

# Asexual sporulation in the basidiomycete *Coprinus cinereus*

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Polak, Eline

**Publication date:**

1999

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002077094>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH No. 13125

**Asexual sporulation in the basidiomycete *Coprinus cinereus***

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCE

presented by  
**ELINE POLAK**  
Ir. University of Wageningen  
born on December 26<sup>th</sup>, 1971  
from the Netherlands

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. M. Aebi, examiner  
Prof. Dr. R. Honegger, co-examiner

Zürich 1999

## SUMMARY

---

### SUMMARY

Monokaryons of the basidiomycete *Coprinus cinereus* constitutively form abundant numbers of single-celled uninucleate haploid asexual spores (oidia) in liquid droplets on specialized aerial structures (oidiophores). Mycelia with mutations in the two mating type loci *A* and *B* (*Amut Bmut* homokaryons) also produce copious numbers of oidia but only when exposed to blue light. We used such an *Amut Bmut* homokaryon (strain *AmutBmut*) to define the specific steps in the cellular process of oidiophore development. An oidiophore emerges perpendicular in a cone-like shape from an aerial hyphal cell (foot cell). A septum separates the foot cell and the evolving stem cell. One or two further stem cells may be formed. Fully-grown oidiophores consecutively bud off short branches (oidial hyphae) that break up into two or occasionally three oidia (arthroconidia) until up to 200 oidia are produced at the tip of the oidiophore. Analysis of more than 20 different *C. cinereus* strains (monokaryons, *Amut* homokaryons, *Bmut* homokaryons and *Amut Bmut* homokaryons) revealed that oidiophore development is a flexible process. Based on morphological variations, we defined four main types of oidiophores that occurred on different strains with variable frequencies. The most complex types of oidiophores produced oidia at the tip(s) of simple (type 1) or branched stems (type 2). Type 3 and 4 oidiophores were characterized by the absence of stem cell elongation (type 3) and stem cell formation (type 4). This indicated that the different steps in oidiophore formation (formation of a stem cell, stem cell elongation, formation of oidial hyphae and subsequent release of matured oidia) can be uncoupled.

In dikaryons, oidia formation is under control of the mating type genes. If present in the same strain, compatible *A* mating type genes repress oidiation and blue light overrides this effect. Compatible *B* mating type genes reduce the effect of light on *A* mediated repression of oidiation. Therefore, dikaryons give rise to a low number of uninucleate haploid oidia. The parental nuclear types were unequally distributed amongst the oidia produced. Transformation experiments with compatible heterologous *A* mating type genes showed that the nuclear distribution in oidia was regulated by the *A* mating type locus. We suggested that unequal recovery of nuclear types in oidia formed on dikaryons was due to unequal repression of oidia formation by the *A* mating type genes. The *A* mating type genes fall into two distinct classes of

## SUMMARY

---

genes, HD1 and HD2, that are homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* *MAT $\alpha$ 2* and *MATa1* mating type genes, respectively. In this organism,  $\alpha 2$  forms homodimers that repress the expression of genes specific for the *a* mating type. *a1*/ $\alpha 2$  heterodimers repress haploid specific gene expression after mating. In *C. cinereus*, the homologous HD1/HD2 heterodimers are thought to repress oidiation in dikaryons. Indications for a negative regulatory role of HD1 proteins came from analysis of a *C. cinereus A-null* strain and its transformants with different combinations of *A* and *B* mating type genes. Light overrode both the HD1 mediated repression and the activated *A* mediated repression, suggesting that light might act via the HD1 protein. Compatible *B* genes did not influence oidia formation unless the *A* mating type pathway was activated.

We characterized about 800 REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) transformants from homokaryon *AmutBmut* with respect to oidiation. Mutants, affected in *A* mating-type/light regulation of oidiation, in stem cell elongation, in production of oidial hyphae, in release of matured oidia and in spore cell wall composition, were identified. We used the property of oidia to adhere to surfaces such as metal or velveteen to develop a new method for replica plating and demonstrated its value in screening for auxotrophic mutant strains and strains altered in sporulation. One mutant strain affected in mating type regulation of oidiation was further characterized. This mutant displayed a monokaryotic phenotype (simple septa, constitutive oidiation, no fruit body formation) but its *Amut* locus was still functional. Two cosmids were isolated that restored light induction of oidiation in this mutant strain.

### ZUSAMMENFASSUNG

Monokaryen des Basidiomyzeten *Coprinus cinereus* produzieren konstitutiv grosse Mengen asexueller Sporen (Oidien). Oidien werden in flüssigen Tropfen auf spezialisierten Strukturen (Oidiophoren) des Luftmyzels gebildet. Myzelien mit Mutationen in beiden Kreuzungstyploci (*AmutBmut* Homokaryen) produzieren ebenfalls grosse Mengen Oidien, jedoch nur nach Bestrahlung mit blauem Licht. Ein solches *AmutBmut* Homokaryon (Stamm *AmutBmut*) wurde zur Bestimmung der spezifischen, zellulären Schritte der Oidiophorenentwicklung benutzt. Ein kegelförmiger Oidiophor entsteht senkrecht zu einer Zelle (Fusszelle) im Luftmyzel. Ein Septum trennt die Fusszelle von der sich entwickelnden Stammzelle. Eine oder zwei weitere Stammzellen können gebildet werden. Ausgewachsene Oidiophoren treiben aufeinanderfolgend kurze Zweige (Oidien-Hyphen), die sich in zwei oder gelegentlich drei Oidien (Arthrokonidien) trennen. Bis zu 200 Oidien werden an einem Oidiophor gebildet. Die Analyse 20 verschiedener *C. cinereus* Stämme (Monokaryen, *Amut* Homokaryen, *Bmut* Homokaryen, und *Amut Bmut* Homokaryen) hat gezeigt, dass die Entwicklung der Oidiophoren ein flexibler Prozess ist. Basierend auf morphologischen Variationen wurden vier Haupt-Oidiophoren Typen definiert, die in den verschiedenen Stämmen mit unterschiedlichen Häufigkeiten vorkamen. Die komplexesten Oidiophoren-Typen produzierten Oidien an der Spitze einfacher (Typ 1) oder verzweigter (Typ 2) Stammzelle. Typ 3 und 4 Oidiophoren sind durch die Abwesenheit der Stammzellverlängerung (Typ3) und der Stammzellbildung (Typ 4) charakterisiert. Dies deutet darauf hin, dass die verschiedenen Schritte während der Bildung der Oidiophoren (Bildung einer Stammzelle, Verlängerung der Stammzelle, Bildung der Oidien-Hyphen und anschliessende Entlassung reifer Oidien) nicht gekoppelte Prozesse sind.

In Dikaryen wird die Oidienbildung durch die Kreuzungstyp Gene kontrolliert. Wenn kompatible A Kreuzungstyp Gene im gleichen Myzel anwesend sind, wird die Oidienbildung unterdrückt. Blaues Licht hebt diesen Effekt auf. Kompatible B Kreuzungstyp Gene reduzieren diesen Effekt des blauen Lichts auf die durch A vermittelte Repression der Oidienbildung. Dikaryen bilden deswegen eine niedrigere Zahl einkerniger, haploider Oidien. Die parentalen Typen der Kerne sind nicht gleichmässig in den produzierten Oidien verteilt. Transformationsexperimente mit

## ZUSAMMENFASSUNG

---

kompatiblen heterologen A Kreuzungstyp Genen haben gezeigt, dass die Kernverteilung in Oidien von Dikaryen durch die A Kreuzungstyp Loci reguliert wird. Es wird vorgeschlagen, dass die unterschiedliche Verteilung der Kerntypen in Oidien durch eine ungleiche Suppression der Oidienbildung durch die A Kreuzungstyp Gene verursacht wird.

Es gibt zwei Klassen von A Kreuzungstyp Genen, HD1 und HD2. Beide Klassen sind homolog zu den jeweiligen *MAT $\alpha$ 2* und *MATa1* Kreuzungstyp Genen von *Saccharomyces cerevisiae*. In diesem Organismus bildet  $\alpha$ 2 Homodimere, welche die Expression *a* spezifischer Gene reprimieren. *a1*/ $\alpha$ 2 Heterodimere reprimieren die Expression haploid spezifischer Gene in diploiden Zellen. In *C. cinereus* werden HD1/HD2 Heterodimere für die Repression der Oidienbildung in Dikaryen verantwortlich gemacht. Hinweise für eine negativ regulierende Rolle der HD1 Proteine wurden nach der Analyse eines *C. cinereus A-null* Stammes und dessen Transformanden mit verschiedenen Kombinationen der A und B Kreuzungstyp Gene gefunden. Licht hob sowohl die durch HD1 als auch die durch HD1/HD2 vermittelte Repression auf. Dies deutet auf einen direkten Einfluss von Licht auf die HD1 Aktivität hin. Kompatible B Kreuzungstyp Gene beeinflussten die Oidienbildung nur in Anwesenheit kompatibler A Kreuzungstyp Gene.

Es wurde die Oidienbildung in ungefähr 800 REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) Transformanden des Homokaryons *AmutBmut* charakterisiert. Mutantenstämme mit veränderter Regulation der Oidienbildung, mit reduzierter Stammzellverlängerung, mit veränderter Bildung von Oidien-Hyphen und verringerter Freisetzung der Oidien wurden identifiziert. Ein Stamm mit veränderter Regulation der Oidienbildung wurde weiter charakterisiert. Dieser Mutantenstamm zeigte einen monokaryotischen Phänotyp (einfache Septen, grosse Mengen an Oidien, und keine Fruchtkörperbildung), obwohl sein *Amut* Locus noch funktionell war. Zwei Cosmide wurden isoliert, welche die Lichtinduktion der Oidienbildung in diesem Stamm wieder herstellten.

Schliesslich benutzten wir die Eigenschaft der Oidien, an Oberflächen wie Metall oder Samt zu haften, zur Entwicklung einer neuen Methode der Replikaplattierung und zeigten deren Nutzen in der Suche nach Auxotrophie mutanten und Mutanten in der Sporulation.