

## Rekombinácia mitochondriálnych génov a hybridizácia kvasiniek

MARGITA OBERNAUEROVÁ — JÚLIUS ŠUBÍK

**Súhrn.** Na základe štúdia rekombinácie mitochondriálnych génov sa vypracoval postup hybridizácie kvasiniek, ktorý je nezávislý od párovacieho typu a absencie jadrových genetických znakov rodičovských kmeňov. Tento univerzálny postup sa dá využiť aj pri hybridizačnom šľachtení priemyselných kmeňov a zakladá sa na mitochondriálnej mutagenéze, konjugácii buniek alebo fúzii ich protoplastov, pričom potomstvo vzniknutých hybridov sa selektuje ako mitochondriálne rekombinanty.

Medzi základné spôsoby umožňujúce meniť genetickú informáciu kvasiniek patrí mutácia, rekombinácia a transformácia. Rekombináciu génov podmieňuje hybridizácia rodičovských buniek a sporulácia ich hybridného potomstva [1, 2]. Priemyselné kmene kvasiniek na rozdiel od laboratórnych sú však väčšinou pohlavne neaktívne, ťažko sporulujúce, bez jadrových genetických znakov a navyše polyploidné alebo aneuploidné [3, 4]. Pre recesívnu povahu väčšiny mutácií býva mutačné šľachtenie takýchto kmeňov málo efektívne [4, 5]. Oveľa účinnejšie je hybridizačné šľachtenie, ktoré je spojené s prekonávaním dvoch problémov. Prvý sa týka sexuálnej inkompatibility buniek rodičovských dvojíc, ktorý možno už dnes prekonať indukovanou fúziou protoplastov kvasiniek [6]. Druhý problém súvisí s identifikáciou hybridov a s nepoužiteľnosťou prototrofnej selekcie, resp. mikromanipulačnej techniky, najmä ak frekvencia tvorby zygôt je nízka.

Cieľom tejto práce bolo získať nové poznatky o rekombinácii mitochondriálnych génov po fúzii protoplastov kvasiniek *S. cerevisiae* a využiť ich pri univerzálnom postupe selekcie a hybridizácie prototrofných kmeňov kvasiniek bez ohľadu na ich párovacie typy a konjugáciu schopnosť. Predbežné výsledky tejto práce sa zverejnili na 3. sympóziu socialistických krajín o biotechnológii [7].

---

Ing. Margita Obernauerová, RNDr. Július Šubík, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

## Materiál a metódy

*Mikroorganizmy.* V práci sa použili kmene kvasiniek *S. cerevisiae* pochádzajúce zo zbierky Výskumného ústavu potravinárskeho v Bratislave, ako aj zbierky Centra molekulárnej genetiky, CNRS, Gif-sur-Yvette:

DPI-1B/514 (MAT $\alpha$ , *his* 1,  $\varrho^+E_{514}^R$ ),

101-4B (MAT $\alpha$  *ade* 1 *lys* 2  $\varrho^+M_{101}^R$ ),

IL 16-10B (MAT $\alpha$  *his* 1  $\varrho^+C^R$ ),

RM 511-44A (MAT $\alpha$  *ura* 1  $\varrho^+E^R$  O $^R$  P $^R$ ),

KL 14-4A (MAT $\alpha$  *his* 1 *trp* 2  $\varrho^+C_{321}^R$  O $_1^R$  P $_{454}^R$ ),

IL 216-1B (MAT $\alpha$  *ura* 1 *trp* 1  $\varrho^+E_{221}^R$ ),

KL 14-5C (MAT $\alpha$  *his* 1 *trp* 2  $\varrho^+_{321} R$  O $_1^R$  P $_{454}^R$ ).

*Spôsob kultivácie a kultivačné médiá.* Inokulá sa pripravili 24-hodinovou aeróbnou kultiváciou kmeňov v polosyntetickej pôde obsahujúcej 5 g/l peptónu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 20 g/l glukózy, zmes anorganických solí [8] pri 30 °C. Inokulum sa použilo na zaočkovanie tekutých polosyntetických médií toho istého zloženia. Bunky boli kultivované za trepania pri 30 °C v Erlenmeyerových bankách naplnených do 1/10 objemu rastovým médiom.

Pevné polosyntetické pôdy boli rovnakého zloženia ako tekuté a navyše obsahovali agar (20 g/l).

Glycerolové polosyntetické médium obsahovalo glycerol (20 g/l) namiesto glukózy. Mediá s antibiotikami sa pripravili pridaním roztoku antibiotika v etanole k autoklátovému glycerolovému médiu schladenému na teplotu 60 °C. Konečné koncentrácie antibiotík boli 3 mg chloramfenikolu/ml média, 2 mg erytromycínu/ml média a 0,5  $\mu$ g mucidínu/ml média.

Pevné minimálne médium obsahovalo glukózu (20 g/l), zmes anorganických solí [8] a zmes vitamínov: 10 mg inozitolu, 1 mg tiamín—HCl, 600  $\mu$ g pyridoxín—HCl, 600  $\mu$ g kyseliny nikotínovej, 600  $\mu$ g pantoténanu vápenatého, 10  $\mu$ g biotínu a 200  $\mu$ g riboflavínu v 1 l média.

*Konjugácia buniek* [9]. Bunky kvasiniek z exponenciálnej fázy rastu oboch rodičov sa zmiešali v pomere 1 : 1 (10<sup>7</sup> buniek : 10<sup>7</sup> buniek), doplnili sa na celkový objem 5 ml glukózovým polosyntetickým médiom a inkubovali aeróbne dve hodiny pri 30 °C. Bunky sa sedimentovali centrifugáciou (800 g, 5 min, 25 °C), nechali stáť 30 minút pri 30 °C, supernatant sa zliat a bunky sa suspendovali v 5 ml čerstvej polosyntetickej glukózovej pôdy. Tvorba zygot sa pozorovala mikroskopicky po 4 až 6 hodinách, resp. po 24 hodinách inkubácie. Selekcia hybridného potomstva sa uskutočnila výsevom premytých buniek na minimálne pôdy, kde vyrástli iba prototrofné diploidné bunky,

resp. na glycerolové pôdy obsahujúce vhodné koncentrácie antibiotík, kde vyrástli iba mitochondriálne rekombinanty.

*Príprava protoplastov* [10]. Protoplasty sa pripravili za aseptických podmienok s použitím sterilných roztokov. Dvakrát premyté bunky (1 g sušiny) sa suspendovali v 20 ml merkaptoetanolu ( $0,5 \text{ mol/dm}^3$ ), Tris-HCl ( $0,1 \text{ mol/dm}^3$ ) a EDTA ( $0,005 \text{ mol/dm}^3$ ) (etyléndiamíntetraacetát), pH 9,3 a inkubovali 10 minút pri  $30^\circ\text{C}$ . Suspenzia sa scentrifugovala, bunky sa premyli KCl ( $0,6 \text{ mol/dm}^3$ ), suspendovali v 10 ml KCl ( $0,6 \text{ mol/dm}^3$ ) obsahujúcom 200 mg lyofilizovaného enzýmového výťažku zo žalúdkov slimákov a inkubovali pri  $30^\circ\text{C}$  za občasného premiešania. Tvorba protoplastov sa sledovala mikroskopicky diferenciálnym počítaním vzoriek riedených vodou, resp. KCl ( $0,6 \text{ mol/dm}^3$ ). Po vytvorení protoplastov sa suspenzia scentrifugovala (10 minút pri 1000 g), protoplasty sa dvakrát premyli 10 ml KCl ( $0,6 \text{ mol/dm}^3$ ) a raz 10 ml  $\text{CaCl}_2$  ( $0,3 \text{ mol/dm}^3$ ).

*Fúzia protoplastov a selekcia fúzných produktov* [10]. Protoplasty rodičovských kmeňov ( $1 \cdot 10^8$  protoplastov z každého kmeňa) suspendované v  $\text{CaCl}_2$  ( $0,3 \text{ mol/dm}^3$ ) sa zmiešali v pomere 1 : 1, sedimentovali centrifugáciou a resuspendovali v minimálnom objeme  $\text{CaCl}_2$  ( $0,3 \text{ mol/dm}^3$ ). Fúzia sa indukovala pridaním 2 ml PEG (polyetylén glykol,  $M_r$  4000) (300 g/l), ktorý obsahoval  $\text{CaCl}_2$  ( $0,1 \text{ mol/dm}^3$ ). Po 15–30 min sa suspenzia protoplastov zriedila vytemperovaním, na  $42^\circ\text{C}$  vhodne zvoleným objemom osmoticky stabilizovaného agaru (25 g/l), obsahujúceho  $\text{CaCl}_2$  ( $0,3 \text{ mol/dm}^3$ ) a vyliala sa v tenkej vrstve na osmoticky stabilizované (KCl,  $0,6 \text{ mol/dm}^3$ ) pevné polosyntetické glukóзовé, minimálne a glycerolové médiá s antibiotikami. Kým na polosyntetickej pôde vyrástli všetky zregenerované protoplasty, k selekcii fúzných produktov po komplementácii jadrových mutácií dochádzalo na minimálnych pôdach, resp. glycerových pôdach obsahujúcich vhodnú kombináciu antibiotík, kde vyrástli iba mitochondriálne rekombinanty.

*Indukcia mitotickej haploidácie* [11, 12]. Bunky kvasiniek sa vysiali na pevnú polosyntetickú glukózovú pôdu obsahujúcu benomyl  $25 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Po 3–4 dňoch rastu sa vyrastené kolónie zmyli sterilnou destilovanou vodou, zriedili sa a vysiali na pevnú polosyntetickú glukózovú pôdu bez benomylu. Po troch dňoch rastu sa vyrastené kolónie podrobili analýze jadrových znakov.

*Analýza rekombinácie a segregácie mitochondriálnych génov* [8, 13]. Bunky potomstva hybridov vzniknutých konjugáciou alebo fúziou protoplastov sa zriedili a v množstve 50 buniek na misku vysiali na pevné minimálne pôdy. Takto vyrastené kolónie sa po 3 dňoch replikovali na selektívne glycerolové médiá obsahujúce príslušné antibiotiká. Rast replikovaných kolónií sa vyhodnotil po 3, resp. 5 dňoch inkubácie pri  $30^\circ\text{C}$ .

## Výsledky a diskusia

Hybridizácia laboratórnych kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae* sa vo väčšine prípadov zakladá na prirodzenej konjugácii auxotrofných buniek opačných párovacích typov (MATa a MAT $\alpha$ ) a selekcii prototrofného hybridného potomstva. Po splynutí buniek plazmogamii sprevádza karyogamia a vzniknutá zygota získava genetickú informáciu oboch rodičov. Dochádza ku komplementácii jadrových génov, k rekombinácii a následnej segregácii mitochondriálnych génov. Ak má hybridná bunka niektoré gény v heterozygotnom stave, jej fenotyp je určený dominantnými alelami zodpovedajúcich génov. Hybridizácia buniek neschopných konjugácie sa dá uskutočniť indukovanou fúziou ich protoplastov [2, 6, 14].

S cieľom využiť pri hybridizácii a selekcii hybridného potomstva kvasiniek dominantné mitochondriálne gény namiesto recesívnych jadrových génov preskúmala sa najprv rekombinácia mitochondriálnych génov po konjugácii buniek i po fúzii ich protoplastov. Zistilo sa, že rekombinácia mitochondriálnych génov kvasiniek *S. cerevisiae* nezávisí ani od pozadia párovacích typov rodičovských buniek ( $a-\alpha$ ,  $a-a$ ,  $\alpha-\alpha$ ), ani od spôsobu prenosu mitochondriálnych génov — konjugáciou buniek alebo fúziou protoplastov (tab. 1). Táto skutočnosť umožňuje pri vhodne zvolenej kombinácii mitochondriálnych genetických znakov selektovať hybridy ako mitochondriálne rekombinanty po konjugácii buniek i po fúzii ich protoplastov.

Po konjugácii rodičovských buniek opačných párovacích typov, nesúcich doplnkové nutričné deficiencie, bola účinnosť selekcie hybridov ako prototrofov rovnako efektívna ako selekcia mitochondriálnych rekombinantov schopných vyrásť na glycerole v prítomnosti oboch mitochondriálnych inhibítorov — erytromycínu a mucidínu súčasne (tab. 2). Za týchto podmienok potomstvo každej prototrofne selektovanej zygoty obsahovalo mitochondriálne rekombinanty typu E<sup>R</sup>M<sup>R</sup> a na druhej strane, bunky všetkých primárne selektovaných mitochondriálnych rekombinantov boli prototrofné a sporulujúce.

Oveľa komplexnejší obraz sa však pozoroval po fúzii protoplastov kvasiniek. Potomstvo sa analyzovalo po regenerácii a raste protoplastov po fúzii rodičov 101-4B (MAT $\alpha$ ) a IL 8-8D (MATa), na osmoticky stabilizovaných polosyntetických glukózových pôdach, resp. pôdach selektujúcich buď prototrofy, buď iba mitochondriálne rekombinanty. Zistilo sa, že rýchlosť regenerácie, reverzie a rastu fúzných produktov je najväčšia na polosyntetických glukózových pôdach (kolónie viditeľné po 2 dňoch), intermediárna na minimálnych pôdach (kolónie viditeľné po 5 dňoch) a najmenšia na glycerolových pôdach s kombináciou oboch inhibítorov (kolónie viditeľné po 12 dňoch).

Na polosyntetických glukózových pôdach rástlo popri potomstve rodičov-

sa vo väčšine  
niak opäťných  
hybridného po-  
tia a vzniknutá  
ku komplemen-  
ochondriálnych  
nom stave, jej  
r. Hybridizácia  
on fúziou ich  
stva kvasiniek  
trových génov  
po konjugácii  
mitochondriál-  
ovaciích typov  
ochondriálnych  
. Táto skutoč-  
ch genetikých  
po konjugácii  
pov, nesúciach  
ako prototro-  
nantov schop-  
inhibítorov —  
ok potomstvo  
riálne rekombi-  
ne selektova-  
ujúce.  
tor kvasiniek.  
o fúzii rodičov  
ých polysynte-  
tototrofy, budú  
tácie, reverzie  
kózových pô-  
nych pôdach  
iach s kombi-  
astve rodičov-

Tabuľka 1. Prenos a rekombinácia mitochondriálnych génov po konjugácii buniek a fúzii protoplastov kvasiniek *S. cerevisiae*  
Table 1. The transfer and the recombination of mitochondrial genes after the cell conjugation and also after the protoplast fusion of the yeast *S. cerevisiae*

Kmene a ich genotyp <sup>1</sup>		Spôsob hybridizácie; Párovacie typy <sup>2</sup>	Prenos mito-chondriálnych génov <sup>3</sup>		Rekom-binácia medzi znakmi O—E- [%]	Diploidy (% celkového počtu)-				Celkový počet analyzo-vaných kolónií <sup>6</sup>
ORES	OSER		ES	OR		ORES	ORER	OSES	OSER	
			[%]							
KL 14-4A <i>his</i> 1 <i>trp</i> 2	IL 216-1B <i>ura</i> 1 <i>trp</i> 1	fúzia <sup>7</sup> $a + \alpha$ kríženie <sup>8</sup> $a \times \alpha$ fúzia <sup>7</sup> $a + \alpha$ kríženie <sup>8</sup> $a \times \alpha$	26,6 35,6 17,2 19,2	33,6 35,5 13,1 15,7	24,2 15,9 7,5 9,5	18,0 27,6 11,4 12,7	15,6 7,9 1,7 3,0	8,6 8,0 5,8 6,5	57,8 56,5 81,1 77,8	628 262 359 370
KL 14-4A <i>his</i> 1 <i>trp</i> 2	IL 8-8D <i>ura</i> 1	fúzia <sup>7</sup> $a + a$	59,6	54,2	16,8	48,5	5,7	11,1	34,7	423
KL 14-5C <i>his</i> 1	IL 216-1B <i>ura</i> 1	fúzia <sup>8</sup> $\alpha + \alpha$	34,4	37,6	18,4	26,8	10,8	7,6	54,8	434

ských buniek i potomstvo fúzných produktov, tvoriacich nápadne väčšie kolónie ako rodičovské bunky, ktoré v prípade adenín-deficitného kmeňa 101-4B boli navyše i ružové. Pri tom istom stupni riedenia v prípade dvojice kmeňov 101-4B a IL 8-8D najviac fúzných produktov, identifikovaných rastom na minimálnych pôdach, objavilo sa na osmoticky stabilizovaných polosyntetických glukózových pôdach, približne 4-krát menej na osmoticky stabilizovaných glycerolových pôdach s inhibítormi a najmenej (100 až 200-krát) na osmoticky stabilizovaných minimálnych pôdach.

Analýzou populácie hybridných buniek fúzných produktov vzniknutých na osmoticky stabilizovaných komplexných glukózových pôdach (zmytím všetkých kolónií, výsevom ich buniek na minimálne pôdy a replikou z nich vyrastených kolónií na glycerolové pôdy s inhibítormi) sa zistilo (tab. 3), že po fúzii protoplastov je obraz prenosu, rekombinácie a segregácie mitochondriálnych génov typický ako v kríženiach [13, 15, 16, 18], splňujúce všetky záko-

Tabuľka 2. Efektívnosť selekcie hybridov ako prototrofov alebo mitochondriálnych rekombinantov po konjugácii auxotrofných kmeňov *S. cerevisiae* líšiacich sa párovacím typom, jadrovými a mitochondriálnymi genetickými znakmi. Analýza populácie po 4 h synchrónnej konjugácie  
Table 2. Efficiency of hybrid selection like prototrophs or mitochondrial recombinants after the conjugation of auxotrophic strains *S. cerevisiae* differing in the mating types, nuclear and mitochondrial genetic markers. Progenies analysed after 4 h of synchronous mating

Kmene a ich genotyp <sup>1</sup>	Percento zygot za 4 h <sup>2</sup>	Počet selektovaných hybridných kolónií na <sup>3</sup>			
		minimálnej pôde-		glycerolovej pôde obsahujúcej <sup>5</sup>	
				erytro- mycín + mucidín <sup>6</sup>	erytro- mycín + chloram- fenikol <sup>7</sup>
		Prototrofy <sup>8</sup>		Mitochondriálne rekombinanty <sup>9</sup>	
		SPO+/ERM <sup>r</sup>	SPO+/ERC <sup>r</sup>	ERM <sup>r</sup> /SPO+	ERC <sup>r</sup> /SPO+
101-4B × IL 8-8D α ade 1 lys 2 MR × × a ura 1 ERC <sup>r</sup>	15,4	444/444	—	441/441	—
IL 16-10B × × RM 511-44A α his 1 CR × × a ura 1 ERORPR	2,1	—	341/341	—	312/312

<sup>1</sup>Strains and their genotypes; <sup>2</sup>Percentage of zygotes in 4 h; <sup>3</sup>Number of selected hybrid colonies on; <sup>4</sup>Minimal medium; <sup>5</sup>Glycerol medium containing; <sup>6</sup>Erythromycin + mucidin; <sup>7</sup>Erythromycin + chloramphenicol; <sup>8</sup>Prototrophs; <sup>9</sup>Mitochondrial recombinants.

Tabuľka 3. Rekombinácia mitochondriálnych génov a selekcia fúzných produktov kmeňov *S. cerevisiae* 101-4B a IL 8-8D po regenerácii protoplastov na osmoticky stabilizovaných polosyntetických glukózových pôdach

Table 3. The recombination of mitochondrial genes and the selection of fusion products of the strains *S. cerevisiae* 101-4 B and IL 8-8D after the regeneration of protoplasts on the osmotically stabilized semisynthetic glucose medium

A. Analýza populácie prototrofných fúzných produktov <sup>1</sup>								
Fúzia protoplastov kmeňov <sup>2</sup>	Prenos génov <sup>3</sup> [%]		Rekombinácia medzi génmi E—M <sup>4</sup> [%]	Genotyp klonov (% celkového počtu) <sup>5</sup>				Počet analyzovaných klonov <sup>6</sup>
	ER	MS		ESMR	ERMS	ERMR	ESMS	
101-4B + IL 8-8D	57,6	55,7	21,1	32,8	46,1	11,5	9,6	375
B. Analýza primárnych fúzných klonov <sup>7</sup>								
ERMR medzi prototrofmami <sup>8</sup> [%]		Počet analyzovaných klonov <sup>9</sup>		Prototrofy medzi ERMR <sup>10</sup> [%]		Počet analyzovaných klonov <sup>11</sup>		
47,2		110		100		104		

<sup>1</sup>A. Analysis of the population of prototrophic fusion products; <sup>2</sup>Protoplast fusion of strains;

<sup>3</sup>Gene transfer; <sup>4</sup>Recombination between E-M genes; <sup>5</sup>Genotype of clones (% of total number);

<sup>6</sup>Number of analysed clones; <sup>7</sup>B. Analysis of primary fusion clones; <sup>8</sup>ERMR between prototrophs;

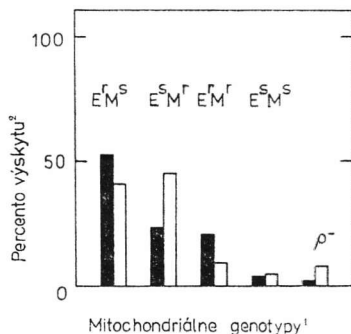
<sup>9</sup>Number of analysed clones; <sup>10</sup>Prototrophs between ERMR; <sup>11</sup>Number of analysed clones.

nitosti mitochondriálnej genetiky [17]. Celková frekvencia rekombinácie medzi dvoma mitochondriálnymi génmi bola 21,1 %, z ktorých približne polovica (11,5 %) pripadala na selektovateľné rekombinanty genotypu E<sup>R</sup>M<sup>R</sup>.

Analýza individuálnych, tvarove väčších kolónií, vyrastených na osmoticky stabilizovaných polosyntetických glukózových pôdach, ktoré sa na základe sporulačnej schopnosti a rastu na minimálnej pôde identifikovali ako hybridné fúzne produkty, však ukázala, že iba 47,2 % takýchto primárnych kolónií hybridov obsahuje i bunky mitochondriálnych rekombinantov genotypu E<sup>R</sup>M<sup>R</sup>. Znamená to, že frekvencia fúzných produktov po regenerácii na komplexných glukózových pôdach je podstatne vyššia ako frekvencia kolónií fúzných produktov následne identifikovaných podľa výskytu mitochondriálnych rekombinantov v primárnych klonoch vzniknutých hybridov. Za uvedených podmienok regenerácie protoplastov však každá kolónia identifikovaná primárne ako mitochondriálny rekombinant bola súčasne prototrofná a sporujúca (tab. 3).

Kvalitatívne podobný obraz sa získal i po fúzii rodičovských kmeňov 101-4B a DPI-1B/514 identických párovacích typov MAT $\alpha$ , nesúcich komplementárne nutričné deficiencie, kde však popri nesporulujúcich diploidných prototrofoch sa objavili navyše i haploidné auxotrofné mitochondriálne rekombinanty — cybridy — nesúce jadro iba jedného z rodičov (MAT $\alpha$  *ade* 1 *lys* 2 M<sup>R</sup>E<sup>R</sup>, resp. MAT $\alpha$  *his* 1 M<sup>R</sup>E<sup>R</sup>) [18].

Kým po fúzii a regenerácii protoplastov na glukózovej polosyntetickej pôde až 47,2 % primárnych fúzných klonov obsahovalo súčasne mitochondriálne znaky oboch rodičov (101-4B + IL 8-8D) — genotyp E<sup>R</sup>M<sup>R</sup> — prototrofne selektované primárne fúzne klony, regenerované na osmoticky stabilizovaných minimálnych glukózových pôdach, obsahovali mitochondriálne rekombinanty genotypu E<sup>R</sup>M<sup>R</sup> už iba 20,7 % a v prípade dvojice rodičov 101-4B a DPI-1B/514 už iba 9,1 % všetkých analyzovaných kolónií (obr. 1). V tomto prípade sa hybridný charakter selektovaných prototrofov, homozygotných v párova-



Obr. 1. Výskyt mitochondriálnych genetických znakov v prototrofne selektovaných primárnych fúzných klonoch regenerovaných na osmoticky stabilizovanej minimálnej pôde. Plné stĺpce — fúzia protoplastov kmeňov *S. cerevisiae* 101-4B + IL 8-8D ( $\alpha$  +  $\alpha$ ), prázdne stĺpce — fúzia protoplastov kmeňov *S. cerevisiae* 101-4B + DPI-1B ( $\alpha$  +  $\alpha$ ).

Fig. 1. The occurrence of mitochondrial genetic markers in prototropically selected primary fusion clones which were regenerated on the osmotically stabilized minimal medium. Full columns — the fusion of protoplasts of *S. cerevisiae* strains 101-4B + + IL 8-8D ( $\alpha$  +  $\alpha$ ), empty columns — the fusion of protoplasts of *S. cerevisiae* strains 101-4B + DPI-1B ( $\alpha$  +  $\alpha$ ). <sup>1</sup>Mitochondrial genotypes; <sup>2</sup>Occurrence percentage.

com type (MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ ), dokázal mitotickou haploidáciou benomylom, po ktorej došlo k vyštiepeniu jadrových genetických znakov jedného i druhého rodiča. V oboch prípadoch sa popri rodičovských a rekombinovaných mitochondriálnych genotypoch objavili aj respiračne-deficitné fúzne produkty ( $\rho^-$ ). Zvýšený výskyt prototrofných homoplazmických primárnych hybridných klonov, nesúcich molekuly mitochondriálnej DNA iba jedného rodiča, je pravdepodobne dôsledkom spomalenia delenia buniek po karyogamii,

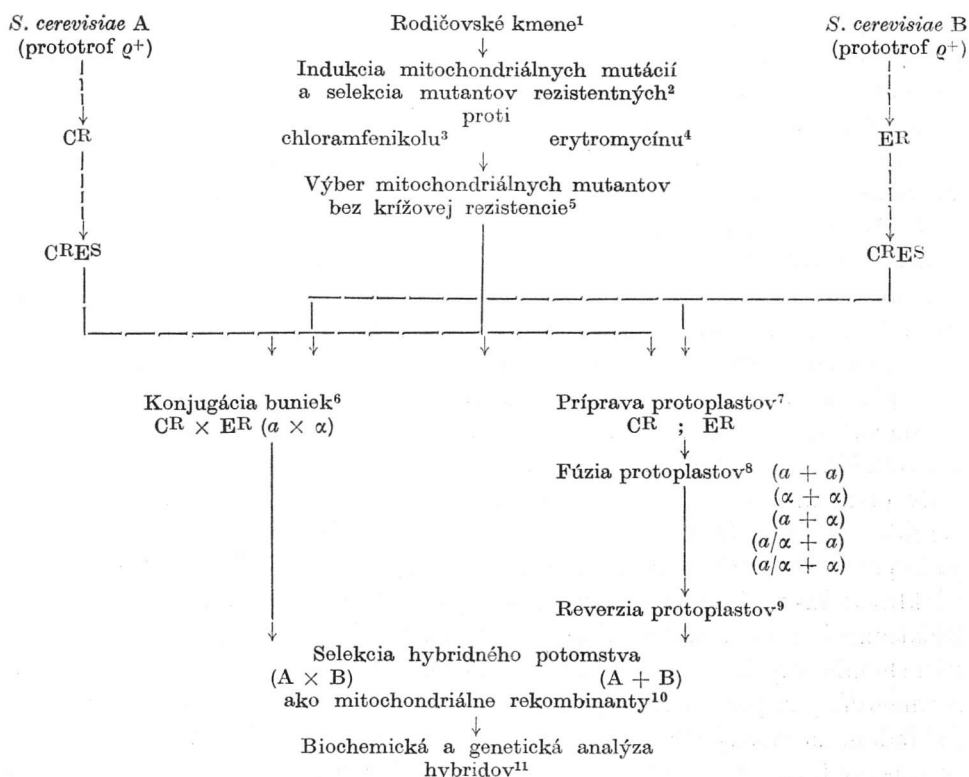


počas regenerácie a reverzie protoplastov, ktorá je na minimálnej pôde oveľa pomalšia ako na polosyntetickej glukózovej pôde. Podobný jav sa pozoroval pôvodne i pri fúzii protoplastov kvasiniek *Schizosaccharomyces pombe* [19, 20].

Analýza fúzných produktov protoplastov kmeňov 101-4B a IL8-8D regenerovaných a selektovaných ako mitochondriálne rekombinanty genotypu  $E^R M^R$  na osmoticky stabilizovanej glycerolovej pôde s erytromycínom a mucidínom však ukázala, že z 332 analyzovaných klonov všetky boli prototrofné a sporujúce. Navyše počet hybridov primárne selektovaných ako mitochondriálne rekombinanty bol rádovo väčší ako počet hybridov selektovaných paralelne na prototrofiu na minimálnych pôdach.

Z výsledkov práce vyplýva, že na rozdiel od konjugácie buniek po fúzii protoplastov nie každý primárne vzniknutý hybridný klon musí nevyhnutne obsahovať aj mitochondriálne rekombinanty. Na druhej strane plazmogamia a rekombinácia mitochondriálnych génov v produktoch fúzie protoplastov môže prebehnúť aj bez karyogamie za vzniku cytoplazmatických hybridov — cybridov, ktorých frekvencia výskytu je však podstatne nižšia. V každom prípade potomstvo hybridných buniek po konjugácii alebo fúzii protoplastov je selektovateľné nielen na prototrofiu, ale aj ako mitochondriálne rekombinanty. Efektívnosť izolácie hybridného potomstva po fúzii protoplastov v podobe mitochondriálnych rekombinantov je na rozdiel od konjugácie závislé od experimentálnych podmienok regenerácie, reverzie a selekcie fúzných produktov. Vzhľadom na možný výskyt cybridov je na potvrdenie hybridného charakteru produktov fúzie protoplastov vždy potrebná následná biochemická a genetická analýza fúzných produktov.

Ploidia neovplyvňuje mitochondriálnu mutagénzu kvasinkových buniek [21, 22]. Možno preto izolovať mutanty s dominantnou mitochondriálnou rezistenciou proti vybraným inhibítorm mitochondriálnych funkcií aj u polyploidných priemyselných kmeňov kvasiniek [23]. Takto sa dá uskutočniť v prípade prototrofných a viacploidných produkčných kmeňov kvasiniek rekombinačné šľachtenie, a to indukciou vhodných mitochondriálnych mutácií, konjugáciou buniek fúziou protoplastov rodičovských kmeňov a následnou selekciou hybridov ako mitochondriálnych rekombinantov [24]. Schému tohto univerzálneho postupu znázorňuje obrázok 2 a tvorila metodický základ pre hybridizačné šľachtenie priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek [23]. Uvedený postup hybridizácie sa dá použiť aj pri hybridizácii vysporulovanej zmesi homotalických prototrofných kmeňov, napr. vinárskych kvasiniek, kde klasické metódy hybridizácie sa zatiaľ ukázali málo efektívne.



Obr. 2. Schéma hybridizácie prototrofných kmeňov kvasiniek.

Fig. 2. The diagram of the hybridization of prototrophic yeast strains.

<sup>1</sup>Parental strains; <sup>2</sup>The induction of mitochondrial mutations and the selection of mutants resistant to; <sup>3</sup>Chloramphenicol; <sup>4</sup>Erythromycin; <sup>5</sup>Selection of mitochondrial mutants without the cross-resistance; <sup>6</sup>Cell conjugation; <sup>7</sup>The preparation of protoplasts; <sup>8</sup>Fusion of protoplasts; <sup>9</sup>Reversion of protoplasts; <sup>10</sup>Selection of hybrid progeny as mitochondrial recombinants; <sup>11</sup>Biochemical and genetic analyses of hybrids.

## Literatúra

1. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Bratislava, Alfa — Praha, SNTL 1982.
2. SPENCER, J. F. T. — SPENCER, D. M. — SMITH, A. R. W., Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects. New York—Berlin—Heidelberg—Tokyo, Springer-Verlag 1984.
3. BENDO VÁ, O. — KAHLER, M., Pivovarské kvasinky. Praha, SNTL 1981.
4. BURROWS, S., In: Economic Microbiology. Vol. 4. Ed.: A. H. Rose. London, Academic Press 1979, s. 31.

5. JOHNSON, J. R. — OBERMAN, H., In, Progress in Industrial Microbiology. Vol. 15. Ed. M. J. Bull. Amsterdam—Oxford—New York, Elsevier 1979, s. 151.
6. FERENCZY, L. — MARÁZ, A., Nature, 268, 1977, s. 524.
7. ŠUBÍK, J. — OBERNAUEROVÁ, M. — TAKÁCSOVÁ, G., Abstr. 3rd Symp. of Socialist Countries on Biotechnology, Bratislava 1983.
8. ŠUBÍK, J. — KOVÁČOVÁ, V. — TAKÁCSOVÁ, G., Eur. J. Biochem., 73, 1977, s. 275.
9. PRESCOTT, D. M., Methods in Cell Biology. Vol. 11. Yeast Cell. San Francisco—London—New York, Academic Press 1975.
10. MARÁZ, A. — ŠUBÍK, J., Mol. gen. Genet., 181, 1981, s. 131.
11. HASTIE, A. C., Nature, 226, 1970, s. 771.
12. KAPPAS, A. — GEORGOPOULOS, S. G. — HASTIE, A. C., Mutat. Res., 26, 1974, s. 17.
13. ŠUBÍK, J. — TAKÁCSOVÁ, G., Mol. gen. Genet., 161, 1978, s. 99.
14. STRATHERN, J. N. — JONES, E. W. — BROACH, J. R., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Life Cycle and Inheritance. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory 1981.
15. DUJON, B. — KRUSZEWSKA, A. — SLONIMSKI, P. P. — BOLOTIN, FUKUHARA, M. — COEN, D. — DEUTSCH, J. — NETTER, P. — WEILL, L., Mol. gen. Genet., 137, 1975, s. 29.
16. GUNGE, N., Mol. gen. Genet., 146, 1976, s. 5.
17. DUJON, B. — SLONIMSKI, P. P. — WEILL, L., Genetics, 78, 1974, s. 415.
18. GOODEY, A. R. — BEVAN, E. A., Curr. Genet., 7, 1983, s. 69.
19. WOLF, K. — DEL GUIDICE, L. — KADEWITZ, F., Mol. gen. Genet., 176, 1979, s. 301.
20. LÜCKEMANN, G. — SIPICZKI, M. — WOLF, K., Mol. gen. Genet., 177, 1979, s. 185.
21. PUTRAMENT, A. — BARANOWSKA, U. — PRAZMO, W., Mol. gen. Genet., 126, 1973, s. 357.
22. ŠUBÍK, J., Aut. osv. 184089/78.
23. ŠUBÍK, J. — GBELSKÁ, Y. — GRECO, G. — JURÍKOVÁ, K. — LEŠKOVÁ, Z. — OBERNAUEROVÁ, M. — HALÁSOVÁ, K. — HUNČÍKOVÁ, S. — ZAVŘELOVÁ, M. — ROESSEL, O., Výskum regulácie metabolizmu priemyselných produkčných mikroorganizmov. Výskumná správa a realizačný výstup úlohy. Bratislava, Výskumný ústav potravinársky 1985.
24. ŠUBÍK, J. — OBERNAUEROVÁ, M., Aut. osv. 234784/85.

## Рекомбинация митохондриальных генов и гибридизация дрожжей

### Резюме

На основании изучения рекомбинации митохондриальных генов был разработан метод гибридизации дрожжей, независимый от совокупляющегося типа и от отсутствия ядерных генетических показателей родительских штаммов. Этот универсальный метод применяем также в гибридизационной селекции промышленных штаммов и основан на митохондриальном мутагенезе, конъюгации клеток или слиянии их протопластов, причем потомство возникших гибридов селекционируется в форме митохондриальных рекомбинантов.

## **The recombination of mitochondrial genes and the hybridization of yeasts**

### **Summary**

The method of the hybridization of yeasts was elaborated according to the study of the recombination of mitochondrial genes. This method is independent on the mating type and the absence of nuclear genetic markers in parental strains. This universal method useful also for the industrial strain improvement by hybridization is based on the mitochondrial mutagenesis, conjugation of the cells or the fusion of their protoplasts whereby the progeny of arisen hybrids is selected as mitochondrial recombinants.