

Nové technologie a technologické inovace

Využití protoplastů při šlechtění vláknitých hub

RNDr. LADISLAV HOMOLKA, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Klíčová slova: protoplasty, vláknité houby, genetika, šlechtění, fáze protoplastů, hybridizace, mutagenese, transformace, genové inženýrství, rekombinantní DNA

1. ÚVOD

Mezi klasické metody šlechtění vláknitých hub patří selekce spontánních mutantů, mutačně-selekční postupy a sexuální i parasexuální hybridizace; v nedávné době přibyla tzv. řízená selekce, využití fúzí protoplastů a techniky používající rekombinantní DNA (metody genového inženýrství). Rozvoj posledních dvou nových přístupů ke genetické modifikaci hub umožnil intenzivní výzkum protoplastů, buněk zbavených buněčné stěny, které jsou schopny reverze do normální buněčné formy. Vývoj techniky fúze protoplastů dal nové dimenze využití dosud málo účinné parasexuální hybridizace (ve srovnání s klasickou metodou je dosahováno i přes 1 % rekombinací). Fúze nabízí jedinečnou cestu k překonání přirozených bariér genetické výměny u špatně fertilitních, neferilitních nebo vzdáleně příbuzných mikroorganismů. Buňky různých genotypů jsou donuceny tvořit přechodné hybridy, čímž může dojít k přeskupení chromozómů a rekombinaci sekvencí DNA do nových kombinací. Další výhodou je možnost vysoké frekvence genetické výměny mezi více než dvěma partnery, což lze využít v průmyslových šlechtitelských programech. Metoda fúze protoplastů je neobyčejně vhodná pro studium mitochondriové a cytoplazmatické dědičnosti. Významné jsou i výsledky a možnosti využití protoplastů v klasické genetické práci a tradičních metodách šlechtění, protože tvorba protoplastů přeměňuje mycelium houby na jednotky, které mohou být kvantitativně zpracovávány technikami používanými u jednobuněčných organismů.

2. PROTOPLASTY VLÁKNITÝCH HUB

Protoplasty byly úspěšně připraveny z mnoha různých druhů vláknitých hub [1], další práce se stále objevují a lze říci, že dnes je technicky možná izolace protoplastů prakticky z každé houby. V současné době jsou k odstranění buněčné stěny používány téměř výhradně metody využívající působení enzymových preparátů, zejména trávicích šťáv hlemýžďe *Helix pomatia*, chitináz, glukonáz a jiných preparátů převážně mikrobiálního původu. Recentní přehled o využití komerčních enzymových přípravků při izolaci protoplastů podává *Hamlyn et al.* [2]. Další výhodnou možností je digesce buněčné stěny pomocí vlastních inducibilních autolytických enzymů [3, 4].

Aby protoplasty přežily odstranění buněčné stěny jako intaktní struktury, musí být uvolňovány do hypertonického média, které zajistí jejich osmotickou stabilitu. Jako osmotické stabilizátory jsou používány různé anorganické

ké soli, cukry a cukerné alkoholy. Vedle použitých lytických enzymů a stabilizátorů ovlivňuje uvolňování protoplastů řada dalších faktorů, např. pH a teplota inkubační směsi a zejména fyziologický stav mycelia daný stářím kultury, podmínkami kultivace, použitými médii aj. Kultury v exponenciální fázi růstu se v tomto směru osvědčily nejvíce.

Jsou-li protoplasty vláknitých hub přeneseny do hypertonického kultivačního média bez lytických enzymů, proběhne u části z nich regenerace buněčné stěny a následná reverze do myceliální buněčné formy. Frekvence tohoto jevu se podle organismu a vnějších podmínek pohybuje mezi zlomky procenta a 100 %. Podstatným rysem houbových protoplastů je schopnost podržet si vlastnosti výchozí kultury včetně tvorby excesivních metabolitů. Základním pramenem informací o přípravě, reverzi a použití protoplastů hub zůstává přehled *Peberdyho* z roku 1979 [1].

3. VYUŽITÍ PROTOPLASTŮ V KLASICKÝCH GENETICKÝCH PŘÍSTUPECH

Využití protoplastů není omezeno na uvedené nové techniky genetické manipulace, ale setkáváme se s ním i v klasické genetické práci a mutačně-selekčních programech. Protoplasty lze snadno získat ve velkém množství jako uniformní jednobuněčnou populaci vegetativního původu, což je zvláště výhodné u hub netvořících asexuální výtrusy. Možnost transformace a vzniku rekombinantů ve vysokých frekvencích vedla k využití protoplastů pro genetickou analýzu a mapování. Nezastupitelnou úlohu mají protoplasty ve studiu mimojaderné dědičnosti. U askomycetu *Podospora anserina* se podařilo pomocí protoplastů dosáhnout rozlišení cytoplazmatických genetických determinant [5] i objasnit podíl chromozómové a mimochromozómové kontroly na jevu senescence [6]. Tvorba protoplastů následovaná reverzí pomohla odhalit jednotlivé jaderné typy u heterokaryontů *Schizophyllum commune* [7]. Při selekci jednotlivých kolonií, připravených regenerací protoplastů, získali *Schuman et al.* [8] z producenta ergotoxinu nové kmeny *Claviceps purpurea* tvořící agroklavin, elymoklavin a chanoklavin.

V našem programu mutačního šlechtění producenta antifungálního antibiotika mucidinu *Oudemansiella mucida*, který netvoří asexuální výtrusy, jsme použili protoplastů produkčního kmene k přímé mutagenizaci UV zářením a chemickými mutageny [9]. Byl to první nám známý pokus tohoto druhu u mikroorganismů, který pak byl následován u kmene *Aspergillus niger* tvořícího ky-

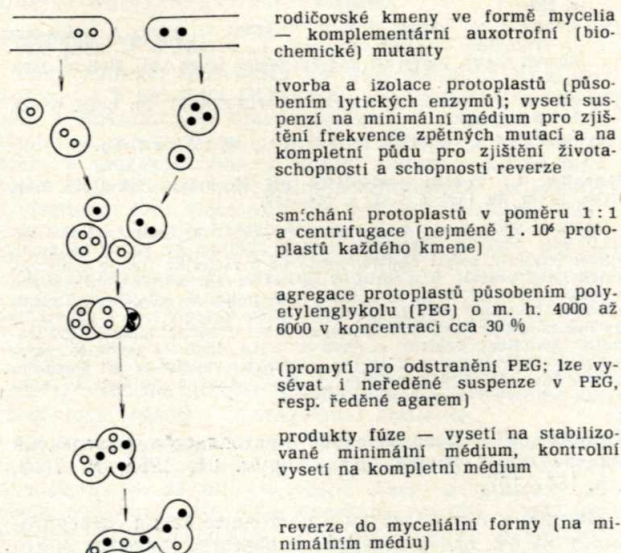
selinu citrónovou [10]. U producenta námelových alkaloidů *Claviceps purpurea* byly izolovány protoplasty z mutagenizovaného mycelia nesporulujícího kmene a použity k selekci výše produkčních izolátů [11]. Technika se ukázala být vhodná pro vláknité mikroorganismy obecně, a tak je dnes běžná i u aktinomycetů [12].

4. FÚZE PROTOPLASTŮ

Podnět k použití techniky fúze u houbových protoplastů pochází z úspěchů podobné práce u rostlinných protoplastů a živočišných buněk. Fúze protoplastů indukované polyetylen glykolem (PEG) nebo působením elektrického pole výrazně zvyšuje dosažitelnou frekvenci rekombinací až na 10^{-2} i 10^{-1} ve srovnání s frekvencí 10^{-6} udávanou pro klasické metody; navíc možnosti rekombinace podstatně rozšiřuje. Při hybridizačních pokusech se většinou využívají selektivní metody, kdy rodičovské kmeny jsou označeny různými signálními geny; nejčastěji jsou to auxotrofní mutanty, mutanty rezistentní k antibiotikům, iontům těžkých kovů, mutanty respirační, morfologické, barevné apod. Metody selekce produktů fúze, při nichž by nemusely být připravovány mutantní kmeny (např. použití inhibitorů klíčových metabolických drah nebo technika mrtvého donoru), jsou u vláknitých hub v začátcích.

Vnitrodruhové fúze byly úspěšně provedeny u celé řady vláknitých hub [13—16] a docházelo při nich k tvorbě heterokaryontů, řidčeji diploidů a aneuploidů a vzácně haploidních rekombinantů. Mezi druhové fúze byly dlouho omezeny na zástupce rodů *Aspergillus* a *Penicillium*, v nedávné době se připojily rody *Claviceps*, *Cephalosporium* a *Emericellopsis* [16, 26]. Produkty fúze zde mají mnohem komplexnější genetický charakter, který do značné míry závisí na taxonomické příbuznosti hybridizovaných druhů. Tvoří se heterokaryonty různé stability, úplné nebo částečné heteroploidy (ekvivalent vnitrodruhových diploidů a aneuploidů) a hybridní rekombinanty. Potomstvo vzniklé hybridizací blíže příbuzných druhů (např. *Penicillium chrysogenum* + *P. notatum*, *Aspergillus nidulans* + *A. rugulosus*) je obecně stabilnější než druhů taxonomicky vzdálenějších (např. *Penicillium chrysogenum* + *P. roquefortii*, *Aspergillus nidulans* + *A. fumigatus*, *Claviceps purpurea* + *C. paspali* aj.). Tvorba rekombinantů, byť v řádově nižších frekvencích, byla zjištěna i u mezirodových hybridizací *Cephalosporium* + *Emericellopsis* a *Cephalosporium* + *Paecilomyces* [16]. Obecné schéma hybridizací pomocí fúze protoplastů uvádí obr. 1.

Hybridizace fúzí protoplastů nachází stále větší uplat-



Obr. 1. Hybridizace prostřednictvím fúze protoplastů za pomoci fúzogenu — PEG (upraveno podle Elan-dera)

nění v genetice průmyslových mikroorganismů. Nejvíce z jinak sporých informací o ovlivnění schopnosti tvořit excesivní metabolity u produktů fúze je k dispozici pro producenty β -laktamových antibiotik. Některé rekombinanty získané fúzí protoplastů auxotrofních nízkoprodukčních kmenů *Penicillium chrysogenum* Wis 49-2105 a Wis 54-1255 produkovaly více penicilinu než rodičovské kmeny, avšak produkce rekombinantů z kombinace nízkoprodukčního a vysokoprodukčního kmene byly většinou intermediární [17]. Fúzí protoplastů byla prokázána možnost kosyntézy penicilinu páry neprodukcíchních mutantů *P. chrysogenum* [18] i mezidruhové kosyntézy *P. chrysogenum* a *Aspergillus nidulans* [19]. Bylo dosaženo i mezidruhového přenosu genetické informace pro tvorbu penicilinu z *P. chrysogenum* do *P. cyaneofulvum*, *P. stoloniferum*, *P. patulum* a *P. verrucosum* var. *cyclopium* [20, 21]; produkce antibiotika byla ovlivněna kvantitativně i kvalitativně. Později byl přenos této informace prokázán i u mezidruhové hybridizace *Aspergillus nidulans* a *A. rugulosus*. Několik rekombinantů mělo produkci penicilinu vyšší, než rodičovský *A. nidulans* [22].

Metoda fúze protoplastů je zvláště užitečná v kombinaci s klasickými mutačními programy. Hybridizaci vysokoprodukčního kmene, oslabeného akumulací genetických poškození po sérii mutagenních zásahů, se zdravým nízkoprodukčním bohatě rostoucím a sporujícím kmenem může vzniknout zdravý vysokoprodukční kmen. Toho bylo využito při hybridizaci oslabeného vysokoprodukčního kmene *P. chrysogenum*, který tvořil jen malé množství nežádoucího p-hydroxybenzylpenicilinu V, se zdravým nízkoprodukčním kmenem za vzniku hybridu spojujícího výhodné vlastnosti obou [23]. V naší laboratoři jsme pro metodu fúze používali dvou vysokoprodukčních prototrofních kmenů z divergentních linií *P. chrysogenum*, lišících se barvou spor, rychlostí růstu, morfologií kolonií a produkcí antibiotika. Vlastní tvorba a reverze protoplastů ani působení PEG neovlivňovaly produkci a nezvyšovaly produkční variabilitu. Průměrná produkce antibiotika u produktů fúze, vybíraných podle morfologických charakteristik, byla intramediatní vzhledem k rodičovským, avšak produkční variabilita byla nejméně trojnásobná [24]. Při použití auxotrofních mutantů divergentních linií vysokoprodukčních kmenů byly nalezeny produkty fúze s produkcí vyšší než výchozí kultury [25].

Významného úspěchu bylo dosaženo u producenta cephalosporinu *Cephalosporium acremonium*, kde konvenční metody hybridizace selhávaly. I v tomto případě šlo o „zdravení“ vysokoprodukčního nesporulujícího kmene, navíc pomalu rostoucího, s dobře sporujícím a rychle rostoucím, ale nízkoprodukčním kmenem, který měl navíc schopnost využívat levnější anorganický síran. Získaný rekombinant nejen spojoval všechny žádoucí vlastnosti obou výchozích kmenů, ale měl o 40 % vyšší produkci antibiotika než prototrofní vysokoprodukční rodič. Tak byla prokázána vhodnost metody fúze protoplastů pro šlechtění průmyslových kmenů hub [14]. Zajímavé výsledky získali Minuth a Esser [16] při studiu produktů vnitrodruhové, mezidruhové a mezidruhové fúze protoplastů hub produkujících β -laktamová antibiotika. U zástupců rodů *Emericellopsis*, *Cephalosporium* a *Paecilomyces* získali parasexuální rekombinanty a zjistili, že prostřednictvím fúze lze přenést morfologické vlastnosti jako je konidiace a do jisté míry i schopnost tvořit antibiotikum. Při mezidruhových hybridizacích byla produkce antibiotika velmi nízká, avšak podařilo se zvýšit intenzitu konidiace. Úspěšné byly pokusy o překonání mezirodových bariér při fúzi protoplastů *Cephalosporium* a *Emericellopsis*, kdy však byl tvořen pouze penicilin N specifický pro rod *Emericellopsis* ve výši odpovídající rodičovskému kmeni. Nestabilní heterokaryonty a částečné heteroploidy byly získány i při hybridizaci *Cephalosporium* + *Paecilomyces*. Použité kmeny však byly vesměs nízkoprodukční.

Vnitrodruhové i mezidruhové fúze byly prováděny i u producentů námelových alkaloidů z rodu *Claviceps*. Při vnitrodruhových hybridizacích *C. purpurea* vznikaly heterokaryonty komplementované ve výživových požadavcích i ve tvorbě alkaloidů, při mezidruhových fúzích *C. purpurea* a *C. paspali* nestabilní částečné heteroploidy, bez komplementace tvorby alkaloidů [26].

V naší práci jsme zjišťovali možnost využití metody fúze protoplastů i u bazidiomycetů. Pomocí PEG byla ve frekvenci 0,3 % indukována fúze a výživová komplementace protoplastů dvou auxotrofních kompatibilních izolátů *Oudemansiella mucida*. Produkty fúze byly prototrofní, dikaryontní a tvořily přezky. Produkce mucidinu však u nich byla podobně jako u výchozích auxotrofů velmi nízká [27].

U průmyslových vysokoprodukčních kmenů hub je zavedení selektovatelných signálních znaků (mutací) pracné a vede pravidelně k výraznému snížení tvorby žádaného metabolitu. V posledních letech byly úspěšně vyzkoušeny techniky, které umožňují nepříznivý vliv mutací obejít použitím nemutantních buněk. Je to v prvé řadě tzv. technika mrtvého donoru (dead-donor technique), blízká se svým charakterem transformací, kdy protoplasty jednoho z kmenů nebo i obou kmenů jsou před fúzí inaktivovány působením tepla, UV-záření, chemických inhibitorů apod. U vláknitých hub, zejména rodu *Aspergillus*, vyzkoušel tuto techniku Ferenczy [28]. V našich pokusech o vnitrodruhovou hybridizaci vysokoprodukčních kmenů *Penicillium chrysogenum* jsme využili techniku mrtvého donoru v kombinaci se signálním znakem barvy spor nebo auxotrofie k přímé selekci produktů fúze s prototrofním kmenem [25].

5. VYUŽITÍ PROTOPLASTŮ PŘI TRANSFORMACI, PŘENOSU BUNĚČNÝCH ORGANEL A V GENOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Vedle techniky fúze představuje transformace hub druhý nový přístup v genetické manipulaci využívající protoplasty. Na tomto poli je však u vláknitých hub k dispozici velmi málo výsledků. Byla popsána transformace sféroplastů *Neurospora crassa* plasmidovou DNA [29] a pak i izolace autonomního replikátoru u těže houby [30]. Zcela nedávno se podařilo *Madhosinghovi* transformovat protoplasty *Fusarium culmorum* DNA izolovanou z protoplastů *F. graminearum*, tvořícím mykotoxin zearalenon. Produkty transformace byly schopny tvořit mykotoxin [31]. Jednosměrný přenos genetické informace je možné provést i prostřednictvím liposómů s DNA, buněčných jader a jiných organel. Mezidruhový přenos mitochondrií a rekombinace mitochondriové DNA byly popsány u aspergilů [32].

Využití protoplastů je neodmyslitelnou součástí metod genového inženýrství, které spolu s technikou fúzí protoplastů umožňují účinnou generalizovanou rekombinaci mezi divergentními nebo přírodními typy kmenů a zavedení genů ze vzdáleně příbuzných nebo nepříbuzných organismů do kmenů produkujících žádoucí metabolity, popř. zvýšení počtu genů již přítomných. Genové inženýrství zaznamenalo v posledních letech velký pokrok i u vláknitých hub, kde donedávna bránil dalšímu vývoji nedostatek použitelných eukaryontních vektorů. Objev mitochondriových plasmidů u řady vláknitých hub a možnosti využití mitochondriové DNA znamenaly zásadní zvrat situace i u této skupiny mikroorganismů [33, 34].

6. ZÁVĚR

Možnosti využití protoplastů ve šlechtění vláknitých hub jsou, jak ukazuje uvedený stručný přehled, široké. Významný přínos je očekáván zejména od využití techniky fúze protoplastů, protože genetická variabilita produktů fúze je výrazně vyšší, než jakou lze najít v přírodních sexuálních nebo asexuálních procesech. V mnoha případech je tato technika jediným známým postupem pro spojení různých genomů. Mezidruhová a mezidruhová fúze protoplastů nabízí nový racionální přístup pro šlechtění, protože hybridizací by mohlo dojít ke spojení žádoucích biochemických vlastností dvou odlišných druhů v jednom genomu. Tím by i u hub mohly vzniknout, jako u aktinomycetů již vznikly, modifikované nebo zcela nové metabolity či nastat změny ve fyziologii průmyslově významného mikroorganismu, které se nakonec odrazí ve zvýšení tvorby produktu nebo využití nových substrátů.

Literatura

- [1] PEBERDY, J. F.: Annu. Rev. Microbiol. **33**, 1979, s. 21.
- [2] HAMLYN, P. F., BRADSHAW, R. E., MELLON, F. M., SANTIAGO, C. M., WILSON, J. M., PEBERDY, J. F.: Enzyme Microb. Technol. **3**, 1981, s. 321.
- [3] REYES, F., PEREZ-LEBLIC, M. I., MARTINEZ, M. J., LAHOZ, R.: FEMS Microbiol. Lett. **24**, 1984, s. 281.
- [4] HOMOLKA, L.: 18. kongres Čs. spol. mikrobiol. ČSAV v Banské Bystrici, Abstrakty přednášek, 1983, s. 37.
- [5] BELCOUR, L.: Genet. Res. **25**, 1975, s. 155.
- [6] TUDZYNSKI, P., ESSER, K.: Mol. Gen. Genet. **173**, 1979, s. 71.
- [7] WESSELS, J. G. H., HOEKSEMA, H. L., STEMERDING, D.: Protoplasta **89**, 1978, s. 317.
- [8] SCHUMAN, B., ERGE, D., MAJER, W., GRÖGER, D.: Planta Medica **45**, 1982, s. 11.
- [9] HOMOLKA, L.: VI. celoštát. mykol. konf. v Pezinku, Súhrny referátov, 1977, s. 29.
- [10] MUSÍLKOVÁ, M., UJCOVÁ, E., SEICHERT, L., FENCL, Z.: AO 196001, 1982.
- [11] KELLER, U.: Appl. Environm. Microbiol. **46**, 1983, s. 580.
- [12] KIM, K. S., CHO, N. Y., PAI, H. S., RYU, D. D. Y.: Appl. Environm. Microbiol. **46**, 1983, s. 689.
- [13] FERENCZY, L.: Genetic as a tool in microbiology (Clover, S. W., Hopwood, D. A., Eds.), Cambridge Univ. Press, 1981, s. 1.
- [14] HAMLYN, P. F., BALL, C.: Genet. Ind. Microbiol. (Sebek, O. K., Laskin, A. I., Eds.), Amer. Soc. Microbiol., Washington, 1979, s. 185.
- [15] ALFÖLDI, L.: Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender, A., Ed.), Plenum Press, New York and London, 1982, s. 59.
- [16] MINUTH, W., ESSER, K.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **18**, 1983, s. 38.
- [17] LOPEZ-NIETO, M. J., GARCIA-ACHA, I., MARTIN, J. F.: Abstr. Vith Int. Ferm. Symp., Ontario, Canada, 1980, s. 25.
- [18] MAKINS, J. F., ALLSOP, A., HOLT, G.: Abstr. Vith Int. Ferm. Symp., Ontario, Canada, 1980, s. 25.
- [19] MAKINS, J. F., ALLSOP, A., HOLT, G.: J. Gen. Microbiol. **122**, 1981, s. 339.
- [20] MIDDLE, F., BYCROFT, B. W., PEBERDY, J. E., ANNÉ, J.: Abstr. Vith Int. Ferm. Symp., Ontario, Canada, 1980, s. 24.
- [21] ANNÉ, J.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **15**, 1982, s. 41.
- [22] PEBERDY, J. F., BRADSHAW, R. E.: Overproduction of microbial products (Krumphanzl, V., Sikyta, B., Vaněk, Z., Eds.) Acad. Press London, 1982, s. 371.
- [23] CHANG, L. T., TERASAKA, D. T., ELANDER, R. P.: Dev. Ind. Microbiol. **23**, 1982, s. 21.
- [24] ZELENÝ, K., HOMOLKA, L.: Abstr. 16th Meeting FEBS, Moskva, 1984, s. 104.
- [25] HOMOLKA, L.: nepublikované výsledky.
- [26] SPALLA, C., MARNATI, M. P.: Overproduction of microbial products (Krumphanzl, V., Sikyta, B., Vaněk, Z., Eds.) Acad. Press, London, 1982, s. 563.
- [27] HOMOLKA, L.: Kand. dizert. práce, MBÚ ČSAV, Praha, 1982.
- [28] FERENCZY, L.: osobní sdělení.
- [29] CASE, M. E., SCHWEIZER, M., KUSHNER, S. R., GILES, N. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **76**, 1979, s. 5259.
- [30] BUXTON, F. P., RADFORD, A.: Mol. Gen. Genet. **196**, 1984, s. 339.
- [31] MADHOSINGH, C.: Abstr. 16th Meeting FEBS, Moskva, 1984, s. 383.
- [32] CROFT, J. H., DALES, R. B. G., TURNER, G., EARL, A.: Advances in protoplast research (Ferenczy, L., Farkas, G. L., Eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest and Pergamon Press Ltd., Oxford, 1980, s. 85.
- [33] ESSER, K., KÜCK, U., STAHL, U., TUDZYNSKI, P.: Curr. Genet. **7**, 1983, s. 239.
- [34] HOMOLKA, L., ZELENÝ, K.: Biol. listy **50**, 1985, v tisku.

Homolka, L.: Využití protoplastů při šlechtění vláknitých hub. Kvas. prům. **31**, 1985, č. 7—8, s. 154—157.

Zájem o protoplasty se v současné době soustředil na jejich využití jako nástrojů některých nových přístupů ke genetické modifikaci bakterií, hub i rostlin. Jedná se o techniku fúze a transformace protoplastů, o využití v genovém inženýrství, pracujícím s rekombinantní DNA, a v klasickém mutačním selekčním šlechtitelském postupu, protože protoplasty se ukázaly být i výborným výchozím materiálem pro mutagenizaci. Uvedené metody, odstraňující genetické bariéry a dávající nové dimenze technice parasexuální hybridizace, začaly být intenzivně využívány při šlechtění průmyslově důležitých vláknitých hub, zejména producentů antibiotik a jiných významných metabolitů.

Гомолка, Л.: Использование протопластов в селекции мицелиальных грибов. Квас. прум. **31**, 1985, № 7—8, стр. 154—157.

Интерес к протопластам в настоящее время сосредоточился на их использовании в качестве средства некоторых новых подходов к генетической модификации бактерий, грибов и растений. Речь идет о технике слияния и трансформации протопластов, о использовании протопластов в геновой инженерии работающей с ре-

комбинантной ДНК, и в классическом мутационно — селекционном методе, так как протопласты появились тоже отличным исходным материалом для мутагенеза. Приведенные методы, удаляющие генетические барьеры и доставляющие новые рамки технике парасексуальной гибридизации, начали интенсивно использоваться в селекции промышленных штаммов мицелиальных грибов, главным образом продуцентов антибиотиков и других значительных веществ.

Homolka, L.: Employment of protoplasts for improvement of filamentous fungi. Kvas. prům. 31, 1985, No. 7—8, pp. 154—157.

Interest in protoplasts has recently centered on their utilization as tools for certain new approaches to the genetic modification of bacteria, fungi, and plants. It is a case of protoplast fusion and transformation techniques, the exploitation of protoplasts in recombinant DNA technology (gene engineering), and also in traditional mutation-selection approach, as the protoplasts proved out to be an excellent material for mutagenic treatment. Above-

mentioned methods, removing genetic barriers and giving new dimensions to the use of parasexual hybridization, have started to be intensively exploited in strain improvement programmes developed for industrial filamentous fungi, especially producers of antibiotics and other important metabolites.

Homolka, L.: Ausnützung der Protoplasten bei Züchtung von Hyphenpilzen. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 7—8, S. 154—157.

Das gegenwärtige Interesse an den Protoplasten konzentriert sich auf ihre Ausnützung als Instrumente mehrerer neuer Verfahren der genetischen Modifizierung von Bakterien, Pilzen und Pflanzen. Es handelt sich um die Fusions- und Transformations-technik der Protoplasten, ferner dann um die Ausnützung in den mit rekombinierten DNA arbeitenden Techniken des Gentransfers (gene engineering) und in den klassischen Mutations- und Selektionszüchtungsverfahren, weil sich die Protoplasten als ausgezeichnetes Ausgangsmaterial für die Mutagenese erwiesen haben. Die erwähnten Methoden, die genetische Barrieren beseitigen und die Technik der parasexuellen Hybridisation neu dimensionieren, begann man bei der Züchtung industriell wichtiger Hyphenpilzen intensiv anzuwenden, namentlich bei der von Antibiotika- und anderen bedeutenden Metabolitenproduzenten.