

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
MOLEKULÁRIS- ÉS SEJTBOLÓGIAI DOKTORI PROGRAM

**GENETIKAI VARIABILITÁS ÉS FILOGENETIKAI
KAPCSOLATOK VIZSGÁLATA *CRYPTOCOCCUS*
HUNGARICUS IZOLÁTUMOKON**

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

**KÉSZÍTETTE: GÁCSER ATTILA
TÉMAVEZETŐ: DR. KUCSERA JUDIT**

SZTE TTK MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2001

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. BASIDIOMYCOTA ÉLESZTŐGOMBÁK RENDSZERÉNEK ÁTTEKINTÉSE	6
2.1.1. A BASIDIOMYCOTÁK RENDSZEREZÉSÉBEN ÁLTALÁNOSAN HASZNÁLT JELLEMZŐK	7
2.1.2. HYMENOMYCETÁK OSZTÁLYA	8
2.1.2.1. TREMELLALES REND	8
2.1.2.2. TRICHOSPORONALES REND	9
2.1.2.3. FILOBASIDIALES REND	9
2.1.2.4. CYSTOFILOBASIDIALES REND	10
2.1.3. A <i>CRYPTOCOCCUS HUNGARICUS</i> FAJ JELLEMZÉSE, TAXONÓMIAI HELYE	10
2.2. A GOMBÁK MITOKONDRIÁLIS DNS-ÉNEK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	12
2.3. GENETIKAI VARIABILITÁS VIZSGÁLATÁRA ALKALMAS MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK	14
2.4. SZEKVENCIA-ANALÍZIS, MINT A MOLEKULÁRIS TAXONÓMIA ESZKÖZE	15
2.5. A FILOGENETIKAI ANALÍZIS ALAPFOGALMAI, KLADISZTIKA	20
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
3.1. A VIZSGÁLATOK SORÁN FELHASZNÁLT MIKROORGANIZMUSOK JEGYZÉKE	24
3.2. TÁPTALAJOK, TÁPOLDATOK ÉS EGYÉB OLDATOK	24
3.3. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	31
3.3.1. SZÉNFORRÁSHASZNOSÍTÁSI VIZSGÁLATOK	31
3.3.2. MITOKONDRIÁLIS DNS IZOLÁLÁS	32
3.3.3. TOTÁL DNS IZOLÁLÁS	32
3.3.4. RESTRIKCIÓS TÉRKÉPEK KÉSZÍTÉSE	33
3.3.5. NUKLEINSAVAK ELVÁLASZTÁSA GÉLELEKTROFORÉZISSEL, MÉRETÜK MEGHATÁROZÁSA	33
3.3.6. DNS IZOLÁLÁSA AGARÓZ GÉLBŐL	33
3.3.7. DNS BLOTTOLÁS ÉS HIBRIDIZÁCIÓ	34
3.3.8. RAPD ANALÍZIS	35
3.3.9. ITS, D1/D2 RÉGIÓ, 18S rDNS PCR- ITS RÉGIÓ RFLP	36
3.3.10. KARIOTIPIZÁLÁS CHEF RENDSZERREL	36
3.3.11. PETITE MUTÁCIÓ INDUKÁLÁSA, MUTÁNSOK IZOLÁLÁSA	37
3.3.12. SZÍNANYAG VIZSGÁLATA VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIÁVAL	37
3.3.13. FILOGENETIKAI ANALÍZIS	38
3.3.14. ELEKTRONMIKROSKÓPIAI VIZSGÁLATOK	38
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	39
4.1. <i>CRYPTOCOCCUS HUNGARICUS</i> INTRASPECIFIKUS VARIABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	39
4.1.1. MORFOLÓGIAI, FIZIOLÓGIAI ÉS BIOKÉMIAI JELLEMZŐK	39
4.1.1.1. MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK	39
4.1.1.2. FIZIOLÓGIAI JELLEMZŐK	41
4.1.1.2.1. SZÉNFORRÁSHASZNOSÍTÁS VIZSGÁLATA	41
4.1.1.3. BIOKÉMIAI SAJÁTSÁGOK	42
4.1.1.3.1. KAROTENOID TARTALOM VIZSGÁLATA	42
4.1.1.3.2. ETÍDIUM-BROMID ÉRZÉKENYSÉG VIZSGÁLATA	43

4.1.2. MOLEKULÁRIS JELLEMZŐK	44
4.1.2.1. TOTÁL DNS HaeIII ELEMZÉSE	44
4.1.2.2. RAPD ELEMZÉS	45
4.1.2.3. ITS RÉGIÓ RFLP ELEMZÉSE	48
4.2. EXTRAKROMOSZÓMÁLIS ELEMENK VIZSGÁLATA KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A MITOKONDRIÁLIS GENOM SZERKEZETÉRE	49
4.2.1. MITOKONDRIÁLIS DNS IZOLÁLÁSA BASIDIOMYCOTA ÉLESZTÖGOMBÁKBÓL	49
4.2.2. MITOKONDRIÁLIS GENOMSZERVEZŐDÉS ELEKTRONMIKROSKÓPOS VIZSGÁLATA	49
4.2.3. <i>CRYPTOCOCCUS HUNGARICUS</i> CBS 4124 ^T MITOKONDRIÁLIS DNS-ÉNEK MÉRETE, FIZIKAI ÉS FUNKCIONÁLIS TÉRKÉPEZÉSE	50
4.2.4. TOVÁBBI <i>CRYPTOCOCCUS HUNGARICUS</i> IZOLÁTUMOK MTDNS-ÉNEK ELEMZÉSE	54
4.2.5. EGYEDI SZERVEZŐDÉSŰ MTDNS <i>C. HUNGARICUS</i> CBS 6569, ILLETVE A <i>CYSTOFILOBASIDIUM CAPITATUM</i> ESTÉBEN	55
4.3. KARIOTIPIZÁLÁS CHEF MÓDSZERREL	58
4.4. <i>CRYPTOCOCCUS HUNGARICUS</i> RENDSZERTANI HELYÉNEK VIZSGÁLATA, FILOGENETIKAI ANALÍZIS	60
4.4.1. A D1-D2 RÉGIÓ FILOGENETIKAI ANALÍZISE	60
4.4.2. AZ ITS RÉGIÓ ÉS A 5.8S rRNS GÉN SZEKVENCIAJÁNAK ANALÍZISE	62
4.4.3. A 18S rRNS GÉN PARCIÁLIS SZEKVENCIAJÁNAK ANALÍZISE	66
5. ÖSSZEFOGLALÁS	68
6. SUMMARY	72
7. IRODALOMJEGYZÉK	76
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	87

1. BEVEZETÉS

Az élesztők a világ minden részén megtalálható, változatos életteret elfoglaló egysejtű szervezetek. Képviselőiket megtalálhatjuk a talajban éppúgy, mint állatokon, vagy növényeken. Fontos mezőgazdasági és orvosi jelentőséggel bírnak lebontó folyamatokban való részvételük, illetve betegségek kiváltásában játszott szerepük révén. Legismertebb képviselőik a „pékélesztő” (*Saccharomyces cerevisiae*), illetve a humánpatogén *Candida* és *Cryptococcus* (*Filobasidiella*) fajok. Mivel élesztők mind az Ascomycetes mind a Basidiomycetes gombacsoportban előfordulnak, így ezeknek a mikroorganizmusoknak a taxonómiai helye, illetve filogenetikai viszonyainak tisztázása sok vitát váltott ki. A rendszerezés általánosan elterjedt klasszikus módszerei mellett napjainkban előtérbe kerülnek a különböző molekuláris alapokon nyugvó eljárások, melyek segítségével a gombák rendszere egyértelműbbé válik.

A basidiomycota élesztők csoportjára elsősorban a napjaink pestiseként emlegetett AIDS irányította rá a figyelmet. Ebbe a rendszertani egységbe tartozik ugyanis a cryptococcosis-t okozó *Cryptococcus neoformans*. Vannak azonban más, gazdasági jelentőséggel bíró basidiomycota fajok is. Az északi országok halászati ágazatának (lazac-, illetve ráktenyésztés) egyik fontos kiegészítő ipara az astaxanthin termeltetés mikroorganizmusokkal. A halak és rákok húsának „mesterséges” színezése nagyban hozzájárul azok piaci értékének növeléséhez. A mezőgazdasági, illetve orvosi vonatkozású basidiomycotákon kívül más, ebbe a csoportba tartozó képviselőket igen keveset tanulmányozták. Filogenetikai rendszerük, illetve fiziológiai, genetikai tanulmányozásuk jelentősen háttérbe szorult, jóllehet számos citológiai, biokémiai és ökológiai különlegességük egyértelművé teszi, hogy genetikai vizsgálatuk nem váltható ki más gombacsoportok tanulmányozásával.

Ezért céljaink között szerepelt:

1. A *C. hungaricus* intraspecifikus genetikai variabilitásának felderítése.
2. Különböző fiziológiai és molekuláris technikákkal nagyszámú marker azonosítása.
3. Az extrakromoszómális genetikai rendszer tanulmányozása.
4. Ezen vizsgálatok eredményei alapján taxonómiai következtetések levonása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Kísérleti munkánk eredményeként, először ismertük meg nagyobb részletességgel és mélységig a basidiomycota élesztő, a *C. hungaricus* genetikai állományát. A magi és a mitokondriális DNS genetikai markerezése utat nyit a további genetikai elemzés előtt. Új adatokat nyertünk ezen gombák taxonómiai viszonyairól.

Az élesztőgombák, mint minden más mikroorganizmusok, rendkívül változatos élőhelyeken fordulnak elő, talajban, növényeken, állatokon (éppolyan jól halak és tengeri vizében, számos fajuk ipari és háztartási, valamint még betegségekkel okozhat. A legismertebb képviselőjük kétségtelenül a pékességek ismert *Saccharomyces cerevisiae* (aszomycota), illetve a napjainkban létező hírhedt szexuális kórokozó *Candida albicans* (ascomycota) fajok, vagy a *Pilobolus* (*Cryptococcus*) *neoformans* (basidiomycota). Az ismert élesztőfajok mintegy 17%-a tartozik a basidiomycota törzshez, a mivel a mikroorganizmusok közül számos az élesztők gazdasági, mezőgazdasági illetve orvosi jelentőséggel, napjainkban egyre növekvő igény jelentősen biodiverzitásuk, illetve ökológiai szerepük tisztázására. A basidiomycota élesztők azonosítása, filogenetikus helyük meghatározása sokszor nehéz feladat, polifitikus természetükük köszönhetően.

Napjaink molekuláris biológiai módszereinek alkalmazásával bebizonyosodott, hogy a basidiomycota élesztők a Basidiomycoták törzshez három osztályban, (Fell és más 2000) az Ustilaginomycetes, Urediniomycetes és a Hymenizomycetes osztályokban fordulnak elő. A mikroorganizmusok a sejtben működik, a sejt, és a sejt DNS (rDNS) elemzése alapján sorolhatók a három osztály valamelyikébe. A vegetatív és reproduktív biológiai jellemzők vizsgálata kiegészítve biológiai tesztekkel, mint például az izolált szénforrástól történő felismerés, vagy az extracelluláris keményítőszint anyagok termelése, azok az élesztők elhelyezkedését lehetővé teszi, amelyek segítségével pontosan meghatározható a taxonómiai rendszertan elhelyezkedése. A taxonómiai elhelyezkedésük kijelölésére kaphatók a *Species* PCR primerek alkalmazása (Fell és más 1995; Hayes és más 1995; Maraschi és Kurtzman 1996; Michel és más 1994), RFLP elemzések alkalmazása (Hayes és más 1997), kromozómrendszerek meghatározása alkalmas eljárásokon (PFGE, CHEF), és RAPD vizsgálatok (Blackburn és más 1997) alapuló technikák. A legnagyobb előrelépés a basidiomycota élesztők rendszerezésében az rDNS kis, illetve nagy mennyiségű sejt-vezetési elemzés jelentése (Blackburn és más 1995; Fell és Kurtzman 1996; Fell és más 1995; Gubler és más 1989, 1993; Nakase és más 1993; Sugiyama és Sait 1993; Suh és Sugiyama 1993; Suh és Nakase 1995; Swann és Taylor 1995b; Van der Peer és más 1992; Yamada és Kawasato 1998; Yamada és Nakagawa 1992).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Basidiomycota élesztőgombák rendszerének áttekintése

Az élesztőgombák világszerte elterjedt mikroorganizmusok, rendkívül változatos élőhelyeken fordulnak elő, talajban, növényeken, állatokon éppúgy, mint folyók és tengerek vizében, számos fajuk iparilag hasznosított, mások pedig megbetegedéseket okoznak. A legismertebb képviselőjük kétségtelenül a pékélesztőként ismert *Saccharomyces cerevisiae* (ascomycota), illetve a napjainkban kétes hírnévre szert tett humánpatogén *Candida* (ascomycota) fajok, vagy a *Filobasidiella* (*Cryptococcus*) *neoformans* (basidiomycota). Az ismert élesztőfajok mintegy 1%-a tartozik a basidiomycoták törzsébe, s mivel e mikroorganizmusok közül számos rendelkezik gazdasági, mezőgazdasági illetve orvosi jelentőséggel, napjainkban egyre növekvő igény jelentkezik biodiverzitásuk, illetve ökológiai szerepük tisztázására. A basidiomycota élesztők azonosítása, filogenetikai helyük meghatározása sokszor nehéz feladat, polifiletikus természetüknek köszönhetően.

Napjaink molekuláris biológiai módszereinek alkalmazásával bebizonyosodott, hogy a basidiomycota élesztők a Basidiomycoták törzsének három osztályában, (Fell és mtsi 2000) az Ustilaginomycetes, Urediniomycetes és a Hymenomycetes osztályokban fordulnak elő. A mikroorganizmusok a szeptumok morfológiája, a sejtfal összetevői és a riboszómális DNS (rDNS) elemzése alapján sorolhatók a három osztály valamelyikébe. A vegetatív és reprodukzív biológiai jellemzők vizsgálata, kiegészítve fiziológiai tesztekkel, mint például az inozitol szénforrásként történő felhasználása, vagy az extracelluláris keményítőszzerű anyagok termelése, azok az általánosan elterjedt alapvető rendszerezési elvek, amelyek segítségével pontosan meghatározható a taxonómiai rendszerben elfoglalt hely. A taxonómiai eljárások fejlődésével előtérbe kerültek a fajspecifikus PCR primerek használatán (Fell és mtsi 1995; Haynes és mtsi 1995; Mannarelli és Kurtzman 1998; Mitchel és mtsi 1994), RFLP mintázatok elemzésén (Magee és mtsi 1987), kromoszómamintázatok meghatározására alkalmas eljárásokon (PFGE, CHEF), és RAPD vizsgálatokon (Boekhout és mtsi 1997) alapuló technikák. A legnagyobb előrelépést a basidiomycota élesztők rendszerezésben az rDNS kis, illetve nagy alegységének szekvenciaszintű elemzése jelentette (Boekhout és mtsi 1995; Fell és Kurtzman 1990; Fell és mtsi 1995; Gueho és mtsi 1989, 1993; Nakase és mtsi 1993; Sugiyama és Suh 1993; Suh és Sugiyama 1993; Suh és Nakase 1995; Swann és Taylor 1995b; Van der Peer és mtsi 1992; Yamada és Kawasaki 1998; Yamada és Nakagawa 1992).

A továbbiakban a Fell és munkatársai által, a nagy riboszómális DNS alegység D1/D2 régiójának szekvenciaanalízisen alapuló basidiomycota élesztőrendszert mutatom be részletesebben (1. ábra) (Fell és mtsi 2000).

2.1.1 A basidiomycoták rendszerezésében általánosan használt jellemzők

A basidiomycota élesztők karakterizálása során felhasznált elsődleges filogenetikai jellemzők a réteges szerveződésű elektrondeniz sejtfal (Kreger-van Rij és Veenhuis 1971, Simmons és Ahearn 1987), illetve a szeptumok felépítése (Boekhout és mtsi 1998, Moore 1998). Mivel ezek a mikroorganizmusok reprodukív életszakaszuk során fonalas képleteket hoznak létre, ezért a sejteket elválasztó szeptumok morfológiája ennél a csoportnál is fontos határozó szempont.

A legtöbb bazídiumos gombára jellemző a dolipórusos szeptumok jelenléte a harántfalak közepén. Ennek a szerkezetnek a szerepe a sejtmagvak szomszédos sejtekbe való áramlásának megakadályozása, ami alapfeltétele a dikariotikus állapot fenntartásának. A dolipórusok peremén a sejtfalak megvastagszanak. A szeptumot nagy elektrondenizitású záró anyag (occlusion) tölti ki, és a pórust mindkét oldalon félgömb alakú sapka, az ún. parentoszóma zárja le.

A záró anyag és a parentoszómák morfológiája fontos rendszertani bélyeg. A záró anyag lehet szemcsés (O1), illetve sávós szerkezetű (O2). A parentoszóma lehet szabályosan perforált (P1), folytonos (P2), különböző alakú vezikulumokból álló (P3-P5), illetve hiányozhat is (P6). A parentoszóma és a záró anyag típusa alapján a bazídiumos gombák számos csoportba sorolhatók. A Hymenomycetes osztályba tartozó fajok szeptumai O1/P1 típusúak. A Tremellales rendbe tartozó fajok többségének O1/P2, a *Sirobasidium* fajoknak (Tremellales) O2/P3, néhány *Tremella* fajnak O2/P4 típusú dolipórusa van. A *Wallemia* fajok (bazídiumos élesztők) szeptumai O2/P5, míg az Ustilaginomycetes osztály fajaira, egyes bazídiumos élesztőkre (Filobasidiellaceae) és a Tulasnellales rendbe tartozó *Stilbotulasnella* fajokra O2/P6 típusú szeptumok jellemzőek. Az Uredinomycetes osztályba tartozó élesztők növekedésének hifás fázisában általában egyszerű szeptumok figyelhetők meg, azonban a *Kriegeria eriophori* (McLaughlin és mtsi 1995) esetében összetett szeptum jellemző. Sejtfaluk felépítésében általános a mannóz, a glükóz, előfordulhat ramnóz, illetve fruktóz a xilóz azonban hiányzik (Prillinger és mtsi 1991). Az Uredinomyceta élesztők inozitolt nem hasznosítanak, keményítőszerű anyagokat nem termelnek. Az Ustilaginomyceta osztály tagjait a mikropór-szerű szeptumok jellemzik (Bauer és mtsi 1989, 1997; Boekhout és mtsi

1992, 1998; O'Donnell és McLaughlin 1984). Az Ustilaginomyceta sejtfal dominánsan glükózt, galaktózt és mannózt tartalmaz, a xilóz itt sem figyelhető meg (Prillinger és mtsi 1990). Inozitolt néhány reprezentánsuk képes szénforrásként hasznosítani, azonban vannak az osztálynak olyan tagjai, melyek erre nem képesek. Keményítőszerű termékeik nincsenek. Mindezekkel ellentétben a Hymenomyceta osztályba tartozó mikroorganizmusok szeptumai úgynevezett "dolipor" szerkezettel bírnak, sejtfaluk glükózt, mannózt és xilózt egyaránt tartalmaz (Prillinger és mtsi 1991, 1993; Roeijmans és mtsi 1998; Weijman és Golubev 1987). Inozitolt rendszerint asszimilálnak, keményítőszerű anyagok termelése általánosan jellemző a csoportra.

2.1.2. Hymenomyceták osztálya

A riboszómális RNS kis alegységének szekvenciáit felhasználva Swann és Taylor (1995c) két alosztályt különített el az osztályon belül. A Hymenomycetidae alosztály tagjai kizárólag nagygombák, míg a Tremellomycetidae alosztály tagjai között olyan mikroorganizmusokat is találunk, amelyek elsődlegesen az egysejtű növekedést részesítik előnyben. Fell és munkatársainak (2000) munkája, amely a nagy riboszómás RNS gén D1/D2 régióját elemezte, bebizonyította, hogy ebben az alosztályban négy rendet különíthetünk el, a Tremellales, Trichosporonales, Filobasidiales, illetve a Cystofilobasidiales rendeket. A *Cryptococcus* genus kivételével, amely polifiletikus jelleggel bír és így mind a négy rendben előfordul, az egyes rendeket a következő fajok jellemzik:

- Tremellales – *Bullera*, *Bulleromyces*, *Fellomyces*, *Filobasidiella*, *Kockovaella*, és *Tsuchivaea*;
- Trichosporonales – ide tartozik az összes *Trichosporon* faj kivéve a *Trichosporon pullulans*-t, mely a Cystofilobasidiales rend tagja;
- Filobasidiales – *Filobasidium*;
- Cystofilobasidiales rendbe a *Cystofilobasidium*, *Mrakia*, *Phaffia*, *Udeniomyces* és *Xanthophyllomyces* fajok tartoznak.

2.1.2.1. Tremellales rend

Az idetartozó fajok életciklusuk haploid fázisában élesztő alakban, dikariotikus fázisában fonalasan növekszenek. Csatképződés van, dolipórusos szeptumokat is

megfigyeltek. Korábbi nézetek alapján (Wells 1994) a Tremellales rendet hét család alkotja, azonban Fell és munkatársainak (2000) molekuláris taxonómiai vizsgálata ezeket az eredményeket nem támasztotta alá. Ha megvizsgáljuk az alosztály filogenetikai fájának képét, láthatjuk, hogy számos belső elágazásnál nem találunk "bootstrap" értéket, mely egyértelműen jelzi a taxonómiai egység heterogenitását. Korábbi vizsgálatok, melyek a vizsgált fajok száma miatt korántsem tekinthetők teljesnek azt eredményezték, hogy a *Tremella* genus öt taxonómiai csoportra osztható (Indecorata, Fuciformis, Aurantia, Foliaces, Mesenterica) (Chen 1998). Fell és munkatársai, azonban bebizonyították, hogy a fenti csoportokba nem csupán *Tremella* fajok tartoznak, mivel 100%-os "bootstrap" érték igazolja a *Cryptococcus skinneri* Foliacea clusterbe való tartozását, az Indecorata csoportba több *Bullera* és *Cryptococcus* faj tartozik (*Bullera unica*, *Bullera pseudoalba*, *Bulleromyces albus*, *Cryptococcus cellulolyticus*, *Cryptococcus laurentii*) (1. ábra) (Fell és mtsi 2000). A Tremellales renden belüli vizsgálatok rámutattak számos *Cryptococcus* faj közeli rokonságára a *Bullera*-kal (*Bullera pseudoalba* / *Cryptococcus cellulolyticus*, *Bullera armeniaca* / *Cryptococcus hungaricus*). Taxonómiai szempontból a *Bullera* és a *Cryptococcus* fajok közötti legfontosabb eltérés a ballisztokonídium képzés képessége, mely a *Bullera*-k sajátja szemben a *Cryptococcus*-okkal. Azonban ez a jelleg nem szignifikáns filogenetikai karakter. Hasonló viszony írható le a *Kockovaella* és a *Fellomyces* fajok között. Fontos megemlíteni, hogy Fell kísérletei szerint, a korábbi nézetekkel ellentétben, a fontos humán vonatkozással rendelkező *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* és var. *bacillispora* nem a Filobasidiales (Bandoni 1995; Boekhout és mtsi 1998) hanem a Tremellales rend tagja, amit 100%-os "bootstrap" érték igazol.

2.1.2.2. *Trichosporonales* rend

A rend a *Trichosporon* fajok mindegyikét magában foglalja, kivéve a *Trichosporon pullulanst*, amely a Cystofilobasidiales rend tagja. A rendbe tartozik két, a rendre nem jellemző módon arthrospórát nem képző faj, a *Cryptococcus curvatus*, ill. az *Apiotrichum porosum*.

2.1.2.3. *Filobasidiales* rend

A rend eredeti képviselői a *Cystofilobasidium*, *Filobasidiella*, *Filobasidium*, *Mrakia* és *Xanthophyllomyces* fajok voltak (Bandoni 1995; Boekhout és mtsi 1998; Wells 1994).

Később Swann és Taylor (1995c) javasolták a rend újraosztását, mivel a *Filobasidiella* nemzetséget a 18S rDNS vizsgálata alapján közelebbi rokonnak találták a *Tremellales*-szel mint a *Filobasidium*-mal, illetve rámutattak, hogy a *Cystofilobasidium* és *Mrakia* nem alkotnak monofiletikus csoportot a *Filobasidium*-mal.

Fell és mtsi (2000) a vizsgálatokat tovább folytatva megállapították, hogy a rendben négy csoport különíthető el. A "cluster"-ek mindegyike nagyszámú antarktikus származású *Cryptococcus* fajt tartalmaz.

2.1.2.4. *Cystofilobasidiales* rend

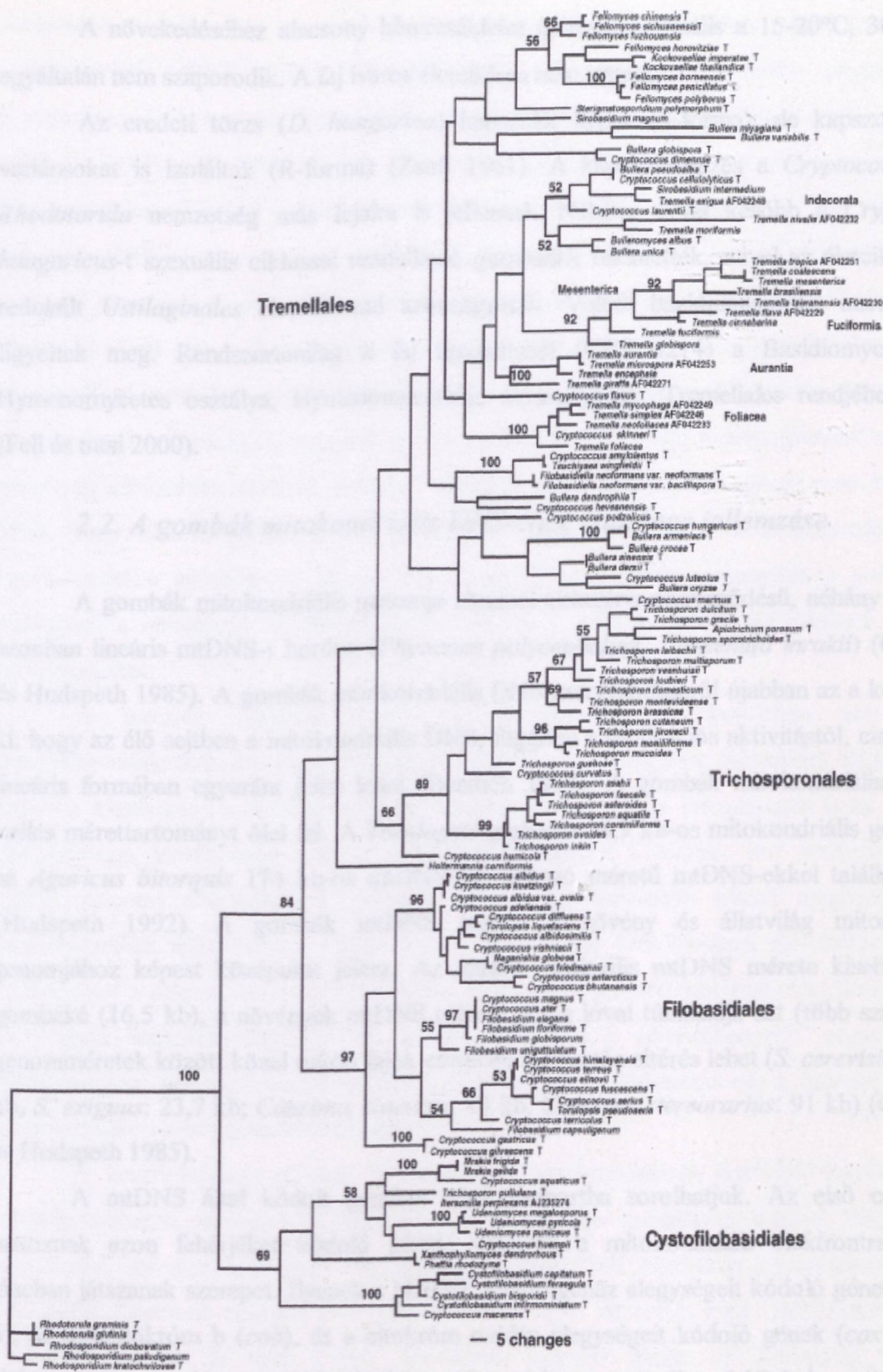
A napjainkban leírt rend egyik különleges sajátja a teliospóra képzés, mely a teleomorf Hymenomycéták között egy különleges tulajdonság, mivel ez elsősorban az Uredinomycéták jellemzője. Egy másik fontos karakter, amely a rendet jellemzi, a holobazídium, illetve a dolipor hifaszseptumok. A renden belül két csoportot különítettek el, amelyek egyikébe *Mrakia*, *Cryptococcus* és *Udeniomyces*, a másikba *Cystofilobasidium*, *Phaffia*, és *Xanthophyllomyces* fajok tartoznak.

2.1.3. *A Cryptococcus hungaricus* faj jellemzése, taxonómiai helye

A *Cryptococcus hungaricus* faj típusörzsét 1957-ben Zsolt János írta le *Dioszegia hungarica* néven. A Tihanyi félsziget talajából izolált faj jellegzetessége a hidegtűrés és a karotenoid színanyag termelés. Később Phaff és Fell (1970) a *Dioszegia hungarica*-hoz hasonló vegetatív szaporodási módot a *Cryptococcus* genus egyes fajainál is megfigyeltek, így feleslegesnek tartották a faj új nemzetségbe való sorolását.

A *Cryptococcus hungaricus* vegetatívan sarjadzással szaporodik, a 6-9 µm hosszú, 4-4,5 µm széles sejteken a sarjak rövid nyelecskén, szterigmán keletkeznek. A sarjak a hosszúkás sejteken legtöbbször laterálisan jönnek létre. Megfigyelésünk szerint a hosszú ideig fenntartott, idős tenyészetekben nagy, gömbölyű, vastag falú óriás sejtek is megfigyelhetők. Az óriássejtekből ismét a normális sejtek sarjadzanak, azonban ilyenkor gyakran csoportosan.

Irodalmi adatok alapján és saját kísérleteink eredményei szerint szénhidrátokat nem erjeszt, nitrátot nem hasznosít. Etanolos táptalajon nem növekszik. Minimál táptalajon vitamin szükséges a növekedéséhez. A *Cryptococcus hungaricus* lassan növekvő faj.



1. ábra Basidiomycota élesztők Hymenomycetidae alosztályának filogenetikai viszonyai a 26S rDNS D1/D2 régiójának szekvenciaanalízise alapján (Fell és mtsi 2000).

A növekedéséhez alacsony hőmérsékletet igényel, optimális a 15-20°C, 30°C fölött egyáltalán nem szaporodik. A faj ivaros életciklusa nem ismert.

Az eredeti törzs (*D. hungarica*) kapszulát képez (S-forma), de kapszula nélküli variánsokat is izoláltak (R-forma) (Zsolt 1961). A kapszulaképzés a *Cryptococcus* és a *Rhodotorula* nemzetség más fajaira is jellemző. Néhány évvel később a *Cryptococcus hungaricus*-t szexuális ciklussal rendelkező gombának tekintették, mivel az életciklusát egy redukált *Ustilaginales* életciklussal azonosították. Valódi bazídiumképzést azonban nem figyeltek meg. Rendszertanilag a faj típustörzsét (CBS 4214) a Basidiomycota törzs Hymenomycetes osztálya, Hymenomycetidae alosztályának, Tremellales rendjébe sorolták (Fell és mtsi 2000).

2.2. A gombák mitokondriális DNS-ének általános jellemzése

A gombák mitokondriális genomja zömmel cirkuláris szerveződésű, néhány gombafaj azonban lineáris mtDNS-t hordoz (*Physarum polycephalum*, *Hansenula mrakii*) (Grossman és Hudspeth 1985). A gombák mitokondriális DNS szerveződéséről újabban az a kép alakult ki, hogy az élő sejtben a mitokondriális DNS, függően a replikációs aktivitástól, cirkuláris és lineáris formában egyaránt jelen lehet (Bendich 1993). A gombák mitokondriális genomja széles mérettartományt ölel fel. A *Torulopsis glabrata* 18,9 kb-os mitokondriális genomjától az *Agaricus bitorquis* 174 kb-os mtDNS-éig változó méretű mtDNS-ekkel találkozhatunk (Hudspeth 1992). A gombák mtDNS mérete a növény és állatvilág mitokondriális genomjához képest középutat jelent. Az állatok minimális mtDNS mérete kisebb mint a gombáké (16,5 kb), a növények mtDNS mérete pedig jóval túlhaladja azt (több száz kb). A genomméretek között közel rokon fajok esetében is jelentős eltérés lehet (*S. cerevisiae*: 72-78 kb, *S. exiguus*: 23,7 kb; *Coprinus cinereus*: 43 kb, *Coprinus stercorarius*: 91 kb) (Grossman és Hudspeth 1985).

A mtDNS által kódolt géneket négy csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba tartoznak azon fehérjéket kódoló gének, amelyek a mitokondriális elektrontranszport-láncban játszanak szerepet. Ilyenek a NADH dehidrogenáz alegységeit kódoló gének (*ndh1-6*), az apocitokróm b (*cob*), és a citokróm oxidáz alegységeit kódoló gének (*cox1-3*). Az elektrontranszport-lánc további fehérjéi a sejtmagi kromoszómákon kódoltak, a citoplazma riboszómáin transzlálódnak, majd a mitokondriumba transzportálódnak. A gének második csoportja a mitokondriális ATP-áz egyes alegységeit kódolja (*atp6*, 8, 9), a többi alegység a sejtmagban kódolt. A gének harmadik csoportja a mitokondriális transzlációs apparátus

molekuláit kódolja. Ide tartoznak a nagy és kis riboszómális RNS génjei (*rnl*, *rns*), a mitokondriális tRNS gének (legalább 22) és egyes riboszómális proteinek (pl. *Saccharomyces cerevisiae* *Var1* génje). A gének negyedik csoportjába a nem azonosított ORF-ek (URF-unidentified reading frame), melyek funkciója jelenleg még nem ismert (pl. az *A. nidulans* URFA3 génje) (Hauswirth és mtsi 1987). Végül külön kell említeni az intronok ORF-jait, amelyek a mtDNS szerveződésében, belső átrendeződéseiben fontos szerepet játszanak. Egyes mitokondriális gének intronokkal erősen tagoltak, illetve a gének között kiterjedt „spacer” régiók lehetnek. Ezek felelősek a közel azonos génkészlet mellett is tapasztalható méretbeli eltérésekért. Élesztőgombák esetében az AT gazdag, nem kódoló régiók eltérő hosszúsága a magyarázat (Clark-Walker 1992), míg fonalas gombák esetében a génekben előforduló intronok számbeli eltérései a fő okai (Cummings és mtsi 1989). Az állati, vagy emberi sejtek mitokondriumaiban jóval kisebb a nem funkcionáló mtDNS hányad mint a gombákban, így az állati mtDNS méretekhez viszonyítva a gombák (és különösen a növények) mtDNS-ei nagyobbak. A 1. táblázat adatai jól tükrözik ezeket a különbségeket.

A gombák körében főként az ascomycoták mitokondrium szerveződését tanulmányozták: előrehaladott kutatások folynak az *Aspergillus* fajcsoport tagjai között, illetve a klasszikus modellszervezetnek tartott *Saccharomyces* nemzetségen belül. Napjaink egészségügyi, járványügyi helyzete - különös tekintettel a modern kor pestisének tartott AIDS rohamos elterjedésével, melynek egyik legveszélyesebb kísérő megbetegedése a basidiomycoták közé tartozó *Cryptococcus neoformans* által kiváltott mélymikózis – tette szükségessé a más rendszertani egységekbe tartozó gombafajok behatóbb vizsgálatát. Mivel a sejt egyik legkonzervatívabb, és funkciója alapján a legérzékenyebb organeluma a mitokondrium, így a kórokozó gombák elleni hatékony védekezés egyik ígéretes vonulata lehet a mitokondrium beható tanulmányozása.

A basidiomycota gombák mitokondriális szerveződéséről rendkívül kevés adat áll rendelkezésünkre, és ezek a közlemények is fonalas gombákon végzett vizsgálatokat ismertetnek (pl. *Agrocybe aegerita* Moulinier és mtsi 1992; *Agaricus brunnescens* Hintz és mtsi 1988; *Coprinus cinereus* és *Coprinus stercorarius* Weber és mtsi 1986; *Schizophyllum commune* Specht és mtsi 1992; *Armillaria ostoyae* Smith és Anderson 1994). A basidiomycota élesztők mitokondriális genetikai rendszeréről alig rendelkezünk adatokkal. E hiányosság a basidiomycota élesztőgombák, illetve a mitokondriális genom evolúciójának megismerését nagymértékben akadályozza.

1. Táblázat A mtDNS jellemzői: géntartalma, mérete.

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Allomyces macrogynus</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Reclinomonas americana</i>
16S és 23S rRNS	2	2	2	2	2	2	2	2
5S rRNS	0	0	0	0	1	1	0	1
Transzfer RNS-ek	22	24	25	25	27	22	0	26
RnázP RNS komponens	0	1	0	0	0	0	0	1
Riboszómális proteinek	0	1	1	16	16	7	0	27
Elongációs faktor	0	0	0	0	0	0	0	1
RNS polimeráz	0	0	0	0	0	0	0	4
NAD (I. légzési komplex)	7	0	7	10	8	9	0	12
Sdh (II. légzési komplex)	0	0	0	0	2	0	0	3
Cob (III. légzési komplex)	1	1	1	1	1	1	1	1
Cox (IV. légzési komplex)	3	3	3	3	3	3	2	3
ATP (V. légzési komplex)	2	3	3	4	4	4	0	5
Protein import	0	0	0	0	3	3	0	4
Citokróm c biogenezis	0	0	0	0	0	0	0	1
Citokróm oxidáz	0	0	0	0	0	0	0	1
összerakás								
Fehérjekódoló gének	13	8	15	40	37	27	3	62
Összes gén	37	35	42	67	67	53	5	92
Méret (kb)	17	75	57	38	187	367	6	69
Genetikai kód	Nem standard	Nem standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Nem standard	Standard
Intronok száma	0	8	28	0	32	23	0	1

2.3. Genetikai variabilitás vizsgálatára alkalmas molekuláris módszerek

A genetikai variabilitás, a DNS polimorfizmus kimutatásához többféle eljárást biztosít a polimeráz láncreakció alkalmazása (Foster és mtsi 1993). Lehetőség van többek között a genom egy adott régiójának (pl. ITS szakaszok az rDNS-ben) amplifikálására (Liu és mtsi 1993), vagy a totál DNS-en random, szintetikus oligonukleotid (általában 10 tagú) primerek alkalmazására (RAPD analízis; Williams és mtsi 1990). Ez utóbbi eljárás abban tér el a többi

általánosan használt PCR technikától, hogy itt egyetlen primer alkalmazása is elegendő, és nem szükséges ismerni az amplifikálódó lókuszt szekvenciáját sem. Ezzel a módszerrel a kimutathatósági szintig felszaporíthatók azok a DNS szakaszok, melyek megfelelő távolságban, a primerekkel homológ invertált ismétlődő szekvenciák közé esnek. A különböző mikroszkópikus gombatörzsek közötti genetikai hasonlóság nagyon jól jellemezhető azáltal, hogy feltárjuk, milyen gyakorisággal ismétlődnek genomjukban bizonyos szekvenciák. A RAPD technikát, mint az RFLP analízis alternatív módszerét, széles körben alkalmazzák; ugyanis rendkívüli érzékenysége mellett további számos előnnyel rendelkezik az utóbbihoz képest. Lényegesen gyorsabb, nem igényel specifikus génpróbákat, a minta DNS-je igen kis mennyisége is elegendő hozzá – míg pl. a Southern blotthoz jelentős mennyiségű és jó minőségű DNS-re van szükség.

A RAPD már számos mikroszkópikus gomba esetében bizonyult – elsősorban fajon belüli – különbségek kimutatására alkalmazható módszernek. Azon túlmenően, hogy a RAPD technikával akár egyedszintű különbségek feltárására is módunk nyílik, segítségével nagy specifitású diagnosztikai próbákhoz is hozzájuthatunk (Foster és mtsi 1993). A módszer szegregációs analízisre (Fabritius és Judelson 1997; Judelson és mtsi 1995), genetikai térképezésre (Williams és mtsi 1991; Judelson és mtsi 1995) egyaránt lehetőséget kínál. További alkalmazást tesz lehetővé, hogy a RAPD termékek közvetlenül szekvenálhatók, valamint felhasználhatók hibridizációs próbaként is, pl. pulzáltatott mezejű gélelektóforézissel (PFGE) elválasztott kromoszómák markerezésére (Tudzynski és Weltring 1993).

2.4. Szekvencia-analízis, mint a molekuláris taxonómia eszköze

A pontos taxonómiai meghatározás fontossága jól ismert mindazok által, akik mikroorganizmusokkal foglalkoznak. Számos lényeges kérdés mutatkozik ezen a területen, kezdve a fajok meghatározásától egészen a rokonsági viszonyok meghatározásáig. A kezdeti időkben a mikrobiológia klasszikus módszerei, majd a modern molekuláris technikák kerültek alkalmazásra, létrehozva a molekuláris taxonómiát. Bizonyossá vált, hogy a konvencionális élesztő-taxonómia, amely morfológiai és fiziológiai jellemzőkön alapszik, közel sem nyújt teljes rendszert, és gyakran eredményez téves meghatározásokat. A molekuláris taxonómia ezeket a problémákat küszöböli ki. Kétség kívül a DNS-DNS reasszociáció az a módszer, amely a legkényelmesebb a közeli rokon fajok elkülönítésére, azonban az eljárás távolabbi taxonok összehasonlításakor korlátozott felhasználhatóságú

(Burns és mtsi 1991; Kurtzman 1992; Kurtzman és Phaff 1987). A mikroorganizmusok meghatározására, rendszertani besorolására, számos molekuláris taxonómiai módszer áll rendelkezésünkre. Általánosan elfogadott, „klasszikus” metodikák: a légzési lánc ubiquinon típusának, illetve a magi DNS guanin és citozin arányának meghatározása, különböző DNS régiók restriktációs elemzése, izoenzim elektroforézis, elektroforetikus kariotipizálás, szerotipizálás, valamint a RAPD (Lehmann és mtsi 1993; Naumov és mtsi 1992; Pernice és mtsi 1998; Shen és Lachance 1993; Xu és mtsi 1999; Yamada és mtsi 1977). Ezek a módszerek azonban gyakran csupán korlátozott mértékben szolgáltatnak adatokat. A nukleinsav szekvencia elemzése sok esetben jóval ígéretesebb megoldást kínál. Egyrészt közeli, illetve távolabbi kapcsolatban lévő mikroorganizmusok közötti viszonyokat is felderíthet a vizsgált DNS régió konzervatív jellegétől függően, másrészt a szekvenciaadatok részletgazdagsága növeli a statisztikai elemzés megbízhatóságát. Mivel a mikroorganizmusok genomjának különböző régiói, különböző fokban képviselnek ősi jelleget ezért a szekvencianálízis egyik kardinális kérdése az elemezni kívánt régió kiválasztása (McCaroll és mtsi 1983). A napjainkban gyakrabban elemzett régiók felsorolását, illetve azt, hogy a rendszerezés milyen szintjén alkalmazhatók, a 2. táblázat mutatja. A különböző régiók elemzése PCR termékek szekvencia analízisével, valamint direkt szekvenálással történik, az alkalmazandó PCR primereket és a keletkező DNS szakasz várható hosszát, a 3. táblázat mutatja be.

Szekvenciaszintű vizsgálatok további kedvelt célpontja a mitokondriális DNS. Elterjedt taxonómiai bélyeg lehet a mitokondriális gének szekvenálása mellett a teljes mitokondriális DNS restriktációs elemzése is (Giménez-Jurado és mtsi 1995). Guillamón és mtsi (1994) mitokondriális RFLP mintázat alapján azonosított négy *sensu stricto* *Saccharomyces* törzset, Piskur és mtsi-nak (1995) ezen molekuláris marker felhasználásával sikerült számos *sensu stricto* *Saccharomyces* fajt elkülöníteni más, közeli rokon *Saccharomyces*-től. Később Piskur és mtsi (1998) bebizonyították, hogy a módszer alkalmas taxonómiai vizsgálatokra, számos fajt és izolátumot sikerült azonosítaniuk és elkülöníteniük. Bebizonyosodott, hogy a mitokondriális DNS restriktációs elemzése alkalmas közeli rokon organizmusok megkülönböztetésére (Erikson 1995; Hibbett és Donoghue 1995). Egyes szerzők szerint a mitokondriális restriktációs elemzések, térképek más taxonómiai markerekkel kombinálva alkalmasak rendszertani besorolásokra (Coria és mtsi 1990).

Napjainkban a filogenetikai vizsgálatok során leginkább az rDNS szekvenciák elemzésének eredményeit részesítik előnyben. Mivel lényegében minden organizmusban előfordul, könnyen összehasonlíthatóak akár távoli fajok is, nagy kópiaszámának

2. Táblázat Filogenetikai vizsgálatok során alkalmazott DNS régiók, illetve alkalmazási lehetőségeik (Valente és mtsi 1999 nyomán).

Molekula	Régió	Magasabb kategória	Család	Genus	Faj	Testvér fajok	Alfaj, varietas	Törzs
5S rDNS	Teljes	+	+					
5,8S rDNS	Teljes			+				
18S rDNS	Teljes	+	++	+++	++			
18S rDNS	18S – 1627 (1451 – 1618)	+		+++	++			
26S rDNS	25S – 635 (D2, V3, B vagy 493 – 622)	+		+++	++			
26S rDNS	25S – 1841 (1611 – 1835)	+		++				
26S rDNS	D1/D2			+	++	++	+	
ITS	Teljes				+	+	+	
IGS	Teljes vagy részleges szekvencia				+		+	+
mtDNS	Restrikciós analízis, részleges szekvenciák				+	+		+

+ használható; ++ jól használható; +++ különösen jól használható

3. Táblázat Filogenetikai vizsgálatok során alkalmazott régiók szekvenálásakor felhasznált primerek és a létrejövő termék hossza (Valente és mtsi 1999 nyomán).

Régió	Primer szekvencia	Hozzávetőleges méret (bp)	Irodalom
5.8S rDNS teljes	Az ITS régió tartalmazza a gént	150	Walker és Doolittle 1982
18S rDNS teljes	Direkt szekvenálás: 5'TGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACC3' 5'CCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCC3' 5'TCTGGGCCGACGCGCGCTACACTG3' 5'GACGGGCGGTGTGTGTACAAAGGGCAG3'	1750	Suh és mtsi 1996
18S rDNS teljes	PCR termék szekvenálás: NS1-5'GTAGTCATATGCTTGTCTC3' NS8-5'TCCGCAGGTTACCTACGGA3' 5'CTGTTAAGACTACAACGGAGCAGGC3' 5'AGAGTGTTCAAAGCAGGC3'	1800	Swann és Taylor 1993
18S rDNS (1451-1618)	Direkt szekvenálás: 5'ACGGGCGGTGTGTAC3'	167-172	Gueho és mtsi 1990
26S rDNS (D2, B, V3 vagy 193-622)	Direkt szekvenálás: 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'	200-300	Gueho és mtsi 1990
26S rDNS (1611-1835)	Direkt szekvenálás: 5'TTGAGACCTGCTGCGG3'	225	Gueho és mtsi 1990
26S rDNS D1/D2	PCR termék szekvenálás: F63-5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' LR3-5'GGTCCGTGTTTCAAGACG3'	600	Fell és mtsi 2000
ITS	PCR termék szekvenálás: ITS5 vagy ITS1-5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	Változó (<400->800)	James és mtsi 1996
IGS	PCR termék szekvenálás: AC10-5'GAGGCTAGAGGTGCCAG3' AC19-5'ATTCGAGAAAGTTATTATG3'	Változó (~2,4)	Fan és mtsi 1995

köszönhetően pedig könnyen felszaporítható, tisztítható. Az rDNS régió rRNS struktúrgéneket tartalmaz, átíródó “*transcribed*” és nem átíródó “*non-transcribed*” spacer régiók építik fel. Az evolúciós eltérés mértéke ezekben a régiókban nem azonos, ezáltal válik alkalmassá a terület különböző szintű rokonsági viszonyok tisztázására (Valente és mtsi 1999). Mikroorganizmusok közötti rokonsági fokok megállapítására először az 5S rDNS szekvencia adatait alkalmazták. A magas evolúciós ráta, illetve a viszonylag kis méret, amely ezt a régiót jellemzi, elsősorban a gombák magasabb rendszertani egységeinek összehasonlítására teszi alkalmassá (Fan és mtsi 1995; Walker és Doolittle 1982). Később Swann és Taylor (1993, 1995a) egy olyan rDNS régiót talált, amely rend, család, illetve faj szinten teszi lehetővé a gombák taxonómiai viszonyainak összehasonlítását. A 18S rDNS szekvencia mérete, valamint evolúciós stabilitása révén távoli és közeli kapcsolatban lévő mikroorganizmusok összehasonlítását is lehetővé teszi. A régió felhasználásával Swann és Taylor (1995b; 1995c) basidiomycota élesztők és fonalas gombák nagyszámú képviselőjét illesztették be a filogenetikai rendszerbe. Napjainkra a 18S rDNS részleges, illetve teljes szekvenciaadataiból egy rendkívül jól használható, mind asco- mind basidiomycotákra vonatkozó, adatbázis állt össze. Legújabban a “fekete” élesztők fajaira nézve is tartalmaz szekvenciákat. Mindez lehetővé teszi újabb fajok beillesztését a gombák filogenetikai rendszerébe (Cai és mtsi 1996; Guého és mtsi 1990; Haase és mtsi 1995; Hendricks és mtsi 1991; James és mtsi 1997, 1998; Kurtzman 1990; Kurtzman és Robnett 1994; Liu és Kurtzman 1991; Mendonca-Hagler és mtsi 1993; Messner és mtsi 1995; Nakase és mtsi 1993; Peterson és Kurtzman 1990, 1991; Prillinger és mtsi 1997; Sugiyama és Suh 1993; Suh és Nakase 1995; Suh és mtsi 1996; Takashima és Nakase 1998; Takashima és mtsi 1995; Yamada és mtsi 1994a, 1994b, 1994c). James és munkatársai a 18S rDNS csaknem teljes szekvenciáját felhasználva bizonyították, hogy a *Saccharomyces* genus nem monofiletikus. Vizsgálataik hozzájárultak három *Saccharomyces* törzs rendszertani helyének tisztázásához, melyek közül kettőt új fajként írtak le. Mivel azonban Peterson és Kurtzman (1991) munkája bebizonyította, hogy ez a terület nem alkalmas közelebbi rokonsági viszonyok tisztázására, megindult a vadászat egy olyan régió keresésére, amely a testvér fajok elkülönítésére alkalmas. A 26S rDNS szekvenciájának elemzésekor számos régiót (26S-635 493-622, 1611-1835) vontak be a filogenetikai vizsgálatokba (Valente és mtsi 1999). A választást elsősorban az az ismeret indikálta, miszerint a fenti régiók variábilisak, így filogenetikailag hasznosak (Gutell és Fox 1988). Fell és munkatársainak (2000) munkája nyomán bebizonyosodott, hogy

a basidiomycota gombák rendszerének tisztázása elképzelhető a 26S rDNS D1/D2 régiójának felhasználásával.

Ez a - mintegy 600 nukleotid hosszúságú - régió alkalmasnak bizonyult a szinte áttekinthetetlen basidiomycota rendszer egyszerűsítésére és filogenetikai viszonyainak tisztázására. A fenti DNS szakasz elemzése varietasok, fajok, családok közötti elkülönítést tesz lehetővé (Fell és Kurtzman 1990; Fell és Statzell-Tallman 1992; Fell és mtsi 1992; Fell és mtsi 1995). Mannarelli és Kurtzman (1998) a D1/D2 szakasz szekvenciája alapján szerkesztett PCR primerekkel 14 humánpatogén élesztő elkülönítését végezte el.

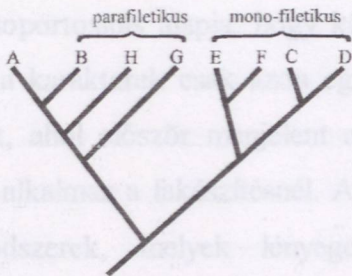
A keresés tovább folytatódott, és a figyelem a riboszómális DNS köztes spacer területeire irányult. Az rDNS cluster-ek között elhelyezkedő, nem kódoló régiók IGS (InterGenic Spacer) szekvenciáinak restrikciós elemzését már korábban populációs markerként alkalmazták (Lachance 1990). Az IGS régió szekvenciájának illetve RFLP mintázatának felhasználásával több élesztő fajon belül sikerült varietas-okat elkülöníteni. Fan és mtsi (1995) *Cryptococcus neoformans* fajon belül két varietas IGS területeit vizsgálták, megállapították, hogy az RFLP mintázat alapján jelentős méretbeli eltérés detektálható közöttük, ugyanakkor rDNS RFLP mintázataik csaknem megegyeztek. Carlotti és mtsi (1997) *Candida krusei* izolátumainak vizsgálata során szintén hosszpolicimorfizmust állapított meg, azonban úgy találta, hogy az IGS régió vizsgálata nem nyújt megfelelő megoldást a testvérfajok és varietas-ok elkülönítésére. A szoros rokonsági viszonyban lévő mikroorganizmusok közötti rokoni viszonyok tisztázására az ITS (Internal Transcribed Spacers) szekvencia elemzését tartják ma a legmegfelelőbbnek. A filogenetikai elemzések rámutattak, hogy az ITS régió szekvenciaelemzése nem csupán élesztők, hanem fonalas gombák és növények esetében is alkalmazható (Baldwin és mtsi 1995; Hamelin és Rail 1997; Holst-Jensen és mtsi 1997). Az ITS régió számtalan esetben bizonyult megfelelő eszköznek a fonalas- és élesztőgombák taxonómiájában, mivel a terület hossza viszonylag állandó, azonban szekvencia tartalmát tekintve jelentős változatosságot mutat (Valente és mtsi 1996, 1997; James és mtsi 1996). Az élesztő taxonómiai vizsgálatok során az ITS régió elemzését elsősorban RFLP mintázatok alapján végezték (Belloch és mtsi 1998; Guillaumon és mtsi 1998; McCulloch és mtsi 1998a, 1998b; McCulloch és mtsi 1999; Molina és mtsi 1992; Montrocher és mtsi 1998; Ramos és mtsi 1998; Williams és mtsi 1995), ugyanis a szekvencia analízise során számos nehézség merült föl, elsősorban a szekvenciaadatok összerendezése, az "alignment" folyamatában a nagyfokú divergencia miatt (James és mtsi 1996). Ez magyarázza azt, hogy a terület elemzése leginkább nagyon közeli rokon fajok (testvér fajok, varietas-ok), illetve faj alatti szintek (izolátumok) kapcsolatainak elemzésére alkalmas (James

és mtsi 1998). A számos ITS régiót érintő munka eredményeképpen az ITS adatbázis egyre növekszik, és kitűnő lehetőséget biztosít összehasonlító elemzések kivitelezésére (Gouliamova és mtsi 1998; Lott és mtsi 1998; Messner és mtsi 1995; Montrocher és mtsi 1998; Oda és mtsi 1999; Prillinger és mtsi 1997; Steels és mtsi 1999). A különböző régiók különböző szinteken adnak tehát felvilágosítást az élesztők filogenetikai viszonyairól, az óriási adatbázis bármely fent említett terület elemzésekor nagy segítséget nyújt, és gyakran elengedhetetlen az új fajok elhelyezésében, illetve a régi rendszerek újragondolásában (Valente és mtsi 1999).

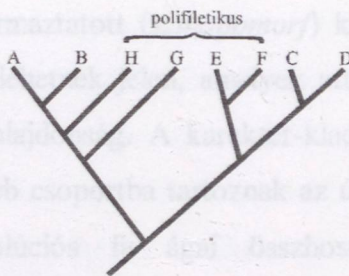
2.5. A filogenetikai analízis alapfogalmai, kladisztika

Munkám során a molekuláris biológiai és klasszikus mikrobiológiai módszerek alkalmazását követően számos adat állt rendelkezésemre, amelyek felhasználásával lehetőség nyílt taxonómiai következtetések levonására. Ehhez azonban részletesebben meg kellett ismernem az evolúciós utak rekonstrukciójára szolgáló módszereket. Ezek a filogenetikai módszerek a taxonómiában központi fontosságú leszármazási viszonyokról adnak tájékoztatást, ezáltal alapot szolgáltatnak az élővilág filogenetikai osztályozásához. A leszármazási mintázatokat kereső metodológiát kladisztika néven foglalhatjuk össze. Fontos megemlíteni, hogy az alkalmazott módszerek sokszor a kívánt cél elérése érdekében feláldozzák az objektivitást, így a személyes döntésektől való függetlenséget is (Podani 1997). Az ilyen típusú vizsgálatok alkalmazásakor ezért nagyon sok múlik a kutatón, az evolúcióról alkotott általános nézetén, illetve az adott csoportra alkalmazott speciális elképzelésein. A kladisztika egyik alapvető sajátága, hogy eredményeinket fa formájában kapjuk meg, ezeket az ábrákat kladogrammnak nevezzük (gör. *kladosz*: ág) (Camin és Sokal 1965). A fák „levelei” maguk a tanulmányozott taxonok, vagy a numerikus taxonómia szaknyelvén OTU-k (operational taxonomic unit, Sneath és Sokal 1973). A kladogramm rész fáit kládoknak nevezzük az ide tartozó OTU-k egy úgynevezett *monofiletikus* (egy őstől származó) csoportot alkotnak (2a. ábra). Abban az esetben, ha a közös őstől származó taxonok közül akár csak egyet is kihagyunk, a csoport már *parafiletikusnak* tekintendő (2a. ábra) (Henning 1966). Meg kell említeni még a sokszor látott polifiletikus csoportokat, ebben az esetben olyan kisebb csoportok egyesítéséről van szó, ahol a saját közvetlen ősök kimaradnak (2b. ábra).

a:



b:



2. ábra Taxonok leszármazási relációi. A kladisztikai értelemben vett monofiletikus csoportban minden leszármazott szerepel, a parafiletikus csoport nem tartalmazza a közös ős minden leszármazottját. A polifiletikus csoportból a közvetlen ősök kimaradnak (Podani 1997).

A kladisztika másik alapelveként tekintendő az úgynevezett minimális evolúciós utak elve, ami annyit jelent, hogy (mint minden tudományos munkában) az egyszerűbb hipotézist kell megtartanunk a komplikáltabbakkal szemben, vagyis adott esetben ez azt jelenti, hogy azt a fát kell optimálisnak tartanunk, amely a taxonok legkisebb megváltozásával jár. Ezt az elvet *parsimony* néven emlegetjük, amelyet takarékosági-elvnek fordíthatunk magyarra (Rédei 1987).

Kladisztika távolságok alapján:

A kladisztika számos matematikai módszert alkalmazhat a filogenetikai fák létrehozására. Az egyik legrégebbi javaslat, evolúciós távolságok fakkal történő reprezentálására, Cavalli-Sforza és Edwards (1967) nevéhez fűződik. Bonyolult algoritmus segítségével számoltak, és olyan fát tekintettek optimálisnak, amelyben az élek összhosszúsága a legkisebb volt. Később Saitou és Imanishi (1989) egy sokkal gyorsabb és egyszerűbb számolásmenetet fejlesztett ki, ugyanezre a célra.

A dendrogramoknak azt a hibáját, miszerint konstans evolúciós változással számolnak, Saitou és Nei (1987) által leírt szomszéd-összevonó (*neighbor joining*) módszerrel próbálja kiküszöbölni. A módszer lényege abban rejlik, hogy az egymás mellé rendelés feltételeinek vizsgálatakor a taxonoknak az összes többi vizsgált objektummal alkotott távolságait is figyelembe veszi. Az ilyen módon létrejött, úgynevezett módosított távolság, annál kisebb lesz az eredetinél, minél nagyobb a két taxon vagy objektum távolsága a többitől, hiszen a nagy érték végeredményben megnöveli kettejük relatív közelségét.

Karakter-kladisztika:

A szűkebb értelemben vett kladisztikát értjük karakter-kladisztikán. Hennig (1950, 1966) elmélete, akit ezen nézetek atyjának tekintenek, azon alapszik, miszerint a karakterek

(tulajdonságok, bélyegek) ősi (*pleziomorf*) és leszármaztatott (*apomorf*) csoportokba sorolhatók. A csoportosítás alapja, hogy közös leszármaztatott (*szinapomorf*) karaktereket találjanak. Ezek a karakterek csak azon egyedekben lehetnek jelen, amelyek attól a közös őstől származnak, ahol először megjelent az adott tulajdonság. A karakter-kladiszтика két módszer családot alkalmaz a fakészítésnél. A jelentősebb csoportba tartoznak az úgynevezett parszimónia módszerek, melyek lényege az evolúciós fa ágai összhosszúságának minimalizálása. Ez azt jelenti, hogy olyan fát tekint a módszer optimálisnak, ahol az adott kiindulási és végállapot között a lehető legkevesebb evolúciós esemény, azaz "karakter-állapotváltozás" bekövetkezése volt szükséges. Swofford és Olsen (1990) képlete alapján meghatározhatjuk a fa hosszát („*tree length*”), és ezt az értéket a vizsgálatok során meghatározott fa esetében föltüntethetjük. Ilyen evolúciós változás, pl. a nukleotidcsere, vagy restrikciós felismerőhelyek elvesztése. A megfelelő törzsfá kiválasztása után a módszer kiválasztja az ősi formát, és az ágak hosszára is megad egy közelítő értéket. A módszer hátránya, hogy kvantitatív karakterek nem használhatók, és a távoli rokon taxonok esetében félrevezető eredményeket ad. A "*parsimony*" analízis több rokon módszert foglal magába, amelyek célja azonos, de az alapjukat képező evolúciós modellek eltérőek. Az előbb említett eljárások elsősorban olyan karakterek elemzésére szolgálnak, amelyek a klasszikus mikrobiológiai fiziológiai tulajdonságokra vonatkoznak. A molekuláris módszerek előtérbe kerülésével a nukleinsav-szekvenciák elemzése vált a molekuláris taxonómia legfőbb eszközévé. Ilyen adatok analízisekor a nukleotid-változások megfelelő interpretálása, illetve modellezése kerül előtérbe. A maximális valószínűségeen ("*maximum likelihood*") alapuló módszer azt a törzsfát tekinti a legjobbnak, mely esetében az észlelt nukleotidcserék a legnagyobb valószínűséggel következhetek be. A módszer alkalmazásakor adatokat kell szolgáltatni a várható nukleotidcserék gyakoriságáról. Ez a módszer egy konkrét evolúciós modell alkalmazását igényli, gyakorlatilag adatokat kell szolgáltatunk arra nézve, hogyan alakult át az egyik szekvencia a másikba. Az eljárás képes kiválasztani a sok lehetséges fa közül azt, amelynek kialakulása a legvalószínűbb (Felsenstein 1981).

Az eredmények értékelésekor a létrehozott fák, illetve a fa belső csoportjai, elágazásai valóságtartalmának ellenőrzésére nagy szükség van. Erre alkalmas statisztikai módszer az ún. "*bootstrap*" eljárás. A módszer lényege, hogy véletlenszerű módon átrendezve az eredeti adathalmazt, újabb és újabb filogenetikai fákat hoz létre. Az eljárást nagy számban ismételve (általában 1000 replikáció) adatokat szolgáltat arra nézve, hogy milyen százalékban kapta ugyanazt az elágazást. A kapott értéket "*bootstrap*" értéknek nevezzük, és a vizsgált elágazás valószínűségéről ad felvilágosítást (Valente és mtsi 1999).

Ebben a fejezetrészben nem vállalkozhattam a kladisztika, illetve a numerikus taxonómia meglehetősen bőséges irodalmának a teljesség igényével történő leírására, már csak azért sem, mert ez a tudományág rendkívül szerteágazó és nehezen áttekinthető. Azonban vallom, hogy mindezek az ismeretek nélkülözhetetlenek a mikroorganizmusok taxonómiai viszonyainak megvilágítására, illetve rokonsági kapcsolataik felderítésére. Fontos megemlítenünk, hogy a nagy mennyiségű adathalmazok kezelése elképzelhetetlen lenne számítógépes programok alkalmazása nélkül. A kladisztikai programcsomagok piacát uraló softwerek közül kiemelem a PHYLIP programcsomagot (Felsenstein 1981), amely számos opciót alkalmaz. Gyakorlatilag a fent említett módszerek mindegyikét alkalmazhatjuk filogenetikai fák létrehozására, napjainkban előtérbe kerülő Windows operációs rendszer alapfelületét használó PAUP (Swofford 1990) programcsomag elterjedése növekszik, általános vélemény szerint a parszimónia módszerekre ez a softwer alkalmasabb, mint az előbb említett.

3% malátás
0.5% desztillátvíz
2.5% agar
0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.1% KH_2PO_4
0.05% MgSO_4
1% glükóz
0.1 ml Wickerham-féle vitaminoldat
Wickerham-féle vitaminoldat (100 ml-re)
0.2 mg folsav
0.2 mg biotin
40.0 mg Ca-patótenger
200.0 mg inozitol
40.0 mg niacin
20.0 mg p-aminobenzoesav
40.0 mg piridoxin HCl
40.0 mg szarv HCl
20.0 mg riboflavin

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A vizsgálatok során felhasznált mikroorganizmusok jegyzéke (4. és 5. táblázat)

3.2. Táptalajok, tápoldatok és egyéb oldatok

2xYPD tápoldat	1% élesztőkivonat
	2% pepton
	2% glükóz
2xYPD táptalaj	2xYPD tápoldat
	2,5% agar
Malátás táptalaj	3% maláta
	0,5% élesztőkivonat
	2,5% agar
Vitaminos minimál tápoldat	0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	0,1% KH_2PO_4
	0,05% MgSO_4
	1% glükóz
	0,1 ml Wickerham-féle vitaminoldat
Wickerham-féle vitamintörzsoldat (100 ml-re)	
	0,2 mg folsav
	0,2 mg biotin
	40,0 mg Ca-patotenét
	200,0 mg inozitol
	40,0 mg niacin
	20,0 mg p-aminobenzoésav
	40,0 mg piridoxin.HCL
	40,0 mg aneurin.HCL
	20,0 mg riboflavin

4. Táblázat A filogenetikai analízisbe bevont basidiomycota élesztők és a 26S rDNS D1/D2 szekvenciáinak GeneBank azonosítói (Fell és mtsi 2000).

Törzsek	Törzsszám	D1/D2 szekvencia GeneBank azonosító
<i>Bullera armeniaca</i>	CBS 7091 ^T	AF189883
<i>Bullera crocea</i>	CBS 6714 ^T	AF075508
<i>Bullera dendrophila</i>	CBS 6074 ^T	AF189870
<i>Bullera dextrii</i>	CBS 7225 ^T	AF189857
<i>Bullera globispora</i>	CBS 6981 ^T	AF075509
<i>Bullera miyagiana</i>	CBS 7526 ^T	AF189858
<i>Bullera oryzae</i>	CBS 7194 ^T	AF075511
<i>Bullera pseudoalba</i>	CBS 7227 ^T	AF075504
<i>Bullera sinensis</i>	CBS 7238 ^T	AF189884
<i>Bullera unica</i>	CBS 8290 ^T	AF075524
<i>Bullera variabilis</i>	CBS 7347 ^T	AF189855
<i>Bulleromyces albus</i>	CBS 501 ^T	AF075500
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	CBS 8351 ^T	AF137603
<i>Cryptococcus aerius</i>	CBS 155 ^T	AF075486
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	CBS 7711 ^T	AF137601
<i>Cryptococcus albidus</i>	CBS 142 ^T	AF075474
<i>Cryptococcus amylolentus</i>	CBS 6039 ^T	AF105391
<i>Cryptococcus antarcticus</i>	CBS 7687 ^T	AF075488
<i>Cryptococcus aquaticus</i>	CBS 5443 ^T	AF075470
<i>Cryptococcus bhutanensis</i>	CBS 6294 ^T	AF137599
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	CBS 8294 ^T	AF075525
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 570 ^T	AF189834
<i>Cryptococcus dimennae</i>	CBS 5770 ^T	AF075489
<i>Cryptococcus diffluens</i>	CBS 160 ^T	AF075502
<i>Cryptococcus elinovii</i>	CBS 7051 ^T	AF137604
<i>Cryptococcus favus</i>	CBS 331 ^T	AF075497
<i>Cryptococcus friedmannii</i>	CBS 7160 ^T	AF075478
<i>Cryptococcus fuscescens</i>	CBS 7189 ^T	AF075472
<i>Cryptococcus gastricus</i>	CBS 2288 ^T	AF137600
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	CBS 7525 ^T	AF181547
<i>Cryptococcus heveanensis</i>	CBS 569 ^T	AF075467
<i>Cryptococcus himalayensis</i>	CBS 6293 ^T	AF181502
<i>Cryptococcus huempfi</i>	CBS 8186 ^T	AF189844
<i>Cryptococcus humicolus</i>	CBS 571 ^T	AF189836
<i>Cryptococcus humicolus</i>	CBS 8371	AF189854
<i>Cryptococcus hungaricus</i>	CBS 4214 ^T	AF075503
<i>Cryptococcus kuetzingii</i>	CBS 1926 ^T	AF137602
<i>Cryptococcus kuetzingii</i>	CBS 922 ^T	AF181504
<i>Cryptococcus laurentii</i>	CBS 139 ^T	AF075469
<i>Cryptococcus luteolus</i>	CBS 943 ^T	AF075482
<i>Cryptococcus macerans</i>	CBS 2206 ^T	AF189848
<i>Cryptococcus magnus</i>	CBS 140 ^T	AF181851
<i>Cryptococcus marinus</i>	CBS 5235 ^T	AF189846
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	CBS 6819 ^T	AF075481
<i>Cryptococcus skinneri</i>	CBS 5029 ^T	AF189835
<i>Cryptococcus terreus</i>	CBS 1895 ^T	AF075479
<i>Cryptococcus terricolus</i>	CBS 4517 ^T	AF181520
<i>Cryptococcus vishniacii</i>	CBS 7110 ^T	AF075473
<i>Cystofilobasidium bisporidii</i>	CBS 6346 ^T	AF189832
<i>Cystofilobasidium bisporidii</i>	CBS 6347	AF075464
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	CBS 6358 ^T	AF075465
<i>Cystofilobasidium lari-marinia</i>	CBS 7420 ^T	AF075466
<i>Cystofilobasidium feraegula</i>	CBS 7201	AF075487
<i>Cystofilobasidium infirmo-miniatum</i>	CBS 323 ^T	AF075505
<i>Fellomyces borneensis</i>	CBS 8282 ^T	AF189877
<i>Fellomyces chinensis</i>	CBS 8278 ^T	AF189878
<i>Fellomyces fuzhouensis</i>	CBS 6133	AF075506
<i>Fellomyces horovitziae</i>	CBS 7515 ^T	AF189856
<i>Fellomyces penicillatus</i>	CBS 5492 ^T	AF177405
<i>Fellomyces polyborus</i>	CBS 6072 ^T	AF189859
<i>Fellomyces sichuanensis</i>	CBS 8318 ^T	AF189879
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CBS 132 ^T	AF075484

4. Táblázat folyt. A filogenetikai anlaízisbe bevont basidiomycota élesztők és a 26S rDNS D1/D2 szekvenciáinak GeneBank azonosítói (Fell és mtsi 2000).

Törzsek	Törzsszám	D1/D2 szekvencia GeneBank azonosító
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>Bacillispora</i>	CBS 6289 ^T	AF075526
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	CBS 4736	AF075501
<i>Filobasidium elegans</i>	CBS 7640	AF181548
<i>Filobasidium floriforme</i>	CBS 6241 ^T	AF075498
<i>Filobasidium globisporum</i>	CBS 7642	AF075495
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	CBS 1730 ^T	AF075468
<i>Holtermannia corniformis</i>	CBS 6979	AF189843
<i>Kockovaella imperatae</i>	CBS 7554 ^T	AF189862
<i>Kockovaella thailandica</i>	CBS 7552 ^T	AF075516
<i>Mrakia frigida</i>	CBS 5270 ^T	AF075463
<i>Mrakia gelida</i>	CBS 5272 ^T	AF189831
<i>Naganishia globosa</i>	CBS 5106 ^T	AF181539
<i>Phaffia rhodozyma</i>	CBS 5905 ^T	AF189871
<i>Sirobasidium magnum</i>	CBS 6803	AF075475
<i>Sirobasidium intermedium</i>	CBS 7805	AF075492
<i>Sterigmatosporidium polymorphum</i>	CBS 8088 ^T	AF075480
<i>Torulopsis liquefaciens</i>	CBS 968 ^T	AF181515
<i>Torulopsis pseudoaeria</i>	CBS 4192 ^T	AF181544
<i>Tremella aurantia</i>	CBS 6965	AF189842
<i>Tremella brasiliensis</i>	CBS 6966	AF189864
<i>Tremella cinnabarina</i>	CBS 8234	AF189866
<i>Tremella coalescens</i>	CBS 6967	AF189865
<i>Tremella encephala</i>	CBS 6968	AF189867
<i>Tremella foliacea</i>	CBS 6969	AF189868
<i>Tremella fuciformis</i>	CBS 6970	AF075476
<i>Tremella globispora</i>	CBS 6972	AF189869
<i>Tremella mesenterica</i>	CBS 6973	AF075518
<i>Tremella moriformis</i>	CBS 7810	AF075493
<i>Trichosporon aquatile</i>	CBS 5973 ^T	AF075520
<i>Trichosporon asahii</i>	CBS 2479 ^T	AF105393
<i>Trichosporon asteroides</i>	CBS 2481 ^T	AF075513
<i>Trichosporon brassicae</i>	CBS 6382 ^T	AF075521
<i>Trichosporon cutaneum</i>	CBS 2466 ^T	AF075483
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	CBS 2482 ^T	AF139983
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	CBS 2478	AF189863
<i>Trichosporon domesticum</i>	CBS 8280 ^T	AF075512
<i>Trichosporon domesticum</i>	CBS 8111	AF189874
<i>Trichosporon dulcitum</i>	CBS 8257 ^T	AF075517
<i>Trichosporon faecale</i>	CBS 4828 ^T	AF105395
<i>Trichosporon gracile</i>	CBS 8189 ^T	AF105399
<i>Trichosporon guehoae</i>	CBS 8521 ^T	AF105401
<i>Trichosporon inkin</i>	CBS 5585 ^T	AF105396
<i>Trichosporon jirovecii</i>	CBS 6864 ^T	AF105398
<i>Trichosporon laibachii</i>	CBS 5790 ^T	AF075514
<i>Trichosporon loubierii</i>	CBS 7065 ^T	AF075522
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	CBS 2467 ^T	AF105392
<i>Trichosporon montevidense</i>	CBS 6721 ^T	AF105397
<i>Trichosporon mucoides</i>	CBS 7625 ^T	AF075515
<i>Trichosporon multisorum</i>	CBS 2495 ^A	AF139984
<i>Trichosporon ovoides</i>	CBS 7556 ^T	AF075523
<i>Trichosporon pullulans</i>	CBS 2532 ^T	AF105394
<i>Trichosporon sporotrichoides</i>	CBS 8246 ^T	AF189885
<i>Trichosporon veenhuisii</i>	CBS 7136 ^T	AF105400
<i>Tsuchiyaea wingi</i>	CBS 7118 ^T	AF177404
<i>Udeniomyces megalosporus</i>	CBS 7236 ^T	AF075510
<i>Udeniomyces puniceus</i>	CBS 5689 ^T	AF075519
<i>Udeniomyces pyricola</i>	CBS 6754 ^T	AF075507
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	CBS 7918 ^T	AF075496

5. Táblázat A vizsgált *C. hungaricus* törzsek, származási helyeik, és az általunk szekvenált régiók
GeneBank azonosítói.

Törzsek	GenBank azonosítók		
	D1/D2 region	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	18S rDNA
<i>Cryptococcus hungaricus</i> CBS 4214 ^T Mo., Külső-tó, J. Zsolt, 1946	AF075503	AF272014	AB032638
<i>Cryptococcus hungaricus</i> CBS 5124 <i>Lewesia pygmaea</i> virága, J.W. Fell & A. Statzell-Tallman, 1997	AF314231	AF272664	AF314232
<i>Cryptococcus hungaricus</i> CBS 6324 tengervíz, J.W. Fell & A. Statzell-Tallman, 1997	AF314233	AF272665	AF314234
<i>Cryptococcus hungaricus</i> CBS 6569 tengervíz, J.W. Fell & A. Statzell-Tallman, 1997	AF314236	AF272666	AF314235
<i>Cryptococcus hungaricus</i> CBS 6576* tengervíz, J.W. Fell & A. Statzell-Tallman, 1997	AF314238	AF272667	AF314237
<i>Cryptococcus hungaricus</i> CBS 6953 gabona, J.W. Fell & A. Statzell-Tallman, 1997	AF314240	AF272668	AF314239
<i>Bullera armeniaca</i> CBS 7091	AF189883	J.W. Fell , személyes adatközlés	-

Glicerines táptalaj	vitaminos minimál tápoldat glükóz nélkül 2% glicerín
LB tápoldat	1% trypton 0,5% élesztőkivonat 1% NaCl pH 6,5
LB táptalaj	LB tápoldat 2% agar
Protoplasztok képzéséhez használt oldatok:	
a, előkezelő oldat	10 mM Tris pH 8; 1mM EDTA
b, enzim oldat	2% csigaenzim
	0,5% Novozym
	0,8 M szorbit
Totál DNS izoláláshoz használt oldatok:	
LETS puffer	0,1 M LiCl;

10 mM EDTA;
10 mM Tris pH 8;
0,5% SDS

DNS blottoláshoz, hibridizációhoz használt oldatok:

0,25 M HCl
0,4 M NaOH
0,2 M EDTA, pH 8
4 M LiCl
20xSSC : 0,3 M Na-citrát,
3 M NaCl, pH 7

Hibridizációs puffer:

5xSSC,
0,1% N-laurylsarcosine,
0,02% SDS,
1% blocking reagents

Mosó pufferek:

- a, 2xSSC, 0,1% SDS
b, 0,1xSSC, 0,1% SDS
1. puffer 0,1 M maleinsav,
0,15 M NaCl, pH 7,5
2. Puffer 1% blocking reagents 1. pufferben
oldva
3. puffer 0,1 M Tris,
0,1 M NaCl,
50 mM MgCl₂, pH 9,5
stripping oldat 0,2 N NaOH,
0,1% SDS

Oldatok izolált mitokondriális DNS tisztításához:

- ETS1 (pH 7,5) 0,12% Tris
0,18% EDTA
15% szacharóz
ETS2 (pH 8) 0,12% Tris
0,36% EDTA

MTS (pH 7,5)	15,6% szacharóz
	0,24% Tris
	15,6% szacharóz
	0,1% $MgCl_2$
TESDS (pH 8)	3% Tris
	3,7% EDTA
	1% SDS

Nukleinsavak izolálásához és elválasztásához használt oldatok:

lizis puffer	3,33 ml 30% glükóz
	0,5 ml 1 M Tris, pH 8,0
	0,5 ml 0,2 M Na-EDTA
	0,67 ml desztillált víz
alkalikus SDS	0,5 ml 10% SDS
	0,1 ml 10 M NaOH
	4,4 ml desztillált víz
hight salt	3 M Na-acetát, pH 4,5
Fenol-kloroform-izoamilalkohol elegy	25 ml fenol
	24 ml kloroform
	1 ml izoamilalkohol
TBE puffer (1000 ml-re)	10,8 g Tris
	5,5 g bórsav
	0,75 g Na-EDTA pH 8,0
TAE puffer (5000 ml-re)	242g Tris pH 8
	57,1 ml jégecet
	18,6 g EDTA
Agaróz gél	TBE puffer
	0,7% agaróz
	1 $\mu g/ml$ etidium bromid
TE puffer	10 mM Tris
	1 mM EDTA
Loading oldat	70% glicerin
	0,1% brómfenol-kék

Kariotipizáláshoz használt pufferek, oldatok:

Tris/EDTA	50 mM EDTA
	10 mM Tris pH 7,5
LET puffer	0,5 M EDTA
	10 mM Tris pH 7,5
NDS puffer	0,5 M EDTA
	10 mM Tris
	1% N-lauryl-sarcosin pH 9,5
	1mg/ml proteináz K

Az ITS; D1/D2 régió; 18S rDNS-PCR reakcióhoz szükséges oldatok:

CORE puffer (10 reakcióra)	10-10 µl dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP és dTTP)
	50 µl 10x inkubációs puffer (500mM KCl, 100 mM Tris/HCl)
	50 µl MgCl ₂ (25mM)
	10 µl steril desztillált víz
COCKTAIL (10 reakcióra)	2,5 µl <i>Taq</i> polimeráz (5 U/µl)
	5-5 µl primer (100 µM)
	287,5 µl steril desztillált víz

500 µl-es Eppendorf-csőbe:

15,0 µl CORE puffer
30,0 µl COCKTAIL
5,0 µl templát DNS (0,02 µg/µl)

ITS-PCR-hoz használt primerek szekvenciái:

ITS-1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

D1/D2 régió PCR-hoz használt primerek szekvenciái:

F63: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'

LR3: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'

18S rDNS PCR-hoz használt primerek szekvenciái:

5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'

5'-GATCCTTCCGCAGGTTCA CC-3'

RAPD analízishez használt oldatok:

CORE puffer (20 reakcióra) 10-10 µl dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP és dTTP)

50 µl 10x inkubációs puffer

50 µl MgCl₂

10 µl steril desztillált víz

COCKTAIL (10 reakcióra) 1 µl *Taq* polimeráz (5 U/µl)

5 µl primer (10 µM)

144 µl steril desztillált víz

500 µl-es Eppendorfba összemért anyagok:

7,5 µl CORE puffer

15,0 µl COCKTAIL

2,5 µl templát DNS (0,02 µg/µl)

RAPD analízis során alkalmazott primerek szekvenciái (Operon primer kit C):

OPC-04 5'-CCGCATCTAC-3'

OPC-06 5'-GAACGGACTC-3'

OPC-08 5'-ACCTGGCCAC-3'

OPC-10 5'-TGTCTGGGTG-3'

OPC-11 5'-AAAGCTGCGG-3'

OPC-18 5'-TGAGTGGGTG-3'

Pigmentizáláshoz használt anyagok:

dietil-éter

futtató elegy (petroléter-aceton 80:20)

3.3 Vizsgálati módszerek

3.3.1. Szénforráshasznosítási vizsgálatok (Kregen-van Rij, 1987 nyomán módosítva)

A tesztekben alkalmazott szénforrások mindegyike egyedüli szénforrásként szerepelt, 0,5%-os koncentrációban minimál táptalajban. Megfelelő mennyiségű forró minimál táptalajt öntöttünk steril lombikba, amelybe már beletettük a tesztelendő vegyület sterilre szűrt oldatát. Miután jól elkevertük, kiöntöttük Petri-csészékbe, mindegyikbe ugyanannyi

mennyiséget (20 ml). A közeg kémhatása mindig pH 5-6 között volt. Csészénként 6 törzset oltottunk le csíkhúzással sejtszuspenzióból, majd 20°C-on inkubáltunk. A törzsek növekedését 4, 7 és 14 nap után hasonlítottuk össze a szénforrás nélküli kontrol csészén, illetve a glükóz-tartalmú táptalajon mutatott növekedésükkel.

3.3.2. Mitokondriális DNS izolálás (Láday és mtsi, 2001 nyomán)

A törzseket 100 ml 2xYPD-ben, nagy mennyiségben (minimum 1000 ml) 18°C-on 72 órán keresztül 200 rpm-mel rázatva tenyésztettük. A sejteket 3000 rpm-es centrifugálással gyűjtöttük össze, hideg ETS-1 oldattal mostuk, majd ETS-1-ben szuszpendáltuk. A sejtszuspenziót 5-ször 30 mp-ig "Bead-Beater"-rel (Biospec. Products, USA) homogenizáltuk, közben 1-1 perc szünetet tartva, mindvégig hűtött körülmények között, ezt követően 3000 rpm-mel 20 percig centrifugáltuk a sejttörmeléket. A felülúszót szűrtük (nejlonszűrő, lyukátmérője 60 μ m), majd 40 percig 12000 rpm-mel centrifugáltuk. Az így összegyűjtött mitokondriumokat tartalmazó csapadékot 30 ml MTS-ben szuszpendáltuk és 0,2 mg/ml DNáz-zal 4°C-on 90 perces inkubáció során a szennyező nukleáris DNS-t eltávolítottuk. 80 ml ETS-2-vel leállítottuk a reakciót és a mitokondriumokat 15 percig 18500 rpm-mel 4°C-on centrifugálva összegyűjtöttük. A mitokondriumok líziséhez 2 ml LETS pufferben szuszpendáltuk fel a pelletet és 65°C-on 15 percig kezeltük. Ezt követően a mintát kétszer fenoloztuk azonos térfogatnyi fenollal (PCI) és egyszer kloroformoztuk (CI). A vizes fázisból a mtDNS-t kétszeres térfogatú absz. etanollal kicsaptuk, majd 10 perces 12000 rpm-mel 4°C-on történő centrifugálással összegyűjtöttük. A csapadékot vákuumban szárítottuk, majd 1 ml 5 μ g/ml RNáz tartalmú TE-ben szuszpendáltuk. A RNáz kezelést 60 percig 37°C-on végeztük. Ezt követte egy fenolos (PCI)-os kezelés és egy kloroform/izoamilalkohol extrakció. A vizes fázisból a DNS-t absz. etanollal kicsaptuk, a csapadékot 70%-os etanollal kétszer mostuk és vákuum alatt beszárítottuk. A DNS-t 100 μ l TE-ben vettük fel és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.3.3. Totál DNS izolálás (Leach és mtsi, 1986 nyomán, módosítva)

0,2g liofilizált sejtet dörzsmozsárban alaposan elporítottunk majd 2 ml LETS pufferrel alaposan vortexeltünk, majd 2 ml fenolt (PCI) adtuk hozzá, és a vortexelést követően 10 percig 3000 rpm-el centrifugáltuk. A DNS-t kétszeres térfogatnyi etanollal kicsaptuk, 5 perces 3000 rpm-es centrifugálás után a csapadékot vákuumban beszárítottuk, és 0,7 ml TE pufferben vettük fel. Kétszer PCI-vel, majd egyszer kloroform-izoamilalkohol

24:1 arányú elegyével extraháltuk. A vizes fázist Eppendorf-csőbe vittük, kétszeres térfogatnyi etanollal kicsaptuk, beszárítottuk, és 100 µl TE-ben felvettük a beszárított DNS-t. A DNS-preparátumokat -20°C-on tároltuk felhasználásukig.

3.3.4. Restrikciós térképek készítése Hamari és mtsi (1999) alapján

A restrikciós térképezéshez a Hamari és mtsi által kifejlesztett módszert használtuk. Ez alapján az izolátumok mitokondriális DNS-ének térképezését **A** és **B** enzimmel történő preparatív emésztéssel kezdtük. Az így kapott mtDNS fragmentumok DNS tartalmának visszaizolálását követően **B** és **A** enzimekkel történt reciprok emésztéssel tudtuk végrehajtani (Hamari és mtsi 1999). Az **A** és **B** fragmentek sorrendiségének meghatározásához az alábbiak szerint jártunk el: agaróz gél egyik oldalára felvittük az izolált **A** fragmentumok **B**-vel emésztett mintáit, a másik oldalára az izolált **B** fragmentumok **A**-val emésztett mintáit, a gél közepére pedig a térképezendő izolátum mtDNS-ének **A**-val, **B**-vel szimpla emésztett és **A/B**-vel kettősemésztett mintáit vittük fel kontrolként, egy DNS molekulásúly marker kíséretében. Ezt követően 1%-os agaróz gélen elektroforézist hajtottunk végre, közben korai, közepes és késői futási stádiumokban dokumentáltuk az elektroforetikus képet. Mivel tudtuk hogy a kettős emésztési képben minden a gélen szereplő fragmentnek meg kell jelennie, illetve a reciprokemésztés során létrejött sávokat összevetve vizuális módon összeállíthatóvá vált a DNS fizikai térképe. A vizuális "fragment összeolvasás" mellett szükség volt az adott fragmentek méretének pontos meghatározására is. A méret-meghatározást a "GelBase/GelBlot Pro" (Ultra Violet Product Ltd) gélelemző szoftver segítségével állapítottuk meg. Az egyes izolátumok mtDNS-ének valós mérete kivétel nélkül a restrikciós térképek szerkesztésekor határozható meg, ugyanis a nagy méretű fragmentek meghatározásakor adódott tévedések kiküszöbölődnek.

3.3.5. Nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel, méretük meghatározása

A nukleinsavak elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk (Sambrook és mtsi 1989). A fragmentek méretének meghatározását a "GelBase/GelBlot Pro" (Ultra Violet Product Ltd) gél dokumentáló- és kiértékelő szoftver segítségével végeztük.

3.3.6. DNS izolálása agaróz gélből

A visszaizolálni kívánt DNS-t 1%-os TAE-t tartalmazó gélben megfuttatjuk preparatív mennyiségben (20-100 µl). UV fény alatt a kívánt DNS sávot kivágjuk a gélből.

Az agaróz blokkot szike segítségével apróra daraboljuk, majd egy töltéssel nem rendelkező vattagolyót tartalmazó félbevágott Eppendorf-csőbe helyezzük. A felezett cső végén kis átmérőjű lyukat szúrunk. Ezt követően belehelyezzük egy másik, egész Eppendorf-csőbe, melynek a záró kupakját eltávolítottuk (a centrifugálás során akadályozna). A következő lépésben centrifugáljuk, eleinte kis fordulatszámmal (3000 rpm) 2 percig, majd fokozatosan elérjük a 12000 rpm-et. 10 perces centrifugálás után az alsó egész Eppendorf-csőben összegyűlt folyadékhoz tized térfogatnyi 3M-os Na-acetátot adunk, majd abszolút etanollal kicsapjuk a DNS-t. 60 perces -20°C -on történő inkubálás után 10 percig 12000 rpm-mel centrifugáljuk. A keletkező pelletet 70%-os etanollal mossuk, majd vákumban szárítjuk, végül 10 μl TE-ben szuszpendáljuk.

3.3.7. DNS blottolás és hibridizáció

Kísérleteinkben a digoxigenines DNS jelölő és detektáló készletet (DIG DNA Labeling and Detection Kit- Roche) használtuk. A DNS jelölést és a hibridizálást a gyártó instrukciói alapján végeztük el.

DNS jelölés:

15 μl templát DNS oldatot (0,5-3,0 μg DNS) 1500 μl -es Eppendorf csőbe tettünk, a DNS-t 10 percig forró vízben történő hőkezeléssel denaturáltuk. A denaturálást követően jégen hirtelen lehűtöttük a mintát, majd 2 μl hexanukleotid keveréket (5. cső), 2 μl dNTP keveréket (6. cső) és 1 μl Klenow enzimet (7. cső) adtunk hozzá. A mintát összekevertük, centrifugáltuk és 12 órán keresztül 37°C -on inkubáltuk. A jelölési reakciót 2 μl 0,2 M EDTA (pH 8,0) oldattal állítottuk le. A jelölt DNS-t 2 μl 4M LiCl és 75 μl előhűtött etanol hozzáadásával kicsaptuk, és fél órára -70°C -ra tettük. A mintát 15 percig centrifugáltuk, a csapadékot 50 μl etanollal mostuk. A DNS-t vákuum alatt beszárítottuk és 50 μl TE-ben vettük fel. A jelölt DNS mennyiségének meghatározását a gyártó instrukciói alapján végeztük el.

Southern-blot:

Az agaróz gélben a DNS fragmentumokat 0,25 M sósavban 10 percig enyhe rázatással depurináltuk, majd a gél 3-4-szer desztillált vízben mostuk. A blottoláshoz az alkalikus transzfer módszerét alkalmaztuk (ehhez 0,4 M NaOH oldatot használtunk). A DNS-t 12 órás kapilláris blot segítségével Hybond N+ membránon (Amersham) rögzítettük. A membránt $2\times\text{SSC}$ -ben 10 percig mostuk. Ezt követően UV fényben másfél perc alatt a DNS fragmenteket a membránra sütöttük. A membránt hibridizációs csőbe helyeztük és 100 cm^2 membránra 20 ml 68°C -ra előmelegített hibridizációs puffert mértünk. A 68°C -os

hibridizációs kamrában végzett 1 órás előhibridizáció után a hibridizációs puffert a membránról leöntöttük és 2,5 ml/ 100 cm² jelölt DNS próbát tartalmazó hibridizációs puffert tettünk a csőbe (a próbát előzőleg 15 percig tartó forralással denaturáltuk és jégen hirtelen lehűtöttük). 12 órás 68°C-on végrehajtott hibridizációt követően a következő lépéseket végeztük el egyenletes forgatás mellett:

1. A membránt 2×5 percig mostuk szobahőmérsékleten 50 ml/100 cm² membrán 2×SSC+0,1%SDS oldattal.
2. A membránt 2×15 percig mostuk 68°C-on 50 ml/100 cm² membrán 0,1×SSC+0,1%SDS oldattal.
3. A membránt 1 percig mostuk 100 ml/100 cm²-nyi 1. pufferrel szobahőmérsékleten. Ezt követően minden lépést szobahőmérsékleten hajtottunk végre.
4. A membránt 30 percig inkubáltuk 100 ml/100 cm²-nyi 2. pufferrel.
5. Antitest konjugátumból (8. cső) 2. pufferrel hígítást készítettünk úgy, hogy 75 mU/ml legyen az oldat koncentrációja. Az antitest oldatból 20 ml/100 cm²-nyi mennyiséget tettünk a membránra, és 30 percig inkubáltuk konstans forgatás mellett.
6. A membránt 2×15 percig mostuk 100 ml/100 cm²-nyi 1. pufferrrel.
7. A membránt 2 percen keresztül 20 ml/100 cm²-nyi 3. pufferrel mostuk.
8. Festékoldatot készítettünk a következők szerint: 10 ml 3. pufferbe 45 µl NBT-oldatot (9. cső) és 35 µl X-foszfát oldatot (10. cső) tettünk. A membránt zárható fóliába tettük és 10 ml/100 cm²-nyi festékoldatot adtunk hozzá. A festéket egyenletesen eloszlattuk a membránra és a fóliát lezártuk. A színreakció néhány perc múlva megindult és min. 16 órán belül befejeződött. A reakció leállítására a membránt 5 percre 50 ml desztillált vízbe vagy TE-be helyeztük.

3.3.8. RAPD analízis

A RAPD reakciók összeállítását Hu és Quiros (1991), valamint Williams és munkatársai (1990) szerint végeztük.

A már ismertetett reakcióelegyet elkevertük, majd 30 µl ásványi olajat mértünk rá, és betettük a PCR készülékbe (MJ Research Inc), melyet 45 ciklusra programoztunk. Egy ciklus a következő lépésekből állt:

1 perc 92°C-on (denaturáció), 1 perc 35°C-on ("annealing"), 2 perc 72°C-on (elongáció).

Az amplifikált DNS-t 1% agaróz gélben választottuk el, és UV fényben fotóztuk.

3.3.9. ITS, D1/D2 régió, 18S rDNS PCR- ITS régió RFLP

Táptalajok, tápoldatok és egyéb oldatok című fejezetben leírtak alapján összemért elegyeket összekevertük és a reakcióelegyek tetejére 50-50 µl ásványi olajat tettünk. A mintákat a PCR készülékbe helyeztük (MJ Research Inc) és a következő lépésekből álló programot hajtottuk végre:

1. lépés: 5 perc, 95°C- denaturálás
2. lépés: 2 perc, 40°C- "annealing"
3. lépés: 3 perc, 72°C- elongáció
4. lépés: 1 perc, 95°C- denaturálás
5. lépés: 2 perc, 40°C- "annealing"
6. lépés: 3 perc, 72°C- elongáció
7. lépés: a 4., 5., 6. lépésből álló ciklus ismétlése 4-szer
8. lépés: 1 perc, 95°C- denaturálás
9. lépés: 2 perc, 55°C- "annealing"
10. lépés: 3 perc, 72°C- elongáció
11. lépés: a 8., 9., 10 lépésből álló ciklus ismétlése 24-szer
12. lépés: 5 perc, 72°C- elongáció

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel, 1,5%-os agaróz gélben, 1×TAE pufferben választottuk el.

Az RFLP analízisben 1500 µl-es Eppendorf-csőbe a következő reakcióelegyet mértük össze 20 µl végtérfogatra:

- 5 µl az amplifikált DNS-t tartalmazó PCR elegyből
- 2 µl 10×enzimpuffer
- 12 µl steril desztillált víz
- 1 µl enzim (6-12 U/µl)

Az emésztéseket 2 órán keresztül, 37°C-on végeztük (kivéve a *TaqI* enzimes emésztéseket, melyeket 65°C-on, paraffinolaj alatt végeztünk). A reakciót követően 5 µl brómfenolkéket tartalmazó glicerindatát adtuk a mintákhoz. Az emésztett DNS fragmenteket 1,5% agaróz gélben választottuk el.

3.3.10. Kariotipizálás CHEF rendszerrel

Protoplaszt készítés: A sejteket 2xYPD-ben neveltük 72 órán át, majd a tenyészetből 10 ml-t vittünk át 100 ml 2xYPD-t tartalmazó lombikba, 24 óráig növesztettük 18°C-on, a felfrissített tenyészetből 20 ml-t oltottunk 100 ml 2xYPD-s tápoldatba, majd 3 óráig 200 rpm-mel rázattuk 18°C-on. A tenyészetet rövid centrifugálással ülepitettük, majd 5 ml előkezelő oldatban szuszpendáltuk, az oldathoz tized térfogatnyi β -merkaptotanol-t is adtunk, 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Három perces 12000 rpm-mel történt centrifugálást követően protoplasztáló enzimoldatban szuszpendáltuk a sejteket, az inkubációs idő 3 óras volt. A protoplasztálást követően a plasztokat centrifugálással (3000 rpm) ülepitettük, majd 0,8 M szorbittal háromszor mostuk. A protolasztokat (4×10^8 protopaszt/ml) 1 ml Tris/EDTA pufferben szuszpendáltuk, majd centrifugálással ülepitettük, ezt a lépést háromszor megismételtük, majd 150 μ l Tris/EDTA-ban felvettük.

Agarózblokk készítés: Az előkészített protoplasztokat alacsony olvadáspontú agarózzal (SIGMA) (1,4 %) 0,8 M szorbit jelenlétében elegyítettük, ezután agarózblokk készítő formába öntöttük. Dermedés után 1 ml LET puffert adtunk hozzá 37°C-on 10 órát inkubáltuk. A továbbiakban a blokkokról a puffert lecseréljük 1 ml NDS-re. 24 óráig 50°C-on inkubáljuk. Befejező lépésként Tris/EDTA oldatban 4-szer mossuk a blokkokat. 4°C-on Tris/EDTA pufferben tároljuk.

CHEF futtatási jellemzők: A futtatást 1%-os agaróz gélben (0,5% TBE-ben oldva) végeztük, CHEF-DRTM II, BIO-RAD készülékkel.

3.3.11. Petite mutáció indukálása, mutánsok izolálása

A törzseket 72 óra előtenyésztést követően frissítettük 24 óráig 2xYPD tápoldatban, majd különböző koncentrációjú EtBr (etidium-bromid)-ot tartalmazó tápoldatba oltottuk úgy, hogy a 10 ml 2xYPD-tartalmazó tápközegeben 10^6 db sejtet tartalmazzon milliliterenként. 48 órás 18°C-on történt inkubáció után a tenyészetből 10-20-50 μ l-t malátás tápagarra szélesztetünk. 3 hetes inkubációt követően az egyedi telepeket csíkhúzással glicerint tartalmazó táptalajra vittük és 14 napig inkubáltuk. A petite mutánsok, sérült mitokondriumuk miatt a nem fermentálható szénforrást tartalmazó táptalajon nem képesek a növekedésre.

3.3.12. Színanyag vizsgálata vékonyréteg kromatográfiával

A sejteket 500 ml-es lombikban 100 ml 2xYPD-ben 72 óráig 20°C-on előneveltük. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, majd egy éjszakán át vákuumban szárítottuk. A

száraz terméket dörzsmozsárban üveggörrel eldörzsöltük, majd kémcsőbe töltöttük. A porra 1,5 ml dietil-étert rétegeztünk, majd óvatosan összeráztuk a keveréket Eppendorf-csőbe pipettáztuk, majd hűtött körülmények között centrifugáltuk. A felülúszót lepipettáztuk, felhasználásig hűtőben tároltuk. A vékonyréteg-analízishez fóliára vitt gélt használtunk (Merck 5553), az alapvonal bejelölése után futtatókádban 60 percig inkubáltuk. A kapott gélt vizuálisan értékeltük napfénynél és UV alatt.

3.3.13. Filogenetikai analízis

A D1/D2 régió és a 18S rDNS egy területének szekvenciaadatait hasonlítottuk össze filogenetikai szempontból, a vizsgálatba bevontuk a Hymenomycetidae alosztály Tremellales rendjébe tartozó élesztőket (4. táblázat). A filogenetika elemzéseket a PHYLIP szoftvercsomaggal végeztük (Felsenstein 1995). A szekvenciaadatokat összerendezését *“align”* manuálisan ellenőriztük, az elemzéshez az *“outgroup rooting”* külső összehasonlító eljárást alkalmaztuk ahol az *“outgroup”* az összehasonlító fél *Rhodotorula* sp. volt. A parszimónia analízis során a DNAPARS programot alkalmaztuk. A belső elágazások valószínűségének mértékét a *“bootstrap”* értéket 1000 ismétléssel határoztuk meg a SEQBOOT, DNAPARS, CONSENSE programok segítségével. A távolsági mátrixok a Kimura két paraméteres modellt (Kimura 1980) felhasználó DNADIST program felhasználásával kerültek kiszámításra. A SOAP (Stability Of Aligned Positios) program segítségével elemeztük a szekvenciák összerendezettségének *“alignment”* stabilitását (Löytynoja és Milinkovich előkészületben).

3.3.14. Elektronmikroszkópiai vizsgálatok

A mintaelőkészítést a Lang és Mitani (1970) által leírt spontán-adszorpciós technika alapján végeztük. A mintákat palládiummal árnyékoltuk, a vizsgálatokat TESLA BS 500 transzmissziós elektronmikroszkóppal végeztük. A DNS molekulák hosszát kurviméter segítségével határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

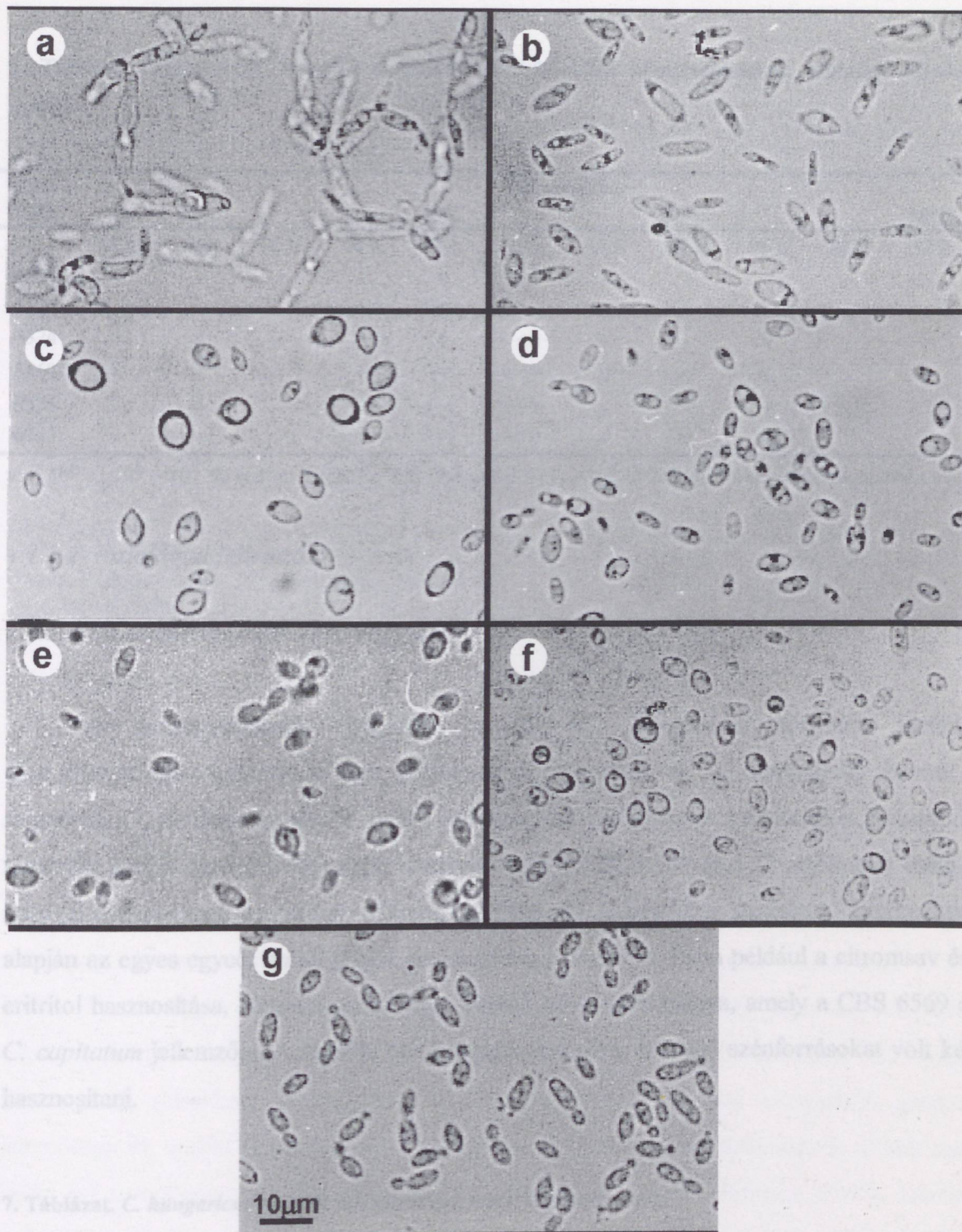
4.1. *Cryptococcus hungaricus* intraspecifikus variabilitásának vizsgálata

4.1.1. Morfológiai, fiziológiai és biokémiai jellemzők

4.1.1.1. Morfológiai vizsgálatok

Az *C. hungaricus* törzsek morfológiáját, növekedési sebességét különböző táptalajokon, különféle hőmérsékleteken tanulmányoztuk (6. táblázat). A törzsek morfológiája egymástól igen eltérő volt. Fénymikroszkópos képüket a 3. ábra mutatja. Három izolátum (CBS 6324, 6576 és 6953) azonos megjelenést mutatott. Ezen izolátumok sejtjei ovális jellegűek, ellentétben a típustörzsével, amelyek jellegzetesen megnyúlt, hosszúkás képet mutatnak. A sarjsejtek rövid nyakkal kapcsolódnak az anyasejthez, illetve a fiatal tenyészetekben viszonylag nagyszámú ovális forma is megtalálható. A CBS 6569-es izolátum sejtjei nagymértékben különböztek a többi *C. hungaricus* törzstől, azonban hasonlóságot mutattak a *Cystofilobasidium capitatum* azonos körülmények között tenyésztett sejtjeivel. Mindkét mintára jellemző a kissé megnyúlt, lekerekített végű sejtforma, illetve a nagyfokú méretbeli heterogenitás. Egyedi megjelenésű sejtképet tapasztaltunk a CBS 5124-es törzs esetében is, ahol a kissé megnyúlt sejtek csúcsban végződnek, és a sarjsejtek gyakran az anyasejtekkel együtt maradnak.

A különböző táptalajokon, különböző hőmérsékleteken tenyésztett törzsek közül szinte valamennyi gyorsabban növekedett 2xYPD-n, mint YPD-n illetve Malátás-oxidon. A legtöbb törzs számára a 20°C-os hőmérséklet volt a legmegfelelőbb, de a törzsek jelentős része 25°C-on is nőtt (6. táblázat). Ez összhangban van a faj psychrophil jellegével. A törzsek egy része eltérő növekedési sajátosságokkal rendelkezett más-más hőmérsékleten. A CBS 4214^T számú csak 20°C-on nőtt, 10°C és 25°C-on egyáltalán nem szaporodott. A törzsek egyike sem növekedett 30°C-on. A CBS 6569-es izolátum azonban 10°C-os inkubációs hőmérsékleten is szaporodott, azonban ebben az esetben a karotenoid termelés visszaszorult, és a telepek színe kevésbé intenzív volt.



3. ábra *C. hungaricus* törzsek és a *C. capitatum* fénymikroszkópos képe (a: CBS 4214^T; b: CBS 5124; c: CBS 6324; d: CBS 6596; e: CBS 6576; f: CBS 6953; g: *Cystofilobasidium capitatum*)

6. Táblázat *Cryptococcus hungaricus* izolátumok különböző hőmérsékleteken mutatott növekedési profilja.

törzs CBS	Hőmérséklet											
	10°C			20°C			25°C			30°C		
	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
4214	-	-	-	-	v	+++	-	-	-	-	-	-
5124	-	-	-	+	++	+++	-	+	++	-	-	-
6324	-	-	-	-	v	+++	-	-	v	-	-	-
6569	-	+ ^{fh}	++ ^{fh}	+	++	+++	v	v	v	-	-	-
6576	-	-	-	+	++	+++	-	+	+	-	-	-
6953	-	-	-	+	++	+++	-	v	+	-	-	-

v: < 10⁶ +: 10⁶ – 10⁷ db sejt/ml ++: 10⁷ – 10⁸ db sejt/ml +++: > 10⁸ db sejt/ml fh: kevésbé pigmentált sejtek

4.1.1.2. Fiziológiai jellemzők

4.1.1.2.1. Szénforráshasznosítás vizsgálata

A szénasszimiláció vizsgálatát a hat *C. hungaricus* törzsnél, illetve a *Cystofilobasidium capitatum* egy izolátumánál végeztük el. A vizsgálatba bevont 22 szénforrás (7. táblázat) közül 19 hasznosításában tudtunk jellegzetes eltéréseket kimutatni (8. táblázat). Ennek mértéke különösen kifejezett volt a CBS 6569 és a *C. capitatum* esetében, amelyek spektrumai jelentősen eltértek a többi *C. hungaricus* törzsétől. Eredményeink alapján az egyes egyedi szénforrások hasznosítása jellegzetes. Ilyen például a citromsav és az eritritol hasznosítása, illetve a melibiózon történő növekedés hiánya, amely a CBS 6569 és a *C. capitatum* jellemzője. A további öt *C. hungaricus* törzs hasonló szénforrásokat volt képes hasznosítani.

7. Táblázat. *C. hungaricus* törzsek vizsgálatában tesztelt szénforrások.

Minden izolátum által egyformán hasznosított szénforrások	szacharóz; raffinóz; maltóz;
Különböző mértékben hasznosított szénforrások	arabinóz cellobióz; citromsav; eritritol; galaktóz; glicerol; inozitol; laktóz; mannitol; melibióz; ramnóz; ribitol; ribóz; keményítő; szorbóz; xilóz
Egyetlen izolátum által sem hasznosított szénforrások	xilán; myo-inozit; glükoronsav

8. Táblázat *C. hungaricus* törzsek szénforráshasznosítási profilja

Törzs	Ar	Cb	Cs	Er	Ga	Gl	In	La	Ma	Mn	Me	Ra	Rm	Ri	Rb	vk	Szo	Sza	Xi
CBS 4214 ^T	+	+	-	-	V	V	V _S	-	+	V	+	+	V	V	V	V	-	+	V
CBS 5124	V	V	V	-	V	V	V	-	+	V	-	+	+	-	V	V	-	+	+
CBS 6324	+	+	-	-	+	V	-	V	+	V	+	+	V	-	V	V	V	+	+
CBS 6576	+	+	-	-	+	V	V	V	+	+	+	+	+	V	+	V	V	+	+
CBS 6953	+	V	-	-	+	V	V	-	+	+	-	+	V	V	+	V	-	+	+
CBS 6569	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>C. capitatum</i>	V	+	+	V	+	+	+	+	*	+	-	*	+	+	+	+	+	*	*

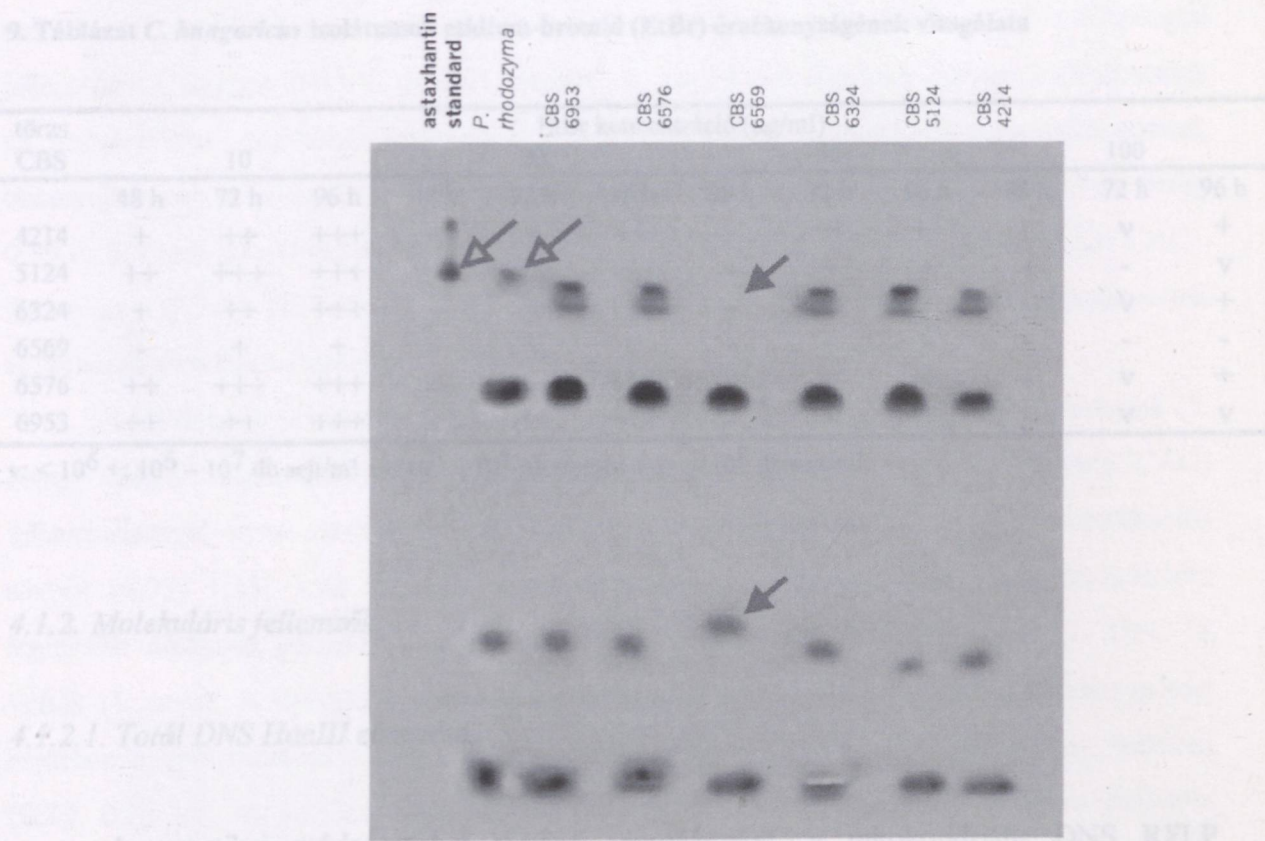
Ar: Arabinóz, Cb: Cellobióz, Cs: Citromsav, Er: Eritritol, Ga: Galaktóz, Gl: Glicerol, In: Inozitol, La: Laktóz, Ma: Maltóz, Mn: Mannitol, Me: Melibióz, Ra: Raffinóz, Rm: Ramnóz, Ri: Ribitol, Rb: Ribóz, vk: vízdoldékony keményítő, Szo: Szorbóz, Sza: Szacharóz, Xi: Xilóz
v: gyenge, s: lassú, *: nem tesztelt

4.1.1.3. Biokémiai sajátosságok

4.1.1.3.1. Karotenoid tartalom vizsgálata

A basidiomycota élesztők iránti növekvő érdeklődés elsődleges oka, hogy a mikroszkopikus gombák között egyedülálló módon az ide tartozó *Phaffia rhodozyma* fő színanyagként asztaxantint (3,3'-dihidroxi-4,4'-dioxo-karotin) szintetizál (Andrewes és mtsi, 1976). Ez a vegyület a természetben viszonylag ritkán előforduló pigment, bár néhány édesvízi, illetve tengeri algában is megtalálható. A mikroszervezeteken kívül egyes madarakban, rákokban, pisztrángban és lazacban fordul elő. Az asztaxantin gazdasági jelentősége ez utóbbi előfordulással kapcsolatos. A mesterséges körülmények között nevelt lazac évi mennyisége ma már több mint 200.000 tonna (An és Johnson 1990), amelynek nélkülözhetetlen, ugyanakkor legdrágább takarmány kiegészítője az asztaxantin. Bár szintetikusan is előállítható, de rendkívül drágán, ráadásul a fogyasztói elvárásoknak jobban megfelel egy természetes eredetű színezőanyag. Az asztaxantin igen jó antioxidáns tulajdonsága (Schroeder és Johnson, 1993) tovább fokozta a vegyület iránti érdeklődést. Mivel a törzs számos tagja termel karotenoid típusú színanyagot így a biokémiai karakterizálás egyik lépéseként a sejtek színanyag kivonatát vékonyrétegen választottuk el (4. ábra). *P. rhodozyma* asztaxantin standardot használva megállapítottuk, hogy a *C. hungaricus*

izolátumok által termelt színanyag nem 3,3'-dihidroxi-4,4'dioxo- β -karotin. A profilok öt *C. hungaricus* esetében azonosnak bizonyult, azonban a CBS 6569-es törzs mintázata eltérő volt. Az egyes komponensek biokémiai elemzése további adatokat szolgáltatna a törzsek jellemzésére.



4. ábra *C. hungaricus* izolátumok színanyag spektruma $\blacktriangle$: astaxanthin; $\blacktriangleright$: hiányzó, vagy eltérő komponensek

4.1.1.3.2. Etídium-bromid (EtBr) érzékenység vizsgálata

Az etídium-bromid érzékenységében jelentős eltéréseket sikerült detektálnunk az egyes izolátumok között. A különbség esetenként nemcsak a különböző koncentrációk alkalmazásában, hanem az egyes törzsek között is kifejezett volt. A CBS 6569-es törzs minden tekintetben eltért a másik öt izolátumtól. A 9. táblázat adatai jól ábrázolják ezt a különbséget. Az erősen mutagén, interkaláló vegyület hatására mutációk keletkeznek a mitokondriális DNS állományában, így az EtBr kiválóan alkalmas petite mutánsok előállítására. Kísérleti rendszerünkben 20-30-50-100 $\mu\text{g/ml}$ EtBr tartalmú tápoldatban neveltük a sejteket. Eredményeink szerint, öt izolátum a rendkívül magas 100 $\mu\text{g/ml}$

koncentrációban jelenlévő mutagént is tolerálta, a CBS 6569-es törzs növekedését viszont már a 20 µg/ml-es koncentrációban jelenlévő EtBr erősen gátolta. Petite mutánsok tesztelése során, a nem fermentálható szénforrást tartalmazó táptalajon történő nevelés során bebizonyosodott, hogy valamennyi törzs petite negatív.

9. Táblázat *C. hungaricus* izolátumok etídium-bromid (EtBr) érzékenységének vizsgálata

törzs CBS	EtBr koncentráció (µg/ml)											
	10			20			50			100		
	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
4214	+	++	+++	+	+	++	-	+	++	-	v	+
5124	++	+++	+++	+	++	+++	-	+	+	-	-	v
6324	+	++	+++	-	+	+++	-	+	+	-	v	+
6569	-	+	+	-	V	v	-	-	-	-	-	-
6576	++	+++	+++	+	++	+++	-	v	+	-	v	+
6953	++	++	+++	+	++	+++	-	-	+	-	v	v

v: < 10⁶ +: 10⁶ – 10⁷ db sejt/ml ++: 10⁷ – 10⁸ db sejt/ml +++: >10⁸ db sejt/ml

4.1.2. Molekuláris jellemzők

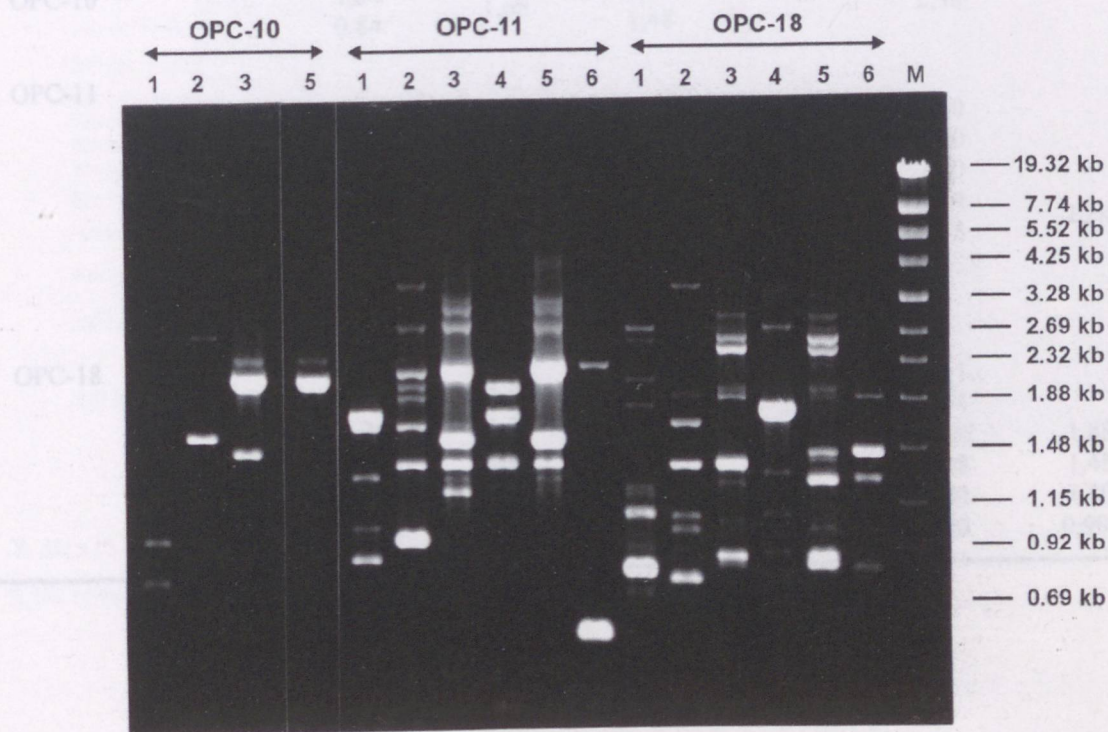
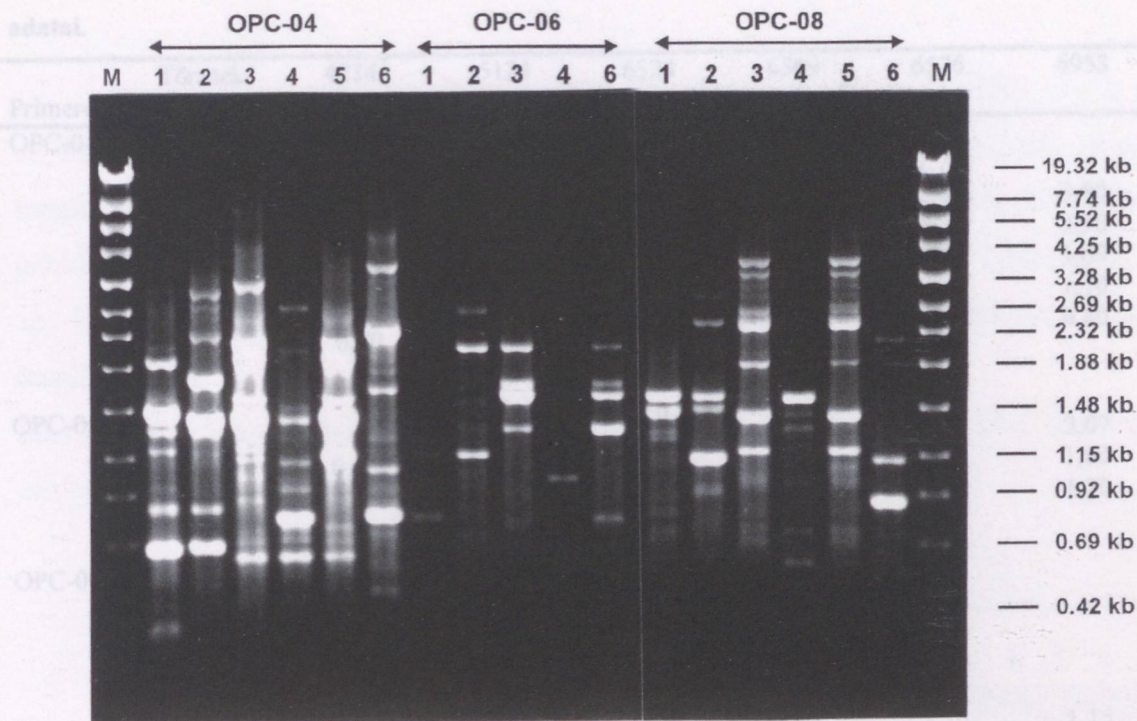
4.1.2.1. Totál DNS HaeIII elemzése

A genetikai módszerekkel történő vizsgálatokat, a mitokondriális DNS RFLP vizsgálatát egy, a fonalgombáknál jól ismert jelenség felhasználásával kezdtük el. Ismeretes hogy a fonalgombák körében a magi és mitokondriális DNS bázisösszetétele eltérő. A fonalgombák egy részére AT gazdag mitokondriális genom jellemző (Hudspeth, 1992), szemben a GC gazdag nukleáris DNS állománnyal. Míg *HaeIII* (felismerő helye: 5'-GG/CC-3') emésztéssel a sejtmagi DNS teljesen felaprózódik, addig a mtDNS-ben az enzim csak néhány helyen tud hasítást végezni. Totál DNS *HaeIII* emésztését követő agaróz gélelektroforetikus elválasztás során a sejtmagi eredetű DNS állomány frontközelbe fut, a mitokondriális DNS pedig az alkalmazott általános DNS molekulasúly markerekkel összevethető néhány fragmentum formájában jelenik meg. Esetünkben azonban nem így történt, a *Cryptococcus hungaricus* totál DNS mintáinak emésztési képén nem különült el egymástól a magi, illetve a mitokondriális DNS állománya. Az azonban jól kitűnt, miszerint a hat izolátum közül mindössze kettő (CBS 6324, CBS 6576) mutat hasonlóságot, a többi minta eltérő volt.

4.1.2.2. RAPD elemzés

RAPD-PCR eljárással nyert molekuláris markerek vizsgálatát is elvégeztük, hogy további adatokat nyerjünk a *C. hungaricus* intraspecifikus variabilitásának jellegéről és mértékéről (a RAPD markerek sokkal inkább neutrálisnak tekinthetők, mint a fiziológiai jellemzők). Összesen 20 OPC primert teszteltünk, ezek közül 6 primer bizonyult alkalmasnak az iterspecifikus variabilitás kimutatására. Az eredmények stabilnak és reprodukálhatónak bizonyultak ebben az esetben. Az amplifikált fragmentek száma 1 és 10 között, mérete pedig 0,39 és 3,95 kb között változott. Az OPC-12 (TGTCATCCCC), OPC-20 (ACTTCGCCAC), illetve az OPC-05 (GATGACCGCC) primerekkel végzett kísérletek nem eredményeztek egyetlen detektálható amplifikációs terméket sem.

A különböző primerekkel nyert mintázatok nagy mértékű polimorfizmust mutattak (5. ábra). Nem tapasztaltunk azonban különbséget az OPC-01 (TTTCGAGCCAG) felhasználásával nyert markerek esetében; mind a hat izolátum azonos, 3 amplifikációs sávból (0,95; 1,25; 1,88 kb) álló mintázatot adott. A polimorfikus jelleg vizsgálatára leginkább alkalmas primerek az OPC-04; OPC-06; OPC-08; OPC-10; OPC-11; OPC-18 voltak (5. ábra). A típustörzs (CBS 4214^T) illetve a CBS 5124-es izolátum minden primer esetében egyedi mintázatot mutatott, kivéve két azonos sávot az OPC-04 primer esetében (0,70; 0,85 kb) és az OPC-08 alkalmazásakor (1,45; 1,5 kb). A CBS 6324-es izolátum mintázata teljesen eltérő volt a típustörzstől, azonban az OPC-08 alkalmazásakor teljesen azonosnak bizonyult a CBS 6576-os törzsével. Ez a két izolátum számos azonos sávot adott az OPC-04; OPC-11 és az OPC-18 primerekkel történő amplifikálás során. Az OPC-10-es primer alkalmazásakor a két izolátum mindössze egy 1,43 kb méretű termék meglétében illetve hiányában tért el egymástól, ez a primer általában nem adott amplifikátumot a többi *C. hungaricus* izolátumnál, kivéve az 5124-es törzs esetét, ahol egy 1,65 kb méretű DNS fragment jelent meg. A RAPD fragmentek méreteit a 10. táblázat foglalja össze.



5. ábra. *C. hungaricus* izolátumok amplifikációs mintázata 1: CBS 4214^T, 2: CBS 5124, 3: CBS 6324, 4: CBS 6569, 5: CBS 6576, 6: CBS 6953, M: λ PUC-Mix molekulásúly marker Fermentas.

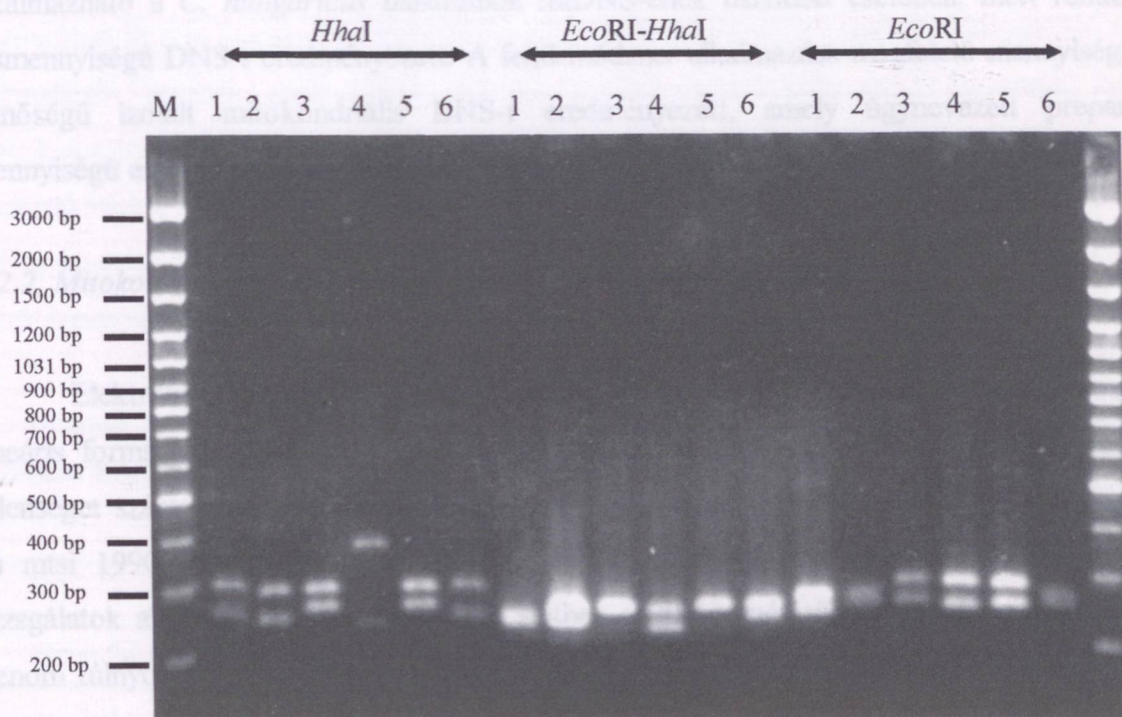
10. Táblázat *C. hungaricus* izolátumok RAPD-PCR eljárással létrehozott mintázatának fragmentumhossz adatai.

Primerek	Törzsek	4214 ¹	5124	6324	6569	6576	6953
Fragmentum méretek (kb)							
OPC-04			3,20	3,40		3,40?	
		1,89	2,69	2,70		2,70	
		1,49	1,70	2,40		2,40	3,90
		1,40	1,45	1,79		1,79	3,50
		1,20	1,43	1,70		1,70	1,69
		0,85	0,85	1,28	1,15	1,28	1,10
		0,70	0,70	0,98	0,80	0,98	0,80
				0,59	0,59	0,59	
OPC-06			2,0	2,0			2,0?
		0,80?	2,0	1,69			1,60
			1,21	1,60	0,98		1,30
				1,30			
OPC-08				3,95		3,95	
				3,50		3,50	
			2,40	2,40		2,40	
		1,58	1,50	1,88		1,88	
		1,40	1,45	1,45		1,45	
			1,09	1,20	1,54	1,20	1,15
							0,90
OPC-10		1,04		2,30			
		0,84	1,65	1,48		2,30	
OPC-11			3,30	3,00		3,00	
			2,80	2,70		2,70	
		1,80	2,30	2,20		2,20	
		1,78	1,70	1,54	1,73	1,54	
		1,30	1,45	1,45	1,79	1,45	2,28
		1,10	1,0	1,32	1,45		
		0,90					
OPC-18		2,71	3,31			2,61	
		2,68	1,88	2,61		2,44	
		2,24	1,78	2,44			
		1,79	1,68	1,88	2,70	1,88?	1,88
		1,28	1,35	1,35	1,69	1,48	1,48
		1,13	1,15	0,90		1,30	1,30
		0,86	0,75			0,90	0,90?

4.1.2.3. ITS régió RFLP elemzése

A gombák molekuláris genetikai jellemzőinek vizsgálatához az rRNS gének mellett az ITS régió RFLP analízise is felhasználható. Ezen terület analíziséhez első lépésben a megfelelő szekvenciákat kellett polimeráz láncreakcióval amplifikálnunk. Ehhez a génklaszter egyes szakaszaival homológ primereket használtunk, melyek közül az ITS-1 és az ITS-4 együttes használatával az ITS régió, mintegy 630 nukleotidnyi szakasz amplifikálható.

Esetünkben a felszaporított DNS szakaszokat *Eco*RI, illetve *Hha*I enzimekkel valamint a két enzim kettős emésztéssel történő RFLP vizsgálatnak vetettük alá (6. ábra).



6. ábra *C. hungaricus* izolátumok ITS-régiójának RFLP mintázata 1: CBS 4214^T; 2: CBS 5124; 3: CBS 6324; 4: CBS 6569; 5: CBS 6576; 6: CBS 6953; M: molekulásúly marker Fermentas

Az emésztési mintázat alapján feltételezhető volt a nagymértékű eltérés a régió nukleotid sorrendjét tekintve. Az amplifikált fragmentek vizsgálata hosszpolimorfizmust mutatott, amely fajon belül ritkán figyelhető meg a régió konzervatív jellege miatt.

Mivel az ITS régió elemzése a fajon belüli polimorfizmus egyik leginkább érzékeny markere, ezért az RFLP mintázatok különbözősége szekvenciaszintű elemzést indokolt,

melynek eredményéről a „*C. hungaricus* izolátumok rendszertani helyének vizsgálata” című fejezetben számolok be.

4.2. Extrakromoszómális elemek vizsgálata, különös tekintettel a mitokondriális genom szerkezetére

4.2.1. Mitokondriális DNS izolálása basidiomycota élesztőgombákból

A *C. hungaricus* mitokondriális genomjának izolálására alkalmazott módszert Ládai és mtsi (2001) által leírt módon végeztük. A CsCl sűrűséggrádiens centrifugálás nem alkalmazható a *C. hungaricus* izolátumok mtDNS-ének tisztítása esetében, mert rendkívül kismennyiségű DNS-t eredményezett. A fenti módszer alkalmazása megfelelő mennyiségű és minőségű izolált mitokondriális DNS-t eredményezett, amely úgynevezett preparatív mennyiségű emésztések alkalmazását is lehetővé tette.

4.2.2. Mitokondriális genomszerveződés elektronmikroszkópos vizsgálata

Elektronmikroszkóppal vizsgálva a mtDNS molekulák többsége változatos méretű lineáris formát mutatott, amelyek között a genomméretnél nagyobbak is voltak. Hasonló jelenséget számos más gombánál is tapasztaltak (pl Schramke és Orłowski 1993; Sekiguchi és mtsi 1990). Bendich és más szerzők PFGE, elektron- és fluoreszcens-mikroszkópos vizsgálatok alapján állítják, hogy az élő sejtben a 30 kb méretűnél nagyobb mitokondriális genom túlnyomórészt lineáris, konkatamer molekulák formájában van jelen, és ez a mtDNS funkcionális formája (Bendich 1993; Maleszka és mtsi 1991). A genomméretű gyűrűk, Bendich szerint, vagy a „rolling circle” replikációs mechanizmus iniciációjában vehetnek részt, (amennyiben ez a replikációs forma jellemző a mtDNS-re), vagy a lineáris mtDNS molekulákon belüli direkt ismétlődő szekvenciák között esetenként lejátszódó rekombináció termékei. Ebből a szempontból a rekombináció számos olyan fontos folyamathoz szükséges mint a DNS replikáció, vagy „repair” és esetenként a genomméretnél kisebb gyűrűket generálhat (Bendich 1993).

A lineáris formánál jóval kisebb számban találtunk cirkuláris DNS molekulaformákat is. Ezek többsége a genomméretnek megfelelő felnyílt („open circular”) gyűrű és részlegesen „supercoiled” struktúra volt. Ezeken kívül gyakran figyeltünk meg különböző

szubgenomi méretű gyűrűket (hasonlót tapasztalt Schramke és Orłowski 1993), valamint esetenként kiterjedt hálózatos képeket is megfigyeltünk. A típustörzs esetében a felnyílt, relaxált állapotú gyűrűk átlagos kontúrhossza alapján számított molekulaméret 27,32 kb-nak adódott (7. ábra).

4.2.3. *Cryptococcus hungaricus* CBS 4214^T mitokondriális DNS-ének mérete, fizikai és funkcionális térképezése

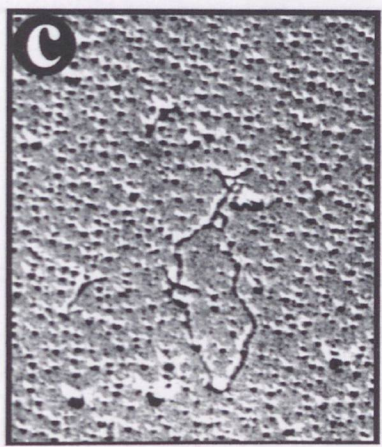
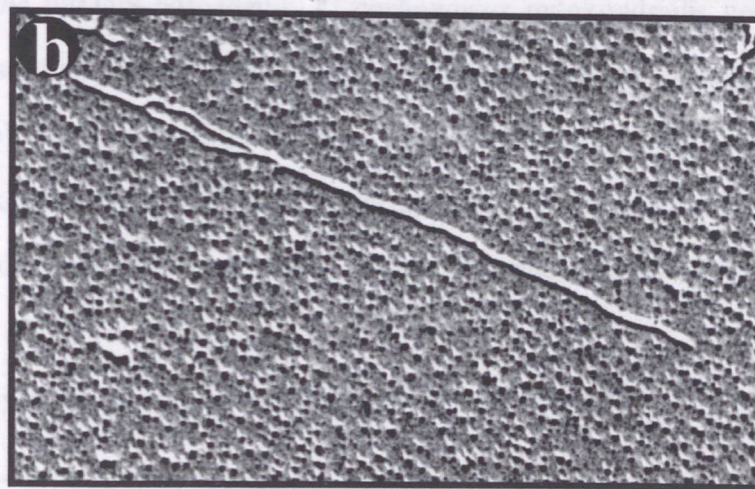
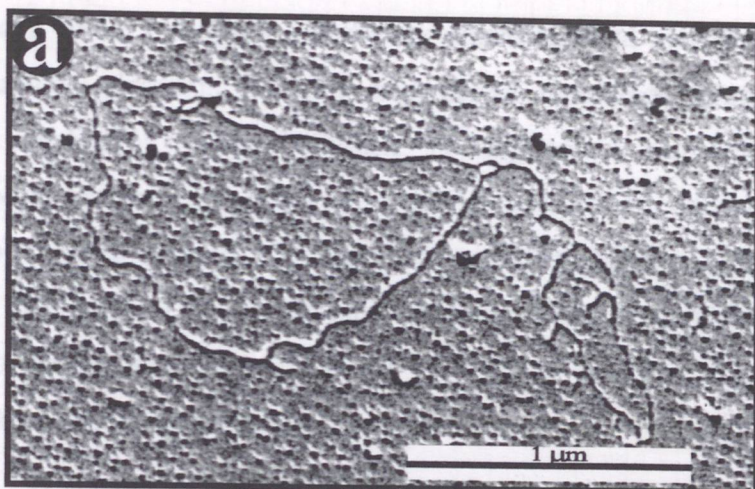
A *C. hungaricus* típustörzsének (CBS 4214^T) mtDNS-ét 5 restrikciós endonukleázzal (*Bgl*III, *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV és *Hind*III) emésztve kaptunk jól reprodukálható elektroforetikus mintázatot. A mitokondriális genomok hozzávetőleges méretét a különböző enzimekkel történt emésztések során kapott RFLP fragmentumok méretéből állapítottuk meg, gélanalizáló szoftver segítségével. Az 11. táblázat tartalmazza az 5 enzimmel kapott restrikciós fragmentum- és genomméreteket; ebből jól látható, hogy a különböző restrikciós endonukleázok fragmentumainak méretösszegei közelítőleg azonos mtDNS méretet eredményeztek. A valós mtDNS méretet azonban csak akkor állapíthattuk meg, amikor később megszerkesztettük a hat *C. hungaricus* izolátum mtDNS részletes fizikai térképét.

11. Táblázat *C. hungaricus* típustörzsének RFLP elemzése során GelBase/Pro szoftver segítségével számított fragmentumméretek.

Méret (kb)	Enzimek				
	<i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RV	<i>Hind</i> III
Fragmentumok	7,81		16,32		
	6,56	23,52	4,22	15,47	9,42
	5,12	2,42	2,51	5,03	5,77
	4,21	1,21	1,48	3,41	4,93
	1,35		1,32	2,87	4,93
	1,20		0,84	0,89	2,31
			0,59		
Össz:	26,25	27,15	27,28	27,67	27,36

Átlag: 27,14 kb

A *C. hungaricus* típustörzs mitokondriális genomjának az egyedi fragmentumok átlagméretéből számított mérete 27,14 kb volt, ami igen jól illeszkedik az elektronmikroszkópos vizsgálatok során megállapított értékhez (27,32 kb).



7. ábra *C. hungaricus* típustörzsének elektronmikroszkópos képe. a: cirkuláris forma, b: lineáris megjelenési forma; c: kisméretű cirkulum

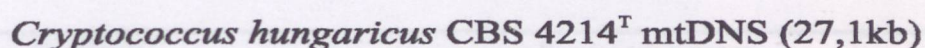
A fizikai térképezés során a reciprok emésztések alkalmazásával méginkább pontos méret-meghatározást tudunk elvégezni, mivel a nagyméretű restrikciós fragmentumok mérése során keletkező mérés hibák kiküszöbölődnek. A nagyméretű restrikciós fragmentumok mérete a térképezés során, egy másik restrikciós endonukleáz által létrehozott kisebb szubfragmentumok méretösszegéből pontosabban meghatározható. Ezzel a módszerrel kalkulált pontos genom méret 27,10 kb-nak adódott, amely a gombák világában a kis mérettartományba tartozó mtDNS-t jelent. Az 12. táblázat néhány mikroszkópikus gomba mitokondriális genom méretét tartalmazza.

A. nidulans mtDNS-ből, illetve *A. carbonarius* mitokondriális genomból származó génpróbák segítségével funkcionális térképet hoztunk létre (8. ábra). Az *A. nidulans* mitokondriumából származó génpróbákat a szakirodalomban közzé tett restrikciós és funkcionális térképek felhasználásával a hivatkozott *A. nidulans* izolátumból, az *A. carbonarius* eredetű génpróbákat pedig saját szekvenciaadatok alapján hoztuk létre

12. Táblázat Néhány mikroszkópikus gomba mitokondriális genom mérete.

Fajnév	A mtDNS mérete (kb)	
<i>Aspergillus carbonarius</i>	45-57	Kevei és mtsi (1996)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75	Zamaroczy and Bernardi (1985)
<i>Claviceps purpurea</i>	45	Tudzynski és mtsi (1983)
<i>Fusarium oxysporum</i>	45-55	Fernandez és mtsi (1994)
<i>Neurospora crassa</i>	63,5	Taylor és Smolich (1985)
<i>Penicillium urticae</i>	27,8	Sekiguchi és mtsi (1990)
<i>Podospora anserina</i>	85-102	Cummings és mtsi (1979); Kuck és mtsi (1985)

(*nad4L*, *nad5*) (Hamari és mtsi 1999). A funkcionális térképek felbontását a restrikciós térkép helyenkénti részlet szegénysége, valamint az *A. nidulans*ból származó génpróbák komplex



volta (egy- és kétféleképp) kettő-három gént is hordoznak) korlátozza. A pontosítás érdekében a komplex heterológ génpróbák helyett próbáltunk egyedi homológ génpróbákat előállítani. Ehhez felhasználtuk az *A. nidulans* mitokondriális szekvencia-adatbázisát és számos génhez PCR primereket terveztünk. A PCR reakciót *C. hungaricus* és *P. rhodozyma* izolált mtDNS-én végeztük. Az így kapott termékek génpróbaként történő felhasználásával már egyedi homológ gének hibridizációs eredményeit tudtuk vizsgálni. A fizikai térkép helyenkénti nagy felbontásán azonban csak további restrikciós enzimek bevonásával, azok hasítóhelyének megállapításával tudunk javítani. Az alkalmazott heterológ és homológ génpróbák listáját az 13. táblázat tartalmazza.

13. Táblázat A funkcionális térképek elkészítése során alkalmazott génpróbák.

Heterológ génpróbák

	mtDNS restrikciós hasítással nyert próbák	PCR reakció által létrehozott génpróbák
<i>Aspergillus nidulans</i> (Glasgow törzs) mitokondriális DNS-ből (Hamari és mtsi 1999)	<i>rnl</i> : 6,7 kb <i>Eco</i> RI fragmentum <i>rns</i> : 1,44 kb <i>Hind</i> III- <i>Bgl</i> II fragmentum <i>cox1</i> : 4,3 kb <i>Hind</i> III- <i>Bgl</i> II fragmentum <i>cob</i> : 1,17 kb <i>Bgl</i> II fragment	<i>atp9</i> : PCR reakcióval amplifikált 198 bp-os fragmentum. (Hamari és mtsi 1999)
<i>Aspergillus carbonarius</i> 1118-as izolátum mitokondriális DNS-éből származó génpróbák (Hamari és mtsi 1999)	<i>nad5</i> : 1,66 kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI fragment pSK vektorba klónozva <i>nad4L</i> : 828 bp <i>Pst</i> I- <i>Xba</i> I fragmentum pSK vektorba klónozva	

PCR reakció által létrehozott génpróbák

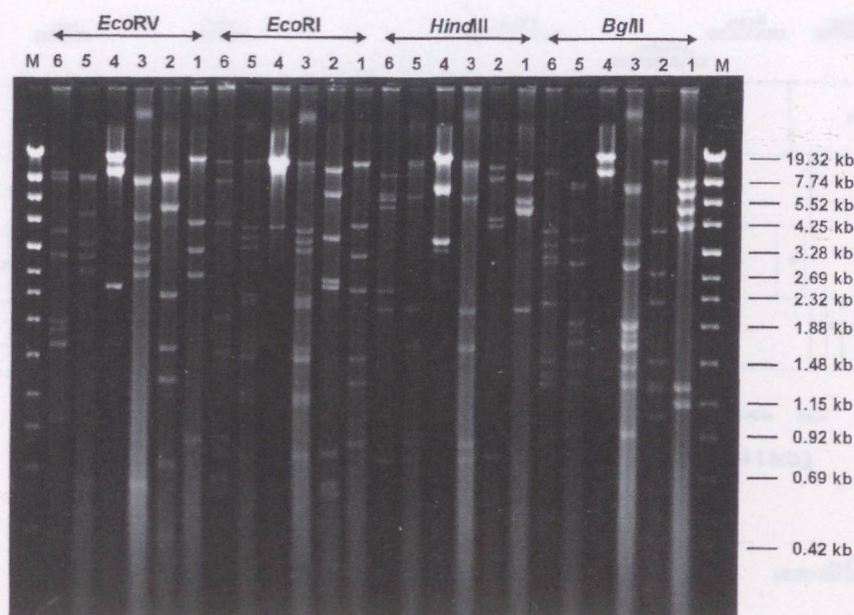
Homológ egyedi génpróbák	“forward” primer	“reverse” primer
<i>nad3</i>	5'-CCAGTATTAGCAATAATCTTGC-3'	5'-GCAAAACCTAATGTTCTTAC-3'
<i>nad5</i>	5'-GTAGGAGTAACAGGTGCAC-3'	5'-CTCTTAGAAGTTTGACCACC-3'
<i>cob</i>	5'-ATGAGAATTTTAAAAAGTCATCC-3'	5'-CTAGGGTGCTTGATGAACC-3'
<i>nad1</i>	5'-GAAGGTCCTTTTAGTAATTGTTCTTGC-3'	5'-GGTATTATACCTAGACCATATAC-3'
<i>rns</i>	5'-TTTTCTAGAAAATTTGAGTTTGATGATGGC-3'	5'-TTTTCTAGATAATTCATCCCGTGCAATTT-3'
<i>atp8</i>	5'-ATGCCACAACCTAGTACCATTTC-3'	5'-TTATAATTTATTTATATATATACGTG-3'
<i>nad4</i>	5'-GGTGTAATAACTATATTATATGC-3'	5'-ATATTATATATTAAATAAGAAACTG-3'

A típustörzs mitokondriális DNS restrikciós térképén az apocitokrómban (*cob*); a NADH dehidrogenáz második, harmadik, negyedik, ötödik alegységének (*nad2*; *nad3*; *nad4*; *nad5*) és a riboszómális RNS kis illetve nagy alegységének génjeit lokalizáltuk. Az ATP-áz gének közül az *atp8* illetve citokrómban oxidáz egyes alegységének egy részletét (*cox1*) sikerült elhelyeznünk.

4.2.4. További *Cryptococcus hugaricus* izolátumok mtDNS-ének elemzése

A továbbiakban a típustörzsnél leírt módszer alapján meghatároztuk az egyes izolátumok mtDNS méretét, illetve elvégeztük mtDNS-ük RFLP analízisét (9. ábra), elkészítettük fizikai és funkcionális térképeiket (10. ábra). Két izolátum, a CBS 6324 és a CBS 6576 az általunk alkalmazott restrikciós enzimekkel vizsgálva teljesen azonos mitokondriális genomszerveződést mutatott. A hibridizációs kísérletek során alkalmazott

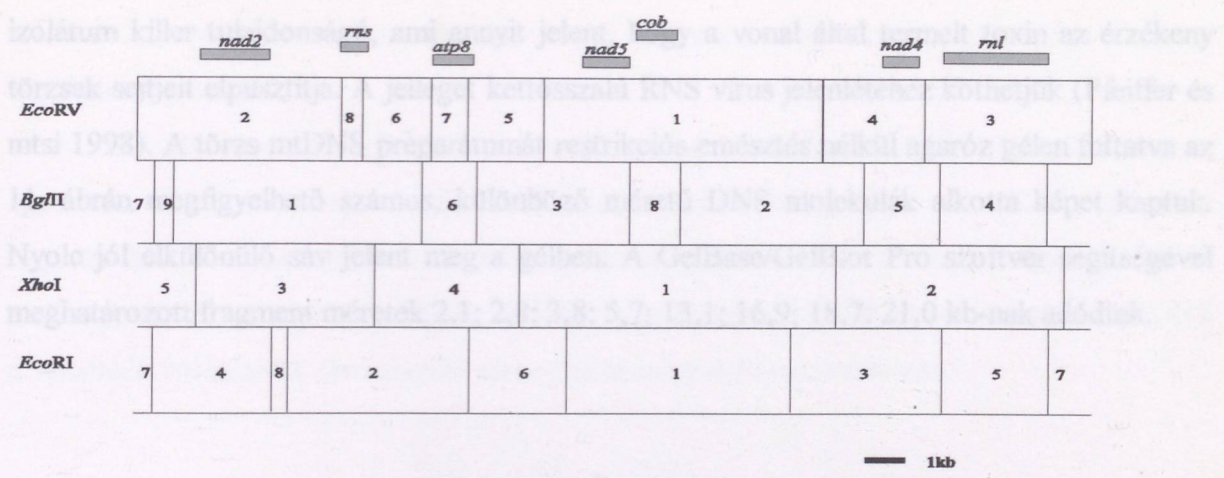
génpróbák is azonos lokalizációt adtak. A CBS 5124-es és a CBS 6953-as törzsek mitokondriális DNS-e mind a típustörzstől, mind a többi izolátumtól különböző volt. A funkcionális elemzés során megállapítottuk, hogy a génsorrend tekintetében nagy változatosságot mutatnak a törzsek. Mivel a basidiomycota élesztők mitokondriális DNS-éről nem áll rendelkezésre szakirodalmi adat, ezért a jelenséget a gombák körében megfigyelhető változatos génsorrendekkel magyarázzuk. A jelenség okaként egyes szerzők a gombagenomban szétszórtan elhelyezkedő GC gazdag szekvenciákat jelölik meg, melyek elősegítik a mtDNS molekulák közötti, illetve a molekulán belüli átrendeződéseket (Grossman és Hudspeth 1985).



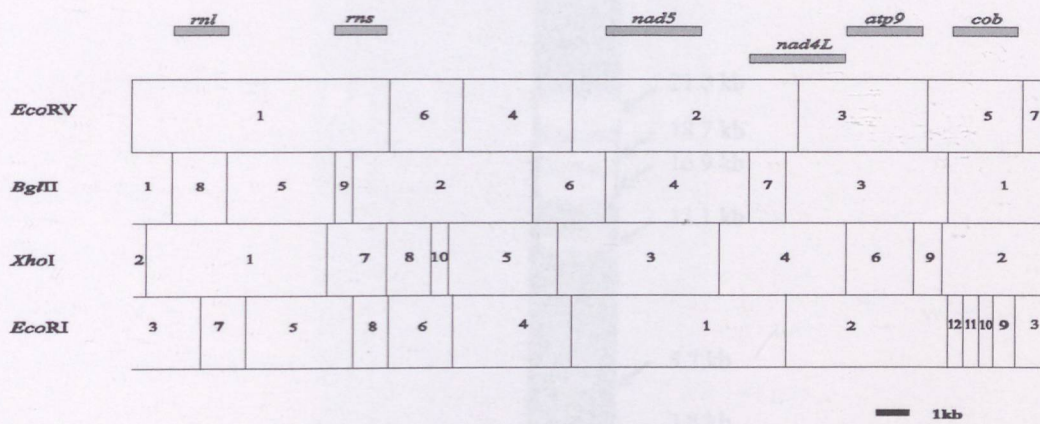
9. ábra *Cryptococcus hungaricus* izolátumok mtDNS-ének RFLP mintázata *EcoRV*, *EcoRI*, *HindIII* és *BglII* restrikciós enzimek alkalmazásával. 1: CBS 4214, 2: CBS 5124, 3: CBS 6324, 4: CBS 6569, 5: CBS 6576, 6: CBS 6953, M: λ PUC-Mix molekulásúly marker Fermentas.

4.2.5. Egyedi szerveződésű mtDNS *C. hungaricus* CBS 6569, illetve a *Cystofilobasidium capitatum* esetében

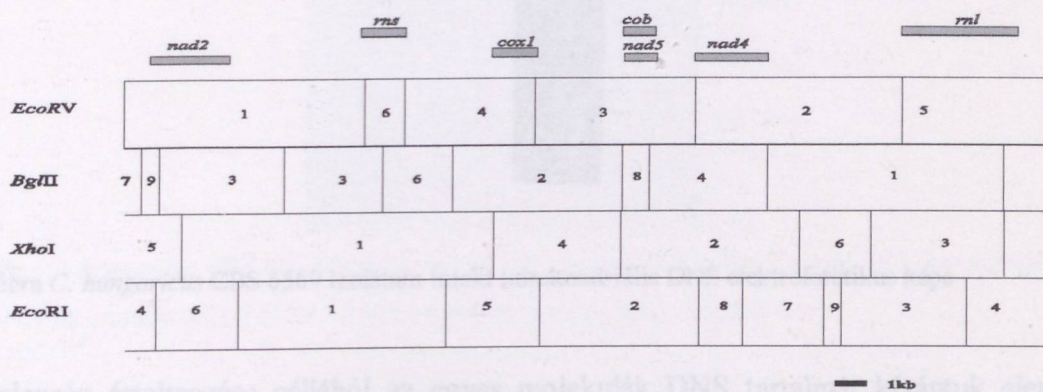
Kísérleteink során a CBS 6569-es törzs mitokondrium szerkezetét, az RFLP profil illetve más fiziológiai adatok alapján részletesebb tanulmányozásra érdemesnek találtuk. A tisztított mitokondriális DNS RFLP elemzése során kapott CBS 6569-es profil jelentős eltérést mutatott más izolátumokétól. A tenyésztési körülmények optimalizálása közben kiderült, hogy a törzs oxigén igénye nagyobb, mint más törzseké. Az említett



Cryptococcus hungaricus CBS 5124 mtDNS (28,04kb)



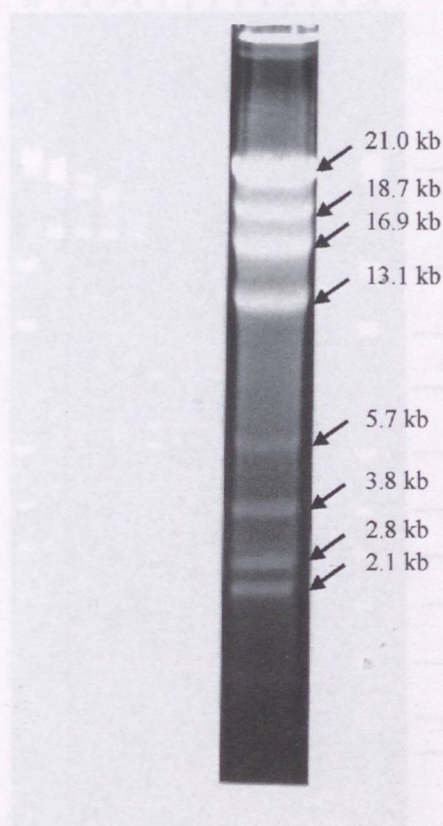
Cryptococcus hungaricus CBS 6324, 6576 mtDNS (28,41kb)



Cryptococcus hungaricus CBS 6953 mtDNS (30,07kb)

10. ábra *C. hungaricus* CBS 5124, 6324, 6576, 6953 izolátumok mtDNS-ének fizikai és funkcionális térképei

izolátum killer tulajdonságú, ami annyit jelent, hogy a vonal által termelt toxin az érzékeny törzsek sejtjeit elpusztítja. A jelleget kettősszalú RNS vírus jelenlétéhez köthetjük (Pfeiffer és mtsi 1998). A törzs mtDNS preparátumát restrikciós emésztés nélkül agaróz gélen futtatva az 11. ábrán megfigyelhető számos, különböző méretű DNS molekulák alkotta képet kaptuk. Nyolc jól elkülönülő sáv jelent meg a gélben. A GelBase/GelBlot Pro szoftver segítségével meghatározott fragment méretek 2,1; 2,8; 3,8; 5,7; 13,1; 16,9; 18,7; 21,0 kb-nak adódtak.

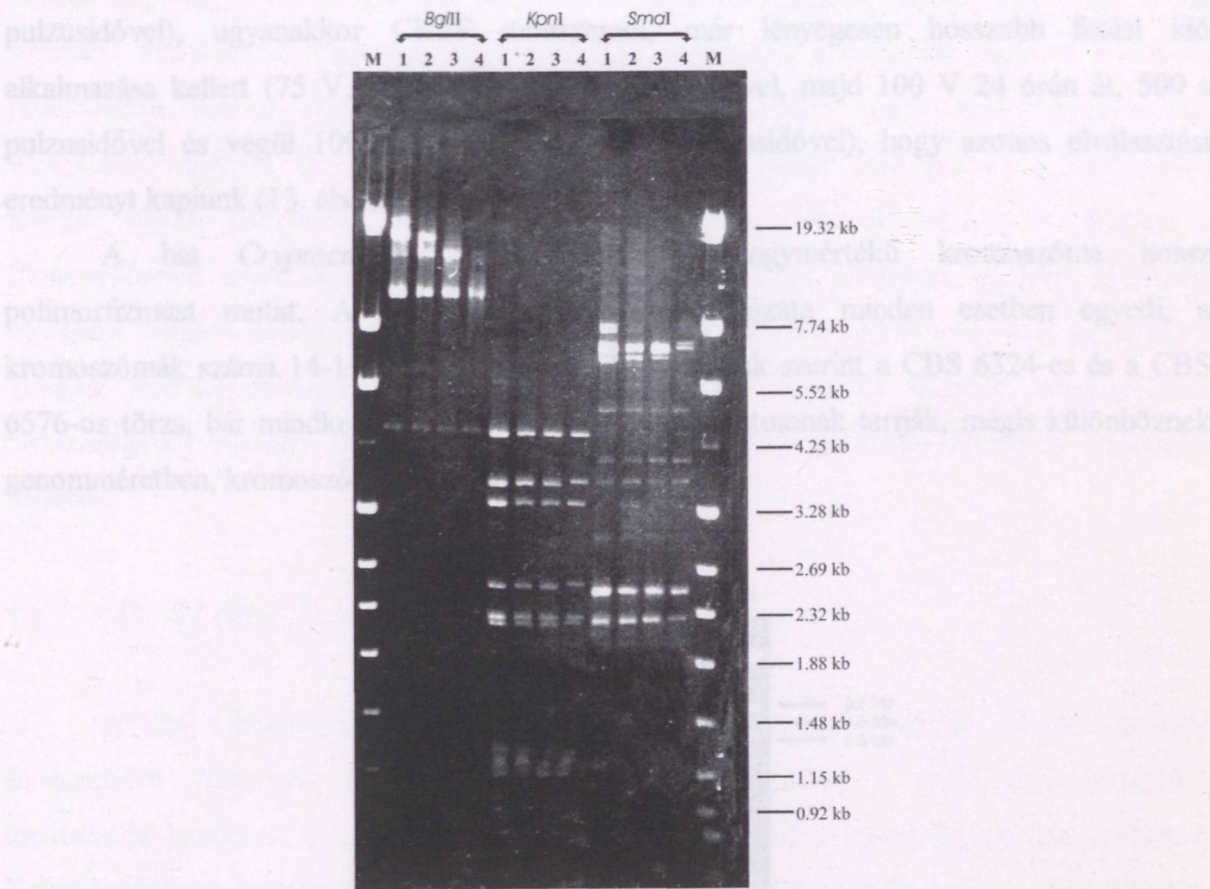


11. ábra *C. hungaricus* CBS 6569 izolátum intakt mitokondriális DNS elektroforetikus képe

A jelenség értelmezése céljából az egyes molekulák DNS tartalmát kívántuk elemezni. A négy legnagyobb, gélből visszaizolált (21; 18,7; 16,9 és 13,1 kb) fragmentumot *Bgl*III, *Kpn*I, *Sma*I enzimmal emésztettük. Az emésztési mintázatok hasonlósága (12. ábra) azt igazolja, hogy a vizsgált 4 különböző méretű DNS molekula szekvenciája feltételezhetően erős átfedéseket mutat. A gyakori felismerőhellyel rendelkező enzimek által generált hasonló mintázat (*Kpn*I, *Sma*I) arra enged következtetni, hogy a különböző méretű DNS molekulák kisebb repetitív egységekből épülnek fel. Ez a mitokondriális genomszerveződés nem csupán

a többi *C. hungaricus* izolátumtól különbözött, de ismereteink szerint a mikroorganizmusok körében is egyedülálló.

A *C. hungaricus* CBS 6569-es törzséhez filogenetikailag közelálló *Cystofilobasidium capitatum* tisztított mitokondriális DNS-ének elektroforetikus képe az előbb említetthez nagyon hasonló képet mutatott. A natív, emésztés nélküli mtDNS 11 fragmentre különült el, melyek mérete 1,1 kb-tól 15 kb-ig terjedt. A jelenség behatóbb tanulmányozása, a DNS fragmentek tartalmának funkcionális elemzése jelenleg is folyamatban van.



12. ábra *C. hungaricus* CBS 6569-es izolátum mtDNS fragmentek RFLP mintázata. 1 (21 kb-os fragmentum); 2 (18,7 kb-os fragmentum); 3 (16,9 kb-os fragmentum); 4 (13, kb-os fragmentum)

4.3. Kariotipizálás CHEF módszerrel

Munkánk eredményeként, OFAGE és CHEF technika alkalmazásával sikerült először megbízható adatokat kapnunk a *C. hungaricus* faj sejtmagi genetikai állományáról. Optimalizáltuk a protoplasztképzés körülményeit, meghatároztuk a DNS molekulák elválasztásának paramétereit.

Az optimális elválasztási körülmények meghatározásakor arra törekedtünk, hogy olyan

paramétereket alkalmazzunk, mely alkalmas mind a kis, mind a nagy DNS molekulák egyidejű elválasztására. Előzetes kísérleteinket, a viszonylag gyorsabb OFAGE rendszerrel végezve azt tapasztaltuk, hogy a rövid pulzusidő és futási idő valamint a nagy feszültség (60 s, 16 h és 24 h, valamint 100 V és 180 V) együttes alkalmazása a 2,2 Mb-nál kisebb kromoszómális DNS molekulák elválasztásánál hatékony. Míg a nagy kromoszómák elválasztásánál használt alacsonyabb feszültség (60 V), hosszabb pulzusidő (160 s) és futási idő (72 h) a 2,2 Mb-nál kisebb DNS molekulák elválasztására nem alkalmas. Az általunk ideálisnak tartott elválasztási körülmény az OFAGE rendszerénél (100 V, 24 órán át, 450 s pulzusidővel), ugyanakkor CHEF módszerénél, már lényegesen hosszabb futási idő alkalmazása kellett (75 V, 72 órán át, 700 s pulzusidővel, majd 100 V 24 órán át, 500 s pulzusidővel és végül 100 V 24 órán át, 150 s pulzusidővel), hogy azonos elválasztási eredményt kapjunk (13. ábra).

A hat *Cryptococcus hungaricus* törzs nagymértékű kromoszóma hossz polimorfizmust mutat. A törzsek kromoszóma mintázata minden esetben egyedi, a kromoszómák száma 14-19 között változott. Tapasztaltuk szerint a CBS 6324-es és a CBS 6576-os törzs, bár mindkettőt nagyon közeli rokon izolátumnak tartják, mégis különböznek genomméretben, kromoszóma számban és méretben.



13. ábra *C. hungaricus* izolátumok CHEF módszerrel készült kromoszóma mintázata. S.p. *Schizosacharomyces pombe*, 1: CBS 4214, 2: CBS 5124; 3: CBS 6324; 4: CBS 6569; 5: CBS 6576, 6: CBS 6953

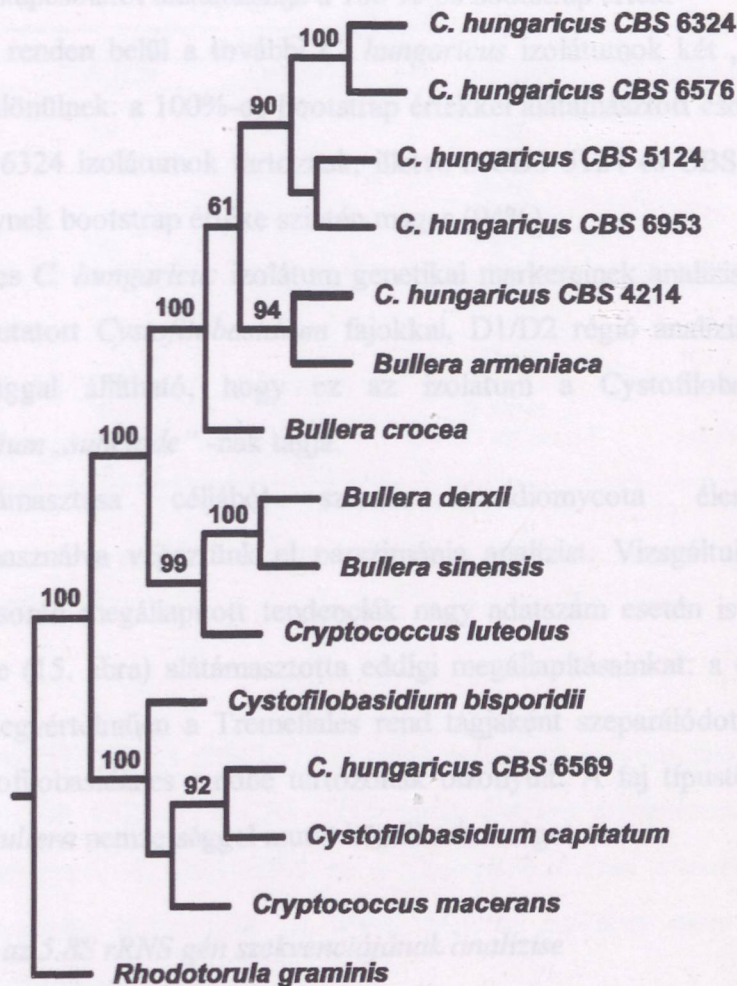
4.4. *Cryptococcus hungaricus* rendszertani helyének vizsgálata, filogenetikai analízis

Fell és munkatársai (2000) a *C. hungaricus*-t - elsősorban a szeptumok morfológiája illetve a sejtfalösszetevők alapján - a Tremellales rendbe sorolták. A hat izolátum molekuláris markereinek elemzése azonban arra engedett következtetni, hogy a faj izolátumai molekuláris genetikai szempontból nem egységesek. A vizsgálataink célja elsősorban az volt, hogy választ kapjunk a *C. hungaricus* fajon belüli polimorfizmusára, illetve arra, hogy a hat izolátum molekuláris markerek alapján történő besorolása korrelációt mutat-e a Fell és munkatársai szerinti besorolással. Ennek érdekében több régió szekvenciaadatainak vizsgálatát végeztük el. A vizsgált területek kiválasztásakor nem csupán a konzervatív jelleget vettük számításba, hanem a már meglévő adatbázisok méretét is. Azokat a filogenetikailag informatív DNS szakaszokat részesítettük előnyben, melyek nukleotid sorrendje számos basidiomycota élesztő esetében már ismertek. Ezáltal ugyanis az általunk vizsgált mikroorganizmus elhelyezhetővé válik a basidiomycota élesztők rendszerében. Összességében mintegy 200 szekvenciaadatot elemeztünk a rokonsági viszonyok felderítése céljából.

4.4.1. A D1-D2 régió filogenetikai analízise

A 26S riboszómális RNS génjének D1/D2 régiójának analízise jól alkalmazható filogenetikai viszonyok felderítésére. Vizsgálataink kezdetén a régió szekvenciájának elemzésébe bevontuk a hat *C. hungaricus* izolátumot, illetve kilenc egyéb fajt, melyek a Tremellales rendet reprezentálják. Előzetes vizsgálataink arra utaltak, hogy a CBS 6569-es izolátum nem a *Cryptococcus* nemzetség tagja, ezért a filogenetikai összehasonlításban Cystofilobasidiales rendbe tartozó fajokat is felhasználtunk. A vizsgálat során mindösszesen 594 nukleotid hosszúságú szakaszt hasonlítottuk össze. Ebből 218 polimorfikus helyet - azaz adott pozícióban különböző nukleotidot - talált az elemző szoftver, filogenetikailag informatívnak pedig 137 pozíció bizonyult. A DNS szekvencia adatokat a Clustal W program (Thompson és mtsi 1994) segítségével hasonlítottuk össze, „outgroup” azaz külcsoporthként a *Rhodotorula graminist* vontuk be. Az elemzésből megállapítható volt, hogy a *C. hungaricus* 4214^T, illetve a *Bullera armeniaca* D1/D2 szekvenciái igen nagyfokú homológiát mutatnak (95%), hasonlóan magas homológiaértéket tapasztaltunk a *C. hungaricus* CBS 6569 és a

Cystofilobasidium capitatum esetében is (98%). A D1/D2 szekvenciák parszimónia és szomszéd-összevonó (*neighbor-joining*) módszerrel készült törzsfáinak topológiája teljesen azonos volt. A parszimónia analízis 4 leginkább „takarékos” fát eredményezett 462 lépésben. A konszenzus fát az 14. ábra mutatja.



14. ábra *C. hungaricus* izolátumok, illetve rokon fajok 26S rDNS D1/D2 régiójának szekvencia adatai alapján elvégzett parszimónia analízis eredménye. A fán jelzett számok a bootstrap-analízis eredményeit jelzik.

A fák elemzése alapján a következő megállapítások tehetők:

1. A két módszerrel kapott fák összehasonlíthatók és jól megfelelnek egymásnak. A fák topológiája a bootstrap-analízissel kapott értékek alapján szignifikánsnak tekinthető.
2. A *C. hungaricus* izolátumok genetikailag heterogének. A faj öt izolátuma (CBS 4214^T, CBS 5124, CBS 6324, CBS 6576, CBS 6953) jelenlegi rendszertani helyének

megfelelően, jól elkülönülve, a Tremellales rend képviselőivel alkot elkülönült csoportot – a bootstrap-analízis alapján ez az elkülönülés egyértelműen szignifikánsnak mondható (100%-os bootstrap érték). A négy *Cystofilobasidiales* faj szintén külön csoportba került, azonban az eddigi feltételezésekkel szemben a *C. hungaricus* CBS 6569-es izolátum is ebben a „clade”-ban fordul elő.

3. A faj típustörzse (4214^T) szoros rokonságot mutat a *B. armeniaca* és *B. crocea* fajokkal, ezt a kapcsolatot alátámasztja a 100 %-os bootstrap érték.
4. A Tremellales renden belül a további *C. hungaricus* izolátumok két „subclade”-ba, alcsoportba különülnek: a 100%-os bootstrap értékkel alátámasztott csoportba a CBS 6576 és CBS 6324 izolátumok tartoznak, illetve a CBS 5124 és CBS 6953 törzsek csoportja, melynek bootstrap értéke szintén magas (94%).
5. A CBS 6569-es *C. hungaricus* izolátum genetikai markereinek analízisekor is közeli rokonságot mutatott *Cystofilobasidium* fajokkal, D1/D2 régió analízis módszerével nagy biztonsággal állítható, hogy ez az izolátum a *Cystofilobasidiales* rend *Cystofilobasidium* „subclade” -nak tagja.

Eredményeink alátámasztása céljából számos basidiomycota élesztő D1/D2 szekvenciaadatait felhasználva végeztünk el parszimónia analízist. Vizsgáltuk, hogy a kis mintaszámú elemzés során megállapított tendenciák nagy adatszám esetén is helytállnak-e. Az analízis eredménye (15. ábra) alátámasztotta eddigi megállapításainkat: a *C. hungaricus* izolátumok közül öt egyértelműen a Tremellales rend tagjaként szeparálódott, míg a CBS 6569-es törzs a *Cystofilobasidiales* rendbe tartozónak bizonyult. A faj típustörzseként leírt 4214^T-es izolátum a *Bullera* nemzetséggel mutat közeli rokonságot.

4.4.2. Az ITS régió és az 5.8S rRNS gén szekvenciájának analízise

Az ITS régió szekvenciája, a régió konzervatív jellegéből következően megfelelő marker a fajon belüli kapcsolatok jellemzésére. Az elemzett terület magában foglalta az ITS1, ITS2, illetve az 5.8S rDNS régiókat. A vizsgálatokba bevontuk a *Bullera armeniaca* és a *Cystofilobasidium capitatum* fajokat. Az ITS1-ITS2 területek amplifikálása során hosszpolimorfizmust figyeltünk meg az egyes izolátumok között, az ITS1 régió mérete 124 bp (4214^T) és 148 bp (CBS 6576) között, míg az ITS2 181 bp (CBS 4214^T) és 269 bp (CBS 6569) között változott. A szekvenciák összehasonlító elemzése során megállapítottuk, hogy a konzervatív jellegű, rövid - mintegy 155 bp méretű - 5.8S rDNS gén nukleotid szekvenciájában az egyes izolátumok különbségeket mutatnak:

CBS 4214^T ◀^{7 nt} ▶ CBS 6569
CBS 5124 ◀^{7 nt} ▶ CBS 6569
CBS 6953 ◀^{8 nt} ▶ CBS 6569

A szekvencia restrikcióshely-pozíció analízise szintén jól kirajzolódó különbségeket mutatott az egyes izolátumok között (14. táblázat).

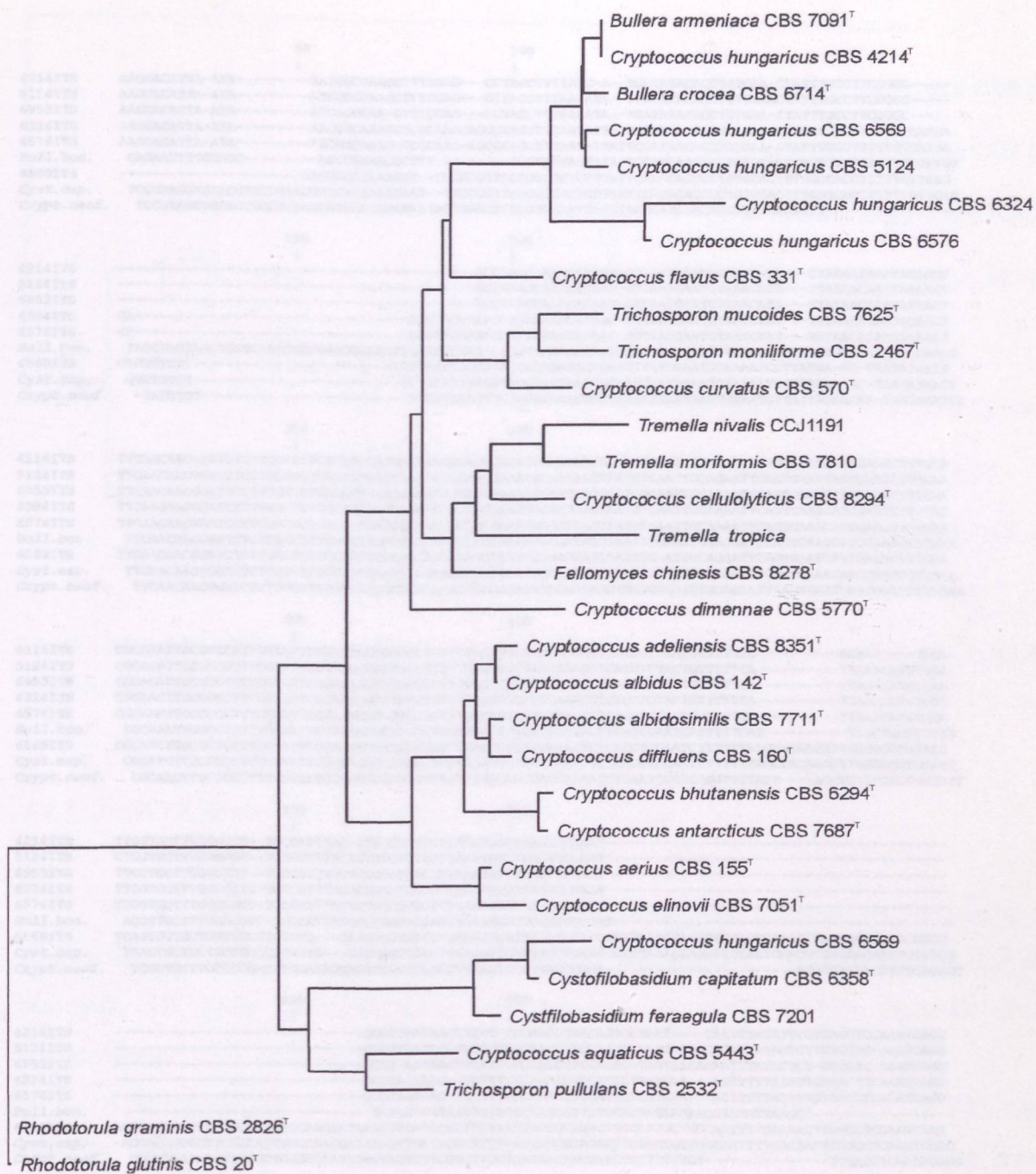
Enzimek	Törzsek					
	CBS 4214	CBS 5124	CBS 6324	CBS 6569	CBS 6576	CBS 6953
Acy I	-	-	355	-	354	-
Aha III	-	40	-	409	-	39
Alu I	23,36	23,36	23,39	-	23,38	35
Bal I	-	-	-	60,467	-	-
Bbv I	181	186	43,205	342	204	184
Bgl II	-	-	-	435	-	-
Cvi II	23,31,36,148,343	23,31,36,153, 354	23,34,39,172,374	27,60,379,467,534	23,33,38,171,373	30,35,151,352
Hae III	-	-	-	60,467,534	-	-
Hind III	21	21	-	-	-	-
Mae II	-	-	-	347,427	-	-
Mse I	8,350,373	8,39,311,361,384	8,42,330,381	87,324,395,408	8,41,329,380	8,38,359
Sdu I	79	81	-	29,54,366	-	79
Taq I	27,157,216	27,162,221	181,240	178,237,424,444,507	180,239	26,160,219
Vsp I	8	8	8	-	8	8

14. Táblázat Különböző retriációs endonukleázok hasítóhelyeinek pozíciója a hat *C. hungaricus* izolátum ITS1-5.8S rDNS-ITS2 régió esetében.

A vizsgált régió (ITS1-5.8S rDNS-ITS2) teljes nukleotid szekvenciáját tekintve (16. ábra) a CBS 6324 a CBS 6576-al; a CBS 4214 pedig *Bullera armeniaca*-val páronként teljesen azonosnak bizonyult. A CBS 6569 és a *Cystofilobasidium capitatum* nukleotid sorrendje 98%-ban mutatott homológiát. A többi izolátum esetében nem tudtunk ilyen mértékű hasonlóságot megfigyelni.

A filogenetikai vizsgálatok során a szekvenciaadatokat parszimónia elemzésnek vetettük alá. Összességében 453 nukleotidot elemeztünk, ebből 76 polimorfikus helyet találtunk, melyek közül 51 bizonyult filogenetikailag informatívnak. A 241 lépésben létrejött egyetlen leginkább takarékos fát az 17. ábra mutatja. Az elemzést elvégeztük szomszéd-összevonó (*neighbor-joining*) módszerrel is, amely vizsgálat hasonló eredménnyel szolgált.

Eredményeink alapján a CBS 6324 és CBS 6576 izolátumok közeli kapcsolatban állnak, illetve a CBS 5124 és CBS 6953 szintén szoros rokonsági viszonyt mutat. A CBS 6569-es törzs a *Cystofilobasidium capitatum*-mal, míg a típus-törzs (4214^T) a *Bullera armeniaca*-val alkotott közös „clusterf”.



15. ábra *C. hungaricus* izolátumok helye a Hymenomycetidae alosztály képviselőinek D1/D2 régió szekvenciaanalízisen alapuló filogenetikai rendszerében.

50 100

4214ITS AAGGACATTA-ATA-----AATGGCGAAGCTTTTCGAG--CCTAGCTTTTATC-A--TCCTATACACCTGTGAA-CTATTTGCGCTTCGGGC-----
5124ITS AAGGACATTA-ATA-----ATCGGCGAAGCTTTTCGAG--CCTAGCTTTAAATA--TGATATACACCTGTGAAACTATTTGCGCTTCGGGC-----
6953ITS AAGGACATTA-ATA-----ATCGGCGAA-CTTTCGAG--CCTAGCTTTAAATA--TGATATACACCTGTGAA-CTATTTGCGCTTCGGGC-----
6324ITS AAGGACATTA-ATA-----AACGGCAAAGCTCGCAAGAGCCTAGCTTTAATATTATCCATAACACCTGTGAA-CTATTTGCGCTTCTTGTCATGA
6576ITS AAGGACATTA-ATA-----AACGGCAAAGCTCGCAAG-AGCCTAGCTTTAATATTATCCATAACACCTGTGAA-CTATTTGCGCTTCTTGTCATGA
Bull. bon. GAGAATTTTGGATC-----AGCCGAAAGGCTTT-----TCCTAATACTTTTATCCATAACACCTGTGCACCTTTTTTATTAGTTGTGATGT
6569ITS -----GAGGACATAAAGAT--TCGCCCTTCGGGGCTCTCTTTATTACACACCCCTGTGCACCTTTGGCCACCTCTTTGTGTGAG
Cyst. cap. TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCACTAAAGAAT--TTGCGCTTCGGGGCTCTCTTTATTACACACCCCTGTGCACCTTTGGCCACCTCTTTGTGTGAG
Crypt. neof. TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAGTAGAATACTGGACTTTGGTCCATTATCTACCCATCTACACCTGTGAACCTGTT-----

150 200

4214ITS -----ACCAAC-AAACATAAT-GT-AATGAATGTAATC-TA-----CTATAATAAATACAAC
5124ITS -----ACCAACCAAACATAAT-GTCAATGAATGTAACATA-----TTATAACAAATATAACT
6953ITS -----ACCAACCAAACATAAT-GTCAATGAATGTAACATA-----TTATAACAAATATAACT
6324ITS GA-----AGGTACAAAACCTTACAAACATAAC-TGTAATGAATGTAATCTAT--TATAACATAATACAAC
6576ITS GA-----AGGTACAAAACCTTACAAACATAAC-TGTAATGAATGTAATCTAT--TATAACATAATACAAC
Bull. bon. TAGCTACTAGCTGGTCAAACGGGCAAGCGCAACTTTCATTTCATACACATACAAACATATTAGTCTTTGAATGTAATATAAATTTGAACAAATACAAG
6569ITS GTGTGTCT-----TTTAATTACATACCCTATAAACACAAGTTATTGAATGTAATGCTTTATAA-AC-TAATATAACT
Cyst. cap. GTGTGTCT-----TTTAATTACATACCCTATAAACACAAGTTATTGAATGTAATGCTTTATAA-AC-TAATATAACT
Crypt. neof. -TATGTGC-----TTGCGCAGCTTTTACACAAACTTCTAAATGAATGAATGTAATCTTATTATAACAA-TAATAAACT

250 300

4214ITS TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
5124ITS TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
6953ITS TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
6324ITS TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
6576ITS TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
Bull. bon. TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
6569ITS TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
Cyst. cap. TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
Crypt. neof. TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCAGATCGATGAAAAACGAGCGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA

350 400

4214ITS CGCAAAATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAACTCACCCCTAATGTTTTATC-----ACAA-----TAGG
5124ITS CGCAGATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAACTCACCCCTACTGTTTTCA-----TTAAACATGTGA
6953ITS CGCAGATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAACTCACCCCTACTGTTTTCA-----TTAGACATGTAAA
6324ITS CGCAAAATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAACTCACCCCTACTGTTTTCA-----TTAAACATGTGGA
6576ITS CGCAAAATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAACTCACCCCTACTGTTTTCA-----TTAAACATGTGGA
Bull. bon. CGCAAAATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAGTTCACCCCAATCATTTTTTCAT-----TAAGTGGTGTGA
6569ITS CGCATCTTGCCTCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAGTTCACCCCAATCATTTTTTCAT-----TAAGTGGTGTGA
Cyst. cap. CGCATCTTGCCTCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAGTTCACCCCAATCATTTTTTCAT-----TAAGTGGTGTGA
Crypt. neof. CGCAAAATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAGTTCACCCCAATCATTTTTTCAT-----TAAGTGGTGTGA

450 500

4214ITS TTGGTGTCTTTGGGTGT--TGCCATTTC-CTGGCTCGCCTTAAATGACTAAGTTGGAAT-----
5124ITS CTGGTGTCTTTGGGTGT--TGCCGTTTACTCTGGCTCGCCTTAAATGCTAAGTTGGAAT-----
6953ITS TTGGTGTCTTTGGGTGT--TGCCGTTTACTCTGGCTCGCCTTAAATGCTAAGTTGGAAT-----
6324ITS TTGGTGTCTTTGGGTGT--TGCCGTTTACTCTGGCTCGCCTTAAATGCTAAGTTGGAAT-----
6576ITS TTGGTGTCTTTGGGTGT--TGCCGTTTACTCTGGCTCGCCTTAAATGCTAAGTTGGAAT-----
Bull. bon. ACGGTGTCTTTGGGTGT--TGCCGTTTACTCTGGCTCGCCTTAAATGCTAAGTTGGAAT-----
6569ITS TGAGTGTCTGTGGTGTCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAGTTCACCCCAATCATTTTTTCAT-----
Cyst. cap. TGAGTGTCTGTGGTGTCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGTGTCTTATAAGTTCACCCCAATCATTTTTTCAT-----
Crypt. neof. TGGTGTCTTTGGGTGT--TGCCGTTTACTCTGGCTCGCCTTAAATGCTAAGTTGGAAT-----AGGTGATTACCTGTGAGCC

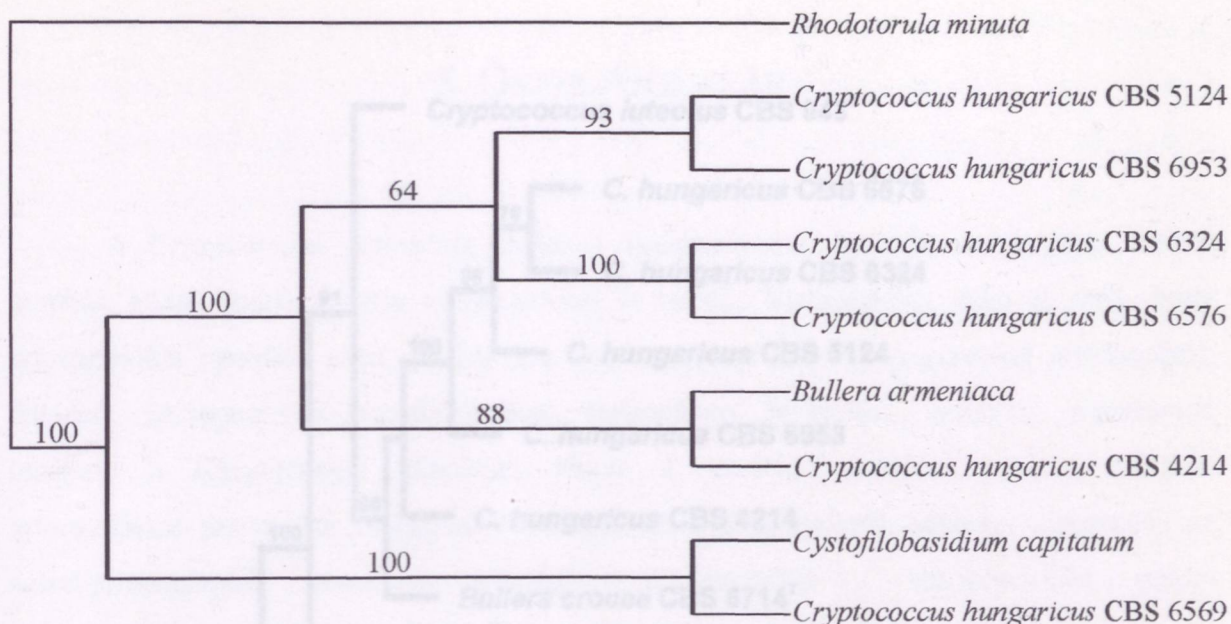
550 600

4214ITS -----GCGTAAATAAGTTCTC-CGCAACCTCCACTCCTAATA--CAATTTATATTCTGACCTCCAATCAGG
5124ITS -----GCGTAAATAAGTTCTTTCGCAACCTCCACTCCTAATAACACACTTTATACCTTTGACCTC-AAATCAGG
6953ITS -----GCGT-AAATAAGTTCTTTCGCAACCTCCACTC-TAATAACACACTTTATACCTC-GACCTC-AAATCAGG
6324ITS -----GCGTAAATAAG--TCTTTTCGCAACCTCCACTCCTAATCAA--ACTTTTTATTTCTGACCTCAAATCAGG
6576ITS -----GCGTAAATAAG--TCTTTTCGCAACCTCCACTCCTAATCAA--ACTTTTTATATTCTGACCTCAAATCAGG
Bull. bon. -----TAGCGTGAATAAGTTCTCGCTATCATTTGCCACTATAATAACCTATATTAAGCT-----
6569ITS AGGACAGTGTCTCGGCATTGGCCAAAGATGATACGCTCTTAATTAGCGCAGACTTCGATTGTGGCAATTTTGAAACTTTGGCCCAAATCAGG
Cyst. cap. AGGACAGTGTCTCGGCATTGGCCAAAGATGATACGCTCTTAATTAGCGCAGACTTCGATTGTGGCAATTTTGAAACTTTGGCCCAAATCAGG
Crypt. neof. GCGTAAATAAGTTCTCGCTGGCCATGAGGTAGTCTCGGCTTCGCTGATACCAACCATCTCTTTTTTGT-----TTGACCTCAAATCAGG

648

4214ITS TTAGGACTACCGCTTGAACTTTAA-----
5124ITS TTAGGACTACCGCTTGAACTTTAA-----
6953ITS TTAGGACTACCGCTTGAACTTTAA-----
6324ITS TTAGGACTACCGCTTGAACTTTAA-----
6576ITS TTAGGACTACCGCTTGAACTTTAA-----
Bull. bon. -----
6569ITS T-AACACTAACCCACTGAACTTAA-----
Cyst. cap. T-AGGACTA-CCCACTGAACCTTAAGCATATCAATAAGTGGAGGAAAG
Crypt. neof. T-AGGCTA-CCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGA-----

16. ábra A vizsgált törzsek ITS szekvenciái (GeneBank azonosítói: CBS 4214^T: AF075503; CBS 5124: AF 272664; CBS 6324: AF272665; CBS 6559: AF272666; CBS 6576: AF272667; CBS 6953: AF272668)

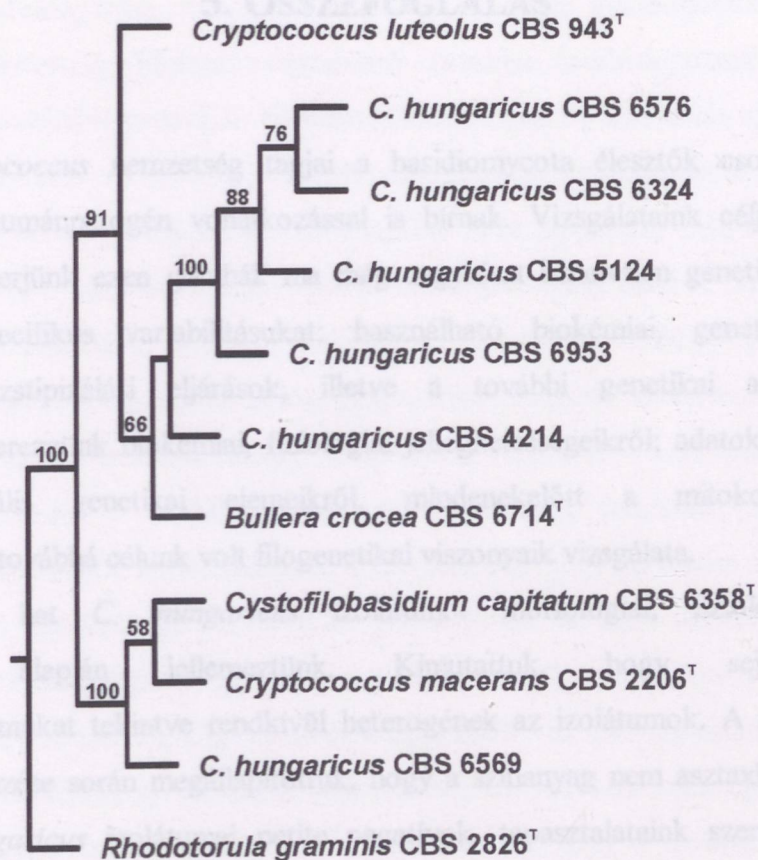


17. ábra ITS1-5.8S rDNS-ITS2 szekvenciák parszimónia analízissel létrehozott filogenetikai fája. A számok bootstrap értékeket jelölnek.

4.4.3. A 18S rRNS gén parciális szekvenciájának analízise

A 18S rRNS gén mintegy 600 bázispárnyi régiójának analízisét is elvégeztük. A filogenetikai elemzésbe 590 nukleotidot vontunk be, melyből 82 polimorfikus helynek bizonyult, 30 pedig parszimóniailag informatívnak. A vizsgálat 138 lépésben 9 fát eredményezett, a konszenzus fát az 18. ábra mutatja be.

A fa topológiája nagymértékű hasonlóságot mutatott a D1/D2, illetve az ITS régió analízise során kapott eredményekkel. Az öt *C. hungaricus* izolátum viszonylag közeli rokonnak bizonyult, a típusörzs szoros rokonságát a *Bullera armeniaca*-val szintén alátámasztotta a vizsgálat. A CBS 6569 és a *Cystofilobasidium capitatum* rokonságát ennek a régióknak az analízise is igazolta.



18. ábra 18S rDNS szekvenciák parszimónia analízissel létrehozott filogenetikai fája. A számok bootstrap értékeket jelölnek.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Cryptococcus* nemzetség tagjai a basidiomycota élesztők csoportjába tartozó gombák közül humánpatogén vonatkozással is bírnak. Vizsgálataink célja az volt, hogy információkat nyerjünk ezen gombák ma még nagyrészt ismeretlen genetikai rendszeréről; feltárjuk intraspecifikus variabilitásukat; használható biokémiai, genetikai markereket találjunk a törzstipizálási eljárások, illetve a további genetikai analízis számára; információkat szerezzünk biokémiai, fiziológiai jellegzetességeikről; adatokat szerezzünk az extrakromoszómális genetikai elemeikről, mindenekelőtt a mitokondriális genom szerveződéséről, továbbá célunk volt filogenetikai viszonyaik vizsgálata.

Elsőként hat *C. hungaricus* izolátumot morfológiai, fiziológiai, biokémiai tulajdonságaik alapján jellemeztünk. Kimutattuk, hogy sejtmorfológiájukat, színanyagspektrumukat tekintve rendkívül heterogének az izolátumok. A sejtek karotenoid tartalmának elemzése során megállapítottuk, hogy a színanyag nem asztaxantin. Igazoltuk, hogy a *C. hungaricus* izolátumai petite negatívok, tapasztalataink szerint egy izolátum kivételével (CBS 6569) extrém magas (100 µg/ml) etídium-bromid koncentrációt is tolerálnak. A törzsek szénasszimilációs képességének vizsgálatába bevont 22 szénforrás hasznosításában jellegzetes eltéréseket tudtunk kimutatni. Ennek mértéke különösen kifejezett volt a CBS 6569-es izolátum esetében, amelynek spektruma sokkal inkább volt hasonló a *Cystofilobasidium capitatum*-éhoz, mint a faj típustörzséhez (CBS 4214^T). Kísérleteink eredményeként olyan specifikus szénasszimilációs markereket azonosítottunk, amelyek alkalmasak az általunk vizsgált izolátumok megbízható identifikálására.

Az intraspecifikus polimorfizmus genetikai módszerekkel történő igazolására RAPD analízist végeztünk, eredményképpen erős intraspecifikus genetikai variabilitást észleltünk. Két random primerrel az egyes izolátumokra specifikus amplifikációs termékeket sikerült azonosítanunk. Mindezek mellett két törzs (CBS 6324, CBS 6576) RAPD mintázatában egyezőnek bizonyult. Bár populációdinamikai szempontból a heterogén előfordulási környezet (az egyes izolátumok változatos élőhelyei miatt) szerepet játszhat a magas intraspecifikus polimorfizmus megjelenésében, ennek ellenére a RAPD mintázatok, illetve a szénforráshasznosítás rendkívüli polimorfikus jellege felvetette az esetleges pontatlan taxonómiai besorolás lehetőségét.

Bár a gombák esetében széles körben foglalkoznak a mitokondriális DNS fizikai és funkcionális tulajdonságainak vizsgálatával, a basidiomycota élesztőgombák esetében ez a terület még feltáratlan, így kísérleti programunk részeként tanulmányoztuk a *C. hungaricus* izolátumok mitokondriális genomját. Elektronmikroszkópos és restrikciós enzimekkel (*Bgl*II, *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV és *Hind*III) végzett vizsgálataink eredményeként meghatároztuk 5 izolátum mtDNS méretét (CBS 4214: 27,1 kb; CBS 5124: 28,04 kb; CBS 6324, 6576: 28,41 kb; CBS 6953: 30,07 kb). Restrikciós térképeket készítettünk, majd *A. nidulans*, illetve *A. carbonarius* mitokondriális DNS-éből származó heterológ, majd PCR reakció során keletkezett termékekből egyedi homológ génpróbákat hoztunk létre, amelyek segítségével funkcionális térképeket szerkesztettünk. A típus törzs (CBS 4214^T) restrikciós térképén az apocitokrómban (*cob*); a NADH dehidrogenáz második, harmadik, negyedik, ötödik alegységének (*nad2*; *nad3*; *nad4*; *nad5*) és a riboszómális RNS kis illetve nagy alegységének (*rns*; *rnl*) géneit lokalizáltuk. Az ATP-áz gének közül az *atp8* illetve citokrómban oxidáz génkomplex egyes alegységének génjét, a *cox1* gént sikerült a restrikciós hasítási térképen elhelyeznünk. Két izolátum - a CBS 6324 és a CBS 6576 - az általunk alkalmazott restrikciós enzimekkel és génpróbákkal vizsgálva teljesen azonos mitokondriális genom szerveződést mutatott. A térképek összevetése során megállapítottuk, hogy a további izolátumok nem csupán mtDNS-ük méretében, hanem génsorrendjükben is nagymértékben különböznek. Mivel a basidiomycota élesztők mitokondriális DNS-éről nem áll rendelkezésre szakirodalmi adat, ezért ezek az információk úttörő jellegűek lehetnek ezen a területen.

Az extrakromoszómális genom tanulmányozása során egyedi, különleges mitokondrium szerveződést figyeltünk meg a CBS 6569-es törzs esetében. A törzs mtDNS preparátumát restrikciós emésztés nélkül agaróz gélen futtatva nyolc különböző méretű, jól elkülönülő sávot figyeltünk meg. A jelenség értelmezése céljából az egyes molekulák DNS tartalmát RFLP elemzéssel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a restrikciós emésztési kép hasonlósága miatt, az analizált molekulák szekvenciája feltételezhetően erős átfedéseket mutat. A basidiomycota élesztők közé tartozó *Cystofilobasidium capitatum* molekuláris genetikai markereit tekintve, közeli rokonságban áll a *C. hungaricus* CBS 6569-es izolátummal. MtDNS-ének vizsgálata során a fent leírtakhoz rendkívül hasonló molekuláris szerkezettel rendelkező mitokondriális genomot detektáltunk. Elektroforetikus vizsgálata során 11 sáv jelent meg. Az ilyen jellegzetességgel rendelkező mitokondriális organizáció behatóbb vizsgálata különleges jelentőséggel bíró feladat, mivel nem csupán a többi *C. hungaricus* törzstől mutat jelentős eltérést, hanem azon túlmutatva, az eukarióta mitokondriális genom egy különleges megjelenési formáját jelenti.

2 OFAGE és CHEF módszerek segítségével adatokat szereztünk a *C. hungaricus* faj izolátumainak sejtmagi genetikai állományáról. Megállapítottuk, hogy a kromoszómák számát és méretét tekintve is nagyfokú heterogenitás jellemzi az izolátumokat. Kromoszóma mintázat szintjén, abban az esetben is variabilitást tapasztaltunk, amikor két izolátum (CBS 6324, CBS 6576) extrakromoszómális rendszerét tekintve (mtDNS) illetve RAPD markereinek tekintetében is azonosnak bizonyult.

3 Az izolátumok eredeti leírásakor – az 1960-70-es években – még nem álltak rendelkezésre olyan molekuláris módszerek, amelyek segítségével a klasszikus mikrobiológiai markereken alapuló taxonómiai besorolásokat pontosítani lehetett volna. Az általunk összehasonlított molekuláris genetikai jellemzők eltérései arra utaltak, hogy a faj izolátumainak taxonómiai helye kérdéses. Ennek érdekében a modern filogenetikai módszerek közül többet is felhasználtunk az izolátumok egymáshoz, és más basidiomycota élesztőkhöz való taxonómiai viszonyának felderítésére. A riboszómális RNS gének szekvenciáinak elemzése különösen alkalmas rokonsági viszonyok feltárására. A 26S rDNS D1/D2 régiójának szekvenciaanalízise során megállapítottuk, hogy a faj típustörzse (CBS 4214^T) sokkal inkább rokon a *Bullera armeniaca* fajjal, mint a többi *C. hungaricus* izolátummal. Négy törzs (CBS 5124, CBS 6324, CBS 6576, CBS 6953) jól elkülönült csoportot alkot, míg a CBS 6569 egyértelműen a *Cystofilobasidiales* rendbe tartozónak bizonyult. Az eredmények alátámasztásának céljából számos basidiomycota élesztő D1/D2 régió szekvenciaadatait felhasználva parszimónia analízist végeztünk. Az adathalmazzal végzett elemzés teljesen alátámasztotta az előzőekben leírt eredményeinket. Az új információk szignifikáns jellegét bizonyítják a magas bootstrap értékek (98-100).

Az ITS régió nukleotid szekvenciája - konzervatív jellegéből adódóan - a fajon belüli polimorfizmus egyik kiváló markere lehet. Az izolátumok egymáshoz való viszonyának elemzésére az ITS1-5.8S rDNS-ITS2 régió szekvenciájának parszimónia analízisét választottuk. A PCR reakció segítségével felszaporított régió mind méretében, mind szekvenciájában különbözőnek bizonyult. A típustörzs szekvenciája 100%-os homológiát mutatott a *Bullera armeniaca*-val, ahogy a CBS 6569 és a *Cystofilobasidium capitatum* esetében a homológia szintén magas, 98% volt. A 18S rDNS 600 bázispárnyi szakaszának elemzése további adatokat szolgáltatott feltételezéseink alátámasztására, amelyeket a következőkben tudunk összefoglalni:

1. A *C. hungaricus* izolátumok filogenetikai szempontból heterogénnek bizonyultak.

2. A faj öt izolátuma (CBS 4214^T, CBS 5124, CBS 6324, CBS 6576, CBS 6953) a legújabb basidiomycota rendszerben elfoglalt helyének megfelelően, a Tremellales rend egy jól elkülönülő csoportját alkotja, a *Bullera* nemzetséggel együtt.
3. A faj típustörzse a *Bullera armeniaca*-val mutatott szoros rokonságot.
4. A Tremellales renden belül a *C. hungaricus* izolátumok két „subclade”-ot alkotnak: ezek a CBS 6324-CBS 6576 és a CBS 5124-CBS 6953.
5. A *C. hungaricus* CBS 6569-es izolátum minden valószínűség szerint téves meghatározás miatt került a faj izolátumai közé. Molekuláris markereinek elemzése arra enged következtetni, hogy a *Cystofilobasidiales* rendbe tartozó fajról van szó, nagy valószínűséggel *Cystofilobasidium capitatum*-ról.

The anamorphic *Cystofilobasidium hungaricus* (described by Zolt. 1957) is a psychrophile yeast, which has reddish colonies. It belongs to the class of Hymenomycetes, subclass of Tremellomycetidae and clade of Tremellales.

In this study we detected intraspecific polymorphism of *C. hungaricus* strains and clarified the phylogenetic relationships among the strains. The modern phylogenetic analysis, which mainly based on molecular characteristics, revealed that the six isolates were dispersed to two distant clades of the Hymenomycetes. Five of them are representatives of the Tremellales clade (CBS 4214^T, 5124, 6324, 6576, 6953) and one of them belongs to the distant related *Cystofilobasidium* clade (CBS 6569).

Classic examinations as cell morphology and C-source utilization analysis could not serve detailed results to study the relationships among the six isolates but a few observations could be established. Based on morphological characters for example shape of the cells, none of the strains were similar to the type strain (CBS 4214^T) and based on assimilation spectra CBS 6569 did not look similar to the other members of the species.

Modern molecular examination methods were introduced to detail analysis of the six strains of *C. hungaricus*, which resulted in the raising of the taxonomic re-classification of the six isolates.

Numbers and sizes of chromosomes were analysed by CHEF experiment in the case of the six *C. hungaricus* strains. Chromosome patterns of the isolates showed strong polymorphism that also confirm the heterogeneity of the six isolates.

RAPD analysis of the total DNAs obtained by six different primers proved the heterogeneity of the six isolates. On the base of RAPD analysis four similarity groups could be distinguished. The type strain CBS 4214^T with strain CBS 5124, the CBS 6324 with CBS

6. SUMMARY

Basidiomycetous yeasts represent about 1% of the known yeasts in nature. In spite of this, they have considerable economic, agricultural and medical importance as they produce bioactive compounds, for example carotenoid like pigments, antioxidants and lipids.

The anamorphic genus *Cryptococcus* Vuillemin has been described as basidiomycetous yeasts having capsulated cells, not forming pseudomycelia, not fermenting sugars, utilizing inositol and D-glucuronate and producing amyloid-like compounds. Cell wall hydrolyzates contain xylose. Several species have orange or red colonies owing to the presence of carotenoids. At present 34 species have been accepted in the genus.

The anamorphic *Cryptococcus hungaricus* (described by Zsolt 1957) is a psychrophile yeast, which has reddish colonies. It belongs to the class of Hymenomycetes, subclass of Tremellomycetidae and clade of Tremellales.

In this study we detected intraspecific polymorphism of *C. hungaricus* strains and clarified the phylogenetic relationships among the strains. The modern phylogenetic analysis, which mainly based on molecular characteristics, revealed that the six isolates were dispersed to two distant clades of the Hymenomycetes. Five of them are representatives of the Tremellales clade (CBS 4214^T, 5124, 6324, 6576, 6953) and one of them belongs to the distant related *Cystofilobasidium* clade (CBS 6569).

Classic examinations as cell morphology and C-source utilization analysis could not serve detailed results to study the relationships among the six isolates but a few observations could be established. Based on morphological characters for example shape of the cells, none of the strains were similar to the type strain (CBS 4214^T) and based on assimilation spectra CBS 6569 did not look similar to the other members of the species.

Modern molecular examination methods were introduced to detail analysis of the six strains of *C. hungaricus*, which resulted in the raising of the taxonomic re-classification of the six isolates.

Numbers and sizes of chromosomes were analysed by CHEF experiments in the case of the six *C. hungaricus* strains. Chromosome patterns of the isolates showed strong polymorphism that also confirm the heterogeneity of the six isolates.

RAPD analysis of the total DNAs obtained by six different primers proved the heterogeneity of the six isolates. On the basis of RAPD analysis four similarity groups could be distinguished. The type strain CBS 4214^T with strain CBS 5124, the CBS 6324 with CBS

6576 showed similarity but the isolates CBS 6569 and CBS 6953 were totally different from the others.

MtDNA RFLP profiles generated by *Bgl*III, *Hind*III, *Eco*RI, *Eco*RV, and *Bam*HI restriction enzymes were compared to further study on relationship of the *C. hungaricus* strains. The patterns obtained were identical in the case of CBS 6324 and 6576 and the other four strains had unique mtDNA RFLP profiles. This strong heterogeneity indicated the altered structural organisation of the mitochondrial genomes that inspired us to construct the restriction maps of the six mtDNAs. Exception of strain CBS 6569, mtDNA physical maps were developed at least by four restriction enzymes. Applying PCR products of mitochondrial genes from *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus carbonarius* (*rnl*, *rns*, *nad5*, *nad4L*, *coba*, *nad2*, *atp6*) as DNA probes in Southern hybridization experiments functional maps were constructed. The physical map and gene order of the mitochondrial genomes of strains CBS 6324 and 6576 proved to be identical, but the remains differed from each other. MtDNA organisation of strain CBS 6569 showed an extreme form, since the purified intact mtDNA - without any enzyme digestions - showed at least eight separated bands with different sizes (2-20 kb) by electrophoresis. Restriction analysis of the separated molecule bands indicated similar nucleotide sequences of these native mitochondrial DNA fragments. Enzymes with frequent cutting sites developed identical RFLP profiles, which suggested that the fragments were organized by large oligomer elements. This type of mitochondrial genome organization proved to be unique and differed from the mtDNA organization of other strains. Since our results on D1/D2 and ITS1-ITS2 sequences of *C. hungaricus* isolates revealed that the strain CBS 6569 is closely related to the Cystofilobasidiales clade, mtDNA of *Cystofilobasidium capitatum* was purified and electrophorised. It showed similar profile as CBS 6569, the native mtDNA separated into eleven fragments with sizes of 1,1 kb to 15 kb by electrophoresis.

Modern taxonomic analysis were performed to classify the examined strains in to the correct taxonomic place that better reflects the reality. Modern taxonomic technology uses the comparing of DNA sequences of certain region of the nuclear genome. The most suitable nuclear regions to comparative sequence analysis are the D1/D2 regions of the 26S rDNA, ITS1 and ITS2 regions with the 5.8S rDNA and the partial sequence of the 18S rDNA. Sequences of the D1/D2 regions of the 26S rRNA genes of *C. hungaricus* isolates and nine additional species representing the Tremellales order and several members of Cystofilobasidiales were also examined. Parsimony analysis of the region indicates that *C. hungaricus* isolates are genetically heterogeneous. Two major branches could be recognized

in our analysis: one containing ten species of the Tremellales clade, while the other branch consisted of four Cystofilobasidiales species. All but one of the *C. hungaricus* isolates were found to belong to the Tremellales clade, and closely related to *Bullera armeniaca* and *B. crocea*. This clade was also observed when D1/D2 sequences of 120 other basidiomycetous yeasts were included in the analysis. The type strain proved to be in closer relationship to *Bullera armeniaca* than to other *Cryptococcus hungaricus* isolates. The CBS 6569 clearly belongs to the Cystofilobasidiales order, forming a well-supported clade together with *Cystofilodasidium capitatum*. Fell et al. observed two main clades within Cystofilobasidiales, both of which were found to include *Cryptococcus* species. *C. hungaricus* CBS 6569 belongs to the *Cystofilobasidium* subclade.

Length polymorphisms were observed between the *C. hungaricus* strains in both ITS1 and ITS2 regions. The size of ITS1 ranged from 124 (CBS 4214^T) to 148 bp (CBS 6576), while that of ITS2 ranged from 181 (CBS 4214^T) to 269 bp (CBS 6569). In the relatively short region of 5.8S rDNA (155 bp), nucleotide sequence differences were detected between CBS 4214^T and 6569 (7 nt), CBS 5124 and 6569 (7 nt), CBS 6569 and 6953 (8 nt). 5.8 S rDNA sequences of CBS 6324 and 6576 were identical. Sequences of the ITS regions were involved in the phylogenetic analysis. Phylogenetic analysis of this region proved that isolates CBS 6324 and CBS 6576 were closely related with each other, while isolates CBS 5124 and CBS 6953 also show close relation. The type strain of *C. hungaricus* (CBS 4214^T) was found to be closely related to *Bullera armeniaca*, while strain CBS 6569 was closely related to a *Cystofilobasidium* species, in accordance with our previously discussed results.

Partial sequences of the 18S rRNA genes of *C. hungaricus* isolates were also determined and subjected to phylogenetic analysis. The topology of the phylogram is similar to those based on phylogenetic analyses of the D1/D2, and ITS data sets.

Morphological and physiological analyses of *Cryptococcus hungaricus* isolates together with molecular data indicate that isolates assigned to the *C. hungaricus* species are genetically heterogeneous. The type strain of the species (CBS 4214^T) was found to be more closely related to *Bullera armeniaca* than to other *C. hungaricus* isolates. These isolates together with four other *C. hungaricus* isolates and a *B. crocea* strain formed a well-defined clade supported. Although micromorphological and C-utilisation patterns indicated that four of these isolates are possibly conspecific, further relationships could not be resolved

unambiguously within this clade. Nuclear DNA reassociation experiments are needed to clarify whether these isolates represent a single, or two separate species.

Ang G C-utilization spectra, micromorphological studies, and sequence data indicated that isolate CBS 6569 belongs to the *Cystofilobasidium* clade. Original identification of this strain was made solely on phenotypic bases, but suspected to be incorrect. However at that time there were no tools to prove this assumption (J. W. Fell, personal communication). More detailed studies including other representatives of *Bullera armeniaca* and other *Bullera* species, and *Cystofilobasidium* species are needed to clarify the taxonomic positions of these isolates.

Bandoni R J 1995 Dimorphic Heterobasidiomycetes taxonomy and parasitism *Stud Mycol* 39 13-28

Bauer R, Oberwinkler F, Deml G 1989 Ultrastruktur der Basidiensepten phragmobasidialer *Brandpilze* *Z Mykol* 55 163-168

Bauer R, Oberwinkler F, Vanky K 1997 Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa *Can J Bot* 75 1373-1384

Belloch C, Batra E, Garcia M, D. Querol A 1998 Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S-rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers *Syst Appl Microbiol* 21 266-275

Bendich A J 1993 Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure *Curr Genet* 24 279-290

Boekhout T, Nakase T 1998 *Bullera* Drex. In *The Yeasts: a Taxonomic Study* 4th edn pp 731-741 Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell Amsterdam: Elsevier

Boekhout T, Bandoni R J, Fell J W, Kwon-Chung K J 1998 Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts. In *The Yeasts: a Taxonomic Study* 4th edn pp 609-626 Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell Amsterdam: Elsevier

Boekhout T, Belknap A, van Laender A, C. Verbrugghe H, A. Mukamurungwa P, Sultani D, & Schaffers W A 1997 Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects *Int J Syst Bacteriol* 47 432-442

Boekhout T, Fell J W, O'Donnell K 1995 Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the Ustilaginiales and Tilletiales *Stud Mycol* 38 175-183

Boekhout T, Yamada Y, Weijman A, C. M. Rossmann H J, Batenburg-van der Vogen W H 1992 The significance of exoenzyme Q carbohydrate composition and apical ultrastructure for the taxonomy of ballistocarpic-forming yeasts and fungi *Syst Appl Microbiol* 15 1-10

Bruce T D, White T J, Taylor J W 1991 Fungal molecular systematics *Annu Rev Ecol Syst* 22 523-564

7. IRODALOMJEGYZÉK

- An G H Johnson E A 1990 Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma* *J Microbiol Serol* 57 191
- Andrewes G Phaff H J Starr M P 1976 Carotenoids of *Phaffia rhodozyma* a red-pigmented fermenting yeast *Phytochem* 15 1003-1007
- Baldwin B G Sanderson M J Porter J M Wojciechowski J Campbell C S Donoghue M J 1995 The ITS region of nuclear ribosomal DNA a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny *Ann Missouri Bot Gard* 82 247- 277
- Bandoni R J 1995 Dimorphic Heterobasidiomycetes taxonomy and parasitism *Stud Mycol* 39 13-28
- Bauer R Oberwinkler F Deml G 1989 Ultrastruktur der Basidiensepten phragmobasidialer Brandpilz *Z Mykol* 55 163-168
- Bauer R Oberwinkler F Vanky K 1997 Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa *Can J Bot* 75 1273-1314
- Belloch C Barrio E Garcia M D Querol A 1998 Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces* restriction map analysis of the 5 8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers *Syst Appl Microbiol* 21 266-273
- Bendich A J 1993 Reaching for the ring the study of mitochondrial genome structure *Curr Genet* 24 279-290
- Boekhout T Nakase T 1998 Bullera Derx In *The Yeasts a Taxonomic Study* 4th edn pp 731-741 Edited by C P Kurtzman & J W Fell Amsterdam Elsevier
- Boekhout T Bandoni R J Fell J W Kwon-Chung K J 1998 Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts In *The Yeasts a Taxonomic Study* 4th edn pp 609-626 Edited by C P Kurtzman & J W Fell Amsterdam Elsevier
- Boekhout T Belkum A van Leenders A C Verbrugh H A Mukamurangwa P Swinne D & Scheffers W A 1997 Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* taxonomic and epidemiological aspects *Int J Syst Bacteriol* 47 432-442
- Boekhout T Fell J W O'Donnell K 1995 Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the Ustilaginales and Tilletiales *Stud Mycol* 38 175-183
- Boekhout T Yamada Y Weijman A C M Roeijmans H J Batenburg-van der Vegte W H 1992 The significance of coenzyme Q carbohydrate composition and septal ultrastructure for the taxonomy of ballistoconidia-forming yeasts and fungi *Syst Appl Microbiol* 15 1-10
- Bruns T D White T J Taylor J W 1991 Fungal molecular systematics *Annu Rev Ecol Syst* 22 525-564

Cai J Roberts I N Collins M D 1996 Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces* *Debaryomyces* *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences *Int J Syst Bacteriol* 462 542-549

Camin J H Sokal R R 1965 A method for deducting branching sequences in phylogeny *Evolution* 19 311-326

Carlotti A Srikantha T Schroppel K Kvaal C Villard J Soll D R 1997 A novel repeat sequence CKRS-1 containing a tandemly repeated sub-element *kre* accounts for differences between *Candida krusei* strains fingerprinted with the probe CkFl 2 *Curr Genet* 31 255-263

Cavali-Sforza L L Edwards A W F 1967 Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 32 550-570

Chen C 1998 Morphological and molecular studies in the genus *Tremella* *Bibl Mycol* 174 1-225

Clark-Walker G D 1992 Evolution of mitochondrial genomes in fungi *Int Rev Cytol* 141 89-127

Coria O R Zalce M E Valentín Mendoza R O Alvarez J G de Cobos A T Brunner L A 1990 Restriction site variation length polymorphism and changes in gene order in the mitochondrial DNA of the yeast *Kluyveromyces lactis* *Antonie van Leeuwenhoek* 58 227-234

Cummings D J Domenico J M Nelson J Sogin M L 1989 DNS sequence structure and phylogenetic relationship of the small subunit rRNA coding region of mitochondrial DNA from *Podospira anserina* *J Mol Evol* 28 232-241

Cummings D J McNally K L Domenico J M Matsuura E T 1990 The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospira anserina* *Curr Genet* 17 375-402

Diaz M R Fell J W 2000 Systematics of psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia* based on ITS and IGS rDNA sequence analysis *Antonie Leeuwenhoek* 77 7-12

Eriksson O E 1995 DNA and ascomycete systematics *Can J Bot* 73suppt 1 S784-S789

Fabritius A L Judelson H S 1997 Mating-type loci segregate aberrantly in *Phytophthora infestans* but normally in *Phytophthora parasitica* implications for models of mating-type determination *Curr Genet* 321 60-65

Fan M Chen L C Ragan M A Gutell R R Waroer J R Currie B P Casadevall A 1995 The 5S rRNA and the rRNA intergenic spacer of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* *J Med Vet Mycol* 33 215-221

Fell J W Kurtzman C P 1990 Nucleotide sequence analysis of a variable region of the large subunit rRNA for identification of marine occurring yeasts *Curr Microbiol* 21 295-300

Fell J W Kurtzman C P 1990 Nucleotide sequence analysis of a variable region of the large subunit rRNA for identification of marine occurring yeasts *Curr Microbiol* 21 295-300

Fell J W Statzell-Tallman A 1992 Systematic placement of the basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium lari-marini* comb nov as predicted by rRNA nucleotide sequence analysis *Antonie van Leeuwenhoek* 62 209-213

Fell J W Boekhout T Freshwater D W 1995 The role of nucleotide analysis in the systematics of the yeast genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula* *Stud Mycol* 38 129-146

Fell J W Boekhout T Fonseca A Scorzetti G Statzell-Tallman A 2000 Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis *Int J Syst Evol Microbiol* 50 1351-1371

Fell J W Statzell-Tallman A Lutz M J Kurtzman C P 1992 Partial rRNA sequences in marine yeasts a model for identification of marine eukaryotes *Mol Mar Biol and Biotech* 13 175-186

Felsenstein J 1981 Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach *J Mol Evol* 17 368-376

Fernandez D Assigbese K Dubois M P Geiger J P 1994 Molecular characterisation of races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f sp *vasinfecum* *Appl Environ Microbiol* 60 4039-4046

Foster L M Kozak K R Loftus M G Stevens J J Ross I K 1993 The polimerase chain reaction and its application to filamentous fungi *Mycol Res* 97 769-781

Giménez-Jurado G Valderrama M J Sá-Nogueira I Spencer-Manins I 1995 Assessment of phenotypic and genetic diversity in the yeast genus *Metschnikowia* *Antonie van Leeuwenhoek* 68 101-110

Gouliamova D E Hennebert G L Smith M T van der Walt J P 1998 Diversity and affinities among species and strains of *Lipomyces* *Antonie van Leeuwenhoek* 74 283-291

Grossman L I Hudspedt M E S 1985 Fungal mitochondrial genomes In *Gene Manipulations in Fungi* Bennet J W Lasuret L L 65-103

Guého E Kurtzman C P Peterson S W 1990 Phylogenetic relationships among species of *Sterigmatomyces* and *Fellomyces* as determined from partial rRNA sequences *Int J Syst Bacteriol* 40 1 60-65

Guého E Improvisi L Christen R de Hoog G S 1993 Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences *Antonie Leeuwenhoek* 63 175-189

Guého E Kurtzman C P Peterson S W 1989 Evolutionary anities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S ribosomal RNA sequence divergence *Syst Appl Microbiol* 12 230-236

Guillamón J M Barrio E Huena T Querol A 1994 Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns *Int J Syst Bacteriol* 444 708-714

Guillamón J M Sabate J Barrio E Cano J Querol A 1998 Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer ITS region *Arch Microbiol* 169 387-392

Gutell R R Fox G 1988 Compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format *Nucleic Acids Res* 16suppl r175-r269

Haase G Sonntag L van de Peer Y Uijhof J M J Podbielski A Melzer-Krick B 1995 Phylogenetic analysis of ten black yeast species using nuclear small subunit rRNA gene sequences *Antonie van Leeuwenhoek* 68 19-33

Hamari Zs Pfeiffer I Ferenczy L Kevei F 1999 Interpretation of variability of mitochondrial genomes in the species *Aspergillus carbonarius* *Antonie van Leeuwenhoek*

Hamelin R C Rail J 1997 Phylogeny of *Gremmeniella* spp based on sequences of the 5.8S rDNA and internal transcribed spacer region *Can J Bot* 75 693-698

Hauswirth W W Lim L O Dujon B Turner G 1987 Methods for studying the genetics of mitochondria In Darley-Usmar V M Rickwood D Wilson M T Eds *Mitochondria* pp 171-244 IRL Press Oxford

Haynes K A Westerneng T J Fell J W Moens W 1995 Detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA *J Med Vet Mycol* 33 319-325

Hendricks L Goris A van de Peer Y Neefs J M Vancanneyt M Kersters K Henneben G L de Wachter R 1991 Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal RNA sequences *J Gen Microbiol* 137 1223-1230

Henning W 1950 *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematic*. Deutscher Zentralverlag Berlin

Henning W 1966 *Phylogenetic systematics* Univ Illinois Press Urbana

Hibbett D S Donoghue M J 1995 Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parcimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences *Can J Bot* 73suppl I S853-S861

Hintz WE Jeng RS Hubbes MM Horgen PA 1991 Identification of three populations of *Ophiostoma ulmi* aggressive subgroup by mitochondrial DNA restriction-site mapping and nuclear DNA fingerprinting *Exp Mycol* 15 316-325

Holst-Jensen A Kohn L M Jakobsen K S Schumacher T 1997 Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia* Sclerotiniaceae based on coding and noncoding rDNA sequences *Am J Bot* 845 686-701

Hu J Quiros C F 1991 Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers *Plant Cell Rep* 10 505-511

Hudspeth M E S 1992 The fungal mitochondrial genome - A broader perspective In Arora DK Elander RP Mukerji KG Eds Handbook of Applied Mycology Vol 4 Fungal Biotechnology pp 213-241 Marcel Dekker Inc New York

James S A Cai J Roberts I N Collins M D 1997 A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences description of *Saccharomyces kunashirensis* sp nov and *Saccharomyces martiniae* sp nov Int J Syst Bacteriol 472 453-460

James S A Collins M D Roberts I N 1996 Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically close related species of the genera *Zygo-saccharomyces* and *Torulaspora* Int J Syst Bacteriol 461 189-194

James S A Roberts I N Collins M D 1998 Phylogenetic heterogeneity of the genus *Williopsis* as revealed by 18S rRNA gene sequences Int J Syst Bacteriol 48 591-596

Judelson H S Spielman L J és Shattock R C 1995 Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete *Phytophthora infestans* Genetics 1412 503-512

Kevei F Hamari Zs Varga J Kozakiewicz Z Croft J H 1996 Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius* Antonie van Leeuwenhoek 70 59-66

Kimura M 1980 A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies on nucleotide sequences J Mol Evol 2 87-90

Kreger-van Rij N J W Veenhuis M 1971 A comparative study of the cell wall structure of basidiomycetous and related yeasts J Gen Microbiol 68 87-95

Kreger-Van Rij N J W 1987 The Yeast, a taxonomic study 3rd edn Elsevier Amsterdam

Kurtzman C P 1992 rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts Int J Syst Bacteriol 42 1-6

Kurtzman C P Phaff H J 1987 Molecular Taxonomy In The Yeasts Edited by A H Rose and J S Harrison Academic Press London Vol 1 2nd ed pp 63-94

Kurtzman C P 1990 *Candida shehatae* genetic diversity and phylogenetic relationships with other xylose-fermenting yeasts Antonie van Leeuwenhoek 57 215-222

Kurtzman C P Robnett C J 1994 Synonymy of the yeast genera *Wingea* and *Debaryosyces* Antonie van Leeuwenhoek 66 337-342

Lachance M A 1990 Ribosomal DNA spacer variation in the cactophilic yeast *Clavispora opuntiae* Mol Biol Evol 72 178-193

Láday M, Pfeiffer I, Kucsera J, Kevei F, Gácsér A, Szécsi Á, Hamari Zs 2001 Preparation of mitochondrial DNA from Yeast and filamentous fungi. BioTechniques 30 1232-1239

Lang D Mitani M 1970 Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers Biopolymers 9 373-379

Leach J Finkelstein D B Rambosek J A 1986 Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi
Fungal Genet Newslett 33 32-33

Lehmann P F Wu L C Pruitt W R Meyer S A Ahearn D G 1993 Unrelatedness of groups of yeasts within the *Candida haemulonii* complex *J Clin Microbiol* 317 1683- 1687

Liu Z Kurtzman C P 1991 Phylogenetic relationships among species of *Williopsis* and *Saturnospora* gen nov as de- termined from partial rRNA sequences *Antonie van Leeuwenhoek* 60 21-30

Lott T J Burns B M Zancope-Oliveira R Elie C M Reiss E 1998 Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 ITS2 from yeast species within the genus *Candida* *Curr Microbiol* 36 63-69

Magee B B D'Souza T M Magee P T 1987 Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species *J Bacteriol* 169 1639-1643

Maleszka R Skelly P J Clark-Walker G D 1991 Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria *The EMBO Journal* 10(12) 3923-3929

Mannarelli B M Kurtzman C P 1998 Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR *J Clin Microbiol* 366 I 634-641

McCarroll R Olsen G J Stahl Y D Woese C R Sogin M L 1983 Nucleotide sequence of *Dictyostelium discoideum* small-subunit ribosomal ribonucleic acid inferred from the gene sequence evolutionary implications *Biochemistry* 22 5858- 5868

McCultough M J Clemons K V Stevens D A 1999 Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea* *J Clin Microbiol* 37 417- 421

McCultough M J Clemons K V McCusker J H Stevens D A 1998b Species identification and virulence attributes of *Sacharomyces boulardi* nom inval *J Clin Microbiol* 36 2613- 2617

McCultough M J Clemons K V McCusker J H Stevens D A 1998a Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids *J Clin Microbiol* 364 1035-1038

McLaughlin E Frieders M Lu H 1995 A microscopist's view of heterobasidiomycete phylogeny *Stud Mycol* 38 91-110

Mendonca-Hagler LC Hagler A N Kurtzman C P 1993 Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences *Int J Syst Bacteriol* 432 368-373

Messner R Prillinger H Ibl M Himmler G 1995 Sequences of ribosomal genes an internal transcribed spacers move three plant parasitic fungi *Eremothecium ashbyi* *Ashbya gossypii* and *Nematospora coryli* towards *Saccharomyces cerevisiae* *J Gen Appl Microbiol* 41 31-42

Mitchell T G Freedman E Z White T J Taylor J W 1994 Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans* J Clin Microbiol 32 253-255

Molina F I Inoue T Jong S C 1992 Restriction polymorphisms in the internal transcribed spacers and 5 8S rDNA of *Saccharomyces* Curr Microbiol 25 251-255

Montrocher R Verner M C Briolay J Gautier C Marmeisse R 1998 Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphism of rDNA spacer sequences Int J Syst Bacteriol 48 295-303

Moore R T 1998 Cytology and ultrastructure of yeasts and yeast-like fungi In *The Yeasts a Taxonomic Study* 4th edn pp 33-44 Edited by C P Kurtzman J W Fell Amsterdam Elsevier

Moulinier T Barroso G Labarere J 1992 The mitochondrial genome of the basidiomycete *Agrocybe aegerita* molecular cloning physical mapping and gene location Curr Genet 21 499-505

Nakase T Takematsu A Yamada Y 1993 Molecular approaches to the taxonomy of ballistosporous yeasts based on the analysis of the partial nucleotide sequences of 18S ribosomal ribonucleic acids J Gen Appl Microbiol 39 107-134

Naumov G Naumova E S Lantto R A Louis E J Korhola M 1992 Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S paradoxus* and *S bayanus* electrophoretic karyotypes Yeast 8 599-612

O'Donnell K L McLaughlin D J 1984 Ultrastructure of meiosis in *Ustilago maydis* Mycologia 76 468-485

Oda Y Yabuki M Tonomura K Fukunaga M 1999 Sequence analysis of 18S-28S rRNA spacer regions from *Saccharomyces kunashirensis* *S martiniae* *S rosinii* and *S transvaalensis* Curr Microbiol 38 61-63

Pernice I Passo C Crisco G Pernice A Todaro-Luck F 1998 Molecular subtyping of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype A isolated from southern Italy Mycoses 41 117-124

Peterson S W Kurtzman C P 1990 Phylogenetic relationships among species of the genus *Issatchenkia* Kudriavzev Antonie van Leeuwenhoek 58 235-240

Peterson S W Kurtzman C P 1991 Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts Syst Appl Microbiol 14 124-129

Phaff H J Fell J W 1970 Genus 3 *Cryptococcus* Kuntzig emend Phaff et Spencer In *The Yeasts a Taxonomic Study* North-Holland Publ Co Amsterdam

Piskur J Mozina S S Stederup J Petersen M B 1995 A mitochondrial marker *ori-rep-tra* for differentiation of yeast species App Environ Microbiol 61 2780-2782

Piskur J Smole S Groth C Petersen R F Petersen M B 1998 Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces* *Int J Syst Bacteriol* 48 1015-1024

Podani J 1997 Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe *Scientia Kiadó Budapest*

Prillinger H Deml G Dorfler C Laaser G Lockau W 1991 Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie Höherer Pilze Hefe-Typen der Basidiomyceten Teil II *Microbotryum-Typ Bot Acta* 104 5-17

Prillinger H Dorfler C Laaser G Hauska G 1990 Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie Höherer Pilze Hefe-Typen der Basidiomyceten Teil III *Ustilago-Typ Z Mykol* 56 251-278

Prillinger H Oberwinkler F Umile C Tlachac K Bauer R Dorfler C Taufrazthofer E 1993 Analysis of cell wall carbohydrates neutral sugars from ascomycetous and basidiomycetous yeasts with and without derivatization *J Gen Appl Microbiol* 39 1-14

Prillinger H Schweigkofler W Breitenbach M Weigang F Ibl M Ellinaer A 1997 Phytopathogenic filamentous *Aslibya Eremothecium* and dimorphic fungi *Holleya Nematospora* with needle-shaped ascospores as new members within the *Saccharomycetaceae* *Yeast* 13 945-960

Ramos J P Valente P Hagler A N Leoncini O 1998 Restriction analysis of the ITS region for characterization of *Debaryomyces* species *J Gen Appl Microbiol* 44 399-404

Rédei Gy 1987 *Genetika Mezőgazdasági kiadó Gondolat Budapest*

Roeijmans H Prillinger H Umile C Sugiyama J Nakase T Boekhout T 1998 Analysis of carbohydrate composition of cell walls and extracellular carbohydrates In *The Yeasts a Taxonomic Study* 4th edn pp 99-101 Edited by C P Kurtzman J W Fell Amsterdam Elsevier

Saitou N Imanishi T 1989 Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum parsimony, maximum-likelihood, minimum evolution, and neighbor joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree *Mol Biol Evol* 6 514-525

Saitou N Nei M 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4 406-425

Sambrook J Fritsch E F Maniatis T 1989 *Molecular cloning In: A laboratory manual* 2nd Edn Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor New York

Schramke M L Orłowski M 1993 Mitochondrial genome of the dimorphic zygomycete *Mucor racemosus* *Curr Genet* 24 337-343

Schroeder W A Johnson E A 1993 Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma* *J Gen Microbiol* 139 907-912

Sekiguchi J Ohsaki T Zamamoto H Koichi K Shida T 1990 Characterization and comparison of mitochondrial DNAs and RNAs from *Penicillium urticae* and *P. chrysogenum* *J Gen Microbiol* 136 535-543

Shen R Lachance M A 1993 Phylogenetic study of ribosomal DNA of cactophilic *Pichia* species by restriction mapping *Yeast* 9 315-330

Simmons R B Ahearn D G 1987 Cell wall ultrastructure and diazonium blue B reaction of *Sporopachydermia quercuum Bullera tsugae* and *Malassezia* spp *Mycologia* 79 38-43

Smith M L Anderson J B 1994 Mitochondrial DNAs of the fungus *Armillaria ostoyae* restriction map and length variation *Curr Genet* 25 545-553

Sneath P H Sokal R R 1973 Numerical taxonomy Freeman San Francisco

Specht C A Novotny C P Ullrich R C 1992 Mitochondrial DNA of *Schizophyllum commune* restriction map genetic map and mode of inheritance *Curr Genet* 22 129-134

Steels H Bond C J Collins M D Roberts I N Stratford M James S A 1999 *Zygosaccharomyces lentus* sp nov a new member of the yeast genus *Zygosaccharomyces* Barker *Int J Syst Bacteriol* 49 319-327

Sugiyama J Suh S O 1993 Phylogenetic analysis of basidiomycetous yeasts inferred from small subunit ribosomal DNA sequence *J Gen Microbiol* 139 1595-1598

Suh S O Nakase T 1995 Phylogenetic analysis of the ballistosporogenous anamorphic genera *Udeniomyces* and *Bullera* and related basidiomycetous yeasts based on 18S rDNA sequence *Microbiology* 141 901-906

Suh S O Sugiyama J 1993 Phylogeny among the basidiomycetous yeasts inferred from small subunit ribosomal DNA sequence *J Gen Microbiol* 139 1595-1598

Suh S O Takashima M Hamamoto M Nakase T 1996 Molecular taxonomy of the ballistoconidium-forming anamorphic yeast genus *Bullera* and related taxa based on small subunit ribosomal DNA sequences *J Gen Appl Microbiol* 42 501-509

Swann E A Taylor J W 1995a Phylogenetic diversity of yeast-producing basidiomycetes *Mycol Res* 99 1205-1210

Swann E A Taylor J W 1995b Toward a phylogenetic systematics of the Basidiomycota integrating yeasts and Filamentous basidiomycetes using 18S rRNA gene sequences *Stud Mycol* 38 147-162

Swann E A Taylor J W 1995c Phylogenetic perspectives on basidiomycete systematics evidence from the 18S rRNA gene *Can J Bot suppl* 1 73 S862-S868

Swann E A Taylor J W 1993 Higher taxa of basidiomycetes an 18S rRNA gene perspective *Mycologia* 85 923-936

Swofford D L 1990 PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony Ver 3.0 Illinois Natl Hist Surv Campaign Illinois

Swofford D L Olsen G J 1990 Phylogeny reconstruction In: Hillis D M Moritz C Molecular systematics Sinauer Sunderland Mass USA pp 411-501

Takashima M Nakase T 1998 *Bullera penniseticola* sp nov and *Kockovaella sacchari* sp nov two new yeast species isolated from plants in Thailand Int J Syst Bacteriol 48 1025-1030

Takashima M Suh S O Nakase T 1995 *Bensingtonia musae* sp nov isolated from a dead leaf of *Musa paradisiaca* and its phylogenetic relationship among basidiomycetous yeasts J Gen Appl Microbiol 41 143-151

Tudzynski P Duvell A Esser K 1983 Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea* I. Mitochondrial DNA and mitochondrial plasmids Curr Genet 7 145-150

Tudzynski P Weltring K -M 1993 Molecular genetics of Phytopathogenic fungi Progress in Botany 54 358-372

Valente P Gouveia F C Lemos G A Pimentel D van Elsas J D Mendonca-Hagler L C Hagler A N 1996 PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures FEMS Microbiol Lett 137 253-256

Valente P Ramos J P Leoncini O 1999 Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy Can J Microbiol 45 949-958

Van de Peer Y Hendriks L Goris A Neefs J M Vancanneyt M Kersters K Berny J F Hennebert G L De Wachter R 1992 Evolution of basidiomycetous yeasts as deduced from small ribosomal subunit RNA sequences Syst Appl Microbiol 15 250-258

Walker W F Doolittle W F 1982 Redividing the basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences Nature 299 723-724

Weber C A Hudspeth M E S Moore G P Grossman L I 1986 Analysis of the mitochondrial and nuclear genomes of two basidiomycetes *Coprinus cinereus* and *Coprinus stercorarius* Curr Genet 10 515-525

Weijman A C M Golubev W I 1987 Carbohydrate patterns and taxonomy of yeasts and yeast-like fungi Stud Mycol 30 361-371

Wells K 1994 Jelly fungi then and now! Mycologia 86 18-48

Williams D W Wilson M J Lewis M A O Potts A J C 1995 Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA J Clin Microbiol 33 2476-2479

Williams J G K Kubelik A R Livak K J Rafalski J A és Tingey S V 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers Nucl Acids Res 18 6531-6535

Xu J Mitchell T G Vilgalys R 1999 PCR-restriction fragment length polymorphism RFLP analyses reveal both extensive clonality and local genetic differences in *Candida albicans* Mol Ecol 8 59-73

Yamada Y Kawasaki H 1989 The molecular phylogeny of the Q8-equipped basidiomycetous yeasts genera *Mrakia* Yamada et Komagata and *Cystofilobasidium* Oberwinkler et Bandoni based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids J Gen Appl Microbiol 35 173-183

Yamada Y Nakagawa Y 1992 The phylogenetic relationships of some heterobasidiomycetous yeast species based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs J Gen Appl Microbiol 38 559-565

Yamada Y Arimoto M Kondo K 1977 Coenzyme Q system in the classification of some ascosporogenous yeast genera in the families Saccharomycetaceae and Spermophthoraceae Antonie van Leeuwenhoek 43 65-71

Yamada Y Maeda K Mikata K 1994b The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming nitrate- assimilating *Pichia* species formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs Saccharomycetaceae the proposals of three new genera *Ogataea* *Kuraishia* and *Nakazawaea* Biosci Biotech Biochem 587 1245-1257

Yamada Y Matsuda M Maeda K Mikata K 1994c The phylogenetic relationships of species of the genus *Dekkera* van der Walt based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs Saccharomycetaceae Biosci Biotech Biochem 581 1803-1808

Yamada Y Matsuda M Maeda K Sakakibara C Mikata K 1994a The phylogenetic relationships of the saturn-shaped ascospore-forming species of the genus *Williopsis* Zender and related genera based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs Saccharomycetaceae the proposal of *Komagataea* gen nov Biosci Biotech Biochem 587 1236- 1244

Zsolt J 1957 A new yeast *Dioszegia hungarica* nov gen et sp Botanikai Közl 47 63-66

Zsolt J 1961 Further investigations on *Dioszegia hungarica* Zsolt Acta Biol Szeged 7 81-87

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez úton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kucsera Juditnak, aki elindított a kutatómunka labirintusában, aki fáradhatatlan odafigyeléssel formálta látásmódomat, minden igyekezetével támogatta tevékenységemet, s aki mind emberi tulajdonságaival, mind pedig naprakész, mély szakmai tudásával segítette munkámat.

Köszönetet mondok Dr. habil. Kevei Ferencnek, aki a kezdetektől fogva lehetővé tette számomra azt, hogy a SZTE Mikrobiológiai Tanszékén dolgozhassak, aki bizalommal támogatta és egyengette sorsomat.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Hamari Zsuzsának, akinek rengeteg segítsége és baráti, szemléletformáló tanításai óriási segítséget nyújtottak munkámban.

Köszönetet mondok Dr. Pfeiffer Ilonának, aki végtelen nyugalommal és türelemmel viseltetett irántam, és segítette szakmai fejlődésemet.

Köszönöm Dr. Antal Zsuzsannának és Kredics Lászlónak a baráti jótanácsokat és a sok segítséget.

Köszönöm Dr. Varga Jánosnak a taxonómia területén nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönetemet fejezem ki Nagy Lajos Gergelynek a technikai segítségért, valamint Palágyi Andrásnének, hogy munkámmal kapcsolatos hivatalos ügyeket elrendezte.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom szüleimnek, akik mindvégig mellettem álltak, nyugodt és szeretetteljes háttérrel biztosítva munkám elvégzéséhez.