

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS



Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos magistrantė

Agnė SEDEREVIČIŪTĖ

Magistro baigiamasis darbas

***Saccharomyces paradoxus* dvigrandžių RNR virusų tyrimas**

**Darbo vadovės:**

Dokt. Bazilė Ravoitytė

Doc. dr. Elena Servienė

Vilnius 2019

## *Saccharomyces paradoxus* dvigrandžių RNR virusų tyrimas

Darbas atliktas

Gamtos tyrimų centre, Genetikos laboratorijoje

Agnė SEDEREVIČIŪTĖ



Darbo vadovė:

Dokt. B. RAVOITYTĖ

/...../

Doc. dr. E. SERVIENĖ

/...../

## TURINYS

Santrumpos.....	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mielės.....	7
1.2. Mielių dvigrandžiai RNR virusai.....	8
1.2.1. Dvigrandžių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RNR virusų įvairovė.....	8
1.2.2. LA ir M virusų replikacijos ciklas.....	10
1.2.3. Toksino sintezė ir sekrecija.....	12
1.3. <i>Saccharomyces paradoxus</i> mielės.....	12
1.3.1. <i>Saccharomyces paradoxus</i> dgRNR virusai.....	13
1.4. Aplinkos įtaka mielių ląstelių augimui.....	15
1.4.1. Temperatūros įtaka mielių ląstelių augimui.....	15
1.4.2. pH įtaka mielių ląstelių augimui.....	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	21
2.1. Medžiagos ir reagentai.....	21
2.1.1. Terpės.....	22
2.1.2. Tirpalai.....	23
2.1.3. Rinkiniai.....	23
2.1.4. Prietaisai.....	24
2.1.5. Mielių kamienai.....	24
2.1.6. Sintetiniai pradmenys.....	25
2.2. Metodai.....	25
2.2.1. Tyrimo objektas.....	25
2.2.2. Morfologinė kolonijų analizė.....	25
2.2.3. Mikroskopinė ląstelių analizė.....	25
2.2.4. Genominės DNR išskyrimas iš mielių ląstelių.....	25
2.2.5. Polimerazinė grandininė reakcija.....	26
2.2.6. Horizontali DNR elektroforezė agaroziniame gelyje.....	26
2.2.7. DNR hidrolizavimas restrikcijos endonukleazėmis.....	27
2.2.8. PGR produkto gryninimas.....	27
2.2.9. Sekoskaitos duomenų analizė.....	27
2.2.10. Naktinės <i>S. paradoxus</i> mielių kultūros auginimas.....	28

2.2.11. Suminės RNR išskyrimas iš <i>S. paradoxus</i> mielių.....	28
2.2.12. Dvigrandės RNR išskyrimas iš <i>S. paradoxus</i> mielių.....	28
2.2.13. Horizontali dgRNR elektroforezė agaroziniame gelyje.....	29
2.2.14. Dvigrandės RNR gryninimas iš agarozinio gelio.....	29
2.2.15. Temperatūros įtaka <i>S. paradoxus</i> mielių biocidinio fenotipo palaikymui.....	30
2.2.16. Terpės pH įtaka <i>S. paradoxus</i> mielių biocidinio fenotipo palaikymui.....	31
2.2.17. Biocidinio fenotipo nustatymas.....	31
3. REZULTATAI.....	32
3.1. <i>Saccharomyces paradoxus</i> rūšies nustatymas.....	32
3.2. Dvigrandės RNR išskyrimo metodo optimizavimas.....	34
3.3. <i>Saccharomyces paradoxus</i> dgRNR išskyrimas ir gryninimas.....	35
3.4. <i>Saccharomyces paradoxus</i> mielių biocidiškumo tyrimas.....	36
3.5. Temperatūros įtaka biocidiniam <i>Saccharomyces paradoxus</i> kamieno fenotipui.....	38
3.6. Terpės pH įtaka biocidiniam <i>Saccharomyces paradoxus</i> kamieno fenotipui.....	40
3.7. Biocidinį fenotipą praradusių <i>Saccharomyces paradoxus</i> ląstelių dgRNR tyrimas...43	
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	46
IŠVADOS.....	50
SANTRAUKA.....	51
SUMMARY.....	52
PADĖKA.....	53
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	54

## Santrumpos

**ATPazė** – adenzintrifosfatazė;

**BLAST** – palyginių paieškos įrankis (angl. *basic local alignment search tool*);

**dgRNR** – dvigrandė RNR;

**DNAzė I** – deoksiribonukleazė I;

**dNTP** – deoksinukleotidai;

**EDTA** – etilendiamintetraacto rūgštis;

**gDNR** – genomine DNR;

**ITS** – tarpgeninė sritis (angl. *internal transcribed spacer*);

**NCBI** – nacionalinis biotechnologijos informacinis centras (angl. *The National Center for Biotechnology Information*);

**PGR** – polimerazinė grandidinė reakcija;

**rDNR** – ribosominė DNR;

**RFLP** – restrikcijos fragmentų ilgių polimorfizmo analizė;

**sumRNR** – suminė RNR;

**TAE** – Tris-aceto-EDTA;

**TE** – Tris-EDTA;

**TRIS** – tris(hidroksimetil)aminometanas;

**vgRNR** – viengrandė RNR.

## IVADAS

*Saccharomyces cerevisiae* mielės – vienos geriausiai ištyrinėtų vienaląsčių eukariotinių organizmų, dėl to įvairiuose biologiniuose tyrimuose šios mielės naudojamos kaip eukariotinių organizmų modelis (Karathia et al., 2011). 1963 metais pradėti tyrinėti *S. cerevisiae* mielėse esantys dvigrandžiai RNR virusai (Somers et al., 1969): LA tipo pagalbiniai virusai ir M tipo virusai, kurių dgRNR yra koduojamas baltymas–toksinas ir nulemiamas atsparumas šiam toksinui (Schmitt et al., 2006). LA ir M dgRNR virusai sudaro biocidines sistemas, kurias palaikančios mielių ląstelės–šeimininkės geba sintetinti baltymus–toksinus, biocidiškai veikiančius jiems jautrias mielių ląsteles (Santos et al., 2008). Daugiausiai ištyrinėti *S. cerevisiae* mielių dgRNR virusai, o apie kitų mielių rūšių palaikomus LA ir M dgRNR virusus yra žinoma nedaug.

*Saccharomyces paradoxus* mielės – filogenetiškai artimiausios *S. cerevisiae* mielėms ir yra laikomos *S. cerevisiae* pirmtakėmis (Vaughan-Martini, Martini, 1995). Pastaraisiais dešimtmečiais skirtingo tipo dgRNR virusai aptikti ir *S. paradoxus* mielėse, tačiau beveik nėra duomenų apie daugumos jų stabilumą, toksinų veikimo mechanizmą ir optimalias veikimo sąlygas.

Temperatūra turi įtakos įvairiems mielių ląstelės procesams (Arroyo-López et al., 2009), taip pat ir biocidinio fenotipo palaikymui. Pastebėta, kad *S. cerevisiae* mieles auginant aukštesnėje temperatūroje, populiacijoje atsiranda ląstelių, praradusių biocidines savybes ir virusinę dgRNR (Wickner, 1974), tačiau šio proceso mechanizmas iki šiol nenustatytas. Mokslinėje literatūroje trūksta duomenų apie terpės pH poveikį mielių biocidiškumo stabilumui.

Magistrinio darbo tikslas: identifikuoti dgRNR virusus *Saccharomyces paradoxus* mielėse, įvertinti jų stabilumą ir apsprendžiamas biocidines savybes. Tikslui pasiekti išskelti uždaviniai:

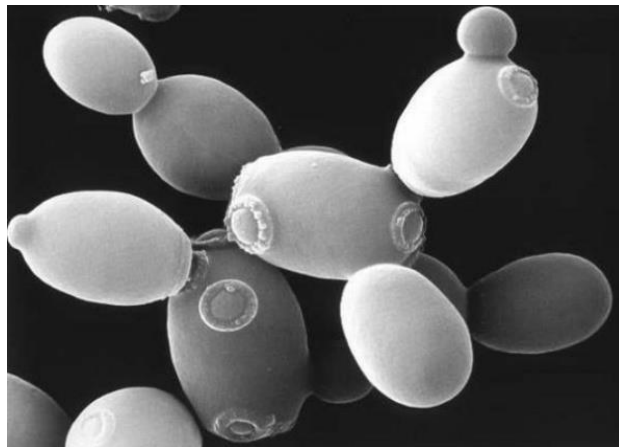
1. Identifikuoti iš gamtinės aplinkos išskirtas *S. paradoxus* mieles pagal rūšiai būdingus požymius.
2. Optimizuoti dgRNR išskyrimo iš mielių metodiką.
3. Išgryninti skirtingo tipo dgRNR molekules iš *S. paradoxus* ląstelių.
4. Įvertinti dgRNR virusų įtaką mielių biocidinėms savybėms.
5. Nustatyti temperatūros ir pH įtaką *S. paradoxus* mielių biocidinio fenotipo pasireiškimui ir dgRNR palaikymui.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. *Saccharomyces cerevisiae* mielės

1996 metais pilnai nusekvenuotas *Saccharomyces cerevisiae* mielių genomas. Tai buvo pirmasis eukariotinis organizmas ir didžiausias genomas, kurį pavyko pilnai nusekvenuoti (Goffeau et al., 1996). *Saccharomyces cerevisiae* mielės yra dažniausiai naudojamas eukariotinis mikroorganizmas maisto ir kitose pramonėse, kadangi jos turi GRAS („įprastai laikomas saugiu“ – angl. *generally regarded as safe*) statusą (Nevoigt, 2008). Tūkstančius metų naudojamos žmogaus, *S. cerevisiae* laikomos domestifikuota rūšimi. Šios mielės yra eukariotinių organizmų modelis biologiniuose, pvz.: ląstelės senėjimo (Murakami et al., 2009; Kaeberlein, 2010), genų raiškos reguliavimo (Rhiannon et al., 2009), ląstelės ciklo (Nasheuer et al., 2002), metabolizmo (López-Mirabal et al., 2008), apoptozės (Owsianowski et al., 2008) ir kt., tyrimuose, kadangi *S. cerevisiae* yra vienas geriausiai ištirtinėtų, paprasčiausių, bei greitai besidauginančių vienaląsčių eukariotų, kurį galima lengvai ir nebrangiai kultivuoti (Karathia et al., 2011).

*Saccharomyces cerevisiae* ląstelės yra apvalios arba ovalios formos, 5–10 μm dydžio (1.1 pav.). Yra žinoma, jog jos gali būti tiek haploidinės, tiek diploidinės. Haploidinės ląstelės dalijasi mitozės būdu, bet žūsta, jei trūksta maisto medžiagų. Diploidinės, kaip ir haploidinės, dalijasi mitozės būdu, tačiau esant streso sąlygoms, pradeda dalintis mejozės būdu – vyksta sporuliacija ir ląstelės suformuoja 4 haploidines sporas. Esant palankioms augimo sąlygoms, eksponentinėje augimo fazėje *S. cerevisiae* ląstelių skaičius padvigubėja kas 90 min. (Herskowitz, 1988).



**1.1 pav.** *Saccharomyces cerevisiae* mielių ląstelių elektroninės mikroskopijos nuotrauka (Aref, 2014)

*S. cerevisiae* gali augti tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis ir drauge su *S. paradoxus* laikomos efektyviausiai fermentuojančiomis *Saccharomyces* genties mielėmis (Nevoigt, 2008). *S. cerevisiae* kaip anglies šaltinį gali naudoti gliukozę, sacharozę, maltozę, rafinozę, kitus sacharidus bei etanolį ir glicerolį. Mielių augimui būtinas azotas, fosforas, siera, įvairūs metalų jonai, pvz.: magnis (Rosa, 2006).

1963 metais pradėti tyrinėti *S. cerevisiae* mielėse esantys dvigrandžiai RNR virusai ir aptikta, jog šios mielės sekretuoja baltymus–toksinus, kurie kenksmingi kai kurioms kitoms mielėms (Somers, Bevan, 1969; Santos, et al., 2008). Todėl mielės, sintetinančios baltyminės kilmės toksines medžiagas, vadinamas mikociniais, buvo pradėtos vadinti biocidinėmis mielėmis (angl. *killer yeast*) (Magliani et al., 1997).

## 1.2. Mielių dvigrandžiai RNR virusai

Dvigrandžiai RNR (dgRNR) virusai aptinkami įvairiose mielių rūšyse, tokiose kaip *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces uvarum*, *Ustilago maydis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Torulaspota delbrueckii* ir kt. (Rodríguez-Cousiño et al., 2017; Ramírez et al., 2017). Virusai, aptinkami *S. cerevisiae* mielėse priklauso *Totiviridae* šeimai (Golubev, 2005). Šios šeimos virusai plačiai paplitę ne tik mielėse, bet taip pat ir pirmuonyse bei daugialąsčiuose grybuose (Schmitt, Breinig, 2006).

Mielių biocidinio fenotipo pasireiškimui yra reikalingi dviejų tipų dgRNR virusai: LA ir M. LA tipo virusai – tai 4,6 kb dydžio pagalbiniai virusai, kurių dgRNR yra koduojami virusiniai baltymai (Icho, Wickner, 1989). M tipo virusų dgRNR yra apie 1,6–2,4 kb dydžio (Rodríguez-Cousiño et al., 2017) ir joje yra koduojamas baltymas–toksinas bei atsparumas šiam toksinui. Mielėse aptinkama ne tik dgRNR, bet ir vgRNR virusų bei prionų (Wickner, 1996a).

### 1.2.1. Dvigrandžių *Saccharomyces cerevisiae* RNR virusų įvairovė

*S. cerevisiae* mielėse iki šiol yra nustatyti pagalbiniai virusai – LA–1, LA–2, LA–28, LA–lus ir M1, M2, M28, Mlus virusai (Schaffrath et al., 2018), kurių dgRNR koduojami atitinkami baltyminiai toksinai – K1, K2, K28, Klus (Schaffrath et al., 2018; Hannig, Leibowitz, 1985; Rodríguez-Cousiño et al., 2011).

LA viruso dgRNR koduojami virusinės kapsidės baltymai Gag ir sulietas su nuo RNR–priklausoma RNR polimeraze baltymas Gag–Pol (Icho, Wickner, 1989). Yra žinoma, jog skirtingų LA pagalbinių dgRNR virusų genetinė medžiaga skiriasi apie 24 % nukleotidų



(Rodríguez-Cousiño, Esteban, 2017), o tarp skirtingų M tipų dgRNR nėra jokių sekos homologijų, tačiau genomo išsidėstymas yra labai panašus (Rodríguez-Cousiño et al., 2017).

Dažnai mielėse, turinčiose LA virusus, aptinkami ir kiti *Totiviridae* šeimos atstovai – LBC, tačiau jų genetinės medžiagos ląstelėse yra mažiau nei LA virusų ir LBC virusai neveikia kaip pagalbiniai virusai M palydovams (Rodríguez-Cousiño et al., 2017).

Skirtingų tipų M dgRNR koduojamų toksinų poveikis pasireiškia specifiniu biocidiniu mechanizmu kitoms mielių ląstelėms. Iki šiol geriausiai ištirtos *S. cerevisiae* biocidinės sistemos, sintetinančios K1, K2 ir K28 toksinus (el-Sherbein, Bostian, 1987; Cartwright et al., 1992; Meškauskas, Čitavičius, 1992; Schmitt and Tipper, 1990; Dignard et al., 1991). Apie kitas biocidines sistemas, pvz.: Klus, esančias *S. cerevisiae* ar kitose mielių rūšyse iki šiol yra žinoma nedaug (Rodríguez-Cousiño et al., 2011).

*S. cerevisiae* M1 viruso dgRNR yra 1,6 kb dydžio, joje koduojamas K1 toksinas. Šis toksinas yra heterodimerinis, sudarytas iš dviejų subvienetų:  $\alpha$  ir  $\beta$ , atitinkamai 9,5 kDa ir 9,0 kDa dydžio. Šie subvienetai tarpusavyje sujungti trimis disulfidiniais tilteliais (Martinac et al., 1990). K1 toksinas jam jautrių mielių ląstelių plazminėje membranoje formuoja jonų kanalus/poras (Martinac et al., 1990), dėl kurių membrana tampa pralaidi jonams (1.1 lentelė) (Schmitt, Breinig, 2006; (Kurzweilova, Sigler, 1993). Šis toksinas yra aktyvus esant pH 4,3–4,7, o šarmingesnėje nei pH 5 terpėje tampa neaktyvus. K1 toksinas praranda aktyvumą aukštesnėje nei 30 °C temperatūroje (Kurzweilova, Sigler, 1993).

**1.1 lentelė.** *S. cerevisiae* mielėse esančių M tipo dgRNR virusų įvairovė ir koduojamų toksinų pagrindinės savybės (Novotná et al., 2004; Lukša, et al., 2015; Schaffrath, et al., 2013; Rodríguez-Cousiño et al., 2011)

Mielių rūšis	dgRNR	dgRNR dydis (kb)	Toksinas	Toksino dydis (kDa)	Receptorius	Toksino veikimo mechanizmas
<i>S. cerevisiae</i>	M1	1,6	K1	$\alpha$ – 9,5 $\beta$ – 9,0	$\beta$ –1,6–gliukanai	Membranos laidumas
	M2	1,5	K2	$\alpha$ – 18,9 $\beta$ –15,4	$\beta$ –1,6–gliukanai	Membranos laidumas
	M28	1,8	K28	$\alpha$ – 11 $\beta$ – 10	Manoproteinai	DNR sintezės sustabdymas
	Mlus	2,1–2,3	Klus	Nežinoma	Nežinoma	Nežinoma

*S. cerevisiae* mielėse esančio M2 viruso dgRNR yra 1,8 kb dydžio ir koduoja baltymą–toksiną K2 (Meškauskas, Čitavičius, 1992; Dignard et al., 1991). Šis toksinas, kaip

ir K1 yra heterodimerinis, sudarytas iš dviejų subvienetų:  $\alpha$  ir  $\beta$  (18,9 kDa ir 15,4 kDa, atitinkamai) (1.1 lentelė) (Satyanarayana, Kunze, 2017). K2 toksinas yra mažiau ištirtas nei K1 ir manoma, kad šio toksino veikimo mechanizmas yra panašus į K1, t.y. sukelia jautrios toksinui ląstelės membranos pralaidumą. K2 toksinas yra aktyvus rūgštesnėje aplinkoje nei K1 toksinas (Novotná et al., 2004; Perez et al., 2001). Optimali toksino veikimo temperatūra – 20–25 °C, o optimalus pH biocidiniam fenotipui pasireikšti – pH 4 (Servienė et al., 2012; Lukša et al., 2015).

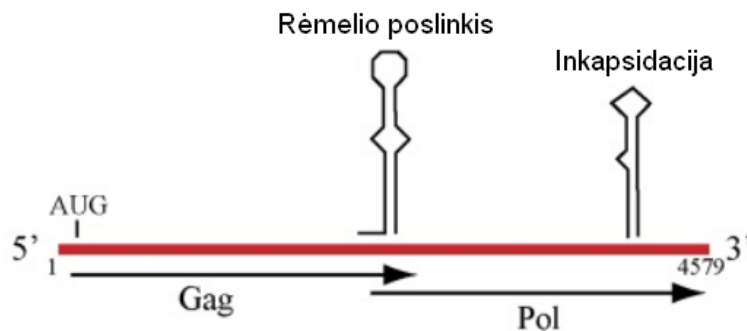
M28 viruso dgRNR yra 1,8 kb dydžio, joje koduojamas K28 toksinas. Šis toksinas yra panašus į K1 toksiną, susideda iš  $\alpha$  – 10 kDa dydžio ir  $\beta$  – 11 kDa dydžio subvienetų (1.1 lentelė) (Schmitt, Tipper, 1995), kurie tarpusavyje sujungti disulfidiniu tilteliu. K28 toksinas jam jautriose ląstelėse blokuoja DNR replikaciją (Eisfeld et al., 2000; Liu et al., 2013).

Mlus virusas dgRNR koduoja toksiną Klus, kuris atrastas *S. cerevisiae* 2011 metais, dėl to apie šio toksino savybes žinoma mažiausiai. Klus toksinas aktyviausias esant pH 4,0–4,7 ir 28–30 °C temperatūrai. Klus toksino veikimo mechanizmas dar nėra nustatytas (1.1 lentelė) (Rodríguez-Cousiño et al., 2011).

### 1.2.2. LA ir M virusų replikacijos ciklas

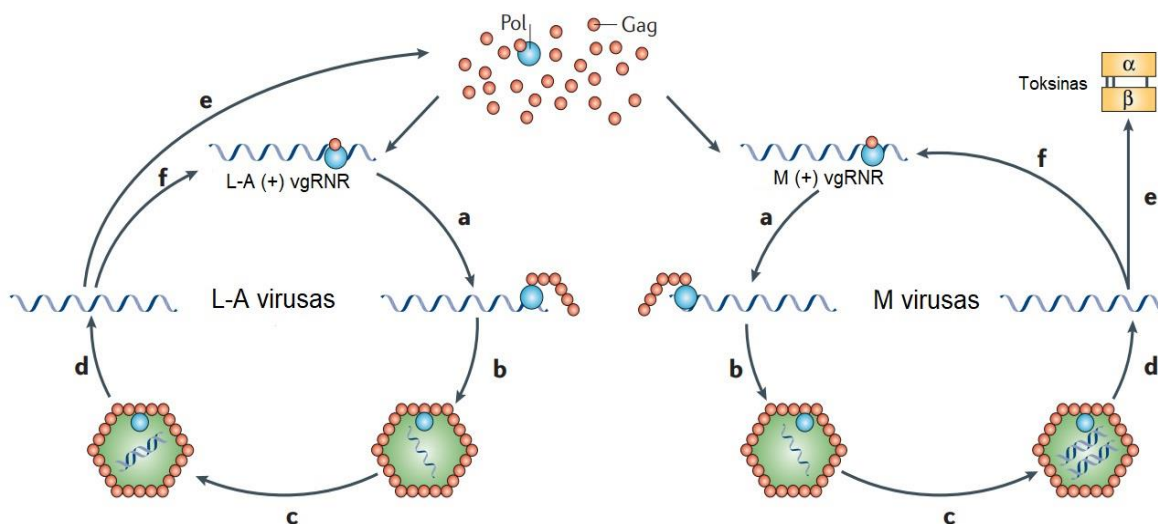
LA virionai – ikosaedro formos neinfekcinės dalelės, kurių diametras yra 39 nm (Cheng et al., 1994). Kiekvienas LA virionas susideda iš vienkopijinės dvigrandės RNR. Ši dvigrandė RNR yra inkapsuliuojama 76 kDa baltymo Gag ir sulieto 171 kDa baltymo Gag–Pol pagalba (Rodríguez-Cousiño et al., 2017). Gag–Pol sulietas baltymas yra susintetinamas įvykus skaitymo rėmelio poslinkiui (1.2 pav.).

LA dgRNR būdinga konservatyvi replikacija, t.y. abi naujos dgRNR molekulės grandinės yra motininės dgRNR kopijos (Schmitt, Breinig, 2006). Replikacijos metu prie LA koduojančios vgRNR prisijungia sulietas baltymas Gag–Pol ir Gag baltymo monomerai, kol suformuojama kapsidė (virionas) (Esteban, Wickner, 1986). Kapsidėje polimerazė susintetina antrą RNR grandinę ir susidaro dgRNR. Polimerazė kapsidės viduje vykdo RNR transkripciją ir sintetina koduojančią vgRNR, kuri per kapsidės struktūroje esančias poras išstumama iš kapsidės į ląstelės citoplazmą (Castón et al., 1997).



**1.2 pav.** LA viruso baltymus koduojančios RNR grandinės schema. Rėmelio poslinkio ir inkapsidacijos vietas grandinėje žymi schematiškos antrinės plaukų segtuko formos struktūros (Rodríguez-Cousiño et al., 2017).

LA koduojanti vgRNR atitinka informacinę RNR, kuri patekusi į citoplazmą gali būti panaudojama naujų virionų susidarymui ir viruso padauginimui, arba citoplazmoje esančių baltymų pagalba gali vykti jos translacija ir virusinių Gag ir Gag–Pol baltymų sintezė (Bostian et al., 1980). Kadangi kapsidę sudaro 60 Gag baltymo dimerų ir tik 1 ar 2 Gag–Pol molekulės. Gag baltymų susintetinama atitinkamai daug daugiau, kai tuo tarpu Gag–Pol baltymas sintetinas tik įvykus skaitymo rėmelio poslinkiui (1.3 pav.) (Schmitt, Breinig, 2006).



**1.3 pav.** Pagalbinio LA ir koduojančio toksiną M dvigrandžių RNR virusų replikacijos ciklas. a – koduojančios viengrandės RNR inkapsuliavimas, dalyvaujant Gag ir Gag–Pol baltymams, b – viriono susirinkimas, c – nekoduojančios RNR grandinės sintezė (replikacija), d – koduojančios RNR grandinės sintezė (transkripcija) ir jos išstūmimas į citozolį, e – viengrandės RNR translacija, f – Gag–Pol sulieto baltymo prisijungimas prie viengrandės RNR (Schmitt, Breinig, 2006).

M dgRNR viruso replikacijos etapai yra analogiški LA, tik M virione yra dvi M dgRNR kopijos. Viengrandės M tipo RNR transliacijos metu susintetinamas baltymas–preprotoksinas (1.4 pav.) (Schmitt, Breinig, 2006).

### 1.2.3. Toksino sintezė ir sekrecija

Mielėse, turinčiose dgRNR virusus, toksinas yra koduojamas M viruso RNR. Po viruso RNR replikacijos ir transkripcijos, koduojanti RNR grandinė iš viriono patenka į ląstelės citoplazmą, kurioje vyksta jos transliacija ir susintetinamas preprotoksinas – toksino pirmtakas (Schmitt et al., 2002). Preprotoksinas lemia ląstelės šeimininkės imuniškumą jos pačios sintetinamam toksinui (Tipper, Schmitt, 1991).

Toksino pirmtakas ląstelės šaperonų pagalba potransliacinės pernašos būdu įnešamas į endoplazminį tinklą, kuriame endopeptidazės pašalina N-galinę sekrecijos signalinę seką (pre-regioną). Endoplazminiame tinkle protoksinas glikozilinamas ir dalyvaujant šaperonams toliau brandinamas keičiant antrinę ir tretinę baltymo struktūrą, bei baltymų disulfidinių izomerazių pagalba sudaromi vidumolekuliniai vandeniliniai ryšiai (Schmitt, Breinig, 2006).

Iš endoplazminio tinklo brandinamas baltymas patenka į Goldžio kompleksą, kuriame vyksta paskutinės protoksino brendimo stadijos: endopeptidazės pašalina pro-regioną ir atskiria toksino subvienetus. Subrendęs toksinas sekrecijos pūslelėse keliauja iki plazminės membranos ir yra sekretuojamas į užląstelinę erdvę (Schmitt, Breinig, 2006).

### 1.3. *Saccharomyces paradoxus* mielės

*S. paradoxus* mielės yra filogenetiškai artimiausios *S. cerevisiae* mielėms, randamoms gamtoje. Net 50 % *S. paradoxus* mielių DNR nukleotidų sekų sutampa su *S. cerevisiae* genomu. *S. paradoxus* kol kas yra vienintelė iš žinomų *Saccharomyces* genties (išskyrus *S. cerevisiae*) mielių, paplitusių gamtinėje aplinkoje, kuri nesudėtingai kultivuojama *S. cerevisiae* mielėms pritaikytomis laboratorinėmis sąlygomis. Dažniausiai *S. paradoxus* fenotipiškai nesiskiria nuo *S. cerevisiae* mielių (Vaughan-Martini, Martini, 1995).

Viena iš mokslininkų pasiūlytų prielaidų apie šių rūšių vystymąsi teigia, kad gamtinė *S. paradoxus* įsitvirtino ir išliko dirbtinėje aplinkoje, pvz.: alaus daryklose, vyno gamyklose, todėl jos DNR palaipsniui kaupėsi genetiniai pokyčiai ir *S. paradoxus* galiausiai tapo nauja rūšimi – *S. cerevisiae* (Vaughan-Martini, Martini, 1995). Eksperimentiniai tyrimai (Fernandez-Espinar et al., 2003) nepatvirtino šios prielaidos, bet kaip ir daugelis kitų tyrimų parodė, jog *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielės yra giminingos, bei patvirtino, kad

*S. paradoxus* pasižymi kur kas didesne genetine įvairove nei *S. cerevisiae* mielės (Vaughan-Martini, Martini, 1995). *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielės yra randamos tose pačiose ekologinėse nišose, pvz.: ant ąžuolo žievės (Salvadó et al., 2011; Sampaio, Gonçalves, 2008). *S. paradoxus* mielės aiškiai pasiskirsčiusios geografiškai ir išskiriamos į: Europos, Amerikos, Tolimųjų Rytų ir Havajų populiacijas (Liti et al., 2009).

*S. paradoxus* mielių ląstelės yra elipsoidinės arba cilindrinės formos, 3–8,5  $\mu\text{m}$  ilgio ir 2,5–7  $\mu\text{m}$  pločio. Šios mielės sporuliuoja daugelyje terpių, pvz.: YPD, o sporuliacija siekia net 50 %. Tai vienas iš pagrindinių skirtumų tarp *S. paradoxus* ir *S. cerevisiae* mielių, kadangi *S. cerevisiae* diploidai nesporuliuoja maisto medžiagomis praturtintose terpėse (Vaughan-Martini, Martini, 2011).

### 1.3.1. *Saccharomyces paradoxus* dgRNR virusai

Skirtingo tipo *S. paradoxus* LA virusų DNR nukleotidų panašumas siekia 73–90 %, priklausomai nuo geografinės vietovės (Rodríguez-Cousiño et al., 2017; Ramírez et al., 2017; Wickner, 1996b). *S. paradoxus* LA ir M dgRNR virusų genomų dydžiai yra panašūs į virusų, aptinkamų *S. cerevisiae* mielėse (Chang et al., 2015).

*S. paradoxus* kamienas, palaikantis LA–66 ir M66 dvigrandžius RNR virusus identifiкуotas Lietuvoje, Gamtos tyrimų centro Genetikos laboratorijoje, 2018 metais (1.2 lentelė). *S. paradoxus* mielės, turinčios šiuos dgRNR virusus, buvo aptiktos ant Lietuvoje augančių vaisių, vykstant spontaninei fermentacijai. Nustačius LA–66 ir M66 dgRNR sekas ir atlikus filogenetinę analizę, nustatyta, kad pagalbinis LA–66 dgRNR virusas yra panašiausias į LA–28 dgRNR tipo virusą, o M66 – į M21 dgRNR (Vepškaitė-Monstavičė et al., 2018).

*S. paradoxus* mielėse esančio M66 viruso dgRNR koduoja baltyminės kilmės toksiną K66. Šis toksinas aktyvus kai terpės pH 3,6–5,2. Optimalios sąlygos biocidiniam fenotipui pasireikšti – pH 4,8 ir 20 °C temperatūra. K66 toksinas jungiasi prie jautrios ląstelės  $\beta$ -1,6-gliukanų ir sutrikdo jonų homeostazę (Vepškaitė-Monstavičė et al., 2018).

*S. paradoxus* mielėse yra palaikomi ne tik LA–66 ir M66 dgRNR, bet taip pat ir pagalbiniai virusai: LA–21, LA–28, LA–45, LA–62, LA–74 ir M tipo dgRNR: M21, M28, M45, M62, M74 (1.2 lentelė) (Rodríguez-Cousiño et al., 2017).

**1.2 lentelė.** *Saccharomyces paradoxus* mielėse esančių M tipo dgRNR virusų įvairovė (Vepškaitė-Monstavičė et al., 2018; Rodríguez-Cousiño et al., 2017)

Mielių rūšis	dgRNR	dgRNR dydis	Toksinas
<i>S. paradoxus</i>	M66	1,6 kb	K66
	M21	1,6 kb	K21
	M28	1,8 kb	K28
	M45	2 kb	K45
	M62	1,9 kb	K62
	M74	2,4 kb	K74

Atliktas *S. paradoxus* kamienų, palaikančių dgRNR virusus, koduojančius K21, K28, K45, K62, K74 toksinus, ir *S. cerevisiae* dgRNR virusus, koduojančius K1 ir K2 toksinus, biocidinio fenotipo tyrimas (Rodríguez-Cousiño et al., 2017). Išanalizavus rezultatus nustatyta, jog nei *S. paradoxus*, nei *S. cerevisiae* ląstelės, sintetinančios įvairius toksinus, biocidiškai neveikia *S. paradoxus* mielių ląstelių, sintetinančių K21 toksiną ir pasižymi stipriu biocidiniu poveikiu hiperjautrių ląstelių kamienui 5X47. *S. paradoxus* ir *S. cerevisiae* kamienų biocidiškumas parodytas 1.4 paveikslėlyje.

	K21	K28	K45	K62	K74	K1	K2
K21							
K28					+ <sup>w</sup>	+	+
K45		+			+	+	
K62					+ <sup>w</sup>	+	+
K74	+ <sup>w</sup>	+				+	+
K1	+	+	+	+ <sup>w</sup>			+
K2	+	+ <sup>w</sup>	+			+	
5X47	+	+	+	+	+	+	+

**1.4 pav.** *S. paradoxus* ir *S. cerevisiae* biocidinių kamienų tarpusavio sąveikos.

Eilutėje viršuje nurodyti mielių toksinų pavadinimai, atspindintys mielių kultūras, produkuojančias atitinkamus toksinus, o stulpelyje – analogiškus kamienus, kurių jautrumas toksinams tirtas. 5X47 – hiperjautri mielių ląstelių kultūra. + stiprus biocidiškumas, +<sup>w</sup> silpnas biocidiškumas (Rodríguez-Cousiño et al., 2017).

Norint išsiaiškinti, ar *S. cerevisiae* ląstelėse gali būti palaikomi *S. paradoxus* dgRNR virusai, iš sporuliuojančių *S. paradoxus* ląstelių dgRNR virusai perkelti į haploidines *S. cerevisiae* mielių ląsteles (Rodríguez-Cousiño et al., 2017). Citodukcijos metodu,

kryžminant laukinio tipo *S. paradoxus* mielių sporas (ląsteles donores) su genetiškai modifikuotu laboratoriniu *S. cerevisiae* haploidu (ląstele recipiente), atrankiai auginant ląsteles galima išskirti *S. cerevisiae* haploidus, turinčius *S. paradoxus* ląstelių citoplazmą, kartu su juose esančiais dgRNR virusais. Atliekant eksperimentą su *S. cerevisiae* ląstelėmis, neturinčiomis mitochondrijų, norimo rezultato pasiekti nepavyko. Pasiūlytos galimos nesėkmės priežastys: 1) dgRNR virusai, esantys *S. paradoxus* mielėse, yra nestabilūs *S. cerevisiae* ląstelėse arba 2) *S. paradoxus* mielių mitochondrijos yra nefunkcionalios *S. cerevisiae* ląstelėse. Naudojant analogiškas *S. cerevisiae* ląsteles su mitochondrijomis problema buvo išspręsta ir *S. paradoxus* dgRNR virusai buvo sėkmingai palaikomi *S. cerevisiae* mielėse. Taip pat atliekant šį tyrimą pastebėta, kad virusinių dgRNR perdavimas tarp mielių rūšių gamtinėmis sąlygomis horizontaliu būdu yra beveik neįmanomas, būtent dėl mitochondrijų nesuderinamumo, o tai riboja dgRNR virusų ir jų sintetinių baltymų–toksinų plitimą tarp rūšių (Rodríguez-Cousiño et al., 2017).

#### **1.4. Aplinkos veiksnių įtaka mielių ląstelių augimui**

Mielės sudaro didelę dalį natūralios ekosistemos. Įvairios mielių rūšys aptinkamos dirvožemyje, gėlame ir jūros vandenyje, ant augalų ir gyvūnų. Jos randamos ir žmogaus sukurtose buveinėse. Natūralių ir dirbtinių buveinių sąlygos lemia mielių metabolinį aktyvumą, augimą ir išlikimą. Įvairūs abiotiniai ir biotiniai veiksniai gali sukelti stresines sąlygas mielėms, prie kurių jos prisitaiko arba žūsta.

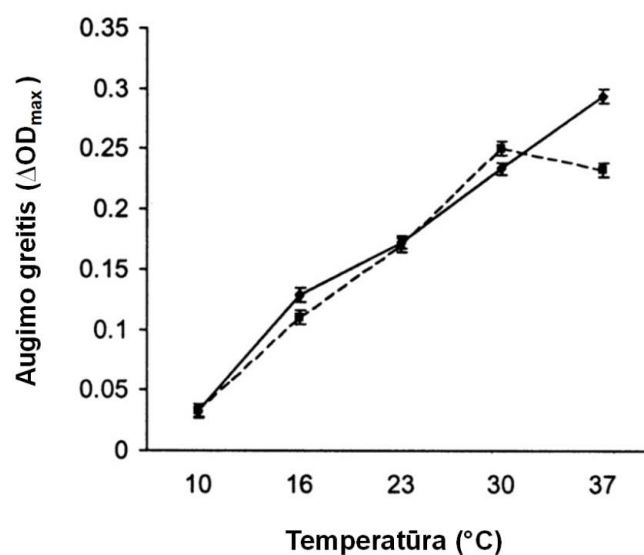
Mielių ląstelių augimui, gyvybingumui, dalijimuisi ir t.t. turi įtakos fiziniai (pvz.: temperatūra, šviesa), cheminiai (pvz.: maisto medžiagos, pH), bei biologiniai (pvz.: kitos mielių rūšys, bakterijos) veiksniai. Didžiausią įtaką mielių ląstelių gyvybingumui turintis fizikinis veiksnys yra temperatūra. Kiti fizikiniai veiksniai, pvz.: šviesa, spinduliuotė ir slėgis, yra mažiau ištyrinėti (Arroyo-López et al., 2009; Brion et al., 2016).

##### **1.4.1. Temperatūros įtaka mielių ląstelių augimui**

Žinoma, jog temperatūra turi įtakos mielių ląstelių augimui (Walton, Pringle, 1980). Kiekvienai mielių rūšiai būdinga skirtinga optimali augimo temperatūra. Dauguma mielių yra mezofilinės ir geriausiai auga esant 20–30 °C temperatūrai. Portugalio N. van Uden grupės atliktuose eksperimentuose buvo tiriama daugiau nei 100 mielių rūšių, priklausančių šioms gentims: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida* ir kt. Nustatyta, kad daugiau nei 98 % mielių auga 24–48 °C temperatūroje. Esant 37 °C temperatūrai gali

augti dažniausiai oportunistinės mielės, pvz.: *Candida albicans*, o didesnė nei 50 °C temperatūra yra letali mielių ląstelėms. Sporos taip pat nėra atsparios karščiui (Vidal-Leiria et al., 1979).

*S. paradoxus* ir *S. cerevisiae* laukinių kamienu, išskirtų iš tos pačios nišos (ąžuolo žievės) augimo temperatūros yra skirtingos. *S. paradoxus* didžiausias augimo greitis pasiekiamas 30 °C temperatūroje, o *S. cerevisiae* – 37 °C temperatūroje (1.5 pav.) (Sweeney, et al., 2004). Atliekant tyrimus su įvairiomis *Saccharomyces* rūšimis, pastebėta, jog tik *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielės gali augti esant 37 °C temperatūrai (Vaughan-Martini, Martini, 2011; Sweeney et al., 2004).



**1.5 pav.** *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielių kultūrų vidutinis augimo greitis, esant skirtingoms temperatūroms. *S. cerevisiae* augimo greitis parodytas vientisa, o *S. paradoxus* – punktyrine linija. Augimo greitis išreikštas  $\Delta OD_{max}$  (didžiausias mielių ląstelių tankio pokytis per valandą, esant 600 nm bangos ilgiui) (Sweeney et al., 2004).

Ištyrus keturias *Saccharomyces* rūšis: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* var. *uvarum* ir *S. kudriavzevii*, aptiktas ant ąžuolo žievės, nustatyta, jog temperatūra turi didelę įtaką *Saccharomyces* rūšių sąveikai. Cirkadiniai temperatūros pokyčiai, natūraliai vykstantys paros, metų laikų eigoje gali suteikti sąlygas skirtingoms rūšims labiau prisitaikyti prie skirtingų temperatūrų ir taip sugyventi toje pačioje ekologinėje nišoje. *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* prisitaiko efektyviau augti aukštesnėse, o *S. bayanus* var. *uvarum* ir *S. kudriavzevii* – žemesnėse temperatūrose (Salvadó et al., 2011; Sampaio, Gonçalves, 2008).

Žemesnė nei optimali *S. cerevisiae* mielių augimo temperatūra sulėtina fermentų kinetiką ir atitinkamai nuo jų priklausančius ląstelių procesus. Taip pat ji turi įtakos įvairioms



ląstelės savybėms, procesams, pvz.: augimo fazėms, kvėpavimui, membranos lipidų sudėčiai ir t.t. Amerikiečių mokslininko Jean–Marc Doran grupė tyrė 12 °C šalčio šoko (angl. *cold shock*) įtaką *S. cerevisiae* mielių ląstelėms. Vertintas pirminis šalčio poveikis, pasireiškiantis per pirmąsias 12 valandų žemoje temperatūroje, ir vėlyvasis šalčio atsakas, vertintas po 12 valandų žemoje temperatūroje. Nustatyta, kad ankstyvuoju poveikio periodu sumažėjo aplinkos streso atsako genų transkripcijos lygis. Taip pat pastebėti dideli skirtumai tarp transkripcijos perprogramavimo ilgalaikės žemos temperatūros aklimatizacijos metu ir transkripcijos atsako į staigų temperatūros sumažėjimą (Chen et al., 2007).

Ląstelių dydis taip pat priklauso nuo temperatūros. *S. cerevisiae* mielių ląstelių skersmuo esant 5 °C ir 40 °C temperatūrai yra 10,20±0,05 μm ir 7,97±0,01 μm, atitinkamai. Pastebėta, kad 18,5–40 °C temperatūroje ląstelių dydis panašus, tačiau kai temperatūra yra žemesnė nei 18,5 °C – ląstelės pradeda didėti. Kuo aplinkos temperatūra yra mažesnė, tuo ląstelės yra didesnės (Zakhartsev, Reuss, 2018).

Nustatyta, kad karščio šokas (angl. *heat shock*) turi įtakos mielių ląstelių augimui, išgyvenamumui ir žūčiai. Stanley Brul grupė tyrė karščio šoko įtaką *S. cerevisiae* mielių augimui. Iš 28 °C temperatūros, mielių ląstelėms esant eksponentinėje augimo fazėje, jos buvo perkeliamos į 37 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C ir 43 °C temperatūras. *S. cerevisiae* augimo temperatūrai padidėjus nuo 28 °C iki 37 °C pastebėta, kad padidėjo ir jų augimo greitis, o 39 °C temperatūroje stebimas nepakitęs ląstelių augimas. Temperatūros padidėjimas iki 42 °C lėmė visišką *S. cerevisiae* mielių ląstelių augimo sustabdymą, bet ląstelės išliko gyvybingos, o 43 °C temperatūroje ląstelės prarado gyvybingumą. Karščio šokas sukelia mielių ląstelių membranos pažeidimus (Mensonides et al., 2002).

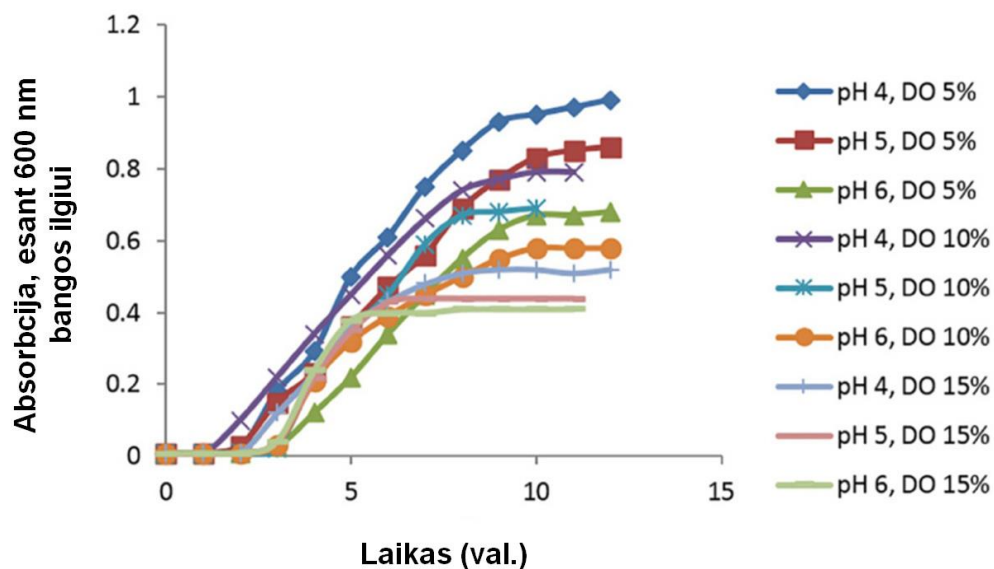
Eksponentinėje augimo fazėje mielių ląstelių jautrumas įvairiai temperatūrai yra skirtingas. Airių mokslininko John R. Pringle grupė nustatė, kad *S. cerevisiae* mielių ląsteles perkeliant iš 23 °C, 30 °C ir 36 °C temperatūros į 52 °C temperatūrą skiriasi mielių ląstelių jautrumas temperatūrai. *S. cerevisiae* mielių ląsteles, esančias eksponentinėje augimo fazėje, perkeliant iš 23 °C į 52 °C temperatūrą, ląstelių sumažėjo 1000 kartų, tuo tarpu kai į 30°C – 2 kartus, į 36 °C – 20 kartų per 8 min. (Walton, Pringle, 1980).

#### **1.4.2. pH įtaka mielių ląstelių augimui**

Mielės geriausiai auga rūgštinėje aplinkoje. Dažniausiai mielių ląstelėms augti optimalus pH yra 4,5–5,5. Tačiau mielės, priklausomai nuo rūšies, gali toleruoti įvairų terpės

rūgštingumą ir augti pH 3–10. Esant žemai temperatūrai, minimalus pH, kuriame ląstelės dar auga, yra didesnis nei auginant ląsteles aukštesnėje temperatūroje (Membre et al., 1999).

Rosita Salari grupė tyrė aeracijos ir terpės rūgštingumo įtaką *S. cerevisiae* mielių augimui. Tyrimui pasirinktos skirtingos pH (pH 4, pH 5, pH 6) terpės, esant 5 %, 10 % ir 15 % ištirpusio deguonies kiekiui. *S. cerevisiae* mielės buvo auginamos bioreaktoriuje, sintetinėje terpėje, palaikant pastovų pH ir ištirpusio deguonies kiekį (1.6 pav.). Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad didžiausias kolonijas formuojančių ląstelių skaičius (koreliuojantis su ląstelių tankiu), auginant ląsteles ilgiau nei 7 valandas, pasiekiamas terpėje, kurios pH 4, o ištirpusio deguonies kiekis – 5 % (1.6 pav.) (Salari, Salari, 2017).



**1.6 pav.** *Saccharomyces cerevisiae* augimo kreivės, esant skirtingam terpės pH ir deguonies prisotinimui (Salari, Salari, 2017). DO – ištirpęs deguonies kiekis.

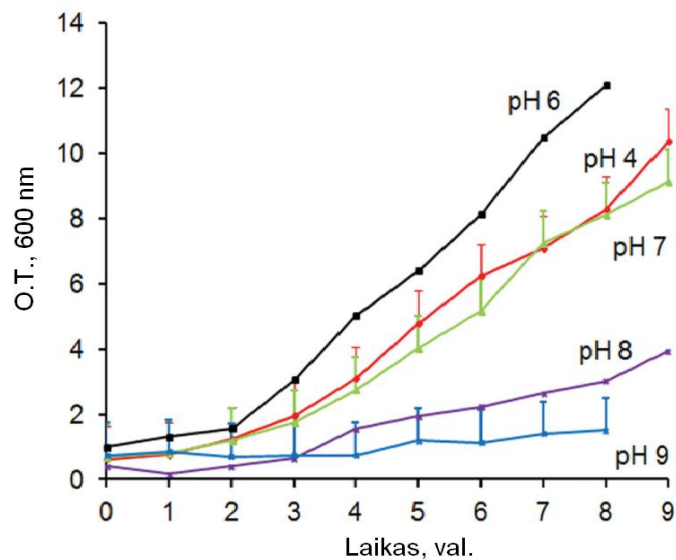
Mielių ląstelėms dideli užląstelinio pH pokyčiai yra nepalankios sąlygos, su kuriomis jos kovoja pasitelkdamos įvairius mechanizmus. Priklausomai nuo užląstelinio pH, vyksta ir viduląstelinio pH pokyčiai (Peña et al., 2015).

Užląstelinio pH pokyčiai, fiksuojami baltymų, esančių prie vidinės ląstelės membranos ir sukeliančių signalo perdavimą į ląstelės branduolį, padeda ląstelei prisitaikyti pertvarkant genų raišką. Geriausiai ištyrinėtas pH signalinis kelias *S. cerevisiae* mielėse – Rim101 (Peñalva, Arst, 2004). Šis kelias aktyvuojamas ląstelėms patekus į šarminę aplinką ir siejamas su endosomomis, tačiau mechanizmas ir jo reikšmė nėra išaiškinta. Endosomos laikomos vienais svarbiausių darinių, paveikiamų šarminio pH, kadangi jų viduje palaikoma rūgštinė terpė, kuri būtina jų fukcionavimui (Maeda, 2012). Užląstelinio pH paveikiamų genų išskiriamos pagrindinės grupės: sekretuojamų baltymų (dažniausiai fermentų), permeazių ir

viduląstelinių baltymų, susijusių su metabolitų sinteze ir eksportu, bei postransliacinėmis sekretuojamų baltymų modifikacijomis, genai (Peñalva, Arst, 2004).

Auginant ląsteles YPD terpėje, kai pastovus pH palaikomas titruojant 0,1N NaOH tirpalu, pastebėta, kad esant pH 8 ir pH 9 ląstelių tankis buvo mažiausias, lyginant su pH 4, pH 6 ir pH 7 pasiektu tankiu (žr. 1.7 pav.). Panašūs rezultatai gauti ir palaikant pH KOH tirpalu. Pradinis ląstelių tankis (OT, 600 nm) buvo 0,4, o po 4 valandų auginimo tirtos šios ląstelių savybės: kalio jonų pernaša ir terpės rūgštinimas, kvėpavimas, fermentacija, amino rūgščių (leucino) pernaša ir panaudojimas baltymų sintezei, viduląstelinis pH (Peña et al., 2015).

*S. cerevisiae* ląstelės augdamos esant pH 4 beveik neparūgštino augimo terpės, kai tuo tarpu esant pH 6 ląstelių produkuojamai rūgščiai neutralizuoti pirmąją augimo valandą reikėjo didelio kiekio NaOH, o esant pH 8 ir pH 9 norint palaikyti šarminį pH reikėjo nuolat tiekti NaOH ir šis poreikis tiesiškai didėjo. Metabolizmas, susijęs su viduląsteliniu kvėpavimu, ATP sinteze, kalio jonų pernaša visais atvejais buvo funkcionalus (Peña et al., 2015).



**1.7 pav.** *Saccharomyces cerevisiae* augimo kreivės, esant skirtingam terpės pH (Peña et al., 2015). Pradinis ląstelių tankis (O.T., 600 nm) 0,4.

Protonų pernaša esant aukštam pH paaiškinama ATPazės aktyvavimu, sumažėja ATP ir padidėja ADP koncentracija ląstelėse, skatinama glikolizė. Esant žemam pH, ATPazė inaktyvuojama, o jam padidėjus – aktyviai pompuoja protonus į ląstelės išorę. Kalio jonų transportas vyksta greičiau esant šarminesniau pH, nes tai susiję su ATPazės veikimo suaktyvėjimu. Visgi, pasak autorių, ATPazė pasiekia maksimalų veikimo efektyvumą jau

esant pH 7, o tiesiškas rūgštingumo didėjimas, esant pH 8 ir pH 9, yra nulemiamas skaidant gliukozę išskiriamo CO<sub>2</sub> kiekio, kuris terpėje hidratuojamas ir ją rūgština (Peña et al., 2015).

Fermentacijos efektyvumas šarminesniame pH šiek tiek sumažėjo. Viduląstelinis pH po 4 valandų auginimo šarminiame pH padidėjo, užląstelinis pH 6 ir pH 9 pakeitė viduląstelinį pH iki maždaug pH 6,55 iki pH 6,65, atitinkamai. Amino rūgščių transportas reikšmingai nesumažėjo padidėjus pH, netgi buvo stimuliuojamas, taigi ir tai nepaaiškino augimo sulėtėjimo esant šarminiam pH (Peña et al., 2015).

Užląstelinis pH turi didelės įtakos ląstelės ciklui. Po 4 valandų auginimo terpėje, kurios pH 9, ląstelės buvo sustabdytos G1 fazėje. Manoma, kad ląstelių ciklas sustoja dėl maisto medžiagų trūkumo, kuris atsiranda sumažėjus protonų gradientui (Lamb, Mitchell, 2003). Tačiau Peña atskleidė, kad potencialas išlieka pakankamas kalio jonų skatinamai medžiagų pernašai. J. Arino grupė remdamasi genų raiškos pokyčiais nurodė, kad vario, geležies ir fosfato jonų ląstelėje trūkumas gali būti pagrindinė priežastis, dėl ko ląstelių augimas sustoja, tačiau mechanizmas lieka neaiškus (Serrano et al., 2004).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos ir reagentai

Visos medžiagos ir reagentai naudoti šiame moksliniame darbe pateikti 2.1 lentelėje.

**2.1 lentelė.** Eksperimentiniuose darbuose naudojamos medžiagos ir reagentai

Pavadinimas	Firmos pavadinimas	Grynumas, %
2 – merkaptoetanolis	AppliChem	≥99
Acto rūgštis	Sigma – Aldrich	100
Agaras	Liofilchem	–
Agarozė	Thermo Scientific	–
Chloroformas	Eurochemicals	≥99,5
Citrinos rūgštis	Eurochemicals	≥99,5
Dinatriohidrofosfatas	Eurochemicals	≥99
DNAzė I (1 U/μl)	Thermo Scientific	–
DNAzės buferis su MgCl (10x)	Thermo Scientific	–
DNR molekulinės masės standartas GeneRuler™ DNA Ladder Mix (0,5 μg/μl)	Thermo Scientific	–
dNTP mišinys (2mM)	Thermo Scientific	≥99
Dream Taq buferinis tirpalas (10x)	Thermo Scientific	–
Dream Taq polimerazė (5 U/μl)	Thermo Scientific	–
Druskos rūgštis	Sigma – Aldrich	≤37
Etanolis	MV Group Production	≥96
Etidžio bromidas (1% vandeninis tirpalas)	Carl Roth	–
Etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA)	Sigma – Aldrich	≥99
Fenolio tirpalas ph 4,5–5	Carl Roth	–
Gliukozė	Biolife	≥98
Imersinis aliejus	Merck	–
Izopropanolis	Carl Roth	≥99,5
Ličio chloridas	Chempur	≥98
Metileno mėlis	Sigma – Aldrich	≥92
Mielių ekstraktas	Liofilchem	–
Natrio acetatas	Carl Roth	≥99
Natrio chloridas	Carl Roth	≥99
Natrio hidroksidas	Sigma – Aldrich	≥99
Natrio laurilsulfatas	AppliChem	≥96
Nukleorūgščių mėginių dažas Orange DNA Loading Dye (6x)	Thermo Scientific	–

Peptonas	Liofilchem	–
Restrikcijos endonukleazė – <i>CfoI</i> (10 U/μl)	Thermo Scientific	–
Restrikcijos endonukleazė – <i>HinI</i> (10 U/μl)	Thermo Scientific	–
Tris(hidroksimetil)aminometanas (TRIS)	AppliChem	≥99,9
Tris–acetato–EDTA (TAE) elektroforezės buferis (50x)	Thermo Scientific	–
TRIS–EDTA (TE) buferinis tirpalas	Thermo Scientific	–
Vanduo be nukleazių	Fermentas	–

### 2.1.1. Terpės

1. YPD mielių mitybinė terpė:

- 1 % mielių autolizatas,
- 2 % peptonas,
- 2 % gliukozė.

2. Agarizuota YPD mielių mitybinė terpė:

- 1 % mielių autolizatas,
- 2 % peptonas,
- 2 % gliukozė,
- 2 % agaras.

3. Mielių autolizato ir peptono koncentratas terpės pH įtakos nustatymui:

- 1,428 % mielių autolizatas,
- 2,857 % peptonas.

Terpių sudedamosios dalys tirpinamos distiliuotame vandenyje. Terpė autoklavuojama 110 °C temperatūroje 30 min, esant 0,5 atm. slėgiui.

4. pH 4,8 MB terpė mielių biocidinio fenotipo nustatymui:

- 0,5 % mielių autolizatas,
- 0,5 % peptonas,
- 4 % gliukozė,
- 1,05 % citrinos rūgštis,
- 3,53 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O,
- 2,5 % agaras,

- 0,002–0,003 % metileno mėlis.

Agaras supilamas tiesiai į kolbą. Sudedamosios dalys, išskyrus metileno mėlį ir agarą, tirpinamos distiliuotame vandenyje. Terpės pH matuojamas pH–metru ir titruojama koncentruota citrinos rūgštimi ar NaOH iki pasiekiamo pH 4,8. Įpilamas trūkstamas kiekis distiliuoto vandens, pridėjama metileno mėlio. Autoklavuojama 110 °C temperatūroje 30 min, esant 0,5 atm. slėgiui.

### 2.1.2. Tirpalai

1. Tirpalai naudojami suminės RNR ir dvigrandės RNR išskyrimui:
  - 50 mM EDTA,
  - 0,2 M EDTA,
  - 50 mM TRIS–HCl pH 8,8–9,3,
  - TES tirpalas: 0,1 M NaCl; 0,01 M TRIS–HCl pH 7,5; 0,01 M EDTA; 0,2 % SDS,
  - 3 M NaAc pH 7,0;
  - 75 % etanolis,
  - 5 M LiCl,
  - 3 M NaCl.
2. Tirpalai naudojami temperatūros ir pH įtakos mielių ląstelių biocidinio fenotipo palaikymo įvertinimui:
  - 2 % gliukozė,
  - 1 M citrinos rūgštis,
  - 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12H<sub>2</sub>O,
  - 0,9 % NaCl.

### 2.1.3. Rinkiniai

RNR gryninimo iš agarozinio gelio rinkinys „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific), Genominės DNR gryninimo rinkinys „Genomic DNA purification Kit“ (Thermo Scientific), PGR produktų gryninimo rinkinys „GeneJET PCR purification Kit“ (Thermo Scientific).

#### 2.1.4. Prietaisai

Vandens distiliatorius 2008 (GFL, Vokietija), autoklavas AES-75 (Raypa, Ispanija), spektrofotometras Genesys 20 (Thermo Scientific), centrifuga 5418 R (Eppendorf, Vokietija), DNR vizualizacijos aparatas MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging systems, Izraelis), UV laminarinė spinta UVT-S-AR (Biosan, Latvija), inkubatorius-purtyklė CERTOMAT™ IS (Sartorius, Vokietija), analitinės svarstyklės ABS-N/ABJ-NM (Kern, Vokietija), laboratorinės svarstyklės 572 (Kern, Vokietija), šaldomoji centrifuga Z216 MK (Hermle Labortechnik, Vokietija), -80 °C šaldiklis MDF-U3386S (Panasonic, Anglija), laboratorinė traukos spinta Q-Optimal (ALCHEM, Lenkija), centrifuga 5804 R (Eppendorf, Vokietija), horizontalios elektroforezės aparatas MultiSUB Midi (Clever scientific Ltd, Anglija), elektroforezės maitinimo šaltinis GE Healthcare EPS 301 (Fisher Scientific), pH-metras CP-315M (Elmetron, Lenkija), 25 °C temperatūros termostatas (Čekija), 30 °C temperatūros termostatas BT 120 (Čekija), +4 °C šaldytuvai (Snaigė, Lietuva ir Whirlpool, Amerika), -20 °C šaldiklis 122 (Snaigė, Lietuva), šviesinis mikroskopas ICC50 HD (Leica, Vokietija), sausa termostatinė vonelė D1200 (Labnet International, JAV), mini centrifuga NG002G (Nippon Genetics Europe GmbH, Vokietija).

#### 2.1.5. Mielių kamienai

Magistriniame darbe naudoti mielių kamienai:

- *S. cerevisiae* α'1: *MATα leu2-2 [kil-0]*,
- *S. cerevisiae* M437: *wt, HM/HM [kil-K2]*,
- *S. cerevisiae* BY4741: *MATα his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0*,
- *S. cerevisiae* K7: *MATα arg9 [kil-K1]*,
- *S. cerevisiae* RW4: *wt, HM/HM [kil-Klus]*,
- *S. paradoxus* K28: *wt, HM/HM [kil-K28]*,
- *S. paradoxus* BCR-17-18,
- *S. paradoxus* CKB-17-33,
- *S. paradoxus* PR-17-59,
- *S. paradoxus* PR-17-63,
- *S. paradoxus* AML-15-66: *wt, HM/HM [kil-K66]*.



### 2.1.6. Sintetiniai pradmenys

ITS srities DNR fragmento padauginimui naudojami sintetiniai pradmenys:

- 10  $\mu$ M ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') tiesioginis pradmuo,
- 10  $\mu$ M ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') atvirkštinis pradmuo.

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Tyrimo objektas

Tyrimo objektas – *S. paradoxus* mielės, aptiktos vykdant spontaninę Lietuvos vaisių ir uogų fermentaciją.

### 2.2.2. Morfologinė kolonijų analizė

Po spontaninės vaisių ir uogų fermentacijos, skystoje raugo frakcijoje esančios ląstelės paskleidžiamos ant agarizuotos YPD mielių mitybinės terpės petri lėkštelėje. Atliekama kolonijų morfologinė analizė. Aprašoma kolonijų tekstūra (gleivėta, klampi, puri, skysta, matinė), spalva (balta, gelsva, geltona, raudona, oranžinė ir kt.), iškilumas (lygi, iškilusi, įdubusi), kolonijos kraštelis (lygus, nelygus ir kt.) ir paviršius (lygus, raukšlėtas).

### 2.2.3. Mikroskopinė ląstelių analizė

Mielių kolonija steriliai, mikrobiologine kilpele, paimama iš petri lėkštelės ir suspenduojama mėgintuvėlyje 30–50  $\mu$ l sterilaus vandens. Ant objektyvio stiklelio užlašinami 5–7  $\mu$ l mėginio ir uždengiama dengiamuoju stikleliu. Vizualizacijai naudojamas imersinis aliejus. Mėginiai mikroskopuojami „Leica ICC50 HD“ šviesiniu mikroskopu esant 1 000 kartų padidinimui. Mikroskopuojant mėginius analizuojamas ląstelių homogeniškumas, dydis, forma (apvali, ovali, epilsoidinė, cilindrinė), viduląsteliniai dariniai (branduolys, vakuolė) ir ląstelių sporuliacija. Atlikus fenotipinę kolonijų ir mikroskopinę ląstelių analizę, preliminariai nustatoma mielių rūšis.

### 2.2.4. Genominės DNR išskyrimas iš mielių ląstelių

Genominė DNR (gDNR) iš mielių ląstelių skiriama genominės DNR gryninimo rinkiniu „Genomic DNA purification Kit“, pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. Užauginus *S. paradoxus* kamienų kultūras, kaip nurodyta skyrelyje 2.2.10., surenkama mielių biomasė ir centrifuguojama 2 min. 12 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas, o

ląstelės suspenduojamos 200  $\mu$ l TE buferinio tirpalo ir užpilamos 400  $\mu$ l lizės tirpalo. Mėginiai švelniai pavartomi ir inkubuojami 5 min. 65 °C temperatūroje. Mėginius perkėlus į traukos spintą, įpilama 600  $\mu$ l chloroformo, pavartoma ir centrifuguojama 2 min. 10 000 aps./min. greičiu. Į naujus „Eppendorf“ mėgintuvėlius atsargiai perkeliama viršutinė vandeninė frakcija ir užpilama 800  $\mu$ l šviežiai paruošto nusodinimo tirpalo. Pavartoma ir centrifuguojama 2 min. 10 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos tirpinamos 100  $\mu$ l 1,2 M NaCl tirpalo. Pridedama 300  $\mu$ l 96 % šalto etanolio, sumaišoma iki homogeniško tirpalo ir 16 valandų inkubuojama –20 °C temperatūroje. Centrifuguojama 4 min. 10 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas, o nuosėda (gDNR) tirpinama 20  $\mu$ l vandenyje be nukleazių. Laikoma –20 °C temperatūroje.

### 2.2.5. Polimerazinė grandininė reakcija

Išskyrus iš mielių ląstelių genomine DNR, kaip nurodyta 2.2.4 skyrelyje, toliau vykdoma polimerazinė grandininė reakcija (PGR). Bendras PGR mišinio tūris – 50  $\mu$ l. Į lede laikomą PGR skirtą mėgintuvėlį supilami visi PGR reakcijos komponentai, o „Dream Taq“ DNR polimerazė, į mišinį įpilama paskutinė. Atlikus PGR gaunamas padaugintas ITS1–5,8S–ITS2 srities rDNR fragmentas.

Polimerazinės grandininės reakcijos mišinį sudaro:

- 1) 35,5  $\mu$ l vanduo be nukleazių,
- 2) 5  $\mu$ l „Dream Taq“ buferinis tirpalas (10x),
- 3) 5  $\mu$ l dNTP mišinys (2 mM),
- 4) 2  $\mu$ l gDNR (10 – 50 ng),
- 5) 1  $\mu$ l tiesioginis ITS1 pradmuo (10  $\mu$ M),
- 6) 1  $\mu$ l atvirkštinis ITS4 pradmuo (10  $\mu$ M),
- 7) 0,5  $\mu$ l „Dream Taq“ DNR polimerazė (5 U/ $\mu$ L).

Polimerazinės grandininės reakcijos programa:

- 1) pradinė DNR denatūracija – 5 min. 94 °C temperatūroje,
  - 2) DNR denatūracija – 1 min. 94 °C temperatūroje,
  - 3) pradmenų hibridizacija – 1 min. 30 sek. 53 °C temperatūroje,
  - 4) DNR sintezė – 2 min. 72 °C temperatūroje,
  - 5) DNR sintezė – 10 min. 72 °C temperatūroje.
- } 25 ciklai

### **2.2.6. Horizontali DNR elektroforezė agaroziniame gelyje**

DNR fragmentų analizei naudojamas 1 % agarozinis gelis. Elektroforezė vykdoma 1x TAE buferiniame tirpale, esant 100–110 V įtampai 30–40 min. Gauti DNR fragmentų dydžiai nustatomi juos lyginant su DNR molekulinio masės standartu (GeneRuller™ DNR Ladder Mix). Pasibaigus elektroforezei gauti DNR fragmentai vizualizuojami UV transiluminatoriuje MiniBIS Pro, fotografuojami ir analizuojami.

### **2.2.7. DNR hidrolizavimas restrikcijos endonukleazėmis**

Padaugintas ITS1–5,8S–ITS2 srities rDNR fragmentas, kaip aprašyta 2.2.5. skyrelyje, toliau hidrolizuojamas *HinfI* ir *CfoI* restrikcijos endonukleazėmis. Galutinis restrikcijos mišinio tūris – 11 µl. Restrikcijos mišinį sudaro: 10 µl PGR produkto ir 1 µl *HinfI* (10 U/µl) arba *CfoI* (10 U/µl) restrikcijos endonukleazių. Restrikcijos reakcija vykdoma 1 val. 37 °C temperatūroje. Gauti DNR fragmentai analizuojami horizontaliosios elektroforezės metodu, kaip aprašyta 2.2.6. skyrelyje.

### **2.2.8. PGR produkto gryninimas**

Susintetinto PGR produkto, kaip aprašyta 2.2.5. skyrelyje, gryninimas atliekamas PGR produkto gryninimo rinkiniu „GeneJET PCR purification Kit“, pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. PGR produktas užpilamas surišimo buferiniu tirpalu (angl. *binding buffer*) santykiu 1:1. Mišinys perkeliamas į „GeneJET“ gryninimo kolonėlę ir centrifuguojama 1 min. 12 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas ir pridedama 700 µl praplovimo buferinio tirpalo (angl. *wash buffer*). Centrifuguojama 1 min. 12 000 aps./min. greičiu, o supernatantas pašalinamas. Šis žingsnis kartojamas du kartus. „GeneJET“ gryninimo kolonėlė perkeliama į švarų 1,5 ml „Eppendorf“ mėgintuvėlį ir 50 µl vandens be nukleazių pilama į kolonėlės centrą, ant membranos. Centrifuguojama 1 min. 12 000 aps./min. greičiu. Gryninimo kolonėlė pašalinama, o mėgintuvėlis sandariai uždaromas. Išgryninta DNR analizuojama horizontaliosios elektroforezės metodu, kaip aprašyta 2.2.6. skyrelyje ir laikoma –20 °C temperatūroje.

### **2.2.9. Sekoskaitos duomenų analizė**

Išgryninus DNR fragmentą, kaip nurodyta 2.2.8 skyrelyje, mėginiai siunčiami sekoskaitai. Atliekama naujos kartos sekoskaita (BASECLEAR, Nyderlandai). Nustatytos

sekos lyginamos naudojant BLAST algoritmą su NCBI duomenų bazėje esančiomis referentinėmis, jau nustatytų mielių rūšių DNR sekomis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **2.2.10. Naktinės *S. paradoxus* mielių kultūros auginimas**

*S. paradoxus* mielių kultūra buvo auginama genomines DNR, suminės RNR skyrimui, skirtingos temperatūros ir pH įtakos tyrimams atlikti. Į 5 ml (20 ml – terpės pH įtakos biocidinio fenotipo palaikymo tyrimui, 50 ml – didelio kiekio dgRNR išskyrimui) skystos YPD mielių mitybinės terpės, mikrobiologine kilpele perkeliamas nedidelis kiekis *S. paradoxus* mielių kultūros. Auginama purtyklėje apie 14–16 valandų 25 °C temperatūroje, purtant 100 aps./min. greičiu.

#### **2.2.11. Suminės RNR išskyrimas iš *S. paradoxus* mielių**

Į 1,5 ml „Eppendorf“ mėgintuvėlius surenkama naktinės *S. paradoxus* mielių kultūros biomasė (2.2.10.), centrifuguojant 1 min. 6 000 aps./min. greičiu. Šis žingsnis kartojamas 2 kartus. Mielių ląstelės praplaunamos 1 ml 50 mM EDTA tirpalu ir jame suspenduojamos. Centrifuguojama 1 min. 6 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos užpilamos 1 ml (50 mM TRIS pH 8,8–9,3 ir 1% 2–merkoptoetanolio) tirpalu, sumaišomos iki vienalytės konsistencijos ir 15 min. inkubuojama kambario temperatūroje. Centrifuguojama 1 min 6 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas ir pridedama 0,8 ml TES tirpalo, sumaišoma. Traukos spintoje įpilama 0,6 ml rūgštinio fenolio (pH 4,5–5) ir sumaišoma. Mėginiai 30 min. įdedami į purtyklę ir centrifuguojami 30 min. 20 000 aps./min. greičiu. Į naujus „Eppendorf“ mėgintuvėlius nusiurbiamą viršutinę vandeninę frakciją (apie 600 µl). Įpilama 60 µl 3 M NaAc pH 7,0 ir 660 µl izopropanolio. Sumaišoma ir centrifuguojama 10 min. 20 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos (sumRNR) praplaunamos 150 µl 75 % šalto etanolio. Centrifuguojama 1 min. 20 000 aps./min. greičiu. Supernatantas nusiurbiamas, o nuosėdos (sumRNR) 5 min. džiovinamos 37 °C termostate. Nuosėdos (sumRNR) tirpinamos 20 µl vandenyje be nukleazių. SumRNR laikoma –20 °C temperatūroje.

#### **2.2.12. Dvigrandės RNR išskyrimas iš *S. paradoxus* mielių**

Norint išskirti dvigrandę RNR (dgRNR) iš *S. paradoxus* ląstelių, pirmiausia reikia išsiskirti suminę RNR, kaip nurodyta 2.2.11. skyrelyje. Išskyrus sumRNR toliau yra

vykdomas viengrandės RNR (vgRNR) nusodinimas pridedant LiCl iki 2,8 M ir laikant 16 valandų 4 °C temperatūroje. Šaldomoje centrifugoje centrifuguojama 45 min. 20 000 aps./min. greičiu, 4 °C temperatūroje. Supernatantas (dgRNR) (apie 40 µl) perkeliamas į naują 1,5 ml „Eppendorf“ mėgintuvėlį ir pridedama 1/10 tūrio 3 M NaCl ir 2,5 tūrio 96 % šalto etanolio. Sumaišoma ir laikoma 1 valandą –70 °C šaldiklyje. Centrifuguojama 30 min. 20 000 aps./min. greičiu, esant 4 °C temperatūrai. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos (dgRNR) praplaunamos 150 µl 75 % šaltu etanolio. Nuosėdos turi atlipti nuo mėgintuvėlio sienelės. Centrifuguojama 5 min. 20 000 aps./min. greičiu, 4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos (dgRNR) džiovinamos 5–10 min. 37 °C temperatūros termostate ir tirpinamos 16 µl vandenyje be nukleazių. Pridedama 2 µl DNAzės buferio (10x) ir 2 µl DNAzės I (1 U/µl), sumaišome. Laikome 30 min. 37 °C temperatūros termostate. Pridedame 0,5 µl 0,2 M EDTA ir laikome 10 min. 65 °C sausoje termostatinėje vonelėje. Laikoma –20 °C temperatūroje.

Dvigrandė RNR gryninimui iš agarozinio gelio, kaip nurodyta 2.2.14. skyrelyje, naudojama dgRNR, kuri išskiriama iš didelio kiekio ląstelių biomasės. Didelio kiekio dgRNR išskyrimas atliekamas, kaip nurodyta 2.2.11 ir 2.2.12 skyreliuose, tačiau šio išskyrimo metu naudojamas didesnis naktinės mielių kultūros kiekis, atitinkamai vietoje 3 ml – 50 ml ir naudojami proporcingai didesni reagentų kiekiai. Suminės RNR išskyrimui: 5 ml 50 mM EDTA, 4 ml (50 mM TRIS pH 8,8–9,3 ir 1 % 2–merkaptoetanolio) tirpalo, 4 ml TES tirpalo, 4 ml rūgštinio fenolio (pH 4,5–5), 1/10 3 M NaAc pH 7,0 ir 1:1 izopropanolio, nuosėdos (sumRNR) praplaunamos 1 ml 75 % šalto etanolio ir tirpinamos 200 µl vandenyje be nukleazių. dgRNR nuosėdos praplaunamos 400 µl 75 % šalto etanolio ir tirpinamos 60 µl vandenyje be nukleazių.

### **2.2.13. Horizontali dgRNR elektroforezė agaroziniame gelyje**

Vykdoma analogiškai kaip ir horizontali DNR elektroforezė, nurodyta 2.2.6. skyrelyje, tačiau naudojamas 0,8 % agarozinis gelis. Elektroforezė vykdoma esant 110 V įtampai 40–45 min. Pasibaigus elektroforezei RNR fragmentai vizualizuojami UV transiluminatoriuje MiniBIS Pro, fotografuojami ir analizuojami.

### **2.2.14. Dvigrandės RNR gryninimas iš agarozinio gelio**

Po dgRNR elektroforezės, kaip aprašyta 2.2.13. skyrelyje, atliekamas LA ir M tipo dgRNR gryninimas iš agarozinio gelio „GeneJET Gel Extraction Kit“ rinkiniu, pagal

gamintojo pateiktas rekomendacijas. LA ir M dgRNR fragmentai, apšvietus UV spinduliais, išpjunami steriliu skalpeliu ir įdedami į sterilius 1,5 ml „Eppendorf“ mėgintuvėlius. Kiekvienas išpjautas fragmentas pasveriamas laboratorinėmis svarstyklėmis. Pridedama surišimo buferinio tirpalo (angl. *binding buffer*) santykiu 1:1 (svoris:tūris) ir inkubuojama 50–60 °C 10 min. Kas kelias minutes mėginiai pavartomi. Jei RNR fragmentai mažesni nei 500 bp pridedama 100 % izopropanolio santykiu 1:1 (svoris:tūris) ir atsargiai sumaišoma. Mėginys perkeliamas į „GeneJET“ gryninimo kolonėlę ir centrifuguojama 1 min. 12 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas ir pridedama 100 µl surišimo buferinio tirpalo. Centrifuguojama 1 min. 12 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas ir pridedame 700 µl praplovimo buferinio tirpalo (angl. *wash buffer*). Centrifuguojama 1 min. 12 000 aps./min. greičiu ir supernatantas pašalinamas. Šis žingsnis kartojamas du kartus. „GeneJET“ gryninimo kolonėlė perkeliama į švarų 1,5 ml „Eppendorf“ mėgintuvėlį ir į kolonėlės centrą, ant membranos, pridedama 50 µl vandens be nukleazių. Centrifuguojama 1 min. 12 000 aps./min. greičiu. Pašalinama gryninimo kolonėlė, o mėgintuvėlis sandariai uždaromas. Išgryninta skirtingo tipo dgRNR patikrinama horizontalios elektroforezės metodu, kaip aprašyta 2.2.13. skyrelyje. Laikoma –20 °C temperatūroje.

#### **2.2.15. Temperatūros įtaka *S. paradoxus* mielių biocidinio fenotipo palaikymui**

*S. paradoxus* mielių ląstelės auginamos, kaip nurodyta 2.2.10. skyrelyje. Mielių ląstelių optinis tankis matuojamas spektrofotometru, esant 600 nm bangos ilgiui. Prieš ląstelių užsėjimą YPD mielių mitybinė terpė pašildoma iki reikiamos temperatūros. Mielių ląstelės sterilioje kolboje atskiedžiamos 20 ml YPD mielių mitybinėje terpėje iki 0,1 optinio tankio (OT). Mielių ląstelės auginamos purtyklėje pasirinktoje (15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C ir 40 °C) temperatūroje, purtant 100 aps./min. greičiu. Mielių ląstelėms užaugus iki 0,4 ir 4,0 OT, esant 600 nm bangos ilgiui, arba pasiekus tašką, kuriame ląstelių tankis nepadidėja per 8 val., atskiedžiamos naudojant sterilų vandenį iki 3 ląst./µl 1,5 ml „Eppendorf“ mėgintuvėlyje. Po 20–30 µl mėginio steriliai paskleidžiama ant 3 petri lėkštelių, su agarizuota YPD mielių mitybine terpe. Mielių kolonijos auginamos apie 48 val. 25 °C temperatūros termostate. Užaugusių mielių kolonijų biocidinio fenotipo nustatymas vykdomas, kaip aprašyta 2.2.17. skyrelyje. Petri lėkštelės laikomos 4 °C temperatūroje.

### **2.2.16. Terpės pH įtaka *S. paradoxus* mielių biocidinio fenotipo palaikymui**

*S. paradoxus* mielių ląstelės auginamos, kaip nurodyta 2.2.10. skyrelyje. Mielių biomasė surenkama centrifuguojant 5 min. 3 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas, o ląstelės plaunamos 45 ml 0,9 % NaCl tirpalu ir suspenduojamos. Centrifuguojame 5 min. 3 000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas ir įpilamas toks 0,9 % NaCl tirpalo kiekis, kad, ląstelių optinis tankis būtų apie 8, matuojant spektrofotometru, esant 600 nm bangos ilgiui. Ląstelės steriliose kolbose atskiedžiamos 20 ml tiriamo pH terpėje iki 0,1 optinio tankio ir auginamos purtyklėje 25 °C temperatūroje, purtant 100 aps./min. greičiu. Mielių ląstelėms pasiekus iki 0,4 ir 4,0 OT, esant 600 nm bangos ilgiui, arba pasiekus tašką, kuriame ląstelių tankis nepadidėja per 8 valandas, jos atskiedžiamos naudojant sterilų vandenį iki 3 ląst./μl 1,5 ml „Eppendorf“ mėgintuvėlyje. Po 20–30 μl mėginio steriliai paskleidžiama ant 3 petri lėkštelių, su agarizuota YPD mielių mitybine terpe. Mielių kolonijos auginamos apie 48 val. 25 °C temperatūros termostate. Užaugusių mielių kolonijų biocidinio fenotipo nustatymas vykdomas, kaip aprašyta 2.2.17. skyrelyje. Petri lėkštelės laikomos 4 °C temperatūroje.

### **2.2.17. Biocidinio fenotipo nustatymas**

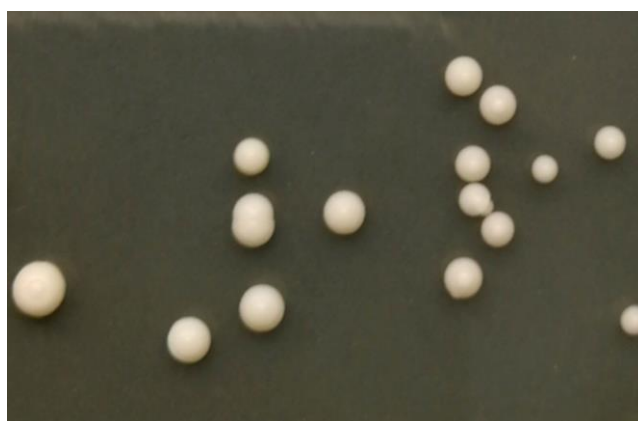
Mielių biocidinio fenotipo nustatymas atliekamas nudojant pH 4,8 MB terpę su giluminiu jautrių toksinams ląstelių sluoksniu petri lėkštelėje. Steriliai paimama  $1 \times 10^6$  ląstelių ir pH 4,8 MB terpė pilama į mėgintuvėlius su jautrių toksinams mielių kultūra ir išpilama į petri lėkštelę. Petri lėkštelės švelniai maišomos sukamaisiais judesiais, kad giluminio sluoksniu ląstelės tolygiai pasiskirstytų po visą petri lėkštelę. Kai MB terpė sustingsta, daromi, užaugusių mielių kolonijų (po skirtingos temperatūros (2.2.15.) ar terpės pH (2.2.16.) įtakos eksperimentų) antspaudai ant petri lėkštelių su agarizuota YPD mielių mitybine ir MB terpe. Petri lėkštelės laikomos 36–48 val. 25 °C temperatūros termostate. Biocidinis fenotipas pasireiškia skaidria lizės zona aplink tiriamąsias kolonijas, kurių dydį galima įvertinti milimetrais.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. *Saccharomyces paradoxus* rūšies nustatymas

Gamtos tyrimo centro Genetikos laboratorijoje surinkta mielių kolekcija nuo įvairių Lietuvoje augančių vaisių ir uogų. Mielių rūšys buvo nustatomos morfologiškai bei molekuliniais metodais.

Tiriamos mielių ląstelės formavo baltas, matines kolonijas, lygiais kraštais (3.1 pav.). Atlikus mikroskopinę mielių kolonijų ir ląstelių analizę, toliau tyrimams buvo atrinktos 4 mielių kultūros, kurios atitiko *Saccharomyces* genties mielėms būdingus požymius. BCR-17-18 mielės aptiktos ant juodųjų serbentų (Vilnius), CKB-17-33 – aronijų (Alytus), PR-17-59 – kriaušių (Vilnius) ir PR-17-63 – kriaušių (Klaipėda).

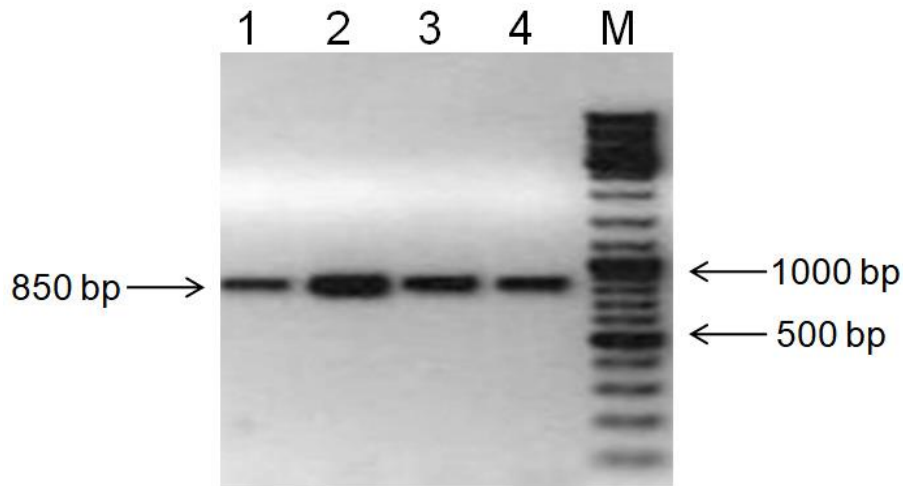


**3.1 pav.** Mielių kolonijų nuotrauka.

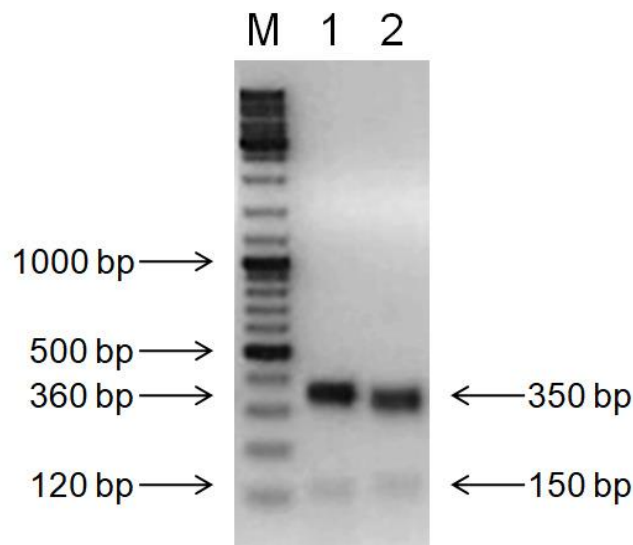
Norint nustatyti, kuriai mielių rūšiai priklauso atsirinktos kultūros, buvo naudojami molekuliniai metodai. Iš BCR-17-18, CKB-17-33, PR-17-59 ir PR-17-63 mielių kultūrų išskirta genomine DNR. PGR reakcijai naudojami ITS1 ir ITS4 (tiesioginis ir atvirkštinis, atitinkamai) pradmenys ITS1–5,8S–ITS2 srities rDNR fragmentų padauginimui. Atlikus PGR fragmentų elektroforetinę analizę nustatyta, kad gauti fragmentai visais 4 atvejais tokio pat dydžio – 850 bp (3.2 pav.).

Padauginti ITS1–5,8S–ITS2 srities rDNR fragmentai hidrolizuojami *HinfI* ir *CfoI* restrikcijos endonukleazėmis. Hidrolizavus BCR-17-18, CKB-17-33, PR-17-59 ir PR-17-63 mielių kultūrų DNR fragmentus atliekama elektroforetinė analizė (3.3 pav.). Nustatyta, jog visų keturių mielių mėginių restrikcijos profiliai su *HinfI* (360 bp, 350 bp ir 120 bp dydžio fragmentai) ir su *CfoI* (350 bp, 350 bp ir 150 bp fragmentai) restrikcijos endonukleazėmis yra panašūs ir būdingi *Saccharomyces paradoxus* mielių rūšiai.





**3.2 pav.** Tirtų *S. paradoxus* mielių padaugintų ITS1–5,8S–ITS2 sričių rDNR fragmentų elektroforetinė analizė. 1 – PR-17-63, 2 – BCR-17-18, 3 – CKB-17-33, 4 – PR-17-59. M – DNR molekulinės masės standartas.



**3.3 pav.** Padauginto ITS1–5,8S–ITS2 srities rDNR fragmento, hidrolizuoto su *HinfI* ir *CfoI* restrikcijos endonukleazėmis, elektroforetinė analizė. M – DNR molekulinės masės standartas. CKB-17-33 ITS srities DNR fragmentas hidrolizuotas su: 1 – *HinfI* restrikcijos endonukleaze, 2 – *CfoI* restrikcijos endonukleaze.

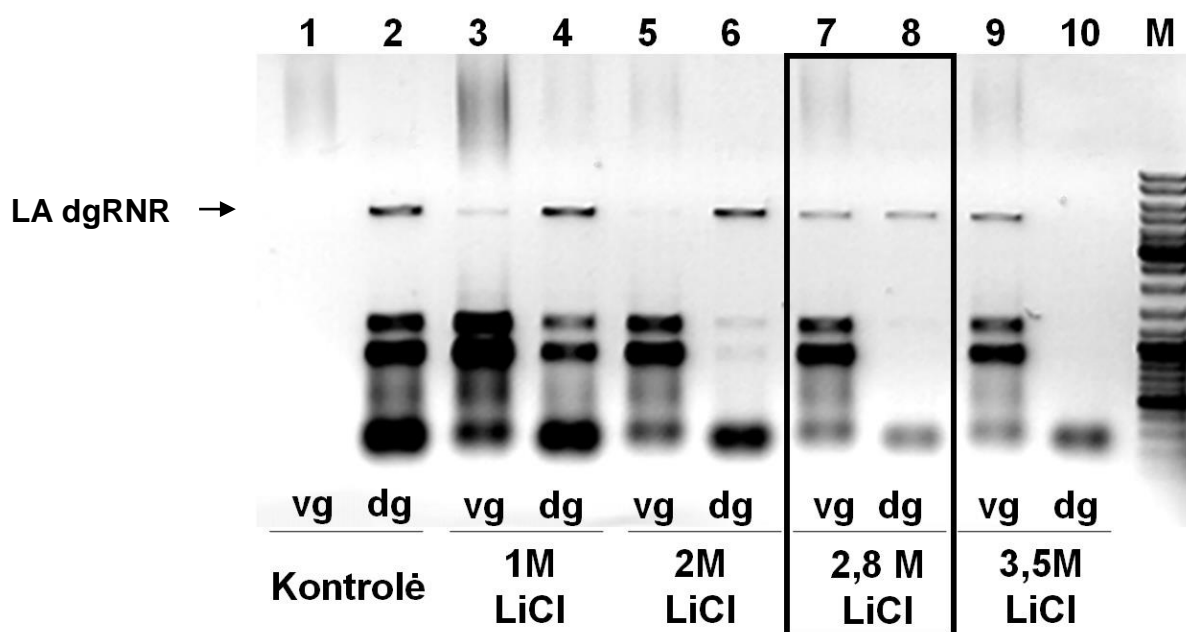
Gauti ITS1–5,8S–ITS2 srities rDNR fragmentai išgryninti naudojant „GeneJET PCR purification Kit“ rinkinį ir išsiųsti sekos nustatymui. Išanalizavus sekoskaitos duomenis bei palyginus juos su NCBI duomenų bazės referentinėmis sekomis, nustatyta, kad visos 4 mielių kultūros priklauso *S. paradoxus* mielių rūšiai. *S. paradoxus* kamienų padaugintų rDNR fragmentų sekos su referentinėmis sekomis sutapo 100 %: BCR-17-18 – FUN:JQ070083 (Gujjari et al., 2011), CKB-17-33 ir PR-17-63 – FUN:FJ713072 (Thornton, 2009), PR-17-59 – FUN:D89890 (Oda et al., 1997).

### 3.2. Dvigrandės RNR išskyrimo metodo optimizavimas

Nustačius, kad tirtos mielių kultūros priklauso *S. paradoxus* mielių rūšiai, buvo išskiriama dgRNR, siekiant nustatyti, ar šios mielės turi virusinę dgRNR. Geros kokybės dgRNR išskyrimui reikėjo optimizuoti dgRNR išskyrimo metodą.

Suardžius tiriamas mielių ląsteles ir jose esančius baltymus, buvo išskiriama suminė RNR. Išskirta sumRNR yra veikama LiCl tirpalu, kuris išsodina vgRNR, o supernatante lieka dgRNR. Šis atskyrimas ypač svarbus norint aptikti M tipo dgRNR, kuri elektroforezės gelyje migruoja panašiai kaip vgRNR fragmentai. Todėl buvo nuspręsta nustatyti optimalią LiCl koncentraciją dgRNR gryninimui.

Eksperimento metu tirtos 1 M, 2 M, 2,8 M ir 3,5 M LiCl tirpalo koncentracijos. Iš *S.paradoxus* mielių ląstelių išskyrus vgRNR ir dgRNR, jų atskyrimo efektyvumas buvo analizuojamas horizontalios elektroforezės metodu (3.3 pav.).



**3.4 pav.** Iš *Saccharomyces paradoxus* išskirtos vgRNR ir dgRNR, naudojant skirtingas LiCl koncentracijas, elektroforetinė analizė. 1, 3, 5, 7, 9 – išskirta vgRNR; 2, 4, 6, 8, 10 – išskirta dgRNR; M – DNR dydžių standarto mišinys.

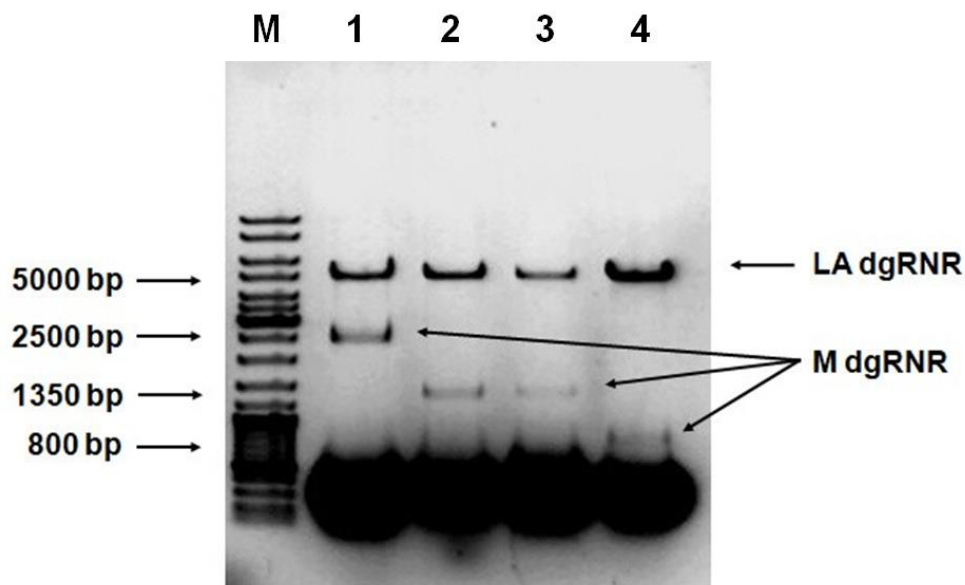
Kontroliniame mėginyje vgRNR neišsėdo į nuosėdas (3.4 pav. 1), t.y. dgRNR neatsiskyrė nuo vgRNR, kadangi mėginyje nebuvo įdėta LiCl tirpalo. Esant 1 M ir 2 M LiCl tirpalo koncentracijai mėginyje yra stebimas nepilnas vgRNR ir dgRNR atsiskyrimas, dgRNR frakcijoje yra didelė LA tipo dgRNR koncentracija, tačiau su vgRNR priemaišomis (3.4 pav. 3–6). Esant 2,8 M LiCl tirpalo koncentracijai mėginyje, dgRNR yra panašios koncentracijos tiek vgRNR, tiek dgRNR frakcijose, tačiau vgRNR priemaišų dgRNR

mėginyje beveik nėra (3.4 pav. 7–8). Esant 3,5 M LiCl tirpalo koncentracijai mėginyje, į nuosėdas iškrenta ne tik vgRNR, bet ir dgRNR (3.4 pav. 9–10), todėl ši koncentracija per didelė norint atskirti dgRNR nuo vgRNR. Nepaisant dgRNR praradimo dėl dalies nukleorūgščių nusėdimo su vgRNR, tolimesniuose darbuose buvo naudojama optimali 2,8 M LiCl koncentracija, norint išskirti gryną ir kokybišką dgRNR iš *S. paradoxus* mielių ląstelių.

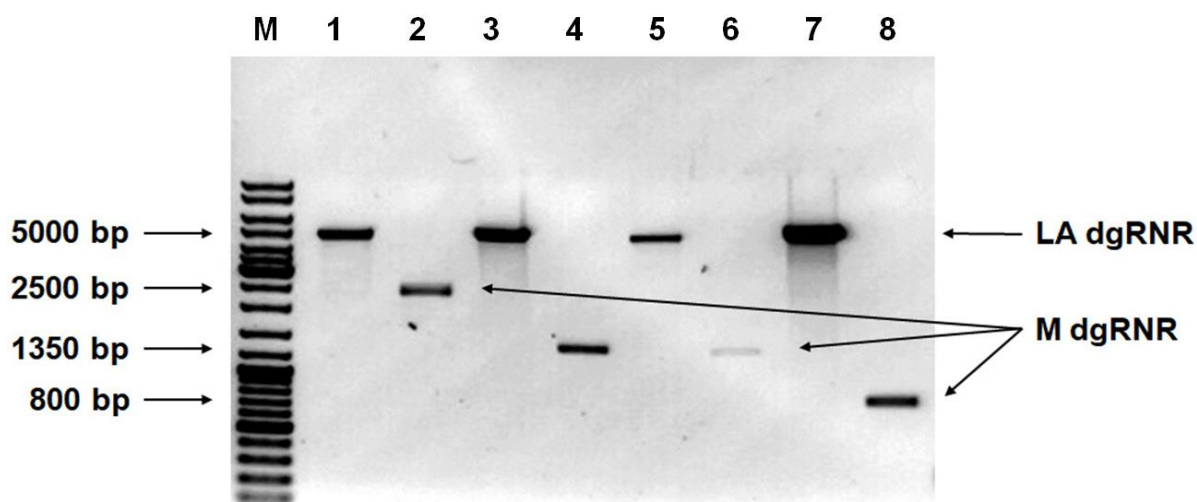
### 3.3. *Saccharomyces paradoxus* dgRNR išskyrimas ir gryninimas

Optimizavus dgRNR išskyrimo iš mielių ląstelių metodiką, dgRNR buvo išskirta iš *S. paradoxus* BCR-17-18, CKB-17-33, PR-17-59, PR-17-63 mielių kultūrų. Išskirta dgRNR buvo tikrinama horizontalios elektroforezės metodu ir atlikus UV vizualizaciją buvo nustatyta, jog visos keturios *S. paradoxus* kultūros turi LA ir M dgRNR (3.5 pav.).

LA tipo dgRNR dydžiai yra panašūs – apie 5 kb (3.5 pav.), o M tipo dgRNR fragmentų dydžiai skirtingi. Iš *S. paradoxus* BCR-17-18 kultūros išskirtos M tipo dgRNR dydis apie 2,5 kb (3.5 pav. 1), CKB-17-33 ir PR-17-59 kultūros M tipo dgRNR dydžiai panašūs – apie 1,35 kb (3.5 pav 2–3), o PR-17-63 kultūros M tipo dgRNR dydis mažiausias – apie 800 bp (3.5 pav. 4).



**3.5 pav.** Iš *Saccharomyces paradoxus* mielių kultūrų išskirtos dgRNR elektroforezinė analizė. M – DNR dydžių standarto mišinys; 1–4 iš skirtingų *S. paradoxus* mielių kultūrų išskirta dgRNR: 1 – BCR-17-18, 2 – CKB-17-33, 3 – PR-17-59, 4 – PR-17-63.



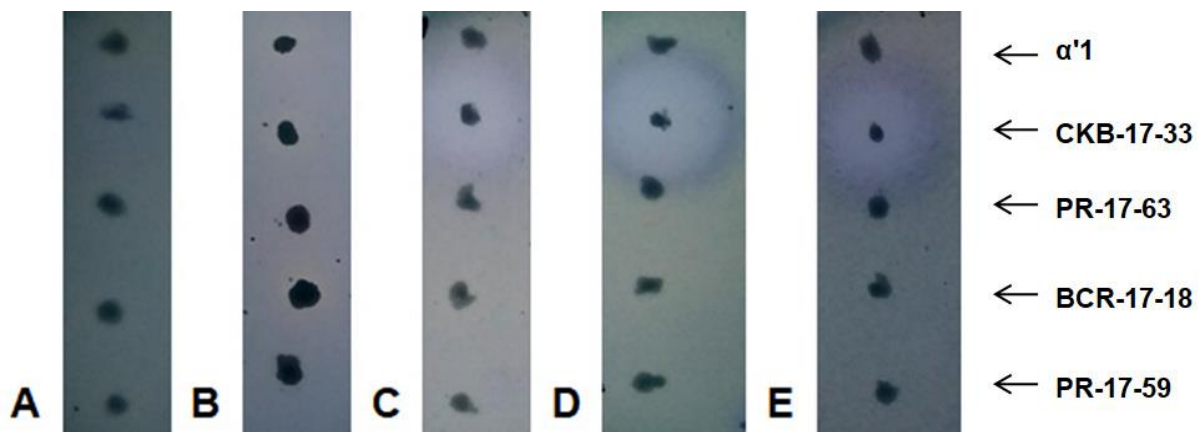
**3.6 pav.** Iš *Saccharomyces paradoxus* išgrynintos skirtingų tipų (LA/M) dgRNR elektroforetinė analizė. M – DNR dydžių standarto mišinys; 1–8 iškirta skirtingo tipo dgRNR iš skirtingų *S. paradoxus* kultūrų: 1, 2 – BCR-17-18, 3, 4 – CKB-17-33, 5, 6 – PR-17-59, 7, 8 – PR-17-63; 1, 3, 5, 7 – LA tipo dgRNR; 2, 4, 6, 8 – M tipo dgRNR.

Skirtingo tipo (LA ir M) dgRNR gryninimui iš agarozinio gelio, naudojama dgRNR, kuri išskiriama iš didelio kiekio ląstelių biomasės. LA ir M dgRNR išpjaunama iš gelio ir gryninama „GeneJET Gel Extraction Kit“ rinkiniu. Išgryninus skirtingas LA ir M tipo dgRNR iš *S. paradoxus* BCR-17-18, CKB-17-33, PR-17-59, PR-17-63 mielių kultūrų buvo atlikta elektroforetinė analizė (3.6 pav.) ir įsitikinta, jog dgRNR gryninimas atliktas sėkmingai, o skirtingo tipo (LA ir M) dgRNR fragmentai atitinka prieš tai nustatytus dydžius.

### 3.4. *Saccharomyces paradoxus* mielių biocidiškumo tyrimas

Tiriamosiose *S. paradoxus* mielių kultūrose aptikus LA ir M dgRNR, tirta ar šioms mielėms būdingas biocidinis fenotipas, kadangi LA ir M tipo virusai sudaro biocidinę sistemą. Biocidiškumo tyrimas buvo atliekamas naudojant pH 4,8 MB terpę. Kiekvieno kamieno biocidinis fenotipas tikrinamas atliekant mielių biocidiškumo testą: aplink biocidiškas *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielių kultūros susidaro skaidrios lizės zonos.

Atlikus tyrimus buvo nustatyta, kad iš 4 tiriamų *S. paradoxus* mielių kultūrų, tik viena (CKB-17-33) – turi biocidinį fenotipą, kitos trys (BCR-17-18, PR-17-59 ir PR-17-63) – ne (3.7 pav.). *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kultūra biocidiškai veikia *S. paradoxus* BCR-17-18, PR-17-59 ir PR-17-63 ląsteles, o jų lizės zonos atitinkamai 6 mm, 5 mm ir 4 mm. Tačiau šių mielių kultūra biocidiškai neveikė *S. cerevisiae*  $\alpha$ 1 kamieno, nors jis yra laikomas ypač jautriu toksinams kamieniu (3.7 pav.).



**3.7 pav.** *S. paradoxus* mielių biocidiškumo testas. A – giluminiame ląstelių sluoksnyje *S. cerevisiae* α'1 mielių kultūra, B – giluminiame ląstelių sluoksnyje *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kultūra, C – giluminiame ląstelių sluoksnyje *S. paradoxus* PR-17-63 mielių kultūra, D – giluminiame ląstelių sluoksnyje *S. paradoxus* BCR-17-18 mielių kultūra, E – giluminiame ląstelių sluoksnyje *S. paradoxus* PR-17-59 mielių kultūra.

Nors *S. paradoxus* BCR-17-18, PR-17-59, PR-17-63 mielių kultūros palaiko LA ir M tipo dgRNR, tačiau neformuoja lizės zonų nei ant *S. cerevisiae*, nei ant *S. paradoxus* mielių. Gali būti, kad sekretuojamo toksino kiekis yra labai mažas ir įprastais metodais neužfiksuojamas arba produkuojamas toksinas kenksmingas kitoms (ne tiriamoms) mielių rūšims. *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kultūra turi stiprų biocidinį fenotipą, todėl buvo toliau tiriama šio darbo metu.

**3.1 lentelė.** *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių biocidiškumas *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* biocidinėms mielėms

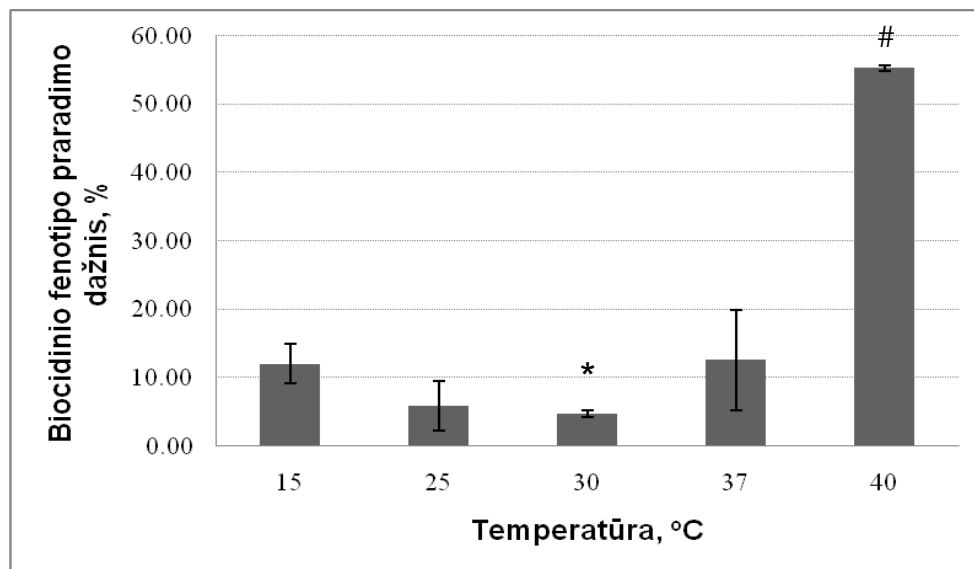
Mielių kamienas	Biocidinė sistema	Lizės zona
<i>S. cerevisiae</i> K7	K1	–
<i>S. cerevisiae</i> M437	K2	2 mm
<i>S. cerevisiae</i> RW4	Klus	0,5 mm
<i>S. paradoxus</i> K28	K28	5 mm
<i>S. paradoxus</i> AML-15-66	K66	5 mm

Nustačius, kad *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės pasižymi biocidiniu fenotipu, buvo norima išsiaiškinti, ar šios mielės biocidiškai veikia *S. cerevisiae* (K7, M437, RW4) ir *S. paradoxus* (K28, AML-15-66) mielių kultūras, kurios taip pat sintetina baltymus–toksinus. Nustatėme, kad *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kultūrų biocidiškai veikia *S. cerevisiae* M437, RW4 ir *S. paradoxus* AML-15-66, K28 ląsteles, o jų lizės zonos atitinkamai 2 mm,

0,5 mm ir 5 mm, 5 mm (3.1 lentelė). Tačiau *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kultūra biocidiškai neveikė *S. cerevisiae* K1 kamieno. Taigi, *S. paradoxus* CKB-17-33 biocidiškai veikė visas tirtas *S. paradoxus*, palaikančias skirtingo tipo dgRNR, bei kai kurias *S. cerevisiae* mielių kultūras. Tirtomis sąlygomis, CKB-17-33 biocidinis fenotipas stipriau pasireiškia prieš *S. paradoxus*, nei prieš *S. cerevisiae* mielių ląsteles.

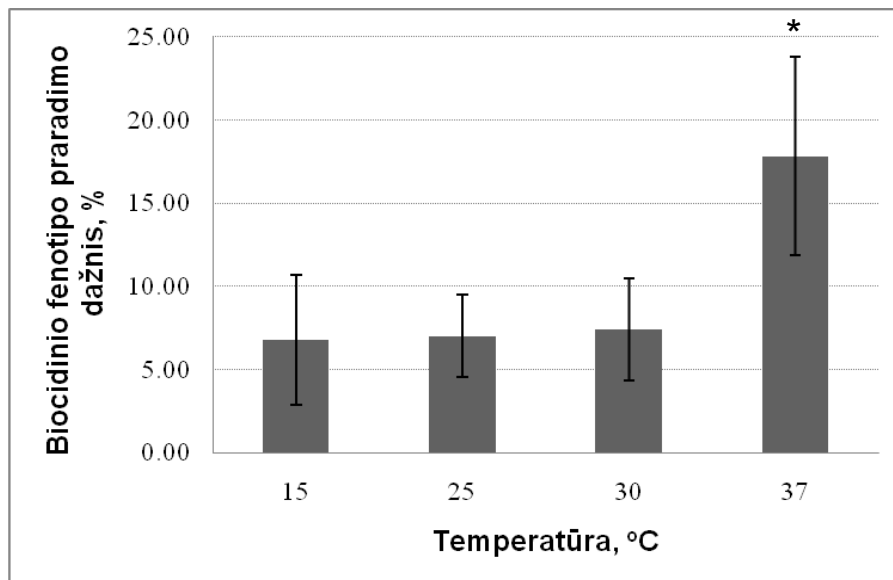
### 3.5. Temperatūros įtaka biocidiniam *Saccharomyces paradoxus* kamieno fenotipui

Šio tyrimo metu buvo siekta išsiaiškinti, ar ląstelių auginimas skirtingose temperatūrose, turi įtakos mielių biocidiniam fenotipui. *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kultūra buvo auginama 5 skirtingose temperatūrose – 15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C ir 40 °C. Prieš perkeltant mielių ląsteles į tiriamąją temperatūrą, mielių kultūra apie 20 val. buvo auginama 25 °C temperatūroje, kadangi ši temperatūra artimesnė aplinkos sąlygoms, kuriomis buvo aptiktos *S. paradoxus* mielės, nei ( $T_{opt}$ ) 30 °C. Skirtingos temperatūros įtaka mielių biocidiniam fenotipui tiriama eksponentinėje fazėje, kai ląstelių optinis tankis 0,4 (I–asis taškas), ir stacionarioje fazėje, kai ląstelių optinis tankis 4,0 (II–asis taškas), esant 600 nm bangos ilgiui.



**3.8 pav.** Skirtingų temperatūrų įtaka *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kultūros biocidinio fenotipo praradimui, kai ląstelės yra eksponentinėje fazėje. Biocidinio fenotipo praradimo dažnis išreiškiamas proc. (%).  $\bar{x} \pm SE$ ,  $n = 3-6$ ; \* – statistiškai patikimi rezultatai lyginant su 15 °C ir 40 °C temperatūros įtaka biocidinio fenotipo praradimui, # – statistiškai patikimi rezultatai lyginant su 15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C temperatūros įtaka biocidinio fenotipo praradimui, kai  $p \leq 0,05$ .

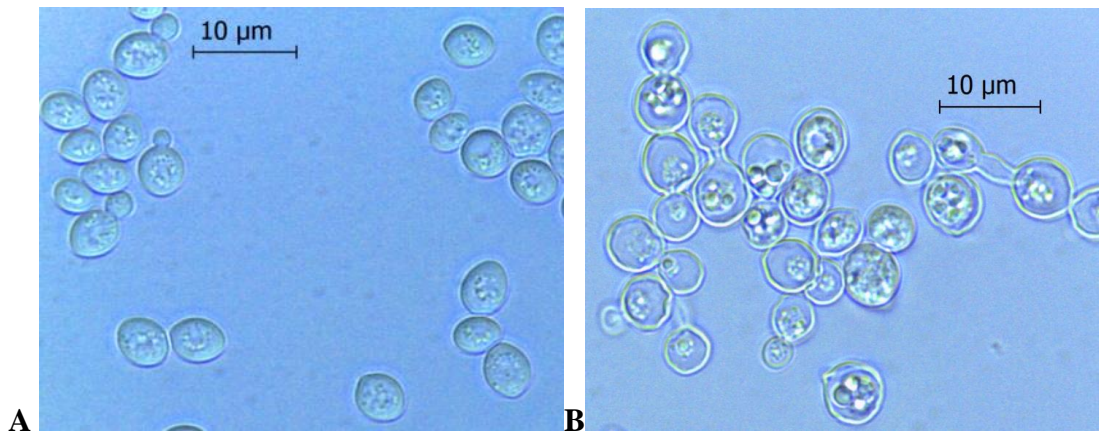
Analizuojant skirtingos temperatūros įtaką I–ame taške, kai *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės eksponentinėje fazėje (0,4 OT) (3.8 pav.), buvo nustatyta, jog esant 30 °C temperatūrai, mielių biocidinio fenotipo praradimo dažnis yra atitinkamai mažesnis  $7,34 \pm 0,46$  % ir  $55,31 \pm 0,46$  %, lyginant su 15 °C ir 40 °C temperatūros įtaka mielių biocidinio fenotipo praradimo dažniu. Nustatyta, jog esant 40 °C temperatūrai, mielių biocidinio fenotipo praradimo dažnis yra didesnis atitinkamai  $43,21 \pm 2,90$ ,  $49,35 \pm 3,62$ ,  $50,55 \pm 0,46$  ir  $42,64 \pm 7,32$ , lyginant su 15 °C, 25 °C, 30 °C ir 37 °C temperatūros įtaka mielių biocidinio fenotipo praradimo dažniu. Išanalizavus 15 °C, 25 °C ir 37 °C temperatūrų įtaką tiriamų *S. paradoxus* mielių ląstelių biocidiškumo praradimo dažniui, rezultatai reikšmingai nesiskyrė ( $12,10 \pm 2,90$  %,  $5,96 \pm 3,62$  %,  $12,67 \pm 7,32$  % atitinkamai) (3.8 pav.).



**3.9 pav.** Skirtingų temperatūrų įtaka *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių biocidinio fenotipo praradimui, esant stacionarioje ląstelių augimo fazėje. Biocidinio fenotipo praradimo dažnis išreiškiamas proc. (%).  $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=3-6$ ; \* – statistiškai patikimi rezultatai lyginant su 15 °C, 25 °C, 30 °C temperatūros įtaka biocidinio fenotipo praradimui, kai  $p \leq 0,05$ .

Analizuojant skirtingos temperatūros įtaką II–ame taške, kai *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės stacionarioje fazėje (4,0 OT) (3.9 pav.), buvo nustatyta, jog esant 37 °C temperatūrai, biocidinio fenotipo praradimo dažnis atitinkamai didesnis  $11,07 \pm 3,90$  %,  $10,83 \pm 2,48$  %,  $10,42 \pm 3,08$  %, lyginant su 15 °C, 25 °C, 30 °C temperatūros įtaka mielių biocidinio fenotipo praradimo dažniu. Išanalizavus 15 °C, 25 °C, 30 °C temperatūros įtaką *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių biocidiškumo praradimui, rezultatai tarpusavyje nesiskyrė ir buvo atitinkamai  $6,76 \pm 3,90$  %,  $7,00 \pm 2,48$  %,  $7,41 \pm 3,08$  % (3.9 pav.). Šiame tyrime 40 °C temperatūros įtaka *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių biocidiškumui

nebuvo įtraukta į palyginimą, kadangi esant šiai temperatūrai ląstelės užaugo tik iki 0,77 optinio tankio.



**3.10 pav.** *Saccharomyces paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių šviesinės mikroskopijos nuotrauka. A – mielių ląstelės augintos 25 °C temperatūroje. B – mielių ląstelės augintos 40 °C temperatūroje.

Nustačius, kad 40 °C temperatūroje ląstelės auga itin lėtai, buvo atiekama mikroskopinė *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių analizė, po 40 °C temperatūros poveikio. Išanalizavus ląsteles mikroskopu, pastebėta, jog ląstelės morfologiškai pakitusios (3.10 pav.).

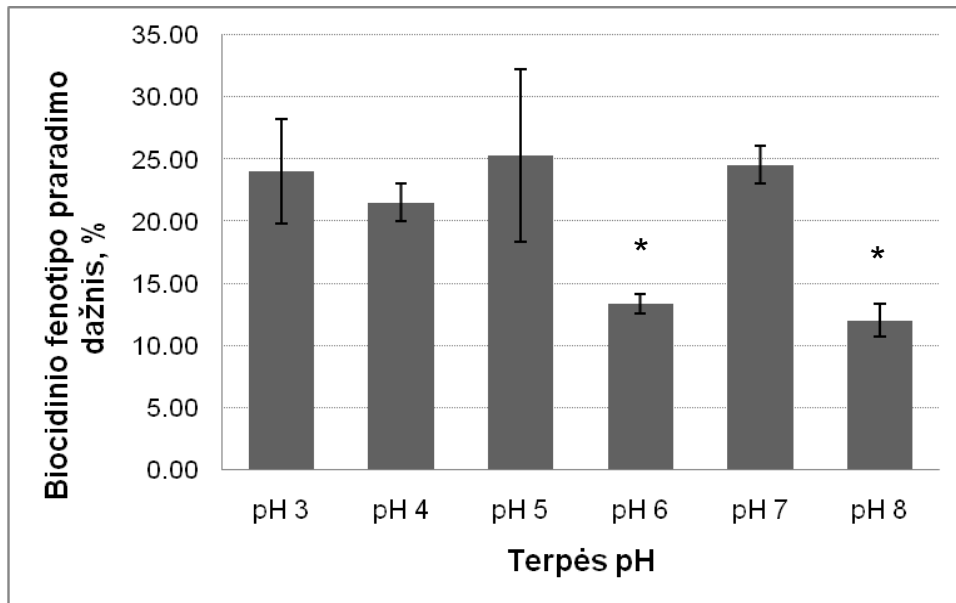
### 3.6. Terpės pH įtaka biocidiniam *Saccharomyces paradoxus* kamieno fenotipui

Šio tyrimo metu siekta išsiaiškinti, ar ląstelių auginimas, esant skirtingam pH, turi įtakos mielių biocidiniam fenotipui. Tyrimui pasirinkti 6 skirtingi terpės pH: pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 ir pH 8. Skirtingų pH įtaka mielių biocidiniam fenotipui tiriama eksponentinėje fazėje, kai ląstelių optinis tankis 0,4 (I–asis taškas), ir stacionarioje fazėje, kai ląstelių optinis tankis 4,0 (II–asis taškas), esant 600 nm bangos ilgiui.

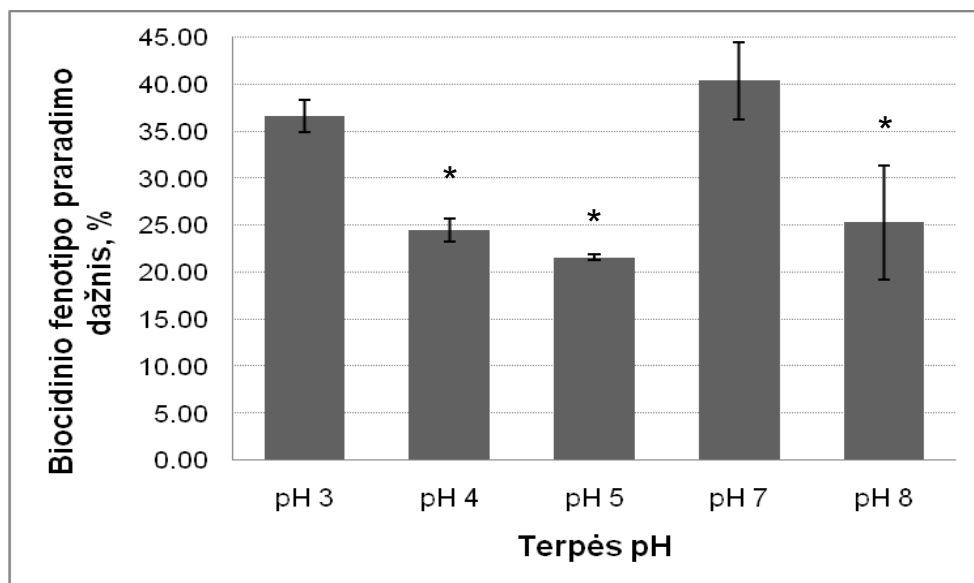
Analizuojant skirtingų terpių pH įtaką I–ame taške, kai *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės eksponentinėje fazėje (0,4 OT) (3.11 pav.), buvo nustatyta, jog ląstelėms augant terpėje, kurios pH 6, mielių biocidinio fenotipo praradimo dažnis yra mažesnis nei pH 3 – 10,67±4,22 %, pH 4 – 8,15±1,50 %, pH 5 – 11,91±6,94 %, pH 7 – 11,22±1,49 %. Esant terpės pH 8 *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių biocidinio fenotipo praradimo dažnis yra mažesnis nei pH 3 – 12,00±4,22 %, pH 4 – 9,48±1,50 %, pH 5 – 13,24±6,94 %, pH 7 – 12,55±1,49 %. Nagrinėjant terpės pH 3, pH 4, pH 5 ir pH 7 įtaką CKB-17-33 mielių ląstelių biocidiškumo praradimui, rezultatai tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė ir buvo atitinkamai 24,04±4,22 %, 21,52±1,50 %, 25,28±6,94 % ir 24,59±1,49 %. *S. paradoxus*



CKB-17-33 mielių ląstelėms augant terpėje, kurios pH 6 ir pH 8, ląstelių biocidinio fenotipo praradimo dažniai tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė ir buvo atitinkamai  $13,37 \pm 0,77$  % ir  $12,04 \pm 1,31$  % (3.11 pav.).



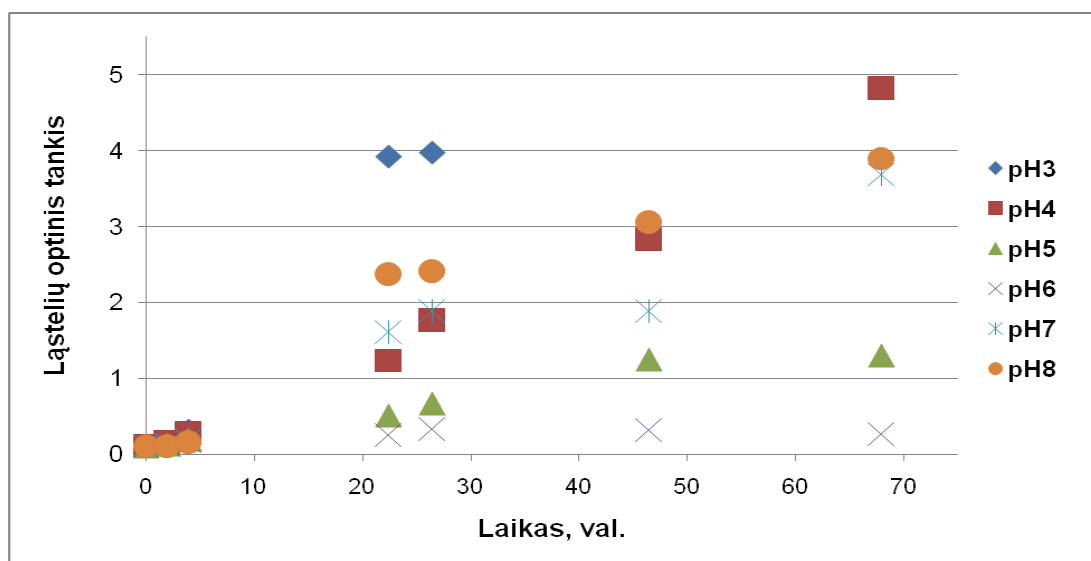
**3.11 pav.** Skirtingų pH įtaka *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno biocidinio fenotipo praradimui, kai ląstelės yra eksponentinėje fazėje. Mielių biocidinio fenotipo praradimo dažnis išreiškiamas proc. (%).  $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=3-6$ ; \* – statistiškai patikimi rezultatai lyginant su terpės pH 3, pH 4, pH 5, pH 7 įtaka biocidinio fenotipo praradimui, kai  $p \leq 0,05$ .



**3.12 pav.** Skirtingų pH įtaka *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių biocidinio fenotipo praradimui, kai ląstelės yra stacionarioje fazėje. Mielių biocidinio fenotipo praradimo dažnis išreiškiamas proc. (%).  $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=3-6$ ; \* – statistiškai patikimi rezultatai lyginant su aplinkos pH 3, pH 7 įtaka biocidinio fenotipo praradimui, kai  $p \leq 0,05$ .

Analizuojant skirtingų terpių pH įtaką II–ame taške, kai *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės stacionarioje fazėje (0,4 OT) (3.12 pav.), buvo nustatyta, jog ląstelėms augant terpėje, kurios pH 4, pH 5 ir pH 8, mielių biocidinio fenotipo praradimo dažnis atitinkamai mažesnis nei pH 3 –  $12,10 \pm 1,71$  %,  $15,00 \pm 1,71$  %,  $11,32 \pm 1,71$  %, nei pH 7 –  $15,89 \pm 4,22$  %,  $18,79 \pm 4,22$  %,  $15,11 \pm 4,22$  %. *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelėms augant terpėje, kurios pH 3 ir pH 7, ląstelių biocidinio fenotipo praradimo dažnis tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė ir buvo atitinkamai  $36,63 \pm 1,71$  % ir  $40,42 \pm 4,12$  %. Išanalizavus terpės pH 4, pH 5 ir pH 8 įtaką CKB-17-33 mielių ląstelių biocidiškumo praradimui, rezultatai tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė ir buvo atitinkamai  $24,53 \pm 1,19$  %,  $21,62 \pm 0,28$  % ir  $25,31 \pm 6,11$  % (3.12 pav.).

Atliekant skirtingo pH įtakos *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių biocidinio fenotipo praradimui tyrimą pastebėta, jog esant skirtingam terpės pH CKB-17-33 mielių ląstelių tankis didėja skirtingai. Esant terpės pH 3, pH 4, pH 7 ir pH 8 *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės pasiekė 0,4 OT atitinkamai per 5 val., 6 val., 11 val. ir 10 val. (3.13 pav.). Esant terpės pH 5 – per maždaug 22 val. Tačiau esant terpės pH 6 *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno ląstelės net ir po 68 val. pasiekė tik 0,26 OT. Toliau auginant CKB-17-33 mielių ląsteles terpėse, kurių pH 3, pH 4, pH 7 ir pH 8, II–asis taškas, kai mielių ląstelių optinis tankis 4,0, pasiekė atitinkamai per maždaug 26 val., 57 val., 68 val. ir 68 val. Tačiau esant terpės pH 5 *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės net ir po 68 val. pasiekė 1,3 OT (3.13 pav.).



**3.13 pav.** *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių tankio kitimas laike. *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno ląstelės augintos YPD mielių mitybinėje terpėje, esant skirtingam pH: pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 ir pH 8. Mielių ląstelių optinis tankis, matuojamas esant 600 nm bangos ilgiui.

Pastebėjus, jog *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląsteles auginant, kai terpės pH 6, ląstelės beveik neauga, buvo siekta išsiaiškinti, ar pH 6 terpė panašiai veikia ir *S. cerevisiae* M437, BY,  $\alpha$ '1 ir *S. paradoxus* BCR-17-18, PR-17-59, PR-17-63, AML-15-66 mielių ląstelių augimą. Buvo nustatyta, jog *S. cerevisiae* M437, BY,  $\alpha$ '1 ir *S. paradoxus* BCR-17-18, PR-17-59, PR-17-63, AML-15-66 mielių ląsteles auginant 24 val., kai terpės pH 6, ląstelės pasiekė atitinkamai 2,4 OT, 1,4 OT, 1,9 OT, 3,9 OT, 0,6 OT, 0,6 OT ir 3,9 OT. Buvo nustatyta, jog tik *S. paradoxus* CKB-17-33, PR-17-59 ir PR-17-63 mielių efektyviam ląstelių augimui pH 6 terpė yra netinkama.

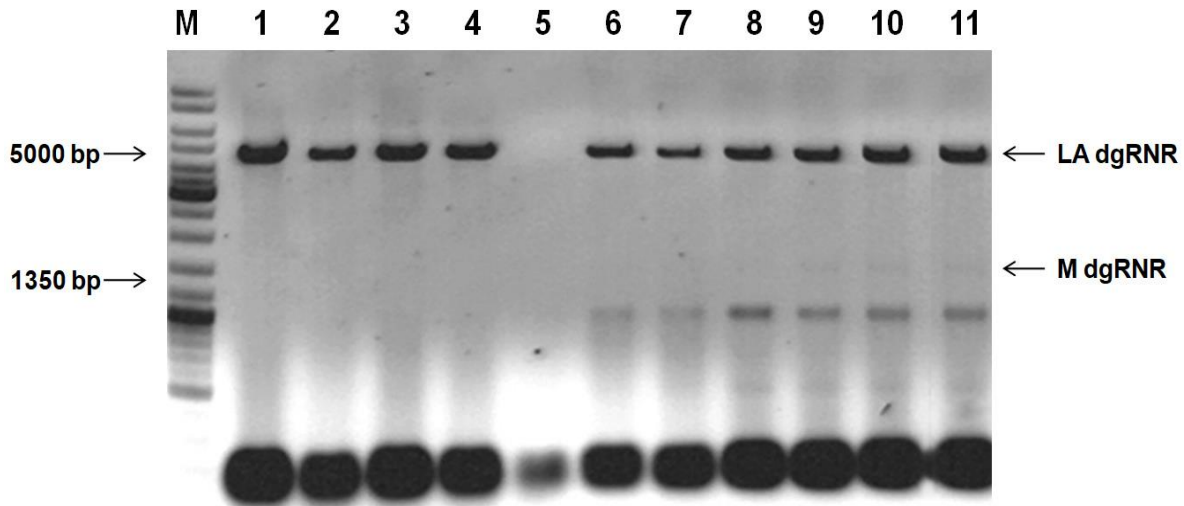
Atlikus eksperimentą buvo matuojama terpių pH vertė, norint įsitikinti ar vykdant tyrimą augdamos mielių ląstelės nepakeitė terpės pH. Pamatavus terpių pH buvo įsitikinta, jog pH vertės nepakito.

### **3.7. Biocidinį fenotipą praradusių *Saccharomyces paradoxus* ląstelių dgRNR tyrimas**

Buvo siekiama išsiaiškinti ar *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kolonijos, kurios prarado biocidinį fenotipą, palaiko virusinę dgRNR. Šiam tikslui buvo išskirta dgRNR iš *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kolonijų, kurios biocidiškumo neteko dėl skirtingos temperatūros ar terpės pH poveikio.

Iš *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių augusių eksponentinėje arba stacionarioje fazėje skirtingomis temperatūros (15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C ir 40 °C) ar terpės pH (pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 ir pH 8) sąlygomis, buvo atsirenkama po 1 koloniją. Iš jų išskirta dgRNR buvo tikrinama horizontalios elektroforezės metodu (3.14 pav.) (3.15 pav.).

*S. paradoxus* mielės, kurios palaiko abiejų tipų (LA ir M) dgRNR virusus ir yra biocidiškos – kontrolė (3.14 pav. 11). Visi išskirti dgRNR fragmentai lyginami su kontrole. Išanalizavus gautus rezultatus buvo nustatyta, jog *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių kolonijos, kurios prarado biocidinį fenotipą po skirtingos temperatūros poveikio, ne visos palaiko dgRNR (3.14 pav. 1–8). Iš gautų rezultatų buvo padaryta išvada, jog tik *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno ląstelės stacionarioje fazėje (4,0 OT), kurios paveiktos 37 °C temperatūra (3.13 pav. 9), bei mielės eksponentinėje (0,4 OT) fazėje paveiktos 40 °C temperatūra (3.14 pav. 10), prarado biocidinį fenotipą, bet palaiko abiejų tipų (LA ir M) dgRNR. *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno ląstelės, kurios stacionarioje fazėje buvo paveiktos 25 °C temperatūra, neturi nei LA, nei M virusinės dgRNR (3.14 pav. 5). Visomis kitomis tiriamos temperatūros sąlygomis pastebėta, jog *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės nepalaiko M tipo dgRNR, tačiau turi LA tipo virusinę dgRNR (3.2 lentelė).



**3.14 pav.** Iš *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno kolonijų, kurios neteko biocidinio fenotipo, po skirtingų temperatūrų poveikio, išskirtos dgRNR elektroforetinė analizė. Tirtas skirtingas temperatūros poveikis skirtingose ląstelių augimo fazėse: I–asis, eksponentinėje fazėje, kai 0,4 OT ir II–asis, stacionarioje fazėje, kai 4,0 OT. M – DNR dydžių standarto mišinys. 1–10 išskirta dgRNR iš kolonijų, praradusių biocidiškumą: 1 – 40 °C II, 2 – 15°C I, 3 – 15 °C II, 4 – 25 °C I, 5 – 25 °C II, 6 – 30 °C I, 7 – 30 °C II, 8 – 37 °C I, 9 – 37 °C II, 10 – 40 °C I. 11 – teigiama kontrolė.

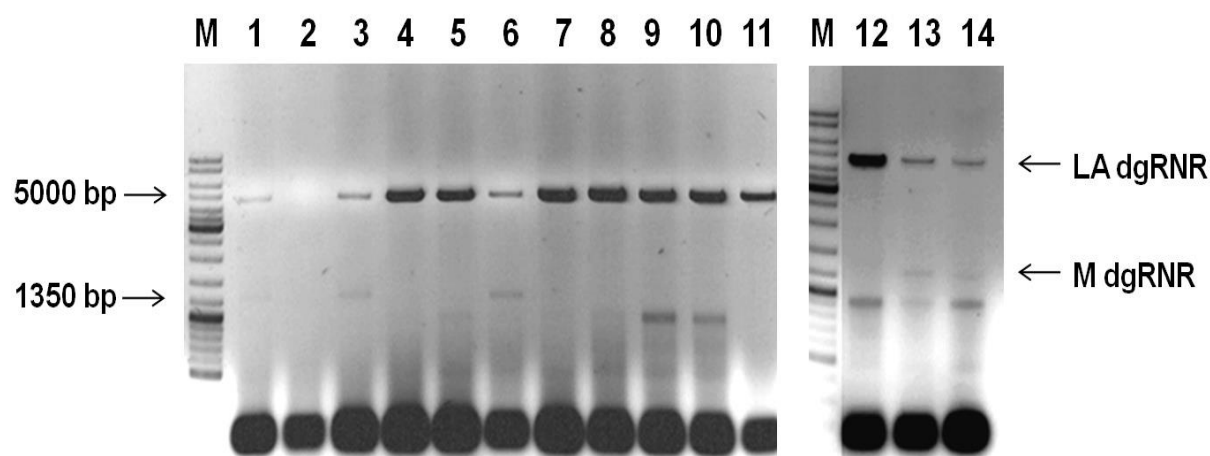
**3.2 lentelė.** Iš *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno kolonijų, kurios neteko biocidinio fenotipo, po skirtingų temperatūrų poveikio, išskirta dgRNR

	15°C I	15°C II	25°C I	25°C II	30°C I	30°C II	37°C I	37°C II	40°C I	40°C II*
LA tipo dgRNR	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
M tipo dgRNR	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–

+ - turi; – - neturi; I – ląstelių optinis tankis 0,4; II – ląstelių optinis tankis 4,0; II\* – ląstelių optinis tankis 0,77

Išanalizavus gautus rezultatus nustatyta, jog *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių kolonijos, kurios prarado biocidinį fenotipą po skirtingo pH poveikio, ne visos palaiko skirtingų tipų dgRNR (3.15 pav. 2,4,5,7–11). Buvo nustatyta, jog tik *S. paradoxus* CKB-17-33 ląstelės eksponentinėje fazėje, augusios pH 5 terpėje (3.15 pav. 6), bei ląstelės stacionarioje fazėje, augusios pH 3 ir pH 8 terpėje (3.15 pav. 3, 13), prarado biocidinį fenotipą, tačiau palaiko LA ir M virusines dgRNR. *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės eksponentinėje fazėje, augusios pH 3 terpėje (3.15 pav. 2), nepalaiko nei LA, nei M tipo dgRNR. Auginant mielių ląsteles kitų pH terpėse nustatyta, jog jose nėra M tipo dgRNR, tačiau yra LA tipo virusinė dgRNR (3.15 pav.) (3.3 lentelė). Tai reiškia, jog šios mielių

ląstelės prarado M dgRNR ir dėl to nepasireiškė biocidinis fenotipas, nes M tipo dgRNR yra koduojamas baltyminės kilmės toksinas.



**3.15 pav.** Iš *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kolonijų, kurios neteko biocidinio fenotipo, po skirtingo pH poveikio, išskirtos dgRNR elektroforetinė analizė. Tirtas skirtingas terpės pH poveikis skirtingose ląstelių augimo fazėse: I–asis, eksponentinėje fazėje, kai 0,4 OT ir II–asis, stacionarioje fazėje, kai 4,0 OT. M – DNR dydžių standarto mišinys. 1 ir 14 – teigiamos kontrolės, 1– 13 išskirta dgRNR iš kolonijų, praradusių biocidiškumą: 2 – pH 3 I, 3 – pH 3 II, 4 – pH 4 I, 5 – pH 4 II, 6 – pH 5 I, 7 – pH 5 II, 8 – pH 6 I, 9 – pH 7 I, 10 – pH 7 II, 12 – pH 8 I, 13 – pH 8 II.

**3.3 lentelė.** Iš *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kolonijų, kurios neteko biocidiniu fenotipu, po skirtingo pH poveikio, išskirta dgRNR.

	pH3 I	pH3 II	pH4 I	pH4 II	pH5 I	pH 5 II*	pH 6 I**	pH 7 I	pH 7 II	pH 8 I	pH 8 II
LA tipo dgRNR	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M tipo dgRNR	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	+

+ - turi; – - neturi; I – ląstelių optinis tankis 0,4; II – ląstelių optinis tankis 4,0 ; II\* – ląstelių optinis tankis 1,3; ; I\*\* – ląstelių optinis tankis 0,27;

Padaryta išvada, kad ne visos *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės, praradusios biocidiškumą po skirtingų temperatūrų ir pH poveikio palaikė LA ir M tipų virusinę dgRNR. Daugeliu atvejų *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelėse LA tipo dgRNR buvo palaikoma, o M tipo dgRNR – ne. Tai rodo *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno virusinės dgRNR nestabilumą.

## REZULTATŲ APTARIMAS

Šio darbo tiriamasis objektas – *S. paradoxus* mielės, aptiktos vykdant spontaninę Lietuvos vaisių ir uogų fermentaciją. Tirtos keturių kultūrų mielių ląstelės morfologiškai atitiko *Saccharomyces* genties mielėms būdingus požymius, aprašomus literatūros šaltiniuose (Vaughan-Martini et al., 2011). Norint patikimai nustatyti mielių rūšį pasitelkti ir molekuliniai metodai: atliktas ITS–5,8–ITS srities rDNR fragmento padauginimas ir RFLP (restrikcijos fragmentų ilgių polimorfizmo) analizė (žr. 3.1) (Naumova et al., 2003; Granchi et al., 1999). Nors abiejų tyrimų rezultatai nebuvo prieštaringi, neatmesta tikimybė, kad taškinės mutacijos galėjo turėti įtakos RFLP analizei. Restrikcijos endonukleazės atpažįsta tik kelių nukleotidų ilgio sekas, todėl papildomai atlikta rDNR fragmentų sekoskaita ir sekų bioinformatinė analizė, leidusi palyginti tiramųjų mielių rDNR sekas su aprašytais literatūroje ir įvertinti jų panašumą. Tiriamos sekos patikimai (100 %) sutapo su referentinėmis sekomis, iš kurių dvi (CKB-17-33 ir PR-17-63) buvo panašiausios į Jungtinės Karalystės upės žiočių žemės mėginiuose aptiktą *S. paradoxus* kultūrą (Thornton, 2009), o kitos dvi (BCR-17-18 ir PR-17-59) į Amerikos ir Nyderlandų mielių kolekcijose esančių kamienų sekas (Gujjari et al., 2011; Oda et al., 1997).

Nustačius, kad tirtos mielių kultūros priklauso *S. paradoxus* mielių rūšiai, buvo tiriama, ar šių kamienų mielių ląstelėse palaikomi dgRNR virusai, kadangi yra žinoma, jog kai kurie *S. paradoxus* kamienai palaiko skirtingo tipo (LA ir M) dgRNR virusus, pvz.: LA–21/M21, LA–28/M28, LA–45/M45, LA–62/M62, LA–66/M66, LA–74/M74 (Vepškaitė-Monstavičė et al., 2018; Rodríguez-Cousiño et al., 2017). Pasirinkome sumRNR išskyrimo metodą naudojant rūgštinį fenolį (žr. 2.2.11.), kuris kolegų sėkmingai taikytas ankstesniuose aukštos kokybės ir didelio kiekio RNR išskyrimo iš *Saccharomyces* mielių tyrimuose (Konovalovas, 2018). LA tipo dgRNR, kurios dydis yra apie 5 kb, dažniausiai detektuojama sumRNR elektroforezėje, kadangi virusinės dgRNR kiekis yra daug didesnis palyginus su panašaus dydžio ląstelės informacine RNR. Žinomi M dgRNR virusai (žr. 1.1 lentelė ir 1.2 lentelė) dažniausiai yra daugiau nei dvigubai mažesni ir jų kiekis mažesnis nei LA tipo dgRNR. Vizualizuojant suminę ląstelės RNR, detektuojama ribosominė RNR, kurios kiekis panašus į LA dgRNR kiekį, dažnai nustelbia artimo jai dydžio M dgRNR. Dėl to norint nustatyti LA ir M tipo dgRNR, ją būtina atskirti nuo vgRNR. Dvigrandės RNR išskyrimo metodas buvo optimizuojamas, t.y. nustatyta optimali LiCl koncentracija, kadangi literatūroje aprašomos skirtingos (2M, 4M) LiCl koncentracijos, naudojamos vgRNR išsodinimui (Diaz-Ruiz et al., 1978). Nagrinėjant vgRNR ir dgRNR atsiskyrimo efektyvumą, nustatėme, jog

2,8 M LiCl koncentracija yra optimali, norint kokybiškai atskirti virusinę dgRNR nuo *S. paradoxus* vgRNR (žr. 3.2).

Optimizavus metodą ir išskyrus dgRNR, nustatėme, jog visose keturiose (CKB-17-33, BCR-17-18, PR-17-59 ir PR-17-63) *S. paradoxus* kultūrose yra palaikoma LA ir M tipo dgRNR (3.5 pav.). LA tipo dgRNR dydis visuose mėginiuose vienodas – apie 4,8 kb, kaip ir literatūroje aprašomų *S. paradoxus* ir *S. cerevisiae* LA tipo dgRNR (Icho, Wickner, 1989; Rodríguez-Cousiño et al., 2017). M tipo dgRNR dydis tirtose *S. paradoxus* kultūrose skyrėsi – 2,5 kb, 1,35 kb ir 800 bp (žr. 3.6. pav.). *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielėse aptinkami M tipo dgRNR virusai, aprašyti literatūros šaltiniuose yra 1,5–2,4 kb dydžio (Meškauskas, Čitavičius, 1992). Nei viena tiriamųjų kamienų palaikoma M tipo dgRNR savo dydžiu neatitiko literatūroje aprašytų virusų: 800 bp dgRNR fragmentas neturi analogų, 1,35 kb dgRNR artimiausia 1,5 kb dydžio *S. cerevisiae* M2 virusinei RNR, o 2,5 kb dgRNR – 2,4 kb *S. paradoxus* M74 (Rodríguez-Cousiño et al., 2017; Pagé et al., 2003).

Nustačius, jog tiriamieji kamienai palaiko LA ir M tipo dgRNR, tirta ar šie virusai sudaro biocidinę sistemą. Atlikus biocidiškumo testus, nustatyta, kad tik *S. paradoxus* CKB-17-33 kultūra pasižymi biocidiniu fenotipu. Tokio pat dydžio M dgRNR palaikantis PR-17-59 kamienas biocidiškumu nepasižymėjo. Abiejų kamienų M dgRNR yra panašaus dydžio, todėl gali būti, jog kiekviena koduoja kitokio tipo toksiną, arba abi dgRNR yra giminingos, tačiau PR-17-59 M dgRNR koduojamas toksinas neaktyvus, pvz.: dėl toksino geno mutacijų arba ląstelės šeimininkės genų, reikalingų toksino brendimui, mutacijų. Negalima vienareikšmiškai teigti, kad biocidiniu fenotipu nepasižyminčių kamienų M dgRNR koduoja neaktyvius toksinus. Jie gali būti aktyvūs prieš kitas, mūsų netirtas ar net nekultivuojamas, tačiau gamtoje paplitusias mielių rūšis.

*S. paradoxus* CKB-17-33 kultūra biocidiškai veikia visas tirtas *S. paradoxus* ir kai kurias *S. cerevisiae* mielių kultūras. Buvo nustatyta, kad *S. paradoxus* CKB-17-33 sintetinam toksinui *S. paradoxus* mielių kultūros yra jautresnės, nei *S. cerevisiae* (žr. 3.1. lentelė). Remiantis tuo, kad ypač jautrus toksinams *S. cerevisiae*  $\alpha$ 1 kamienas yra atsparus CKB-17-33 biocidiniam poveikiui, daroma prielaida, kad atsparumas nesusijęs su virusinės dgRNR palaikymu ląstelėje-taikinyje. Gali būti, kad tiek jautrumą, tiek atsparumą *S. paradoxus* CKB-17-33 biocidiškumui lemia rūšies savybės, pvz.: skirtingas potencialių toksino receptorių kiekis ląstelės sienelėje ir/arba membranoje, toksiną neutralizuojančių sistemų skirtumai ir pan. (Pagé et al., 2003). Tai yra tikėtina, kadangi *S. paradoxus* 50 % nukleotidų sekų nesutampa su *S. cerevisiae* genomu (Vaughan-Martini, Martini, 1995) ir šie skirtumai gali būti svarbūs skirtingam ląstelių atsparumui.

Tiriant temperatūros įtaką biocidinio *S. paradoxus* CKB-17-33 fenotipo palaikymui, nustatyta, kad jis yra nestabilus ląsteles auginant visose tirtose temperatūrose (15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C). Biocidinio fenotipo kintamumas labai varijuoja, stebimas platus rezultatų išsibarstymas net auginant ląsteles toje pačioje temperatūroje. Visgi 30 °C temperatūroje, kuri laikoma optimalia *S. paradoxus* mielėms (Sweeney, et al., 2004), praradusių biocidinį fenotipą ląstelių procentas išlieka panašus. Ląsteles auginant ilgesnį laiką, skirtumai tarp žemesnės ir aukštesnės temperatūros poveikio padidėja, patvirtinantys, kad aukštesnė (37 °C) temperatūra labiau skatina biocidinio fenotipo praradimą nei žemesnė, o 40 °C temperatūroje stebimas beveik 60 % biocidinio fenotipo praradimo dažnis (žr. 2.5). Ląstelių auginimas 37–39 °C temperatūroje ant agarizuotos terpės yra naudojamas metodas dgRNR pašalinimui iš mielių ląstelių (Wickner, 1974), tačiau šio proceso mechanizmas iki šiol nenustatytas. Auginant ląsteles aukštoje temperatūroje joms sukliamas stresas, neretai populiacijoje atsiranda ląstelių, praradusių mitochondrijų funkciją (Wickner, 1974). Literatūroje aprašomas ir agresyvių reagentų (UV spinduliuotės, cikloheksimido) naudojimas dgRNR virusų pašalinimui iš mielių ląstelių (Trdton et al., 1987; Mitchell et al., 1976).

Terpės pH įtaka mielių biocidiškumo praradimui iki šiol netirta. Mielių augimui tinkamiausia rūgštinė aplinka, optimalus pH 4,5–5,5 (Membre et al., 1999). Nukrypimas nuo optimalių terpės pH sąlygų, ypač šarminė aplinka, kaip ir aukšta temperatūra, yra streso veiksnys, kurio poveikį svarbu ištirti. Nustatėme, kad *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių biocidinis fenotipas nestabilus, kultivuojant mieles skirtingo pH (pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8) terpėse. Eksponentinėje augimo fazėje mielių biocidinio fenotipo praradimo dažnis mažesnis, kai terpės pH 8, o stacionarioje fazėje – esant terpės pH 4, pH 5 ir pH 8. Apibendrinus tyrimo duomenis daroma prielaida, kad tiek eksponentinėje, tiek stacionarioje fazėje, kai terpės pH 8, biocidiškumo palaikymas ląstelių populiacijoje tirtomis sąlygomis yra stabiliausias, o pH 3 ir pH 7 – nestabiliausias.

Atliekant šį tyrimą buvo nustatyta, jog terpės pH turi įtaką ne tik mielių biocidinio fenotipo palaikymui, bet ir mielių ląstelių augimui. *S. paradoxus* CKB-17-33 augimui nepalankiausias terpės, kurių pH 5 ir pH 6. Terpėje, kurios pH 6, ląstelių tankiui pakitus nuo 0,1 OT iki 0,26 OT, ląstelių augimas sustojo. Ląstelės per 24 val padvigubėjo tik 2-3 kartus, kai esant palankioms augimo sąlygoms, eksponentinėje augimo fazėje vidutiniškai mielių ląstelių skaičius padvigubėja kas 90 min (Herskowitz, 1988). Tikėtina, kad šis lėtas ląstelių augimas, kai terpės pH 6, neturi įtakos mielių biocidinio fenotipo stabilumui, kadangi biocidiškumo praradimo dažnis yra panašus, kaip ir kai terpės pH 8 ir augimo greitis nesulėtėjęs. Nustatėme, kad terpė, kurios pH 6, *S. paradoxus* PR-17-59 ir PR-17-63, bet ne



*S. paradoxus* (BCR-17-18, AML-15-66) ir *S. cerevisiae* (M437, BY,  $\alpha$ '1) ląstelių efektyviam augimui yra netinkama. Kituose moksliniuose tyrimuose *S. cerevisiae* mielių ląstelių augimo greitis terpėse, kurių pH 6, nesukelia ląstelių augimo stagnacijos (Peña et al., 2015; Cartwright et. al., 1992), o apie terpės pH įtaką *S. paradoxus* mielių ląstelėms literatūrinių duomenų nėra. Gali būti, kad šis ląstelių augimo fenomenas susijęs ne su rūšies, bet su tirtų kamienų savybėmis.

Išskyrus skirtingų tipų (LA ir M) dgRNR iš *S. paradoxus* CKB-17-33 kamieno kolonijų praradusių biocidinių fenotipą po temperatūros ar terpės pH poveikio, pastebėta, jog ne visos mielių ląstelės palaikė virusinę dgRNR (žr. 3.14 pav. ir 3.15 pav.). Kai kuriais atvejais *S. paradoxus* CKB-17-33 kamiene buvo palaikomos abiejų tipų (LA ir M) dgRNR, tačiau ląstelės nepasižymėjo biocidiniu fenotipu. Galima prielaida, kad atsirado virusinių arba ląstelės genų mutacijos, nulėmusios biocidinio fenotipo praradimą (Dignard et al., 1991). Daugeliu atvejų *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelės palaiko LA tipo dgRNR, bet ne M tipo dgRNR. Tai rodo, kad M virusas tirtomis sąlygomis yra mažiau stabilus, nei LA.

## IŠVADOS

1. BCR-17-18, CKB-17-33, PR-17-59 ir PR-17-63 mielių kultūros priklauso *Saccharomyces paradoxus* mielių rūšiai.
2. Optimali LiCl koncentracija grynos ir kokybiškos dgRNR išskyrimui iš *S. paradoxus* mielių ląstelių yra 2,8 M.
3. Išgrynintų *Saccharomyces paradoxus* LA ir M dgRNR dydžiai: BCR-17-18 – 5 kb ir 2,5 kb, CKB-17-33 ir PR-17-59 – 5 kb ir 1,35 kb, PR-17-63 – 5 kb ir 800 bp.
4. Tirtomis sąlygomis *Saccharomyces paradoxus* BCR-17-18, PR-17-59 ir PR-17-63 mielės nebiocidiškos, o *S. paradoxus* CKB-17-33 pasižymi stipresniu biocidiniu poveikiu *S. paradoxus*, nei *S. cerevisiae* mielėms.
5. *Saccharomyces paradoxus* CKB-17-33 mielių ląstelių biocidinio fenotipo praradimo dažnis eksponentinėje augimo fazėje yra didžiausias esant 40 °C temperatūrai, o stacionarioje augimo fazėje – esant 37 °C temperatūrai. Visose tirtose temperatūrose virusinės dgRNR palaikymas *S. paradoxus* CKB-17-33 ląstelėse yra nestabilus.
6. *Saccharomyces paradoxus* CKB-17-33 mielių biocidinio fenotipo praradimo dažnis eksponentinėje fazėje yra didžiausias, kai terpės pH 3, pH 4, pH 5, pH 7, o stacionarioje augimo fazėje – pH 3 ir pH 7 terpėse. Nepriklausomai nuo tirtos terpės pH, virusinės dgRNR palaikymas *S. paradoxus* CKB-17-33 ląstelėse yra nestabilus.

Agnė SEDEREVIČIŪTĖ /...../

Darbo vadovė:

Dokt. B. RAVOITYTĖ /...../

Doc. dr. E. SERVIENĖ /...../

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Agnė Sederevičiūtė

Magistro baigiamasis darbas

***Saccharomyces paradoxus* dvigrandžių RNR virusų tyrimas**

SANTRAUKA

*Saccharomyces paradoxus* mielės – filogenetiškai artimiausios *S. cerevisiae* mielėms. *S. paradoxus* mielėse aptinkami LA ir M dgRNR virusai, sudarantys mielių biocidines sistemas, koduojančias baltymus–toksinus ir lemiančias imuniškumą jų pačių koduojamiems toksinams. Daugelio *S. paradoxus* dgRNR virusų koduojamų toksinų veikimo mechanizmai ir optimalios veikimo sąlygos nėra žinomos. Ant Lietuvoje augančių vaisių ir uogų, aptiktos BCR-17-18, CKB-17-33, PR-17-59 ir PR-17-63 mielių kultūros, priklausančios *S. paradoxus* mielių rūšiai ir palaikančios dgRNR virusus. *S. paradoxus* CKB-17-33 mielių kultūra pasižymi stipriu biocidiniu fenotipu. Auginant *S. paradoxus* CKB-17-33 ląsteles skirtingos temperatūros (15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C ir 40 °C) ir terpės pH (pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8) sąlygomis, nustatyta, jog biocidinis fenotipas ir dgRNR virusų palaikymas yra nestabilūs. Daugeliu tirtų atvejų, biocidiškumą praradusiose ląstelėse, palaikoma LA tipo dgRNR, bet ne M tipo dgRNR, kai kuriais atvejais – palaikomos LA ir M dgRNR, rečiausiai – prarandamos abiejų tipų dgRNR. M virusas tirtomis sąlygomis yra mažiau stabilus, nei LA.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER  
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Agnė Sederevičiūtė

Master thesis

**Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces paradoxus***

SUMMARY

*Saccharomyces paradoxus* yeast is the phylogenetically closest species for *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* yeasts both possess LA and M dsRNA viruses. These viruses work as a killer system encoding killer toxins and determining immunity to their own toxins. Mechanisms of action and optimum operating conditions for most of the viruses encoded by *S. paradoxus* dsRNA are unknown. *S. paradoxus* yeast cultures (BCR-17-18, CKB-17-33, PR-17-59 and PR-17-63) found on fruits and berries in Lithuania bear dsRNA viruses. *S. paradoxus* CKB-17-33 yeast culture has a strong killer phenotype. Cultivation in various temperatures (15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C and 40 °C) and medium pH (pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8) showed that killer phenotype and dsRNA maintenance in *S. paradoxus* CKB-17-33 was unstable. In most cases, upon the loss of the killer phenotype M dsRNA was lost, while LA dsRNA was maintained. However, in some cases, both LA and M dsRNA were maintained, while only rarely they were both lost. M virus was less stable than LA.

## **PADĖKA**

Esu dėkinga Gamtos tyrimo centro Genetikos laboratorijos kolektyvui už malonų bendradarbiavimą, bei pagalbą atliekant ir rašant magistrinį darbą:

- dr. Julianai Lukšai
- dr. Živilei Strazdaitei-Žielienei
- Ramunei Stanevičienei
- doktorantei Iglei Vepštaitei-Monstavičiai

Už teorines ir praktines žinias, už visokeriopą pagalbą, palaikymą, bei patarimus rašant baigiamąjį darbą, nuoširdžiai dėkoju magistrinio darbo vadovėms:

- doktorantei Bazilei Ravoitytei
- doc. dr. Elenai Servienei

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aref R. Comparative analysis of repressor interaction with pleiotropic corepressors Sin3 and Cyc8 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. [disertacija]. Vokietija: Greisvaldo universitetas;2014.
2. Arroyo-López FN, Orlic S, Querol A, Barrio E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int J Food Microbiol.* 2009;131(2-3):120–7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035.
3. Bostian KA, Sturgeon JA, Tipper DJ. Encapsidation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: Dependence of M on L. *J Bacteriol.* 1980; 143(1):463–70.
4. Brion, C, Pflieger D, Souali-Crespo S, Friedrich A, Schacherer J. Differences in environmental stress response among yeasts is consistent with species-specific lifestyles. *Mol Biol Cell.* 2016; 27(10):1694–705. DOI: 10.1091/mbc.e15-12-0816.
5. Carlos AR, Gabor P, editors. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. New York: Springer; 2006.
6. Cartwright CP, Zhu YS, Tipper DJ. Efficient secretion in yeast based on fragments from K1 killer preprotoxin. *Yeast.* 1992;8(4):261–72. DOI:10.1002/yea.320080404.
7. Castón JR, Trus BL, Booy FP, Wickner RB, Wall JS, Steven AC. Structure of L-A virus: A specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol.* 1997;138(5): 975–85. DOI: 10.1083/jcb.138.5.975.
8. Chang SL, Leu JY, Chang TH. A population study of killer viruses reveals different evolutionary histories of two closely related *Saccharomyces sensu stricto* yeasts. *Mol Ecol.* 2015; 24(16):4312–22. DOI: 10.1111/mec.13310.
9. Chen D, Bhat P, Pickett JA, Launikonis BS, Shah A, Kruger WA, Edwardson JM, Thom P. Dynamic Regulation of the Large Exocytotic Fusion Pore in Pancreatic Acinar Cells. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(1):5100–12. DOI: 10.1091/mbc.E07-01-0024.
10. Cheng RH, Caston JR, Wang GJ, Gu R, Smith TJ, Bozaarh RF, Trus BL, Cheng N, Wickner RB. Fungal virus capsids, cytoplasmic components for the replication of double-strand RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric Gag dimers. *J Mol Biol.* 1994;244:255–8. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1726.
11. Diaz-Ruiz JR, Kaper JM. Isolation Of Viral Double-Stranded Rnas Using A liel Fractionation Procedure. *Prep Biochem.* 1978;8(1):1–17.

DOI:10.1080/00327487808068215.

12. Dignard D, Whiteway M, Germain D, Tessier D, Thomas DY. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol Gen Genet* 1991; 227(1):127–36.

13. Eisfeld K, Riffer F, Mentges J, Schmitt MJ. Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol.* 2000;37(4):926–40.

DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02063.x.

14. el-Sherbeini M, Bostian KA. Viruses in fungi: infection of yeast with the K1 and K2 killer viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(12): 4293–7.

DOI:10.1073/pnas.84.12.4293.

15. Esteban R, Wickner RB. Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vitro M1 double-stranded RNA synthesis. *Mol Cell Biol.* 1986;6(5):1552–61. DOI: 10.1128/mcb.6.5.1552.

16. Fernandez-Espinar TT, Barrio E, Querol A. Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast.* 2003;20(14):1213–26.

DOI: 10.1002/yea.1034.

17. Walton EF, Pringle JR. Effect of Growth Temperature upon Heat Sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 1980; 124: 285–7.

DOI:10.3747/pdi.2011.00058.

18. Gier S, Schmitt MJ, Breinig F. Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating K1 mechanisms of action and immunity. *Toxins.* 2017; 9(11). DOI: 10.3390/toxins9110345.

19. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis Ej, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. Life with 6000 Genes. *Science.* 1996;274 (5287):563–7.

20. Golubev VI. Wine yeast races maintained in the All-Russia Collection of Microorganisms (VKM IBPM RAS). *Priklbiokhim mikrobiol.* 2005;41(5):592–5.

21. Granchi L, Basco M, Messini A, Vincenzini M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J Appl Microbiol.* 1999;87(6):949–56.

DOI:10.1046/j.1365-2672.1999.00600.x.

22. Hannig EM, Leibowitz MJ. Structure and expression of the M2 genomic segment of a type 2 killer virus of yeast. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13(12):4379–400. DOI:

10.1093/nar/13.12.4379.

23. Herskowitz I. Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 1988;52(4):536–53.
24. Icho T, Wickner RB. The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J Biol Chem.* 1989;264(12) :6716–23.
25. Kaeberlein M. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature.* 2010;464(7288):513–9. doi: 10.1038/nature08981.
26. Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: A comparative study. *PLoS ONE.* 2011;6(2):e 16015. DOI:10.1371/journal.pone.0016015.
27. Konovalovas, A. Molecular determinants of Totiviridae family viruses of *Saccharomyces sensu stricto* clade. Vilnius:Vilniaus universitetas; 2018.
28. Kurzweilova H, Sigler K. Factors affecting the susceptibility of sensitive yeast cells to killer toxin K1. *Folia microbiol.* 1993; 38(6):524–6.
29. Lamb TM, Mitchell AP. The Transcription Factor Rim101p Governs Ion Tolerance and Cell Differentiation by Direct Repression of the Regulatory Genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2003;23(2):677–86. DOI:10.1128/mcb.23.2.677-686.2003.
30. Liti, G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, Davey RP, Roberts IN, Burt A, Koufopanou V, Tsai IJ, Bergman CM, Bensasson D, O'Kelly MJ, van Oudenaarden A, Barton DB, Bailes E, Nguyen AN, Jones M, Quail MA, GoodHead I, Sims S, Smith F, Blomberg A, Durbin R, Louis EJ. Population genomics of domestic and wild yeast. *Nature.* 2009; 458(7236):337–41. DOI: 10.1038/nature07743.
31. Liu GL, Chi Z, Wang GY, Wang ZP, Li Y, Chi ZM. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2013;35(2):222-34. DOI: 10.3109/07388551.2013.833582.
32. López-Mirabal HR, Winther JR. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(4):629–40. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2007.10.013.
33. Lukša J, Serva S, Servienė E. *Saccharomyces cerevisiae* K2 toxin requires acidic environment for unidirectional folding into active state. *Mycoscience.* 2015;57(1):51–7. DOI: 10.1016/j.myc.2015.08.003.
34. Maeda T. The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi. *FEBS J.* 2012;279(8): 1407–13. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08548.x.



35. Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Poloneli L. Yeast Killer Systems. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):369–400.
36. Martinac B, Zhu H, Kubalski A, Zhou XL, Culbertson M, Bussey H, Kung C. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(16):6228–32.
37. Membre J-M, Kubaczka M, Chene C. Combined Effects of pH and Sugar on Growth Rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a bakery product spoilage yeast. *Appl Environ Microb.* 1999; 65(11): 4921–4925.
38. Mensonides FI, Schuurmans JM, Teixeira de Mattos MJ, Hellingwerf KJ, Brul S. The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. *Mol BioRep.* 2002;29(1–2):103–6.
39. Meškauskas A, Čitavičius D. The K2-type killer toxin- and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. *Gene.* 1992;111(1):135–9.
40. Murakami C, Kaeberlein M. Quantifying Yeast Chronological Life Span by Outgrowth of Aged Cells. *J Vis Exp.* 2009;(27). DOI: 10.3791/1156.
41. Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weisshart K. Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Progin nucleic acid res mol biol.* 2002;72:41–94.
42. National Centre of Biotechnology Information (NCBI), U S. National Library of Medicine [duomenų bazė internete]. USA. Sukurta 1988 11. Adresas: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
43. Naumova ES, Korshunova IV, Jespersen L, Naumov GI. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Res.* 2003;3(2):177–184. DOI: 10.1016/S1567-1356(02)00191-5.
44. Nevoigt E. Progress in Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol biol rev.* 2008; 72(3):379–412. DOI: 10.1128/MMBR.00025-07.
45. Novotná D, Flegelová H, Janderová B. Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2004; 4(8):803–13. DOI: 10.1016/j.femsyr.2004.04.007.
46. Oda Y, Yabuki M, Tonomura K, Fukunaga M. A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S- 28S rRNA spacer regions. *Yeast.* 1997;13(13):1243–50. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(199710)13:13<1243::AID-YEA173>3.0.CO;2-D.

47. Owsianowski E, Walter D, Fahrenkrog B. Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(7):1303–10. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.03.006.
48. Pagé N, Gerard-Vincent M, Menard P, Beaulieu M, Azuma M, Dijkgraaf GJ, Li H, Marcoux J, Nguyen T, Dowse T, Sdicu AM, Bussey H. A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*. 2003;163(3):875–94.
49. Peña A, Sanchez NS, Alvarez H, Calahorra M, Ramirez J. Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast res*. 2005;15(2). DOI: 10.1093/femsyr/fou005.
50. Peñalva MA, Arst HN Jr. Recent Advances in the Characterization of Ambient pH Regulation of Gene Expression in Filamentous Fungi and Yeasts. *Annu Rev Microbiol*. 2004; 58(1); 425–51. DOI: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123715.
51. Perez F, Ramírez M, Regodon JA. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2001;79(3-4):393–9.
52. Ramírez M, Velazquez R, Lopez-Pineiro A, Naranjo B, Roig F, Llorens C. New insights into the genome organization of yeast killer viruses based on “atypical” killer strains characterized by high-throughput sequencing. *Toxins*. 2007;9(9). DOI:10.3390/toxins9090292.
53. Rhiannon B, Young ET. The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast*. 2009; 26(4):205–20. DOI: 10.1002/yea.1660.
54. Rodríguez-Cousiño N, Maqueda M, Ambrona J, Zamora E, Esteban R, Ramirez M. A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(5):1822–32. DOI: 10.1128/aem.02501-10.
55. Rodríguez-Cousiño N, Esteban R. Relationships and evolution of doublestranded RNA totiviruses of yeasts inferred from analysis of L-A-2 and L-BC variants in wine yeast strain populations. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(4). DOI:10.1128/AEM.02991-16.
56. Rodríguez-Cousiño N, Gómez P, Esteban R. Variation and distribution of L-A helper totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts producing different killer toxins. *Toxins*. 2017; 9(10). DOI: 10.3390/toxins9100313.
57. Salari R, Salari R. Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* grow

condition *Electron Physician*. 2017; 9(1):3592–7. DOI:10.19082/3592.

58. Salvadó Z, Arroyo-Lopez FN, Guillamon JM, Salazar G, Querol A, Barrio E. Temperature adaptation Markedly Determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(7):2292–302. DOI: 10.1128/AEM.01861-10.

59. Sampaio JP, Gonçalves P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with Oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(7): 2144–52. DOI: 10.1128/AEM.02396-07.

60. Santos A, San mauro M, Marquina D. Killer yeasts as biological agents to control plant pathogenic fungi. In: Legaz ME, Vicente C, editors. *Biochemical Responses of Plants to Invaders*. Research Signpost; 2008. p. 79-96.

61. Satyanarayana T, Kunze G, editors. *Yeast Diversity in Human Welfare*. New York: Springer; 2017.

62. Schaffrath R, Meinhardt F, Klassen R. Yeast Killer Toxins: Fundamentals and Applications. In: Hofrichter M, editors. *The Mycota: Industrial Applications*. 2nd ed. New York: Springer; 2018. p. 107-130.

63. Schaffrath R, Meinhardt F, Klassen R. Physiology and Genetics. In: Hall GM, editors. *The Ingenious Mind of Nature*. 2nd ed. New York: Springer; 2013; p. 222-43.

64. Schmitt MJ, Riffer F, Einfeld K, Breining F. Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 2002; 148(5):1317–28. DOI: 10.1099/00221287-148-5-1317.

65. Schmitt MJ, Breinig F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4(3):212–21. DOI: 10.1038/nrmicro1347.

66. Schmitt MJ, Tipper DJ. K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1990; 10(9):4807–15. DOI: 10.1128/mcb.10.9.4807.

67. Schmitt MJ, Tipper DJ. Sequence of the M28 dsRNA: Preprotoxin is processed to an  $\alpha/\beta$  heterodimeric protein toxin. *Virology*. 1995; 213(2): 341–51. DOI:10.1006/viro.1995.0007.

68. Serrano R, Bernal D, Simon E, Anno J. Copper and Iron Are the Limiting Factors for Growth of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an Alkaline Environment. *J Biol Chem*. 2004; 279(19):19698–704. DOI: 10.1074/jbc.M313746200.

69. Servienė E, Lukša J, Orentaitė I, Lafontaine DL, Urbonavičius J. Screening the Budding Yeast Genome Reveals Unique Factors Affecting K2 Toxin Susceptibility. *PLoS One*. 2012; 7(12):e50779. DOI: 10.1371/journal.pone.0050779.

70. Somers JM, Bevan EA. The inheritance of the killer character in yeast. *Genet Res.* 1969;13(1): 71–83. DOI: 10.1017/S0016672300002743.
71. Sweeney JY, Kuehne H A, Sniegowski PD. Sympatric natural *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* populations have different thermal growth profiles. *FEMS Yeast Res.* 2004;4(4–5):521–5. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00171-5.
72. Thornton CR. Tracking the emerging human pathogen *Pseudallescheria boydii* by using highly specific monoclonal antibodies. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(5):756–64. DOI: 10.1128/CVI.00061-09.
73. Tipper DJ, Schmitt MJ. Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol.* 1991; 5(10):2331–8.
74. Treton BY, Le Dall MT, Heslot H. UV-induced curing of the double-stranded RNA virus of the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: *Current Genetics: Microorganisms and Organelles*. New York:Springer.1987; p. 37–9.
75. Vaughan-Martini A, Martini A. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J Ind microbiol.* 1995;14(6):514–22.
76. Vaughan-Martini A, Martini A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess In: *The Yeasts: A taxonomic Study*. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T, editors. Elsevier Science 2011.
77. Vepškaitė-Monstavičė I, Lukšavalovas A, Konovalovas, Ežerskytė D, Stanevičienė R, Strazdaitė-Žieliene Ž, Serva S, Servienė E. *Saccharomyces paradoxus* K66 killer system evidences expanded assortment of helper and satellite viruses. *Viruses.* 2018;10(10):564. DOI: 10.3390/v10100564.
78. Vidal-Leiria M, Buckley H, van Uden N. Distribution of maximum temperature for growth among yeasts. *Mycologia.* 1979;36(6):664–88.
79. Wickner RB. "Killer character" of *Saccharomyces cerevisiae*: curing by growth at elevated temperature. *J bacteriol.* 1974;117(3):1356–7.
80. Wickner RB. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 1996a;60(1): 250–65. DOI: 10.1146/annurev.mi.46.100192.002023.
81. Wickner RB. Prions and RNA Viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet.* 1996b; 30(1):109–39. DOI: 10.1146/annurev.genet.30.1.109.
82. Zakhartsev M, Reuss M. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. *FEMS Yeast Res.* 2018; 18(6). DOI: 10.1093/femsyr/foy052.