott mitokondriális DNS fragmentumok agaróz gélből történő visszaizolálását követően **B** és **A** restrikciós enzimekkel történt reciprok emésztéssel tudtuk végrehajtani (Hamari és mtsi., 1998). Az **A** és **B** fragmentumok egymásutániságának meghatározásához agaróz gél egyik oldalára felvittük az izolált **A** fragmentumok **B** restrikciós enzimmel emésztett mintáit, a másik oldalára az izolált **B** fragmentumok **A** restrikciós enzimmel emésztett mintáit, középre pedig a térképezendő izolátum mitokondriális DNS-ének **A**, **B** és **A/B** enzimekkel kettőseméstett mintáit egy DNS molekulasúly marker kíséretében. Ezt követően 1 %-os agaróz gélen elektroforézist hajtottunk végre, és közben a korai, közepes és késői futási stádiumokban dokumentáltuk az elektroforetikus képet. A gélfotók jobb és bal oldalán szereplő fragmentumok egymással, és a középre felvitt kettőseméstéssel megegyező számú és méretű fragmentumokat hordoztak, ennek alapján vizuális módon "össze lehet olvasni" az **A** és **B** emésztéskor kapott fragmentumok sorrendjét. A nagyobb, 50 kb feletti mitokondriális DNS-ek térképezésekor a fenti módszert kombinálnunk kellett az **A** és **B** fragmentumok pSK vektorba történő klónozásával, mivel az emésztéseket gyakran tíz-tizenöt fragmentum-szám jellemzett, amit még az is bonyolít, hogy gyakori az azonos, vagy közel azonos méretű fragmentumok száma, melyek a gélen azonos távolságra, azaz együtt futnak. Ilyenkor minden egyes **A** és **B** fragmentumot pSK vektorba klónoztunk, majd ezen klónok reciprok emésztéseit végeztük el, és a fentiekben megegyező elvek szerint 1%-os agaróz gélben futtattuk meg őket. A "vizuális fragmentum-összeolvasás" mellett szükség volt az adott fragmentumok méretének pontos meghatározására is. Így tudtuk a leggyorsabban a legnagyobb mitokondriális DNS-ek restrikciós térképét létrehozni. Az egyes izolátumok mitokondriális DNS-ének valós mérete kivétel nélkül a restrikciós

térképek szerkesztésekor határozható meg, ugyanis a nagyméretű fragmentumok meghatározásakor adódott tévedések kiküszöbölődnek.

4.4.9 DNS fragmentumok klónozása, baktérium transzformáció

A DNS fragmentumokat pBluescript KS vektorba ligáltuk. A ligálást T4 DNS ligázzal végeztük a gyártó által javasolt feltételek között. A sejtek transzformációját a Sambrook és mtsi. (1989) által ismertetett módon hajtottuk végre. A 250 ml térfogatban tárolt kompetens sejteket (ld. 3.4.7) –70°C-ról való kivétel után 15 percig jégen tároltuk, majd hozzáadtuk a fent említett ligátumot és 100 µl TCM puffert. Enyhe összekeverés után 25 percig jégen állni hagytuk. Ezt követően 3,5 perces 37°C-os hősokkot alkalmaztunk, majd a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, végül 5000 rpm 3 perces centrifugálással ülepítettük a sejteket. A felülúszó nagy részét eldobtuk, a maradék folyadékban a sejteket felszuszpendáltuk és 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajra szélesztettük (melyre előzőleg 40 µl X-gal-t és 40 µl IPTG-t szélesztettünk, mindkettő 25 mg/ml-es törzsoldatból). A transzformáns sejteket 37°C-on „over night" tenyésztettük, az inzert DNS-t és az „üres" vektorokat tartalmazó telepeketszín alapján szelektáltuk (kék és fehér telepek).

4.4.10 Plazmid tisztítás

Baktérium sejtekből alkalikus lízis módszerével tisztítottunk DNS plazmidokat (Kovalenko és mtsi., 1994). Minilizátum készítés esetén 2 ml 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatban rázatva növesztettük az *E. coli* sejteket egy éjszakán át 37°C-on. Másnap a sejteket 3 perc 5000 rpm enyhe centrifugálással ülepítettük, majd 100 µl lízis pufferben felszuszpendáltuk. 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd 200 µl alkalikus SDS oldat hozzáadása után a csöveket a minták feltisztulásáig kézzel billegtettük. Ezután 5 percig jégen tároltuk, majd 150 µl „high salt" oldatot adtunk hozzá. Fél óráig jégen

állni hagytuk, majd 12 perc 12 rpm centrifugálással ülepítettük. A felülúszót azonos térfogatú fenol (PCI) oldattal tisztítottuk, abszolút etanollal kicsaptuk, végül 35-40 µl TE pufferben vettük fel. Maxilizátum készítés esetében is hasonlóan jártunk el, csak 100 ml sejtből indultunk ki, így arányosan több feltáróanyagot használtunk fel.

4.4.11 Kompetens sejt készítés

E. coli DH5α törzsének 100 ml 0,4 OD-jű (optikai denzitás) tenyészetét 3000 rpm 10 perc centrifugálással ülepítettük, majd 50 ml hideg 50 mM $CaCl_2$ oldatban szuszpendáltuk fel. 10 percen át jégen tartottuk, majd 3000 rpm 10 perc centrifugálással újra ülepítettük a sejteket, melyeket 5 ml hideg 50mM $CaCl_2$ oldatban szuszpendáltunk fel. Majd legalább 1 órán át jégen inkubáltuk. A sejteket ezután közvetlenül felhasználhattuk transzformálásra, vagy pedig 15%-os glicerintartalom mellett –70°C-on tárolhatók.

4.4.12 DNS blottolás és hibridizáció

Az agaróz gélelektroforézissel elválasztott DNS-t alkalikus transzfer módszerrel vittük át Hybond N+ membránra (Reed és Mann, 1985). A génpróbák digoxigeninnel történő jelölését és a hibridizációt a gyártó által előírt módon végeztük el. A hibridizációt, valamint a nem kötődött, jelölt DNS eltávolítását a filterről minden esetben 68°C-on végeztük el.

4.4.13 DNS szekvenciák meghatározása, összehasonlítása adatbankokkal

A klónozott DNS fragmentumok szekvenciájának meghatározását az MTA Szegedi Biológiai Központjában végezték el, ABI-PRISM Model version 2.1.0 automata szekvenátorral, a Maxam-Gilbert módszer alapján. A szekvenciák adatbankokkal történő összehasonlítását az NCBI (National Center for Biotechnology Information) "on-line service"-én a BLAST (Altschul és mtsi, 1990) és FASTA (Pearson és Lipman, 1988)

programok felhasználásával végeztük. Az általunk szekvenált és adatbankba leadott szekvenciákat a 4. táblázat tartalmazza.

adatbanki szám	törzs	szekvenciatartalom	hossz
AF177534	*A. niger* N909	*tRNS-Met*, *tRNS-His* és *cox*1 gének	3759 bp
AF271619	*A. tübingensis* 0932	*tRNS-Met*, *tRNS-His* és *cox*1 gének	5708 bp
AF271620	*A. niger* N400	*atp*6 gén (oligomicin szenzitív törzsé)	664 bp
AF271621	*A. niger* N909	*atp*6 gén (oligomicin rezisztens törzsé)	664 bp
AY525762	*A. tübingensis* 0932	*nad*1, *nad*4, *orf*1 és *orf*2 gének	5144 bp
AY525763	*A. niger* N909	*nad*4, *atp*8, *atp*6, *tRNS-Arg* és *tRNS-Asn* gének	3977 bp
AY525764	*A. niger* N909	*nad*4L és *nad*5 gének	2240 bp
AY771642	*A. niger* N909	*adh*1 gén (részleges)	1061 bp
AY771643	*A. tübingensis* 0932	*nad*2 és *nad*5 gének (részleges)	1261 bp
AY771644	*A. tübingensis* 0932	*nad*4L gén	270 bp
AY693993	*A. tübingensis* 0932	a *cox*1 gén cDNS szekvenciája	641 bp
DQ171928	*A. tübingensis* No70	a *cox*1 gén első intronja	1171 bp
DQ171932	*A. tübingensis* No70	a *cox*1 gén második intronja	1101 bp
DQ171933	*A. tübingensis* 0767	a *cox*1 gén első intronja	1101 bp
DQ171929	*A. tübingensis* 550	a *cox*1 gén első intronja	1171 bp
DQ171934	*A. tübingensis* 550	a *cox*1 gén második intronja	1101 bp
DQ171926	*A. tübingensis* 554	a *cox*1 gén első intronja	1159 bp
DQ171930	*A. tübingensis* 554	a *cox*1 gén második intronja	1171 bp
DQ171935	*A. tübingensis* 554	a *cox*1 gén harmadik intronja	1101 bp
DQ171927	*A. tübingensis* 566	a *cox*1 gén első intronja	1159 bp
DQ171931	*A. tübingensis* 566	a *cox*1 gén második intronja	1171 bp

4. táblázat: A leadott szekvenciák adatbanki elérési számai az NCBI honlap apalján (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) A B202, B203, B205, B212, B227, B240 jelű törzsek az *A. niger* x *A. tübingensis* keresztezésből származnak

adatbanki szám	törzs	szekvenciatartalom	hossz
AY802760	*A. tübingensis* B205, B202, B203, B212, B227, B240	*tRNS-Met, tRNS–His*	435 bp
AY802759	*A. tübingensis* B205, B202, B203, B212, B227, B240	*cox*1 gén	5059 bp
DQ178134	*A. niger* N909 és *A. tübingensis* B205	*atp*9 gén	225 bp
DQ178135	*A. tübingensis* 0932, B202, B203, B212, B227, B240	*atp*9 gén	554 bp
DQ178136	*A. niger* N909 és *A. tübingensis* B205, B212	*nad*4L gén	747 bp
DQ178137	*A. niger* N909 és *A. tübingensis* B205, B212, B203	*nad*5 gén (részleges)	669 bp
DQ178138	*A. tübingensis* 0932, B202, B227, B240	*nad*5 gén (részleges)	669 bp
DQ178139	*A. niger* N909 és *A. tübingensis* B205, B212, B203	*nad*2 gén (részleges)	580 bp
DQ178140	*A. tübingensis* 0932, B202, B227, B240	*nad*2 gén (részleges)	583 bp
DQ178141	*A. niger* N909 és *A. tübingensis* B205, B212, B203, B202, B227	*cob* gén	1158 bp
DQ178142	*A. tübingensis* 0932, B240	*cob* gén	1158 bp
DQ178143	*A. tübingensis* 0932, B240, B227	*nad*4 (részleges)	1020 bp
DQ178144	*A. niger* N909 és *A. tübingensis* B205, B212, B203, B202	*nad*4 (részleges)	1020 bp
DQ206451	*A. tübingensis* B202	*nad*4L gén	270 bp
DQ206452	*A. tübingensis* B203	*nad*4L gén	270 bp
DQ206453	*A. tübingensis* B240	*nad*4L gén	270 bp
DQ206454	*A. tübingensis* B227	*nad*4L gén	270 bp
DQ207726	*A. niger* N909	teljes mtDNS szekvencia	31103 bp
DQ217399	*A. tübingensis* 0932	teljes mtDNS szekvencia	33656 bp

4. táblázat: (folytatás)

4.4.14. PCR reakció

4.4.14.1 PCR reakció RAPD analízishez:

PCR csőbe az alábbi komponenseket mértük össze: 7,5 µl CORE puffer, 15 µl COCTAIL és 2,5 µl templát DNS (0,05 µg/µl). A reakcióelegyet elkevertük, majd 40 µl ásványi olajat rétegeztünk rá. A reakciót PCR készülékben (Model PTC-100-60, MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts, USA) az alábbi paraméterek mellett végeztük: 92°C-on 1 perc denaturáció, 35°C-on 1 perc "annealing", 72°C-on 2 perc elongáció. A műveletet 45x ismételtük, majd a reakciót 7 perc 72°C-on történő utópolimerizációval zártuk. A reakciókhoz 4.3.13-as pontban ismertetett OPC primereket használtuk.

4.4.14.2 PCR reakció szubklónozáshoz az általunk tervezett "forward" és "reverse" szintetikus primerekkel:

A reakcióelegyet 50 µl végtérfogatra állítottuk össze, melybe bemértünk 8 µl nukleotid keveréket (az egyes nukleotidokra nézve 2,5 mM koncentráció), 5 µl inkubációs puffert, 5 µl $MgCl_2$ oldatot (2,5 mM), 1 µl 0,2 µg/µl "forward" primert, 1 µl 0,2 µg/µl "reverse" primert, 1 µl templát DNS-t és 1 µl Taq polimerázt tartalmazott. A reakcióelegyre 40 µl ásványi olajat rétegeztünk. A primerek "olvadáspontja" által meghatározott legmagasabb "annealing" hőmérsékletet választva az alábbi reakciókörülmények között 45 ciklust hajtottunk végre: 94°C-on 1 perc denaturáció, 55°C-on 30 másodperc "annealing", 72°C-on 5 perc elongáció, majd a 40 ciklust lezáró 7 perc 72°C-on történő utópolimerizáció.

4.4.15 Totál RNS izolálás

A fonalas gomba fiatal, 12 órás rázatott tenyészetét konídiumszűrővel leszűrtük, és néhány mg-ot folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A fagyott micéliumot folyamatos hűtés mellett dörzsmozsárban porítottuk el, majd Eppendorf csőbe tettük. Ettől a lépéstől a mintát

jéghóval folyamatosan hűtöttük. 0,8 ml RNA Plus oldat hozzáadása, majd alapos vortexelést követően 0,2 ml kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú keverékét adtunk a mintához. Újabb vortexelés után 5 percig jégen állni hagytuk, majd 15 perc, 12000 rpm centrifugálás következett. A felülúszót áthelyeztük egy tiszta csőbe, majd azonos térfogatú izopropanollal kicsaptuk (jégen, 15 perc). 15 perces ülepítés után a csapadékot RNáz mentesített 70%-os etanollal mostuk, majd az alkohol lepipettázása után (nem beszárítás, mivel gyorsan kell dolgozni az RNS lebomlását elkerülendő), 50 µl RNáz mentesített vízben oldottuk fel. Az RNS minta azonnal felhasználható, vagy azonos térfogatú izopropanollal kicsapva –70°C-on tárolható.

4.4.16 cDNS készítés

A cDNS készítésnél a 4.3.10 pontban leírt termékeket használtuk a gyártó által ajánlott paraméterek alkalmazásával.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

5.1 *Aspergillus niger* és *Aspergillus tübingensis* törzsek mtDNS szerveződése, és a belőlük protoplasztfúzióval létrehozott mitokondriális rekombinánsok elemzése

5.1.1 Az *A. niger* és *A. tübingensis* törzsek mtDNS-ének szerveződése

Kísérleteink során elsődleges célunk volt az eddig még nem elemzett fekete *Aspergillus*ok mtDNS variabilitásának vizsgálta. A genomok közti eltérések molekuláris szintű elemzéséhez szükségessé vált néhány törzs teljes mitokondriális genomjának ismerete. A korábbi vizsgálatok középpontjában elsősorban az *A. niger* fajaggragátum állt, ezért az előzetes adatok alapján ezt a csoportot vettük részletes elemzés alá. Az így kapott adatok a későbbiekben az *A. niger* fajkomplexen belül protoplasztfúzióval létrehozott rekombináns utódok elemzéséhez is nélkülözhetetlenek voltak. A korábbi vizsgálatok mtDNS RFLP szempontjából az *A. niger* fajt öt (1a-1e), az *A. tübingensis* fajt pedig hat (2a-2f) alosztályba sorolták (Varga és mtsi, 1993, 1994; Tóth és mtsi, 1997). Mindkét fajból kiválasztottunk egy-egy törzset a mtDNS teljes szekvenciájának meghatározásához. A törzseink az *A. niger* esetében az 1a (N909), *A. tübingensis* esetében a 2b (0932) mtDNS típust képviselték.

Munkám kezdetekor már e két törzs fizikai térképe rendelkezésünkre állt, és néhány törzsből kisebb szakaszok szekvenciaszintű elemzése is megtörtént: *atp6* és *cox*1 gének, illetve az *rnl* gén előtti tRNS régió (4. táblázat). Ezek a szekvenciarészletek már a jelen munka előtti kísérletekben is fontos szerepet játszottak. Az *atp6* génben lévő pontmutáció okozza a mitokondriális oligomycin rezisztenciát (N400-as oligomycin szenzitív *A. niger* törzsből szelektálták ki a rezisztens N909-es törzset, 1. táblázat) A *cox*1 gént már számos más *Aspergillus* fajban is tanulmányoztuk, és összehasonlítási alapul használtuk fel. Az *rnl* gén előtti tRNS régió elemzésére pedig az *A. niger* különböző mtDNS típusai közt protoplasztfúzióval létrtehozott mitokondriális rekombinánsok vizsgálatakor volt szükség (Kevei és mtsi, 2001; Hamari és mtsi, 2002, 2003; Juhász és mtsi, 2004).

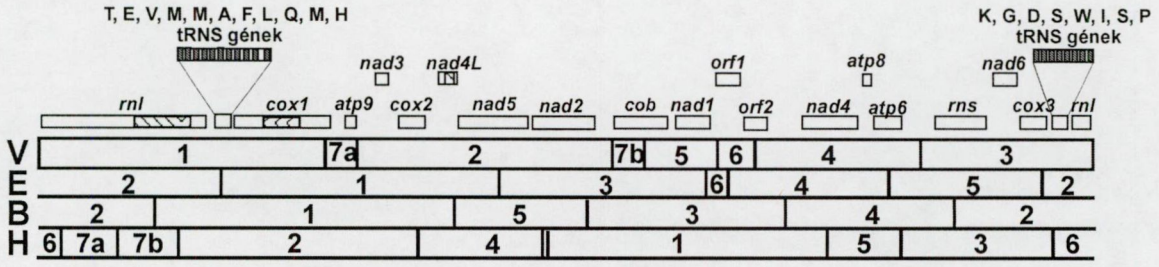
A teljes genomok szekvenálása előtt elvégeztük a fiziai térképek pontosítását, illetve meghatároztuk a gének sorrendjét, és pontos méretét (1. ábra – bár a térképek lineárisak, de a mtDNS cirkuláris szerveződésű). A gének hozzávetőleges pozícióját a restrikciós térképen először Southern-hibridizációval határoztuk meg. A hibridizációhoz az *A. nidulans* mitokondriális genomjából származó PCR termékeket digoxigeninnel jelöltük és heterológ génpróbaként alkalmaztuk. A mitokondriális gének pontos méretét és egymáshoz viszonyított elhelyezkedését a különböző gének és az intergénikus régiók PCR termékeinek méretmeghatározásával állapítottuk meg. A PCR-hoz szükséges primerek az *A. nidulans* és a *Trichophyton rubrum* ismert mitokondriális szekvenciája alapján íródtak (2. táblázat). A heterológ primerek megbízhatóan működtek minden esetben. Ezzel a technikával pontosítani tudtuk a mitokondriális genomok méretét is, melyek jó egyezést mutattak a teljes szekvenálás után kapott adatokkal. (*A. niger*: 31,23 kb – 31103 bp; *A. tübingensis* 33,06 kb – 33656 bp) A két mitokondriális genom géntartalma és a gének sorrendje megegyezett, a méretbeli eltérésekért elsődlegesen intronális szekvenciák jelenléte illetve hiánya a felelős.

5.1.2 Az *A. niger* és *A. tübingensis* törzsek mtDNS-ének szekvenciaszintű elemzése

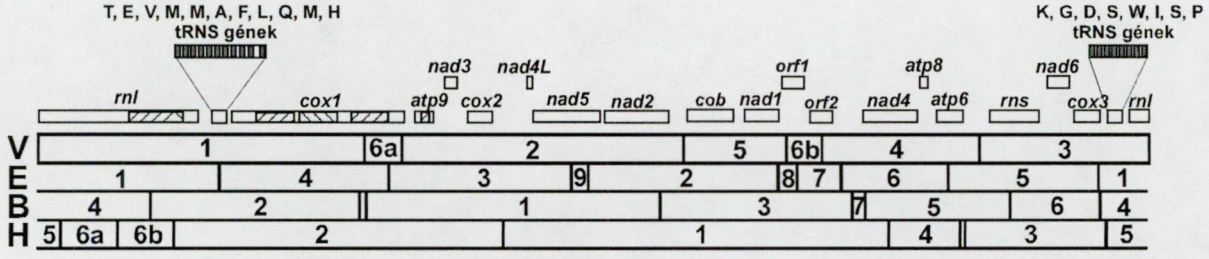
Mindkét törzs esetében elsősorban klónozott fragmentumokat, bizonyos esetekben közvetlenül a tisztított mtDNS-t használtuk fel a szekvenáláshoz. A fizikai térképek elkészítéséhez használt restrikciós enzimekkel (*Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Bgl*II) emésztettük a tisztított mtDNS-t, és a kapott fragmentumokat pBluescript-SK vektorba ligáltuk. Az így klónozott DNS-einket a vektor saját szekvenáló primereivel (T3: aattaaccctcactaaaggg, T7: gtaatacgactcactatcgggc) szekvenáltattuk meg (4.4.12). Mivel egy-egy szekvenálás alkalmával kb. 600 bp-nyi értékelhető szekvenciát kaptunk az 1000-1200 bp-nál nagyobb klónjaink esetében szubklónozásokra volt szükség. Klónjainkat egy másik restrikciós enzimmel emésztettük, és a kapott kisebb fragmentumokat újra vektorba ligáltuk, és szekvenáltattuk. A klónozott fragmentumainkat könnyen és gyorsan szaporíthattuk, de pusztán ezzel a módszerrel nem tudtuk a teljes genom szekvenciát meghatározni. Ehhez a „primer walking" módszert alkalmaztuk. A saját törzseink DNS szekvenciáihoz primereket terveztünk (2.

táblázat), és ezek segítségével lépésről-lépésre szekvenáltattuk tovább a mintáinkat. A pontos szekvencia adatokat az 5. táblázat tartalmazza.

A. niger N909, mtDNS típus 1a:



A. tübingensis 0932, mtDNS típus 2b:



1. ábra: A két teljes mitokondriális genom szekvenciával rendelkező *Aspergillus* törzs mtDNS-ének fizikai és funkcionális térképe. A térkép készítéséhez használt restrikciós enzimek: V: *Eco*RV, E: *Eco*RI, B: *Bgl*II, H: *Hind*III. A két nagy tRNS kluszteren kívül beazonosítottunk még néhány külön álló tRNS gént is: R: *cox*2 és *nad*4L gének közt; R és N: *nad*4 és *atp*8 gének közt; Y: *rns* és *nad*6 gének közt helyezkednek el mindkét törzsünk esetében. A leadott szekvenciák adatbanki adatait a 4. táblázat mutatja.

Mint ahogy az az 5. táblázatban megfigyelhető, mindkét törzs génkészlete szinte megegyezik az intronális eltérések kivételével. Számos esetben az intronok okozzák az RFLP mintázatbeli eltéréseket is, de néhol csak egy-egy pontmutáció felel a hasítóhely jelenlétéért illetve hiányáért. Elsősorban a törzseink közt tapasztalható eltéréseket emelném ki, illetve egyéb – rokon fajoknál nem tapasztalt – érdekességekre szeretnék rámutatni, melyeket a szekvenciák analízise során tapasztalhattunk.

gén	méret (bp)		egyezés	introntartalom	
	N909	0932		N909	0932
cob	1158	1158	99%	-	-
nad1	1050	1050	98%	-	-
orf1	912	906	94%	-	-
orf2	762	741	91%	-	-
nad4	1467	1467	98%	-	-
atp8	147	147	100%	-	-
atp6	774	774	98%	-	-
rns	1445	1445	97%	-	-
nad6	654	654	95%	-	-
cox3	810	810	98%	-	-
rnl	4633	4634	99%	1	1
cox1	2728	5058	98%*	1	3
atp9	225	554	98%*	-	1
nad3	408	408	97%	-	-
cox2	762	762	98%	-	-
nad4L	747	270	99%*	1	-
nad5	1971	1971	97%	-	-
nad2	1689	1689	99%	-	-

5. táblázat: A két törzs mitokondriális génjeinek pontos szekvencia adatai és összehasonlítása. *: az intronmentes részek (exonok) egyezése. A leadott szekvenciák adatbanki adatait a 4. táblázat mutatja.

Eltérések a törzseink között (az adatbankba leadott szekvenciákat a 4. táblázat mutatja):

- *cox*1 gén: Az *A. niger* 1a mtDNS típusú törzsének *cox*1 génje 2728 bp, és csak egyetlen intront tartalmaz. Az *A. tübingensis* 2b mtDNS típusú törzsének *cox*1 génje 5058 bp méretűnek bizonyult, három intront tartalmaz, amelyek sorrendben 1148 bp, 1126 bp, és 1085 bp hosszúságúak. Mindegyik intron I-es típusú mitokondriális intron, LAGLIDADG típusú endonukleázszerű fehérjét kódolnak orf-jükben. Az *A. tübingensis* 2b *cox*1 génjének 1. intronja 94%-os homológiát mutat az *A. nidulans cox*1 2. intronjával (X00790). Az *A.*

tübingensis 2. intronja 93%-os homológiát mutat az *A. niger* 1a típusú mtDNS *cox*1 génjének egyetlen 1025 bp-os intronjával, inszerciós helyük is megegyezik. Ez az intron homológ az *A. nidulans cox*1 génjének 3. intronjával (X00790), valamint a *Neurospora crassa* negyedik (X14669), *Schizosaccharomyces pombe* második (X00886), *Penicillium marneffei* második (AY347307) *cox*1 intronjaival. Az *A. tübingensis* 2b *cox*1 3. intronja nem mutat homológiát egyetlen ismert mitokondriális intronnal sem. Az intronok pozícióját először csak adatbanki homológiák alapján határoztuk meg, majd ezt az izolált mRNS-ből készített cDNS szekvenálásával is igazoltuk.

- *atp*9 gén: Az *A. niger* 1a típus esetében a gén intronmentes, és 225 bp hosszúságú. Az *A. tübingensis* 2b esetében a gén egy 329 bp-os ORF nélküli intront tartalmaz, így a gén hossza 554 bp. Az intron 68.-128. bp-os része 88%-os homologiát mutat *Hypocrea jecorina atp*9 gén utáni 60 bp-os szakaszával, de ezt intergénikus szekvenciaként tüntetik fel (AF447590). Az intron egyébként más szekvenciával nem mutat homológiát.

- *nad4*L gén: A 270 bp-os gén *A. tübingensis* 2b esetében intronmentes, míg *A. niger* 1a esetében egy 477bp hosszúságú intront tartalmaz, mely I-es típusú mitokondriális intron. Hasonlóan az *atp*9 gén intronjához ez sem hordoz ORF-et. Az intron egy része homológiát mutat *Neurospora crassa nad*4L génjének (X05115) és a *Podospora anserina nad*4L génjének (X55026) intronjával. Közelebbi rokon fajokkal nem ad homológiát, ennek az lehet a magyarázata, hogy mind az *atp*9, mind a *nad*4L gén esetében igen ritka az intronhordozás, illetve az is oka lehet, hogy az *Aspergillus* fajok mtDNS-éről rendelkezésünkre álló információk elég hiányosak.

- További kisebb méretbeli eltéréseket okozhatnak az intergénikus régiók méretbeli eltérései, de ezek ritkán haladják meg a 100 bp-os nagyságot. Ezek közül kettőt emelnék ki:

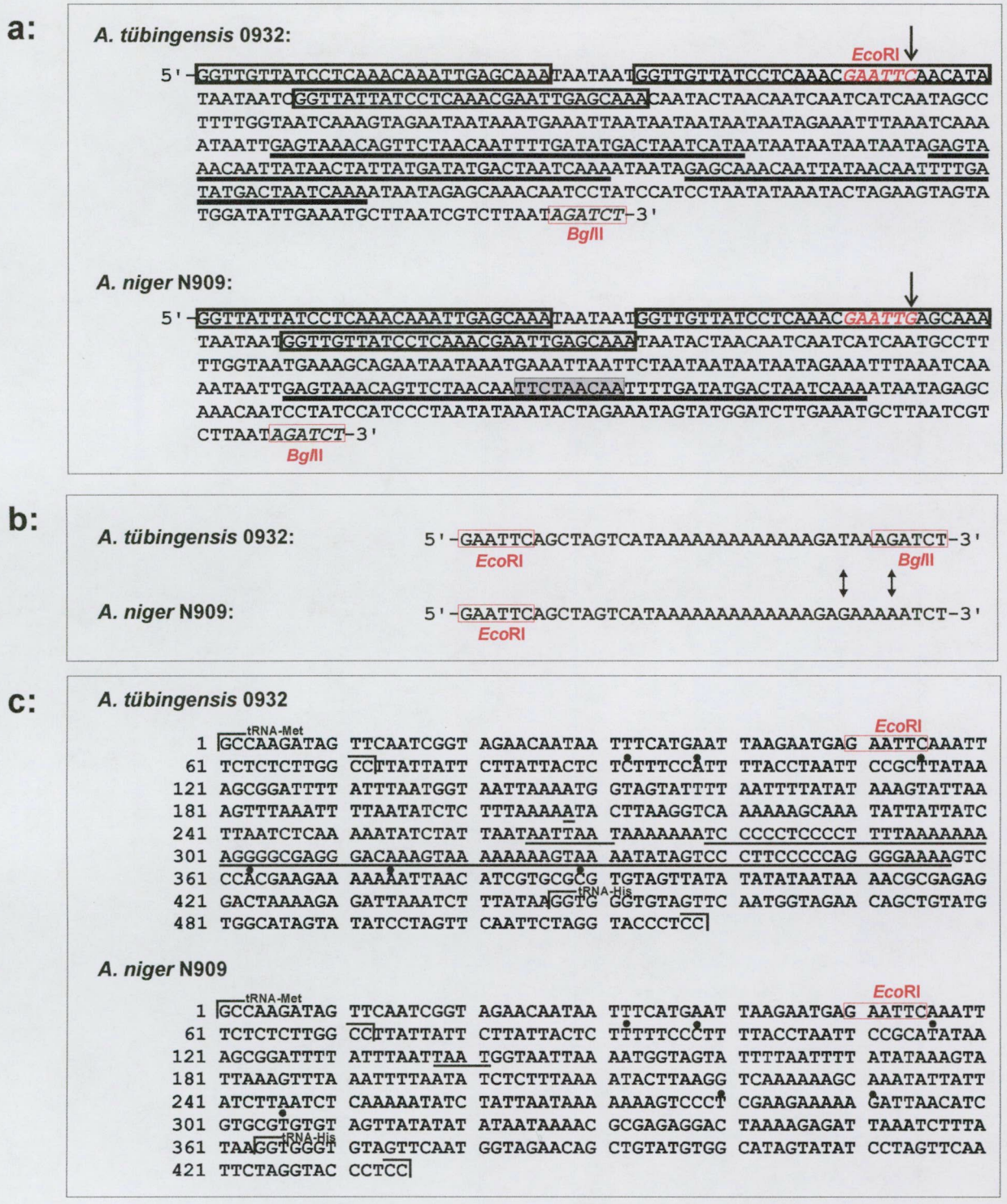
Mindkét törzsben az *orf*2 és a *nad*4 gén között egy ismétlődő szakaszokból álló régiót találtunk. Először háromszor ismétlődik egy 29 bp-os szekvenciarész mindkét törzsben, igaz a második elemben egy pontmutáció található az *A. tübingensis* 2b esetében, ami egy extra *Eco*RI hasítóhelyet eredményez. Szintén ebben a törzsben a második 39 bp-os elem is háromszor ismétlődik, míg *A. niger* 1a esetében csak egy 48 bp-os szekvenciarész fordul elő, mely azonosságot mutat a 39 bp-os *A. tübingensi*-beli szekvenciával (2. ábra).

Közvetlenül a *cox*1 gén előtt található a metionin és hisztidin tRNS gének közti intergénikus szakasz, melynek mérete szintén eltér a két törzsben, az *A. tübingensis* esetében 87 bp-ral nagyobb. Ezekért az eltérésekért több kisebb inzerció, illetve deléció a felelős (2. ábra). Jelen esetben ez az általunk használt restrikciós enzimekre nézve extra hasítóhelyek megjelenésével nem járt. Legtöbb esetben azonban, mint például a glicin tRNS gén előtti 40 bázispáros régiónál, a restrikciós térképbeli eltéréseket csak pontmutációk idézik elő, melyek hasítóhelybeli eltérést okoznak, de méretbeli különbséget nem (2. ábra).

Mindkét törzsben meglévő szokatlan, vagy rokon fajokra nem jellemző szekvenciák (az adatbankba leadott szekvenciákat a 4. táblázat mutatja):

- *orf*1 és *orf*2: Mindkét törzsben a *nad*1 és *nad*4 gének közti mintegy 3000 bp-os szakaszon a már fent említett ismétlődő régió előtt két nyitott leolvasási keret található. E két gén mindkét törzsben nagyfokú homológiát mutat egymással (5. táblázat). Az *orf*1 feltételezett fehérjéje 44%-os szekvencia homológiát mutat a *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriális Endo.SceI endonukleázzal (AAA32160). A második ORF 52%-os homológiát mutat *Staphylococcus aureus* helyspecifikus rekombinázával (BAB47672). Tehát mindkét fehérje leginkább az I.-típusú intronokban kódolt endonukleázokhoz hasonlít. Pontos funkciójuk nem ismert, de valószínűleg az intronok kivágódásában, vagy a rekombinációban lehet szerepük. A rekombinációban lehet szerepe a már korábban említett repetitív elemeket tartalmazó szekvenciának is.

- A *nad*2 gén után 66 nukleotid távolságra egy 68 bp-os szakasz következik. Ennek érdekessége, hogy szinte 100%-os homológiát mutat a *nad*1 gén 87.-154. bp-os szakaszával. Ez a DNS szakasz mindkét törzsben megtalálható ugyanebben a pozícióban. Sem az előtte sem az utána lévő szakasz nem mutat semmiféle homológiát a *nad*1 génnel. Ez a géndarab nem lehet működőképes, de a *nad*1 gén szekvenálása során jelentős nehézségeket okozott (PCR- és szekvenáló primerek két helyre is tapadtak a genomban). Jelenléte a genomban valószínűleg összefügghet a szinte közvetlen utána következő 315 bp-os DNS szakasszal, mely 96%-os homológiát mutat egy feltételezett endomukleázzal (AJ632139, Te Biesebeke és mtsi 2005). Fehérje szinten 59%-os homológiát mutat *Podospora anserina nad*3 intron proteinjével illetve annak egy részletével (S05654, Cummings és Domenico 1988).



2. ábra: Szekvencia eltérések a két törzs között. A: a repetitív régió eltérései. Az azonos módon jelölt szekvenciarészek ismétlődnek, nyíllal jelölt a pontmutáció, amely hasítóhely eltérést okoz. N909 esetén a besötétített rész eltérés a másik törzs ismétlődő részétől. B: glicin tRNS előtti eltérések, ahol a pontmutáció új hasítóhelyet eredményez. C: metionin és hisztidin tRNS közti rész. Inzerciók az aláhúzott részek, ponttal a pontmutációkat jelöltük.

Különösen érdekes az, hogy ez a 315 bp-os szekvencia a többi génhez képest épp fordított irányban helyezkedik el, ezért feltételezhetően nem aktív (a kezdeti pár nukleotid is hiányzik). E két szekvenciarészlet azonban arra utalhat, hogy korábban valamilyen rekombinációs események zajlottak le a törzsekben, és ezekre az eseményekre utaló, a géneknek ma már működésképtelen változatait találtuk meg a genomban

- A *cob* és *nad*1 gének közti intergénikus területen találtunk egy 223 nukleotidnyi szakaszt, ami szintén ellentétes leolvasási irányban helyezkedik el. 95%-os homológiát mutat *A. niger* NRRL 322-es törzs genomi PX21 promóterével (M90699; Luo, 1995). Semmilyen egyéb szekvenciával nem mutat még alacsony fokú homológiát sem. A PX21 promóter leírója akkor semmivel sem talált homológiát. Mivel a magi és mitokondriális promóterek más faktorokkal aktivizálódnak nem valószínű, hogy aktív lenne.

Fontos még megemlíteni még az *atp*6 gén egyik pontmutációját, amely az N909 esetében az oligomycin rezisztenciát okozza. Az N400-as oligomycin szenzitív *A. niger* törzsben (melyből szelektálták az oligomycin rezisztens N909-et) az *atp*6-os gén 517. nukleotidja citozin (C). A rezisztens változatban pedig ugyanebben a pozícióban timin (T) nukleotid található. Ez a mutáció, illetve a vele járó aminosav változás felelős az oligomycin rezisztenciáért. Az *A. tübingensis* 2b ilyen tekintetben az N400-ra hasonlít, ott is C található az 517. pozícióban, és természetesen oligomycin szenzitív a törzs.

5.1.3 A restrikciós térképek szekvenciaszintű elemzése

Az intronális eltéréseken és kisebb inszerciókon kívül pontmutációk okozzák a két törzsünk közti restrikciós térképeken is megjelenő eltéréseket. Az *A. niger* 1a típusban négy specifikus (*A. tübingensis* 2b típusban jelen nem levő) restrikciós hasítóhely található a következő fragmentek között: B1/B5 (*nad*4L intronban); H4/H1 (*nad*2 génben valójában nem egy, hanem két hasítóhelybeli eltérés: 53 bp távolságra van két *Hind*III hasítóhely, 2b mtDNS pontmutáció miatt egyik hasítóhely sincs meg – 3. ábra/A); V7b/V5 (*cob* gén pontmutáció – 3. ábra/B) és V7a/V2 (*atp*9 előtti pontmutáció – 3. ábra/C). Kilenc *A. tübingensis* specifikus restrikciós hely található a következő fragmentek közt: E4/E3, B2/B8, B8/B1, V1/V6a (mind

a négy a *cox*1 gén 3. intronjában); E9/E2 (*nad*5 gén pontmutáció – 3. ábra/D); E7/E6 (ismétlődő régió, pontmutáció – 2. ábra/A); B7/B5 (*nad*4 előtti pontmutáció – 3. ábra/E); H7/H3 (atp6 gén utáni pontmutáció) és B6/B4 (pontmutáció – 2. ábra/B). Az intronokban való eltéréseket a 4. táblázat adatbanki hivatkozásai alapján érdemes megvizsgálni (a szekvenciák hossza miatt).

A:

A. niger N909:

*Hind*III

TATCCTAGAAAGCTTATATCAAGTGAATATATGAGTTTACATAAATTAATATTTACAAAA

*Hind*III

TTAAGCTTTGTAAAAAATTTAACTGTATCAAATATTATATTAAAAAAAGGAGAACAATAT

A. tübingensis 0932:

TTTTATCCTAGAAAA*CTTATATCAAGTGAATATATGAGTTTACATAAATTAATATTTACA

AAATTAAGT*TTTGTAAAAAATTTAACTGTATCAAATATTATATTAAAAAAAGGAGAACAA

B:

A. niger N909:

*Eco*RV

GCTAACCCAATGCAAACTCCACCTGCTATTGTACCAGAGTGATATCTTTTACCTTTCTAT

A. tübingensis 0932:

GCTAACCCAATGCAAACTCCACCTGCTATTGTACCAGAGTGATATT*TATTACCTTTCTAT

C:

A. niger N909:

*Eco*RV

CAGATTCTCATGTATATCCATTTAACTTAGATGATATCTCTTTAGAGATGGCGACTCTTA

A. tübingensis 0932:

CAGATTCTCAACTATATCCATTTAACTTAGATGATATT*TCTTTAGAGATGGCGACTCTTA

3. ábra/A-F: Pontmutációk okozta eltérések a két mtDNS típus között. A bekeretezett részek az adott restrikciós enzim hasítóhelyét jelentik, míg az aláhúzott részek ezen restrikciós helyek megfelelői, de a *-gal jelölt pontmutációk miatt mégsem funkcionálnak hasítóhelyként. A: *nad*2 gén; B: *cob* gén; C: *atp*9 gén

D:

A. niger N909:

CATTAAGTTTACTTTCTGTTTTATTATCCGAATTT*TTACCTAAATTACTTATTAATTTTA

A. tübingensis 0932:

*Eco*RI

CATTAAGTTTAATTTCTGTTTTATTATCCGAATTCTTACCTAAATTACTTATTAATTTTA

E:

A. niger N909:

GGGCCTCGCCCGCAAGGCGACAAGAC*CTCCTTGGGGCTAGTAATAAATATTTTATTAGTA

A. tübingensis 0932:

*Bgl*II

GGGCCTCGCCCGCAAGGCGACAAGATCTCCCTGGGGGCTAGTAATAAATATTTTATTAGT

F:

A. niger N909:

TAAAAGGAAAATCCAATACTTTTTAAGCATACATGATTGATTATCAAC*CTTTATAAAGAT

A. tübingensis 0932:

*Hind*III

GTGGCTTCCAGCAGTCGGGCTCTCCCCCTTCCGCAGGGAGCTAAAAAGCTTTATTTTATT

3. ábra (folytatás): D: *nad*5 gén; E: *nad*4 gén; F: *atp*6 gén

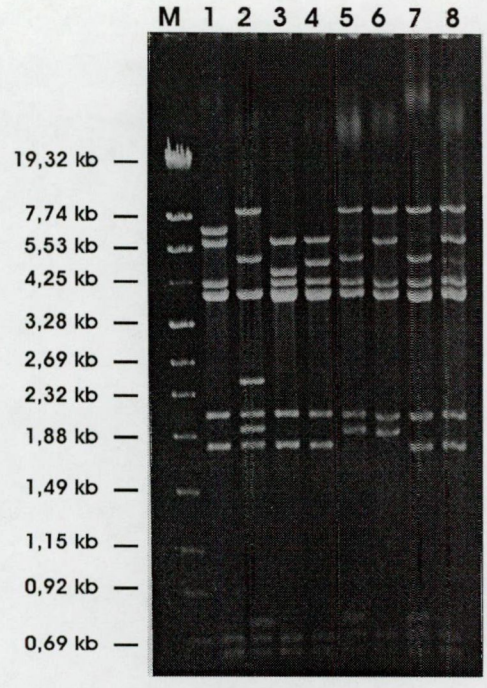
Természetesen más restrikciós enzimekre nézve is lérejöhettek hasítóhely mutációk, de jelen dolgozatban csak a fizikai térkép elkészítésekor alkalmazott enzimek restrikciós helyeinek vizsgálatát tűztük ki célul. Bár az RFLP mintázatok jelentősen eltérnek (4. ábra) a két törzs esetében a szekvenciaszintű elemzés azt támasztja alá, hogy az intronális eltérések mellett a két mitokondriális genom szinte azonos egymással. Kíváncsiak voltunk rá, hogy a két törzs mitokondriális genomja miként hat egymásra, ezért protoplasztfúzióval (heterokarion képzési inkompatibilitás miatt csak ilyen módon volt kivitelezhető a „keresztezés") mtDNS rekombináns utódokat hoztunk létre, és ezeket vettük részletes elemzés alá.

5.1.4 *A. niger* 1a → *A. tübingensis* 2b törzsek közt protoplasztfúzióval létrehozott rekombináns utódok szekvenciaszintű vizsgálata

Korábbi kísérletek során már elkészítették a *A. niger* 1a (met-; barna konídiumszín; mitokondriálisan oligomycin rezisztens) → *A. tübingensis* 2b (ade-, nic-; zöld konídoumszín; oligomycin szenzitív) fúzióból származó utódok négyenzimes (*Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Bgl*II) restrikciós térképét és részleges analízisét. Munkám során az eltérésekért felelős molekuláris mechanizmusok szekvenciaszintű vizsgálata volt a cél.

A protopasztfúzió során egyirányú *A. niger* 1a → *A. tübingensis* 2b mitokondrium átvitelt hajtottak végre. A fúziót követően az *A. tübingensis* sejtmagjára, és az *A. niger* oligomycin rezisztens mitokondriumára szelektáltak. Számos utód átvizsgálása után hatféle különböző típust észleltek (4. ábra), melyek különböző előfordulási gyakorisággal jelentek meg. Ezen csoportokból egy-egy törzset választottunk ki, melyek képviselik az adott csoportot, és ezeket vettük részletes elemzés alá. A kiválasztott törzsek típusának előfordulási gyakorisága a következő: B205: 37,5%, B212: 35%, B240: 10%, B203: 7,5%, B202: 5%, B227: 2,5%

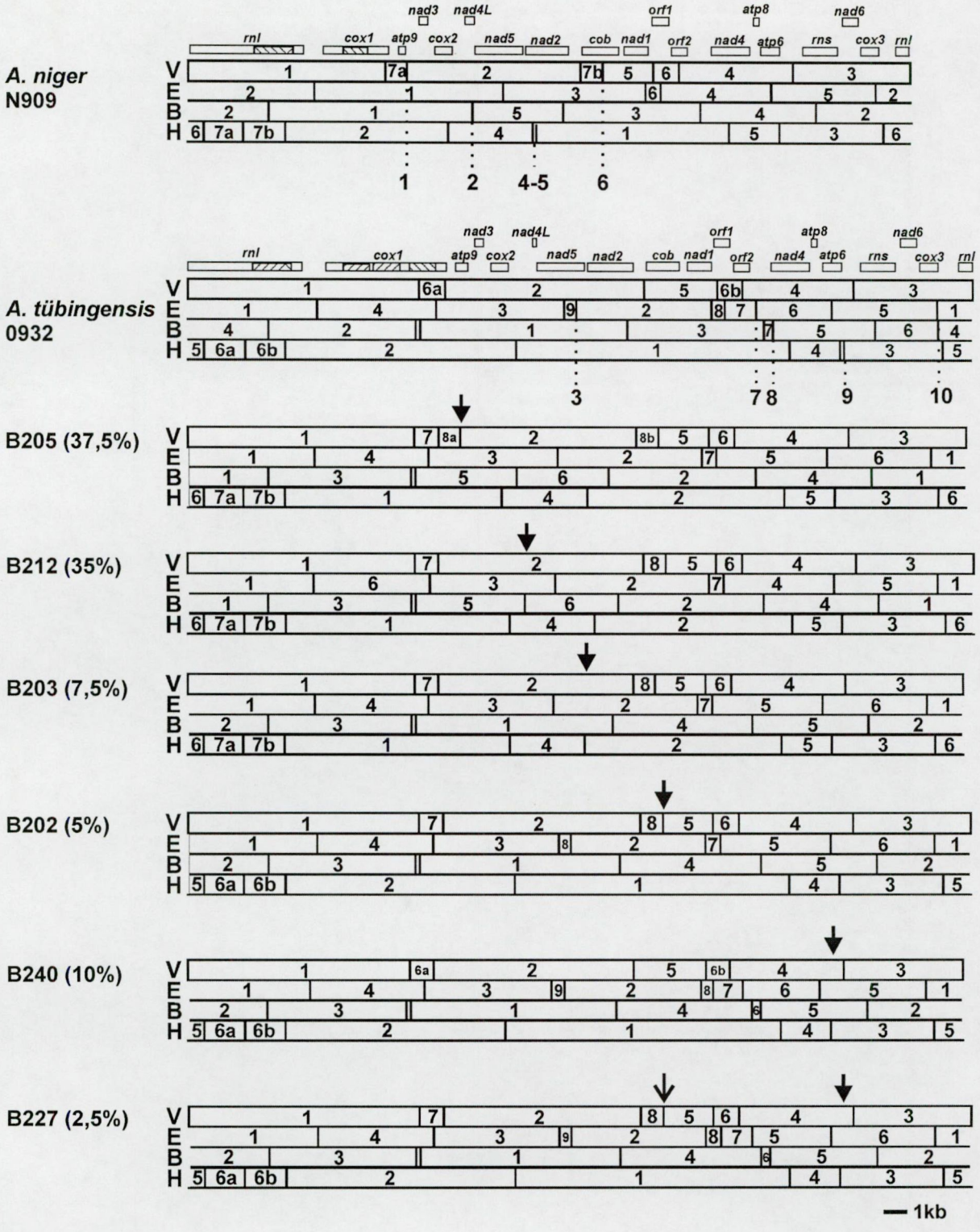
Elkészítettük az 1a→2b átvitelből származó hat különböző RFLP mintázatú mtDNS-t hordozó izolátum fizikai térképét (5. ábra). A mitokondriális genom méreteket ebben az esetben is a restrikciós enzimek által létrehozott fragmentumok méreteinek összegéből határoztuk meg (ez a módszer már korábban is pontos megközelítést adott az N909 és 0932 törzsek esetében). A rekombináns mitokondriális genommal rendelkező utódok mtDNS méretei a következők: a B205 rekombinánsé 32,73 kb, a B212-é 33,04 kb, a B227-é 32,98 kb, a B202-é 32,92 kb, a B240-é 32,54 kb, míg a B203 rekombinánsé 32,60 kb. Tehát minden utód mtDNS mérete a recipiens szülő (*A. tübingensis* 2b típus) mitokondriális genom méretéhez áll közel. A donor (*A. niger* N909 1a típus) mérete kisebb, mintegy 31,10 kb.



4. ábra: Az 1a→2b mitokondrium átviteli kísérletek során alkalmazott törzsek és a kapott rekombináns mtDNS-t hordozó utódok izolált mtDNS-einek *Hae*III-*Bgl*II restrikciós enzimekkel emésztett RFLP mintázatai. M: λ-pUC mix DNS molekulasúly marker (Fermentas), 1: N909, 2: 0932, 3-8: rekombináns utódok. 3: B205, 4: B212, 5: B227, 6: B202, 7: B240, 8: B203

Feltételezésünk szerint azonban az utódoknak mtDNS méretükben inkább a donorra kellett volna hasonlítaniuk, hiszen annak oligomycin rezisztens mitokondriumára szelektáltunk. A két szülői törzs elemzése során korábban bemutatott adatok alapján értelemszerűen a *cox*1 gén mértetbeli eltérésére következtettünk, mert annak eltérő introntartalma felelős leginkább a genomok méretbeli eltéréséért.

Elvégeztük tehát mind a hat rekombináns típus *cox*1 génjének szekvencia analízisét. Azt tapasztaltuk, hogy a *cox*1 gén szekvenciája minden rekombináns utódban teljesen megegyezik (4. táblázat), és nagyfokú hasonlóságot mutat az *A. tübingensis cox*1 génjéhez. Mindhárom intron azonos pozícióban található meg minden esetben, és mindössze két nukleotidban térnek el a 2b típusú *cox*1 géntől. Ez a két nukleotid eltérés az első exon területén található, mindkét esetben T→A csere történik a gén kezdetétől számított 113. és 248. pozícióban. Ez az eltérés azonban már az *A. niger* 1a típusú *cox*1 génre jellemző. Számos más eltérés is található az első intron utáni exonokban, de a rekombináns utódok ezekben már mind az *A. tübingensis* 2b típusra hasonlítottak (6. táblázat).



5. ábra: A két szülő és a rekombináns utódok fizikai térképei. 1-9: *cox*1 génen kívüli hasítóhelybeli eltérések a két szülő közt. A rekombináns utódok a *cox*1 géntől a tömör nyílig 2b, utána 1a típusú mtDNS-sel rendelkeznek. B227 esetében van egy kivétel: a nyíllal jelzett rész az 1a mtDNS típushoz hasonlít

pozíció	*A.n.*	*A.t.*	pozíció	*A.n.*	*A.t.*	pozíció	*A.n.*	*A.t.*
113	**A**	**T**	1939	T	C	2257	T	C
248	**A**	**T**	1949	A	T	2260	T	A
764	T	C	1966	T	C	2269	C	T
821	A	G	1967	C	G	2275	T	C
1874	A	T	1968	G	T	2278	T	C
1875	T	A	2003	G	T	2353	T	A
1876	A	T	2018	A	T	2470	T	C
1885	A	T	2020	C	T	2542	C	T
1930	T	A	2068	T	A	2701	T	A
1933	A	T	2239	T	A			

6. táblázat: A két szülői törzs *cox*1 gén exonjaiban a nukleotidok eltérése (pozíció: az *A. niger*-beli pozíció). *A.n.*: *A. niger* 1a, *A.t.*: *A. tübingensis* 2b mtDNS típus. Az első két eltérés kivételével az összes rekombináns utód az *A. tübingensis*-re hasonlít.

Megállapítható tehát, hogy minden utód „örökölte" a 0932-es törzs mindhárom intronját, még a 2. intron is ebből a törzsből való, holott a másik szülőnél ugyanebben a pozícióban volt egy ezzel azonos (de nem 100% homológ) intron. Mindez azzal magyarázható, hogy az intronok mozgása nemcsak magára az intronra korlátozódik, hanem az intron körüli szekvenciák is átmásolódnak vele. Így az első és harmadik intron mozgása mintegy „magával rántotta" a második intront is, és mint látni fogjuk a *cox*1 géntől az *atp*9 irányában jóval nagyobb szekvenciarészt is érint ez a mozgás. Ez nem egyedülálló jelenség, az intronok mozgásakor mindig kisebb-nagyobb környező szekvenciák is átmásolódnak.

A protoplasztfúzió során tehát mindig a donor mitokondriuma öröklődik, de ez a recipiens intronjai, és az ezt követő rekombinációs események által módosul. Arra, hogy a donor 1a típusú mtDNS-e öröklődik alapvetően, több bizonyíték is van.

- Minden rekombináns oligomycin rezisztens.

- A *cox*1 gén első exonjában az 1a típusú mitokondriumra hasonlítanak.

- A *cox*1 gén előtti metionin/hisztidin tRNS-ek közti intergénikus régiót minden esetben megszekvenáltuk (2. ábra C rész), és mindegyiknél a donor 1a típusú mitokondriumára jellemző szekvenciát találtuk.

- A glicin tRNS előtti (5. ábrán 10-el jelölt rész) intergénikus régiót szintén megszekvenáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy itt is minden utód az 1a típusú donorra hasonlít. A recipiens esetében itt egy *Bgl*II hasítóhely található, ami egyik rekombinánsban sincs meg (2. ábra B rész.)

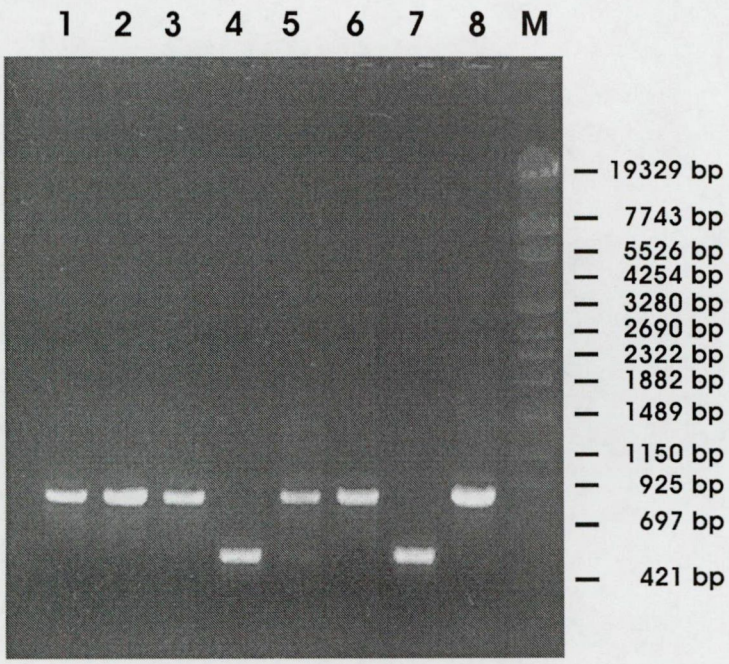
- Az *atp*6 gén utáni intergénikus régiót minden utódban megszekvenáltuk és minden esetben az 1a típusú szülőre hasonlít

- Felfedeztünk egy fokozatosságot a fizikai térképek vizsgálata során. Tiz eltérő restrikció helyet találtunk a két szülői törzs között (*cox*1 gén eltéréseitől eltekintve): 5. ábrán 1-10-ig jelzett részek. Ezeknek az eltéréseknek a magyarázatát az előző fejezetben tárgyaltam. A 9. és 10. marker minden törzsben 1a-szerű volt. A többi marker tekintetében azt tapasztaltuk, hogy a *cox*1 géntől (ami az első exon kivételével a 2b típussal azonos) távolodva fokozatosan 1a-szerűvé válik a mtDNS szerkezete a rekombinánsokban. A B205 törzs esetében az összes marker 1a-hoz, míg B240 esetében nyolc marker 2b-hez hasonlított, vagyis ez mutatja a legnagyobb eltérést a donor mitokondriumához képest. A markerek eloszlását a 7. táblázat mutatja. A markerek 2b-szerűvé válását nemcsak az adott marker pontmutációja okozza, hanem egy tényleges, eltérő nagyságú szekvenciákat érintő rekombináció. Erre jó példa az 1. marker utáni *atp*9 gén, mely méretbeli eltérést mutat az utódokban (2b mtDNS típusra jellemző atp9 gén intront tartalmaz): ahol a marker 1a-szerű (B205), ott az *atp*9 kisebb, vagyis intronmentes, tehát 1a típusra hasonlít (6. ábra).

A 7. táblázatban is jól látható, hogy az utódok nagyrésze hamar visszanyeri az 1a típusra jellemző markereket. Vagyis már kis távolságra a *cox*1 gén végétől lezáródik az a rekombinációs esemény, melyet az intronok mozgása indított el. Néhány törzsnél ez azonban majdnem 14 kb-os rekombinációt eredményezett. Ilyen nagy kiterjedésű rekombináció nem gyakori az intronok mozgásánál, valószñűleg az *orf*1 és *orf*2 által kódolt endonukleázok is részt vehetnek a mechanizmusban, de ezek tényleges közreműködését még nem sikerült igazolnunk. Valószínűleg ezzel magyarázható a B227-es típus (ami egyébként egyetlen törzset jelent) mozaikos jellege, vagyis az, hogy a 2b-re jellemző szekvenciaszakaszban megjelenik egy 1a típusra jellemző rész (5. ábra).

Az eltérő restrikciós helyek	a hasítóhelyek jellege az utódokban					
távolsága a *cox*1 gén végétől	B205	B212	B203	B202	B240	B227
(1) *Eco*RV - 1 kb	1a	2b	2b	2b	2b	2b
(2) *Bgl*II - 4,4 kb	1a	1a	2b	2b	2b	2b
(3) *Eco*RI - 5,5 kb	1a	1a	1a	2b	2b	2b
(4-5) *Hind*III - 6,3 kb és 6,4 kb	1a	1a	1a	2b	2b	2b
(6) *Eco*RV - 9,8 kb	1a	1a	1a	1a	2b	1a
(7) *Eco*RI - 13,2 kb	1a	1a	1a	1a	2b	2b
(8) *Bgl*II - 13,6 kb	1a	1a	1a	1a	2b	2b
előfordulási gyakoriság	37,5%	35%	7,5%	5%	10%	2,5%

7. táblázat: A szülőkre jellemző restrikciós markerek megoszlása a rekombináns utódokban. 1-8 számok az 5. ábrán jelzett restrikciós pozíciókkal azonosak.



6. ábra: A PCR tecnikával felamplifikált *apt*9 gén elektoforetikus képe. Az 5. táblázathoz képest a nagyobb méretek annak köszönhetők, hogy az alkalmazott primerek a gén előtti és a gén utáni részekből is amplifikáltak fel részeket. 1: B202, 2: B212, 3: B227, 4: B205, 5: B203, 6: B240, 7: N909, 8: 0932, M: λ-pUC mix DNS molekulasúly marker (Fermentas)

A *cox*1 intronok mozgása minden esetben végbement, ami a mobilis intronokkal kapcsolatos szakirodalmi adatokkal egybevág. Csak egy törzs képez kivételt, mely a donor 1a típusú változatlan mitokondriumát örökölte (ez képezi a fennmaradó 2,5%-ot). Ez mutatja, hogy az intronok mozgása azért nem teljesen 100%-os, de igen nagy gyakoriságal bekövetkezik.

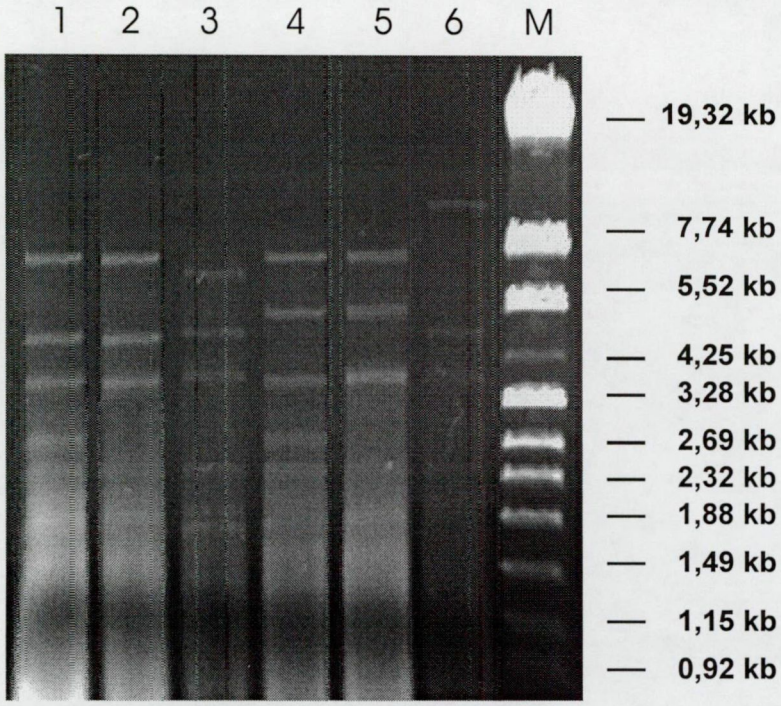
Az *A. japonicus*-sal végzett protoplasztfúziós kísérletek során a donor változatlan mitokondriumának öröklődése sokkal gyakoribb esemény volt. Sőt bizonyos fúziós partnerek esetében csak ilyen utódok képződtek (ld. 5.3 fejezet). A *nad*4L és *atp*9 gének intronjai nem mobilisek, hisz a mobilitásért az intronban kódolt fehérje a felelős.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a rekombináns mtDNS-ek kialakulásáért alapvetően a *cox*1 gén mobilis intronjai a felelősek.

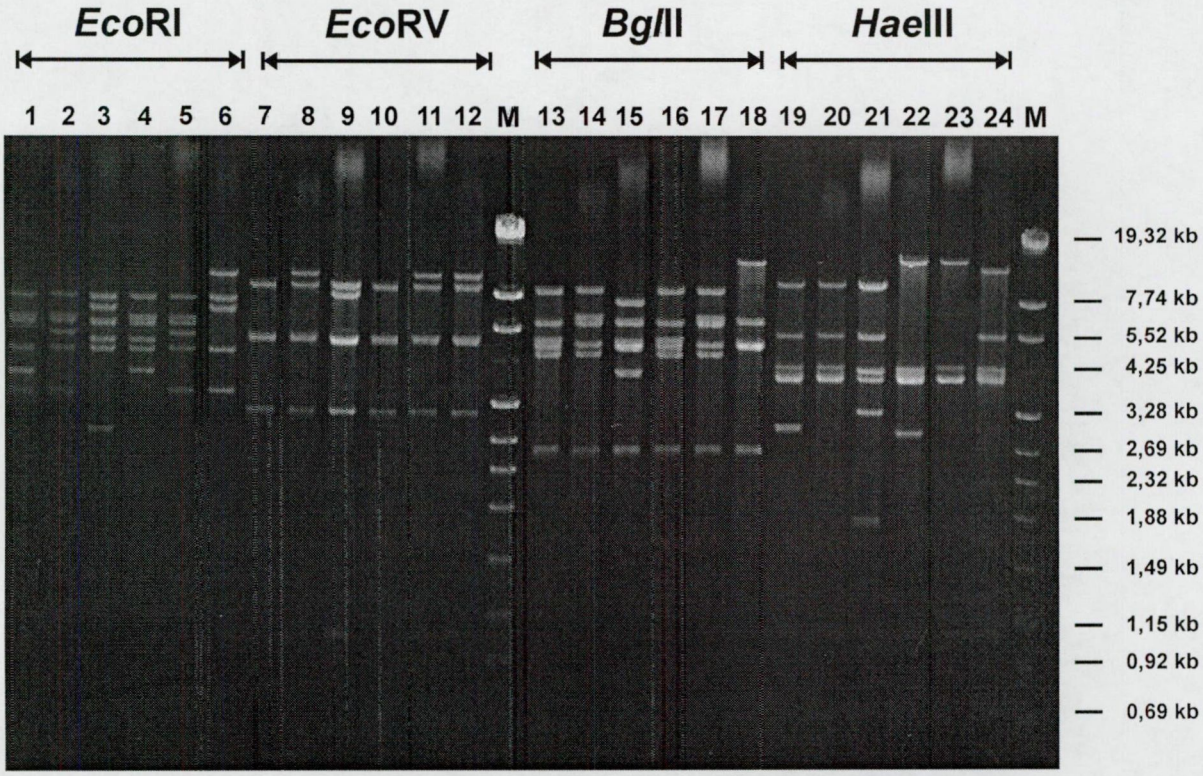
5.2 *A. tübingensis* izolátumok mtDNS variabilitás vizsgálata

5.2.1 *A. tübingensis* izolátumok mtDNS RFLP mintázat polimorfizmusa

Tanszékünkön elvégzett korábbi vizsgálatok során az *A. tübingensis* fajt mtDNS RFLP mintázatuk alapján hat csoportba osztották (2a-2f; Varga és mtsi 1994; Tóth és mtsi 1997). Jelen dolgozat keretében az *A. tübingensis* hat különböző típusú mtDNS-ének részletes analízisét, valamint az eltérések okának magyarázatát végeztük el. A vizsgálatokhoz mind a hat típusból egy-egy törzset választottunk ki (1. táblázat) és vettünk részletes analízis alá. A törzseinket első lépésben totál DNS izolálás módszerével (ld. 4.4.3, 4.4.4) kezdtük el vizsgálni. A totál DNS *Hae*III restrikciós enzimmel (5'-GGCC-3') való emésztése során a mtDNS *Hae*III fragmentumok vizsgálatát tudjuk elvégezni. Az emésztés kivitelezésekor ugyanis kihasználjuk a fonalasgombák egyik tulajdonságát, mely a magi és a mitokondriális DNS eltérő AT-GC arányára vonatkozik. Mivel a fonalasgombák sejtmagi DNS-ének GC tartalma igen magas, a mtDNS pedig AT gazdagabb, ezért *Hae*III emésztés hatására a magi DNS felaprózódik (frontközelben futnak apró fragmentjei), a mtDNS pedig kevés számú fragmentumra hasad. Jelen esetben a totál DNS emésztéséhez kettős emésztést alkalmaztunk (*Hae*III és *Bgl*II), mert az *A. niger* fajaggragátumon belül elvégzett korábbi vizsgálatok a kettős emésztést tartották a legmegbízhatóbb elkülönítési módszernek. Az izolátumaink totál DNS RFLP mintázatát a 7. ábra mutatja. A totál DNS vizsgálatakor az *A. niger* izolátumok polimorfizmus vizsgálatánál ténylegesen szükség is van a kettős emésztésre. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az *A. tübingensis* esetében a *Hae*III restrikciós enzim önmagában is megfelelően differenciál, sőt a 2b és 2e típus közt számos alkalmazott restrikciós enzim (*Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hin*dIII, *Hae*III, *Pst*I, *Xho*I, *Bam*HI, *Xba*I) közül ez egyetlen, amely differenciálni képes (8. ábra).



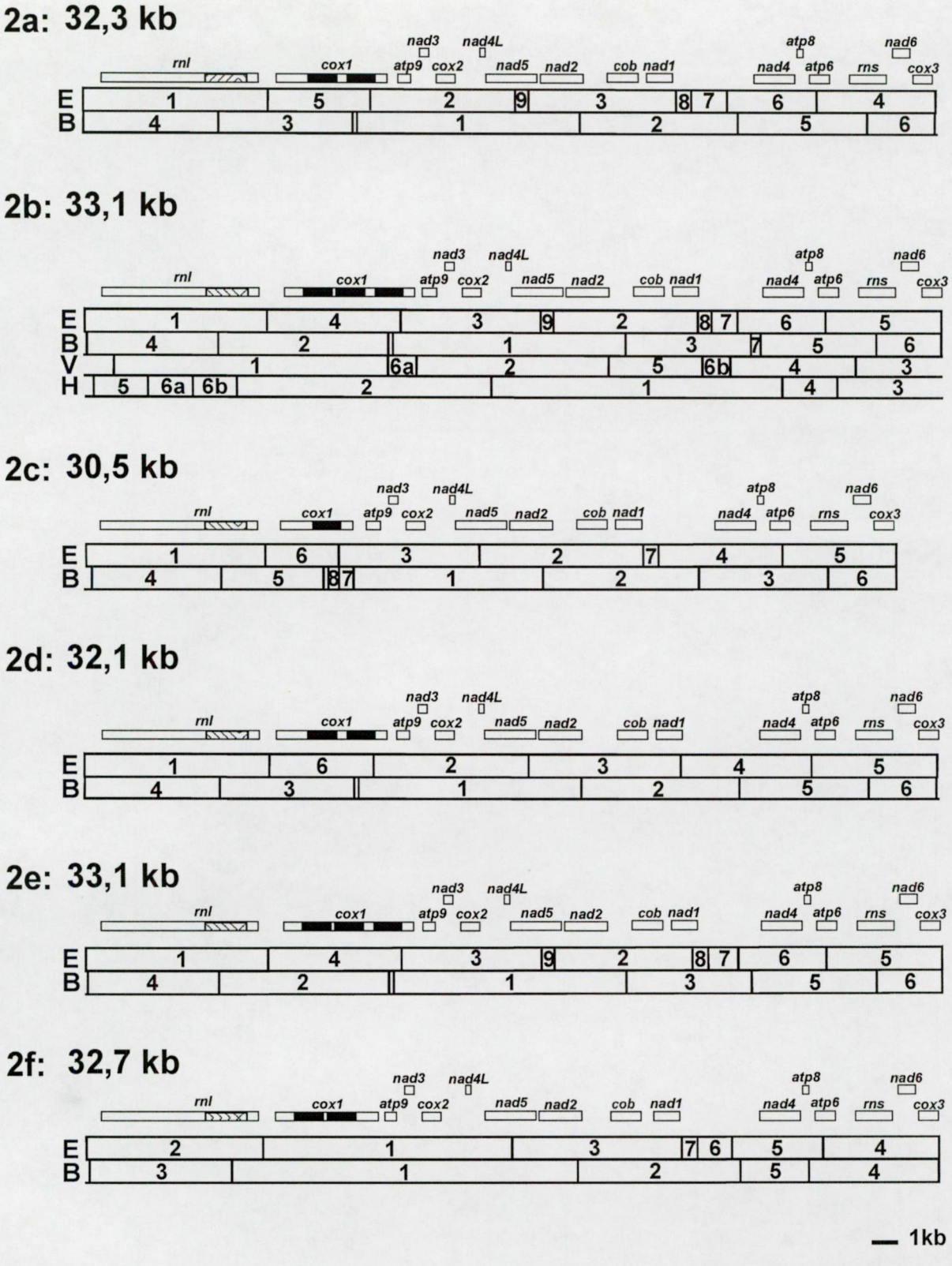
7. ábra: *A. tübingensis* izolátumok totál DNS-ének *Hae*III-*Bgl*II kettős emésztésének elektroforetikus képe. 1: No70, 2: 0932, 3: 0767, 4: 550, 5: 554, 6: 566, M: λ-pUC Mix DNS molekulasúly marker (Fermentas)



8. ábra: A hatféle *A. tübingensis* izolátum mtDNS RFLP mintázata. 2a (1, 7, 13, 19 sávok); 2b (2, 8, 14, 20 sávok); 2c (3, 9, 15, 21 sávok); 2d (4, 10, 16, 22 sávok); 2e (5, 11, 17, 23 sávok); 2f (6, 12, 18, 24 sávok); M: λ-pUC Mix DNS molekulasúly marker (Fermentas).

5.2.2 A különböző mtDNS RFLP típusok térképezése

A 2b törzs részletes fizikai és funkcionális térképe korábbi vizsgálatok eredményeként már elkészült (részletes szekvenciaszintű elemzés 5.1 fejezetben). A törzs négy enzimes térképe (*EcoR*I, *Bgl*II, *Hind*III, *EcoR*V) a rendelkezésünkre állt, és ezt összehasonlítási alapul használtuk fel a többi, eltérő mtDNS mintázattal rendelkező törzs térképezése során. A további öt mtDNS RFLP típusról csak két enzimes térképet készítettünk, mert ez is elegendőnek bizonyult az összehasonlító vizsgálatok elvégzéséhez. A fizikai térkép készítésekor *Eco*RI és *Bgl*II restrikciós enzimeket használtunk, mivel a 8. ábrán is jól látható különbségeket adják, és a térképszerkesztést megkönnyítő, elektroforetikusan jól elkülöníthető fragmentumokat képeznek. A térképek a reciprok emésztés technikájával, a 3.4.5 fejezetben leírtak alapján készültek el. A mitokondriális genomok méretét a különböző enzimekkel történt emésztés során kapott fragmentumok méreteinek összegzésével állapítottuk meg gélanalizáló szoftver segítségével. A 2a, 2b, 2c, 2d, 2e és 2f törzsek mtDNS méretei 32,3; 33,1; 30,5; 32,1; 33,1 és 32,7 kb-nak bizonyultak (9. ábra). A méretbeli eltérések ellenére a térképek, és így a mtDNS-ek alap felépítése jelentős hasonlóságot mutatnak egymással. Feltételezésünk szerint ezen eltérések oka a törzsek mtDNS-ének különböző introntartalma, amelyet további összehasonlító elemző vizsgálataink eredményeként sikerült alátámasztanunk. (Az előző fejezetben tárgyaltak szerint a 2b típus mtDNS mérete 33656 bp, itt mégis 33,1 kb szerepel. Ennek az az oka, hogy a fragentumok mérésén alapuló technika ezt a kisebb eredményt szolgáltatta. Mivel a többi törzs esetében nem ismerjük a mitokondriális genom pontos méretét, ezért hiba lenne a pontosított értéket használni a 2b törzs esetében és ezt összehasonlítani a többi mtDNS típus hozzávetőleges genommére teivel.) A gének restrikciós térképen lévő hozzávetőleges pozícióját először Southern-hibridizációval határoztuk meg, majd pontos méreteket PCR technikával állapítottuk meg az 5.1.1 fejezetben leírtak szerint (9.ábra).



9. ábra: Az *A. tübingensis* 2a-2f törzsek fizikai és funkcionális térképe. E: *Eco*RI, B: *Bgl*II, H: *Hind*III, V: *Eco*RV

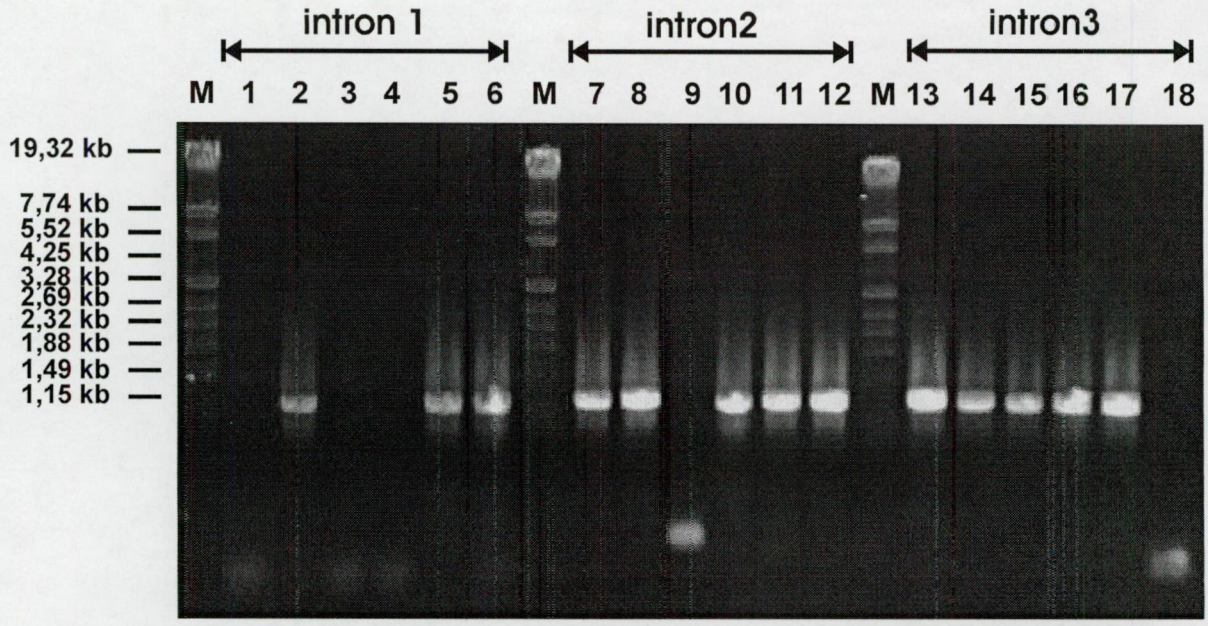
SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

Dolgozatomban bemutatott korábbi vizsgálatok rámutattak arra, hogy az *A. tübingensis* mitokondriális genomszerveződése az *A. niger* izolátumok mtDNS szerveződésével sok hasonlóságot mutat, azonos a génsorrend, a gének egymáshoz való távolsága és a restrikciós hasítóhelyek eloszlása is nagy egyezéseket mutat (Juhász és mtsi., 2004). Ahogy a 9. ábrán látható a hat *A. tübingensis* mtDNS típus génsorrendje azonos, a gének és intergénikus régiók nagysága a legtöbb esetben megegyezik. Az előzetesen már ismertetett 2b típus a *cox*1 génjében három intront hordoz. A 2a, 2c, 2d és 2f típusokban a *cox*1 gén mérete különbségeket mutatott, amely az intronok számának eltérésére utal, indokolttá téve a *cox*1 gén közelebbi vizsgálatát.

5.2.3 A hat *A. tübingensis* típus részletes szekvenciaszintű elemzése

Eredményeink alapján a *cox*1 gén jelentős introntartalombeli eltéréseket mutatott a fekete *Aspergillus* izolátumok között, amely nem csak méretbeli különbségeket vont maga után, hanem esetenként újabb restrikciós hasítóhelyek megjelenését vagy eltűnését okozta. Ezért a hatféle mtDNS RFLP mintázatot mutató *A. tübingensis* izolátumok összehasonlítása során elsősorban a *cox*1 régiót vizsgáltuk meg részletesen.

Az *A. tübingensis* 2b *cox*1 génje 5058 bp méretűnek bizonyult, három intront tartalmaz. Célunk annak kiderítése volt, hogy az *A. tübingensis* többi mtDNS típus *cox*1 génjei miben térnek el egymástól. Első lépésként az *A. tübingensis* 2b ismert *cox*1 intronjaihoz primereket terveztünk (a primerek az intront határoló exon szekvenciákhoz lettek tervezve), majd a hat eltérő mtDNS-en elvégeztük a PCR-t. A PCR termék mérete utal arra, hogy a kérdéses intron az adott mtDNS típusban jelen van, vagy hiányzik. A PCR reakciók eredményeit a 10. ábra mutatja.



10. ábra: Az *A. tübingensis* izolátumok introntartalom vizsgálatához készült PCR termékek elektroforetikus képe. 2a (1, 7, 13); 2b (2, 8, 14); 2c (3, 9, 15); 2d (4, 10, 16); 2e (5, 11, 17,); 2f (6, 12, 18); M: λ-pUC Mix DNS molekulasúly marker (Fermentas)

A 10. ábrán látható, hogy a 2b típusra jellemző 1. intron csak a 2b, 2e és 2f típusoknál van jelen, a 2a, 2c és 2d típusokból hiányzik. A 2b típusra jellemző 2. intron a 2c kivételével minden típusban előfordul. A 2b típusra jellemző 3. intron egy kivétellel (2f) minden típusban jelen van. A PCR eredmény alapján kapott intronmegoszlás egybevág a térképek *cox*1 régiókban mutatott méretbeli eltéréseivel, amely végső soron kihat a teljes mitokondriális genom méretére. A két legnagyobb genommal rendelkező törzs a 2b és 2e (mindkettő 33,1 kb), amelyek esetében mind a három intron megtalálható. A 2c típusú mtDNS a legkisebb méretű (30,5 kb), itt a *cox*1 gén csak egy intront tartalmaz. A 2a, 2d és 2f mtDNS-ek köztes méreteket mutatnak (32,3 és 32,1 kb, 32,7), a *cox*1 génjük két-két intront tartalmaz.

A továbbiakban elvégeztük a gén szekvenciaelemzését mind a hat törzsben. Elsősorban a PCR termékek szekvenálását kezdtük el, amely révén választ kaphatunk arra a kérdésre, hogy az azonos eredetű PCR termékek azonos intronokat tartalmaznak-e, és azok vajon azonos pozícióban találhatóak-e. Ezért a PCR reakcióban alkalmazott primerek

segítségével megszekvenáltattuk a termékeinket, így bizonyítottuk, hogy az azonos pozícióban lévő intronok megegyeznek egymással. Sőt a szekvenciaadatok alapján azt is megállapíthatjuk, hogy az intronok inszerciós helye is pontosan megegyezik. A szekvencia adatokat a 4. táblázat tartalmazza. Az intronok megoszlását, és a homológiát a 8. táblázat foglalja össze. Példaként a 11. ábra mutatja be a 2b típus 3. intronjának megfelelő intronok szekvenciahomológiáját.

Az *A. tübingensis* 2b mtDNS típusra jellemző intronok	*A tübingensis* mtDNS típusok intronmegoszlása					
	2a	2b	2c	2d	2e	2f
1. intron	-	100%	-	-	98%	97%
2. intron	98%	100%	-	98%	98%	98%
3. intron	99%	100%	98%	99%	98%	-

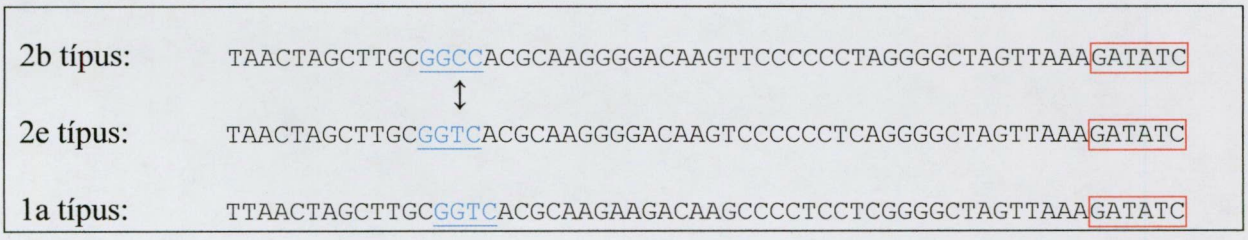
8. táblázat: A hatféle *A. tübingensis* mtDNS típus intronjainak homológiája a már jól ismert 2b típus intronjaihoz. Ahol százalékos érték fel van tüntetve ott az a homológia szintjét jelöli, ahol nincs szám, ott hiányzik az adott intron a törzsből.

Elmondhatjuk tehát, hogy a variábilis RFLP mintázatok ellenére a hat típusú *A. tübingensis* restrikciós és funkcionális térképek nagyon hasonlóak. Elsősorban introntartalombeli eltérés és néhány specifikus hasítási hely felelős a variábilis RFLP mintázat kialakulásáért. A 2c típusú mtDNS a legkisebb, és a 2f mutatja a legnagyobb eltérést a többi típustól (ennek oka főleg a *cox*1 3. intronjának hiánya, mivel abban számos hasítóhely található: két *Bgl*II, egy *Eco*RI, és egy *Eco*RV is, bár ez utóbbi enzim nem szerepelt csak a 2b típus térképezésekor, ezek hiánya nagyban befolyásolja az RFLP mintázat kialakulását.)

11. ábra: Az *A. tübingensis* 2b típus 3. intronjának megfelelő intronok szekvenciahomológiája. A *-al jelölt nukleotidok mind az öt törzsben megegyeznek (a 2f típusban hiányzik ez az intron)

A 2b és 2e áll a legközelebbi kapcsolatban, mtDNS-ük felépítése szinte teljesen azonos. Sőt valószínűleg csak pontmutációkban térnek el egymástól, ilyen a már említett *Hae*III restrikciós hely polimorfizmus is. A két típus *Hae*III restrikciós helybeli eltérés okának felderítésére céljából mindkét törzs esetében összehasonlítottuk a *Hae*III, *Bgl*II és a kettős emésztések RFLP mintázatát. Azt tapasztaltuk, hogy a legnagyobb *Bgl*II fragmentum nem emésztődik *Hae*III enzimmel, és mivel mindkét törzs esetében a legnagyobb *Hae*III

fragmentum nagyobb, mint a legnagyobb *Bgl*II fragmentum, így megállapíthatjuk, hogy a *Bgl*II fragmrentum része a legnagyobb *Hae*III fragmentumnak. Mindkét törzs esetében ismert volt a *Bgl*II fragmentumok pozíciója, mert ez volt az egyik térképező enzim. Szerencsénkre a *cox*1 gén vizsgálatakor a 3. intron, melynek szekvenciaszintű analízise mindkét törzsben megtörtént, 8-10 pozíciójában megtaláltuk a *Hae*III -GGCC- hasítóhelyét (11. ábra). Tehát itt kezdődik a legnagyobb *Hae*III fragmentum. Mérete alapján a másik végét a *nad*4 gén előtti részre tettük, ahol a 2b törzs esetében ténylegesen van hasítóhely. 2b törzs esetében e két hasítóhely között még egy felismerőhelye van az enzimnek a cob gén előtt. A hasítás során egy 9880 és egy 5534 bp méretű fregmentum keletkezik. Ezek összege szinte pontosan megegyezik a 2e törzs legnagyobb *Hae*III fragmentum becsült méretével, ami kb. 15000 bp. Ezért elkeztük vizsgálni a *cob* gént tartalmazó E2 fragmentumot (9. ábra), és megállapítottuk, hogy ténylegesen nem emésztődik *Hae*III enzimmel 2e törzs esetében, míg 2b esetében igen. A 2e törzs esetében is megszekvenáltuk az adott részt és a szekvenciaadatok megerősítették a -GGCC- hasítóhely hiányát (ebből a szempontból a 2e típus az *A. niger* 1a típusú mtDNS-re hasonlít, ott is -GGTC- pontmutáció következett be, 12. ábra). Ettől az eltéréstől eltekintve azonban azt gondoljuk, hogy a 2b és 2e típus nagyon hasonló, szinte azonos mtDNS-sel rendelkezik, valószínűleg csak pontmutációkban térnek el egymástól, bár nem kizárható, hogy más restrikciós enzimek alkalmazása esetén további kisebb mértékű eltéréseket tapasztalnánk.



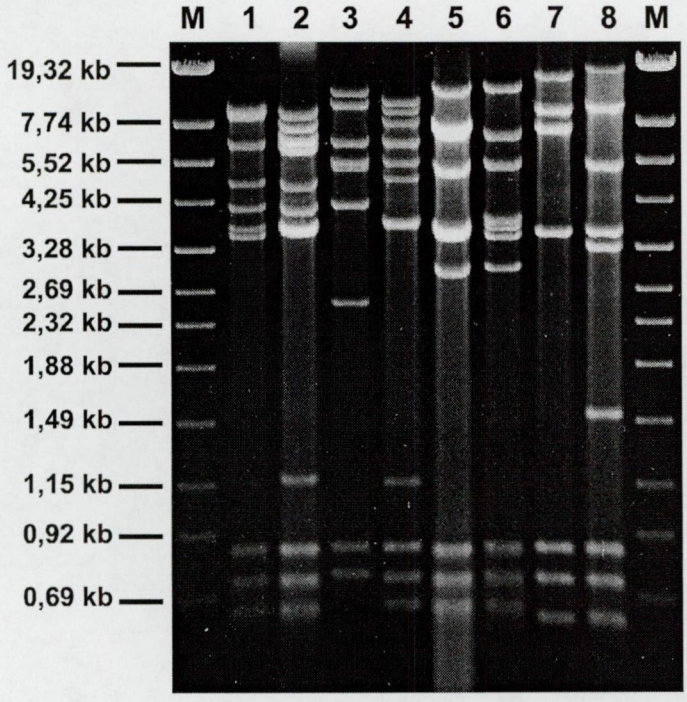
12. ábra: A két *A. tübingensis* (2b és 2e) mtDNS típus, és az *A. niger* 1a mtDNS típus cob gén előtti intergénikus régiójának szekvenciája. A bekeretezett rész *Eco*RV hasítóhely. Az aláhúzott rész a *Hae*III felismerőhelye, illetve annak elmutálódott változata.

5.3 Instabil mitokondriális rekombináns *A. japonicus* izolátumok vizsgálata

5.3.1 Protoplasztfúzióval megvalósított mitokondrium átviteli kísérletek

Munkám során az *A. niger* fajaggragátummal végzett kísérletek mellett szintén a fekete *Aspergillus*-ok közé tartozó *A. japonicus* faj mtDNS polimorfizmusával, és protoplasztfúzióval létrehozott utódok mtDNS analízisével is foglalkoztam.

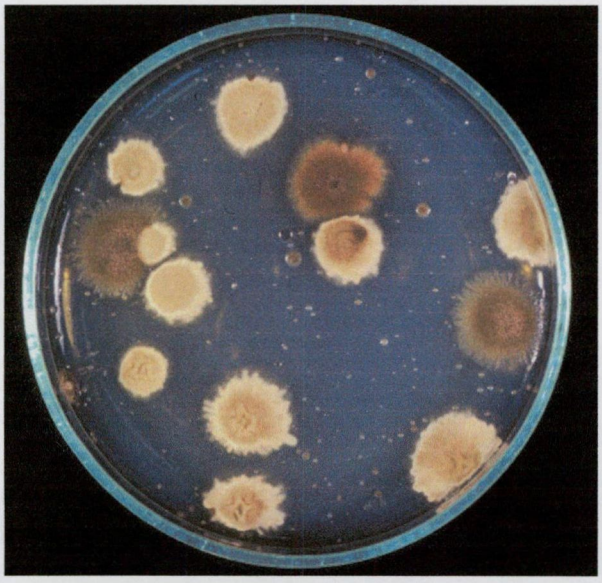
Kísérleteink során a mtDNS átvitelt a nyolc különböző RFLP mintázatú csoport között protoplasztfúzióval valósítottuk meg (13. ábra). A mitokondrium transzmisszió mindig egyirányú volt, és az átvitel során donorként minden esetben egy oligomycin rezisztenciát mitokondriálisan hordozó lizin auxotróf, fehér konídiumszínű izolátum (1287o^R) szerepelt, mely a leggyakoribb mtDNS RFLP mintázatú 1. csoportba tartozik.



13. ábra: *A. japonicus* mtDNS RFLP mintázat típusok *Hae*III restrikciós endonukleázzal. M: λ-pUC mix DNS molekulasúly marker (Fermentas), 1: No57, 2: IN10, 3: 440, 4: 564, 5: 557, 6: 427, 7: Fr.1.2.1, 8: 1287 o^R

A recipiensek a többi mtDNS RFLP osztályt reprezentálták, zömmel prototrófok és a szelekció céljából oligomycin szenzitívek voltak. A fúziós termékeket 0,4 μg/ml oligomycin tartalmú minimál táptalajon szelektáltuk. Mivel az auxotrófia marker magi eredetű, az oligomycin rezisztencia pedig mitokondriális eredetű, csak azok a fúzionált telepek voltak életképesek és nőttek fel, amelyek a recipiens prototróf magját, illetve a donor mitokondriális rezisztenciáját is (14. ábra). Ez pedig csak mitokondrium transzmisszió révén jöhetett létre.

A mitokondrium transzmisszióra irányuló kísérleteket megfelelő kontrollok alkalmazása mellett végeztük: vizsgáltuk a szülők regenerációs képességét, az esetleges backmutációt, spontán rezisztencia kialakulását, valamint a donor és a recipiens protoplasztjainak PEG kezelés utáni regenerációs gyakoriságát. A fúziós kísérleteket több csoportnál többször is elvégeztük a megfelelő fúziós utódszám miatt, illetve a fúzió helyességét is ellenőriztük. Erre elsősorban azért volt szükség, mert a közeli rokon *A. niger* fajaggregátumba tartozó törzsekkel végzett előzetes kísérletek eredményeitől adataink jelentősen eltértek (ld. később). Eredményeinket a 9. táblázat összegzi.



14. ábra: A fúziót követően a szelekciós körülmények közt regenerált utódok telepei.

mitokondrium transzmisszió iránya*	rezisztens regenerált utódok száma	valódi rekombináns utódok aránya (%)	rekombináns típusokat képviselő egyedi izolátumok**	transzmissziós utódok aránya (%)
1→2	118	0	-	100
1→3	342	22	3.127, 3.314; 3.320; 3.322; 3.325; 3.224; 3.317	78
1→4	120	99	4.01; 4.14; 4.33; 4.37	1
1→5	50	20	5.01; 5.06	80
1→6	132	0	-	100
1→7	0	-	-	-
1→8	4	0	-	100

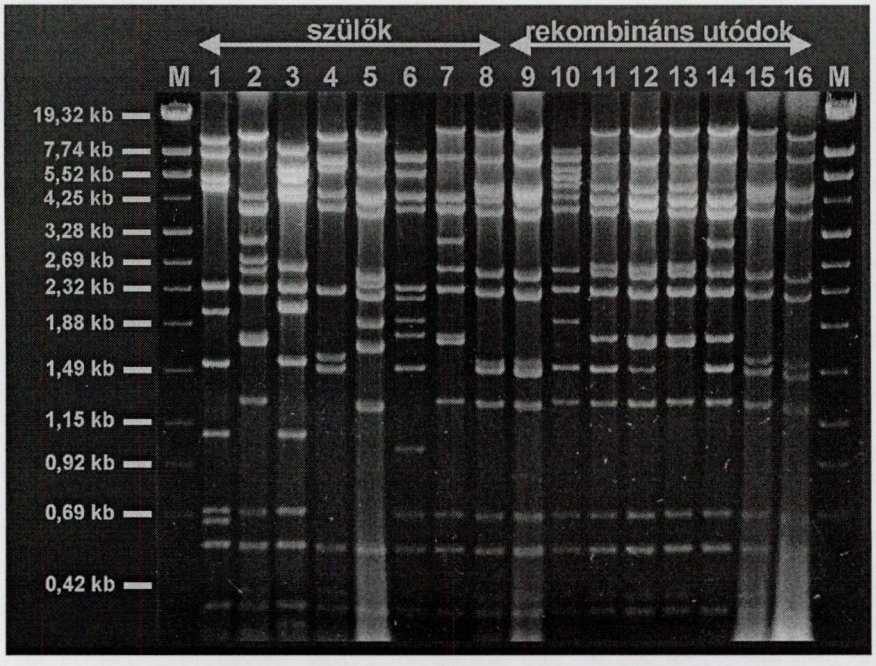
9. táblázat: A mitokondrium transzmissziós kísérletek eredményei. *:A donor az 1., a recipiensek pedig a többi 7 csoportba tartoztak. **: A regenerált utódoknál a pont előtti szám a fúzió recipiensére utal, a pont utáni szám pedig az izolált utódok száma.

Mint ahogy a 9. táblázatból egyértelműen leolvasható, azt tapasztaltuk, hogy az egyes fúziós csoportok között megvalósított mitokondriumátvitel után a regenerált utódok száma jelentősen eltér egymástól, holott a kísérleti körülmények majdnem teljesen azonosak voltak. A 7. csoportot képviselő izolátumok különálló fajnak (*Aspergillus aculeatus*) tekinthetők. Ez volt az egyetlen csoport, ahol olyan nagyfokú az inkompatibilitás, hogy a protoplasztfúziós kísérletek nem adtak pozitív eredményt mitokondrium átvitel tekintetében, annak ellenére, hogy a sejtmagi rDNS-ük az *A. japonicus* izolátumokkal összevetve nem variábilis. Az extrakromoszómális elemek közötti inkompatibilitás is indokolja a más fajba történő besorolásukat (korábban az *A. japonicus* fajba sorolták őket *A. japonicus var. aculeatus* névvel). A fúzió tehát ezen utóbbi csoport kivételével sikeresnek bizonyult, és a továbbiakban már csak a szigorúan vett *A. japonicus* fajjal foglalkoztunk.

5.3.2 Az utódok RFLP mintázatának vizsgálata

A regenerált telepeket első lépésben totál DNS izolálás módszerével (ld. 4.4.3, 4.4.4) kezdtük el vizsgálni. A totál DNS-t *Hae*III restrikciós enzimmel emésztettük. Így a hosszadalmas mtDNS izolálást megkerülve sok száz törzsből tudtunk azonnal mtDNS RFLP mintázatot kapni. A módszer elvi alapját az 5.2.1 fejezetben ismertettem.

A fúziót követően oligomycin rezisztens regenerált utódok mtDNS RFLP mintázatát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy rekombináns (mindkét szülőétől eltérő mintázatot mutató) mtDNS profillal jellemezhető törzsek mellett nagy gyakorisággal olyan utódok izolálhatók, amelyek a donor oligomycin rezisztens mitokondriumára jellemző RFLP mintázatot mutatják (ezeket nevezzük "helyettesített", vagy "szubsztitúciós" utódoknak, 15. ábra).



15. ábra: Az 1. táblázatban feltüntetett szülői és a 9. táblázatban felsorolt valódi rekombináns mitokondriumokkal rendelkező utódok mtDNS-ének *Eco*RV emésztéssel kapott RFLP képe. M: λ-pUC mix DNS molekulasúly marker (Fermentas) 1: No57, 2: IN10, 3: 440, 4: 564, 5: 557, 6: 427, 7: Fr.1.2.1, 8: 1287 o^R, 9: 3.120, 10: 3.127 11: 4.33, 12: 4.35, 13: 4.01, 14: 4.14, 15: 5.01, 16: 5.06

A mitokondrium helyettesítés az *A. niger* fajaggregátum izolátumai közötti mitokondrium transzmisszió során igen ritka, 1% alatti gyakoriságú eseménynek számított (5.1.4 fejezet; Kevei és mtsi. 1997, Tóth és mtsi. 1998), ezzel szemben az *A. japonicus* fajnál gyakori esemény, az esetek több mint felében ez fordult elő.

Az *A. japonicus* 1→2, 1→6 és 1→8 mtDNS RFLP osztályok közötti mitokondrium átvitel utódainak 100%-a szubsztitúciós volt (9. táblázat), azaz recipiens sejtmagi háttér mellett az oligomycin rezisztens donor mitokondrium RFLP mintázata jelent meg.

Az 1→4 mtDNS típusok közötti transzmisszió utódainak 100%-a valódi rekombinánsnak bizonyult, amelyek négyféle mtDNS mintázatot mutattak. Ezen rekombinánsok vizsgálatát már korábban elvégezték (Hamari és mtsi; 2001)

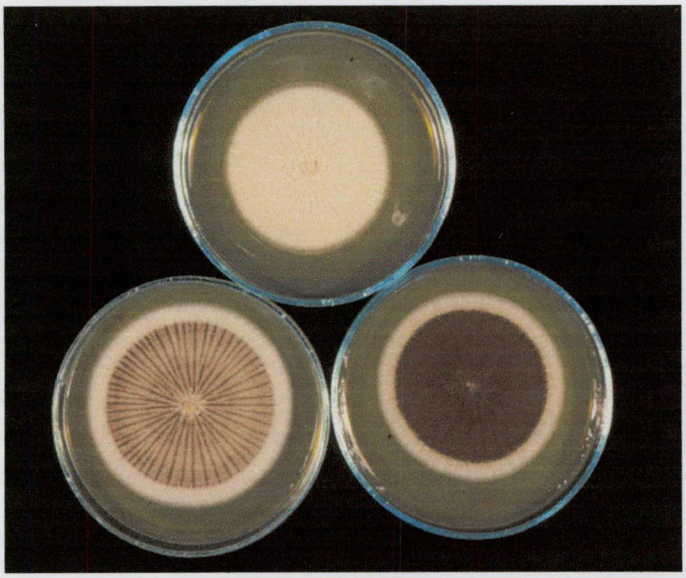
Az 1→3 és az 1→5 mtDNS RFLP csoportok közötti mitokondrium transzfer utódainak kisebb hányada rekombináns volt, amelyek gyakran többféle RFLP mintázatot mutattak (9. táblázat). Az utódok nagyobb hányada azonban helyettesített donor RFLP-jű mitokondrium hordozónak bizonyult. Munkám során a továbbiakban erre a két csoportra koncentráltam, mert itt találkoztunk egy egyedi jelenséggel: az utódok egyrésze instabilnak mutatkozott, és fenotípusának változása együtt járt a mtDNS átszerveződésével is.

5.3.3 A rekombináns mtDNS-t hordozó utódok fenotipikus jellegeinek vizsgálata

A donorként alkalmazott törzsünk ugyanolyan gyors növekedési- és jó konídiumképzési sajátságokkal rendelkezett, mint a recipiensként alkalmazott vad típusú törzsek, viszont mutáns, fehér konídiumszíne miatt jól elkülöníthető tőlük. A fúziót követően az utódok lassan regeneráltak, és visszafogott növekedést mutattak a szelekciós táptalaj magas sókoncentrációja miatt (14. ábra). Szubkultúrázások után szinte azonnal visszatér a szülőkre jellemző gyors növekedés és az erőteljes, vad típusú fekete színnel

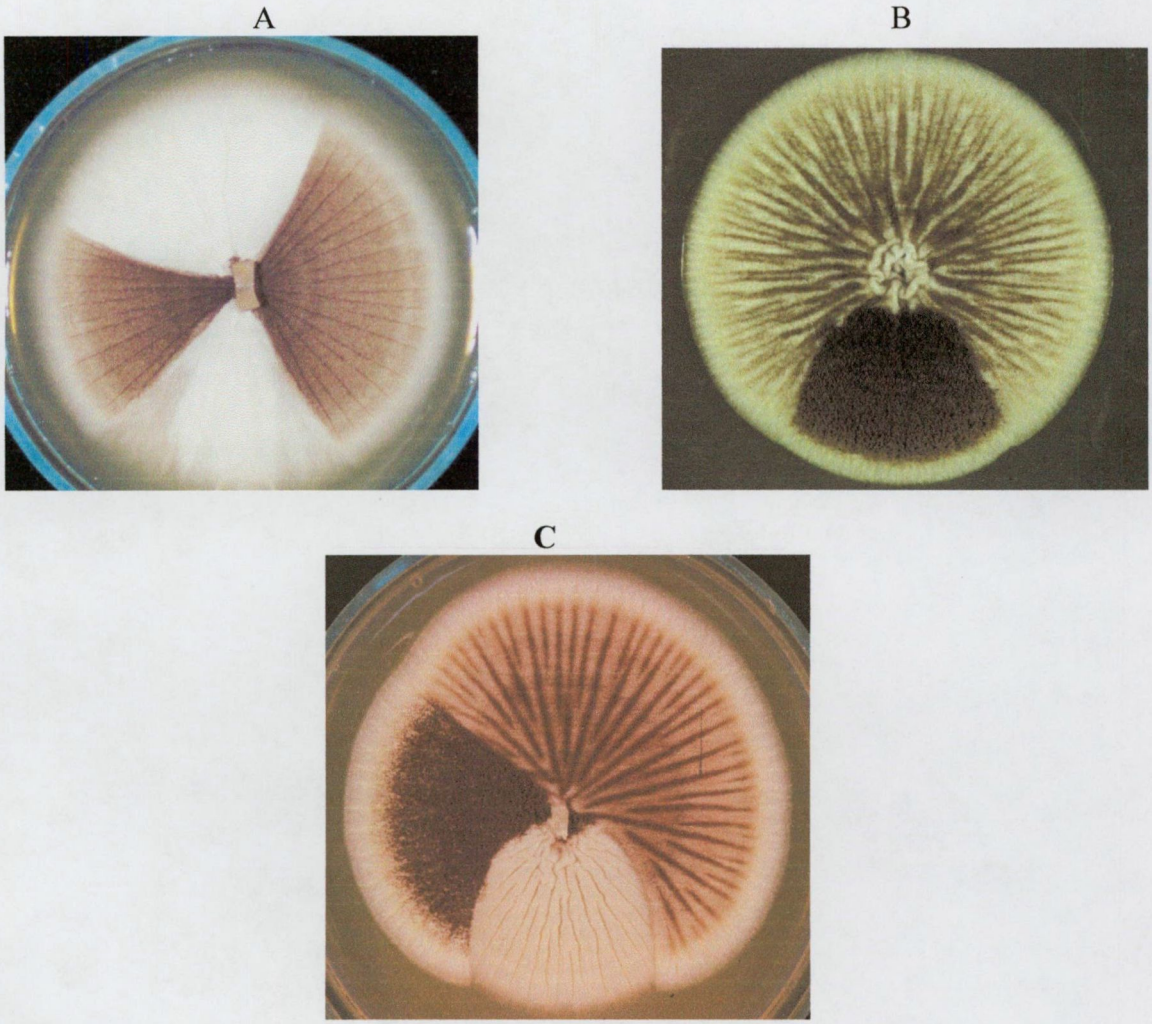
jelentkező konídiumképzés, annak ellenére, hogy már magasabb - 5 μg/ml - oligomycin tartalmú táptalajon neveltük őket (az intakt sejtek szelekciójához magasabb antibiotikum koncentráció kell). Ez kétfúziós osztály kivételével jellemző az összes fúzióból regenerált utódra.

Az 1→3 és 1→5 fúziók során a fentiektől eltérően azt tapasztaltuk, hogy a regenerált utódok fenotípusa nem egységes, alapvetően három csoportba osztható. A regenerált utódok jelentős részére (kb. 80%, 9. táblázat) jellemző fenotípus a konídiumképzés szinte teljes hiánya miatt kialakuló világos telepszín, és a visszafogott növekedés. Telepszínűk miatt „világosoknak" neveztük el ezt a típust. Más utódok konídiumképzése még mindig visszafogott volt, de erőteljesebb az előzőeknél, és a táptalaj felületén bordásan növekedtek. Ezek képezték az átmeneti formát. Valamint megjelentek a már fent említett vad típushoz hasonló morfológiai tulajdonságokat mutató telepek is, amelyeket fekete konídiumszínük miatt „feketéknek" neveztünk el (16. ábra).



16. ábra: A háromféle különböző fenotípus telepei. Fent: világos, balra lent: átmeneti forma, jobbra lent: fekete. Az ábra 3.218 jelű utód háromféle megjelenési formáját mutatja.

Kezdetben azt feltételeztük, hogy ezek a formák egyszerre jelennek meg, csak az egyes típusok gyakorisága tér el. Azonban ismételt fúziók sorával igazoltuk, hogy a fúzió után először csak „világosak" izolálhatók, ha az izolálást viszonylag gyorsan – a protoplasztfúzió után 6-8 nappal – végeztük el. Bizonyos esetben ezek a telepek szegregációra voltak hajlamosak, amely során a „világos" fenotípus egyre jobban kezdett hasonlítani a vad típus morfológiai sajátságaihoz. Az először megjelenő szegregánsok az átmeneti forma képviselői voltak, melyek egyrésze szintén instabilnak mutatkozott, és továbbalakult a fekete, vad típusúvá (17. ábra).



17. ábra: A: Egy „világos" telepből kialakuló átmeneti formát mutató szektorok. B: Átmeneti formából kialakuló „fekete" szektor. C: Egy „világos" telepből egyszerre kialakuló különböző szektorok.

A három fenotípus forma megjelenési sorrendje nem szigorúan következett be, ugyanis megfigyelhető, hogy a „világosok"-ból egyszerre alakultak ki a másik két típus szektorai (17. ábra). Az utódok az átalakulások ellenére végig megtartották oligomycin rezisztenciájukat még akkor is, ha nem szelektív körülmények közt alakultak ki a szektorok.

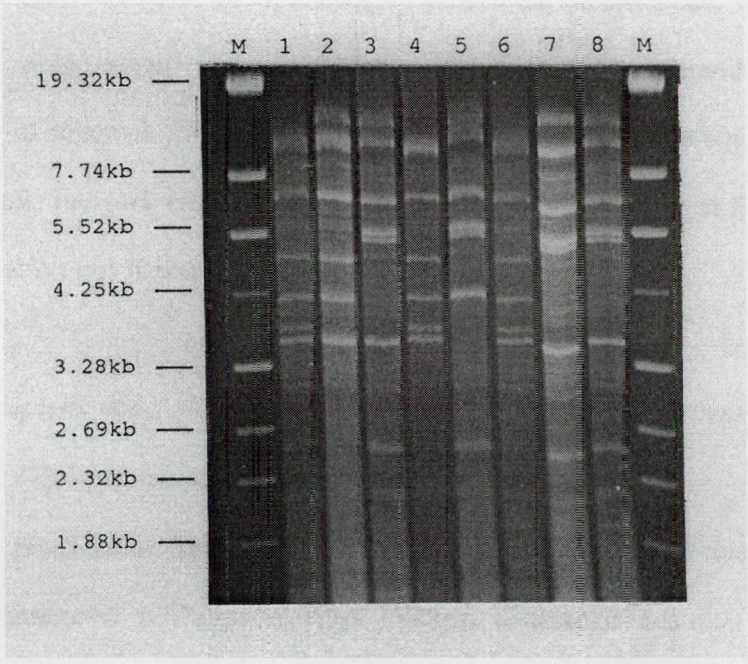
A „feketék" nem alakultak tovább, ezek végleges formáknak tekinthetők. A világos és átmeneti formák egy része szintén nem alakult tovább, de feltételezhetően erre képesek lennének. Megvizsgáltuk a fenotipikus megjelenési formák követése mellett a „világos" utódok, valamint a belőle keletkező szektorok mtDNS RFLP mintázatát. Azt tapasztaltuk, hogy az utódok megjelenési formái erős korrelációban állnak az mtDNS szerveződés változásaival. Minden világos utód szubsztitúciós mitokondriumot hordozott, azaz a donor változatlan RFLP-jű mtDNS-ét öröklik. A donor és a szubsztitúciós utódok mtDNS-ét többféle restrikciós enzimmel is megemésztettük, és ezek az eredmények szintén az előbbi állítást igazolják, ugyanis az RFLP mintázatok megegyeztek.

Az átmeneti formák, és a feketék rekombináns mtDNS karaktert mutattak. Számos átmeneti fenotípust mutató telep vizsgálatával hétféle rekombináns mtDNS RFLP típust sikerült azonosítani, a fekete telepek vizsgálata viszont egységes RFLP mintázatot mutatott, mely eltért mint a hét átmeneti típusra jellemző mintázattól, és a recipiens szülő mtDNS-éhez vált hasonlóvá (18. ábra). Ezeket az eredményeket többszöri ismétlésekből származó kísérleti eredmények is megerősítik.

Az 1→2, 1→6 és 1→8 fúziók kizárólag szubsztitúciós utódokat eredményeztek, melyek vad fenotípust mutattak. Tehát ezekből a fúziókból származó, és az előzőekben ismertetett szegregációra képes szubsztitúciós utódok fenotípusa nem egyezik meg egymással. Ennek a magyarázata az lehet, hogy a különböző mitokondriális RFLP csoportba tartozó recipiensek különböző szintű kompatibilitásban vannak a donorral, közelebbi vagy távolabbi „rokonsági kapcsolatban" vannak egymással a fajon belül – ami egy aszexuális faj esetében el

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 13.

is képzelhető. Jelen esetben pl. az 1→6 fúzió során a recipiens mag képes elfogadni a donor változatlan mitokondriumát, míg az 1→3 fúziónál a szubsztitúciós utód kevésbé életképes, mint a belőle kialakuló rekombinánsok.



18. ábra : Az 1-3 fúzióból származó két „világos" törzs, valamint a belőlük keletkezett „átmeneti" és „fekete" típusok, valamint a szülők totál DNS-ének *Hae*III enzimmel történő emésztése során kapott RFLP mintázata. M: λ-pUC mix DNS molekulasúly marker (Fermentas) 1: 3.218 világos, 2: 3.218 átmeneti, 3: 3.218 fekete, 4: 1287o^{R}, 5: 427, 6: 3.324 világos, 7: 3.324 átmeneti, 8: 3.324 fekete.

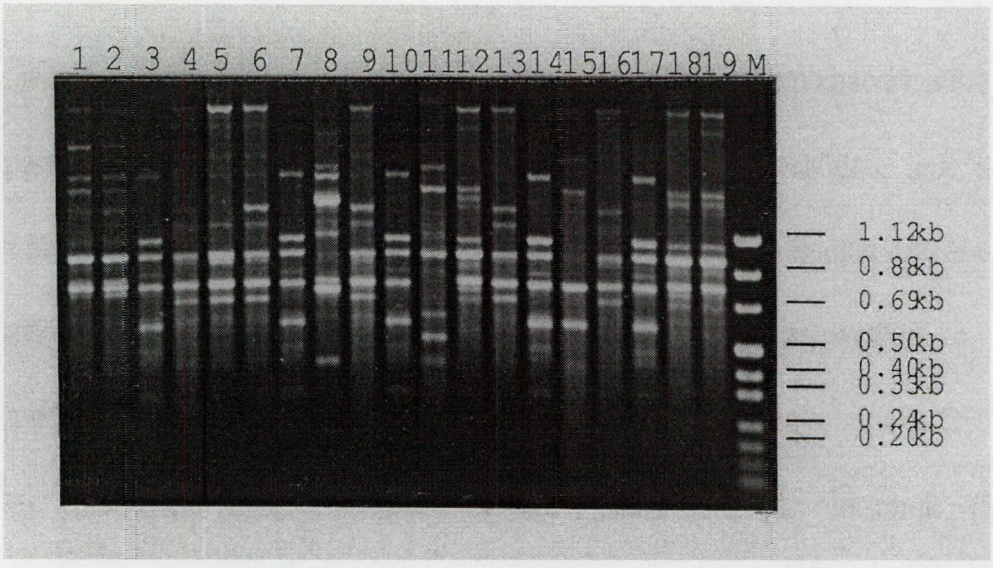
5.3.4 A recipiens mag öröklődésének vizsgálata

Mivel a recipiens szülők magi markerrel nem rendelkeztek (vad típus) RAPD-PCR technika segítségével próbáltuk a magi DNS-re vonatkozó adatokat összegyűjteni. Elsősorban azt szerettük volna bebizonyítani, hogy a transzmissziós mitokondriumú törzsek magja a recipiens eredetű, azaz a mag és a mitokondrium más-más szülőtől származik. A RAPD-PCR reakciót több különböző primerrel végeztük el. Mivel ez a típusú PCR reakció nem előre megtervezett DNS részletet amplifikálódó primereket használ, nem

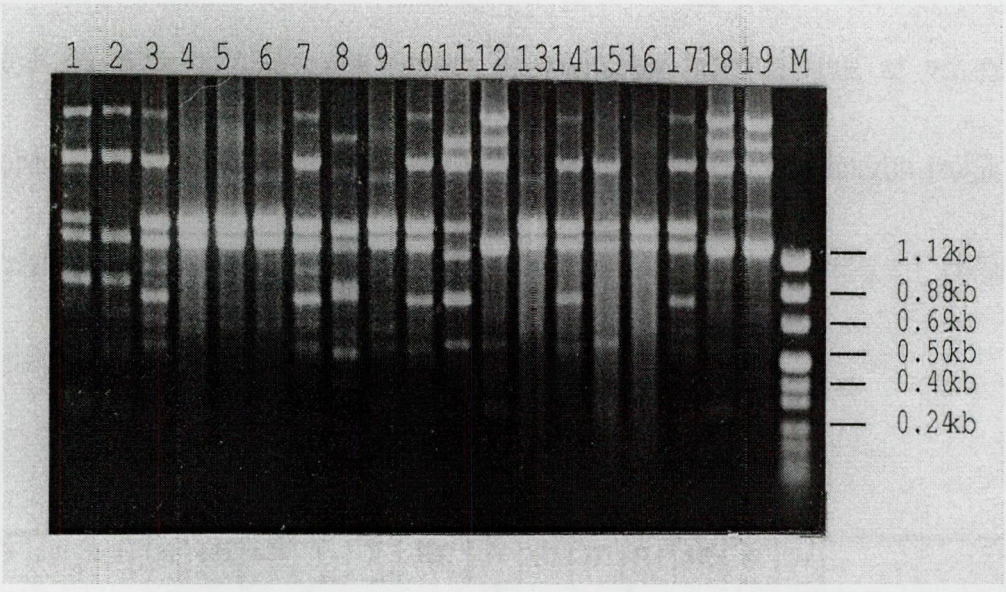
volt ismeretes számunkra hogy ennél a fajnál a magi vagy a mitokondriális genomhoz illeszkednek ezek a primerek, bár gazdag GC tartalmuk miatt inkább az előzőhöz vártuk az illeszkedést. Az OPC-1 és OPC-9-es primerek bizonyultak alkalmasnak a magi DNS jellemzésére, ezért a fúziós partnerek, a szubsztitúciós és valódi rekombináns utódok magi jellemzését a fenti két primerrel végeztük el.

A kísérletek során megvizsgáltuk a donor, a recipiensek és az egy-egy fúziós csoportra jellemző szubsztitúciós, és ha volt, egy valódi rekombináns utódtípus RAPD-PCR mintázatát (19. és 20. ábra). Az utódok a recipiens szülőre jellemző mintázatot mutatták, igazolva a mag recipiens eredetét. Természetesen ezt az eredményt vártuk, hiszen a donor magjának jelenléte együtt járt volna a fehér konídiumszín megjelenésével, ugyanakkor esetünkben az utódok a vad típusra jellemző fekete konídiumszínt mutattak (a világos telepek esetében is, a fehér szín a micélium színe, nem pedig a konídiumoké, melyek itt is feketék, csak nagyon kevés számban képződnek).

Mindezen adatok alapján azt feltételezzük, hogy a fúzió után keletkező utódok mitokondriumai a donor változatlan mtDNS-ét öröklik, mely a recipiens maggal bizonyos összeférhetetlenségben áll. Ez az összeférhetetlenség magyarázza a visszafogottan növő, konídiumképzésben elmaradt telepformát, melynek lehetséges oka a mag és a mitokondrium közötti kommunikáció zavara miatt fellépő energiaszegénység. Az utódokban kis gyakorisággal elindulhat egy mtDNS átrendeződési folyamat, amely többféle úton történhet (többféle átmeneti forma megjelenése), de egyetlen végső mtDNS szerveződési állapot kialakulása irányába történik, és ez a végső, fekete telepformát kísérő mtDNS RFLP mintázattal jellemezhető (mindegyik átmeneti formából megfigyelhető volt a végforma kialakulása).



19. ábra: Az OPC-1-es primerrel elvégzett RAPD-PCR reakció elektroforetikus képe. M: pUC-mix DNS molekulasúly marker, a 3, 7, 10, 14, és 17 sávok: 1287 o^R, 1: IN10, 2: 2.01, 4: 564, 5: 6.01, 6: 6.101, 8: 440, 9: 8.06, 11: 427, 12: 4.33, 13: 3.102, 15: 557, 16: 5.03, 18: Fr.1.2.1, 19: 4.13. A 2.01, 6.01, 6.101, 8.06, 3.102 és 5.03 szubsztitúciós izolátumok.



20. ábra: Az OPC-9-es primerrel elvégzett RAPD-PCR reakció elektroforetikus képe. M: pUC-mix DNS molekulasúly marker, a 3, 7, 10, 14, és 17 sávok: 1287 o^R, 1: IN10, 2: 2.01, 4: 564, 5: 6.01, 6: 6.101, 8: 440, 9: 8.06, 11: 427, 12: 4.33, 13: 3.102, 15: 557, 16: 5.03, 18: Fr.1.2.1, 19: 4.13. A 2.01, 6.01, 6.101, 8.06, 3.102 és 5.03 szubsztitúciós izolátumok.

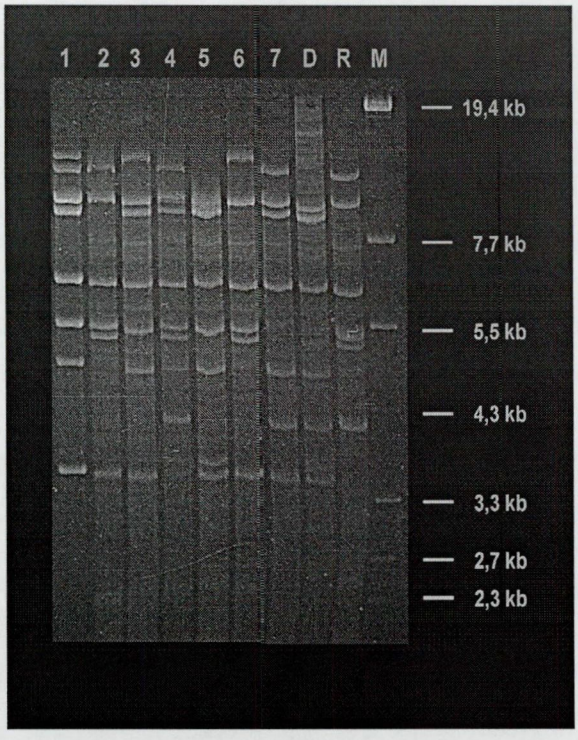
Ez már a recipiens szülő mtDNS RFLP mintázatához hasonló. Ezzel a felvetéssel azonban azt is feltételezzük, hogy a recipiens szülő mtDNS szerveződése annyira tér el a donorétól, hogy a donor mtDNS-e (ami nagyobb, mint a recipiensé) át tud alakulni recipiens jellegűvé. Intronok elvesztését tartjuk a legjellemzőbb átalakulást kísérő folyamatnak.

5.3.5 A rekombinációs események vizsgálata

A következő lépésként a rekombináció mechanizmusának felderítését céloztuk meg. Ennek keretén belül már korábban megtörtént a donor ($1287o^R$), és egy kiválasztott (4.33 jelű, 1→4 mitokondrium átvitelből származó) valódi rekombinációs utód fizikai térképének megszerkesztése. A két mitokondriális genom szerveződése igen hasonló volt, s az eltérések jól lokalizálhatók voltak. A kettő közti eltérő régiókat szubklónozták és megszekvenálták. Tisztázódott, hogy a fúziót követően alapvetően a donor mitokondriuma szelektálódott ki a recipiens mitokondriális DNS-ének egy-egy szekvencia-részletével (intronjai által) módosulva. Ezek az eredmények egybevágtak a korábban ismertetett *A. niger* fajaggragátumban létrehozott rekombinációs utódok elemzésekor kapott adatokkal. Az intronok (ORF-et tartalmazó I. típusú intronok) a rekombinációs utód *cob* és *cox*1 génjeibe inszertálódtak. Detektáltak egy donor eredetű *cox*1 intront, amely a rekombináns utódban nem található meg, azaz intronvesztés zajlott le. Irodalmi adatok alapján (Lambowitz 1993, Dujon 1989) az intronvesztés eseménye igen ritka, kis gyakorisággal bekövetkező esemény, melynek azonban egyre növekvő jelentőséget tulajdonítanak azóta, hogy felmerült génterápiás eszközként való alkalmazása intronmutáció okozta betegségek gyógyításánál (Huang 1998, Smyth és mtsi. 1998).

Megállapítható volt tehát, hogy a rekombináns karakter kialakításáért alapvetően a *cob* és *cox*1 gének intronmozgásai voltak a felelősek. Ezen ismeretek tudatában kezdtünk neki az 1→3 fúzió utódainak a vizsgálatába, és feltételeztük, hogy a fent említett gének

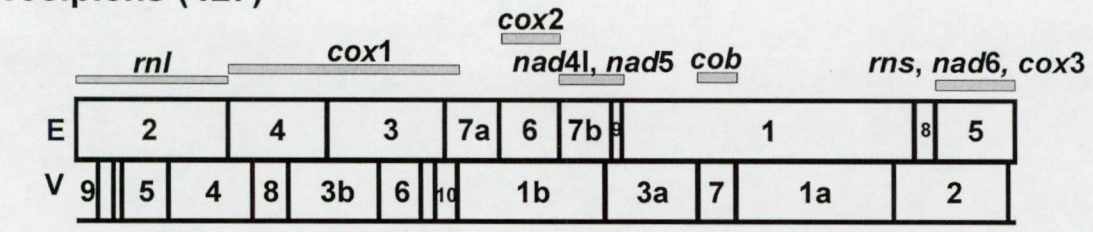
szabálytalan intronmozgásai okozhatják az instabilitást az utódokban (elsősorban azt feltételeztük, hogy a világos és átmeneti formák gyengébb fitnesze a mRNS intronkivágódási zavaraiból ered). Első lépésként elkészítettük a recipiens szülő, a végforma, és néhány átmeneti forma fizikai térképét. A hétféle rekombináns típus és a szülők RFLP mintázatát a 21. ábra mutatja



21. ábra: Az 1→3 fúzióból származó hétféle rekombináns törzs, valamint a szülők totál DNS-ének *Hae*III enzimmel történő emésztése során kapott RFLP mintázata. **M**: λ-pUC mix DNS molekulasúly marker (Fermentas) 1: 3.127, 2: 3.317, 3: 3.320, 4: 3.322, 5: 3.325, 6: 3.314, 7: 3.224, D: 1287 o^R , R: 427. A 2. sorban található a végforma, mely nagymértékben hasonlít a recipiensre (R)

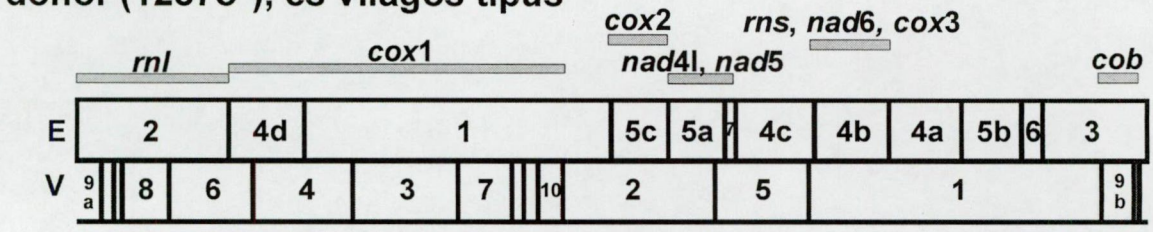
A fizikai térképek elkészítésével azt próbáltuk kideríteni, hogy a mobilis intronok miképpen okozhatják az 1→3 fúzió során tapasztalt jelenségeket. Vagyis, hogy mi változik a szubsztitúciós mitokondriumban (amit a donoréval azonosnak tekintünk) amikor átalakul az átmeneti forma instabil rekombináns típusaivá, és ez hogy alakul tovább a végleges formává. A fizikai térképeket a 22. ábra mutatja.

recipiens (427)

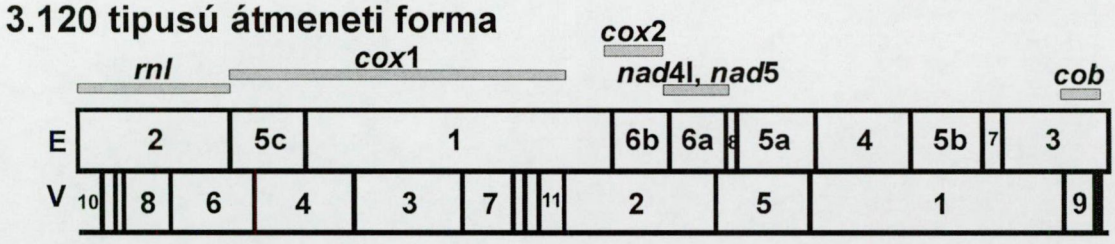


= 1 kb

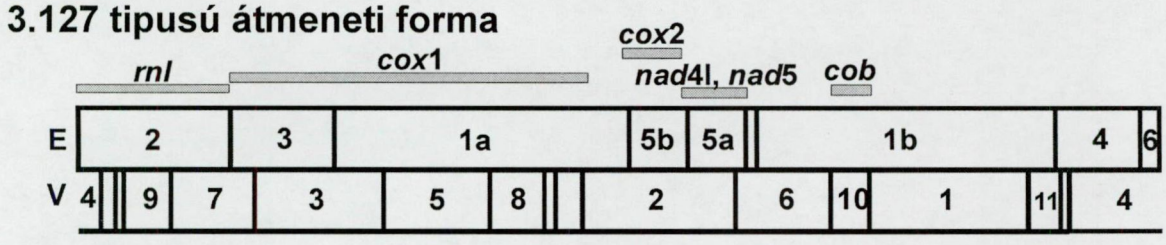
donor (1287o^{R}), és világos típus



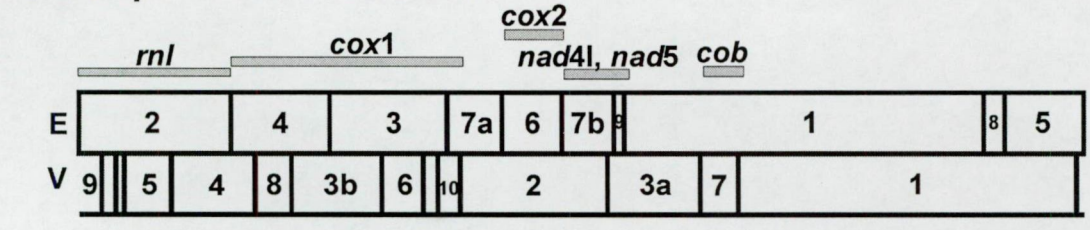
3.120 tipusú átmeneti forma



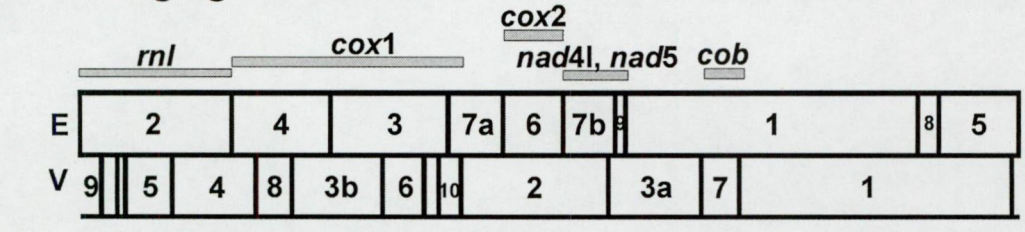
3.127 tipusú átmeneti forma



3.314 tipusú átmeneti forma



3.317 végleges forma



22. ábra: Magyarázó szöveg a következő oldalon.

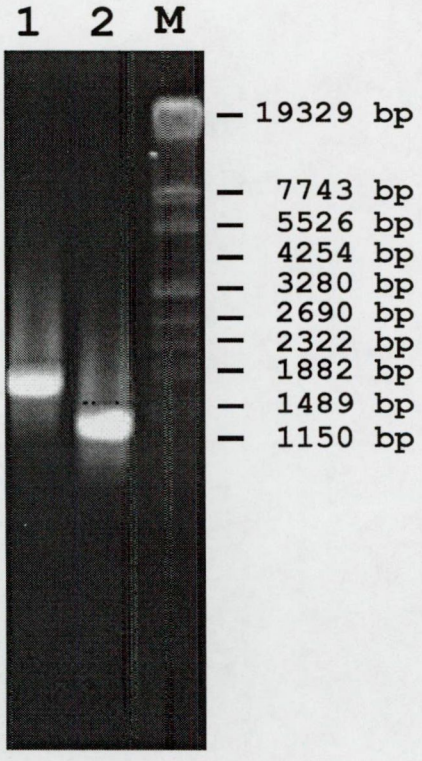
22. ábra: A két szülő, háromféle átmeneti forma, és a végleges forma fizikai és részleges funkcionális térképe. Jól látható ahogy a donorszerű mitokondrium fokozatosan alakul át recipiensszerűvé.

A fizikai térképek mellett részleges funkcionális térképet is készítettünk hibridizáció segítségével. A pontos, korábban már többször említett PCR-es méretmeghatározás nem volt lehetséges, mert az *A. nidulans*-ból származó heterológ primerek nem működtek megbizhatóan az esetek egy részében. Azt sikerült megállapítani, hogy a kísérleteink szempontjából érdekes *cob* gén a két szülői törzsben más pozícióban helyezkedik el, tehát a génsorrend nem teljesen azonos. A donor mitokondriuma sokkal nagyobb, és ez a méretkülönbség a hibridizációs adatok alapján a cox1 gén méretbeli eltérésének köszönhető.

A 3.120-as típusú átmeneti forma még nagyon hasonlít a donor mtDNS-ére, a génsorrend is azonos. A 3.127-es jelű izolátum még mindig inkább donorszerű, de a *cob* gén átrendeződése már megtörtént. A 3.314 és 3.317 jelű törzseknél már a *cox*1 gén mérete, és ezáltal az egész genom mérete is csökkent. Ez utóbbi törzs szinte teljesen azonos fizikai térképpel rendelkezik mint a recipiens szülő. Felmerülthet a kérdés, hogy ez utóbbi típusok nem a recipiens mtDNS-éből alakultak-e ki. Ez azért nem valószínű, mert az átmeneti és a végleges forma sohasem a fúzió után izolálható, hanem bizonyos idő elteltével a világos, vagyis a donorszerű mitokondriummal rendelkező típusból alakulnak ki. Emellett elvégeztük bizonyos intergénikus régiók szekvenálását mind a két szülőben, és a végformában, és minden esetben azt tapasztaltuk, hogy a DNS szekvencia a donoréval egyezik meg. Vagyis igazoltnak tekinthető, hogy alapvetően itt is a donor mitokondriuma öröklődik.

Feltételezésünk szerint a recipiens magja nem teljesen „kompatibilis" a donorszerű mitokondriummal, ennek az lehet az oka, hogy a nagyobb mtDNS több intront tartalmaz melyek pontos kivágódásával problémák lehetnek. Ezért a „világos" és átmeneti forma típusokból totál RNS izolátumot készítettünk, és cDNS-t készítettünk mind a *cox*1 mind a *cob* génből. Elvárásaink sajnos nem igazolódtak be, vagyis az intronmentes mRNS-nek megfelelő

méretű cDNS termékeket kaptunk mindkét esetben (23. ábra). Mindez azt igazolja, hogy az intronok pontosan kivágódnak azokban az esetekben is, ahol a csökkent konídiumképzéssel rendelkező fenotípus jelenik meg.



23. ábra: A 3.218 jelű „világos" (szubsztitúciós) utód *cox*1 (1) és *cob* (2) cDNS-ének futtatási képe. M: λ-pUC mix DNS molekulasúly marker (Fermentas)

Megállapítottuk, hogy a rekombináns mtDNS kialakításáért itt is az intronok mozgása, sőt egy génsorrend csere is a felelős, de ezeknek pontos mechanizmusát nem sikerült felderítenünk (*A. japonicus* mtDNS genomja 40-60 kb közt mozog, ezek teljes szekvenálására nem voltak megfelelő lehetőségeink). Azt a tényt sem tudtuk magyarázni, hogy miért nyúlik el időben ennyire a mtDNS átalakulása (néha hónapok multán is keletkeztek újabb rekombináns szektorok). Ha ezeket a folyamatokat a recipiens mitokondriális genomja idézi elő, akkor azoknak már rögtön a fúzió után le kellett volna zajlani (ugyanis az utódokban csak egyféle mtDNS képes fennmaradni). Feltételezhető tehát, hogy a donorszerű genom magától kezd átalakulni recipiensszerűvé, de a megfelelő szekvencia adatok hiányában ezt nem tudjuk igazolni. Elképzelhető továbbá, hogy sejtmagi faktorok is szerepet játszhatnak az mtDNS

átalakulásában, de ezen folyamatok mibenléte szintén nem ismeretes. Megállapíthatjuk tehát, hogy a rekombináns utódok folyamatos mtDNS átrendeződésében az intronmozgásokon túl, további eddig ismeretlen folyamatok is részt vesznek, melyek felderítésére további vizsgálatokra lenne szükség.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során három, a fekete *Aspergillus*-ok közé tartozó, faj részletes mtDNS elemzését végeztük el. Az *A. niger* öt (1a-1e), az *A tübingensis* hat (2a-2f), míg az *A. japonicus* nyolc (1-8) mtDNS RFLP csoportba sorolható. Az mtDNS variabilitás vizsgálatán kívül a fajok közti (*A. niger* 1a és *A. tübingensis* 2b), és fajon belüli (*A japonicus* különböző mtDNS RFLP mintázatú csoportjai) mitokondrium transzmissziós kísérletekből származó rekombináns utódok elemzését is elvégeztük. A mitokondrium átviteleket minden esetben protoplasztfúzióval valósítottuk meg a kiterjedt heterokarion képzési inkompatibilitás miatt.

Elkészítettük a két általunk legjobban tanulmányozott *A. niger* fajaggregátumba tartozó törzs, az *A. niger* 1a és *A. tübingensis* 2b mtDNS típusú törzsek fizikai és funkcionális térképét. A gének pontos helyét és sorrendjét Southern-hibridizációval, valamint a PCR termékeinek szekvencia analízisével határoztuk meg. A géntartalom és a génsorrend mindkét esetben megegyezett. A pontos mtDNS elemzés céljából elvégeztük a teljes mitokondriális genomok szekvenálását. A mtDNS mérete az *A. niger* 1a esetében 31103 bp, míg az *A. tübingensis* esetében 33656 bp.

A méretbeli különbségek nagy részéért a *cox*1 gén introntartalma felelős. Az *A. niger* 1a mtDNS típusú törzsének *cox*1 génje 2728 bp, és csak egyetlen 1015 bp-os intront tartalmaz. Az *A. tübingensis* 2b mtDNS típusú törzsének *cox*1 génje 5058 bp méretűnek bizonyult, három intront tartalmaz, amelyek sorrendben 1148 bp, 1126 bp, és 1085 bp hosszúságúak. Mindegyik intron I-es típusú mitokondriális intron, LAGLIDADG típusú endonukleázszerű fehérjét kódolnak. Az *A. tübingensis* 2. intron azonos az *A. niger* 1a típusú mtDNS *cox*1 génjének egyetlen intronjával, inszerciós helyük is megegyezik. Az *A. tübingensis* 2b *cox*1 génjének 1. intronja az *A. nidulans cox*1 2. intronjával homológ, míg a 3. intronja nem mutat homológiát egyik ismert mitokondriális intronnal sem.

További kisebb méretbeli eltérés az *atp*9 és *nad*4L génekben adódott. Az *A. niger* 1a típus esetében az *atp*9 gén intronmentes, és 225 bp hosszúságú. Az *A. tübingensis* 2b esetében a gén egy 329 bp-os ORF nélküli intront tartalmaz, így a gén hossza 554 bp. A 270 bp-os *nad*4L gén *A. tübingensis* 2b esetében intronmentes, míg *A. niger* 1a esetében egy 477 bp hosszúságú intront tartalmaz, mely I-es típusú mitokondriális intron. Hasonlóan az *A. tübingensis* 2b típus *atp*9 gén intronjához ez sem hordoz ORF-et. Az intron egy része homológiát mutat *Neurospora crassa* és *Podospora anserina nad*4L génjének intronjával. Az intronok jelenléte e két génben a szakirodalom szerint ritka jelenség, közeli rokon fajok esetében nem hordoznak intront ezek a gének.

További kisebb méretbeli eltéréseket okoznak az intergénikus régiók kisebb eltérései, de ezek esetenként nem nagyobbak néhány tíz bázispárnál (pl. metionin – hisztidin tRNS gének közti intergénikus régió). A restrikciós hely polimorfizmust pedig az esetek nagy részében pontmutációk okozzák, illetve az intronokban jelenlevő hasítóhelyek felelősek az eltérésekért. Négy *A. niger* 1a és kilenc *A. tübingensis* 2b típusra specifikus restrikciós hely található genomokban, melyeket elsősorban pontmutációk okoznak.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a két mitokondriális genom nagymértékben hasonló, és főleg intronális eltérések felelősek a mtDNS-ek közti eltérésekért. Kíváncsiak voltunk rá, hogy a két genom miként hat egymásra, azért protoplasztfúziós technika segítségével mitokondrium átvitelt alkalmaztunk törzseink közt. A donorként a mitokondriálisan oligomycin rezisztens *A. niger* 1a típust alkalmaztuk, míg a recipiens az *A. tübingensis* 2b mtDNS típusú törzs volt. A fúzió után a recipiens sejtmagjára, és a donor rezisztens mitokondriumára szelektáltunk. Negyven regenerált utód átvizsgálásával hatféle rekombináns típust azonosítottunk, melyek előfordulási gyakorisága is eltért: B205: 37,5%, B212: 35%, B240: 10%, B203: 7,5%, B202: 5%, B227: 2,5%. A maradék 2,5%-ot a B201 jelű törzs képviseli, mely a recipiens magja mellett a donor változatlan mitokonriumát örökölte.

Elkészítettük az 1a→2b átvitelből származó hat különböző RFLP mintázatú mtDNS-t hordozó izolátum négy enzimes fizikai térképét, és meghatároztuk az egyes típusokat képviselő egy-egy törzs genomméretét: a B205 rekombinánsé 32,73 kb, a B212-é 33,04 kb, a B227-é 32,98 kb, a B202-é 32,92 kb, a B240-é 32,54 kb, míg a B203 rekombinánsé 32,60 kb. A törzsek minden esetben a donor mitokondriumát örökölték, mely a recipiens intronális szekvenciái által módosult. A 2b típusra jellemző mindhárom intron jelen volt az összes rekombináns törzsben, ami egybevág a szakirdalomi adatokkal (az intronok „homingja" szinte 100%-os esemény). Az intronok mozgása azonban beindított egy rekombinációs mechanizmust, amely kiterjedése a különböző típusú rekombináns törzsekben eltérő méretű volt. A *cox*1 génbeli eltéréseken kívül nyolc régiót azonosítottunk a fizikai térképek alapján, melyek jelenléte illetve hiánya eltért az utódokban. A B205 esetében az összes marker 1a-hoz, míg B240 esetében mind a nyolc marker 2b-hez hasonlított, vagyis ez mutatja a legnagyobb eltérést a donor mitokondriumához képest. Ez utóbbi esetben majdnem 14 kb-os részt érintett a *cox*1 gén mozgása által beindított rekombináció. Megállapíthatjuk tehát, hogy a rekombináns utódok kialakulásáért alapvetően a *cox*1 gén mobilis intronjai a felelősek.

Annak megállapítására, hogy az intronok mozgásának milyen szerepe van a környezetből izolálható fekete *Aspergillus*-okra elvégeztük számos *A. tübingensis* izolátum mtDNS polimorfizmus vizsgálatát. Az *A. tübingensis* faj mtDNS RFLP mintázatuk alapján hat csoportba osztható (2a-2f). A részletes mitokondriális genom vizsgálatokhoz minden mtDNS RFLP mintázatú típusból egy-egy törzset választottunk ki, és vettünk részletes analízis alá. A 2b törzs részletes térképe előző kísérleteinkből már a rendelkezésünkre állt, és ezt összehasonlítási alapul használtuk fel a többi eltérő mtDNS mintázattal rendelkező törzs térképezése során. A további öt mtDNS RFLP típusról elkészített fizikai térképek alapján a 2a, 2b, 2c, 2d, 2e és 2f törzsek mtDNS méretei 32,3; 33,1; 30,5; 32,1; 33,1 és 32,7 kb-nak bizonyultak. A hat *A. tübingensis* mtDNS típus génsorrendje azonos, a gének és intergénikus

régiók nagysága a legtöbb esetben megegyezik. Az előzőekben már ismertetett 2b típushoz képest a 2a, 2c, 2d és 2f típusokban a *cox*1 gén mérete különbségeket mutatott, amely az intronok számának eltérésére utal. Megállapítottuk, hogy a 2b típusra jellemző 1. intron csak a 2b, 2e és 2f típusoknál van jelen, a 2a, 2c és 2d típusokból hiányzik. A 2b típusra jellemző 2. intron a 2c kivételével minden típusban előfordul. A 2b típusra jellemző 3. intron szintén egy kivétellel (2f) minden típusban jelen van.

Elmondhatjuk tehát, hogy a variábilis RFLP mintázatok ellenére a hat eltérő típusú *A. tübingensis* mtDNS restrikciós és funkcionális térképek nagyon hasonlóak. Elsősorban introntartalombeli eltérés és néhány specifikus hasítási hely felelős a variábilis RFLP mintázat kialakulásáért. A 2c típusú mtDNS a legkisebb, és a 2f mutatja a legnagyobb eltérést a többi típustól. A 2b és 2e áll a legközelebbi kapcsolatban, mtDNS-ük felépítése szinte teljesen azonos, csak egy *Hae*III hasítóhelyben térnek el egymástól (*cob* gén előtti régióban egy C→T pontmutáció felelős a restrikciós mintázatbeli eltérésért).

Az *A. niger* fajaggragátum mellett a szintén a fekete *Aspergillus*-ok közé tartozó *A. japonicus* faj mtDNS polimorfizmusát vizsgáltuk. A protoplasztfúzióval létrehozott utódok mtDNS analízisét is elvégeztük. Az *A. japonicus* faj mtDNS RFLP alapján nyolc csoportra osztható. A mtDNS átvitelt a nyolc különböző RFLP mintázatú csoport között protoplasztfúzióval valósítottuk meg. A mitokondrium transzmisszió mindig egyirányú volt, és az átvitel során donorként minden esetben egy oligomycin rezisztenciát mitokondriálisan hordozó lizin auxotróf fehér konídiumszínű izolátum ($1287o^R$) szerepelt, mely a leggyakoribb mtDNS RFLP mintázatú 1. csoportba tartozik. A recipiensek a többi mtDNS RFLP osztályt reprezentálták, zömmel prototrófok és a szelekció céljából természetesen oligomycin szenzitívek voltak. A fúziók után a donor oligomycin rezisztens mitokondriumára, és a recipiens sejtmagjára szelektáltunk. A fúzió minden esetben sikeres volt, kivéve az 1→7 esetben. Ma már a 7. mtDNS csoportot képviselő izolátumok különálló fajnak (*Aspergillus*

aculeatus) tekinthetők. Ez volt az egyetlen csoport, ahol olyan nagyfokú az inkompatibilitás, hogy a protoplasztfúziós kísérletek nem adtak pozitív eredményt mitokondrium átvitel tekintetében.

A fúziót követően oligomycin rezisztens regenerált utódok mtDNS RFLP mintázatát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy rekombináns mtDNS profillal jellemezhető törzsek mellett nagy gyakorisággal szubsztitúciós utódok is izolálhatók. A mitokondrium helyettesítés az *A. niger* fajaggregátum izolátumai közötti mitokondrium transzmisszió során igen ritka, 1% alatti gyakoriságú eseménynek számított. Az *A. japonicus* 1→2, 1→6 és 1→8 mtDNS RFLP osztályok közötti mitokondrium átvitel utódainak 100%-a szubsztitúciós volt, az 1→4 mtDNS típusok közötti transzmisszió utódainak 100%-a valódi rekombinánsnak bizonyult. Az 1→3 és az 1→5 mtDNS RFLP csoportok közötti mitokondrium transzfer utódainak kisebb hányada rekombináns volt, nagyobb hányada azonban helyettesített donor RFLP-jű mitokondrium hordozónak bizonyult. Ez utóbbi két csoport részletes vizsgálatakor kiderült, hogy az mtDNS RFLP mintázata és az utódok fenotípusának eltérése közt összefüggés van, és ezek változása együtt járt a mtDNS átszerveződésével is. Alapvetően három fenotípust azonosítottunk: a regenerált utódok jelentős részére visszafogott konídiumképzése miatt világos telepszínt mutatott. Más utódok erőteljes konídiumképzést - a recipiensre jellemző fekete színben - mutattak, ezeket „feketéknek" neveztük el. Volt egy harmadik csoport, mely még mindig csökkent konídiumképzést mutatott, de a világosnál erőteljesebb volt; ezt a típust átmeneti formának neveztük el. A fúzió után először csak a „világosak" izolálhatók. Bizonyos esetben ezek szegregációra voltak hajlamosak, amely során világos fenotípus egyre jobban kezdett hasonlítani a vad fenotípus morfológiai sajátságaihoz (világosból képződtek átmeneti formára és a feketékre jellemző szektorok, de az átmeneti forma is képes volt átalakulni feketévé. Ez utóbbi típus nem alakult tovább, ezért végformának tekinthető). A

fenotípus összefüggésben volt az mtDNS RFLP mintázatával is. Minden világos szubsztitúciós mtDNS-sel rendelkezett. Az átmeneti formákra többféle rekombináns RFLP volt jellemző, míg a végforma szintén rekombináns volt, de csak egyféle RFLP mintázattal jellemezhető. Az utódok itt is a donor mitokondriumát örökölték elsődlegesen, mely fokozatosan alakult át intronvesztéssel a recipiensre jellemző mtDNS típussá. Feltételezésünk szerint ennek oka az, hogy a recipiens magja nem kompatibilis a donor jóval nagyobb mitokondriumával, és intronkivágódási problémák miatt fellépő mitokondriális funkcióhiány okozza a gyengébb növekedést és konídium képzést. Elméletünk alapja az volt, hogy a rekombináns típusok mitokondriuma egyre jobban a recipiensére kezdett hasonlítani, az eltérés a *cob*, de elsősorban a *cox*1 gént érintette: jelentős méretbeli csökkenést tapasztaltunk, ami intronok elvesztésére utal (ez a szakirodalom által igen ritka eseménynek számít, jelen esetben pedig jelentős számban fordult elő). Eredményeink nem igazolták ezt az elméletet, mert sikerült az intronmentes géneknek megfelelő méretű cDNS-t előállítanunk. Megállapíthatjuk tehát, hogy az *A. japonicus* izolátumaink esetében valamilyen, általunk nem ismert faktorok felelősek a mtDNS változásaiért.

Az elvégzett kísérleteink a természetben lejátszódó mitokondriális rekombináció jelenségének modellezésére szolgáltak. Az általunk megfigyelt rekombinációs események intron mozgáson alapulnak. Az eddigi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a mtDNS rekombináció folyamatának kiváltásában az intronok mozgásának kulcsszerepe van.

7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÁS (SUMMARY)

Section *Nigri* of the genus *Aspergillus* is one of the economically most important fungal taxa. This section includes several imperfect fungal species, and the *A. niger* species aggregate, which involves three black *Aspergillus* "species". Strains of the *Aspergillus niger* species aggregate exhibit high degree of molecular variability. They are divided into three main groups based on the mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) of the strains. MtDNA RFLP types 1, 2 and 3 exhibiting nuclear rDNA types I, II and III correspond to three different species, *A. niger, A. tubingensis* and *A. brasiliensis,* respectively. MtDNA types 1 and 2 consist of several subgroups (1a-1e and 2a-2f).

Physical and functional maps of *Aspergillus tubingensis* mtDNA type 2b were constructed and compared to *A. niger* type 1a mtDNA. The gene content and order, as well as the patterns of restriction sites, were similar. Both mtDNA genomes were sequenced completely. The sizes of the *A. niger* and *A. tübingensis* mtDNAs were 31103 bp and 33656 bp, respectively. The length differences were principally attributed to the altered intron content of their *cox*1, *atp*9 and *nad*4L genes. Length variability between mtDNAs of several filamentous fungi, like *Aspergillus nidulans, Podospora anserina, Neurospora crassa* and their relatives and the intraspecific mtDNA polymorphism of natural isolates of *Aspergillus carbonarius* was found to be due to the presence or absence of optional introns and intronic ORFs. It is well established that mitochondrial introns bearing ORFs are endowed with a mobile character, and their transfer may be accompanied by the concomitant modification of the adjacent exons. The mobile introns play a major role in the interaction of mitochondrial genomes, since their homing process generates rearranged mtDNAs by homologous recombination. Other studies on *P. anserina* and its closely related species demonstrated that

the ORFs themselves, either standing free or inserted in group I introns, have mobile capacity due to their endonuclease gene products (LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H or His-Cys box). For this reason we have focused our attention on the intronal differences of the strains. The *cox*1 gene in *A. niger* 1a consisted of 2728 nucleotides and contained a 1025 bp long LAGLIDADG type group I intron. The *cox*1 gene of *A. tubingensis* 2b contained 5058 nucleotides and possessed three LAGLIDADG type group I introns, with the lengths of 1148 bp, 1126 bp and 1084 bp, respectively. The positions of the introns were verified by preparing and sequencing the *cox*1 cDNA. The first intron of 2b mtDNA showed 94% sequence homology to the second intron of *cox*1 of *A. nidulans,* the second intron of 2b mtDNA proved identical to the *cox*1 intron of *A. niger* 1a and the third intron of *cox*1 in 2b mtDNA did not show homology to any known mitochondrial introns. The *cox*1 exonic sequences of mtDNAs 1a and 2b were nearly identical.

The *nad*4L gene of *A. niger* 1a consisted of 747 nucleotides and contained a 477 bp long intron. The *nad*4L gene in *A. tubingensis* 2b contained 270 nucleotides and the gene contains no intron. The *atp*9 gene of *A. tubingensis* 2b consisted of 544 nucleotides and contained a 329 bp long group I intron. The main part of the intron proved identical to the *nad*4L intron of *Neurospora crassa* and *Podospora anserina.* The *nad*4L gene in *A. niger* 1a is without any intron and consisted of 225 nucleotides. The intron of atp9 gene of *A. tubingensis* 2b and the intron of *nad*4L gene in *A. niger* are not mobile, because they do not have any ORF in their sequences.

The maps of these strains are very similar, with some remarkable differences. Four type 1a-specific restriction sites (which are not present in type 2b) were found and nine type 2b-specific restriction sites were detected. The presence or absence of these restriction sites originated from a point mutation in most cases, or they are situated in the introns (they are alterated in our strains).

The nearly 3-kb intergenic region between the *ndh*1 and *ndh*4 genes contained two *orf*s (*orf*1 and *orf*2) and a short section with several repeat elements. The *orf*1 (906 bp) and *orf*2 (741 bp) in *A. tubingensis* 2b were identical to those ones in *A. niger* 1a. The putative protein encoded by the *orf*1 showed 44% homology to the Endo.SceI endonuclease of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrion. The ORF2 showed 52% homology to a site-specific recombinase of the *Staphylococcus aureus*. The region of the repeat elements is located downstream of the *orf*s. Two groups of non-perfect tandem repeats were identified in 2b mtDNA: the first consisted of three subsequent repeats of a 29-bp element, and the second contained three subsequent repeats of a 39-bp element. The first group of tandem repeats was also present in 1a mtDNA and was almost identical to that in mtDNA type 2b. However, the second repeat group was absent; only a single 48-bp unit was observed showing recognizable identity to the 39-bp repeat unit of the 2b mtDNA.

Heterokaryon formation was found to be a very rare event, even between strains belonging to the same molecular polymorphic subgroup, except among black *Aspergillus* strains of isogenic origin. For this reason, mitochondrial transmissions were carried out by protoplast fusion. Six different recombinant mtDNA RFLP profiles were detected among forty analysed progenies recovered under selective conditions after the protoplast fusion of *A. niger* mtDNA type 1a and *A. tubingensis* mtDNA type 2b. The progenies were selected for the adenine auxotroph nuclei of *A. tubingensis* and the oligomycin resistant (oli^R) mitochondria of *A. niger*. Restriction maps of the six types of recombinant mtDNAs were constructed using four restriction enzymes. Representatives of each groups are labelled by isolation numbers of B205, B212, B203, B202, B240 and B227 their occurence frequency was 37.5%, 35%, 7.5%, 5%, 10% and 2.5%, respectively. The remaining 2.5% corresponded to a group represented by strain B201, which carried the unchanged mtDNA of the 1a parental strain, thus it was not classified as recombinant but substituted. The maps of recombinant progenies differed from

that of the parental strains and from each other. Certain restriction sites of recombinant mtDNAs were characteristic for the fusion partner 1a while others for 2b. The size of the recombinant mtDNAs was similar to that of mtDNA type 2b. Sequence analysis of the two intergenic regions, which were polymorphic between the 1a and 2b type mtDNAs (intergenic region downstream of *tRNA-Gly*, intergenic region between *tRNA-Met* and *-His*) revealed that all the six types of the progenies entirely identical to each other and to 1a regarding these regions. The *atp6* gene could serve as a third characteristic sequence marker, which of course in all progenies was identical to that of the 1a one, as all the strains were mitochondrial oligomycin resistant.

Using intron specific primers designed to intron-flanking exonic sequences of the three *cox*1 introns of mtDNA 2b, the intron content of the forty analysed progenies was monitored by PCR and the products were sequenced in the case of the six representative strains. In all cases the three *cox*1 introns with their flanking exon sequences were present and they were entirely identical to the *cox*1 sequence of mtDNA type 2b, regarding even those exonic nucleotides, which showed polymorphism between mtDNA 1a and mtDNA 2b. Detailed analysis of the six recombinant restriction maps revealed that presence/absence of restriction sites located between the end of the *cox*1 gene and the end of the *ndh*4 gene caused remarkable and systematic variations among the recombinant mtDNA types. The results show that intron homing-induced homologous recombination occurred at a high frequency during the mitochondrial transmission process. Only one progeny (2.5 %) out of forty carried the unchanged 1a type mtDNA, thus showing no recombination. The intron homing-induced homologous recombination was restricted to the *cox*1 region (37.5%, B205-like strains) in the majority of the recombinant progeny or a slightly more expanded one containing 1kb-long sequence downstream (35%, B212-like strains). Once initiated in the *cox*1 region, homologous recombination spread over the neighbouring mtDNA regions: the greater the

SZEGED

expansion of the recombination the lower the frequency of the corresponding recombinants recovered (4.4 kb, 7.5%, B203-like strains; 6.3 kb, 5%, B202-like strains; 14 kb, 10%, B240-like strains). On the basis of our results the expansion of the recombination was unidirectional: it spreads downstream of the *cox*1 region towards the *ndh*4 gene. A distinct group of recombinants (2.5%, B227-like strains) showed mosaic pattern of 1a- and 2b-specific sequences, suggesting that spontaneous homologous recombination (independent of the intron homing process) also occurred and contributed to the generation of the recombinant types, albeit at a very low frequency.

The results showed that recombinant mtDNAs of the progenies arose from homologous recombination between the two parental mtDNAs. All of the progenies contained the *A. tubingensis* specific *cox*1 gene with three introns suggesting that homing played essential role in the high frequency homologous recombination in this region.

In previous studies considerable inter- and intraspecific mtDNA polymorphisms were detected among black *Aspergilli*. *Aspergillus tubingensis* isolates proved to be highly variable, they could be divided into six groups (2a-2f) based on their mtDNA profiles. To study the reason of mtDNA variability, *Eco*RI-*Bgl*II restriction maps and partial functional maps of mtDNA types 2a, 2c, 2d, 2e and 2f were constructed and compared to that of mtDNA type 2b. Detailed mtDNA map of mtDNA type 2b had already been described previously.

The sizes of the six different *A. tubingensis* mitochondrial genomes were between 30.5 and 33.0 kb. The relative location of the restriction sites was similar although some of the restriction sites proved to be specific for certain mtDNA types. The gene content and the gene order were identical. The main reason of size differences could be attributed to different intron-content of their *cox*1 genes. The *cox*1 gene of mtDNA type 2b contained three group I introns and the size of the mtDNA was 33.1 kb. The mtDNA type 2e possessed three introns and its genome-size was 33.1 kb, too. The mtDNAs of these strains are almost identical, only

one *Hae*III restriction site difference was detected in the V5 fragment. Type 2c carried 30.5 kb mtDNA and only one intron was found in the *cox*1 gene. The *cox*1 of 2a, 2d and 2f contained two introns and their mtDNAs were 32.3, 32.1 and 32,7 kb respectively.

We also dealt with the characterisation of unstable mitochondrial recombinants of *A. japonicus*. The mitochondrial genomes of *A. japonicus* strains belonging to the imperfect black *Aspergilli* exhibit highly variable RFLP paterns (1-8). Transmissions of mitochondria were carried out between incompatible mitochondrial oli^R strain as donor (mtDNA type 1) and sensitive recipient strains carrying mtDNAs with different RFLP patterns (mtDNA types 2-8) by protoplast fusion. Fusion colonies were selected for oligomycin resistance and nuclear phenotype of the recipient partner. The transfer experiments resulted in oli^R progeny with recombinant and/or unchanged donor (substituted) mtDNA in each case of intraspecific combinations, but it failed when the closely related *A. aculeatus* (mtDNA type 7, earlier this strain belongs to *A. japonicus*) was the recipient partner.

The transmissions can be classified into three groups on the basis of characters of resistant progenies: progeny with recombinant type of mitochondria only (1→4); progeny with exclusively substituted mitochondria (1→2, 1→6, 1→8); both types of progenies, predominantly the substituted type can be recovered (1→3, 1→5). The first two cases can be interpreted on the basis of various communication ability between nuclear and extranuclear genomes originating from different strains representing different levels of incompatibility. Interpretation of the third variation was ambiguous. Therefore we followed the behaviour of primary fusion products from their early apperance in the repeated mitochondrial tansmission experiments. The colonies of 1→3 fusion recovered on selective media were subsequently subcultured either in the presence or absence of oligomycin. These cultures exhibit reduced

fitness, with decreased capacity of conidial formation, possibly because of the perplexed oxidative phosphorilation. All of these cultures carried substituted mtDNAs.

The oli^R fusion products are relatively stable, but during their subsequent cultivation a segregation process could be observed via a transient colony form (bearing several types of recombinant mtDNAs), finally resulted in morphologically stable oli^R strains with recovered fitness. These strains carry a single type of recmtDNA which differs from those observed in the transient forms. Strain development was found to be unidirectional.

With full knowledge of size differences and physical maps of the donor and recipient mitochondrial genomes and mtDNAs of the stabilised final form of progenies derived from the transmission it can be concluded that reorganisation of mtDNAs is accompanied by their size reduction. Which could be caused by intron loss. Our hypothesis was that the communication between donor mtDNA and recipient nuclear genome resulted in abnormal growth and differentiation capacity, probably due to the perplexed splicing in mitochondrion (especially the *cob* and *cox*1 genes). However, our results verify that intron splicing works efficiently in all types of the progenies, therefore other processes can cause the reduced fitness.

In conclusion, the progenies basically inherit the mtDNA of the resistant donor strain, which may remain unchanged or may be modified by the introns of the recipient mtDNA under selection pressure. MtDNA profiles of recombinant progeny are strongly influenced by the intron content of both parental mtDNAs. Both intron loss and acquisition play a role in the development of recombinant characters. These experiments elucidate the molecular events, which may take place in nature, and may partly be responsible for the high degree of variability of mitochondrial genomes in imperfect fungi.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G. és Cabanes, F.J. (1984) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2650-2652.

Ainsworth, A.M., Beeching, J.R., Broxholme, S.J., Hunt, B.A., Rayner, A.D.M. és Scad, P.T. (1992) Complex outcome of reciprocal exchange of nuclear DNA between two members of the basidiomycete genus *Stereum*. J. Gen. Microbiol. 138: 1147-1157

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. és Blackwell, M. (1996) Introductory mycology. John Wiley & Sons, New York.

Al-Musallam, A. (1980) Revision of the black *Aspergillus* species. PhD Thesis, State University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.

Anwar, M.M., Croft, J.H. és Dales, R.B. (1993) Analysis of heterokaryon incompatibility between heterokaryon-compatibility (h-c) groups R and GL provides evidence that at least eight het loci control somatic incompatibility in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 139: 1599-1603.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. és Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410

Baltimore, D. (1985) Retroviruses and retrotransposons: The role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. Cell 40: 481-482

Baptista-Ferreira, J.L.C., Economou, A. és Casselton, L.A. (1983) Mitochondrial genetics of *Coprinus*: recombination of mitochondrial genomes. Curr. Genet. 7: 405-407.

Barroso, G., Moulinier, T. és Labarere, J. (1992) Involvement of a large inverted repeated sequence in a recombinational rearrangement of the mitochondrial genome of the higher fungus *Agrocybe aegerita*. Curr. Genet. 22: 155-161.

Beagley, C.T., Okada, N.A. és Wolstenholme, D.R. (1996) Two mitochondrial group I introns in a metazoan, the sea anemone *Metridium senile*: One intron contains genes for subunits 1 and 3 of NADH dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5619-5623

Bendich, A.J., (1993) Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. Curr. Genet. 24 (4): 279-290

Benore-Parson, M. és Anderson, L. (1995) Purification of DNA fragments from lyofilised agarose gels. Nucl. Acid Res. 23: 4926-4927.

Berka, R.M., Dunn-Coleman, N. és Ward, M. (1992) Industrial enzymes from *Aspergillus* species, In *Aspergillus*. Biology and Industrial Applications. Bennett, J.W. és Klich., M.A. (szerk.), Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 155-202

Birky, C.W. (1983) Relaxed cellular and organelle heredity. Science 222: 468-475

Birky, C.W. (1994) Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws. J. Heredity 85: 355-365

Birky, C.W. (1978) Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. Ann. Rev. Genet. 12: 471-512.

Borkhardt, B. és Olson, L.W. (1983) Paternal inheritance of the mitochondrial DNA in interaspecific crosses of the aquatic fungus *Allomyces*. Curr. Genet. 7: 403-405.

Boynton, J.E., Harris, E.H., Burkhart, B.D., Lamerson, P.M. és Gillham N.W. (1987) Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 460-462

Brown, T.A., Waring, R.B., Scazzocchio, C. és Davies, R.W. (1985) *The Aspergillus nidulans* mitochondrial genome. Curr. Genet. 9: 113-117.

Brown, T.A., Ray, J.A., Waring R.B., Scazzocchio C. és Davies R.W. (1984) A mitochondrial reading frame which may code for a second form of ATPase subunit 9 in *Aspergillus nidulans*. Curr. Genet. 17: 489-492

Burger, G., Gray, M.W. és Lang B.F. (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. Trend. Genet. 19 (12): 709-716

Cabanes, F.J., Vensncio, A., Malé, G., Castellá, G., Serra, R., Perrone, G. és Kozakiewicz, Z. (2004) DNA characterization of a new species in *Aspergillus* section *Nigri*. Abstracts of Academy Colloquium Fungal Phylogenomics, Amsterdam: Centraalbureau vor Schimmelculturen.

Cech, T.R. (1990) Self-splicing of group I introns. Annu. Rev. Biochem. 59: 543-568

Chase, T.E., Ullrich R.C. (1990a) Genetic basis of biological species in *Heterobasidion annosum*. Mycologia 82: 67-72

Chase, T.E., Ullrich R.C. (1990b) Five genes determining intersterility in *Heterobasidion annosum*. Mycologia 82: 73-81

Coenen, A., Croft, J.H., Slokhort, M., Debets, F. és Hoescotra, R. (1996) Mitochondrial inherance in *Aspegillus nidulans*. Genet. Res. 67 (2): 93-100

Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D.S. és Elias, K.S. (1994) Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In The Genus *Aspergillus*, From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications. Powell, K.A., Renwick. A. és Peberdy, J.F. (szerk.), Plenum Press, New York, pp. 1-27.

Croft, J.H., Dales, R.B.G., Turner, G. és Earl, A. (1980) Intercpecific somatic hybridisation in *Aspegillus*. In Advances in protoplast research. Proceedings of the 5th International Protoplast Symposium. Ferenczy, L. és Farkas, G.L. (szerk). Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 85-92

Croft, J.H. (1987) Genetic variation and evolution in *Aspergillus*. In Evolutionary biology of the fungi. Rayner, A.D.M., Brasier, C.M. és Moore, D. (szerk.) Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 311-323

Croft, J.H. és Dales, R.B.G. (1984) Mycelial interactions and mitochondrial inheritance in *Aspergillus.* In The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium. Jennings, D.H. és Rayner, A.D.M. (szerk.) Cambridge University Press, Cambridge UK. pp. 433-450.

Cummings, D.J and Domenico, J.M. (1988) Sequence analysis of mitochondrial DNA from *Podospora anserina.* Pervasiveness of a class I intron in three separate genes. J. Mol. Biol. 204 (4): 815-839

Cummings, D.J., McNally, K.L., Domenico, J.M. és Matsuura, E.T. (1990) The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina.* Curr. Genet. 17: 375-402

Dales, R.B.G., Jadayel, D. és Croft, J.H. (1983) spontaneous recombination of mitochondrial genomes in interspecific somatic hybrids of *Aspergillus.* In Protoplasts 1983, 6th Int. Protoplast Symp. Basel. Poster Proc. Potrykus, I., Harms, C.T., Hinnen, A., Hütter, R., King, P.J. és Shillito, R.D. (szerk.), Birkhäuser Verlag Basel, Stuttgart, pp. 308-309.

Dales, R.B., Moorhouse, J. és Croft, J.H. (1993) Evidence for a multi-allelic heterokaryon incompatibility (het) locus detected by hybridization among three heterokaryon-compatibility (h-c) groups of *Aspergillus nidulans.* Heredity 70:537-43.

De Jonckheere, J.F. és Brown, S. (1994) Loss of the ORF in the SSUrDNA group I intron of one *Naegleria* lineage. Nucl. Acid Res. 22: 3925-3927

Derr, L.K., Strathern, J.N. és Garfinkel, D.J. (1991) RNA-mediated recombination in *S. cerevisiae.* Cell 67: 355-364.

Dujon, B. (1989) Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations - a review. Gene 82: 91-114.

Earl, A.J., Turner, G., Croft, J.H., Dales, R.B.G., Lazarus, C.M., Lünsdorf, H. és Küntzel, H. (1981) High frequency transfer of species specific mitochondrial DNA sequences between members of the *Aspergillaceae.* Curr. Genet. 3:221-228.

Economou, A., Zolan, M.E., Pukkila, P.J. és Casselton, L.A. (1986) Biased inheritance of optional DNA insertions following mitochondrial genome recombination in *Coprinus cinereus*. Heredity 57: 127.

Eskes, R., Yang, J., Lambowitz, A.M. é Perlman P.S. (1997) Mobility of yeast mitochondrial group II introns: engineering a new site specificity and retrohoming via full reverse splicing. Cell 88: 865-874

Esser, K. és Blaich, R. (1994) Heterogenic incompatibility in fungi. In: Mycota I. Esser, K. és Lemke, P.A. (szerk.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 211-232

Feagin, J.E. (2000) Mitochondrial genome diversity in parasites. Int. J. Parasitol. 30: 371-390

Freyer, R., Neckermann, K., Maier, R.M. és Kössel, H. (1995) Structural and functional analysis of plastid genomes from parasitic plants: loss of an intron within the genus *Cuscuta*. Curr. Genet. 27: 580-586

Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I. és Samson, R.A. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In Advences in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. Samson, R.A. és Pitt, J.I. (szerk.), Plenum Press, New York, pp. 55-62.

Gilbert, W. (1978) Why genes in pieces? Nature 271: 501.

Glass, N.L. és Kuldau, G.A. (1992) Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. Annu. Rev. Phytopathol. 30: 201-224

Grossman, L.I. és Hudspeth, M.E.S. (1985) Fungal mitochondrial genomes. In: Gene manipulation in fungi. Bennett, J.W. és Lasure, L.L. (szerk.) Academic Press, London, pp. 65-103.

Guo, H., Karberg, M., Long, M., Jones J.P., 3rd, Sullenger, B. és Lambowitz A.M. (2000) Group II introns designed to insert into therapeutichally relevant DNA target sites in human cells. Science 289: 452.457

Guo, H., Zimmerly, S., Perlman, P.S. és Lambowitz A.M. (1997) Group II intron dendonucleases use both RNA and protein subunits for recognition of specific sequences in double-standed DNA. EMBO J. 16: 6835-6848

Hamari, Zs., Kevei, F., Kovács, É., Varga, J., Kozakiewicz, Z. és Croft, J.H. (1997) Molecular and phenotypic characterisation of *Aspergillus japonicus* and *A. aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. Antonie van Leeuwenhoek 72: 337-347

Hamari, Zs., Pfeiffer, I., Ferenczy, L. és Kevei, F. (1999) Interpretation of variability of mitochondrial genomes in the species *Aspergillus carbonarius*. Ant. van Leeuwenhoek 75: 225-231.

Hamari, Zs., Juhász, Á., Gácser, A., Kucsera, J., Pfeiffer, I. és Kevei, F. (2001) Intron mobility results in rearrangement in mitochondrial DNAs of heterokaryon incompatible *Aspergillus japonicus* strains after protoplast fusion. Fungal Genet. Biol 33: 83-95

Hamari, Zs., Juhász, Á. és Kevei, F. (2002) Role of mobile introns in mitochondrial genome diversity of fungi – a mini review. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 49: 331-335

Hamari, Zs., Tóth, B., Beer, Zs., Gácser, A.,·Kucsera, J., Pfeiffer, I., Juhász, Á. és Kevei, F. (2003) Interpretation of intraspecific variability in mtDNAs of *Aspergillus niger* strains and their mtDNA rearrangement following mitochondrial transmissions. FEMS Microbiol. Letters 221:63-71

Hammans, S.R. (1994) Mitochondrial DNA-associated disease. In: From genotype to phenotype. Humphries, S.E. és Malcolm, S. (szerk.). BIOS Scientific Publishers, pp. 209-231.

Haugen, P., Simon, D.M. és Bhattacharya, D. (2005) The natural history of group I introns. Trend. Genet. 21 (2): 111-119

Hauswirth, W.W., Lim, L.O., Dujon, B. és Turner, G. (1987) Methods for studying the genetics of mitochondria. In Mitochondria. Darley-Usmar, V.M., Rickwood, D. és Wilson, M.T. (szerk.). IRL Press, Oxford, pp 171-244.

Hintz, W.E.A., Anderson, J.B. és Horgen, P.A. (1988) Nuclear migration and mitochondrial inheritance in the mushroom *Agaricus bitorquis*. Genetics 119: 35-41.

Huang, C.H. (1998) The human Rh50 glycoprotein gene. Structural organisation and associated splicing defect resulting in Rh(null) disease. J. Biol. Chem. 273: 2207-2213

Hudspeth, M.E.S. (1992) The fungal mitochondrial genome - A broader perspective. In Handbook of applied mycology Vol. 4: Fungal biotechnology. Arora, D.K., Elander, R. P. és Murekji, K.G. (szerk.). Marcel Dekker, Inc., New York. pp 213-242.

Jadeyel, D.M. (1986) Variation in the organization and structure of the mitochondrial DNA of species of *Aspergillus*. PhD Thesis, The University of Birmingham,. Birmingham, UK.

Jin, T. és Horgen, P.A. (1994) Uniparental mitochondrial transmission in the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4456-4460.

Juhász, Á., Láday, M., Gácser, A., Kucsera, J., Pfeiffer, I., Kevei, F. és Hamari, Zs. (2004) Mitochondrial DNA organisation of the mtDNA type 2b of *Aspergillus tubingensis* compared to the *Aspergillus niger* mtDNA type 1a. FEMS Microbiol. Letters 241: 119-126

Kawano, S., Takano, H. és Kuroiwa, T. (1995) Sexuality of mitochondria: fusion, recombination and plasmids. Int. Rev. Cytol. 161: 49-110

Kevei, F, és Peberdy, J.F. (1977) Interspecific hybridisation between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. J. Gen. Microbiol. 102: 255-262

Kevei, F. és Peberdy, J.F. (1984) Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the *Aspergillus* genus. J. Gen. Microbiol. 130: 2229-2236

Kevei, F., Tóth, B., Coenen, A., Hamari, Zs., Varga, J. és Croft, J.H. (1997) Recombination of mitochondrial DNAs following transmission of mitochondria among incompatible strains of black *Aspergilli*. Mol. Gen. Genet. 254: 379-388.

Kevei, F., Juhász, Á. és Hamari Zs. (2001) Interaction between mitochondria derived from incompatible black *Aspergillus* isolates. Acta Biol. Hung. 52: 201-210

Kleff, S., Kemper, B.és Sternglanz, R. (1992) Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. EMBO J. 11, 699-704.

Koll, F., Boulay, J., Belcour, L. és Carafa, Y.A. (1996) Contribution of ultra-short invasive elements to the evolution of the mitochondrial genome in the genus *Podospora*. Nucleic Acids Res. 24: 1734-1741.

Kovalenko, S.A., Tanaka M., Ozawa T. (1994) Simple methods for preparation of plasmid DNA yielding long and accurate sequence data. Nucl. Acid Res. 22: 5771-5772

Kusters-van Someren, M.A., Samson, R.A. és Visser, J. (1991) The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. Curr. Genet. 19: 21-26.

Lambowitz, A.M. és Belfort, M. (1993) Introns as mobile elements. Annu. Rev. Biochem. 62: 587-622

Lambowitz, A.M. és Zimmerly, S. (2004) Mobile Group II introns. Annu. Rev. Genet. 38:1-35

Lazarus, C.M., Earl, A.J., Turner, G. és Kuntzel, H. (1980) Amplification of a mitochondrial DNA sequence in the cytoplasmically inherited "ragged" mutant of *Aspergillus amstelodami*. Eur. J. Biochem. 106: 633-641.

Leach, J., Finkelstein, D.B. és Rambosek, J.A. (1986) Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. Fungal Genet. Newslett. 33: 32-33

Leslie, J.F. (1993) Fungal vegetativ compatibility. Ann. Rev. Phytopathol. 31: 127-150.

Luo, X. (1995) Cloning and characterisation of three *Aspergillus niger* promoters. Gene 163 (1): 127-131

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

Mannella, C.A., Pittenger, T.H. és Lambowitz, A.M. (1979) Transmission of mitochondrial deoxyribonucleic acid in *Neurospora crassa* sexual crosses. J. Bacteriol. 137: 1449-1451.

Matsumoto, T. és Fukumasa-Nakai, Y. (1996) Mitochondrial DNA inheritance in sexual crosses of *Pleurotus ostreatus*. Curr. Genet. 30: 549-552.

May, G. és Taylor, J.W. (1988) Patterns of mating and mitochondrial DNA inherance in the aaric basidiomycete *Coprinus cinereus*. Genetics 118:213-220

May, G. és Taylor, J.W. (1989) Independent transfer of mitochondrial plasmids in *Neurospora crassa.* Nature 339: 320-322

Mitchell, M.B. és Mitchell, H.K. (1952) A case of maternal inheritance in *Neurospora crassa.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38: 442-449.

Moran, J.V., Mecklenburg, K.L., Sass, P., Belcher, S.M., Mahnke, D., Lewin, A. és Perlman, P. (1994) Splicing defective mutants of the *COXI* gene of yeast mitochondrial DNA: initial definition of the maturase domain of the group II intron AI2. Nucl. Acid Res. 22: 2057-2064

Nosek, J., Tomaska, L., Fukuhara, H., Suyama, Y. és Kovac, L. (2003) Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. Trend. Genet. 19 (12): 706-716

Osman, K.E. (1987) Genetic and molecular studies of *Aspergillus*. PhD Thesis, The University of Birmingham, Birmingham, UK.

Pearson, W.R. és Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448.

Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D. és Bufton, A.W.J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5: 141-238

Raper, K.B. és Fennell, D.I. (1965) The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Company, Baltimore.

Reed, K.C. és Mann, D.A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucl. Acids Res. 13: 7207-7221.

Ridder, R., Künkele, K.P. és Osiewacz, H.D. (1991) Sequence of the nuclear ATP synthase subunit 9 gene of *Podospora anserina*: lack of similarity to the mitochondrial genome. Curr. Genet. 20: 349-351

Roehr, M., Kubicek, C.P. és Kominek, J. (1992) Industrial acids and other small molecules. In *Aspergillus*. Biology and Industrial Applications. Bennett, J.W. és Klich., M.A. (szerk.). Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 91-131.

Rowlands, R.T. és Turner, G. (1974) Recombination between extranuclear genes conferring oligomycin resistance and cold sensitivity in *Aspergillus nidulans*. Mol Gen Genet 133: 151-161.

Rowlands, R.T. és Turner, G. (1975) Three-marker extranuclear mitochondrial crosses in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 141: 69-79.

Rowlands, R.T. és Turner, G. (1976) Material inherance of extranuclear mitochondrial markers in Aspergillus nidulans. Genet. Res. 28 (3): 281-290

Sambrook, J., Fritsch, E.F. és Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M. és Frisvad, J.C. (2000) New ochratoxin or sclerotium producting species in *Aspergillus* section *Nigri*. Stud. Mycol. 50: 45-61

Sellem, C.H., Carafa, Y.A., Rossignol, M. és Belcour, L. (1996) Mitochondrial intronic open reading frames in *Podospora*: Mobility and consecutive exonic sequence variations. Genetics 143: 777-788.

Smith, J.E. és Pateman, J.A. (eds), (1977) Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Acad. Press. London

Smith, M.L., Duchesne, L.C., Bruhn, J.N. és Anderson, J.B. (1990) Mitochondrial genetics in natural populations of the plant pathogen *Armillaria*. Genetics 126: 575-585

Smyth, I., Wicking, C., Wainwright, B. és Chenevix-Trench, G. (1998) The effects of splice site mutations in patients with naevoid basal cell carcinoma syndrome. Hum. Genet. 102: 598-601

Specht, C.A., Novotny, C.P. és Ullrich, R.C. (1992) Mitochondrial DNA of *Schizophyllum commune*: restriction map, genetic map, and mode of inheritance. Curr. Genet. 22: 129-134

Strausberg, R.L. és Perlman, P.S. (1978) The effect of zygotic bud position on the transmission of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 163: 131-144.

Te Biesebeke, R., Levin, A., Satg, C., Bartels, J., Goosen, T., Ram, A., van der Hondel, C. és Punt, P. (2005) Identification of growth phenotype-related genes in Aspergillus oryzae by heterologous macroarray and suppression subtractive hybridization. Mol. Genet. Genomics 273 (1): 33-42

Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E. és Kevei, F. (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. Mycopathologia 134: 171-176.

Thomas, D.Y. és Wilkie, D. (1968) Recombination of mitochondrial drug-resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: 368-372.

Tóth, B., Hamari, Zs., Barna, R., Varga, J., Kevei, F. (1997) Phenotypic and molecular charcterization of black wild type *Aspergillus* isolates. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44: 72

Tóth, B., Hamari, Zs., Ferenczy, L., Varga, J. és Kevei, F. (1998) Recombination of mitochondrial DNA without selection pressure among compatible strains of the *Aspergillus niger* species aggregate. Curr. Genet. 33: 199-205.

Turcq, B., Denayrolles, M. és Bégueret, J. (1990) Isolation of two allelic incompatibility genes *s* and *S* of the fungus *Podospora anserina*. Curr. Genet. 17: 297-303

Turner, G., Earl, A.J. és Greaves, D.R. (1982) Interspecies variation and recombination of mitochondrial DNA in the *Aspergillus nidulans* species group and the selection of species specific sequences by nuclear background. In Mitochondrial Genes. Slonimski, P., Borst, P. és Attardi, G. (szerk.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 411-414.

van Gorcom, R.F.M, Punt, P.J. és van den Hondel, C.A.M.J.J. (1994) Heterologous gene expression in *Aspergillus,* In The genus *Aspergillus*. Powell, K. A., Renwick, A. és Peberdy, J.F. (szerk.) Plenum Press, New York, pp. 241-250.

Varga, J., Kevei, F., Fekete, Cs., Coenen, A., Kozakiewicz, Z. és Croft, J.H. (1993) Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. Mycol Res 97: 1207-1212.

Varga, J., Kevei, F., Vriesema, A., Debets, F., Kozakiewicz, Z. és Croft, J.H. (1994) Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. Can. J. Microbiol. 40: 612-621.

Wallace, R.S. és Cota, J.H. (1996) An intron loss in the chloroplast gene *rpo*C1 supports a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae. Curr. Genet. 29: 275-281

Webster, J. (1986) Introduction to fungi. Cambridge University Press, Cambridge.

Whittaker, S.L., Assinder, S.J. és Shaw, D.S. (1992) Inheritance of mitochondrial DNA in *Phytophthora infestans*. Phytophthora Newlett. 18: 2-3.

Whittaker, S.L., Assinder, S.J. és Shaw, D.S. (1994) Inheritance of mitochondrial DNA in *Phytophthora infestans*. Mycol. Res. 98: 569-575.

Wicklow, D.T., Dowd, P.F. és Gloer, J.B. (1994) Antiinsectan effetcs of *Aspergillus* metabolites. In The genus *Aspergillus*. Powell, K. A., Renwick, A. és Peberdy, J.F. (szerk.) Plenum Press, New York, pp 93-114.

Yang, X. és Griffiths, J.F. (1993) Male transmission of linear plasmids and mitochondrial DNA in the fungus *Neurospora*. Genetics 134: 1055-1062

Yu, T.S., Yeo, S.H. és Kim, H.S. (2004) A new species of Hyphomycetes, *Aspergillus coreanus* sp. nov. isolated from traditional Korean Nuruk. J. Microbiol. Biotechnol. 14: 182-187

Zhong, J., Karlberg, M. és Lambowitz, A.M. (2003) Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targeton) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. Nucleic Acids Res. 31: 1656-1664

Zweifel, S.G. és Fangman, W.L. (1991) A nuclear mutation reversing a biased transmission of yeast mitochondrial DNA. Genetics 128: 241-249.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kevei Ferencnek, hogy szakdolgozó korom óta megosztotta velem e témához fűződő rendkívül széles elméleti ismeretét és gyakorlati tapasztalatát és minden segítséget megadott munkám sikeres elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Hamari Zsuzsannának, aki bevezetett a molekuláris technikák rejtelmeibe hasznos tanácsaiért, önzetlen segítségéért. Köszönetet mondok Dr. Pfeiffer Ilonának, aki végtelen nyugalommal és türelemmel viseltetett irántam, akivel gyakran hosszan gondolkodtunk egy-egy probléma megoldásán.

Köszönet illeti munkatársaimat, különösképp a 302-es labor dolgozóit, akik az általuk kialakított segítőkész, baráti légkör kialakításával nagyban hozzájárultak munkám elvégzéséhez.

Köszönetemet fejezem ki Kovácsné Deák Juditnak és Nagy Lajos Gergelynek munkám során nyújtott technikai segítségét, valamint Palágyi Andrásnénak és Kreisch Istvánnénak, hogy munkámmal kapcsolatos hivatalos ügyeket elrendezték.