

JOANNA CHMIELEWSKA, JOANNA KAWA-RYGIELSKA

## ZRÓŻNICOWANIE GENETYCZNE SZCZEPÓW DROŹDŹY FERMENTUJĄCYCH KSYLOŻĘ

### S t r e s z c z e n i e

W pracy podjęto próbę wykorzystania metody PCR do różnicowania gatunków drożdży fermentujących ksylożę: *Pichia stipitis*, *Yamadazyma stipitis*, *Candida shehatae* i *Pachysolen tannophilus*.

### Wstęp

Rozwój w dziedzinie biologii molekularnej stworzył możliwość wykorzystania w diagnostyce drobnoustrojów metod opartych na analizie DNA lub RNA, w tym polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR – polimerase chain reaction). Metoda ta polega na enzymatycznej amplifikacji wybranego odcinka DNA przez polimerazę DNA przy użyciu swoistych starterów inicjujących syntezę nowej nici DNA na matrycy wyjściowej. W efekcie uzyskuje się zwielowrotnioną liczbę kopii materiału genetycznego.

Celem pracy był dobór primerów różnicujących gatunki drożdży fermentujące ksylożę.

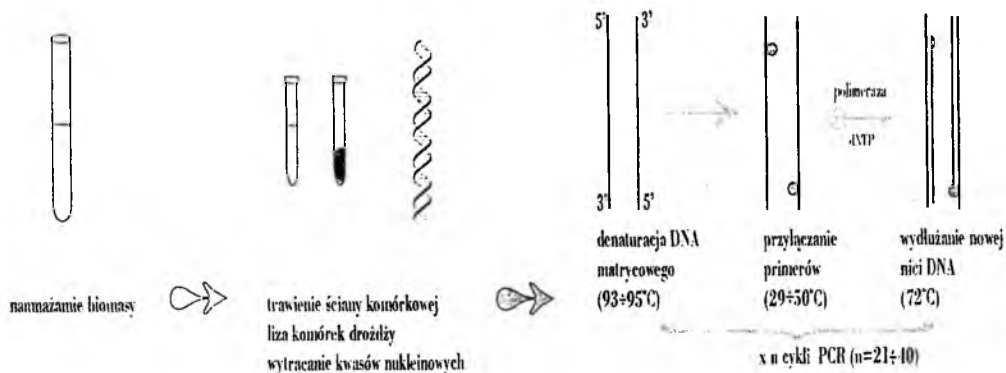
### Materialy i metody badań

Materiał biologiczny stanowiły drożdże *Pichia stipitis* (1), *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, *Pichia stipitis* (2), *Candida shehatae* ATCC 58779, *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 oraz *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392.

Izolację całkowitego DNA z komórek drożdży prowadzono zmodyfikowaną metodą Rose i wsp. [5], z wykorzystaniem Zymolazy 5000 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd) o stężeniu 20 mg/cm<sup>3</sup>. Do powielania DNA zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) w termocyklerze PTC-200 DNA Engine firmy MJ Research, INC., przy użyciu primerów:

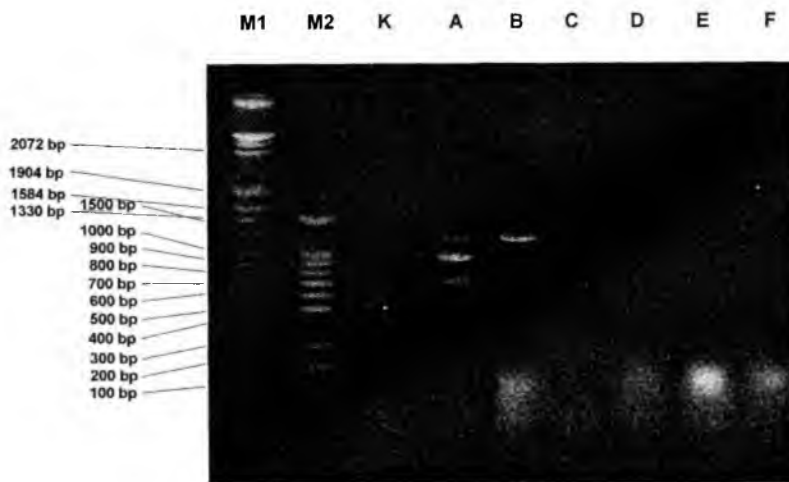
- KAWA 1 - (5'⇒3') GTG GAT TTT TAT TCC AAC A,

- KAWA 2 - (5'⇒3') CAA AAT TCA CCT ATA TTC TCA,
- KAWA 3 - (5'⇒3') (GTG)<sub>5</sub> [1, 3, 4],
- FP 1 - (5'⇒3') CAT ATG CCT AAA GAA CGA CG,
- FP 2 - (5'⇒3') CTC HGC RCA CTC CTT RCA GTA CCA,



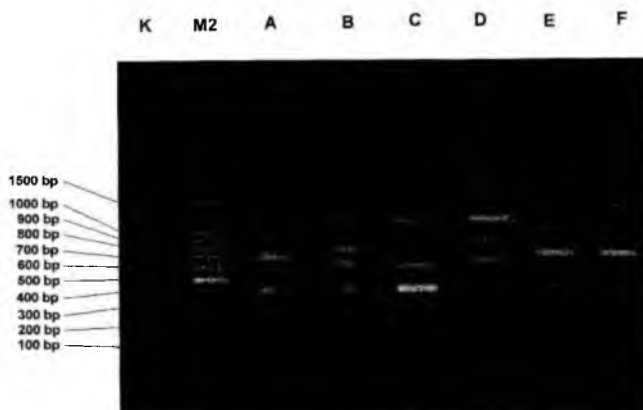
Rys. 1. Schemat izolacji DNA genomowego drożdży oraz reakcji PCR.

Fig. 1. Schema of genomic DNA isolation and PCR reaction.



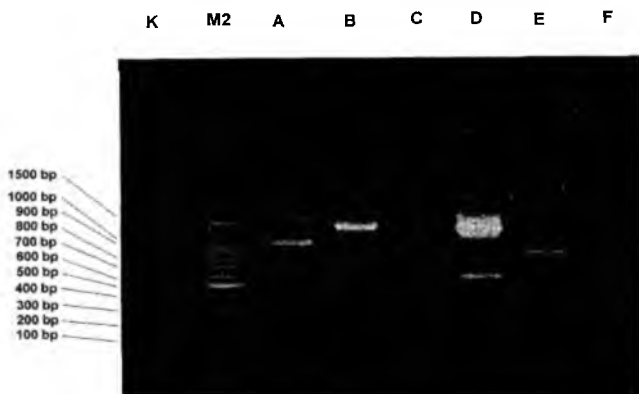
Fot. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z drożdży: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 i F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, uzyskanych przy użyciu primera (5' ⇒ 3') GTG GAT TTT TAT TCC AAC A; M1 – Lambda DNA/EcoRI + Hind III Markers, M2 – 100bp DNA Ladder, K – kontrola.

Photo. 1. The electrophoretic separation of DNA amplification products isolated from yeasts: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, with use of (5' ⇒ 3') GTG GAT TTT TAT TCC AAC A; M1 – Lambda DNA/EcoRI + Hind III Markers, M2 – 100bp DNA Ladder, K – control.



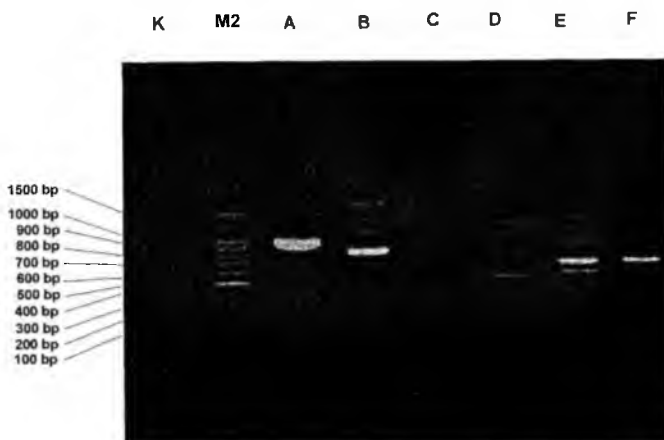
Fot. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z drożdży: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 i F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, uzyskanych przy użyciu primera mikrosatelitarnego ( $5' \Rightarrow 3'$ ) (GTG)<sub>5</sub>; K – kontrola, M2 – 100bp DNA Ladder.

Photo. 2. The electrophoretic separation of DNA amplification products isolated from yeasts: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, with use of ( $5' \Rightarrow 3'$ ) (GTG)<sub>5</sub> microsatellite primer; K – control, M2 – 100bp DNA Ladder.



Fot. 3. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z drożdży: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 i F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, uzyskanych przy użyciu primera mikrosatelitarnego ( $5' \Rightarrow 3'$ ) CAT ATG CCT AAA GAA CGA CG; K – kontrola, M2 – 100bp DNA Ladder.

Photo. 3. The electrophoretic separation of DNA amplification products isolated from yeasts: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, with use of ( $5' \Rightarrow 3'$ ) CAT ATG CCT AAA GAA CGA CG primer; K – control, M2 – 100bp DNA Ladder.



Fot. 4. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z drożdży: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 i F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, uzyskanych przy użyciu primeru mikrosatelitarnego (5' ⇒ 3') CTC HGC RCA CTC CTT RCA GTA CCA; K – kontrola, M2 – 100bp DNA Ladder.

Photo. 4. The electrophoretic separation of DNA amplification products isolated from yeasts: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, with use of (5' ⇒ 3') CTC HGC RCA CTC CTT RCA GTA CCA primer; K – control, M2 – 100bp DNA Ladder.

syntetyzowanych przez ARC SCIENTIFIC i Taq DNA polimerazy (Core KIT 201223 firmy Quiagen). Profile termiczne reakcji oraz ilość cykli dobrano w zależności od primerów [2]. Schemat izolacji DNA genomowego drożdży oraz reakcji PCR przedstawiono na rys. 1. W celu rozdzielenia produktów PCR stosowano elektroforezę w żelu agarozowym (stężenie agarozы 0,8%) z dodatkiem bromku etydyny w obecności markerów masy: Lambda DNA/EcoR I + Hind III Markers (M1) i 100 bp DNA Ladder (M2).

## Podsumowanie

Przy zastosowaniu primeru KAWA 1 (Fot. 1) amplifikację DNA obserwowano jedynie dla szczepów *Pichia stipitis* (1) i *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376. Primer KAWA 2 nie wykazywał działania z żadnym z badanych szczepów drożdży. Primery KAWA 3 (Fot. 2), FP 1 (Fot. 3) i FP 2 (Fot. 4) dawały produkty PCR pozwalające na zróżnicowanie omawianych gatunków drożdży.

## LITERATURA

- [1] Baleiras Couto M.M., Hartog B.J., Huis in't Veld J.H.J., Hofstra H., Vossen J.M.B.M.: Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting, *Food Microbiol.*, **13**, 59-67, 1996.
- [2] Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J.: Recent advances in the polymerase chain reaction, *Science*, **252**, 1643-1651, 1991.
- [3] Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaromyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences, *Yeast*, **7**, 61- 72, 1991.
- [4] Lieckfeldt E., Meyer W., Börner T.: Rapid identification and PCR differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting; *J. Basic Microbiol.*, **33**, 6, 413-426, 1993.
- [5] Rose M.D., Winston F., Hieter P.: *Methods in yeast genetics. A laboratory course manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

### GENETIC DIFFERENTIATION OF KSYLOSE FERMENTING YEAST STRAINS

#### S u m m a r y

In this study was made an attempt to use polymerase chain reaction (PCR) method to differentiation of ksylose fermenting yeast species: *Pichia stipitis*, *Yamadazyma stipitis*, *Candida shehatae* i *Pachysolen tannophilus*.