B 2216

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

KÜLÖNBÖZŐ SZINTŰ HETEROZIGÓTA ÁLLAPOTOK LÉTREHOZÁSA ASPERGILLUS NIDULANSBAN PROTOPLASZT FUZIÓVAL

Joó Ernő

Készült
a szegedi József Attila Tudományegyetem
Mikrobiológiai Tanszékén

1983.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés, Irodalmi áttekintés..... 1. oldal

Anyagok és módszerek..... 15. oldal

A lizin igény mutáció kromoszómális elhelyezkedésének vizsgálata a 1157 jelü Aspergillus nidulans törzsben. Stabil aneuploid törzsek megjelenésének kimutatása diploid, heterozigóta Aspergillus nidulans törzsek benomiles kezelése után..... 38. oldal

Átmeneti poliploidok létrehozása haploid Aspergillus nidulans mutánsokból..... 55. oldal

Protoplaszt fuzió az egyik partner hő-inaktiválásával..... 66. oldal

Irodalomjegyzék..... 77. oldal

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Munkámban az Aspergillus nidulans penészgombát használtam kisérleti objektumként. Az eredmények értelmezéséhez röviden ismertetem ennek az organizmusnak a legfontosabb jellemzőit.

Rendszertani besorolása a következő:

XI. Ph. Mycophyta /Valódi gombák/
3. Cl. Ascomycetes /Tömlős gombák/
3. O. Plectascales
1. F. Aspergillaceae /Kannapenész/
Aspergillus nidulans csoport
sp. Aspergillus nidulans

Az Aspergillus nidulans a természetben gyakran előforduló, penész külsejü szaprofiton szervezet. Néha emberi mikózist /tüdő/ is okozhat, ez azonban szerencsére ritka betegség. Iparilag bizonyos törzsekből cellulózbontó enzimet állitanak elő.

Vegetativ micéliumának hifái keresztfalakkal osztottak, és erősen elágazók. A keresztfalakon egyszerü pórus látható /6. ábra/.

A sejtfal elektronmikroszkóp alatt nem mutat lemezes felépitést. Kémiailag kitinből és glükánból áll. Jellemző a tömlős gombákra, hogy nem β-1,4 poliglukóz /cellulóz/ van jelen, hanem főleg β-1,3 és β-1,6 kötésü, néha α-1,3 és α-1,4 kötésü is lehet. Kis mennyiségben D mannóz, D galaktóz, D galaktóz-amin is előfordul, de D xilóz és D fruktóz nem.

Az Aspergillusok morfológiai felépitését Czapek-Dox féle táptalajon szokják megadni, mert a különböző táptalajokon nagyon nagy eltérések mutatkoznak a morfológiában.

A telep eleinte fehér, majd megjelenik a konidiumok sötétzöld szine. Előállitottak a konidiumok szinképzésében sérült sárga, fehér, barna, "chart" /világos zöld/ mutánsokat is, ezek értelem szerüen a megfelelő szinü telepeket adják /4/.

A konidium tartó sima falu, felső részén sárgásbarna szinü, 60-130 µm hosszu. A végén gömb alaku vezikulum látható, átmérője 8-10 µm. A sterigmák a tér minden irányában állnak, két sorosak /elsődleges és másodlagos sterigmák/. A konidiumok sorban füződnek le a sterigmák végén, a vad tipus esetén sötétzöldek, érdes gömbök, átmérőjük 3-5 µm. A konidium fej /vezikulum+sterigmák+konidiumok/ rövid oszlop alaku, 40-80 x 25-40 µm méretü.

A bioszintetikus folyamatok mechanizmusában egy érdekes jellemző található, nevezetesen az, hogy a lizin bioszintézise nem a 2,6-diamino-pimelinsav uton, hanem a 2-amino-adipinsav uton játszódik le.

Az Aspergillus nidulans ivaros szaporodása ismert, de vannak olyan törzsek is, ahol nagyon nehezen vagy egyáltalán nem indukálható az ivaros folyamat /31/.

A faj homotallikus, nemzedék-váltakozásának menete az 5. ábrán látható. A peritéciumokat jellegzetes hifákból álló álszövet veszi körül, az un. "Hülle-sejtek". A termőtest gömbölyded, zárt kleisztotécium, átmérője 100-175 µm. A termőtestek szabálytalanul helyezkednek el a védő hifák /peridium/ által közrezárt micélium kötegben. A bennük szintén szabálytalanul elhelyezkedő 8-8 db haploid aszkospóra sima falu, az ekvatoriális barázda szélén két taraj látható, mely ép szélü, keresztben rovátkás, 0,5-1,8 µm széles. Az aszkospórák biborvörösek.

A gombákban, igy az Aspergillus nidulansban is, a vegetativ szaporodás /sejtosztódás/ különös módon, az un. gomba mitózissal történik. A centroszóma nem a citoplazmában, hanem a sejtmagburokban található, igy osztódáskor a magburok nem oldódik fel, a huzófonalak a sejtmagon belül alakulnak ki.

Az öröklődő sajátságok rekombinációjára egyes gombáknál, igy az Aspergillus nidulansnál, szabályos ivari folyamat hiányában is nyilik lehetőség /1,27/.

A paraszexualitás során két haploid egyed fonalai között vegetativ anasztomózis történik, ezzel heterokarion interszeptum jön létre. A heterokarionban a kariogámia is fellép, és a létrejött diploid sejtmag a haploidokkal együtt szaporodik az uj interszeptumok képződése során. A genetikai rekombinációra a diploid magok mitózisai során történő crossing-overekkel nyilik lehetőség. A szegregáció pedig a diploid magok időnként fellépő haploidizációja révén valósul meg /32,33,34/.

Jellemző a paraszexualitásra, hogy az egyes fázisok hossza /szemben a normál ivari folyamatéval/ szabálytalan és az egyed fonálzatán belül a különböző fázisok párhuzamosan is előfordulhatnak. Annyi szabályszerüség mégis van a folyamatban, hogy olyan fajnál, mely normális ivari folyamatra is képes, a kétféle géntérképezés azonos eredményt ad /31,32/.

Az irodalomban viszonylag részletes géntérkép található az Aspergillus nidulans genomjáról, ez látható a 4. ábrán /27/.

A lókuszok a Clutterbuck által javasolt jelölésrendszerrel vannak feltüntetve, a centromeront —o— jelöli /5/.

Nemcsak a gombák, de általában a mikroorganizmusok protoplasztjainak fuziójáról nagyon sok közlemény lelhető fel az irodalomban.

Auxotróf Gram-pozitiv baktérium mutánsok vagy antibiotikum rezisztens mutánsok protoplasztjainak fuziójával több esetben sikerült rekombináns utódokat előállitani /Bacillus megatérium, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Streptococcus lactis, Bacillus thuringiensis/ /12,20/.

Beszámoltak Gram-negativ baktériumok szferoplasztjainak fuziójával nyert komplementációról és rekombináns utódok észleléséről is /Escherichia coli, Providencia alcalifaciens/ /12,28/.

Az antibiotikumok termelésében rendkivül jelentős Actinomycetales csoport számos fajával végeztek fuziós kisérleteket eredményesen. Különösen jelentős Hopwood és munkatársai a Streptomyces coelicolorral végzett munkája, de számos más Streptomyces és Micromonospora fajról is jelentek meg közlemények /12,22/.

Az eukarióta mikroorganizmusok közül a fonalas gombák, az élesztők és az algák egyaránt alkalmasak fuziós vizsgálatokra. Megfelelő enzimes kezeléssel, esetleg kémiai előkészités után protoplasztok nyerhetők belőlük, ezek ozmotikusan stabilizált közegben fuzionáltathatók, regenerációra késztethetők. A fuziós termékek közül heterokarion és diploid is izolálható. A gének komplementációja, a tulajdonságok rekombinációja megfigyelhető /11,14,15, 16,17/.

Eredményes fuzió végezhető különböző fajhoz tartozó organizmusok között /pl: Aspergillus nidulans x Aspergillus fumigatus, Penicillium roqueforti x Penicillium chrysogenum, Aspergillus nidulans x Aspergillus rugulósus, Penicillium chrysogenum x Penicillium notatum, Kluyveromyces lactis x Kluyveromyces fragilis/.

Mitokondriumok, kloroplasztok és virusok protoplaszt fuzió segitségével végzett transzfuziójáról is jelentek meg beszámolók /18/.

Bacillus megatérium protoplasztokkal ugy végeztek fuziót, hogy 50 C-on 120 percig hőkezelték az egyik partnert. A hőkezelés hatására a protoplasztok elvesztették regenerációs képességüket, de ha nem hőkezelt protoplasztokkal fuzionáltatták őket, a fuziós termékben a hőkezelt partner genetikai anyaga is kifejeződésre jutott /20/.

Kisérleteimben alapvető szerepet játszott a benomil, és az utóbbi 15 évben számos benzimidazol származék került gyakorlati felhasználásra is. Alkalmazzák őket mint széles spektrumu fungicidet /benomil, fuberidazole, thiabendazole/, mint nematocidet /fenbendazole, mebendazole, parbendazole, thiabendazole/, sőt antitumor gyógyszer is van közöttük /oncodazole/.

József Attila Tudományegyetem Könyvtár SZEGED

Kimutatták, hogy kismértékü ovocid hatással is rendelkeznek, azaz elpusztitják a rovarok és atkák tojásait.

A fentebb emlitett vegyületek kereskedelmi elnevezése, szerkezeti képlete, valamint pontos kémiai elnevezése az 1,2,3, ábrákon látható /37/.

A benomil /benlate, fundazol, methyl 1-/butylcarbamoyl/-2-benzimidazolyl-carbamate/ nukleofil támadás vagy UV-besugárzás hatására elbomlik, MBC /methyl 2-benzimidazolecarbamate, benzimidazolecarbamate methyl ester, carbendazim/ keletkezik belőle, mely az eddigi vizsgálatok szerint a gombaölő hatásért felelős alapvegyület. Vizes oldatban a benomil szintén elbomlik, MBC és butylisocyanate keletkezik belőle /7,36/.

A benomil akut toxicitására jellemző LD 50 érték szájon át /per os/ adagolva, patkányon mérve: 9,5 g/kg.

Hasonlóan alacsony toxicitást mutatott a benomil más emlős állatokban is: egérben, nyulban, juhban. Az alacsony toxicitás a vegyület nagyon gyors metabolizmusának és hidroxilált alakban való kiválasztódásának köszönhető.

Érdekes különbséget találtak a különböző benzimidazol vegyületek között, ha intraperitoneális vagy per os adagolás után vizsgálták az állatok szérumának citotoxicitását /host-mediated assay/. Intraperitoneális adagolásban az MBC, a benomil és a PP010 /methylbenzothiadiazine/ hasonló mértékü toxicitást mutatott. Per os adagolva azonban a benomil kezelés 10-szeresen alacsonyabb értéket adott, mint a többi. A jelenség magyarázata valószinüleg abban rejlik, hogy az MBC az a degradációs termék, amely felelős a PP010 és a benomil citotoxikus hatásáért is. A különböző adagolási mód esetén eltérő az egyes vegyületek stabilitása, adszorbciójának mértéke, vagy metabolizmusa /37/.

Eukariótákban a benomil befolyásolja a ploiditást. Kappas és munkatársai beszámoltak arról, hogy a benomil és az MBC erősen növeli a diploid és a részlegesen haploid szegregánsok számát egy diploid Aspergillus nidulans törzsben.

A legfontosabb hatásnak szerintük a non-disjunctió kiváltása tekinthető, de a mitotikus crossing-overek gyakoriságának kismértékü növekedését is megfigyelték /23, 24,25/.

A benomil haploidizáló hatásának mechanizmusa viszonylag részletesen ismert. Több cikk jelent meg arról, hogy bizonyitották a mitózis huzófonalainak kialakitásában szerepet játszó tubulinnal való kapcsolódását /9/. Benomilra rezisztens Aspergillus nidulans törzsekből a szenzitiv törzsekétől eltérő felépitésü tubulin volt izolálható. Ez a változás felelős lehet a benomil rezisztencia kialakulásáért /8/.

Allium cepa /vöröshagyma/ gyökér sejtjeiben 96 és 48 ppm benomilt tartalmazó oldatban való 15 órás kezelés után, a kromoszóma rendellenességek gyakoriságának növekedését figyelték meg. A sejteket a prometafázisban és a metafázisban befolyásolja a benomil. Már 12 ppm benomil koncentráció fragmentációt indukál.

Beszámoltak arról is, hogy a benomilt és az MBC-t mutagén hatásra tesztelve, Salmonella his G 46 és TA 1530 törzseken mutagénnek találták, de nem bizonyult mutagénnek a TA 1531, TA 1532, TA 1534 Salmonella törzseken /35/.

A benzimidazol származékok mutagén hatásának mechanizmusára született egy érdekes elképzelés, mely szerint uj tipusu bázis-analóg mutagénekként viselkednének. Ez a feltevés még további megerősitésre szorul a szerzők saját véleménye szerint is /25/.

Torchinsky vizsgálatai alapján tudjuk, hogy a benomilnak teratogén és embriotoxikus hatása is kimutatható patkányokon. A nőstény állatokat a párosodás előtt egy hónapig, majd a terhesség alatt is benomillal kezelték. A benomil hatására növekedett a spontán postimplantációs elhalálozása az embrióknak, és a torzok aránya is.

Styles és Garner közölte, hogy a benomil és az MBC citotoxikusnak bizonyult, amikor megvizsgálták specifi-

kus kórokozóktól mentes törzsü patkányokon és különböző emlős sejtvonalakon /felnőtt ember máj, HeLa, egér kötőszövet, sziriai hörcsög vese, Kinai hörcsög tüdő/. Megfigyelték, hogy a hatás a mitózis megállitására, illetve késleltetésére és kis gyakoriságu kromoszóma károsodások létrehozására irányul.

Szövetkulturákon végzett vizsgálatokból tudjuk azt is, hogy a benomil és az MBC 10^{-2}-10^{-3} M koncentrációban pyknózist vált ki. A sejtek magvainak anyaga homogén, erősen festődő tömeggé alakul hatására, mely a sejtelhalás egyik jele. 10^{-5} M feletti benomil koncentráció megállitja a sejtosztódást a metafázisban, növeli a pyknotikus magok számát és növeli a morfológiailag abnormális magok számát.

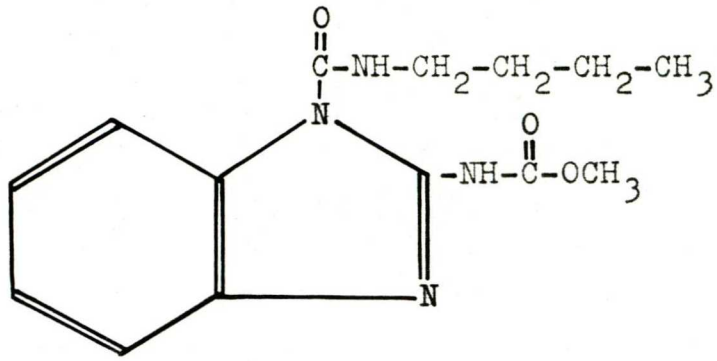
Orvosok megfigyelték, hogy a benomil a vele tartósan érintkezőkön kétoldali konjunktivitist /kötőhártya gyulladás / és kontakt dermatitist /bőr gyulladás/ okozhat. A kórfolyamatban az immun rendszernek fontos szerepe van, allergia elleni gyógyszerekkel a tünetek mérsékelhetők. Valószinü tehát, hogy ezek az anyagok hapténként viselkednek.

Käfer és Upshall rendkivül érdekes megfigyelést közöltek aneuploid Aspergillus nidulans törzsekről. Morfológiai különbségeket találtak, ha egy kromoszómára monoszómiás, diszómiás vagy triszómiás törzs telepeit hasonlitották össze /26/.

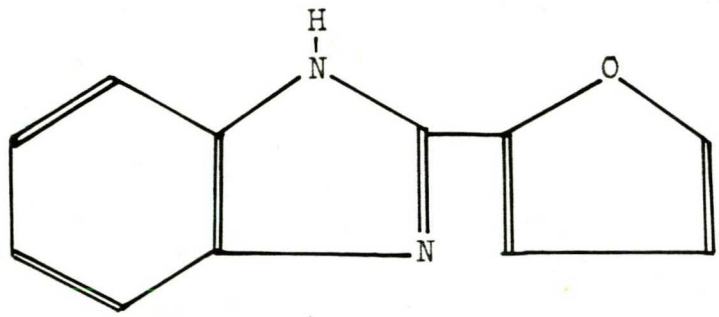
Az eddig ismertetett irodalmi adatok felhasználásával terveztem meg vizsgálataimat a következő témakörökben:

- A lys^- mutáció kromoszómális elhelyezkedésének vizsgálata a 1157 jelü Aspergillus nidulans törzsben.
- Stabil aneuploid törzsek megjelenésének kimutatása diploid heterozigóta Aspergillus nidulans törzsek benomil kezelése után.
- Átmeneti poliploidok létrehozása haploid Aspergillus nidulans mutánsokból.
- Protoplaszt fuzió az egyik partner hő-inaktiválásával.

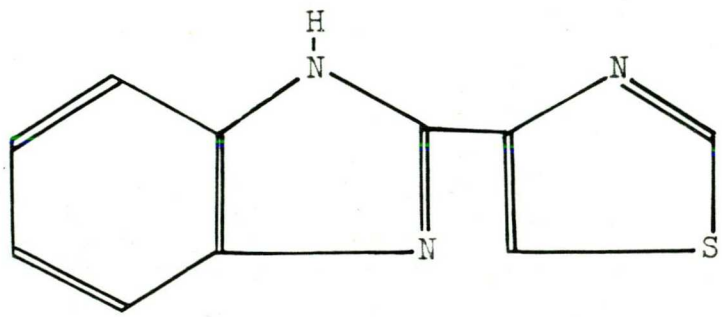
1. ábra. Benzimidazol származékok



benomil /fundazol/
methyl 1-/butylcarbamoyl/ benzimidazol-2-yl carbamate

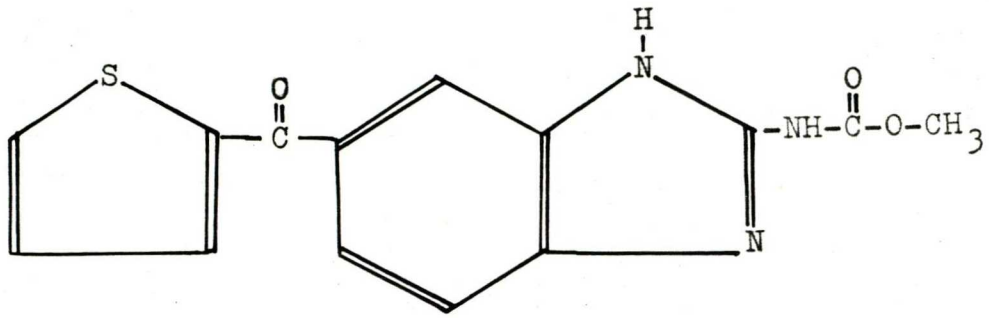


fuberidazole
2-/2'-furyl/ benzimidazole

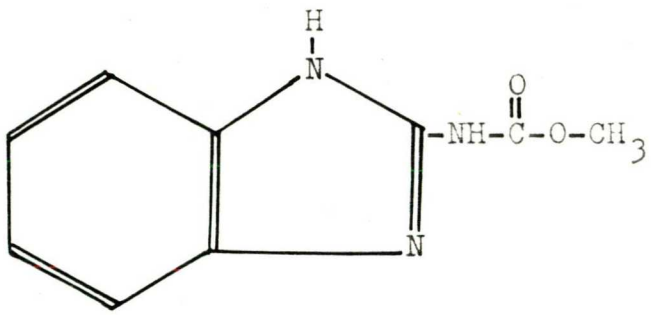


thiabendazole
2-/4'-thiazolyl/ benzimidazole

2. ábra. Benzimidazol származékok

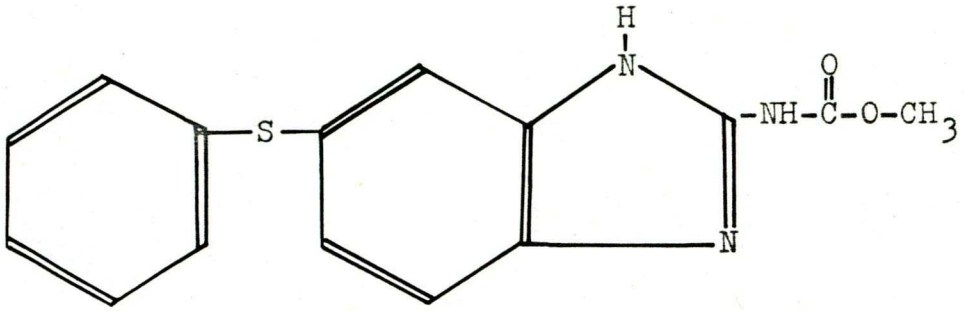


oncodazole /R 17934/
methyl 5-/2-thienyl-carbonyl/ benzimidazol-2-yl carbamate

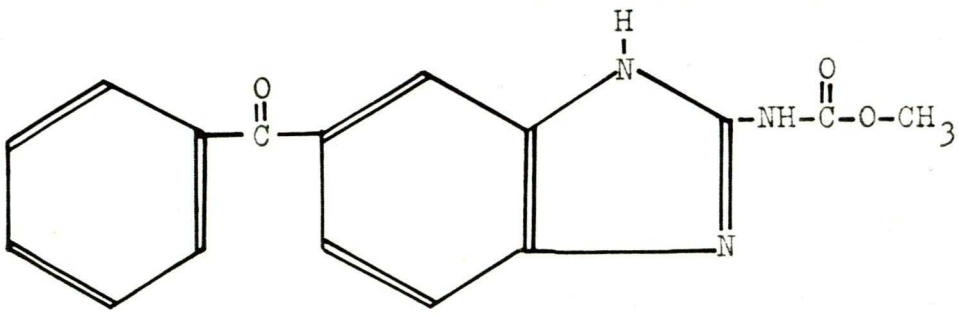


carbendazim /MBC/
methyl benzimidazol-2-yl carbamate

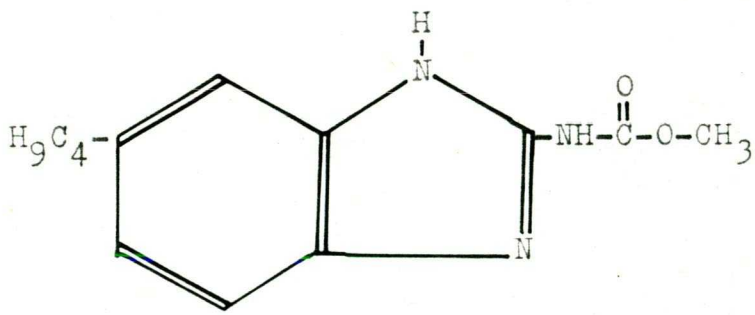
3. ábra. Benzimidazol származékok



fenbendazole
methyl 5-phenylthiobenzimidazol-2yl carbamate

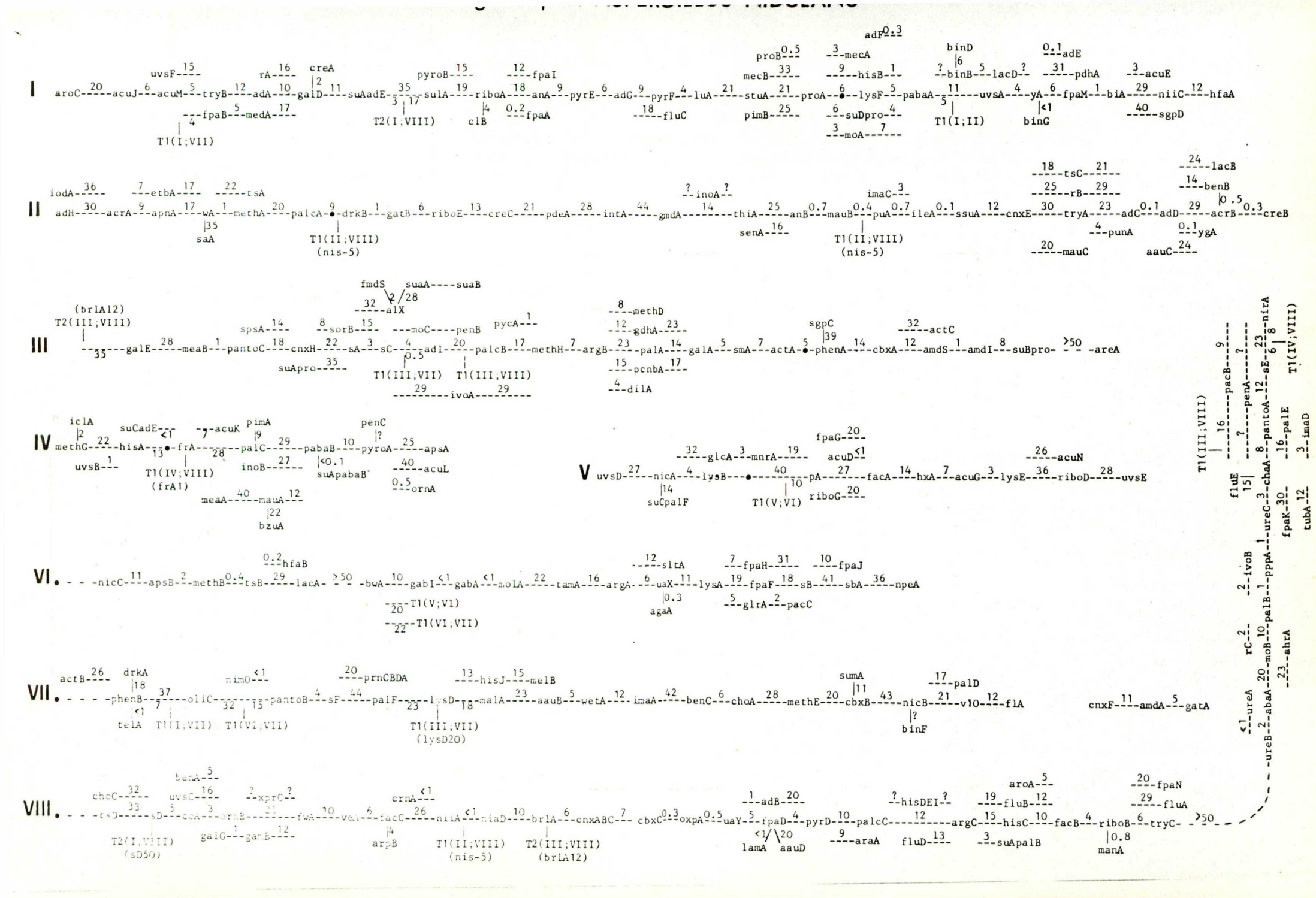


mebendazole
methyl 5-benzoylbenzimidazol-2-yl carbamate



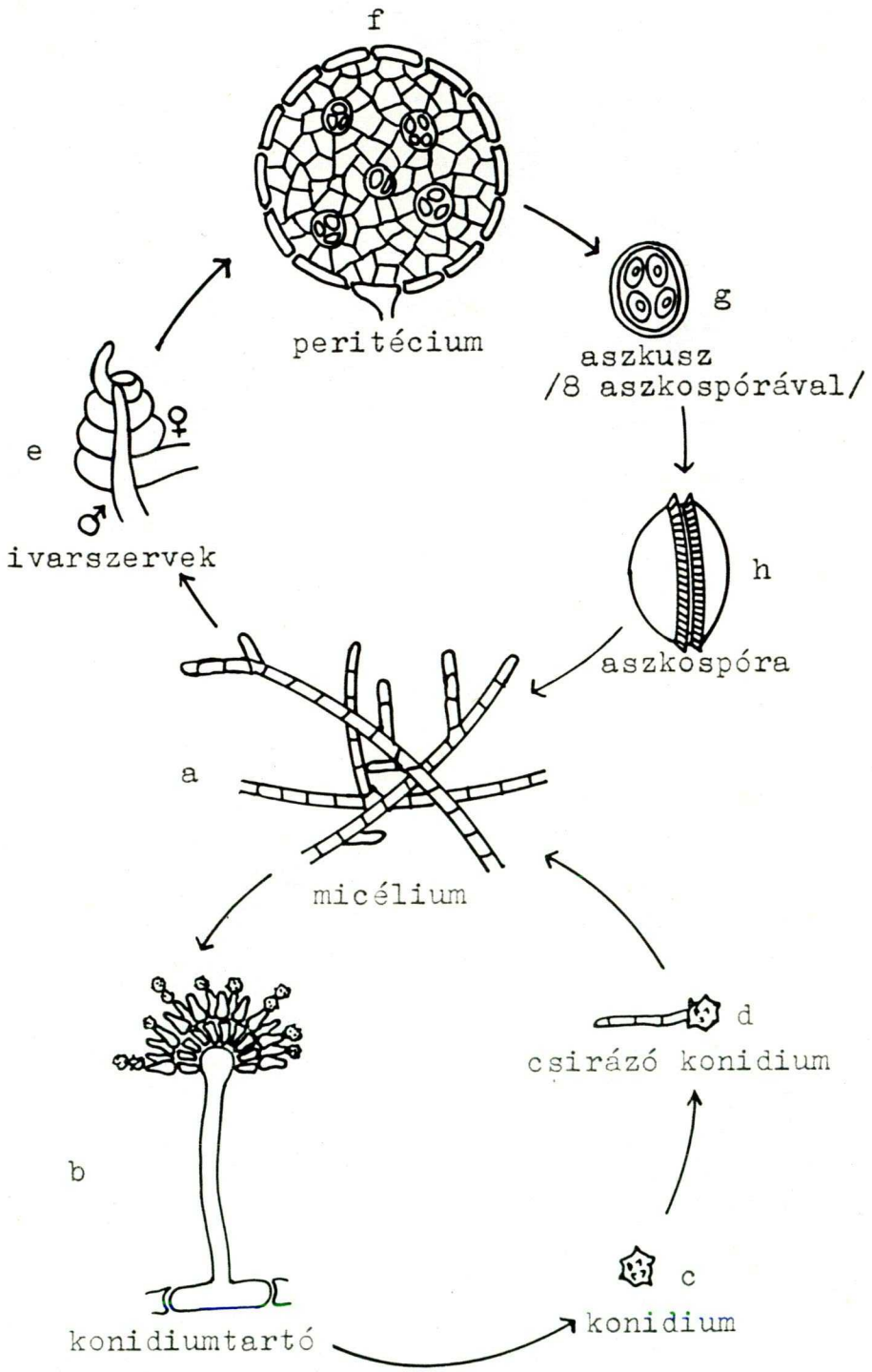
parbendazole
methyl 5-butylbenzimidazol-2-yl carbamate

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED


I
aroC acuJ acuM tryB adA galD suAadE sulA riboA anA pyrE adG pyrF luA stuA proA lysF pabaA uvsA yA fpaM biA niiC hfaA
uvsF rA creA pyroB fpaI proB mecB mecA hisB binB lacD adE pdhA acuE
fpaB medA T1(I;VII) T2(I;VIII) clB fpaA fluC pimB suDpro moA T1(I;II) binG sgpD
II
iodA etbA tsA adH acrA apnA wA methA palcA drkB gatB riboE creC pdeA intA gmdA thiA anB mauB puA ileA ssuA cnxE tryA adC adD acrB creB
inoA imaC tsC rB lacB benB
saA T1(II;VIII) (nis-5) senA T1(II;VIII) (nis-5) mauC punA ygA aauC
III
(brlA12) T2(III;VIII) galE meaB pantoC cnxH sA sC adI palcB methH argB palA galA smA actA phenA cbxA amdS amdI suBpro areA
fmdS suaA suaB alX spsA sorB moC penB pycA methD gdhA sgpC actC
suApro T1(III;VII) T1(III;VIII) ivoA pcnbA dilA
IV
iclA suCadE acuK pimA penC
methG hisA frA palC pabaB pyroA apsA
uvsB T1(IV;VIII) (frA1) inoB suApabaB acuL ornA
meaA mauA bzuA
V
uvsD nicA lysB pA facA hxA acuG lysE riboD uvsE
glcA mnrA fpaG acuD acuN
suCpalF T1(V;VI) riboG
VI.
nicC apsB methB tsB lacA bwA gabI gabA molA tamA argA uaX lysA fpaF sB sbA npeA
hfaB sltA fpaH fpaJ
T1(V;VI) T1(VI;VII) agaA glrA pacC
VII.
actB drkA nimO prnCBDA hisJ melB sumA palD
phenB oliC pantoB sF palF lysD malA aauB wetA imaA benC choA methE cbxB nicB v10 flA cnxF amdA gatA
telA T1(I;VII) T1(VI;VII) T1(III;VII) (lysD20) binF
VIII.
choC benA uvsC xprC crnA adB hisDEI aroA fpaN
tsD sD coA ornB fwA veA facC niiA niaD brlA cnxABC cbxC oxpA uaY fpaD pyrD palcC argC hisC facB riboB tryC
T2(I;VIII) (sD50) galG gamB arpB T1(II;VIII) (nis-5) T2(III;VIII) (brlA12) lamA aauD araA fluD suApalB manA
T1(III;VIII) pacB penA nirA T1(IV;VIII) fluE pantoA sE palE imaD fpaK tubA ureC chaA ivoB pppA palB moB ahrA rC ureA ureB abaA

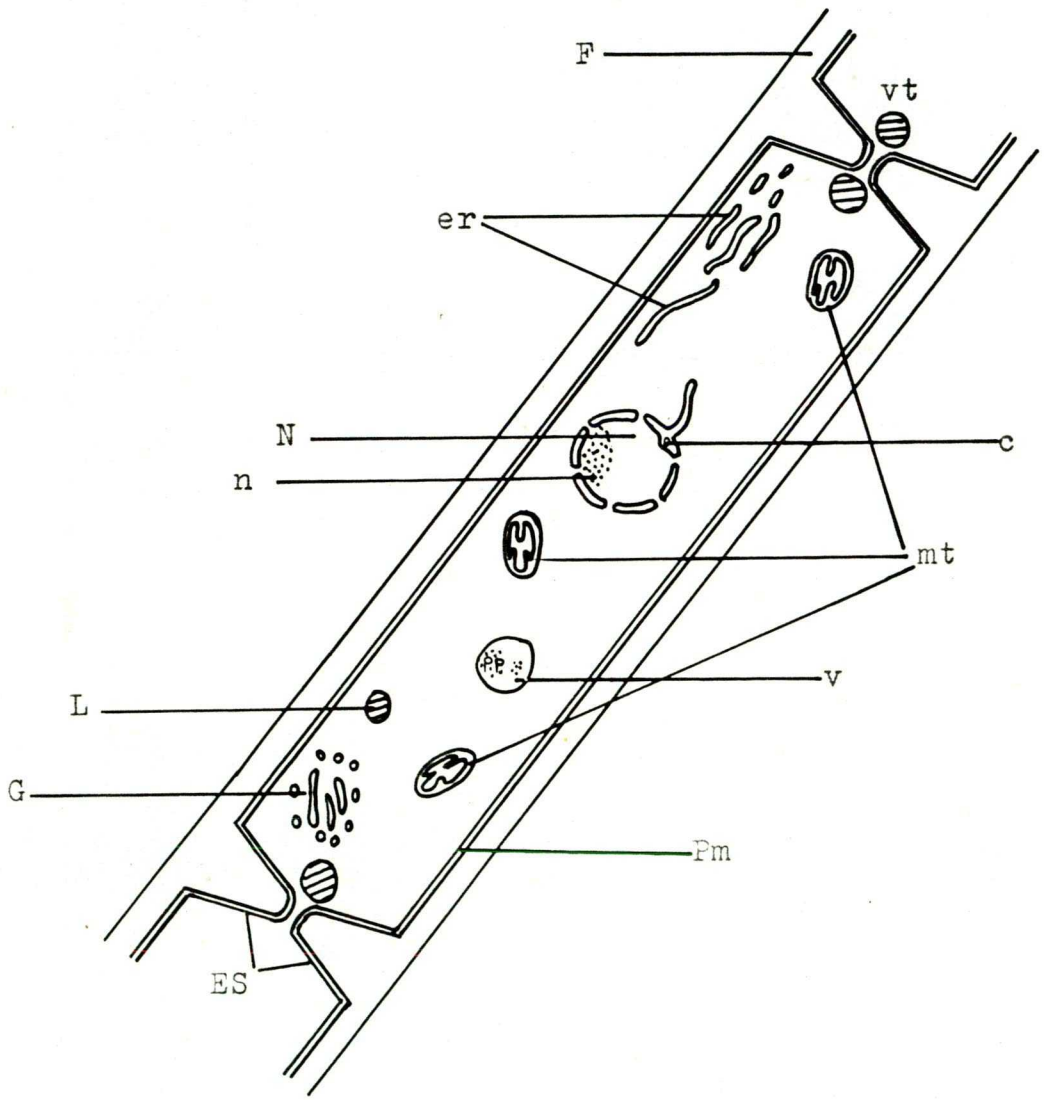
5. ábra

Az Aspergillus nidulans nemzedékváltakozása



6. ábra

Egy Aspergillus nidulans sejt vázlata

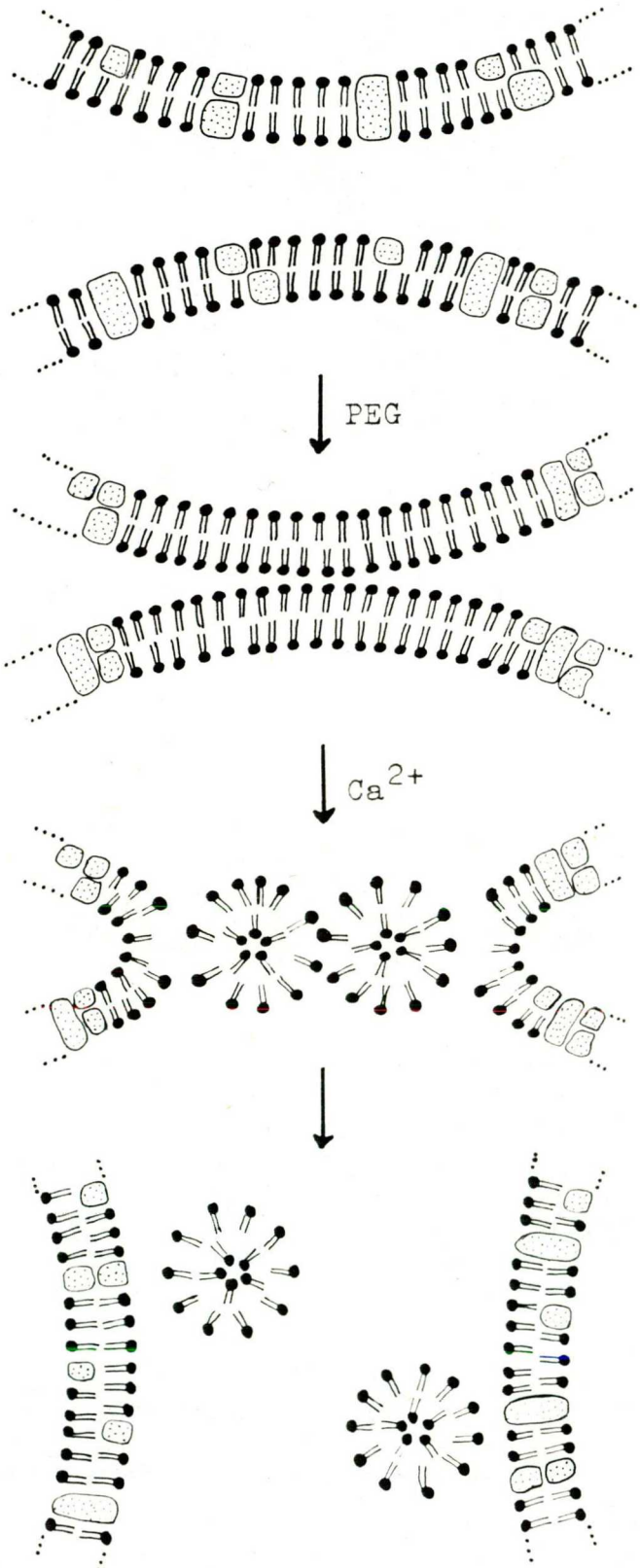


Jelmagyarázat:

c: centriólum folt, er: endoplazmás retikulum, ES: egyszerü pórusu szeptum, F: sejtfal, G: Golgi-készülék / diktioszóma /, L: lipidcsepp, mt: mitokondrium, N: nukleusz, n: nukleolusz, Pm: plazmamembrán, pp: polimetafoszfát szemcsék, v: vakuólum, vt: Voronin-test.

7. ábra

A membránfuzió elvi vázlata



ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mikroorganizmusok

A mutációk jelölésére a Clutterbuck által javasolt rendszert használtam.

FGSC 90
Aspergillus nidulans
Vad izolátum. Diploid.

FGSC 92
Aspergillus nidulans
Vad izolátum. Haploid.

FGSC 350
Aspergillus nidulans
1. bi A1 3. phe A2 6. lys A1 s B3

FGSC 407
Aspergillus nidulans
1. ad E20 bi A1 2. Acr A1 3. phe A2 4. pyro A4
5. lys B5 6. lac A1 7. cho A1 8. ribo B2 cha A1

FGSC 473
Aspergillus nidulans
1. sul A1 ad E20 2. Acr A1 w A3 3. Act A1
4. pyro A4 5. fac A303 6. lac A1 s B3
7. oli A2 cho A1 8. ribo B2 cha A1

FGSC 476
Aspergillus nidulans
1. sul A1 ad E20 2. Acr A1 w A3 3. Act A1
5. lys B5 7. cho A1 8. cha A1

R-21
Aspergillus nidulans
1. paba y

1156
Aspergillus nidulans
1. paba y ad E
Az R-21-ből készült UV besugárzással.

1157
Aspergillus nidulans
1. paba y ismeretlen helyzetü: lys
Az R-21-ből készült UV besugárzással.

5662
Aspergillus nidulans
Diploid. ad^-
Protoplaszt fuzióval készült: 1156 x FGSC 476

5756
Aspergillus nidulans
Diploid. y^- $paba^-$
Protoplaszt fuzióval készült: 1157 x 1156

5760
Aspergillus nidulans
Diploid.
Protoplaszt fuzióval készült: 1157 x FGSC 407

5761
Aspergillus nidulans
Diploid.
Protoplaszt fuzióval készült: 1157 x FGSC 473

Tr

Aspergillus nidulans
Protoplaszt fuzióval készült: 1157 x 5662.

Te

Aspergillus nidulans
Protoplaszt fuzióval készült: 5662 x 5756.

A törzsek származása:

- Az FGSC jelü törzsek
  Fungal Genetics Stock Centre
  Humbold State University
  Arcata, CA 95521 USA
- R-21, 1156, 1157 törzsek a JATE Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyüjteményéből származnak.
- 5662, 5756, 5760, 5761, Tr, Te törzseket vizsgálataim során protoplaszt fuzióval állitottam elő, az előző törzsekből.

Speciális Vegyszerek

Liofilezett csigaenzim preparátum

A JATE Mikrobiológiai Tanszékén készült a következő módon: Helix pomatia héját az állat 24 órás éheztetése után feltörjük, a zsigerzacskót felnyitjuk, a gyomornedvet jéggel hütött edénybe fejtjük, 20 percig 8000 rpm-mel centrifugáljuk. A felüluszót mélyhütjük, majd liofilezzük. Felhasználás előtt a "csigaenzim oldat" cimszó alatt leirt módon feloldjuk, 0,45 µm-es membrán szürőn sterilre szürjük.

Benomil /fundazol/

A Chinoin Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyárának /Budapest IV Tó u 1-5/ készitménye. Analitikailag tiszta preparátum.

Trypaflavinum /Akriflavin,Xanthacridinum,Tripaflavin/

A vegyszert a "REANAL" Közületi Vegyszerboltból szereztük be, at. minőségben, katalógus száma: 1385. A készitmény narancsvörös szinü, keserü izü por, 3,6-diamino-10-metilakridiniumklorid és 3,6-diaminoakridiniumklorid kb.2+1 arányu keveréke.

"REANAL" Közületi Vegyszerbolt
Budapest, XIV. Telepes u. 58-60. Telefon: 632-047

Oligomicin

A vegyszert a "REANAL" Közületi Vegyszerboltból szereztük be. Katalógus száma: 1115. Összegképlete: $C_{24}H_{40}O_6$
Molekulasulya: 424,58

Aktidion /cikloheximid/

Beszerezhető: Boehringer Mannheim Gmbh
A-1201 Wien, Pasettistraße 64.
Katalógusszám: 103675 Összegképlet: $C_{15}H_{23}NO_4$
Molekulasuly: 281,3

Táptalajok, oldatok

A tenyésztéshez használt táptalajok

Maláta törzsoldat

Kereskedelmi malátakivonatból csapvizzel olyan higitást készitettem, mely refraktométerrel 10 % cukortartalmat mutatott.
Sterilezzük 20 percig 120 C-on.

Malátás-élesztőkivonatos tápoldat

Bacto Yeast Extr.	0,5	%
Maláta törzsoldat	5	tf%
Glukóz	3	%

Csapvizzel oldjuk. pH: 6,5
Sterilezzük 20 percig 120 C-on.

Malátás-élesztőkivonatos táptalaj

Bacto Yeast Extr.	0,5	%
Maláta törzsoldat	5	tf%
Glukóz	3	%
Szálas agar	2	%

Csapvizzel oldjuk. pH: 6,5
Sterilezzük 20 percig 120 C-on.

A protoplaszt fuzióhoz szükséges táptalajok és oldatok

Fuziós minimál táptalaj

$/NH_4/_2SO_4$	0,5	%
KH_2PO_4	0,1	%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05	%
Glukóz	1	%
Bacto agar	2	%
KCl/0,6M/	4,47	%

Desztillált vizzel oldjuk. pH: 6,5
Sterilezzük 20 percig 120 C-on.

Gentamicin	50	µg/ml

Esetleges tápanyagkiegészitéseket hozzáadjuk.

Fuziós minimál lemezöntő táptalaj

a/ Ugyanaz az összetétel alkalmazható, mint a fuziós minimál táptalajé, csak a Bacto agar koncentrációját 1 %-ra csökkentjük.
A táptalajt 40 C-os vizfürdőbe téve megvárjuk, mig hőmérséklete 40 C-ra csökken, és igy használjuk.

b/

Bacto agar	1	%
KCl/0,6M/	4,47	%

Desztillált vizzel oldjuk. pH: 6,5
Sterilezzük 20 percig 120 C-on.
A táptalajt 40 C-os vizfürdőbe helyezve megvárjuk, mig hőmérséklete 40 C-ra csökken, és igy használjuk.

0,6M KCl oldat

KCl/0,6M/	44,7	g

Oldjuk 1000 ml desztillált vizben.
Sterilezzük 20 percig 120 C-on.

Csigaenzim oldat

Liofilezett csigaenzim	1,5	%
Streptomicin	50	µg/ml

Oldjuk 0,6M-os KCl oldatban.
Sterilezés: Centrifugáljuk 10 percig 4000 rpm-el.
Szürjük 0,45 µm-es membránszürőn.

Fuziós oldat

PEG 4000	30	%
$CaCl_2.2H_2O$/0,1M/	1,47	%

Desztillált vizzel oldjuk. pH: 6,5
Sterilezzük 20 percig 120 C-on.

A DNS meghatározásához használt oldatok

Perklórsav oldat /PCA/

Perklórsav	10	%

Desztillált vizzel oldjuk.

Difenilamin oldat

Difenilamin	4	%

Jégecetben oldjuk, frissen.

Acetaldehid oldat

Acetaldehid	1,6	tf%

Desztillált vizzel oldjuk.
Használat előtt tizszeresére higitjuk.

József Attila Tudományegyetem SZEGED

DNS standard oldat

Csirke eritrocita DNS 400 µg/ml

5 mM NaOH desztillált vizes oldatában oldjuk.

Használat előtt:

20 % perklórsav oldattal kétszeresére higitjuk.

Hidrolizálunk 70 C-on 15 percig.

10 %-os perklórsav oldattal kétszeresére higitjuk.

Az igy kapott standard oldat 100 µg/ml tartalmu.

A mutációk teszteléséhez használt táptalajok és oldatok

Pontecorvo minimál táptalaj

$NaNO_3$	0,25	%
KH_2PO_4	0,1	%
$MgSO_4.7H_2O$	0,05	%
KCl	0,05	%
Glukóz	2	%
Bacto agar	2	%

Desztillált vizzel oldjuk. pH: 6,5

Sterilezzük 20 percig 120 C-on.

Czapek-Dox minimál táptalaj

$NaNO_3$	0,3	%
KH_2PO_4	0,1	%
$MgSO_4.7H_2O$	0,05	%
KCl	0,05	%
$FeSO_4.7H_2O$	0,001	%
Szacharóz	3	%
Bacto agar	1,5	%

Desztillált vizzel oldjuk. pH: 6,5

Sterilezzük 20 percig 120 C-on.

Komplettáló kiegészitő Czapek-Dox táptalajhoz

Tripton vagy kazein hidrolizátum	1	%
Élesztő kivonat	0,1	%

Lodder féle vitaminkeverék

Folsav	0,2	mg
Biotin	0,2	mg
Ca-pantotenát	40	mg
Inozitol	200	mg
Niacin	40	mg
Paba	20	mg
Pirodoxin HCl	40	mg
Aneurin HCl /tiamin/	40	mg
Riboflavin	20	mg

100 ml steril desztillált vizzel oldjuk.
1 liter táptalajhoz 1 ml Lodder oldatot adunk.

Aminosav és vitamin igények, a szulfát fel nem használás tesztelése

A vizsgálatokat két metodikával végeztem, az egyiket csikoltásos módszernek, a másikat korongos tesztnek neveztem el.

Csik oltásos módszer

40 C-ra lehütött Pontecorvo minimál táptalajba oldottam fel a megfelelő kiegészitő keveréket. A kiegészitő keverék valamennyi igényelt anyagot tartalmazta, annak az egynek a kivételével, melyre a vizsgálat történt. Emellett természetesen beállitottam valamennyi igényelt anyagot tartalmazó, és semilyen kiegészitést nem tartalmazó kontrol csészéket is. A kiegészitő anyagok koncentrációja a táptalajban a következő volt:

Biotin, pirodoxin, riboflavin, paba	5 µg/ml
Adenin, L lizin, L metionin	50 µg/ml
DL fenilalanin	100 µg/ml
Cholin HCl	20 µg/ml

A táptalajt petricsészékbe öntöttem ki, és megszilárdulás után sugár irányban 1-1,5 cm hosszu csikokat huztam a konidiumokba mártott oltókaccsal. 1 csészére 8 csikot oltottam le. 30 C-on inkubáltam. Az értékelést 20 óra után mikroszkópos vizsgálattal, és 48 óra után szabadszemmel is elvégeztem.

Korongos teszt

Ellenőrzötten tiszta petricsészékbe Pontecorvo minimál táptalajt öntöttem. 1 ml 10^7 konidium/ml szuszpenziót egyenletesen szétfolyattam a táptalaj felületén, a felesleget leöntöttem, majd steril boxban a táptalaj felületére száritottam a konidiumokat. Fontos, hogy az oltáshoz használt konidium szuszpenzió friss és kellően sürü legyen. 30 C-os termosztátban 5 órát inkubáltam a csészéket, majd felhelyeztem a tápanyagkiegészitő anyagokat tartalmazó papirkorongokat. A korongok felhelyezése csipesszel történt, a csipeszt minden korong után alkohollal leégettem. Egy csészére négy korongot raktam fel, a csésze szélétől 2 cm távolságra. A tápanyagkiegészitést tartalmazó korongokat szürőpapirból vágtam ki irodai lukasztóval. A korongokat átitattam a megfelelő kiegészitőt tartalmazó törzsoldattal, megszáritottam, majd 10 percig 120 C-on sterileztem őket. Hütőszekrényben a száraz korongok eltarthatók. A törzsoldatok valamennyi igényelt anyagot tartalmazták, annak az egynek a kivételével, melyre a vizsgálat történt. Természetesen minden igényelt anyagot tartalmazó korongot is készitettem. A törzsoldatokban a következő koncentrációkat alkalmaztam.

Biotin, pirodoxin, riboflavin, paba	1	mg/ml
Cholin HCl	5	mg/ml
DL Fenilalanin	20	mg/ml
Adenin, L lizin, L metionin	10	mg/ml

A korongok felhelyezése után 30 C-on inkubáltam a csészéket. 20 óra után mikroszkóppal, majd 48 óra után szabadszemmel értékeltem a növekedést a korongok körül.

Megjegyzések

- A biotin igényt egyik módszerrel sem tudtam vizsgálni, ugyanis biotin kiegészités nélkül is növekedtek a törzsek. A jelenség oka valószinüleg a felhasznált vegy-

szerek nem megfelelő tisztasága, biotinnal való szennyezettsége.

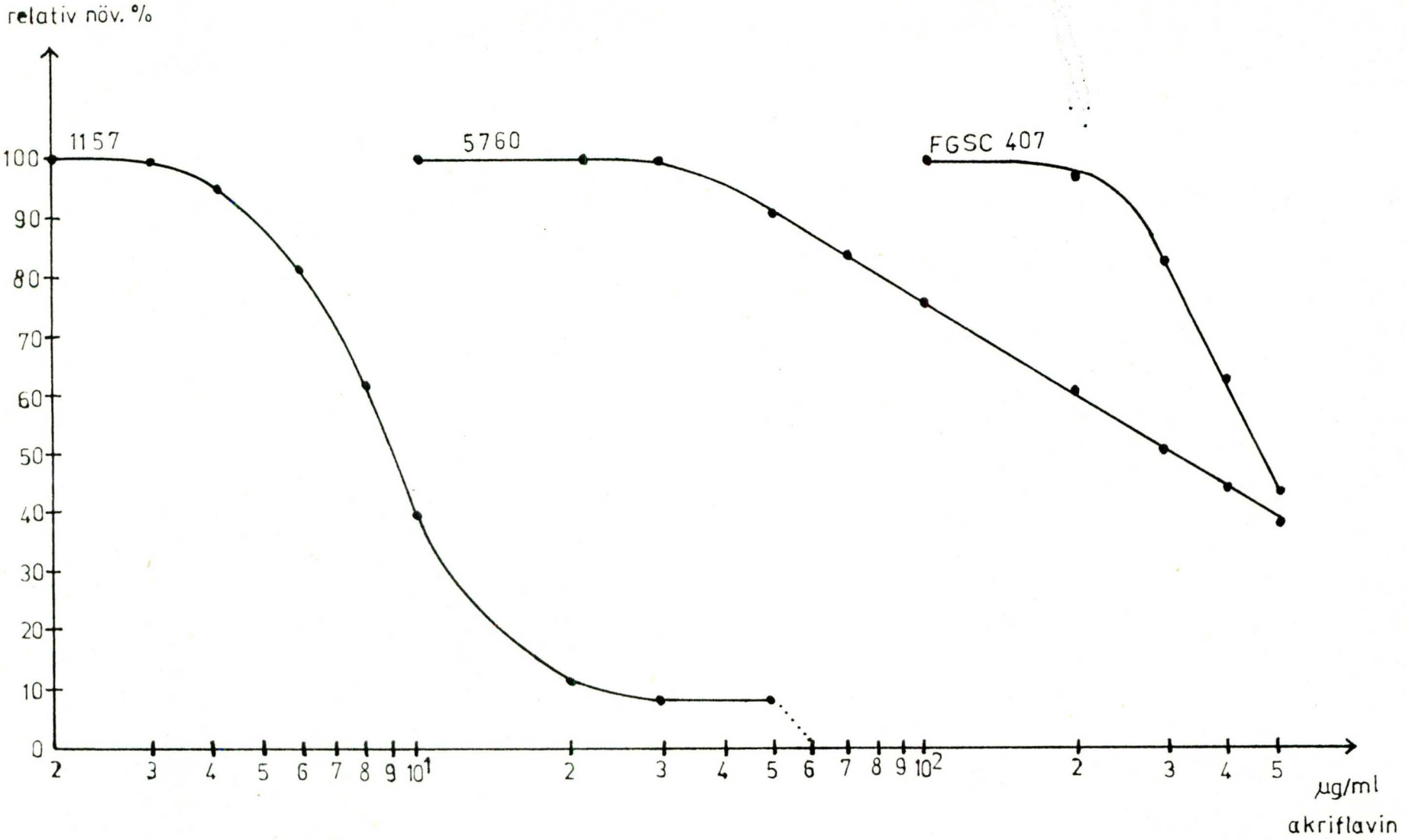
- A pyro, a ribo, a paba, az ad, és a lys igény mindkét módszerrel jól vizsgálható.
- A fenilalanint azért alkalmaztam dupla mennyiségben, mert csak DL keverék készitmény állt a rendelkezésemre.
- A cholin igény érdekes módon jelentkezett. A konidiumok csirázása cholin nélkül is megindult, majd megállt a növekedés. Emiatt a korongos teszt nem alkalmazható a vizsgálatra. Fontos, hogy a cholint viszonylag alacsonyabb koncentrációban használjuk, töményebben ugyanis toxikus hatása kezd jelentkezni.
- A szulfát fel nem használást metionin igényként teszteltem. Előzetes vizsgálataimból kiderült, hogy Na_2SO_3-t, $Na_2S_2O_3$-t nem képesek felhasználni a mutáns törzsek, de metionin vagy cisztein jelenlétében növekednek. A konidiumok csirázása metionin, vagy cisztein nélkül is megindul, majd megáll a növekedés, hasonlóan a cholinnál tapasztaltakhoz. A korongos teszt tehát itt sem használható vizsgálati módszer.

A rezisztencia mutációk tesztelése

Az akriflavin koncentráció - növekedés függvény

Malátás - élesztőkivonatos táptalajt 40 C-os vizfürdőben lehütöttem, majd hozzáadtam a megfelelő mennyiségü akriflavint. A táptalajt petricsészékbe öntöttem, a kihülés után középre, oltótüvel, egy pontba konidiumokat vittem fel. 30 C-on 4 napig inkubáltam, majd lemértem a telepek átmérőjét. Az eredmény a 8. ábrán, grafikonon látható.

A rezisztens FGSC 407 lényegesen magasabb akriflavin koncentrációt visel el, mint az érzékeny 1157. Feltünő a belőlük fuzióval előállitott törzs /diploid/ laposan lefutó görbéje.



8. ábra. Akriflavin koncentráció-növekedés függvény

Csik oltásos módszer

Vizfürdőben 40 C-ra hütött malátás-élesztőkivonatos táptalajban feloldottam a megfelelő mennyiségü drogot. A táptalajt csészékbe öntöttem, majd steril fogpiszkálóval esetleg oltókaccsal sugár irányban 1,5-2 cm-es csikokat huzva oltottam le a konidiumokat. Egy csészére nyolc csikot. 30 C-on inkubáltam. 2 és 4 nap után értékeltem a növekedést. A drogokat a következő koncentrációban alkalmaztam:

Akriflavin	100 µg/ml
Aktidion	100 µg/ml

Korongos teszt

Pontecorvo minimál táptalajhoz az aminosav-vitamin igények tesztelésénél leirt mennyiségben kevertem a következő kiegészitő anyagokat: bi, pyro, ribo, paba, phe, lys, ad, cho, met. A táptalajt petricsészékbe öntöttem és hagytam megdermedni. A táptalaj felületére 1 ml 10^7 kon/ml szuszpenziót szélesztettem, a felesleges folyadékot leöntöttem és a lemez felületét megszáritottam. 30 C-on 3 órát inkubáltam a csészéket, majd felraktam a drogot tartalmazó papirkorongokat. Egy csészére négy korongot helyeztem a csésze szélétől 2 cm távolságra. A korongokat csipesszel sterilen kezeltem, és minden korong után alkohollal leégettem a csipeszt. A szürőpapirból irodai lukasztóval kivágott papirkorongok átitatásához az alábbi koncentrációju törzsoldatokat használtam. A kapott gátlási zónák átlagos átmérője szintén a táblázatban látható.

A drog neve	A törzsoldat koncentrációja	A gátlási zóna átmérője mm-ben	
		rezisztens	szenzitiv
Akriflavin	50 mg/ml	15	30
Aktidion	50 mg/ml	0	15
Oligomicin	10 mg/ml	0	20

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

A korongok felhelyezése után 30 C-on inkubáltam, a növekedést 20 és 48 óra után értékeltem.

Megjegyzések

- Az akriflavin és az aktidion rezisztencia a csik oltásos és a korong teszt módszerrel egyaránt jól vizsgálható.
- Az oligomicin rezisztencia vizsgálatokhoz a korongos módszert alkalmaztam, hogy minél kevesebbet használjak fel az értékes antibiotikumból.
- A szulfonamid rezisztencia vizsgálatokhoz a következő különleges szabályokat is be kell tartani. A táptalaj pH-ját 7,2-re állitottam, a szulfonamid készitmény jobb oldódása végett. A tesztet a táptalaj felületére helyezett Sumetrolim kristállyal végeztem és ha gátlási zónát nem észleltem, rezisztensnek tekintettem a törzset. A Sumetrolim rezisztencia vizsgálatához használt táptalaj nem tartalmazhatott paba-t, mely antagonizálja a szulfonamidok hatását.
- A fluorecetsav rezisztenciát acetát fel nem használás formájában teszteltem, a rendkivül mérgező anyag nehéz beszerezhetősége és a vele való munka veszélyessége miatt. A módszert a laktóz fel nem használás vizsgálatánál ismertetem.

Különféle szénforrások hasznosithatóságának vizsgálata

Az aminosav-vitamin keverék optimális koncentrációjának meghatározása

A kisérlethez dupla koncentrációju Pontecorvo-minimál sókeveréket készitettem. Sterileztem 120 C-on 20 percig, majd 60 C-ra hütöttem. Külön sterileztem 100 C-on 5 percig 4 % Bacto agar és 1 % glukóz steril desztillált vizzel készitett oldatát, majd ezt is 60 C-ra hütöttem.

A két oldatból azonos mennyiségeket kevertem össze, majd hozzáadtam a kiegészitő anyagok megfelelő mennyiségét. A tápanyagkiegészitésekből harmadoló koncentrációsort alkalmaztam, 4 lépésben. A kiinduló koncentrációk az alábbi táblázatban láthatók:

Biotin, pirodoxin, riboflavin, paba	5 µg/ml
Adenin, L lizin, L metionin	50 µg/ml
DL fenilalanin	100 µg/ml
Cholin HCl	20 µg/ml

A kiegészitett táptalajt ellenőrzötten tiszta petricsészékbe öntöttem dermedni, majd steril fogpiszkálóval, esetleg oltókaccsal sugár irányban 1,5-2 cm-es csikokat huzva oltottam le a konidiumokat. Egy csészére 8 csikot. A vizsgálathoz a 1157, az FGSC 407, az FGSC 476, az FGSC 473 törzseket használtam. 30 C-on inkubáltam. 2 és 4 nap után értékeltem a növekedést. Az eredmény a következő volt:

A kiegészitő anyagkeverék higitása	Növekedés
1	jó
1/3	jó
1/9	bizonytalan
1/27	nem nő

Különböző szénforrások tesztelése

Az előkisérlet alapján a továbbiakban a szénforrást 0,5 %-ban, a kiegészitő anyagokat pedig a következő koncentrációkban alkalmaztam:

Biotin, pirodoxin, riboflavin, paba	2,5 µg/ml
Adenin, L lizin, L metionin	25 µg/ml
DL fenilalanin	50 µg/ml
Cholin HCl	10 µg/ml

Egyebekben az előző kisérletben leirtakhoz hasonló módon jártam el. Az értékeléshez kétféle kontrolt használtam:

a/ Szénforrást nem, csak kiegészitő anyagokat tartalmazó táptalajt.

b/ 0,5 % glukóz szénforrást és a kiegészitő anyagokat tartalmazó táptalajt.

A teszt táptalaj a kiegészitő tápanyagokat és 0,5 % szénforrást tartalmazott. A három táptalajon mutatott növekedést összehasonlitva döntöttem el, hogy a vizsgált törzs képes-e a tesztben szereplő szénforrás hasznositására. A két vizsgált szénforrás a laktóz és az acetát volt. Az acetátot nátriumacetát formájában alkalmaztam. Itt utalok arra, hogy az acetát fel nem használást a fluorecetsav rezisztencia mutáció kimutatására használtam.

A szin mutációk kimutatása

Kisméretü petricsészébe malátás-élesztőkivonatos táptalajt öntöttem. A csésze közepére 0,5 cm hosszu csikban oltottam le a konidiumokat, majd 30 C-on 5 nap inkubálás után értékeltem a szinképzést.

Protoplaszt szuszpenzió készitése

Öt petricsészébe malátás-élesztőkivonatos táptalajt öntöttem, mely 50 µg/ml streptomicint is tartalmazott. A táptalaj felületére sterilen nedves celofánt helyeztem. A celofánra ecsettel kis pöttyök formájában oltottam le a konidiumokat, kb. 10^6 kon/ml szuszpenzióból. Fontos, hogy az oltáshoz használt konidiumok fiatal, 3-5 napos tenyészetből származzanak. A csészéket 30 C-on inkubáltam 20 órát. A celofánokat csipesszel sterilen 5 ml csigaenzim oldatot tartalmazó petricsészékbe helyeztem, a rajtuk kinőtt micéliummal lefele forditva. A csészéket 30 C-on 2 órát rázattam, majd mikroszkóppal ellenőriztem, képződött-e elegendő protoplaszt. A csészék tartalmát összeöntöttem, a celofánt egyszer lemostam 0,6 M KCl oldattal, és ezt a mosófolyadékot is egyesitettem az előző

szuszpenzióval. A szuszpenziót 17P02 /G2/ szürőn átszürtem. A szürőt használat előtt 0,6 M KCl oldattal átöblitettem az esetleg jelenlevő viznyomok eltávolitása céljából. A szürletet egy 50 ml-es centrifugacsőben fogtam fel. A szürletet centrifugáltam 10 percig 1500 rpm-el 4 C-on. A felüluszót vizlégszivattyura kapcsolt Pasteur-pipettával szivtam le. Az üledéket 1-2 ml 0,6 M KCL-el felszuszpendáltam és egy 10 ml-es centrifugacsőbe szivtam át . A szuszpenzió sejtszámát Bürker-kamrával határoztam meg, majd 0,6 M KCl-el higitva 10^7 protoplaszt/ml-re állitottam be.

Protoplaszt fuzió

A fuzionálandó két törzsből 10^7 protoplaszt/ml szuszpenziót készitettem. 1-1 ml szuszpenziót egy 10 ml-es centrifugacsőbe jól összekevertem, majd 10 percig 1500 rpm-el, 4 C-on centrifugáltam. A felüluszót vizlégszivattyura kapcsolt Pasteur-pipettával szivtam le. Fontos a felüluszó minél alaposabb eltávolitása, mert a KCl gátolja a fuziót. Az üledékhez 2 ml fuziós oldatot pipettáztam. A kémcsövet mozgatva, majd erőteljesebben keverve felszuszpendáltam a protoplasztokat. 10 percig inkubáltam a szuszpenziót 30 C-on. A fuziót mikroszkóppal ellenőriztem. A szuszpenzióból 0,2 ml-t jól elkevertem 20 ml 40 C-os fuziós minimál lemezöntő táptalajba. Ebből 5-5 ml-t rétegeztem a petricsészébe öntött 20 ml fuziós minimál táptalajra. A csészéket 30 C-on inkubáltam. Kb. 2-4 nap kell, mig megjelennek a fuziós telepek. A kinőtt telepekből néhányat /10-50 db/ steril fogpiszkálóval Pontecorvo-minimál táptalajra helyeztem át, és 30 C-on 4-5 napig inkubáltam. A kinövő telepek legnagyobb része jellegzetes gyökeres növekedésü heterokarion, de általában néhány szabályos, tömött növekedésü diploid is megjelenik. A diploid telepek a szinmarkerek konidiumokban történő

komplementációja alapján is felismerhetők, ha megfelelő partnereket választunk a fuzióhoz. Ha nem jelent meg diploid telep, akkor a heterokarion telepekből 1,5 cm telepátmérő elérésekor kis darabkákat fogpiszkálóval áthelyeztem Pontecorvo-minimál táptalaj felületére helyezett celofánra. A csészéket 7 napra 4 C-ra helyeztem, majd 30 C-on inkubáltam tovább. Ekkor nagy valószinüséggel sikerült diploid telepet vagy szektort találni. A diploid telepről konidiumokat szélesztettem Pontecorvo-minimál táptalajra, majd egy izoláltan növő teleppel megismételtem a szélesztést. Igy tisztán izoláltam az uj diploid törzset, és a továbbiakban malátás-élesztőkivonatos táptalajon tartottam fenn.

Anasztomózis

A vizsgálandó törzsekből konidium szuszpenziót készitettem. A töménység 10^6 kon/ml, a szuszpendáló oldat malátás-élesztőkivonatos tápoldat volt. Két törzs szuszpenziójából 1-1 ml-t félkémcsőbe pipettáztam, összekevertem, steril vattadugóval zártam. 3 napig inkubáltam 30 C-on. Ekkor a tápoldat tetején gombafonalakból erős hártya képződik. A fonaltömeget steril lándzsatüvel elválasztottam a kémcső falától, kis petricsészébe kiemeltem, steril vizzel egyszer leöblitettem a rátapadt tápfolyadékot. A továbbiakban a lependéket feldaraboltam, és steril fogpiszkálóval megfelelően kiegészitett vagy kiegészitést nem tartalmazó Pontecorvo-minimál táptalaj felületére raktam. 5-7 napig inkubáltam 30 C-on, ekkor kifejlődtek a telepek.

A benomil koncentráció-növekedés függvényének felvétele

Malátás-élesztőkivonatos táptalajt 40 C-ra hütöttem, majd hozzákevertem a megfelelő mennyiségü benomilt. A táptalajt petricsészékbe öntöttem, és hagytam megdermed-

ni. A csésze közepére oltótüvel egy pontba vittem fel a konidiumokat. 30 C-os termosztátban inkubáltam 4 napig, majd lemértem a telepek átmérőjét. Az átmérőkből kiszámitottam a relativ növekedés százalékos értékét.

rel. növ. % = a drogon nőtt telep átmérője x 100 / a kontrol telep átmérője

Az eredmények a 11, 12, 13, 14, 15. grafikonokon láthatók.

Benomiles kezelés szegregánsok előállitására

A benomilt a növekedés-benomil koncentráció függvények alapján 1,2 µg/ml koncentrációban kevertem a malátás-élesztőkivonatos táptalajba. A táptalaj felületére három kacsnyi konidiumot szélesztettem, majd inkubáltam a csészéket 30 C-on 14 napig. Ekkor 10-50 apró telep jelent meg. A telepeket steril fogpiszkálókkal kis petricsészékbe öntött malátás-élesztőkivonatos táptalajra helyeztem át. Ez a táptalaj már nem tartalmazott benomilt. Kb. 7 napos 30 C-os inkubáció után 2-3 cm átmérőjü telepeket kaptam, melyeken jól felismerhető szektorok voltak láthatók. Minden szektorról steril fogpiszkálókkal konidiumokat oltottam át kis csészében levő malátás-élesztőkivonatos táptalajra, igy izoláltam és tisztán fenntartottam a szegregánsokat.

A DNS-tartalom kémiai meghatározása

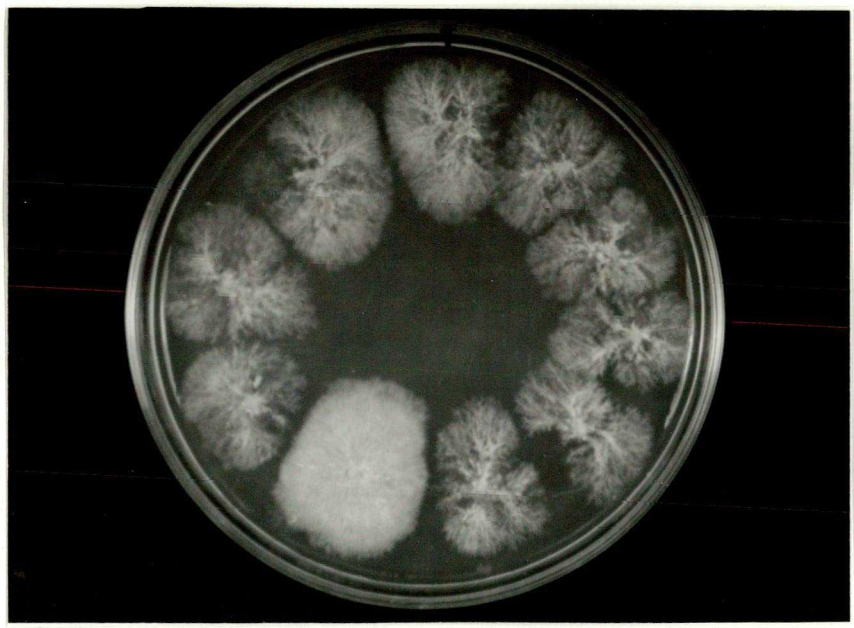
A vizsgálandó törzseket malátás-élesztőkivonatos táptalaj felületére oltottam le. A petricsésze közepére a konidiumokba mártott kaccsal 3-3,5 cm hosszu csikot huztam. Egy vizsgálathoz törzsenként tiz csészét használtam fel. 14 napig inkubáltam 30 C-on. Ekkor az egész csésze felületét benőtte a gomba, és kellően konidiumosodott. A csészékre 5 ml 0,05 %-os hideg SDS oldatot mértem, és a táptalaj felületét üvegbottal kapargatva a konidiumokat

szuszpendáltam. A tiz csészéről készitett szuszpenziót egyesitettem, és 20 percig 4000 rpm-el hütve centrifugáltam. A felüluszót leöntöttem, az üledéket 5 ml vizzel szuszpendáltam. A szuszpenziót 20 ml 25 %-os szaharóz oldatra rétegeztem és az asztalon jégbe állitva 3 órát ülepitettem. A konidiumokat szennyező nagyobb részecskék kiültek a cukoroldat aljára. A konidiumok néhány mm-t ülepedtek a cukoroldatban. Leszivtam a konidiumokat tartalmazó részt, és 10 percig 4000 rpm-el hütve centrifugáltam. Az üledéket 5 ml hideg PCA oldattal szuszpendáltam, és 30 percig jégen állni hagytam. A szuszpenziót 10 percig 4000 rpm-el centrifugáltam, majd 5 ml PCA-val szuszpendáltam az üledéket. 1 óra hidrolizis következett 70 C-os vizfürdőben. Közben az egyenletesen szuszpendált anyagból mintát vettem, és 100-szoros higitásban Bürker-kamrával meghatároztam a szuszpenzió mililiterenkénti konidium számát. A hidrolizis után 10 perc 4000 rpm centrifugálás következett. 2 ml felüluszót, 0,1 ml acetaldehid oldatot, 2 ml difenilamin oldatot pipettáztam össze, és ezt a keveréket inkubáltam 30 C-on 20 órát. A DNS-tartalmat az 595 nm-nél mért fényelnyelésből határoztam meg, kalibrációs görbe segitségével. A kalibrációs görbe csirke eritrocita DNS-oldat felhasználásával készült. Az eredményeket µg DNS/konidium formában adtam meg.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

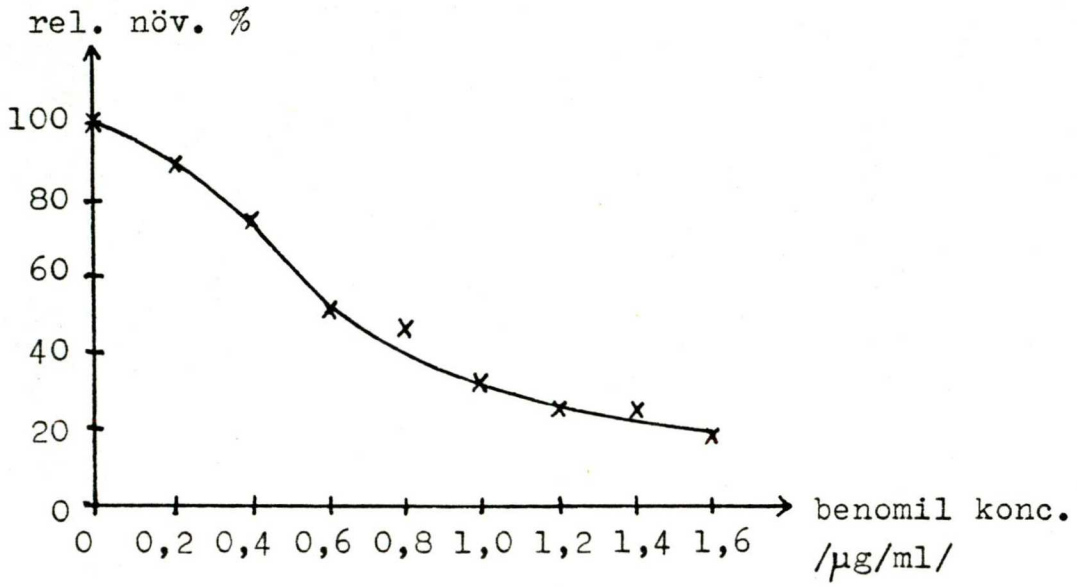
9. ábra. Protoplaszt képződés csigaenzim hatására

10. ábra. Egy diploid és több heterokarion fuziós telep

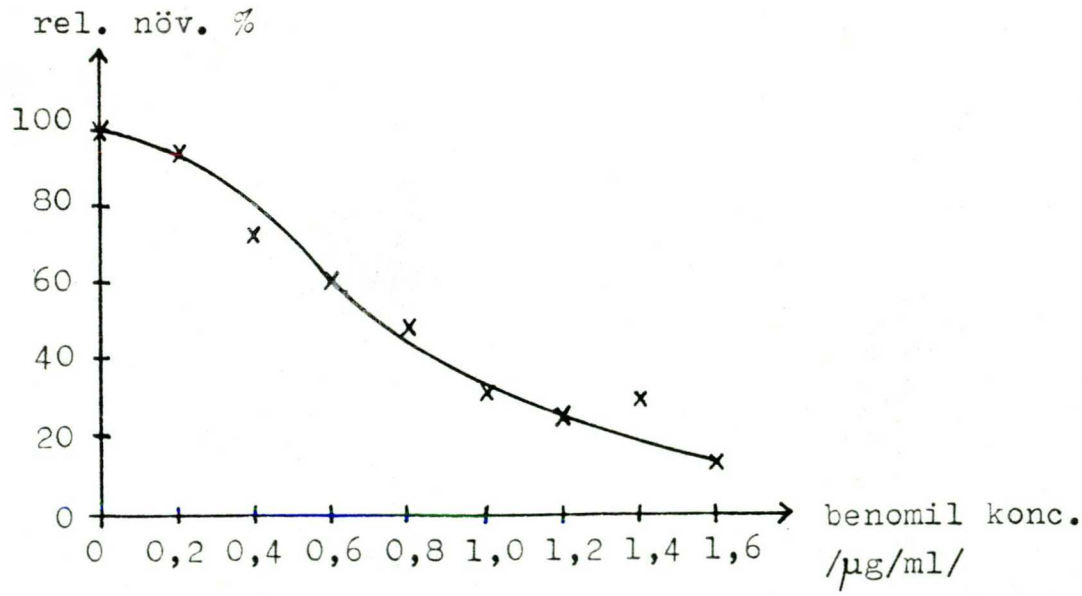


József Attila Tudományegyetem Könyvtár SZEGED

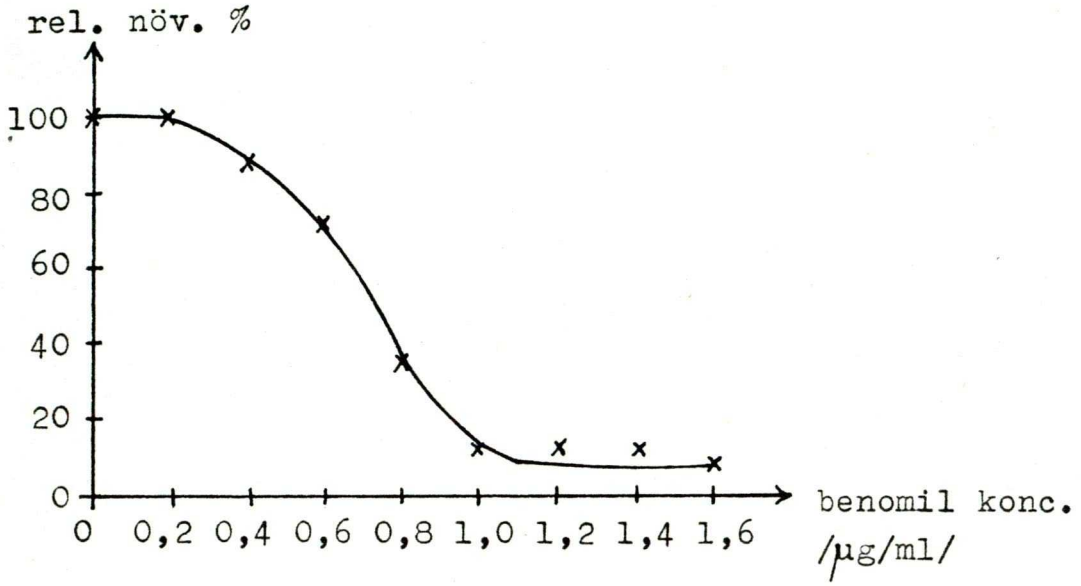
11. ábra. Az FGSC 407 törzs benomil koncentráció-növekedés függvénye



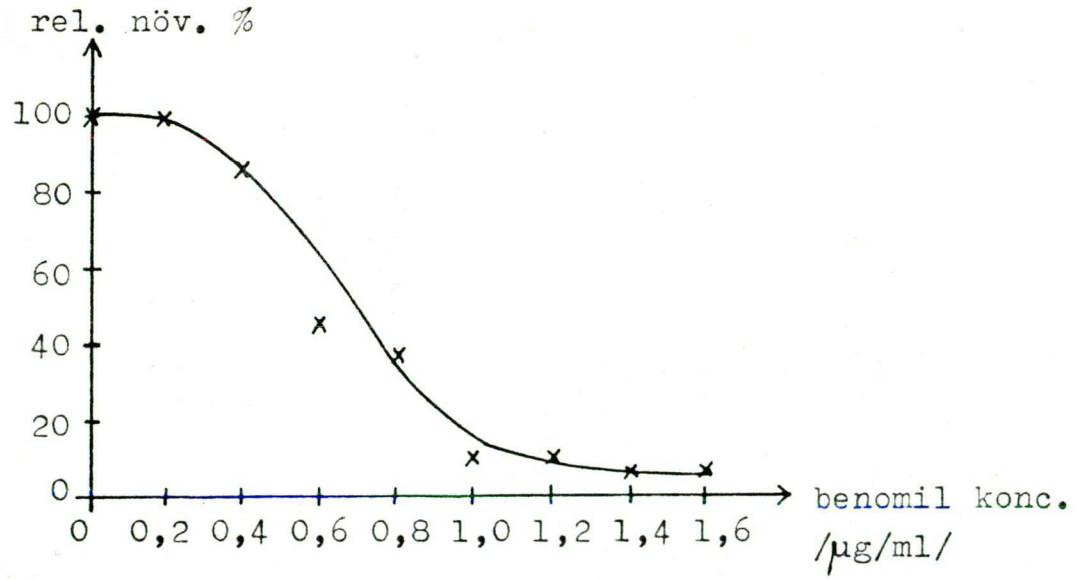
12. ábra. Az FGSC 473 törzs benomil koncentráció-növekedés függvénye



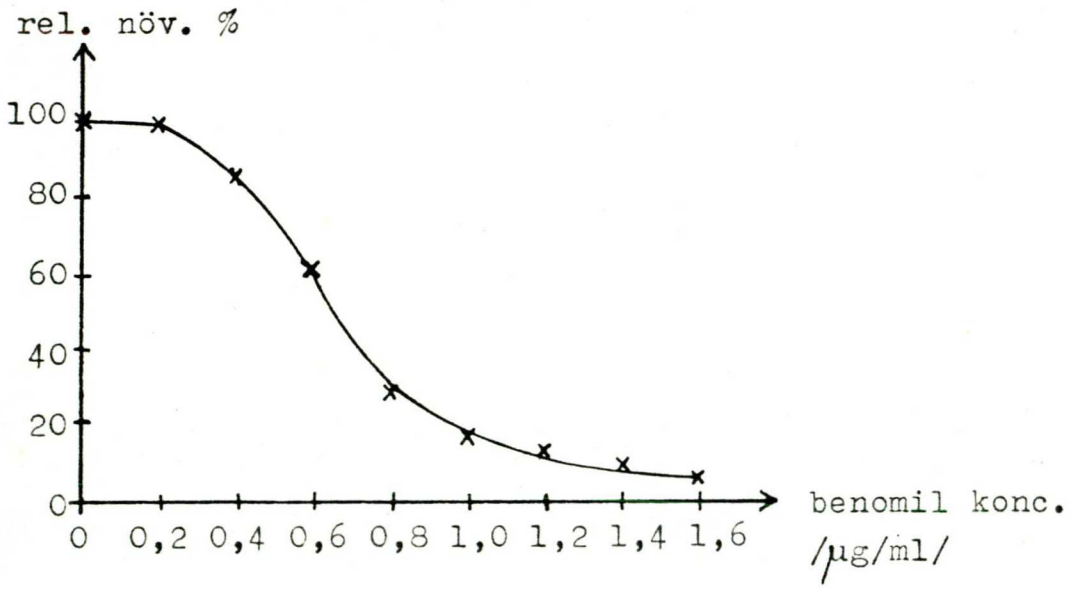
13. ábra. Az 1157 törzs benomil koncentráció-növekedés függvénye



14. ábra. Az 5760 törzs benomil koncentráció-növekedés függvénye



15. ábra. Az 5761 törzs benomil koncentráció-növekedés függvénye



A LIZIN-IGÉNY MUTÁCIÓ KROMOSZÓMÁLIS ELHELYEZKEDÉSÉNEK VIZSGÁLATA A 1157 JELÜ ASPERGILLUS NIDULANS TÖRZSBEN

STABIL ANEUPLOID TÖRZSEK MEGJELENÉSÉNEK KIMUTATÁSA DIPLOID, HETEROZIGÓTA ASPERGILLUS NIDULANS TÖRZSEK BENOMILES KEZELÉSE UTÁN

Célkitüzéseim

Kisérleteim eredeti célkitüzése a 1157 Aspergillus nidulans törzsben elhelyezkedő lys mutáció /UV-besugárzással állitotta elő Oravecz Gyula/ kromoszómális elhelyezkedésének meghatározása volt. A 1157 törzs a nemzetközi irodalomban R-21 jellel ismert törzsből származik, melyről már korábban megállapitották, hogy a y és a paba mutációja az I. kapcsolódási csoportban foglal helyet. Vizsgálataim során vetődött fel, hogy a benomil kezelés hatására nem csak haploid, hanem aneuploid állapotu szegregánsok is keletkeznek. Ekkor célul tüztem ki az aneuploid állapotu szegregánsok kimutatását. Stabilitásuk meghatározását nem szelektiv, benomil mentes táptalajon. Annak eldöntését, hogy az aneuploidoknak bizonyuló szegregánsokban ismételt benomil kezeléssel ujabb kromoszómák elvesztése kiváltható-e. Megvizsgálni, hogy mely kromoszómapárok hajlamosak diszómiás állapotban maradni.

Diploid, heterozigóta törzs létrehozása a 1157 és az FGSC 407 törzsekből, az 5760 törzs szegregánsainak vizsgálata

Protoplaszt fuzióval állitottam elő az 5760 jelzésü diploid, heterozigóta Aspergillus nidulans törzset, melynek egyik szülője a vizsgálandó 1157 jelzésü törzs, a másik pedig a nemzetközi irodalomban FGSC 407 jellel ismert, minden kromoszómáján jelölt master törzs.

A fuziós eljárás után az összecsapott protoplasztokat fuziós minimál illetve lizinnel kiegészitett fuziós minimál táptalaj fölülöntőjébe vittem ki. Az ozmotikus stabilizátor 0,6 M KCl volt. Mindkét esetben kb. azonos számu telep jelent meg, a két törzs lizin igénye komplementálta egymást, ebből következik hogy különböző cisztronba esnek. Egyszerübben szólva: a 1157 lys mutációja nem lehet az 5. kromoszómán elhelyezkedő lys B cisztronban.
Az izolált fuziós telepek nagy része laza, szabálytalan /gyökér szerü/ micéliumot képző, főleg sárga, de kevés világos zöld konidiumot is termelő heterokarion volt.
A kisebb gyakoriséggal megjelenő diploid telepeket tömöttebb, rendezett micéliumukról és sötétzöld konidiumaikról könnyen felismertem. A fuziós telepek diploid illetve heterokarion voltát az auxotrófia és a szin markerek konidiumokban való komplementációja és a konidium átmérők mikroszkópos mérése alapján valószinüsitettem.
A heterokarion telepek esetén a micéliumban mindkét szülői sejtmag jelen volt és müködött, igy a micélium növekedéséhez nem igényelt kiegészitő anyagot. A konidiumokba azonban csak egy sejtmag juthatott be, ez nyilván csak az egyik vagy a másik szülővel egyező tulajdonságu lehetett. Valóban a heterokarion telepek az egyik, illetve a másik szülőnek megfelelő auxotrófiáju és szinü /sárga és világoszöld/ konidiumokat termeltek. A konidiumok átmérője is a szülői törzsekével azonos volt.
A diploid telepek esetében a szülői magvak összeolvadtak, igy egy magon belül jött létre a hibás gének komplementációja. A micélium növekedéséhez természetesen itt sem igényelt kiegészitő anyagot, sőt a konidiumok is prototrof tulajdonságuak és sötétzöld szinüek voltak. A konidiumok átmérője lényegesen nagyobb volt mint a haploid szülőké, illetve a heterokarion telepek által termelt konidiumoké.

A konidiumok mikroszkóposan mért átmérője:

1157	3,5 µm
FGSC 407	3,5 µm
Heterokarion	3,5 µm
5760	4,2 µm

Az 5760 diploid és a haploid törzsek konidium térfogatainak aránya: V diploid / V haploid = 1,72
Az 5760 törzs stabilan fenntartható volt prototróf formában, nem szelektiv körülmények között is, és mindig csak prototrof konidiumokat termelt. Ez kizárta annak lehetőségét, hogy több önálló, haploid, de egyetlen sejtben levő mag révén jött létre a komplementáció.
Érdekes következtetés vonható le abból, hogy a heterokarion telepek világoszöld és sárga, a diploid telepek pedig sötétzöld konidiumokat termelnek. Logikus, hogy a konidiumok szinanyagképződéséért felelős gének müködése csak azután indul be, miután a konidiumokba kerülő egyes sejtmagok már izolálódtak egymástól.
Megvizsgáltam az 5760 törzset akriflavin érzékenység szempontjából is, és a várakozásnak megfelelően akriflavin rezisztensnek mutatkozott. Az Acr Al mutáció domináns hatása tehát érvényre jutott. /lásd: Anyag-módszer fejezetben az akriflavin koncentráció-növekedés grafikont/
A protoplaszt fuzióval kapott heterozigótából benomil kezeléssel próbáltam haploid szegregánsokat előállitani. A kapott szegregánsokat csik oltásos módszerrel vizsgáltam meg, hogy milyen markerek nyilvánulnak meg bennük. Elméleti megfontolások alapján az egyes markerek /mutáns fenotipusok/ előfordulási gyakorisága a haploid utódokban 50 %-nak várható, mivel vagy a mutáns gént hordozó kromoszóma vagy a másik kerül az utódba.
A szin markerek esetén nem egy, hanem két gén alléljeinek kölcsönhatása határozza meg a fenotipust. Igy négy lehe-

tőség áll elő, melyek az alábbi táblázatban láthatók.

Az 1. kromoszómán y locus allélje	A 8. kromoszómán cha locus allélje	Fenotipus	Várt gyakoriság
y	cha	Barna	25%
y	vad	Sárga	25%
vad	cha	Világoszöld	25%
vad	vad	Sötétzöld	25%

Speciális esetet jelent a lys^- marker, melynek helyzete a 1157 törzsben nem ismert. Két lehetőséggel kell számolni. Első lehetőség: Ha a 1157 lys mutációja az FGSC 407 lys mutációjával azonos kromoszómán, az 5. kromoszómán helyezkedik el, akkor a haploid utódokban a lys^- fenotipus megjelenése 100%-os gyakorisággal várható. Ugyanis vagy az FGSC 407-ből származó lys B5 mutációt hordozó 5. kromoszómát tartalmazzák. Itt jegyzem meg, hogy a komplementáció segitségével, a fuziós kisérlet alapján már kizártam azt a lehetőséget, hogy a 1157 lys mutációja a lys B cisztronban helyezkedik el.

Második lehetőség: Ha a 1157 lys mutációja nem az 5. kromoszómán helyezkedik el, a lys^- fenotipus megjelenése 75% gyakorisággal várható a haploid utódokban.

A továbbiak szempontjából még a két marker együttes előfordulásának gyakoriságát kell megvizsgálnom.

Tudottan egy kromoszómán előforduló markerek a következők:

ad E20, bi A1	az FGSC 407	1. kromoszómáján
$paba^-$, y^-	a 1157	1. kromoszómáján
ribo B2, cha A1	az FGSC 407	8. kromoszómáján

Az egy kromoszómán levő markerek együttes előfordulása 100%-nak várható, vagy annál csak nagyon kicsivel alacsonyabb értéknek, a crossing-over miatt.

Ha két olyan markert vizsgálunk, melyek azonos kromoszómapár egyik, illetve másik kromoszómáján fordulnak elő, együttes előfordulásuk 0%, illetve a crossing-over miatt egy nagyon alacsony érték.

Két olyan marker esetén, melyek különböző kromoszómapárok tagjain fordulnak elő, 25% együttes előfordulási gyakoriság várható.

Az eddigiek alapján látható, hogy a markerek együttes előfordulási gyakoriságának vizsgálatával remény van a 1157 lys mutáció kapcsolódási csoportjának meghatározására.

Az "5760 szegregánsok adatai" táblázatban az 5760 törzs első benomiles kezelése után izolált szegregánsok jellemzése látható.

Az 5760 szegregánsok adatai

Sorsz.	lys	paba	y	ad	Acr	phe	pyro	cho	ribo	cha	Szin	Izolátum db	Izolátum %
1.	+	+	+	-	R	+	+	+	+	+	Z	3	5,5
2.	+	+	+	-	R	-	+	+	-	-	Cha	1	1,8
3.	+	+	+	-	S	+	+	+	+	+	Z	1	1,8
4.	+	+	+	-	S	+	-	-	+	+	Z	1	1,8
5.	+	-	-	+	R	+	+	+	+	+	S	25	46,3
6.	+	-	-	+	R	+	-	+	+	+	S	1	1,8
7.	+	-	-	+	R	+	-	-	+	+	S	1	1,8
8.	+	-	-	+	S	+	+	+	+	+	S	2	3,7
9.	-	+	+	-	R	-	+	-	-	-	Cha	1	1,8
10.	-	+	+	-	S	+	+	+	+	+	Z	3	5,5
11.	-	+	+	-	S	+	+	-	+	+	Z	1	1,8
12.	-	+	+	-	S	+	-	+	+	+	Z	1	1,8
13.	-	+	+	-	S	-	+	+	-	-	Cha	1	1,8
14.	-	+	+	-	S	-	+	-	-	-	Cha	1	1,8
15.	-	+	+	-	S	-	-	-	-	-	Cha	1	1,8
16.	-	-	-	+	S	+	+	+	+	+	S	2	3,7
17.	-	-	-	+	S	+	+	-	-	-	B	1	1,8
18.	-	-	-	+	S	+	-	+	+	+	S	1	1,8
19.	-	-	-	+	S	+	-	-	+	+	S	1	1,8
20.	-	-	-	+	S	+	-	-	-	-	B	2	3,7
21.	-	-	-	+	S	-	+	-	-	-	B	1	1,8
22.	-	-	-	+	S	-	-	+	-	-	B	1	1,8
23.	-	-	-	+	S	-	-	-	-	-	B	1	1,8

Jelölések:

Z = sötétzöld
S = sárga
B = barna
Cha = világoszöld

\+ = vad fenotipus
\- = mutáns fenotipus

Az akriflavin rezisztenciánál: S = szenzitiv
R = rezisztens

József Attila Tudományegyetem Mezőgazdasági Kémiai Intézet SZEGED

Összesen 54 db izolátumot vizsgáltam meg, melyek 23 különböző tipusba voltak sorolhatók. Feltünő az 5. tipusu szegregánsok kiugróan magas gyakorisága / 25 db, 46,3 % /. A jelenség magyarázatát a később ismertetésre kerülő stabil aneuploid állapotu szegregánsok létrejöttében látom.

Az eredmények megerősitették, hogy a paba és a y markerek az 1. kromoszómán helyezkednek el, mert a paba és a y mindig csak együtt fordult elő, és egyik sem párosodott az ad E20-szal. Olyan szegregánst, mely sem adenint, sem paba-t nem igényelt, nem találtam, tehát az első kromoszóma szétválása mindig tökéletes volt, diszómia nem fordult elő.

A szinek öröklődésére a következő sémát állitottam fel:

Az 1. kromoszómán	A 8. kromoszómán	Fenotipus
y	cha	barna
y	vad	sárga
vad	cha	világoszöld
vad	vad	sötétzöld

Az egyes markerek gyakorisága a szegregáns tipusokban:

Marker	Kapcsolódási csoport	Előfordult: db	%
lys	5, ?	15	65,2
paba	1	12	52,2
y	1	12	52,2
ad E20	1	11	47,8
acr^s	2	17	73,9
phe A2	3	8	34,8
pyro A4	4	10	43,5
cho A1	7	11	47,8
ribo B2	8	10	43,5
cha A1	8	10	43,5

A lys 65,2 %-os gyakorisága vagy arra utal, hogy a 1157 lys nem az 5. kromoszómán helyezkedik el, vagy ha mégis ezen a kromoszómán van, akkor az 5. kromoszómára a szegregáns tipusok 34,8 %-a diszómiás.
Az egyes markerek gyakorisága a lys^- szegregáns tipusokban:

Kapcsolódási csoport	A marker jele	db	%
1.	ad E20	7	46,7
2.	acr^s	14	93,3
3.	phe A2	7	46,7
4.	pyro A4	7	46,7
7.	cho A1	9	60,0
8.	ribo B2	9	60,0

A lys^- szegregáns tipusok között 50 % gyakorisággal várható azon markerek megjelenése, melyek a 1157 lys mutációtól különböző kromoszómán helyezkednek el. Az a marker, amely a 1157 lys mutációjával azonos kromoszómapáron helyezkedik el, 33,3 %-ban várható a lys^- szegregánsok között. A fentiek alól kivételt jelent az acr^s marker, amely a 1157 2. kromoszómáját jelzi. Ha ezen a kromoszómán van az ismeretlen helyzetü lys mutáció, akkor kapcsoltan kell hogy öröklődjék az acr^s-el.
A fenti táblázatból látható, hogy a 1157 lys minden valószinüség szerint nem az 1, 3, 4, 7, 8 kromoszómán helyezkedik el. Az acr^s 93,3 %-os gyakorisága arra utal, hogy a 1157 lys kapcsolt vele, tehát a 2. kromoszómán van. Ezen következtetésnek azonban nyomós érvként ellene szól, hogy a 9. szegregáns tipus lys^- acr^s, és a lizint nem igénylő szegregánsok között 3 db acr^s van /37,5 %/. Hogy mégis miért olyan ritka az Acr^R a lys^- szegregánsok között, arra eddig kielégitő magyarázatot nem találtam. Gondolni lehet valamiféle kölcsönhatás jelenlétére az egyes kromoszómapárok között, de ez a feltételezés mindenképpen további vizsgálatokat igényelne.

Az 5760 szegregánsainak elemzésekor felvetődött a gyanu, hogy a benomil kezeléskor nem tökéletes a kromoszóma párok szétválása, nem csak haploid, de aneuploid állapotu törzsek is létrejönnek, és stabil állapotban maradnak fenn a benomil eltávolitása után.
Kisérleteimben az 5. átoltás után, a benomil mentes malátás-élesztőkivonatos táptalajon fenntartott szegregánsokban változás nem volt kimutatható.
Aneuploidok jelenlétére a következő jelenségek miatt gondoltam:
Az 5. tipusból kiugróan nagy számu szegregánst /46,3 %/ izoláltam. Feltünő az is, hogy ezekben a szegregánsokban csak egy marker jelent meg. A szegregánsok néhány más csoportjában is nagyon kevés marker jelent meg /1, 3, 5, 6, 8 tipusokban/. Hipotézisem igazolására az 5760 szegregánsok minden tipusából egy reprezentativ törzset 1,2 µg/ml benomillal kezeltem. A benomiles kezelés után az egyes csészéken különböző morfológiáju szektorok megjelenését igyekeztem kimutatni, és izolálni őket. Az 1, 2, 5, 6, 7, 8 tipusu szegregánsok esetén ez sikerült. A további vizsgálatokhoz a szin markerek jellegzetes öröklésmenetét használtam ki, mely segitségével a 8. kromoszóma diszómiája viszonylag könnyen kimutatható. A biztonság kedvéért a ribo$^-$ marker, mely kapcsoltan helyezkedik el a cha$^-$ markerrel a 8. kromoszómán, megjelenését is megvizsgáltam az izolált másod szegregánsokban.
Az ismételt benomil kezelés kisérletének elvi áttekintése az alábbi táblázatban látható:
Jelölések:

S = sárga fenotipusu konidium
Z = sötétzöld fenotipusu konidium
C = világoszöld fenotipusu konidium
B = barna fenotipusu konidium

R^+ = riboflavint nem igényel /fenotipus/
R^- = riboflavint igényel /fenotipus/

y^- = mutáns gén a y lókuszban
y^+ = vad gén az y lókuszban
c^- = mutáns gén a cha lókuszban
c^+ = vad gén a cha lókuszban
r^- = mutáns gén a ribo lókuszban
r^+ = vad gén a ribo lókuszban

Az első szegregáns			Lehetséges másod szegregánsok		
Fenotipus	Lehetséges genotipus		Lehetséges genotipus		Fenotipus
	1. kr.	8. kromoszóma	1. kr.	8. kromoszóma	
S, R^+	y^-	$c^+ r^+ / c^- r^-$	y^-	$c^+ r^+$	S, R^+
			y^-	$c^- r^-$	B, R^-
	y^-	$c^+ r^+$	y^-	$c^+ r^+$	S, R^+
Z, R^+	y^+	$c^+ r^+ / c^- r^-$	y^+	$c^+ r^+$	Z, R^+
			y^+	$c^- r^-$	C, R^-
	y^+	$c^+ r^+$	y^+	$c^+ r^+$	Z, R^+
B, R^-	y^-	$c^- r^-$	y^-	$c^- r^-$	B, R^-
C, R^-	y^+	$c^- r^-$	y^+	$c^- r^-$	C, R^-

Az ismételt benomil kezelés kisérletének eredménye:

Az első szegregáns sorszáma	Milyen másod szegregánst adott				Az első szegregáns 8. kromoszómája
	C R^-	B R^-	S R^+	Z R^+	
1.	igen	nem	nem	igen	diszómiás
2.	igen	nem	nem	nem	monoszómiás
5.	nem	igen	igen	nem	diszómiás
6.	nem	igen	igen	nem	diszómiás
7.	nem	igen	igen	nem	diszómiás
8.	nem	nem	igen	nem	monoszómiás

Azoknál a hasadást mutató első szegregánsoknál, melyek másod szegregánsai között szinbeli variációk nem mutathatók ki /2, 6/, az izolátumok növekedési sebességében látható különbség. Ezek esetében nem a 8. kromoszóma

diszómiájáról van szó, hanem valószinüleg valamely más kromoszóma diszómiás. Ennek közelebbi meghatározására nem történt kisérlet.
Összefoglalva megállapitható tehát, hogy aneuploid szegregánsok léte kimutatást nyert a kisérlet alapján.

Diploid, heterozigóta törzs létrehozása a 1157 és az FGSC 473 törzsekből, az 5761 törzs szegregánsainak vizsgálata

Az 5761 diploid, heterozigóta törzset a 1157 jelü törzsből és az FGSC 473 jelzésü master törzsből protoplaszt fuzióval állitottam elő. Az izolált fuziós telepek nagy része prototrof micéliumu, szabálytalan növekedésü, fehér és sárga, a szülőkével egyező tulajdonságu konidiumokat termelő heterokarion volt.
A kisebb gyakoriséggal megjelenő diploid telepek micéliuma prototróf volt, és szabályos növekedésü. A konidiumok sötétzöldek, prototrófok, és a haploid szülőkénél lényegesen nagyobb átmérőjüek.
A konidiumok mikroszkóposan mért átmérője:

1157	3,5 µm
FGSC 473	3,2 µm
Heterokarion	3,5 µm
5761	4,3 µm

A vizsgálatokat az 5760 törzshöz hasonlóan végeztem el, igy itt részletes tárgyalásuktól eltekintek. A haploidizálás 1,2 µg/ml benomillal történt, az "Anyagok és módszerek" részben leirt módon. A szegregánsok tesztelésének eredménye az "5761 szegregánsok adatai" táblázatban látható.

Az 5761 szegregánsok adatai

Sorsz.	lys	ad	y	Acr	w	Act	pyro	fac	lac	s	cho	ribo	cha	Szin	db
1.	-	+	-	S	+	S-R	+	+	+	+	+	+	+	S	5
2.	-	+	-	S	+	S-R	-	+	+	+	+	+	+	S	3
3.	-	+	-	R	-	R	+	+	+	+	+	+	+	F	2
4.	-	+	-	R	-	R	-	+	+	+	+	+	+	F	2
5.	-	-	+	S	+	S	+	+	+	+	+	+	+	Z	4
6.	-	-	+	S	+	S	-	+	+	+	+	+	+	Z	2
7.	-	-	+	S	+	S	-	+	+	+	+	-	-	Cha	1
8.	-	-	+	S	+	S-R	+	+	+	+	+	+	+	Z	4
9.	-	-	+	S	+	S-R	-	+	+	+	+	+	+	Z	1
10.	-	-	+	R	-	R	+	+	+	+	+	+	+	F	1
11.	-	-	+	R	-	R	-	+	+	+	+	+	+	F	1
12.	+	+	-	S	+	R	+	-	-	-	-	-	-	B	
13.	+	+	-	S-R	+/-	R	+	-	-	-	-	+	+	S	
14.	+	+	-	S-R	+/-	R	+	-	-	-	-	-	-	B	
15.	+	+	-	R	-	R	-	-	-	-	-	+	+	F	
16.	+	-	+	S	+	R	-	-	-	-	-	-	-	Cha	
17.	+	-	+	S-R	+/-	R	-	-	-	-	-	+	+	Z	

Összesen 110 db szegregánst izoláltam.
Ebből lys^- 26 db /23,6%/ volt.

Jelölések: Mint az "5760 szegregánsok adatai" táblázatban.
F = fehér konidium szin

Összesen 110 db szegregánst vizsgáltam meg, ezekből első lépésben kiválogattam a lizin igényeseket. 26 db /23,6%/ lys^- szegregánst kaptam. Valamennyit és még néhány reprezentativ lys^+ szegregánst a többi markerre is megvizsgáltam. Azt a tényt, hogy a lys^+ szegregánsok gyakorisága

az elméletileg várható 50% helyett csak 23,6%, aneuploidok fellépésével magyaráztam.

Érdekes eredményt adott a 2. és a 3. kromoszómán elhelyezkedő akriflavin és aktidion rezisztencia markerek vizsgálata. A markerek megnyilvánulását a mérget tartalmazó malátás-élesztőkivonatos táptalajon mutatott növekedés alapján, a leoltástól számitott 2. és 4. napon biráltam el. Az izolátumok nagy része a 2. és a 4. napon értékelve azonos elbirálás alá esett /rezisztens vagy szenzitiv/. Volt azonban néhány izolátum, amely a 2. napon nem mutatott növekedést /szenzitiv volt/, de a 4. napon már a rezisztenseknek megfelelő növekedést mutatott. Akriflavinra a 13, 14, 17, aktidionra az 1, 2, 8, 9 tipust találtam ilyennek. A jelenség értelmezéséhez a 2. kromoszómán kapcsoltan elhelyezkedő domináns Acr és a recessziv w mutáció adta meg a kulcsot. A 13, 14, 17 tipusokban a recessziv w mutáció nem nyilvánul meg, pedig az őt hordozó kromoszóma jelenléte a domináns Acr mutáció megnyilvánulásából következik. A magyarázat szerintem: ezekben a szegregánsokban a második kromoszómapár mindkét tagja jelen van. A w^- allél hibás müködését komplementálja a másik kromoszómán jelenlevő vad allél, a domináns Acr^R allél pedig diszómiás állapotban is érvényre jut, bár láthatóan kis időbeli késéssel.

Következtetésem tehát: a 13, 14, 17 szegregáns tipus a 2. kromoszómára, az 1, 2, 8, 9 tipus pedig a 3. kromoszómára diszómiás.

Furcsa jelenség, hogy az 5, 6, 7 kromoszómán elhelyezkedő markerek ugy viselkednek, mintha kapcsoltan öröklődnének. Ez valamiféle, a különböző kromoszómapárok között müködő kölcsönhatásra utal, de mélyebb vizsgálatára nem került sor.

A szin markerek öröklődése az 5760 törzsnél leirtakhoz képest a w mutáció hatásával bonyolódik. Az öröklésmenet a következő:

1. kromoszómán	2. kromoszómán	3. kromoszómán	Fenotipus
y^+	w^-	cha^+	F
y^-	w^-	cha^-	F
y^+	w^-	cha^-	F
y^-	w^-	cha^+	F
y^+	w^+	cha^+	Z
y^-	w^+	cha^-	B
y^+	w^+	cha^-	Cha
y^-	w^+	cha^+	S

Látható, hogy a w^- allél domináns hatást mutat a y és a cha lókuszok fölött. Biokémiai szempontból valószinüleg arról van szó, hogy a w gén terméke a szinanyagképződés anyagcsereutjában egy a y és a cha lókusz enzimje katalizálta reakciólépést megelőző lépésben játszik szerepet.

Az egyes markerek előfordulása a lys^- szegregáns tipusokban.

Kromoszóma	Marker	Előfordulás	
		db	%
1.	ad E20	7	63,6
2.	Acr^s	7	63,6
3.	Act^s	3	27,3
4.	pyro A4	6	54,5
5.	fac A303	0	0
6.	lac A1	0	0
7.	cho A1	0	0
8.	ribo B2	1	9,1

A táblázatban látható adatok alapján a 1157 lys mutáció 1, 2, 3, 4 kromoszómán való elhelyezkedése valószinüleg kizárható. Az 5, 6, 7, 8 kromoszómára nem vonható le következtetés.

Komplementációs vizsgálat a 1157 lys és az FGSC 350 lys A1 között

A kisérlet célja annak eldöntése volt, vajon a 1157 lys nem a 6. kromoszómán elhelyezkedő lys A cisztronban van-e. Protoplaszt fuziót végeztem a 1157 és az FGSC 350 törzsek között. A minimál és a lizinnel kiegészitett minimál táptalajon azonos számu telepet kaptam. Ebből következik, hogy a két mutáció komplementálja egymást, tehát különböző cisztronba esnek.

Kisérlet a lys B5 és a 1157 lys mutáció elkülönitésére 2-aminoadipinsav felhasználási képesség alapján

A vizsgálatot abból a megfontolásból kiindulva végeztem el, hogy ha a két lys mutáció közül az egyik a szintézis ut 2-aminoadipinsav előtti, a másik pedig egy későbbi lépésében okozott hibát, akkor a két mutáció a 2-aminoadipinsav felhasználási képesség alapján elkülönithető. Ebben az esetben pedig az 5760 lys^- szegregánsok közül kiválogathatók a 1157 lys mutációját hordozók, és elemzésükkel további adatokhoz jutottam volna az ismeretlen helyzetü mutációról.
A kisérlet eredménye sajnos kedvezőtlen volt. Egyik törzs sem volt képes lizin helyett 2-aminoadipinsav jelenlétében növekedni. Annyi következtetés azonban igy is levonható, hogy mindkét mutáció a 2-aminoadipinsav utáni lépések valamelyikében okozott hibát.

Összefoglalás

A 1157 lys mutáció elhelyezkedéséről összegyült adatokat az alábbi táblázatban foglaltam össze:

Kromoszóma	Az irodalomban leirt lys cisztronok	A 1157 lys mutáció
1.	lys F /1R/	5760, 5761 szegregánsokból az 1. kromoszómán való elhelyezkedés kizárható.
2.	-	5761 szegregánsok alapján a 2. kromoszómán való elhelyezkedés nem valószinü.
3.	-	5760, 5761 szegregánsokból a 3. kromoszómán való elhelyezkedés kizárt.
4.	-	5760, 5761 szegregánsokból a 4. kromoszómán való elhelyezkedés kizárt.
5.	lys B, lys E	FGSC 407 lys B5-el való komplementáció alapján lys B kizárható.
6.	lys A /6R/	FGSC 350 lys A1-el való komplementáció alapján lys A kizárható.
7.	lys D	5760 szegregánsok alapján a 7. kromoszómán való elhelyezkedés nem valószinü.
8.	-	5760 szegregánsok alapján a 8. kromoszómán való elhelyezkedés nem valószinü.

Valószinü tehát, hogy a 1157 lys mutáció az 5. kromoszómán elhelyezkedő lys E cisztronban van, vagy pedig egy eddig le nem irt cisztronban, melyről feltehető, hogy az 5. vagy a 6. kromoszómán van.

Az aneuploid törzsek létrejöttéről a benomil kezelés hatására

Megállapitottam, hogy a diploid Aspergillus nidulans tör-

zsek benomil kezelésekor aneuploid állapotu szegregánsok izolálhatók. Ezek az aneuploid törzsek nem szelektiv, benomil mentes táptalajon /malátás-élesztőkivonat/ stabilnak bizonyultak. Bennük ismételt benomil kezeléssel további kromoszómák elvesztése idézhető elő. Az egyes kromoszómákra vonatkozóan a következő összefoglaló táblázatot készitettem.

Kromoszóma	Diszómia kimutatható?	Utalás a konkrét kisérleti eredményre.
1.	nem	5760, 5761 első szegregánsok paba-ad markerei.
2.	igen	5761 szegregánsok Acr-w markerei
3.	igen	5761 szegregánsok Act markere
4.	?	-
5.	igen?	5760 lys^+ szegregánsok
6.	?	-
7.	?	-
8.	igen	5760 ismételt benomiles kezelése az első szegregánsoknak

Látható, hogy a különböző kromoszómapárok nem egyformán hajlamosak diszómiás állapotban maradni, az 1. kromoszóma esetén nem tudtam ilyet kimutatni.

Szegedi Állami Tudományegyetem Könyvtára

ÁTMENETI POLIPLOIDOK LÉTREHOZÁSA HAPLOID ASPERGILLUS NIDULANS MUTÁNSOKBÓL

Célkitüzéseim

Az Aspergillus nidulans haploid, auxotróf mutáns törzseiből viszonylag könnyen képezhetünk heterokarion, illetve diploid állapotu törzseket. A protoplaszt fuzió és az anasztomózis is alkalmas módszer előállitásukra. A természetből izolált törzsek között is találunk néha diploidot, példa erre az FGSC 90 törzs. Érdekes kérdés azonban, hogy ha rendelkezésre áll egy megfelelő szelekciós rendszer, milyen termékek izolálhatók egy haploid és egy diploid, illetve két diploid törzs fuziója vagy anasztomózisa után. A kérdés megválaszolására a következő vizsgálatokat végeztem el: Meghatároztam, hogy a 1156 törzsben elhelyezkedő ad mutáció mely komplementációs csoportba /cisztron/ tartozik. Protoplaszt fuzióval előállitottam az 5756 és az 5662 diploid törzseket, jellemeztem őket. Létrehoztam egy diploid és egy haploid /1157 x 5662/, illetve két diploid /5662 x 5756/ törzs protoplaszt fuzióját. Izoláltam és jellemeztem a fuziós terméket. Néhány törzsön megvizsgáltam, hogy létrehozható-e anasztomózis két haploid, egy haploid és egy diploid, illetve két diploid törzs között. Jellemeztem az anasztomózis termékeit. Megmértem valamenynyi kiinduló törzs, két összehasonlitó törzs, és a fuziós kisérletekből izolált törzsek konidiumainak átmérőjét. Meghatároztam a konidiumok DNS-tartalmát. Jellemeztem a törzseket a micélium tömeg folyadékkulturában való növekedése alapján. Festés után mikroszkópos vizsgálatot végeztem, a konidiumokban elhelyezkedő magvak megfigyelésére.

Megfelelő kiindulási törzsek kiválasztása. A 1156 ad mutáció komplementációs csoportjának meghatározása

Vizsgálataim alapvető feltétele volt olyan diploid tör-

zsek létrehozása, melyekben legalább egy auxotrófia mutáció nem komplementálódott. Ezek felhasználásával reméltem ugyanis megvalósitani a diploid-diploid és a haploid-diploid fuzió szelekciós rendszerét.
Az egyik diploid kiépitéséhez a 1157 és a 1156 törzset választottam. Tudtam róluk, hogy a paba és a y mutáció mindkét törzsben azonos lókuszon helyezkedik el, az 1. kromoszómán. A belőlük létrejövő heterokarionban illetve diploidban sem fognak komplementálódni. A 1157 lys mutációja és a 1156 ad mutációja viszont lehetőséget nyujt a fuziós termék szelekciójára.
A 1156 ad mutációjának azonositását az FGSC 476 törzzsel való fuzió tette lehetővé. A fuziós termékben az ad igény nem komplementálódott, tehát a két törzs ad igénye azonos cisztronban /ad E/ van. A diploid izolálásához a 1156 paba és az FGSC 476 lys és cho mutációit használtam fel. A létrejövő diploid ad igényes, igy alkalmas a további fuziós vizsgálatokra.

Az 5756 előállitása és jellemzése

A 1157 és a 1156 törzsekből az "Anyagok és módszerek" részben leirt módon protoplasztokat készitettem, majd fuzionáltam őket. A fuziós terméket paba kiegészitést tartalmazó fuziós minimál táptalajon izoláltam. Lodder-keverékkel kiegészitett Pontecorvo minimál táptalajra tovább oltva sok heterokarion és néhány diploid telepet kaptam. A heterokarion telepek sárga szinü, a szülőkével egyező auxotrófiáju konidiumokat termeltek. A telepek gyökérszerü növekedést mutattak.
A diploid telepeket egyenletes, tömött növekedési képükről ismertem fel. A konidiumok sárgák és paba auxotrófok voltak. A lys és az ad igény a várakozásnak megfelelően komplementálódott bennük. A diploid törzs nem szelektiv

körülmények között / malátás-élesztőkivonatos táptalaj / is stabilan fenntartható volt. A továbbiakban 5756 jellel hivatkozok az izolált diploid törzsre.

Az 5662 előállitása és jellemzése

Az FGSC 476 és a 1157 törzsekkel protoplaszt fuziót végeztem. A fuziós minimál táptalaj adenin kiegészitést tartalmazott. A fuziós termékből itt is nagy gyakorisággal heterokarion telepeket kaptam, de néhány diploid is megjelent. A heterokarion a szülőkével egyező szinü és auxotrófiáju konidiumokat termelt, növekedése gyökeres jellegü volt. A diploid szabályos növekedést mutatott, sötétzöld adenin auxotrof konidiumokat termelt. Az izolált diploid törzs stabilnak bizonyult, és az 5662 jelet adtam neki.

Egy diploid /5662/ és egy haploid /1157/ törzs fuziója

A fuziós termék izolálásához az 5662 ad markerét és a 1157 lys és paba markerét használtam szelekciós rendszerként. A protoplaszt fuziót a szokásos módon végeztem. A fuziós minimál táptalaj nem tartalmazott kiegészitő anyagot. A fuziós termék életképesnek bizonyult, nagyszámu telep jelent meg. A telepek többsége gyökeres növekedésü, mindkét szülő eredeti tulajdonságait hordozó konidiumokat termelő heterokarion volt. Kisebb gyakorisággal találtam szabályos, tömött növekedésü, sötétzöld, prototróf konidiumokat termelő telepeket is. Ezekből izoláltam a Tr jelü törzset, melyet a továbbiakban megvizsgáltam, vajon triploid genomot tartalmaz-e? A Tr törzs stabilan fenntartható nem szelektiv táptalajon / malátás-élesztőkivonatos táptalaj / is.

Két diploid törzs fuziója

A kisérletben az 5662 /ad⁻/ és az 5756 /paba⁻/ törzseket

használtam. A protoplaszt fuziót a szokásos módon végeztem, a fuziós minimál táptalaj nem tartalmazott kiegészitő anyagot. Sok gyökeres növekedésü, a szülőkkel egyező szinü és auxotrófiáju konidiumokat termelő heterokarion telepet kaptam. Kisebb gyakoriséggal jelentek meg a tömött növekedésü, sötétzöld, prototróf konidiumokat termelő telepek, melyek nem szelektiv körülmények között /malátás-élesztőkivonat/ sem mutattak szegregációt. A törzsre a továbbiakban Te jellel hivatkozok.

Anasztomózis haploid-haploid, haploid-diploid és diploid-diploid törzsek között

A sikeres fuziós kisérletek után felmerült a kérdés: vajon anasztomózis is létrehozható-e a különböző törzsek között?
Az "Anyagok és módszerek" részben leirt metodikával az alábbi párositásokat vizsgáltam meg: 1157 x 1156, 1156 x FGSC 476, 1157 x FGSC 476, 1157 x 5662, 5756 x 5662. Valamennyi esetben sikerült komplementálódott telepeket kapni. A telepek nagy része gyökeres növekedésü, szülői tipusu konidiumokat termelő heterokarion volt, de néhány tömött növekedésü, a konidiumokban is komplementációt mutató telepet is izoláltam, valamennyi variáns esetén.

A konidiumok DNS-tartalma

Annak tisztázására, hogy a haploid-diploid és a diploid-diploid fuzióban nyert egyenletes növekedésü, a konidiumokban is komplementálódott törzsek /Tr és Te/ ploiditásfoka milyen, kémiai DNS meghatározást végeztem. A vizsgálat az "Anyagok és módszerek" részben leirt metodikával történt. Az alábbi eredményt kaptam:

A törzsek jele	DNS-tartalom µg DNS/kon.
1157	$4,1 \pm 0,62 \times 10^{-8}$
1156	$4,1 \pm 0,48 \times 10^{-8}$
FGSC 476	$4,3 \pm 0,59 \times 10^{-8}$
FGSC 92	$3,9 \pm 0,74 \times 10^{-8}$
5756	$9,1 \pm 0,66 \times 10^{-8}$
5662	$9,6 \pm 0,70 \times 10^{-8}$
Tr	$9,4 \pm 0,63 \times 10^{-8}$
Te	$9,2 \pm 0,72 \times 10^{-8}$
FGSC 90	$8,9 \pm 0,74 \times 10^{-8}$

$$\text{Szórás: } S_x = \sqrt{\frac{/x-x_i/^2}{n-1}}$$

Látható, hogy az 5756 és az 5662 törzsek a várakozásnak megfelelően kétszeres DNS-tartalmat mutatnak, diploidok. Érdekes a Tr és a Te törzsek ugyancsak kétszeres DNS-tartalma, mely ezek diploid voltára utal. A két vad tipusu /természetből izolált/ összehasonlitó törzs közül /FGSC 90 és FGSC 92/ az FGSC 90 ugyancsak diploid, ami azért érdekes, mert a penészgombák általában haploid formában fordulnak elő.

A konidiumok átmérője

A konidiumokat 1 óráig duzzasztottam vizben, majd tárgylemezre száritva immerziós objektivvel fényképeket készitettem róluk. Ugyanezzel a beállitással lefényképeztem egy objektiv mikrométert is. A filmet kivetitve tolómérővel lemértem a konidiumok átmérőjét és az objektiv mikrométer osztásközeit. A két adatból kiszámitottam a konidiumok abszolut átmérőjét.

A törzsek jele	A konidiumok átmérője µm
1157	3,60 ±0,15
1156	3,32 ±0,21
FGSC 476	3,40 ±0,26
FGSC 92	3,62 ±0,30
5756	4,96 ±0,27
5662	4,72 ±0,29
Tr	4,96 ±0,32
Te	5,08 ±0,28
FGSC 90	4,98 ±0,31

A DNS-tartalom alapján diploidnak bizonyult törzsek konidium átmérője határozottan nagyobb, mint a haploid törzseké. A haploid és a diploid törzsek egymás között nem mutatnak számottevő eltérést.

Kisérlet sejtmagátmérő mérésére protoplasztokban, elektronmikroszkópos felvételek alapján

A konidiumok fénymikroszkópos átmérő mérései alapján arra gondoltunk, hogy talán a protoplasztok sejtmagjainak átmérőjében is kifejeződésre jut az egyes törzsek ploiditásának foka. Az elektronmikroszkópos felvételeket megvizsgálva azonban azt tapasztaltuk, hogy a protoplasztokban a sejtmag szabálytalan alaku, nem gömb. Igy méretének meghatározására sem nyujt lehetőséget a metszetek elektronmikroszkópos fényképezése. A fentiek szemléltetésére a 1157 törzs protoplasztjainak egy elektronmikroszkópos metszeti képét mutatja a 16. ábra.

Sejtmagok festése konidiumokban

A DNS-meghatározáshoz használt konidium szuszpenziót vettem igénybe a vizsgálathoz. A 30 percig 0 C-on PCA-val

Akadémiai Könyvtár SZEGED

végzett hidrolizis után mintát vettem, és vizzel háromszor mostam. Ezután 1 mg/ml desztillált vizben oldott akridinoranzzsal festettem 20 percig. Háromszor tiz perc mosás következett desztillált vizzel, majd tárgylemezre száritottam a szuszpenziót. A vizsgálatot immerziós objektivvel végeztem látható fényben, illetve ultraibolya fényben BG 3 fényforrás szürő és OG 4 okulár szürő alkalmazásával. Megszámoltam látható fényben a látómezőnkénti részecskék számát, és ehhez viszonyitottam az ultraibolya fényben zöld fluoreszcenciát mutató sejtmagok számát. A konidiumoknak csak egészen kis része /5%/ nem tartalmazott sejtmagot, és a törzsek között nem mutatkozik lényeges különbség ebből a szempontból. Több magvat tartalmazó konidium nem fordult elő.

A micéliumok tömegnövekedése tápoldatban

A különböző törzsek jellemzésére végeztem el a vizsgálatot. Malátás-élesztőkivonatos tápoldatot oltottam be azonos mennyiségü konidiummal. 30 C-on rázattam a tenyészeteket. 24 óránként lemértem az egy-egy mintában termelődött micélium száraz tömegét. Az eredmények az alábbi táblázatban és a 17. ábrán láthatók.

A törzs jele	mg micélium / 24 óra
FGSC 92	74
FGSC 476	32
1156	28
1157	50
FGSC 90	76
5662	56
5756	81
Tr	115
Te	104

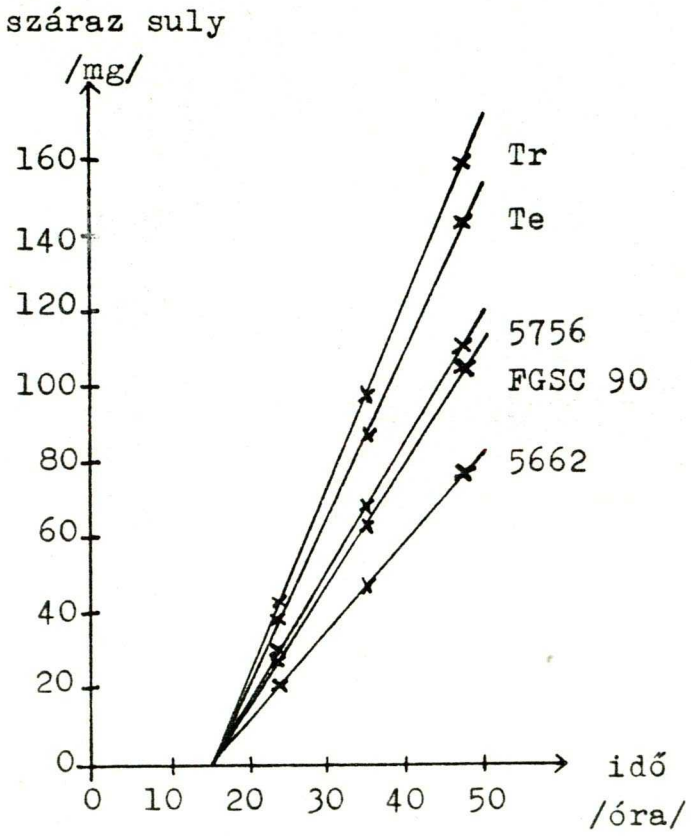
A haploid, hibás géneket hordozó törzsek mutatják a legrosszabb növekedést /1156, FGSC 476, 1157/. A mutáns fenotipusu diploid törzsek /5662, 5756/, illetve a prototróf haploid /FGSC 92/ és diploid /FGSC 90/ törzs már érzékelhetően erőteljesebb hozamot mutat. A prototróf Tr és Te törzs feltünően jó hozama valószinüleg azzal magyarázható, hogy bennük a gének olyan kedvező kombinációja szelektálódott ki, mely a magas hozamot lehetővé teszi.
A micélium tömeg-idő grafikonon látható, hogy a növekedés kb. 15 óra után jut lineáris szakaszba. A jelenség a konidiumok csirázásához szükséges latencia idővel magyarázható.

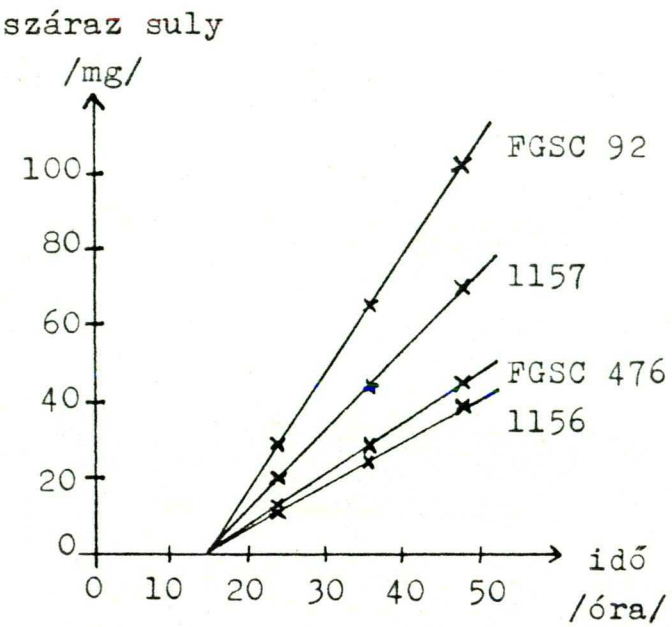
Összefoglalás, következtetések

Kisérleteim alapján megállapitottam, hogy egy haploid és egy diploid, illetve két diploid törzsből is létrehozható heterokarion. A protoplaszt fuzió éppugy alkalmas erre, mint a hifák anasztomózisa. A heteromarion a haploid törzsekből képzett heterokarionokkal teljesen azonos módon viselkedik.
A heterokarionokban kis gyakoriséggal a sejtmagok összeolvadása is megtörténhet, és átmeneti triploid illetve tetraploid állapot jön létre. A triploid és a tetraploid állapot azonban nem stabil, azonnal szétesnek diploidokká, melyek már stabilan viselkednek. A szelektiv táptalajon természetesen azt a diploidot fogjuk izolálni, melyben a kromoszómák olyan kombinációja fordul elő, hogy prototróf fenotipust eredményez. A nagyobb növekedési sebesség szintén szelekciós előnyt jelent, az ilyen törzs izolálása tehát valószinübb.
A Tr és a Te törzsek diploid voltát a konidiumok DNS-tartalma alapján állitom. A konidiumok nagyobb átmérője is jellemzi a diploid törzseket. A Tr és a Te konidium átmérője nem különbözik lényegesen a diploid törzsek konidium átmérőjétől.

16. ábra. A 1157 törzs protoplasztjának elektronmikroszkópos fényképfelvétele

17. ábra. A micéliumok tömegnövekedése tápoldatban

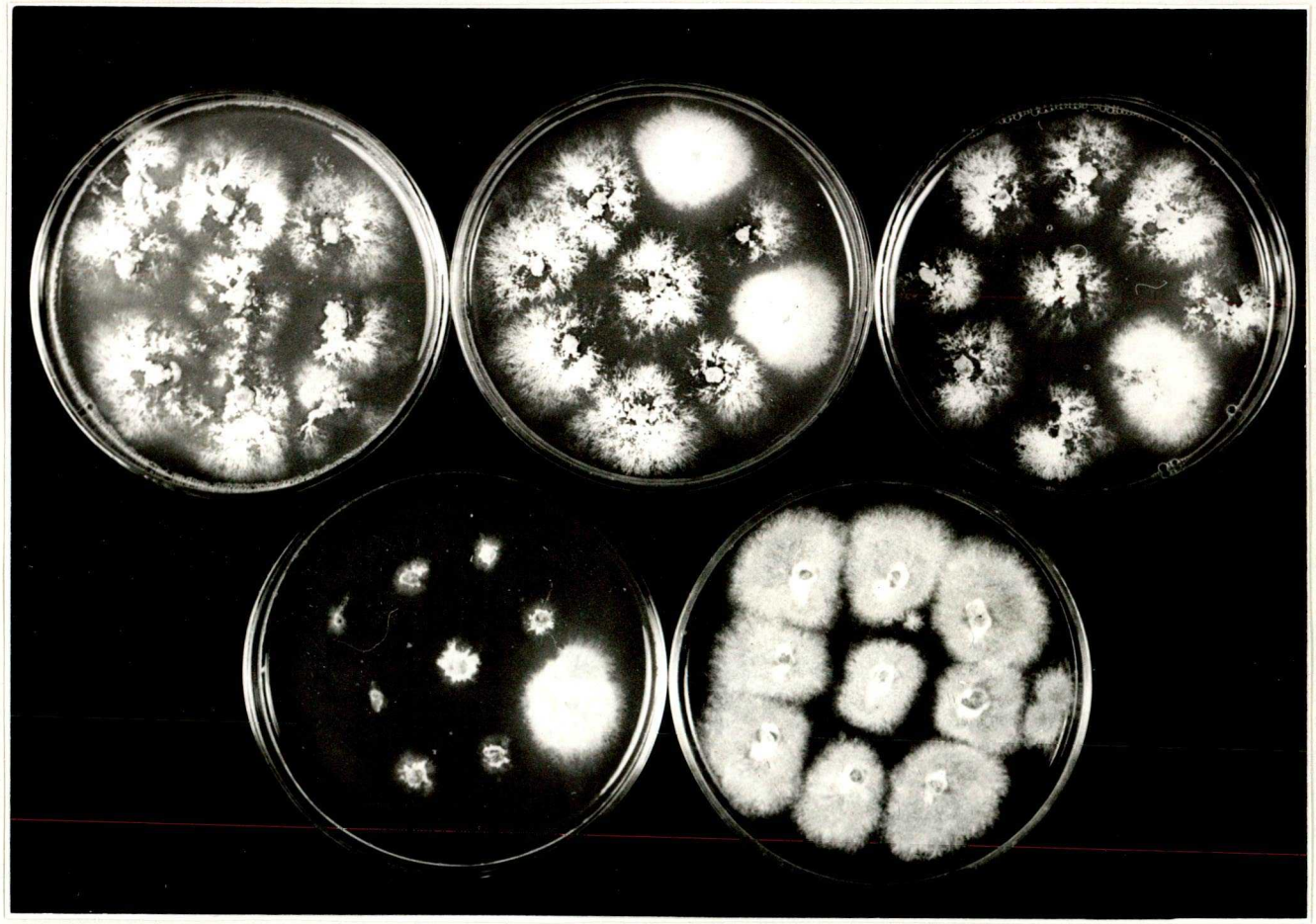




18. ábra. Az anasztomózis eredményeként létrejött telepek

Elrendezés:

1157 x 1156 1156 x FGSC 476 1157 x FGSC 476



Tr Te

Kossuth Könyvtár SZEGED

PROTOPLASZT FUZIÓ AZ EGYIK PARTNER HŐ-INAKTIVÁLÁSÁVAL

Célkitüzéseim

A nagy termelőképességü mikroorganizmus törzsek létrehozására gyakran alkalmaznak különféle genetikai manipulációkat. A protoplaszt fuzió is az egyik legreménytkeltőbb ilyen eljárás. A fuziós termék kinyeréséhez valamiféle szelekciós rendszert kell kiépiteni. A leggyakrabban különböző auxotróf mutánsokat alkalmaznak erre a célra. Nagyon sokszor azonban nem állnak rendelkezésre a megfelelő mutánsok. Előállitásuk nagyon munkaigényes, esetleg különféle problémák is felmerülnek, például a mutagén kezelés hatására az organizmus termelőképessége csökken. Ezért célul tüztem ki olyan szelekciós rendszer kidolgozását, ahol a törzsek genetikai anyagát kevésbé éri sérülés, és a mutánsok készitése elkerülhető. Elgondolásom szerint az egyik szülő a szokásos auxotróf mutáns lehet, esetleg, ha rendelkezésre áll, akkor egy "master" törzs is, a másik szülő protoplasztjait pedig hőkezeléssel inaktiválnám. Ezalatt azt értem, hogy olyan hőkezelésnek vetném alá, mely tönkreteszi a protoplasztok regenerációs képességét, de nem inaktiválja a genetikai anyagukat. A müködőképes genetikai anyag azután a másik szülő ép protoplasztjaival egyesülve kifejeződésre juthat.
Célom elérésére megvizsgáltam:
A vegetativ gombafonalak növekedési sebességét különböző hőmérsékleteken
A konidiumok pusztulását különböző hőmérsékleteken
A protoplasztok regenerációját különböző hőmérsékleteken végzett különböző idejü hőkezelések után
A hőkezeléskor a fonalakban és a protoplasztokban fellépő változásokat
A protoplaszt-konidiumok, illetve a protoplaszt-fonaldarabkák egymással való fuziójának lehetőségét
A protoplasztok-hőkezelt protoplasztok fuziójának eredményét

A gombafonalak növekedési sebessége különböző hőmérsékleteken

A vizsgálatokat a 1157 és a 1156 jelü Aspergillus nidulans törzseken végeztem el. Petricsészékbe kiöntött malátás-élesztőkivonatos táptalaj közepére tüvel nagyon kis területre konidiumokat juttattam, majd különböző hőmérsékletü termosztátokban inkubáltam a csészéket. 24 óránként 5 napig mértem a fejlődő telepek átmérőjét. Az eredmény a 19. és a 20. ábrán látható. A görbéket elemezve megállapitható, hogy a növekedés a leoltás után 15 órával lineáris függvényt mutat. A latencia periódus valószinüleg a konidiumok csirázásával van összefüggésben. Mindkét törzs 33-34 C hőmérsékleten mutatja a maximális növekedési sebességet, és 48 C-on már egyik sem növekszik értékelhető mértékben. Huzamosabb ideig /7 nap/ 50 C-on tartott csészékben rendkivül kis méretü, gyakorlatilag alig növekvő telep jelenik meg. A telep morfológiája nagyon "tömött". Mikroszkóp alatt fonalas szerkezet látható, a fonalak nagyon rövid szakaszokon sokszor elágaznak, nem ozmoszenzitivek, konidium képződés egyáltalán nem látható. A 7 napig 50 C-on tartott csészét 30 C-on inkubálva tovább, 3 nap mulva teljesen szabályos telep nőtt ki. A sejtek tehát nem pusztulnak el ezen a hőmérsékleten, csak fejlődési, növekedési folyamataik akadályozottak.

A konidiumok pusztulása hőkezelés hatására

A konidiumok vizes szuszpenzióját kémcsőben, ultratermosztát 50 C-os vizfürdőjébe állitva hőkezeltem. 5 percenként mintákat vettem 30 percen át. A mintákból azonos higitásokat készitettem. Malátás-élesztőkivonatos táptalajon, lemezöntéses módszerrel meghatároztam a csirázóképes konidiumok számát. Az eredmények a 21. ábrán lát-

hatók. A konidiumok nagymértékben ellenálltak a hőkezelés pusztitó hatásának, számuk kb. 27 perc alatt feleződött meg. Mikroszkóp alatt nem észlelhető morfológiai változás még 30 perc hőkezelés után sem.

Protoplasztok regenerációja a hőkezelés függvényében

Protoplaszt szuszpenziót készitettem az "Anyagok és módszerek" részben leirt módon. A 0,6 M KCl oldatban szuszpendált protoplasztokat kémcsőben, ultratermosztát vizfürdőjébe állitva hőkezeltem. 2 percenként mintát vettem automata pipettával 10 percen át. A 0,5 ml térfogatu mintákat 2 ml szobahőmérsékletü desztillált vizbe, illetve 0,6 M-os KCl-be fecskendezve azonnal lehütöttem. A regenerálódóképes részecskeszám meghatározása lemezöntéssel történt. A táptalaj 0,6 M KCl-lel stabilizált, illetve stabilizátor nélküli malátás-élesztőkivonatos agar volt. A 22. ábrán az un. ozmorezisztens frakció hőérzékenysége látható. Itt a mintákat a hőkezelés után desztillált vizes kezelésnek vetettem alá, mely hetására a protoplasztok szétrobbantak. Azok a részecskék tehát, amelyekből telep képes fejlődni, nem protoplasztok, hanem fonaldarabkák vagy konidiumok voltak. 10^6 részecskéből kevesebb mint 100 telep nőtt ki, tehát számuk nagyon kevés a protoplasztokéhoz viszonyitva. Hőérzékenységük lényegesen kisebb, mint a protoplasztoké, hasonló a konidiumok,illetve a hifák hőérzékenységéhez.
A 23. és 24. ábrán a protoplasztok hőérzékenysége látható. A vizsgálatokat a 1157 és a 1156 törzzsel egyaránt elvégeztem. A hőkezelés 50 C-on történt, a minták hütése pedig 2 ml szobahőmérsékletü 0,6 M KCl oldatba való fecskendezéssel. Látható, hogy a két törzs nagyjából azonos lefutásu görbét ad. Mindkét grafikon két szakaszból áll. A kezdeti meredek rész mutatja a protoplasztok hőérzékenységét, majd ellaposodik a függvény, az ozmorezisztens frakció kisebb hőérzékenységü részecskéinek nagyobb ellenállása miatt.

Morfológiai változások a protoplasztokban a hőkezelés hatására

A protoplaszt szuszpenziókból 50 C-on hőkezelve, mikroszkópos vizsgálat céljára, percenként mintákat vettem. A 4. perctől kezdve a protoplasztok citoplazmájában sajátságos rögösödés lépett fel, mely a 25/b. ábrán látható. A rögök száma kb. 30 db/protoplaszt. A protoplasztok száma még 10 perc hőkezelés után is változatlan, szétesés vagy törmelék megjelenése nem figyelhető meg.

Fuziós kisérlet konidiumok és protoplasztok, illetve fonaldarabkák és protoplasztok között

Az "Anyagok és módszerek"részben leirt szokásos fuziós metodikával kisérletet tettem fuzió létrehozására az egyik törzs konidiumai és a másik protoplasztjai között. Fuziós telepeket sem igy, sem a partnereket megcserélve nem kaptam. Akkor is eredménytelen volt a kisérlet, amikor a konidiumokat 10 órát előzetesen malátás-élesztőkivonatos tápoldatban előcsiráztattam. Ebből az eredményből következik, hogy a protoplaszt szuszpenzió un. ozmorezisztens frakciója nem játszik szerepet a fuzióban, zavaró tényezőként nem fog jelentkezni.

Protoplasztok fuziója az egyik partner hőkezelésével

Mindkét törzsből /1157 és 1156/ protoplaszt szuszpenziót készitettem az "Anyagok és módszerek" részben leirt módon. A szuszpenziókat három részre osztottam. Az egyik részt szobahőn tartottam, a másik rész 50 C-on 5 percig, a harmadik 50 C-on 10 percig kapott hőkezelést. A hőkezelés kémcsőben, ultratermosztát vizfürdőjébe állitva történt. A kezelési idő lejárta után jeges vizbe mártva

hütöttem le a kémcsöveket. A szuszpenziókból 0,1 ml-es mintákat vettem regenerációra, melyet 0,6 M KCl-lel stabilizált malátás-élesztőkivonatos táptalajon vizsgáltam lemezöntéses módszerrel.
A fuzióhoz 0,5 ml-es mintákat vettem. A fuziót az "Anyagok és módszerek" részben leirt módon végeztem. A lemezöntéshez használt fuziós táptalaj Lodder vitaminkeverék kiegészitést tartalmazott. Eredményeimet az alábbi táblázatban foglaltam össze:

A protoplaszt szuszpenziók részecskeszáma:
5×10^6 protoplaszt/ml

Kisérleti variáns	Telepek száma az agar lemezen
1157 x 1156	70-80 telep/cm^2
1157 H5 x 1156	20-30 telep/cm^2
1156 H5 x 1157	20-30 telep/cm^2
1157 H10 x 1156	10-15 telep/cm^2
1156 H10 x 1157	10-15 telep/cm^2
R 1157	összefolyó, kb. 5×10^5/csésze
R 1156	összefolyó, kb. 5×10^5/csésze
R 1157 H5	80-90 telep/csésze
R 1156 H5	100-120 telep/csésze
R 1157 H10	20-30 telep/csésze
R 1156 H10	35-50 telep/csésze

Jelölések:

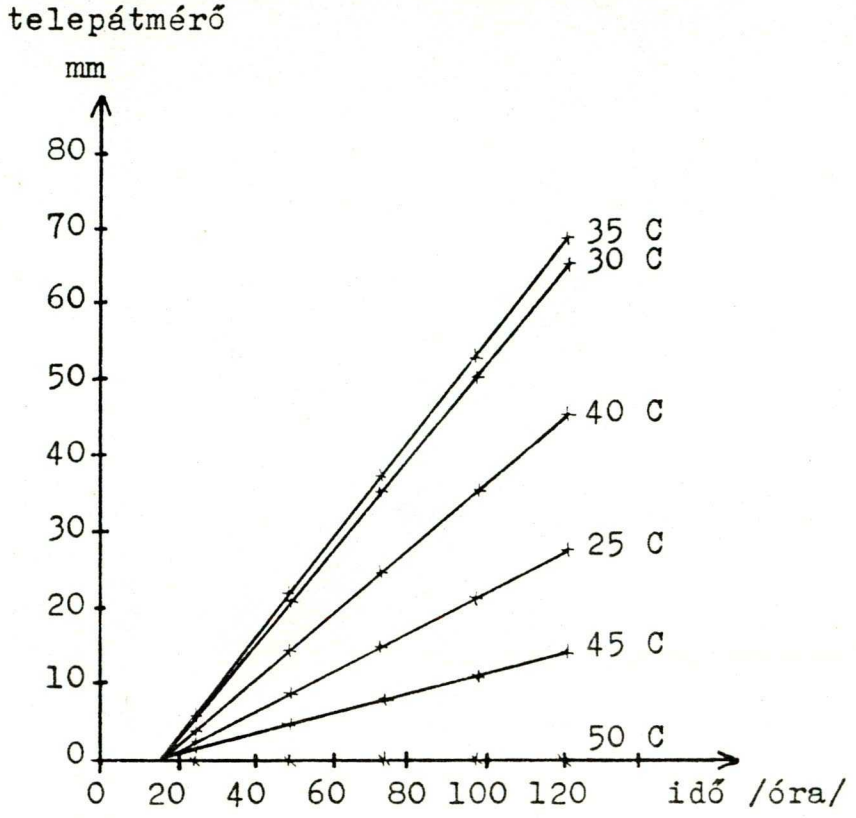
H5 = hőkezelve 50 C-on 5 percig
H10 = hőkezelve 50 C-on 10 percig
x = fuzió
R = regeneráció

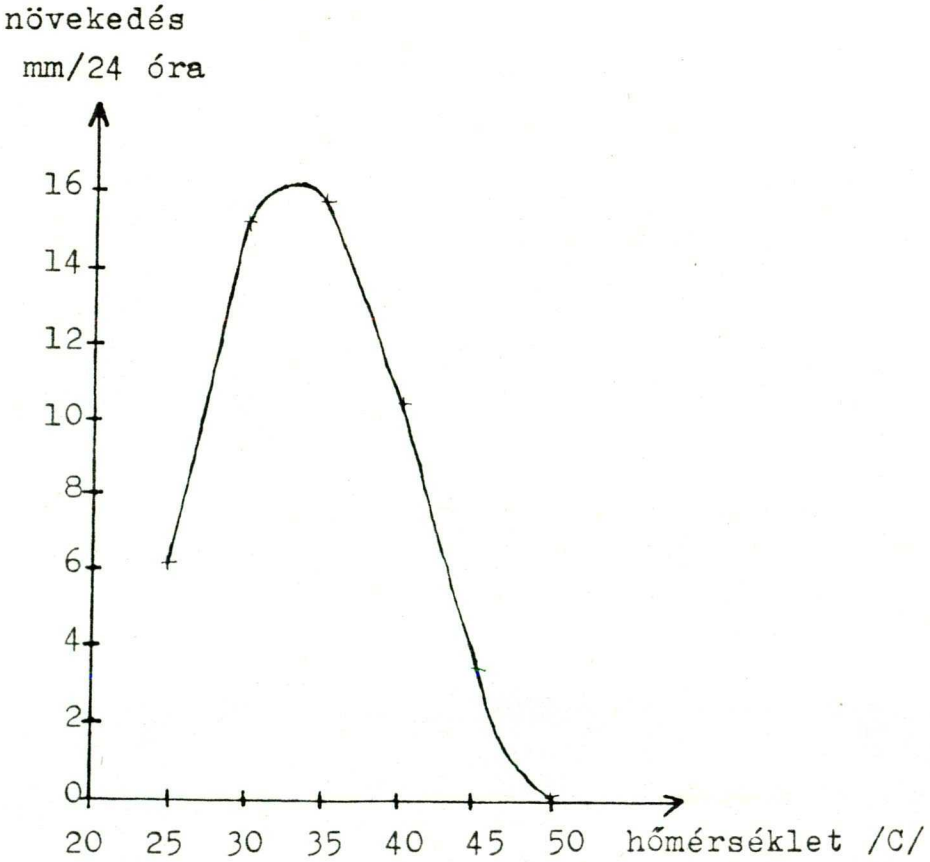
Az eredményt elemezve megállapitható, hogy a protoplaszt fuzió megvalósitható az egyik partner hőkezelésével, a fuziós telepek száma kb. 15–25%-a a nem hőkezeléssel végzett fuzió telepszámának. Az egyik partner hőkezelése alkalmas szelekciós rendszer a fuziós termék kinyerésére, mert a hőkezelt protoplasztok regenerációja kb. négy nagyságrenddel kisebb a hőkezeletlen protoplasztokhoz képest.

Összefoglalás

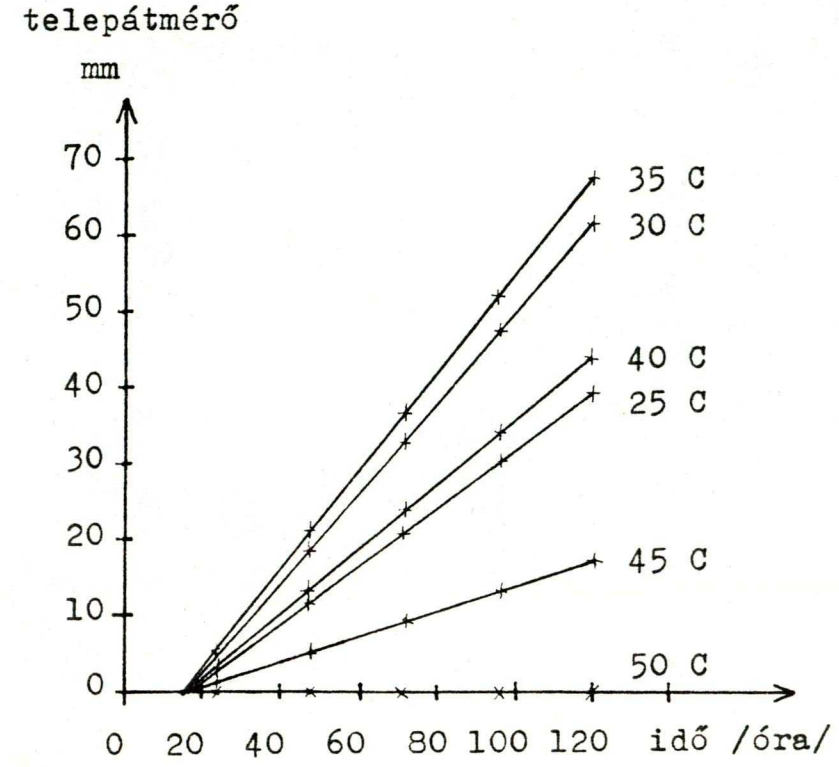
Eredményeim alapján megállapitható, hogy lehetséges olyan szelektiv módon hőkezelni a protoplasztokat, mely regenerációs képességüket megszünteti, de nem kárositja a genetikai anyagukat. Az inaktivált protoplasztok információ tartalma egy nem hőkezelt partnerrel való fuzió után ujra nüködőképes, a fuziós termékben megjelenik. A hőinaktiválással végzett protoplaszt fuzió uj lehetőséget jelent a genetikai vizsgálatok számára, és esetleg az iparilag felhasznált törzsek nemesitésénél is használható metodika.

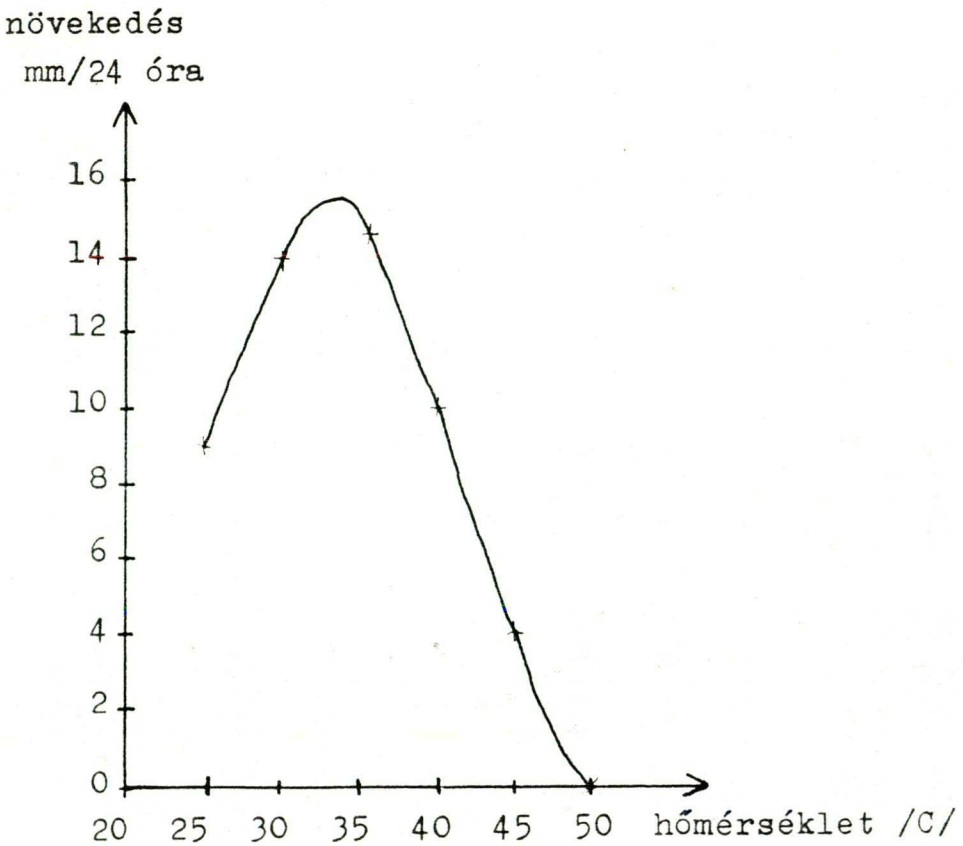
19. ábra. A 1157 törzs hőfok-növekedés függvénye



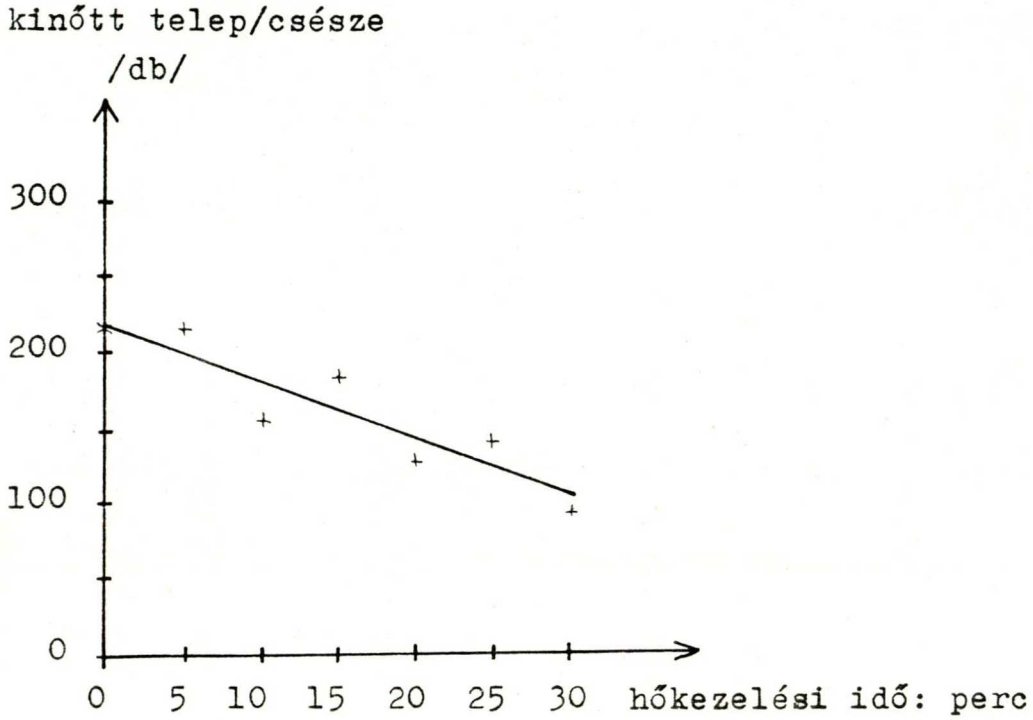


20. ábra. A 1156 törzs hőfok-növekedés függvénye

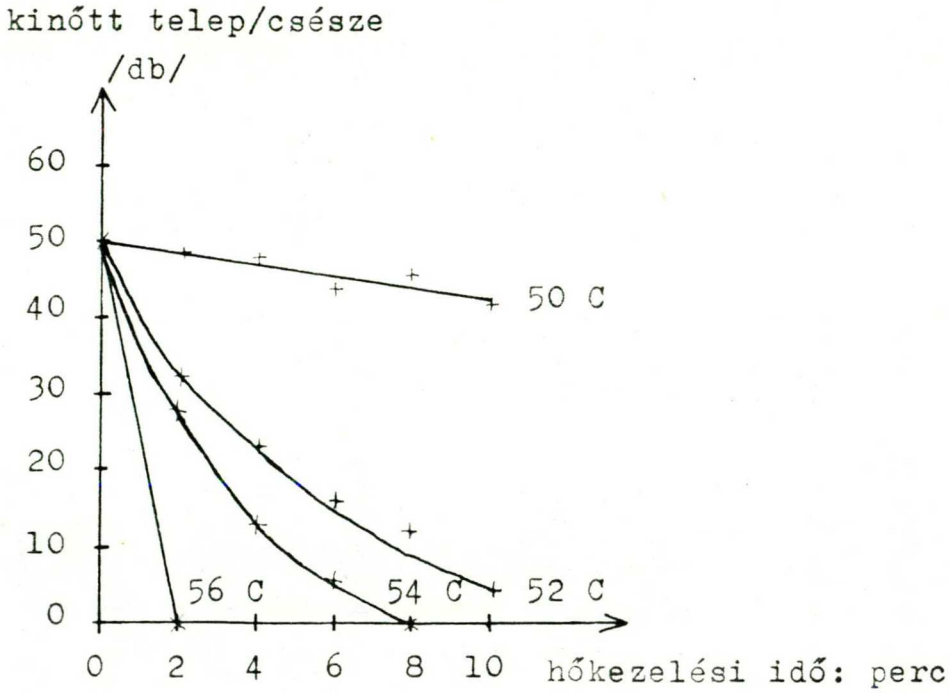




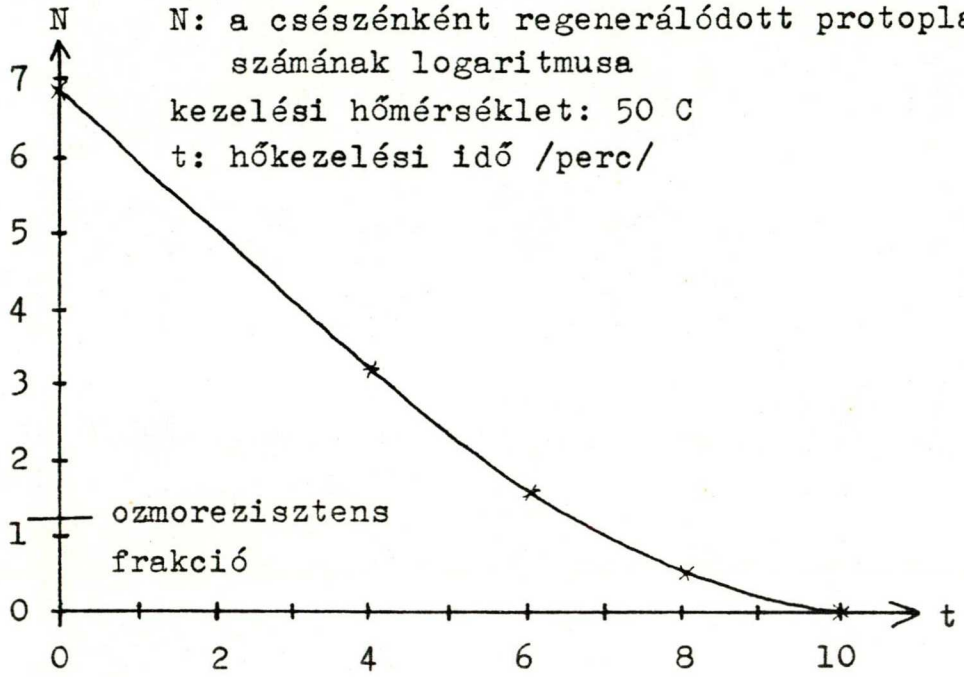
21. ábra. A 1157 konidiumok pusztulása hőkezelés hatására



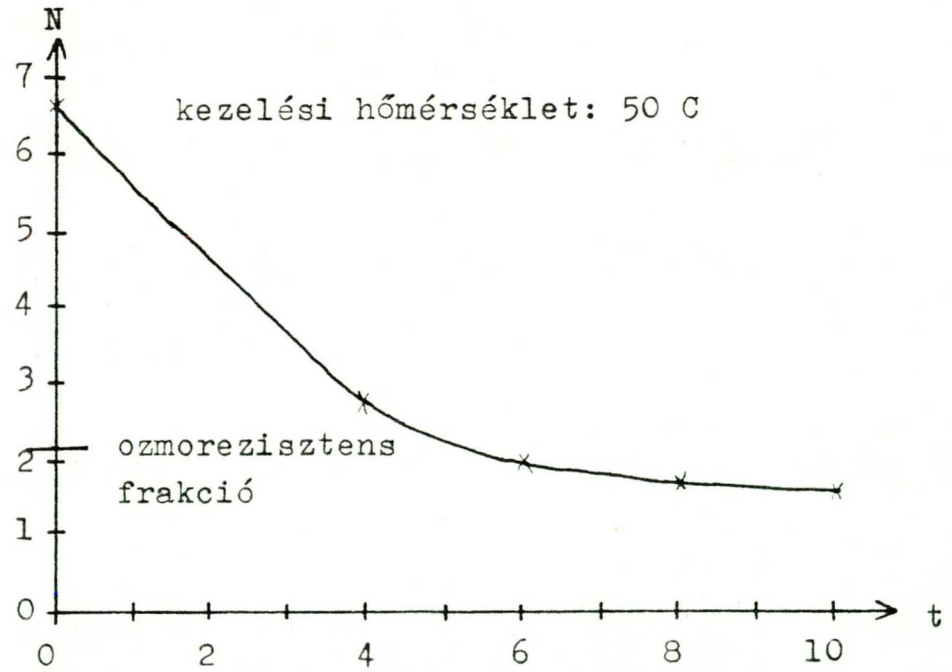
22. ábra. Az un. ozmorezisztens frakció hőérzékenysége a 1157 törzsön vizsgálva



23. ábra. A 1157 protoplasztok regenerációja a hőkezelési idő függvényében

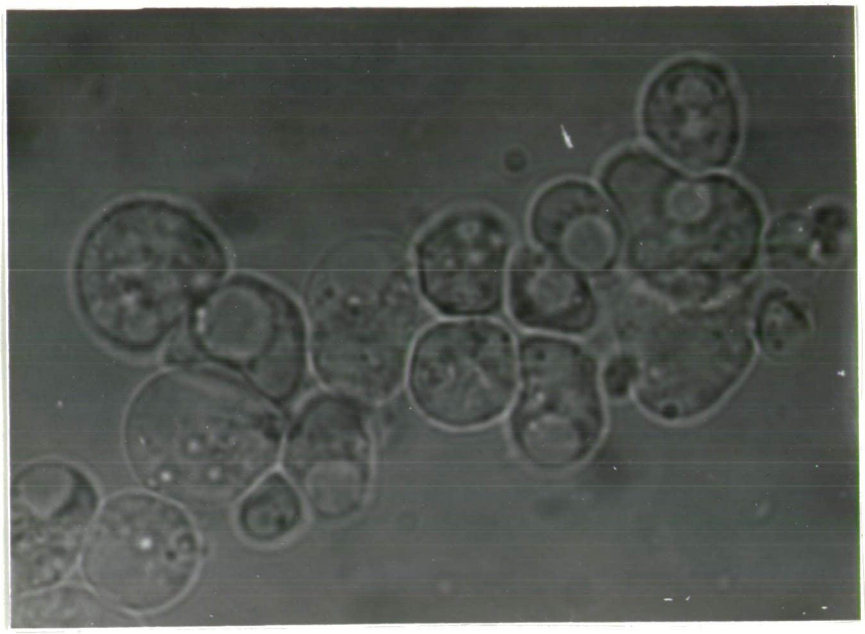


24. ábra. A 1156 protoplasztok regenerációja a hőkezelési idő függvényében

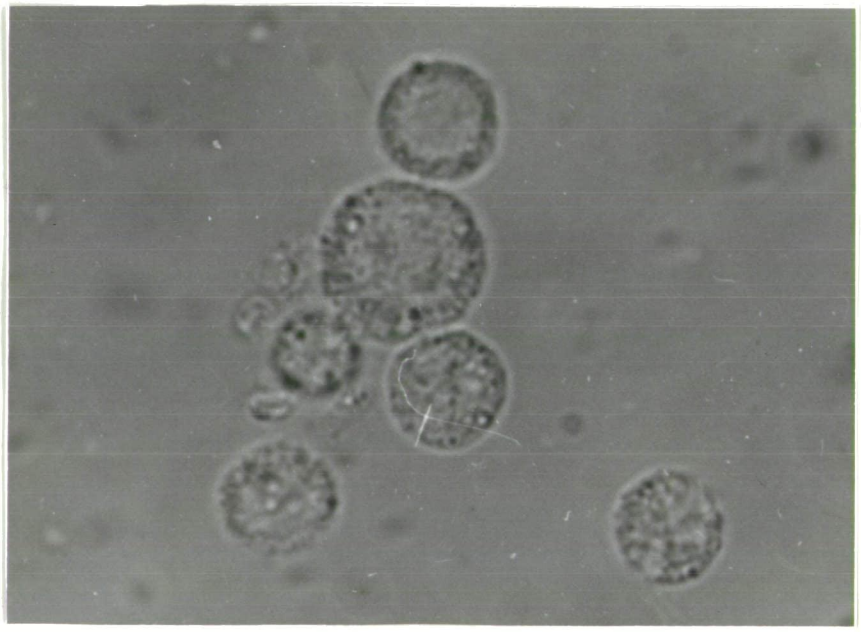


25. ábra. Protoplasztok mikroszkópos felvételei

a/ Hőkezeletlen protoplasztok



b/ Hőkezelt protoplasztok



IRODALOMJEGYZÉK

1. Barron G.L., MacNeill B.H. /1962/
A simplified procedure for demonstrating the parasexual cycle in Aspergillus.
Canad. J. of Botan., 40: 1321-1327.

2. Bignami M., Aulicino F., Velcich A., Carrere A., Morpurgo G. /1977/
Mutagenic and recombinagenic action of pesticides in Aspergillus nidulans.
Mut. Res., 46: 395-402.

3. Bignami M., Morpurgo G., Pagliani R., Carrere A., Gonti G., Giuseppe G /1974/
Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in Aspergillus nidulans.
Mut. Res., 26: 159-170

4. Caten C.E. /1969/
Genetic determination of conidial colour in Aspergillus heterocaryoticus and relationship of this species to Aspergillus amstelodami.
Trans. Br. Mycol. Soc., 73/1/: 65-74.

5. Clutterbuck A.J. /1973/
Gene symbols in Aspergillus nidulans.
Genet. Res., Camb. 21: 291-296.

6. Dassenoy B., Meyer J.A. /1973/
Mutagenic effect of benomyl on Fusarium oxysporum.
Mut. Res., 21: 119-120.

7. Davidse L.C., /1973/
Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate /MBC/ in Aspergillus nidulans.
Pesticide Biochemistry and Physiology, 3: 317-325.

8. Davidse L.C., Flach W. /1977/
Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of Aspergillus nidulans.
The Journal of Cell Biology, 72: 174-193.

9. Davidse L.C., Flach W. /1978/
Interaction of thiabendazole with fungal tubulin.
Biochimica at Biophisica Acta, 543: 82-90.

10. Ferenczy L. /1976/
Some characteristics of intra- and interspecific protoplast fusion products of Aspergillus nidulans and Aspergillus fumigatus.
in: Cell Genetics in Higher Plants.
ed: Dudits D., Farkas G.L., Maliga P.

11. Ferenczy L. /1980/
Fusion of protoplasts of auxotrophic fungal mutants: Diversity in the genetic background of nutritional complementation.
in: Advances in Protoplast Research, pp: 55-62.
ed: Ferenczy L., Farkas G.L.
Budapest: Akadémiai Kiadó Oxford: Pergamon Press

12. Ferenczy L. /1981/
Microbial protplast fusion.
in: Genetics as a Tool in Microbiology, pp: 1-34.
ed: Glover S.W., Hopwood D.A.
Cambridge: University Press

13. Ferenczy L. /1981/
Microbial protoplast fusion, pp: 74-75.
The Society for General Microbiology Quarterly, 8.

14. Ferenczy L., Kevei F., Szegedi M. /1975/
High-frequency fusion of fungal protoplasts.
Experientia, 31: 1028-30.

15. Ferenczy L., Kevei F., Szegedi M. /1976/
Fusion of fungal protoplast induced by polyethylene glycol.
in: Microbial and Plant Protoplasts, pp: 177-187.
ed: Peberdy J.F., Rose A.H., Rogers H.J., Cocking E.C.
London, New York, San Francisco: Academic Press.

16. Ferenczy L., Kevei F., Szegedi M., Frankó A., Rojik I. /1976/
Factors affecting high-frequency fungal protoplast fusion.
Experientia, 32: 1156-8.

17. Ferenczy L., Kevei F., Zsolt J. /1974/
Fusion of fungal protoplasts.
Nature, London 248: 793-4.

18. Ferenczy L., Maráz A. /1977/
Transfer of mitochondria by protoplast fusion in Saccharomyces cerevisiae.
Nature, London 268: 524-5.

19. Ferenczy L., Szegedi M., Kevei F. /1977/
Interspecific protoplast fusion and complementation in Aspergilli.
Experientia, 33: 184-85.

20. Fodor K., Demiri E., Alföldi L. /1978/
Polyethylene glycol-induced fusion of heat-inactivated and living protoplasts of Bacillus megaterium.
Journal of Bacteriology, 135: 68-70.

21. Hastie A.C. /1970/
Benlate-induced instability of Aspergillus diploids.
Nature, 226: 771

22. Hopwood D.A., Wright H.M. /1981/
Protoplast fusion in Streptomyces: Fusions involving ultraviolet-irradiated protoplasts.
Journal of General Microbiology, 126: 21-27.

23. Kappas A. /1978/
On the mechanisms of induced somatic recombination by certain fungicides in Aspergillus nidulans.
Mut. Res., 51: 189-197.

24. Kappas A., Georgopoulos S.G., Hastie A.C. /1974/
On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid Aspergillus nidulans.
Mut. Res., 26: 17-27.

25. Kappas A., Green M.H.L., Bridges B.A., Rogers A.M., Muriel W.J. /1976/
Benomil-a novel type of base analogue mutagen?
Mut. Res., 40: 379-382.

26. Kafer E., Upshall A. /1973/
The phenotypes of the eight disomics and trisomics of Aspergillus nidulans.
The Journal of Heredity, 64: 35.

27. Clutterbuck A.J. /1974/
Aspergillus nidulans.
in: Handbook of Genetics. Vol.1.
ed: King R.C.
New York: Plenum Press

28. Levi C., Rivas C.S., Schaeffer P. /1977/
Further genetic studies on the fusion of bacterial protoplasts.
FEMS Microbiology Letters, 2: 323-326.

29. Parag Y., Roper J.A. /1975/
Genetic control of cromosome instability in Aspergillus nidulans as a mean for gene amplification in eucaryotic microorganisms.
Molec. Genet.,287: 140-275.

30. Peberdy J.F. /1979/
Protoplasts-applications in microbial genetics.
in: A Handbook of Experimental Methods.
ed: Peberdy J.F.
Nottingham: Univ. of Nottingham, Dep. of Botany.

31. Pontecorvo G., Roper J.A., Hemmons L.M., MacDonald K.D., Bufton A.W.J. /1953/
The genetics of Aspergillus nidulans.
Advan. Genet. 5: 141-238.

32. Pontecorvo G., Tarr-Gloor E., Forbes E. /1954/
Analysis of mitotic recombination in Aspergillus nidulans.
J. Genet., 52: 226-237.

33. Roper J.A. /1952/
Production of heterozygous diploids in filamentous fungi.
Experientia, 8: 14-15.

34. Roper J.A. /1966/
The parasexual cycle.
in: The fungi. Vol.2. pp: 589-617.
ed: Ainsworth G.C., Sussman A.S.
New York: Academic Press.

35. Seiler J.P. /1972/
The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives I. Forvard and reverse mutations in Salmonella typhimurium caused by benzimidazole and some of its derivatives.
Mut. Res., 15: 273-276.

36. Seiler J.P. /1975/
Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds.
Mut. Res., 151-168.

37. Sisler H.D., Siegel M.R.
Antifungal compound. Vol.2.
ed: Marcel Dekker
New York, Basel

38. Upshall A., Giddings B., Mortimore I.D. /1977/
The use of benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of Aspergillus nidulans and Aspergillus tenens.
J. Gen. Microbiol., 100: 413-418.

39. Upshall A., Johnson P.E. /1981/
Thiram-induced abnormal chromosome segregation in Aspergillus nidulans.
Mut. Res. 89: 297-301.

SZTE Klebelsberg Könyvtár

Ezuton mondok köszönetet Dr. Ferenczy Lajos professzor Urnak, a Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének munkám irányitásáért, elméleti és gyakorlati tanácsaiért. Köszönöm Dr. Rojik Imrének az elektronmikroszkópos felvételek elkészitését, Forrai Tamásnénak a kisérletek elvégzéséhez nyujtott segitségét, Nagy Lajos Gergelynek a fényképfelvételek elkészitését.