

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS
Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

Genetikai és rendszertani vizsgálatok a *Rhizomucor* nemzetségben

készítette
Vastag Mária

Témavezető
dr. Vágvölgyi Csaba

Szegedi Tudományegyetem
Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED
2002



TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
BEVEZETÉS	3
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
1.1. A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK FŐBB JELLEMVONÁSAI	4
1.2. A <i>RHIZOMUCOR</i> NEMZETSÉG	5
1.2.1. A <i>Rhizomucor</i> nemzetség jellemzése	7
1.3. A <i>RHIZOMUCOR</i> GÉNUSZBA TARTOZÓ FAJOK JELLEMZÉSE	8
1.3.1. <i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt)	8
1.3.2. <i>Rhizomucor miehei</i> (Conney és Emerson)	10
1.3.3. <i>Rhizomucor tauricus</i> (Milko és Schkurenko)	10
1.4. A GENETIKAI VARIABILITÁS VIZSGÁLATA IZOENZIM ÉS RAPD ANALÍZISSEL	12
1.4.1. Az izoenzim analízis	12
1.4.2. Szénasszimilációs spektrum analízis	14
1.4.3. A RAPD analízis	14
1.4.4. rDNS ITS-RFLP	16
1.5. GÉNTÉCHNIKA	17
1.5.1. Klónozási stratégiák	18
1.6. A GLICERINALDEHID-3-FOSZFÁT DEHIDROGENÁZT KÓDOLÓ GÉN (<i>GPD</i>)	20
1.6.1. A <i>gpd</i> szekvencián alapuló filogenetikai elemzések	20
1.6.2. A <i>gpd</i> promoter szekvenciák alkalmazása transzformációs rendszerekben	21
2. CÉLKITŰZÉSEK	23
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
3.1. A VIZSGÁLT MIKROORGANIZMUSOK	25
3.2. . TÁPTALAJOK ÉS OLDATOK	27
3.3. TENYÉSZTESI KÖRÜLMÉNYEK	28
3.4. IZOENZIM ANALÍZIS	28
3.5. RAPD ANALÍZIS	29
3.6. PCR-RFLP	30
3.7. SZÉNASSZIMILÁCIÓS SPEKTRUM ANALÍZIS	31
3.8. SZÁMÍTÓGÉPES ADATFELDOLGOZÁS	31
3.9. GÉNKLÓNOZÁSHOZ FELHASZNÁLT MÓDSZEREK	32
4.0. PULZÁLTATOTT MEZEJŰ GÉLELEKTROFORÉZIS	38

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS	39
5.1. ZIGOSPÓRÁK VIZSGÁLATA	40
5.2. A <i>RHIZOMUCOR</i> FAJOK GENETIKAI VARIABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	40
5.2.1. Szénasszimilációs spektrum analízis	40
5.2.2. Izoenzim analízis	44
5.2.3. rDNS ITS-RFLP	49
5.2.4. RAPD analízis	51
5.3. A <i>RHIZOMUCOR MIEHEI</i> NRRL 5282 GENOMIÁLIS GENKÖNYVTÁR LÉTREHOZÁSA	56
5.4. HOMOLÓG <i>GPD</i> PRÓBA LÉTREHOZÁSA PCR REAKCIÓVAL	56
5.5. A <i>RHIZOMUCOR MIEHEI</i> GÉN KÖNYVTÁR SZÜRÉSE ÉS A REKOMBINÁNS KLÓNOK AZONOSÍTÁSA	56
5.6. SZUBKLONÓZÁSI ÉS SZEKVENÁLÁSI KÍSÉRLETEK	57
5.7. A <i>RHIZOMUCOR MIEHEI GPD</i> GÉN SZEKVENCIA ANALÍZISE	59
5.8. <i>GPD</i> AMINOSAV SZÉVENCIA ÖSSZEHOSONLÍTÁS	65
5.9. ELEKTROFORETIKUS KARIOTIPIZÁLÁS	68
6. ÖSSZEFOGLALÁS	69
7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ (SUMMARY IN ENGLISH)	72
8. IDÉZETT IRODALOM	76
9. A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉGE	89
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	93

BEVEZETÉS

A járomspórás gombák (Zygomycetes) rendszertanilag jól körülhatárolható, egységes csoportot alkotnak. Ezen osztály különleges jelentőséggel bír az alacsonyabbrendű (*lower fungi*) és magasabbrendű (*higher fungi*) gombák közötti átmeneti jellege miatt. Az idetartozó fajok többsége a Mucorales rend tagja, elsősorban növényi és állati eredetű bomló szerves anyagokon előforduló, talajból izolálható szaprofita szervezet. A növénykárosító gombák döntő többsége ún. raktári kártevő szervezet. Ebből a szempontból kiemelkedő fontosságúnak tekinthetők a *Rhizopus*, *Mucor* és *Gilbertella* nemzetségek egyes tagjai.

A Zygomycetes osztályba tartozó gombák gyakran vizsgált modellszervezetek, különböző szabályzó mechanizmusok, sajátos szexuális folyamataik, vagy a gomba morfogenezis tanulmányozása során. Jelentőségüket tovább növeli, hogy közöttük számos orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk. Orvosi szempontból egyes fajok (mint pl. *Absidia*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* nemzetségek képviselői), mint ún. mucormikózt okozó opportunistáknak érdemelnek figyelmet. Ezek a fertőzések bár viszonylag ritkán fordulnak elő, de erősen progresszív és nehezen kezelhető jellegük miatt igen veszélyesek (WHITEWAY és mtsi. 1979, WEITZMAN és mtsi. 1993). Más fajok ipari törzsei extracelluláris enzimek (pl. lipázok, proteázok) termelőjeként (GOTTFREDSEN 1990, OUTTRUP és BOYCE 1990), vagy értékes biológiai aktivitással rendelkező (pl. szteroidvázak) vegyületek sztereospecifikus hidroxilálójaként (MADYASTHA és SRIVATSAN 1987) kerülnek ipari felhasználásra.

Meglepő módon a járomspórás gombákkal kapcsolatban csak igen szegényes genetikai ismeretanyag áll rendelkezésünkre, habár ezen gombák számos citológiai, biokémiai és ökológiai sajátossága egyértelművé teszi, hogy genetikai vizsgálatuk nem váltható ki más gombacsoportok tanulmányozásával.

Ezért céljaink közt szerepelt: a *Rhizomucor* fajok (*Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor tauricus*) intraspecifikus genetikai variabilitásának feltárása; különböző fiziológiai és molekuláris technikákkal nagyszámú marker azonosítása; ezen vizsgálatok eredményei alapján taxonómiai következtetések levonása; génkönyvtár készítés, mely felhasználásával gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) gén azonosítása és szekvenciájának meghatározása; valamint ezen gombák genetikai rendszerének tanulmányozása céljából transzformálási rendszerek kidolgozásának megkezdése.

Kísérleti munkánk eredményeként sikerült meghatároznunk olyan markereket, melyek felhasználhatók a *Rhizomucor* törzsek azonosításában, és adatokat szolgáltatnak a nemzetség taxonómiai revíziójához. A tipizálási eljárások a gyakorlat számára a pontos diagnózis és a patogén gomba jobb megismerésének lehetőségét nyújtják.

A *Rhizomucor* nemzetség rendszertanának és a különböző taxonokat jellemző genetikai variabilitás és genetikai rendszer jobb megismerésén túl, eredményeink elősegíthetik más fontos Zygomyceta rendszertani csoportok alaposabb megismerését is.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK FŐBB JELLEMVONÁSAI

A Zygomycetes osztályba tartozó gombák nevüket vastag falú, kitartóspóráként is funkcionáló, ivaros spóraalakjukról, a két gametangium fúziójával létrejövő járomspóráról, azaz a zigospóráról (gör *zygos* = járom, iga) kapták. Azonban nem minden a Zygomycetesbe helyezett fajnál figyelhető meg a zigospóráképzés, így számos morfológiai, biológiai és ökológiai jelleget is figyelembe vesznek az osztályba sorolásnál. Ilyen alapvető jellegek például a cönocitikus micélium (vagy legalábbis a reguláris szeptáció hiánya), a sporangiospórákkal történő ivartalan reprodukció, valamint a flagellumok és centriolumok hiánya. Meg kell említeni, hogy a csoport igen sok tagja esetében a taxonómusok különös hangsúlyt helyeztek a vegetatív szaporodással kapcsolatos jellemzőkre, ezért a legtöbb határozókulcs szinte kizárólag az ivartalan szaporítóképletek morfológiáján alapul (ALEXOPOULOS és mtsi. 1996).

A Zygomycetes osztály legtöbb fajt magába foglaló és legváltozatosabb csoportja a Mucorales rend. Ezen rendbe tartozó szervezetek többsége talajból, humuszból, bomló szerves anyagból izolálható szaprofita gomba. Ennek ellenére számos fajuk komoly gazdasági károkat okozhat pl. vetőmagvak, lédús zöldségfélék vagy gyümölcsök tönkretételével. Némely ide tartozó faj kifejezetten növénypatogén, mint a *Choanephora cucurbitarum*, mely tökfélék és más gazdaságilag fontos növények virágait és termését támadja meg (WEBSTER 1980).

A Mucorales rendbe tartozó fajok egy része, mint pl. az *Absidia corymbifera*, valamint a *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* nemzetségek némely képviselője humánpatogén szervezet (AJELLO és mtsi. 1976, RIPPON 1988, KWONG-CHUNG és BENNETT 1992).

Ezen túl a rend néhány nemzetsége elsősorban ipari fontossággal bír, különböző enzimek (pl. amiláz, proteáz, lipáz), valamint szerves savak vagy másodlagos metabolitok termelőjeként. Így pl. a kereskedelmileg fontos fumársav előállítása *Rhizopus stolonifer* gombával történik, míg más *Rhizopus* fajok nagyon fontos tejsav termelők. Habár a gyakorlatban a tejsav döntő mennyiségét baktériumokkal termeltetik, a gomba által előállított végső termék könnyebben tisztítható, mint a bakteriális úton előállított (LOCKWOOD 1975).

1.2. A *RHIZOMUCOR* NEMZETSÉG

A *Rhizomucor* nemzetség önálló taxonómiai egységként történő kezelését Lucet és Constantin (1899) javasolta. A nemzetségnek, mint a mezofil *Mucor* fajoktól jól elhatárolódó taxonnak a végleges és általános elfogadására, azonban csak évtizedekkel később került sor. Jelentős ismeretanyag felhalmozódása tette egyértelműen szükségessé (WEHMER 1907, VUILLEMIN 1931, HESSELTINE és ELLIS 1973), hogy ezen nemzetségbe elkülönítve kezeljék az indával (*stolon*), rizoidokkal és sötét színű (barna-fekete) sporangiummal rendelkező termofil *Mucor* fajokat.

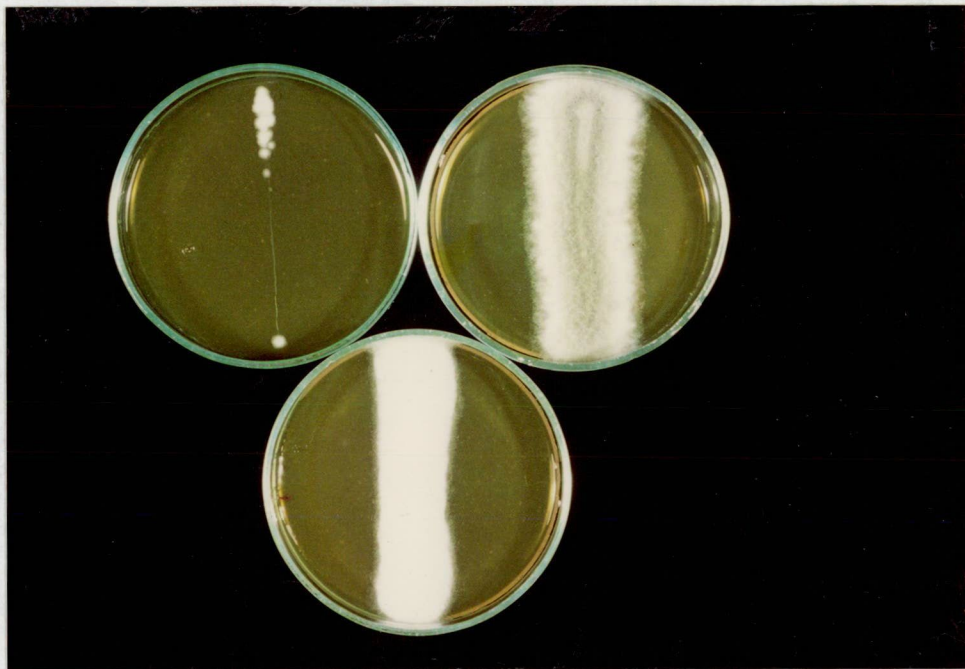
A különálló génusz létjogosultságát a későbbi scanning elektronmikroszkóppal végzett vizsgálatok is alátámasztották, amellyek során fény derült arra, hogy ezen fajok zigospóráinak külső morfológiája teljesen különbözik a többi *Mucor* faj zigospóráinál megfigyelttől (SCHIPPER 1978).

A *Rhizomucor* génusz rendszertanilag a Zygomycetes osztályba tartozik. Schipper (1978) három gombafajt sorolt ezen nemzetségbe: a *R. pusillus*, *R. miehei* és a *R. tauricus* fajokat. A csekély fajsám ellenére az idetartozó mikroszkópikus gombák kiemelkedő gyakorlati jelentőséggel bírnak. A *R. pusillus* és a *R. miehei* humán és állati mikózisok opportunistá patogén kórokozói lehetnek. Az általuk kiváltott betegségek, amelyeket gyakran jelölnek az általánosabb zigomikózis (mukormikózis) elnevezéssel is, viszonylag ritkán fordulnak elő. Elsősorban immunszupresszált betegeknél, ketoacidózisban szenvedő cukorbetegknél, krónikusan alultáplált gyermekekben, egyes leukémiás megbetegedésekben, illetve súlyos égési sérülteknél okozhatnak gondot (EMMONS és mtsi. 1977, EVANS és GENTLES 1985). Két olyan tényező is ismert azonban, amelyek miatt ezen mikózisokra az utóbbi években fokozott figyelem irányul. Az egyik, hogy növekszik azoknak a betegeknek a száma, akik állapotuk miatt potenciálisan veszélyeztetettek; itt elsősorban a cukorbeteg, továbbá a valamilyen kórfolyamat (pl. AIDS), vagy terápiás okokból (pl. transzplantáció) immunszupresszált állapotba került betegek növekvő számára kell utalnunk (SMITHERMAN és PEACOCK 1995).

A másik ok, hogy ezen mikózisok kialakulása esetén a terápiás lehetőségek meglehetősen korlátozottak: ez részben ezen gombák gyors, a normál testhőmérsékleten optimális feltételeket találó növekedésével, másrészt a gombaellenes hatóanyagok többségével szemben mutatott rezisztenciájával magyarázható. Ennek tudható be, hogy Blitzer és Lawson felmérése szerint (1980) a rhinocerebrális mukormikózisban megbetegedettek esetében a mortalitás elérte a 63%-ot, amely értéket nagy dózisu amfotericin B kezelés alkalmazásával is csak 58%-ra lehetett csökkenteni.

A *Rhizomucor miehei*, a leírtakon túl, rendkívül nagy jelentőségű egyes biotechnológiai és élelmiszeripari alkalmazások okán is. A legismertebb ilyen felhasználás a sajtgyártás során

alkalmazott *rennin* (a tejet koaguláló enzim) termelése. Egyes adatok szerint az ipari felhasználásra kerülő rennin értéke évi mintegy 60 millió \$; ezt, a piaci értéket tekintve csak a proteázok és az amilázok múlják felül (WAINWRIGHT 1996). Több gombafaj izolátuma által termelt enzim nem specifikus proteináz aktivitását vizsgálták meg, amely során a *R. miehei* VTT-D-82193 (ATCC 16457) törzse bizonyult a legjobb mikrobiális rennin forrásnak (BAILEY és SIIKA-AHO 1988). A *R. pusillus* proteáz termelése heterotallikus törzseknél mindössze 1%-a, homotallias törzseknél 2-4%-a a *R. miehei* enzimtermelésének (BRANNER-JØRGENSEN és NIELSEN 1974).



1. Ábra. A *R. tauricus* (R1), *R. pusillus* (R2A) és *R. miehei* (R6) jellegzetes telepmorfológiája.

1.2.1. A *Rhizomucor* nemzetség jellemzése

A *Rhizomucor* fajok sporangiofórai monopodiális, vagy szimpodiális elágazásúak, sötétbarna színűek, végeiken terminális sporangiumokkal. Ez utóbbiak függőleges helyzetűek, gömbölyűek, sötét színűek és spórákkal teltek. A sporangiospórák (ivartalan szaporítóképletek) alakja gömbszerű.

Ez a nemzetség morfológiai szempontból hasonlít az *Actinomucor* génuszhoz (a sporangiofórak és sporangiumnak hasonló a szerkezete), de az *Actinomucor* nemzetségbe tartozó gombák mezofilek, továbbá nem mutattak ki ezen fajoknál zigospórát, ami a *Rhizomucor*oknál általában megfigyelhető (COONEY és EMERSON 1964). A *Mucor* génusztól a rizoidok és indák, a *Rhizopus* fajoktól az elágazó sporangiofórok és az apofizis hiánya, az *Absidia* képviselőitől pedig a gömbalakú sporangium és szintén az apofizis hiánya különbözteti meg. (1. Táblázat).

A termofil tulajdonság a *Rhizomucor* génusz mindhárom fájának régen felismert jellegzetes sajátossága (LINDT 1886, MIEHE 1907, LUCET és CONSTANTIN 1900). Az optimális hőmérséklet ezen gombák fejlődéséhez a 37-40°C.

A *Rhizomucor* fajok ivartalan úton sporangiospórákkal szaporodnak. Ivaros folyamataik eredménye az erősen pigmentált falú zigospóra, mely két heterotallikus (eltérő párosodási típusba tartozó) telep ivarszerveinek egyesülése révén vagy homotallikusan jön létre. A homotallikus törzsek egyazon telepen belül képeznek zigospórát. A zigospóra méretében és morfológiájában mutakozó különbségek bélyegként szolgálhatnak a fajok elkülönítéséhez.

1. Táblázat. A *Rhizomucor* nemzetség összehasonlítása az *Absidia*, *Mucor* és *Rhizopus* nemzetséggel.

Génusz	<i>Rhizopus</i>	<i>Absidia</i>	<i>Rhizomucor</i>	<i>Mucor</i>
rizoid és stolon	van	van; gyakran nehezen észlelhető	van	hiányzik
sporangiofór	általában nem elágazó; legtöbbször barna színű	a végeken elágazó; általában hialin típusú	monopodiális, vagy szimpodiális elágazású; sötétbarna	elágazó, vagy nem; leginkább hialin típusú
sporangium	gömbalakú; szürke, vagy barna; sokszor fényes	piriform	gömbalakú; szürke; fénylő	gömbalakú

kolumella	gömbszerű, vagy kissé elongált	hemiszférikus, gyakran nyúlványokkal	gömbszerű; barna	változatos alakú (pl. gömb, piriform)
apofízis	jelen van (sokszor nem szembetűnő)	jelen van; kúp alakú	hiányzik, vagy nagyon pici	hiányzik
sporangiospóra	leginkább szögletes és barázdált	gömb alaktól a hengeresig; sima felszínű	gömb, vagy gömbszerű; kicsi; sima	gömb alaktól a hengeresig
zigospóra	érdes; leginkább egyenlőtlen gömb alakú szuszpenzorok között	sima, vagy gyengén érdes; a szuszpenzorok közel egyformák	érdes; egyforma szuszpenzorok között találhatók	érdes; egyforma szuszpenzorok között találhatók

1.3. A *RHIZOMUCOR* GÉNUSZBA TARTOZÓ FAJOK JELLEMZÉSE

A három *Rhizomucor* faj legfontosabb jellemzőinek összehasonlítását a 2. Táblázat tartalmazza.

1.3.1. *Rhizomucor pusillus* (Lindt)

A *Rhizomucor pusillus* legtöbb törzse heterotallikus; ezt a sajátosságot kezdetben, mint a legfontosabb, a *R. miehei*-től a megkülönböztetést lehetővé tevő bélyeget kezelték (COONEY és EMERSON 1964). A későbbiekben, a homotallikus *R. pusillus* törzsek felfedezése után, az ilyen alapon történő elkülönítés lehetetlenné vált (SCHIPPER 1978). A fajhatárok meghúzását nagyrészt a morfológiai bélyegek tették (több-kevesebb sikerrel) lehetővé.

A rendelkezésre álló adatok szerint a *Rhizomucor* fajok közül a *R. pusillus* okoz gyakrabban megbetegedéseket: számos esetben írták le állati mikózisok kórokozójaként (SCHOLER 1970), gyakran izolálták fertőzött emlősökből (szarvasmarha, ló, disznó, foka), sokszor okoz vetélést a szarvasmarhánál. Lindt és munkatársai (1886) *R. pusillus* segítségével halálos kimenetelű fertőzéseket idéztek elő kísérleti nyulakon. Scholer (1970) egerekkel történt kísérletei során tíz törzs patogenitását igazolta. Mindegyik törzs igen jelentős morfológiai elváltozást okozott a vizsgált állatok veséjében.

Emberi megbetegedést valamivel ritkábban írtak le. Az összes *Rhizomucor* faj esetében megnehezíti az ilyen adatok értékelését az a tény, hogy a mukormikózist kiváltó gomba azonosítása sokszor csak a nemzetség meghatározásáig történik meg. Mivel a *Rhizomucor* fajok korábban a *Mucor* nemzetségbe sorolva szerepeltek (*M. pusillus*, *M. miehei*), nem lehet pontosan tudni azon korábbi megbetegedések számát, amelyet ezen fajok váltottak ki.

2. Táblázat.

A *Rhizomucor* nemzetségbe tartozó fajok fontosabb jellemzői.

Jellemző tulajdonságok	<i>R. tauricus</i>	<i>R. michei</i>	<i>R. pusillus</i>	Forrás
Párosodási típus	?	homotallikus	heterotallikus, néhány törzs homotallikus	Schipper 1978
Patogenitás	?	patogén	patogén	Scholer 1970
Fény hatása a telepnövekedésre	jelentéktelen	halványabb telepek (ok: kevés zigospóra)	jelentéktelen	Schipper 1978
Hőmérséklet hatása a telepnövekedésre	21°C: lassú 24°C-55°C: normál 57°C: nincs	21°C és 55°C: elhanyagolható 24-55°C: normál	21°C: nagyon lassú 24 - 50°C: normál 55°C: szegényes 57°C: nincs növekedés.	Cooney és Emerson, 1964 Scholer 1970
Táptalaj hatása a telepnövekedésre	20-80% szaharóz serkent	szaharóz nem befolyásol	20-40% szaharóz serkent	Scholer és Müller, 1966 Schipper 1978
Telep magassága	< 1 mm	1 mm	1-2 mm	Schipper 1978
Telep színe	szürkés oliva	világosszürke, szürke, mély olivaszürke	világos füstszürke, mély szürkés oliva, barna	Schipper 1978
Zigospóráképzés tiamin hiányában	?	gyér telepek zigospórák nélkül	hatástalan	Schipper 1978
Zigospóráképzés szaharóz jelenlétében	?	kedvezőtlen 40% (hiányzik)	kedvezőtlen 20% (keves) 40% (ritka v. hiányzik)	Schipper 1978
Zigospóráképzés fény jelenlétében	?	keves zigospóra	keves zigospóra	Schipper 1978
Zigospóráképzés hőmérséklete	?	27(24) - 40°C	27(24) - 33(36)°C	Schipper 1978
Zigospórák	?	ált. 35µmØ, gömbszerű, csillagalakú kiemelkedésekkel, vöröses-, később feketésbarnák	70×63µm, tompa végű tüskék figyelhetők meg rajta, színük a sötétbarnától a feketéig	Schipper 1978
Indák	20µmØ	9µmØ, durva sejtfalú	17µmØ, durva sejtfalú	Schipper 1978
Rizoidok	gyengén fejlettek	gyengén fejlettek	rövidek	Schipper 1978
Sporangiofór	10-35µmØ, esetleg gyenge szimpodiális elágazású; barnás színű	szimpodiális elágazású, 7µmØ, barna, kéregszerű sejtfallal	elágazó (monopodiális v. szimpodiális), 11-15µmØ, barnás színű, kéregszerű sejtfallal	Schipper, 1978
Sporangium	szürke, fénylő, 125µmØ, kéregszerű sejtfal	szürke, fénylő, 50-60µmØ, kéregszerű sejtfal	szürke, fénylő, 80-100µmØ, kéregszerű sejtfal	Schipper 1978
Kolumella	gömbszerű, 70×60µm, egérszürke v. barnás	28×25µm, egérszürke v. barnás, kis kiemelkedésekkel a felszínén	45×38µm, világosbarnától a sötétszürkéig, majdnem sima felszínű, gömbszerű	Schipper 1978
Sporangiospórák	gömbszerűek, 3-4µm Ø	gömbszerűek, 3-4µm Ø	gömbszerűek, 3-4µm Ø	Schipper 1978

1.3.2. *Rhizomucor miehei* (Cooney és Emerson)

A *Rhizomucor miehei* valamennyi törzse homotallikus (COONEY és EMERSON 1964). A faj elkülönítését segítő morfológiai bélyegek közül a zigospórák mérete, továbbá a sporangiofór morfológiája érdemel említést: ez a *R. pusillus*-nál csokorszerűen ágazik el, míg a *R. miehei*-nél lazább, főként szimpodialis elágazások figyelhetők meg. A sporangium és kolumella is általában nagyobb a *R. pusillus*-nál. Mindezek a bélyegek, azonban olyan nagy fajon belüli variabilitást mutatnak (az elágazás mértéke és a sporangium mérete is változhat), hogy önmagukban alkalmatlanok a fajok elkülönítésére.

Kísérleti célból megfertőzött egerekben a *R. miehei* letális mikózisok kiváltására képes (SCHOLER 1970). A beteg állat veséjén makroszkópikus elváltozásokat észleltek, hasonlóan a *R. pusillus* által indukált tünetekhez.

1.3.3. *Rhizomucor tauricus* (Milko és Schkurenko)

Malátás táptalajon jellegzetes, kissé összenyomott, barna színű telepeket produkál. A telepeken csak egy sajátos, duzzadt típusú sporangiofór fejlődik ki: a sporangium steril.

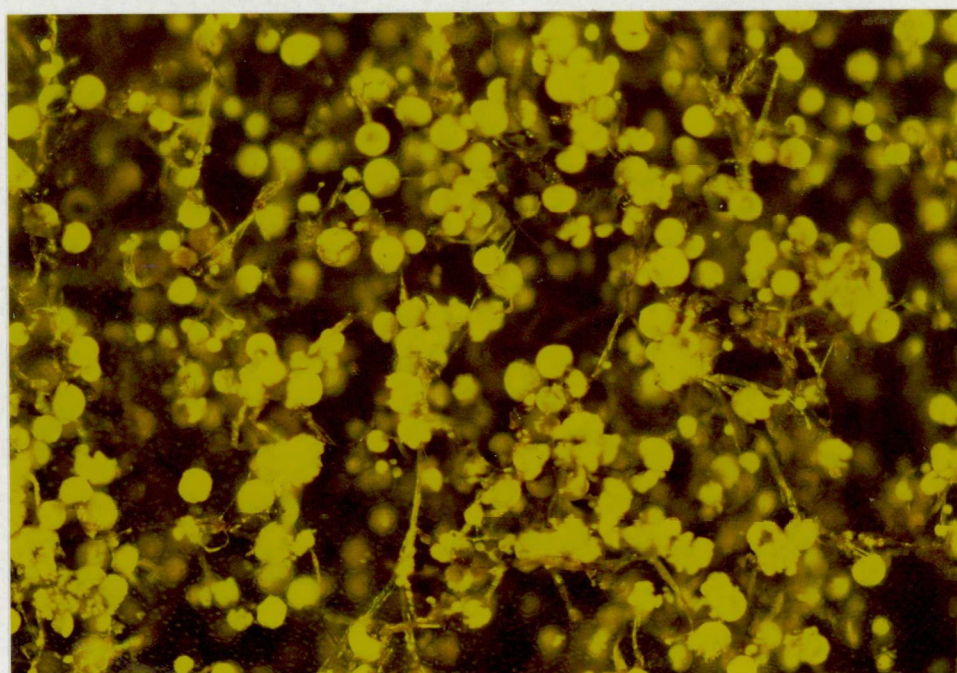
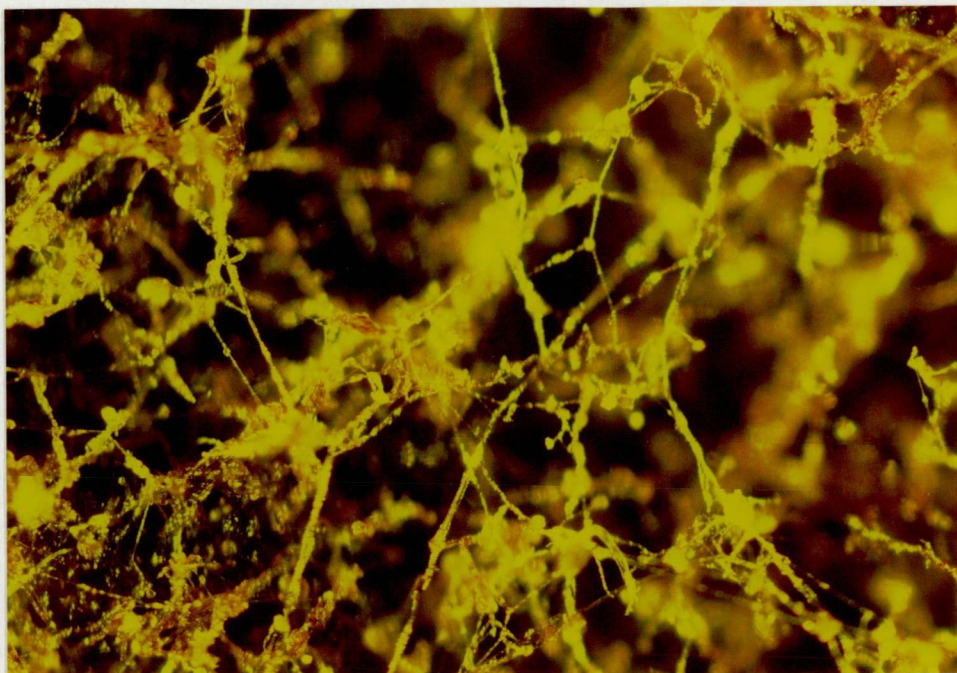
A malátás táptalajt szaharózzal kiegészítve (20-80%) szürkés színű telepek fejlődnek: megjelenik a keskenyebb típusú (szabályos) sporangiofór, valamint a spórákkal telt sporangium (SCHIPPER 1978).

Szaharóz hozzáadása a táptalajhoz megváltoztatja a faj növekedésének hőmérsékletfüggését is. Szaharóz nélküli malátás táptalajon a maximális hőmérséklet, ahol még növekedés tapasztalható 50°C, míg szaharóz jelenlétében még 55°C-on is mutat növekedést (SCHIPPER 1978).

A *R. tauricus* faj érdekessége, hogy csak egyetlen törzse ismert a mai napig. A szóban forgó törzzsel végzett kísérletek során a *R. pusillus*-tól és *R. miehei* törzseitől elsősorban az ozmofilitása (szaharóz igénye a táptalajban) és szabálytalan mikromorfológiát mutató, korlátozott növekedése különbözteti meg (SCHIPPER 1978). A disszertációban ismertetett kísérleti eredményeink alapján megkérdőjelezhető ezen törzs külön fajba való sorolása.

Patogenitásával kapcsolatos kísérleteket még nem végeztek el, de 37°C-os optimális növekedési hőmérséklete alapján potenciálisan patogén fajnak tekintik.

A rendelkezésre álló egyetlen törzsen zigospóra képzést még nem sikerült megfigyelni. A keresztezési kísérleteket a *R. pusillus* eltérő párosodási típusú teszter-törzseivel a *R. tauricus* ozmofiliája akadályozta meg: ugyanis emelt szaharóz koncentráció mellett a *R. pusillus* zigospóra képzése gátlódik (SCHIPPER 1978).



2. Ábra. A *R. tauricus* sporangiofórok (A) 1% glükózzal illetve (B) 3.75% glükózzal kiegészített malátás táptalajon

1.4. A GENETIKAI VARIABILITÁS VIZSGÁLATA IZOENZIM ÉS RAPD ANALÍZISSEL

A fajon, illetve faj alatti egységeken belüli genetikai variabilitás vizsgálatában igen hatékony módszernek bizonyult az izoenzim és RAPD analízis. A genetikai vizsgálatok szükségessé teszik, hogy könnyen és egyértelműen azonosítható markerek álljanak rendelkezésünkre. Ilyen területen a gombák genetikai vizsgálatában előrelépést a nyolcvanas évek végétől tapasztalhattunk, mikortól is egyre elterjedtebbé vált az izoenzim és az RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) analízis (MICHELMORE és HULBERT 1987) használata.

A polimeráz láncreakción (PCR, SAIKI és mtsi. 1988) alapuló módszerek bevezetése újabb lökést adott az ilyen irányú kutatásoknak. Ezen újabb eljárások közé tartozik az 1990-ben leírt RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) technika is (WILLIAMS és mtsi. 1990), mely sikeresen alkalmazható a genetikai polimorfizmus tanulmányozására, valamint a géntérképezés és a szegregációs analízis területén is (WILLIAMS és mtsi. 1991).

A számos ismert módszer közül csak az általam használt eljárásokat részletezem.

1.4.1. Az izoenzim analízis

Régóta ismertek azok az eljárások, amelyek lehetővé teszik a fehérjék sejtekből történő kivonását. A fehérjekivonat összetevőinek szétválasztása elektroforézissel történik, amelyet követően lehetőségünk nyílik a proteinmintázat elemzésére.

Több információval szolgálhatnak azok a vizsgálatok, amelyek során egy adott enzim különböző formáinak, az ún. izoenzimeknek a vizsgálatát végezzük el. Ezek az izoenzimiek többféle módon jöhetnek létre:

- több génlokusz különböző, de azonos funkciót ellátó polipeptid-láncot kódol;
- egy lokusznak több allélja hozza létre a különböző formákat;
- poszttranszlációs módosítások következményeként jönnek létre az ún. másodlagos izoenzimiek (ilyen módosulások lehetnek pl. alkilezés, glikozilezés, a fehérjék aminos csoportjainak acilezése);
- "conformer" hipotézis (egy polipeptid láncnak több konformációja is lehet aktív)

Mivel a különböző izoenzim formák más-más elektroforetikus mobilitással rendelkeznek, így azok keményítő vagy poliakrilamid gélen elválaszthatók egymástól; specifikus festéseket alkalmazva jellegzetes mintázat nyerhető.

Az izoenzim analízis a gomba taxonómia és genetika évtizedek óta sikeresen alkalmazott módszere (MICALES és mtsi. 1986). Számos esetben alkalmazták gombarendszertani problémák megoldására: elsősorban génuszon belül fajok, illetve faj alatti kategóriák elkülönítésére bizonyult jól használhatónak. Így, többek között, felhasználták *Beauveria* fajok taxonómiai

elemzésére (MUGNAI és mtsi. 1989), *Rhizoctonia* fajok taxonómiai revíziójára (PATERSON és mtsi. 1989), *Aspergillus* és *Pleurotus* fajok taxonómiai vizsgálatára is (SUGIYAMA és YAMATOYA 1990, ZERVAKIS és LABARERE 1992). Egy sajátos alkalmazási terület az ismeretlen gombák azonosítása, amely elsősorban a patogén mikroorganizmusok esetében nagy gyakorlati jelentőségű (NEWTON 1987, BONDE és mtsi. 1989).

A módszert széles körben alkalmazzák fajon, vagy populáción belüli variabilitás feltárására, valamint keresztezési kísérletek nyomkövetésére, éppúgy mint a létrejövő hibridek analizálására (BURDON és mtsi. 1981; KÁLMÁN TÓTH és mtsi. 1991), és kromoszómák genetikai térképezésére (ROYSE és mtsi. 1983; SPEAR és mtsi. 1983). Az egyik leggyakoribb alkalmazási terület azonban a gombapopulációk vagy fajok genetikai variabilitásának vizsgálata; használták pl. *Fusarium* (SKOVGAARD és ROSENDAHL 1998); *Pythium* (MOTOAKI és mtsi. 1998); *Phomopsis* (MEIJER és mtsi. 1994) vagy *Phyllosticta* (LEUCHTMANN és mtsi. 1992) esetében.

A leírtakkal ellentétben a járomspórás gombák taxonómiájának és genetikai variabilitásának biokémiai vagy molekuláris markerekkel történő elemzésére alig lehet példát találni. Egy korai kísérletben kétféle (glükóz és olívaolaj tartalmú) táptalajon nevelt 9 *Mortierella ramanniana* (korábban *Mucor ramannianus*) izolátum észteráz mintázatait hasonlították össze (PEBERDY és TURNER 1968). Az elektroforetikus mintázatok rendkívül nagy variabilitást mutattak; glükóz, illetve olívaolaj táptalajon csak egy-egy észteráz sáv volt közös a vizsgált izolátumok esetében. A szerzők kétségbe vonták a tapasztalt izoenzim profilok taxonómiai jelentőségét. Meg kell azonban említeni, hogy a módszer alkalmazhatósága szempontjából nem mindegy, hogy milyen enzimszrendszereket vonunk be a vizsgálatokba. A központi metabolikus folyamatok szabályozó enzimeit általában sokkal kisebb variabilitást mutatnak, mint a többi enzim, pl. az észterázok és a foszfatázok. Így az utóbbiak kizárólagos alkalmazása olyan nagymértékű polimorfizmust eredményezhet, amely valóban megakadályozza, hogy az így kapott eredményekből megfelelő következtetéseket vonjunk le a taxonómiai viszonyokra, vagy a fajon belüli variabilitás mértékére vonatkozóan (MICALES és mtsi. 1986).

Egy másik kísérletben a *M. racemosus* izolátumok szintén igen nagy variabilitást mutattak. Morfológiai hasonlóságuk ellenére, 3 külön fajnak megfelelő csoportot alkottak. Ugyanakkor a morfológiailag meglehetősen különböző *M. hiemalis* és *M. mucedo* több, mint 90%-os hasonlóságot mutatott (STOUT és SHAW 1974).

Egy másik, 10 *Mucor* faj 30 izolátumát érintő izoenzim vizsgálat során (VARGA és VÁGVÖLGYI 1991) szintén igen nagy inter- és intraspecifikus variabilitást detektáltak. Az azonos fajba tartozóként leírt izolátumok többsége nem alkotott elkülönülő csoportot; ez alól kivétel a *M. plumbeus* 11 vizsgált izolátuma volt, amely minden vizsgált enzimszrendszerre feltűnő hasonlóságot mutatott. A korábbi eredményekkel összhangban (STOUT és SHAW 1974) ebben a kísérletben is a *M. racemosus* törzsek rendelkeztek a legvariabilisabb mintázatokkal,

továbbá a *M. hiemalis* és a *M. mucedo* itt is nagyon hasonlóknak bizonyult. Mivel a *M. plumbeus* morfológiai jellegek alapján a többi vizsgált fajnál jóval könnyebben azonosítható (SCHIPPER 1976), az eredmények egyik magyarázata lehet, hogy a különböző kísérletekben detektált nagy "fajon belüli" variabilitás a morfológiai alapú törzsidentifikálás elégtelenségéből származik. A másik, még több megválaszolatlan kérdést felvető lehetőség az, hogy ezek az eredmények valóban az egyes fajok genetikai állományának erősen eltérő variabilitását tükrözik.

Vágvölgyi és munkatársai (1996) *Mucor piriformis* izolátumok izoenzim analízise segítségével a zigospóra képzésre képes (+ és -), illetve az aszexuális (neutrális) izolátumok elkülönítését lehetővé tevő markereket határoztak meg. Hat enzimszisztéma vizsgálata során mérsékelt variabilitást detektáltak. 93%-uk 3 jellegzetes elektroforetikus fenotípust mutatott, a többi 4 fenotípust egy-egy törzs képviselte, melyek mindegyike csak egyetlen enzim mintázatában különbözött az előbb említett 3 fenotípus valamelyikétől. Az izoenzim karakterek és egyéb biológiai jellegek (pl. fertőzőképesség) nem mutattak korrelációt.

1.4.2. Szénasszimilációs spektrum analízis

A fiziológiai tulajdonságok tanulmányozása (pl. nitrogén vagy szénforrás hasznosítási képesség) is szolgáltat adatokat a mikroszkópikus gombák jellemzéséhez. Különösen előnyös ez a megközelítési mód numerikus taxonómiai vizsgálatok részeként alkalmazva, ahol a további elemzéshez nagyszámú, jól differenciálható karaktert biztosíthat.

Trichoderma nemzetség fajainak identifikálásában a szénasszimilációs vizsgálat jól használható módszernek bizonyult: 65 *Trichoderma* izolátumot 127 szénforráson tesztelve lehetővé vált a *T. harzianum* és *T. hamatum* fajok elkülönítése (MANCZINGER és POLNER 1987).

Hoog és munkatársai (1995) a humánpatogén *Cladosporium-Xylophora* fajok rendszertani osztályozását pontosították fiziológiai, többek között szénforrás hasznosítási vizsgálatok segítségével. A *Capronia pilosella* morfológiailag hasonló a *Cladosporium carrionii* fajhoz, de fiziológiai különbségeik alapján biztosan elkülöníthetők voltak, csakúgy mint a *Cladophialophora* génusz morfológiailag nehezen megkülönböztethető fajtái.

A *Rhizomucor*hoz taxonómiaiilag közeli *Mucor* nemzetségben a szénasszimilációs vizsgálatok szintén taxonómiai szempontból hasznosnak bizonyultak (VÁGVÖLGYI és mtsi. 1996).

1.4.3. RAPD analízis

Kary Mullis 1985-ben bejelentett felfedezéséért, a polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction, PCR) kidolgozásáért, megkapta az 1993-as év kémiai Nobel-díját. Módszere példátlan sebességgel terjedt el, és mára a PCR-technika teret hódított a nukleinsavval kapcsolatos munkák szinte mindegyikében. Népszerűsége abban rejlik, hogy jelentősen

megkönnyíti az eddigi eljárásokat, és számos korábban elképzelhetetlen alkalmazást tesz lehetővé.

A DNS polimorfizmus kimutatásához is többféle hatékony eljárást biztosít a PCR alkalmazása (FOSTER és mtsi. 1993). Lehetőség van, többek között, a genom egy adott régiójának (pl. az ITS szakaszok a rDNS-ben) amplifikálására (LIU és mtsi. 1993), vagy random szintetikus oligonukleotid primerek alkalmazásával a teljes genom vizsgálatára és ismeretlen szekvenciák amplifikálására. Ez utóbbi eljárás, a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD, BOWDITCH és mtsi. 1993; WILLIAMS és mtsi. 1990) felhasználásával felszaporíthatók azok a DNS szakaszok, melyek a primerekkel homológ invertált repetitív szekvenciák közé esnek. A primerek, ezen kísérletekben általában 10 bázisból álló oligonukleotidok, a velük homológ DNS szakaszokhoz kapcsolódnak. A két szakasz közé eső genomdarabot a polimeráz láncreakció elvén a kimutathatóságig fel lehet szaporítani. A különböző mikroszkópikus gombatörzsek közötti genetikai hasonlóság nagyon jól jellemezhető azáltal, hogy megvizsgáljuk milyen gyakorisággal és milyen távolságban ismétlődnek genomjukban bizonyos szekvenciák. A RAPD technikát, mint az RFLP (restriction length polymorphism) analízis alternatív módszerét, széles körben alkalmazzák; ugyanis, rendkívüli érzékenysége mellett, számos előnnyel rendelkezik az utóbbihoz képest: lényegesen gyorsabb, nem igényel specifikus génpróbákat, a minta DNS igen kis mennyisége is elegendő hozzá – míg pl. az RFLP analízishez jelentős mennyiségű és jó minőségű DNS-re van szükség.

A RAPD már számos mikroszkópikus gomba esetében (pl. *Fusarium*, CROWHURST és mtsi. 1991; *Colleotrichum*, GUTHRIE és mtsi. 1992; *Aspergillus*, MEGNEGNEAU és mtsi. 1993; *Botrytis*, BÜTTNER és mtsi. 1994; *Coprinus*, LAROCHE és mtsi. 1995; *Pythium*, MOTOAKI és mtsi. 1998) bizonyult rendkívül érzékeny, elsősorban fajon belüli különbségek kimutatására kitűnően alkalmazható eljárásnak.

Azon túlmenően, hogy a RAPD-technikával akár egyedszintű különbségek feltárására is módunk nyílik, segítségével hozzájuthatunk nagy specifitású diagnosztikai próbákhoz is (FOSTER és mtsi. 1993). A módszer szegregációs analízisre (FABRITIUS és JUDELSON 1997, JUDELSON és mtsi. 1995), genetikai térképezésre (pl. WILLIAMS és mtsi. 1991, JUDELSON és mtsi. 1995) és homokarion/heterokarion állapot meghatározására (FOSTER és mtsi. 1993) 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).

A RAPD technikát nagyon kevés esetben használták járomspórás gombák genetikai analízisére. A Mucorales renden belül részletesen tanulmányozták a *Parasitella parasitica* (rokon fajokat parazitáló gomba) tözsgyűjteményekben fellelhető összes (7 db) izolátumát

(BURMESTER és WÖSTEMEYER 1994). RAPD analízist végeztek továbbá a *Mucor piriformis* izolátumaival is, melyek az izoenzim vizsgálatokkal összhangban, szintén a párosodási képesség meglétének vagy hiányának, illetve a törzsek eredetének megfelelően különülnek el. A *Mucor piriformis* esetében tehát kimutathatók olyan polimorf markerek, melyek alapján elkülöníthetők a párosodásra képes és az aszexuális törzsek, valamint az eltérő eredetű izolátumok (PAPP és mtsi. 1997).

1.4.4. rDNS ITS-RFLP

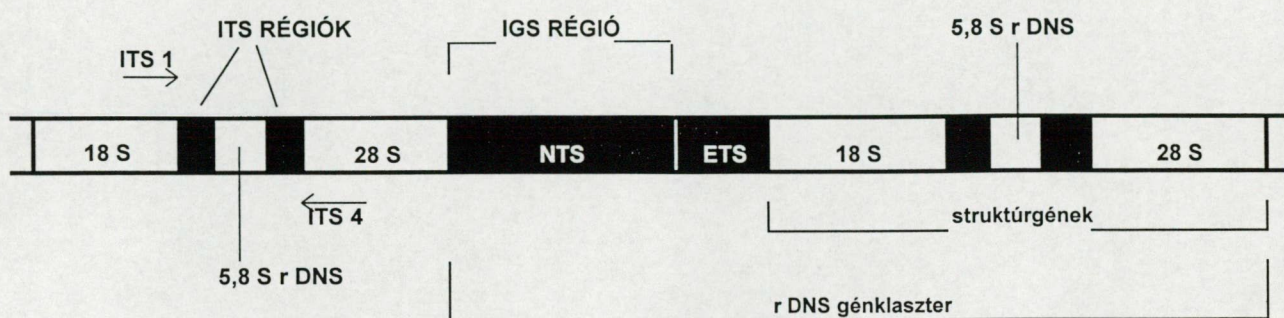
Filogenetikai szempontból fontosak azok a gének, amelyek azonos funkcióval bírnak a különböző szervezetekben, körülbelül azonos rátájú az evolúciójuk és genomként egy van belőlük jelen (vagy egységes egészként viselkednek). Ilyenek pl. a rRNS gének (3. Ábra), citokróm oxidáz gén és egyes riboszomális fehérje elongációs faktorok. Fontos, hogy olyan szekvenciákkal dolgozzunk, melyek nem túl variabilisak. A rRNS gének tartalmaznak igen konzervatív szekvenciákat is (28S, 5.8S és 18S rRNS gének), melyeket nem kódoló, polimorf régiók: ITS (internal transcribed spacer) és IGS (intergenetic spacer) választanak el egymástól. A rRNS gének konzervált volta lehetővé teszi primerek szerkesztését az ITS régiók PCR-al történő amplifikálásához.

A PCR-RFLP módszert ma már széles körben alkalmazzák a gombataxonómiában (WHITE és mtsi. 1990, BRUNS és mtsi. 1991). Aszkomicéta és bazidiomicéta fajok identifikálása is ily módon történt (GARDES és mtsi. 1991, HENRION és mtsi. 1992, 1994). A kevésbé variabilis ITS régió RFLP analízise alkalmasnak bizonyult *Tuber* fajok elkülönítésére, míg a közeli rokonságú taxonok, valamint a fajon belüli variabilitás mértékének kimutatása az IGS régiók, valamint azok restriktions elemzésével valósítható meg (HENRION és mtsi. 1994).

Berbee és munkatársai (1995) *Penicillium* fajok 18S, 5.8S és ITS rDNS szekvenciáit elemezte. A vizsgálatok alapján a *Talaromyces* szexuális alakkal rendelkező *Penicillium* fajok külön csoportot képeznek, míg az *Eupenicillium* teleomorf alakú fajok az *Aspergillus* és *Monascus* fajokhoz állnak közelebb. Az *Aspergillus* nemzetség monofiletikusnak bizonyult. Az eredmények összhangban vannak az aszkospórák felszíni morfológiája alapján történt elkülönítéssel, de nincsenek összhangban az aszexuális szaporítóképletek alakja szerinti felosztással.

Az ITS régiót polimeráz láncreakcióval amplifikálták és RFLP analízist végeztek el sikeresen az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójában Kumeda és Asao (1996). A PCR-RFLP módszert *Fusariumok* vizsgálatában is alkalmazták (EDEL és mtsi. 1996), és az ITS szekvencia és a vele szomszédos 26S rRNS egy rövid szakaszának vizsgálata alapján 87 különböző *Fusarium* izolátumot tudtak 23 csoportba (ú.n. haplotípusba) sorolni.

Varga és munkatársai (2000) 17 *Aspergillus* section *Circumdati* izolátum ITS régiói, illetve 5.8S rRNS génjei szekvenciáinak filogenetikai analízise során azok parafiletikus fejlődését állapították meg. Rigó és munkatársai (2001) az ITS régiók szekvenciáit szintén alkalmasnak találták az *Aspergillus* fajok evolúciós kapcsolatának tisztázására. Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába sorolt fajok 23 típus törzsét vonták be a vizsgálatokba. Az ITS régiók, illetve 5.8S rRNS gének szekvencia adatainak parsimony analízise során megállapították, hogy az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába tartozó fajok külön csoportokat alkotnak. Más vizsgálatok során Gácsér és munkatársai (2001) kimutatták, hogy a *Cryptococcus hungaricus* ITS régióinak hossz polimorfizmusa alkalmas taxonómiai kérdések megoldására.



2. Ábra. A rDNS szerveződése.

1.5. GÉNTÉCHNIKA

A géntechnika (*genetic engineering*) és fehérjetechnika (fehérje mérnökség, *protein engineering*) a molekuláris biológia legdinamikusabban fejlődő részei. A géntechnika számos tudományág és speciális technika összehangolt alkalmazásával az élő szervezetre vonatkozó alapvető és gyakorlati problémákat old meg. Ezen belül is a rekombináns DNS eljárások fejlődnek a leggyorsabban. A rekombináns technika lehetővé teszi egyedi gének izolálását, szaporítását, kutatását, átvitelét más organizmusokba és a gének kifejeződését termékeik formájában. A rekombináns DNS technika mára már óriási ismeretanyaga az 1970-es évek óta halmozódott fel. Fejlődése elsősorban az információt átvivő vektorok, ezen belül is a plazmid kutatásnak köszönhető, abból az analógiából kiindulva, hogy a természetes klónozás vektorai a transzdukáló bakteriofágok. A vektorok használatát ötvözve a DNS specifikus hasításával (restrikciós enzimek) és a DNS fragmentek összekapcsolásával (DNS ligáz) egy viszonylag könnyen hozzáférhető technika birtokába juttatta a molekuláris genetikát.

1.5.1. Klónozási stratégiák

Egy gombagén izolálására különböző klónozási stratégiák alkalmasak, melyek használhatósága azonban nagymértékben függ a mikroorganizmus és az izolálni kívánt genetikai elem természetétől.

A funkcionális azonosság alapján történő klónozás egyik lehetséges módja egy heterológ mikroorganizmus hordozta mutáció genetikai komplementációja. Ez a megközelítés, elsősorban élesztőgének klónozásánál volt eredményes (KIEL és mtsi. 1995, RATKZIN és CARBON 1997, DALBOGE és HELDT-HANSEN 1994). Ezen módszer hatékony alkalmazásának előfeltétele azonban, hogy megfelelő mutánsok, illetve hatékony transzformációs rendszer álljon rendelkezésre. Számos "modellszervezet" esetében (pl. *S. cerevisiae*, *Sch. pombe* és *A. nidulans*) ezek a feltételek teljesülnek (FINCHAM 1987, GREY és BRENDEN 1992, HOOD és STACHOW 1995). Előnyös, hogy mind a *S. cerevisiae* (PARENT és mtsi. 1985, BRUNELLI és PALL 1993), mind a *Sch. pombe* (COTTAREL és mtsi. 1993, BRUN és mtsi. 1995), mind pedig az *A. nidulans* esetében (BOWYER és mtsi. 1994) ismertek az *E. coli*-ban is funkcionáló inga vektorok (*shuttle vector*).

A járomspórás gombák esetében a legnagyobb nehézséget az jelenti, hogy hatékony heterológ komplementáció csak az egymáshoz filogenetikailag közel álló gombák esetében várható. Erre jó példa több *A. nidulans*, *A. niger* és *N. crassa* gén kölcsönösen sikeres expresszációja (BALLANCE 1986, WEISS és mtsi. 1985), illetve számos sikeres komplementáció különböző élesztőgombák között (MCNEMAR és mtsi. 1997, GROOM és mtsi. 1998). A járomspórás gombák azonban rendszertanilag távol állnak valamennyi fentebb említett mikroszkópikus gombától, ami a genetikai komplementáció esélyeit jelentősen csökkenti. Problémát jelenthet továbbá élesztő mutánsok használatakor, hogy a fonalgombák jelentős mennyiségben tartalmaznak az élesztőkből hiányzó genetikai információt: például a növénykórokozó *Magnaporthe grisea*-ból ismert expresszáció szekvenciák közel 30%-a nem mutat homológiát az élesztő adatbázisok szekvenciáival (HAMER 1997). Ennek ellenére nincs kizárva a sikeres komplementáció lehetősége a járomspórás gombák génjeivel: így pl. a β -izopropil malát dehidrogenázt kódoló *Mucor* gén (*leu4*) komplementációja is eképpen történt (VAN HEESWIJCK és RONCERO 1984, RONCERO és mtsi. 1989).

A genetikai komplementáció az "instant génbank" (BOWYER és mtsi. 1994) módszerével is felhasználható klónozásra, melynek előnye, hogy szükségtelenné teszi génkönyvtárak előzetes létrehozását. Az *A. nidulans* 6.1 kb nagyságú *AMA1* szekvenciája (autonóm replikációt lehetővé téve) jelentősen képes megnövelni egy adott vektor transzformációs gyakoriságát (GEMS és mtsi. 1991). Ez, egy külön vektorba (pHELP1) integrálva, kotranszformációs kísérletek esetén is hasonló hatású (GEMS és CLUTTERBUCK 1993). Ennek háttérében álló, valószínűleg

preintegratív rekombinációs esemény lehetővé teszi, hogy a vizsgált gomba izolált genomiális DNS-ével közvetlen komplementációs kísérleteket végezzünk.

Másik módszer, a homológ genetikai komplementáción alapuló klónozás, amely esetében első lépésként egy megfelelően jellemzett mutánsparc létrehozása szükséges. Ekkor megkísérélhető a defektív fenotípusok direkt komplementációja egy *S. cerevisiae* plazmidban (pl. YRp17) létrehozott génkönyvtár segítségével. Egyes irodalmi adatokból úgy tűnik, hogy a járomspórás gombák örökítő anyagában nagy gyakorisággal fordulnak elő autonóm replikációt lehetővé tevő genetikai elemek, mintegy sajátos "hajlamot" tükrözve a genetikai információ egy részének extrakromoszómális állapotban való fenntartására (VAN HEESWIJCK és RONCERO 1984, ANAYA és RONCERO 1991, RONCERO és mtsi. 1989, BURMESTER és mtsi. 1992, HANFLER és mtsi. 1992, BURMESTER és mtsi. 1987, WÖSTEMEYER és mtsi. 1987, REVUELTA és YAYARAM 1986). Ez teremti meg annak az esélyét, hogy a kis gyakorisággal lejátszódó integratív transzformációs események mellett (ARNAU és STÖMAN 1993), a vad típusú DNS-t tartalmazó vektor képes lehet integrálódás nélkül fennmaradni és hatékonyan komplementálni az adott mutációt.

Gének izolálása megkísérélhető a szekvencia-hasonlóság alapján is, más mikroszkópikus gombákból már klónozott gének segítségével. Ekkor a járomspórás gombatörzs génkönyvtárából, más gombák klónozott génjeit heterológ próbaként felhasználva hibridizációs analízissel azonosíthatjuk a megfelelő klónokat. Ezen kísérletek során azonban ugyanaz a nehézség jelentkezik, mint a genetikai komplementációval történő klónozásakor: a próbaként felhasználható gének döntő többsége rendszertanilag távoli gombafajokból származik, ezért sokszor viszonylag alacsony közöttük a szekvenciahomológia. Ennek okán a járomspórás gombáknál esetenként célszerű lehet az ilyen hibridizációs analízisre alacsonyabbrendű gombák, mint például a Chytridiomycetes klónozott génjeit is felhasználni (REYMOND és mtsi. 1991, DURAN és mtsi. 1994, BRONDIJK és mtsi. 1996). Sikerrel alkalmazható azonban ez a módszer az élővilágban előforduló konzervatív gének klónozásakor, mint pl. *gpd* gén, orotidin-5-monofoszfát dekarboxiláz gén. *Claviceps purpurea*, valamint *Schizophyllum commune* *gpd* gének génkönyvtárból történő izolálásához próbaként az *A. nidulans* *gpd A* gén egy régióját használták fel (JUNGEHÜLSING és mtsi. 1994, HARMSSEN és mtsi. 1982). A *Podospora anserina* ugyanezen génjének izolálása is heterológ hibridizációval történt a *Curvularia lunata* gombából származó próbával (RIDDER és OSIEWACZ 1982). Míg a *Rhizopus niveus leu1* gén klónozásához, a *Mucor circinelloides leu1 A* génjének 2kb-nyi fragmentjét használták hibridizációs próbaként (TAKAYA és mtsi. 1996).

Általában hatékonyan alkalmazhatók azok a klónozási stratégiák, melyekben PCR segítségével generált homológ próbák kerülnek felhasználásra (MULLIS és FALLONA 1987). Ezen a módon történő klónozást sok esetben alkalmaztak *gpd* gének izolálására (pl.

Cryptococcus neoformans, VARMA és mtsi. 1999 ; *Candida albicans*, VILLAON és mtsi. 1999, *Lyophyllum shimeji*, SAITO és TANAKA 1999), de más gének klónozására is (pl. *Phaffia rhodozyma* aktin gén, WERY és mtsi. 1996 ; *Rhizopus oryzae* aspartil proteáz, FARLEY és SULLIVAN 1998 ; *Aspergillus oryzae* glutamináz gén, KOIBUCHI és mtsi. 2000). Bár itt is gondot jelenthet a primerek tervezéséhez használt szekvenciák és az amplifikálni kívánt járomspórás gomba DNS szakasz szükségyszerű különbözősége, azonban a "touchdown" PCR (DON és mtsi. 1991, LICHSTEINER és mtsi. 1993), vagy a "nested", illetve "hemi-nested" amplifikálás (két külső és egy belső primer felhasználásával) elősegítheti korlátozott mennyiségű szekvenciaadat megléte esetén is egy homológ próba előállítását (MAGDOLEN és mtsi. 1995).

1.6. A GLICERINALDEHID-3-FOSZFÁT DEHIDROGENÁZT KÓDOLÓ GÉN (*GPD*)

A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz kódoló gén (*gpd*) kulcsenzimként játszik fontos szerepet a glikolízis folyamatában. A *gpd* gén nagy mértékben és konstitutívan kifejeződő gén : élesztőknél a poly (A)+ RNS 2-5%-át a *gpd* mRNS teszi ki (HOLLAND és HOLLAND 1978, EDENS és mtsi. 1984), míg közel 5%-át a sejten belüli fehérjéknek a *gpd* protein képviseli (KREBS 1953). Az aktív holoenzim tetramer szerkezetű, azonos alegységekkel.

A glikolízis folyamatában a glicerinaldehid-3-foszfát glicerinsav-1,3-difoszfáttá való átalakulását a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (egy NAD-koenzimmal működő tipikus oxidoreduktáz) katalizálja. Az enzim -SH csoportjához történő kötődéssel jön létre az enzim-szubsztát komplex, amelyen bekövetkezik a NAD redukciója. A NADH₂ kevésbé szorosan kötődik az enzimhez, így a környezetben található NAD könnyen lecseréli. Az enzim-szubsztrát komplex - anorganikus foszforilációval - új szubsztrátot kötni képes enzimmé és glicerinsav-1,3-difoszfáttá bomlik.

1.6.1. A *gpd* szekvencián alapuló filogenetikai elemzések

A gombák filogenetikai vizsgálata kezdetben morfológiai és fiziológiai jellegzetességekre épült. Az utóbbi időben azonban filogenetikai elemzések céljára legtöbbször az rDNS génklaszter bizonyos szakaszait szokták alkalmazni (pl. 18S RNS-t kódoló gént). Annak ellenére, hogy a 18S rRNS gén univerzális az élővilágban, nem minden esetben szolgáltat kellő információt a gomba filogenetikai elemzéséhez. Ennek magyarázatául szolgálhat a gén nagymértékű konzervatív volta, melynek következtében mindössze 15%-os eltérés tapasztalható a gombák között. Távolsági rokonsági kapcsolatok, így pl. *Schizosaccharomyces pombe* filogenetikai helyzete sem állapítható meg 18S rRNS génjének vizsgálatával (RADFORD 1993). Eerre a célra alkalmasak lehetnek más, a különböző mikroorganizmusokban általánosan

előforduló, alapvető jelentőségű és viszonylag konzervatívnak tartott genetikai elemek (pl. a *gpd* gén). Verdoes és mtsi. (1997) által a *Phaffia rhodozyma gpd* génjének klónozása kapcsán elvégzett ilyen elemzés számos meglepő eredményre vezetett. A *P. rhodozyma* egyetlen *gpd* gént tartalmaz ellentétben jónéhány más eukariota mikroorganizmussal (pl. *S. cerevisiae*, *Trichoderma koningii*). Sajátos módon a *Phaffia gpd* a legnagyobb homológiát egy fonalas bazidiomicéta *gpd* génnel (*Phanerochaete chrysosporium*) mutatta. A *gpd* gén vizsgálatán alapuló filogenetikai fát (5. Ábra) értékelve több következtetés is levonható. A legérdekesebb, hogy az aszkuszos élesztők (pl. *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*) a fonalas aszkomicétáktól viszonylag korán különválva fejlődtek, közöttük kisebb mértékű rokonsági kapcsolat mutatható ki, mint a bazidiomicéták és a fonalas aszkomicéták között (SMITH 1989). Ez utóbbi megállapítást alátámasztja, hogy a *Saccharomyces cerevisiae*-nél fonalas gombák heterológ promotereit alkalmazva nem történik transzkripció (INNIS és mtsi. 1985, YOSHIKAWA és ASHIKARI 1987), míg pl. *Aspergillus niger* glükóamiláz génjének promotere jól működik a bazidiomicéta *Ustilago maydis* gombában (SMITH 1989). Az élesztő aszkomicéták jelentős különbözősége a fonalas aszkomicétáktól feltehetően az élesztők unicelluláris voltaival magyarázható. Molekuláris szinten ezen élesztők bizonyos szempontból közelebbi rokonságot mutatnak a baktériumokhoz, mint a fonalas gombákhoz és magasabb fejlettségű eukariotákhoz. A bakteriális génekhez hasonlóan a legtöbb *Saccharomyces* gén sem tartalmaz intronokat, ellentétben a fonalas gombákkal, valamint növényi és állati génekkel.

A feltevések szerint az aszkuszos élesztőkben jelenlevő két *gpd* gén, vagy egy, a gombák korai evolúciós történetében lezajlott génduplikáció, vagy a prokariótákból az eukariótákba történő horizontális géntranszfer eredménye. Az utóbbi hipotézist többek között az a felfedezés is alátámasztja, hogy az *E. coli gpd* gén aminosav szekvenciája jelen van egy az aszkomicéta élesztőkhöz viszonylag közel levő csoportban (SMITH 1989).

1.6.2. A *gpd* promotor szekvenciák alkalmazása transzformációs rendszerekben

A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz enzimnek nagyon fontos szerepe van mind a glikolízisben, mind a glükoneogenezisben. Irreverzibilisen katalizálja a glicerinaldehid-3-foszfát foszforilációját és oxidációját foszfogliceráttá és mint az anyagcsere egyik kulcsenzime általában erős expressziót mutat gombákban is. Erős promotor aktivitásának köszönhetően a *gpd* gén 5'-régióját számos esetben felhasználták gomba transzformációs rendszerek kialakítására (PUNT és mtsi. 1987). Élesztőkkel végzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a *gpd* génről íródik át a mRNS 2-5%-a (HOLLAND és HOLLAND 1978). *Cochliobolus heterostrophus*-szal végzett vizsgálatok szerint ez az enzim mind időben, mind pedig különböző szénforrásokat tartalmazó táptalajokon konstitutívan termelődik; az expresszió ugyanolyan mértékű a spórákban és a vegetatív micéliumokban (VAN WERT 1990). Érdekes módon olyan kísérleti

adatok is ismertek, melyek szerint a glicerín-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz szintézise nem konstitutív. A mikoparazita *Trichoderma harzianum*-nál azt tapasztalták, hogy a *gpd* expressziója regulált: erős expressziót detektáltak glükóz jelenlétében, ám jóval gyengébbet, amikor a gazda *Rhizoctonia solani* sejtfalát használták fel egyedüli szénforrásként. Ugyanezen organizmusnál a *gpd* mRNS mennyisége változik az egyes életszakaszok folyamán; csökken a sporuláció alatt és kevesebb a konidioforokban és konídiumokban, mint a vegetatív micéliumokban (PUYESKI és mtsi. 1997). A *Sclerotinia sclerotiorum* esetében pektint, glükózt, glicerolt és arabinózt felhasználva egyedüli szénforrásként azt tapasztalták, hogy a *gpd* gén kifejeződése pektin és glükóz esetében jóval erősebb.

Agaricus bisporus bazidiomicéta gombánál két *gpd* gén jelenlétét igazolták. Harmsen és munkatársai szerint (1992) az egyik *gpd* (*gpd^{Ag1}*) gén feltehetően a gomba életciklusának csak bizonyos részében aktív, vagy pedig bizonyos környezeti feltételek (mint pl. anaerobiózis) hatására aktiválódik és fejeződik ki.

A transzformáció hatásfoka homológ promoter használatakor lényegesen jobb, mivel a szelekciós markerként alkalmazott struktúrgén sokkal erősebb expresszióját teszi lehetővé. Ezt igazolták többek között *Trichoderma reesei* és *Curvularia lunata* fonalasgombákkal végzett kísérletekben is (MACH és mtsi. 1994, OSIEWACZ és RIDDER 1991). Ridder és Osiewacz (1992) a *Podospora anserina* aszkomicéta gombával folytatott kísérletei során megállapította, hogy homológ 5' szabályzó régió használatával a transzformáció hatásfoka jelentős mértékben növekedett, a heterológ *Aspergillus nidulans* promoter szekvenciát tartalmazó plazmiddal történő transzformáció gyakoriságához képest.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A *Rhizomucor* nemzetség képviselői nagy gyakorlati jelentőséggel bírnak úgy biotechnológia és élelmiszeripar területén, mint a humán és állati mikózisok kórokozójaként az orvosi gyakorlatban is. Ezen gombák genetikai rendszere (az intraspecifikus variabilitás mértéke, genom szerveződése) kevésbé ismert.

Munkánk során célul tűztük ki a következőket:

1. Különböző forrásból származó *Rhizomucor* izolátumok intraspecifikus variabilitásának feltárása.
2. Fiziológiai és molekuláris technikákkal (szénasszimilációs spektrum, izoenzim és RAPD analízis, ITS-RFLP) nagyszámú genetikai marker azonosítása.
3. Ezen vizsgálatok eredményei alapján taxonómiai következtetések levonása, valamint a gyakorlat számára hasznos törzstipizálási eljárások kidolgozása.
4. A *Rhizomucor miehei* egy adott törzseből génkönyvtár létrehozása, mely felhasználásával a *gpd* struktúrgén és a kapcsolódó szabályzó régiók klónozása és elemzése.
5. Ezen vizsgálatok azon túl, hogy lehetőséget teremtenek az adott gén molekuláris, funkcionális és filogenetikai elemzésére, kiindulópontul szolgálhatnak további genetikai kísérletekhez. A *gpd* gén szabályzó régiói jól használhatók hatékony transzformációs rendszerek kifejlesztésére. Eredményeink lehetőséget teremtenek egy ilyen, a járomspórás gombákban reményeink szerint általánosan alkalmazható (pl. drogrezisztencián alapuló) transzformációs rendszer kidolgozására.
6. A protoplasztiképzés körülményeinek optimalizálása a *Rhizomucor* fajoknál, melynek a későbbiekben szintén a transzformációs rendszerek létrehozásánál lesz nagy gyakorlati jelentősége.
7. Kariotipizálási előkísérletek megkezdése a *Rhizomucor* fajok genom méretének megismerése céljából.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A VIZSGÁLT MIKROORGANIZMUSOK

3. Táblázat. A felhasznált gombatörzsek.

Kód ^a	Fajnév	Gyűjteményes kód ^b	Eredet	Párosodási típus
R1	<i>R. pusillus</i> ^c	NRRL 3695	talaj, Ukrajna (<i>R. tauricus</i>) ^d	ismeretlen
R2A	<i>R. pusillus</i> ^e	NRRL 2543	állati mikózis, Anglia (<i>R. pusillus</i>) ^d	homotallikus
R2B	<i>R. pusillus</i> ^e	NRRL 2543	állati mikózis, Anglia (<i>R. pusillus</i>) ^d	homotallikus
R4	<i>R. pusillus</i>	NRRL A-23448	ismeretlen	+
R5	<i>R. pusillus</i>	NRRL A-23504	ismeretlen	-
R6	<i>R. miehei</i>	NRRL 3169	ismeretlen, California, U.S.A	homotallikus
R7	<i>R. pusillus</i> ^c	NRRL 3310	ismeretlen, India (<i>R. miehei</i>) ^d	homotallikus
R8	<i>R. miehei</i>	NRRL 5282	borsmenta komposzt, India	homotallikus
R9	<i>R. miehei</i>	CBS 370.71	köpet, Hollandia	homotallikus
R10	<i>R. miehei</i>	NRRL 5284	rothadó alma, U.S.A.	homotallikus
R11	<i>R. miehei</i>	NRRL 5901	tehén placenta, Dakota, U.S.A	homotallikus
R12	<i>R. miehei</i>	NRRL 6303	ismeretlen	homotallikus
R13	<i>R. pusillus</i> ^c	NRRL A-13100	Ismeretlen (<i>R. miehei</i>) ^d	-
R14	<i>R. miehei</i>	NRRL A-18359	ismeretlen	homotallikus
R15	<i>R. miehei</i>	CBS 360.92	humán mikózis, Ausztrália	homotallikus
R16	<i>R. pusillus</i> ^c	ETH M4920	trachea váladék, Svájc (<i>R. miehei</i>) ^d	ismeretlen
R17	<i>R. miehei</i>	ETH M4918	komposzt, Svájc	homotallikus
R18	<i>R. pusillus</i>	WRL CN(M)231	állati mikózis	-

R19	<i>R. pusillus</i>	FRR 2490	ismeretlen, Ausztrália	+
R20	<i>R. pusillus</i>	IBP M.p./1	ismeretlen, Lengyelország	+
R21	<i>R. pusillus</i> ^c	FRR 1652	ismeretlen	+
R23	<i>R. pusillus</i> ^c	NRRL 6399	denevér ürülék, India (<i>R. miehei</i> var. <i>minor</i>) ^d	homotallikus
R25	<i>R. pusillus</i>	NRRL 3638	víztartály, Wisconsin, U.S.A.	+
N6	<i>M. piriformis</i>	NRRL 26212	rothadó körte, U.S.A.	neutrális
Ab1	<i>A. glauca</i>	CCM F450	talaj	-
Rp11	<i>Rh. stolonifer</i>	SzMC 0506	talaj, Illinois, U.S.A.	-

^a A dolgozatban használt izolátumok kódjai.

^b ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Hollandia; ETH, Swiss Federal Institute of Technology Culture Collection (C.C.), Zürich, Svájc; FRR, CSIRO Food Research C.C., North Ryde, New South Wales, Ausztrália; IBP, Institute of Fermentation Industry C.C., Warsaw, Lengyelország; NRRL, Agricultural Research Service C.C., Peoria, Illinois, U.S.A.; WRL, Wellcome Bacterial Collection, Beckenham, Anglia; CCM, Canadian Collection of Microorganism; SzMC, Szeged Microbial Collection, Magyarország.

^c A kísérleteink alapján pontatlannak bizonyult fajnevek.

^d Eredeti fajmeghatározás.

^e Az eredeti törzsből két izolátumot tudtunk kitisztítani. Másik törzsgyűjteményben (ATCC 22064) *R. miehei*-ként írták le.

4. Táblázat. Felhasznált baktériumtörzsek és plazmidok.

Törzsek	Plazmidok
<i>E.-coli</i> DH5α	pBluescript SK (-)
<i>E.-coli</i> XL1 Blue MRA (P2)	
λ Fix II fág	

3.2. TÁPTALAJOK ÉS OLDATOK

Malátás táptalaj (MA)

5% élesztőkivonat; 5% malátakivonat; 1% glükóz; 1% KH_2PO_4 ; 3% agar

Minimál táptalaj (MM)

0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.1% KH_2PO_4 ; 0.05% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 1% glükóz; 1.5% agar;
1 ml/l Wickerman vitamin törzsoldat

Élesztőkivonat-glükóz tápoldat (YEG: "Yeast-Extract-Glucose medium")

1% glükóz; 0.5% élesztőkivonat; 1% KH_2PO_4

LB-táptalaj (pH 7.0)

1% NaCl; 1% tripton; 0.5% élesztőkivonat; 1.5% agar

LB+maltóz tápoldat

1% NaCl; 1% tripton; 0.5% élesztőkivonat; 0.2% maltóz; 10 mM MgSO_4 (pH 7.0)

LB-fedőagar

1% NaCl; 1% tripton; 0.5% élesztőkivonat; 0.7% agaróz; 10 mM MgSO_4 (pH 7.0)

SM puffer

0.58% NaCl; 0.2% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 1 M Tris/HCl (pH 7.5); 2% zselatin

Hibridizációs oldatok

1. detektáló puffer (pH 7.5)

0.1 M maleinsav; 0.15 M NaCl

2. detektáló puffer

1.4% "blocking" reagens 1. detektálási pufferben

3. detektáló puffer

0.1 M Tris-HCl; 0.1 M NaCl; 50 mM MgCl_2 (pH 9.5)

20×SSC

3 M NaCl; 0.3 M Na_3 -citrát

1×STE

1 M NaCl ; 100 mM Tris/HCl (pH 8.0) ; 10 mM EDTA (etilén diamin tetraecetsav) (pH8.0)

10×"feltöltő" puffer

0.06 M Tris/HCl (pH 7.5); 0.06 M NaCl; 0.06 M MgCl_2 ; 0.5% zselatin; 0.015 M DTT (dithioeritol)

Extrakciós puffer

1×térfogó 5×RNB (1M Tris/HCl, 1.25M NaCl, 0.25M EDTA, pH 8.5)

2×PAS (120mg /ml p-aminosalicilsav)

2×TNS (20mg/ml tri-izopropil-naftilszulfonát)

3×fenol

Agaráz puffer

10 mM Bis Tris/HCl (pH 6.5); 1 mM Na₂EDTA

TE puffer

10 mM Tris/ HCl (pH 7.5); 1 mM Na₂EDTA

LETS

0.1 M LiCl; 10 mM EDTA; 10 mM Tris; 0.5% SDS (nátrium lauril szulfát)

TBE

90 mM Tris-borát, pH 8.0; 2 mM Na₂EDTA

TAE

40 mM Tris-ecetsav, pH 7.6; 1 mM Na₂EDTA

3.3. TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK

A törzsek fenntartása malátás táptalajon történt két havonkénti átoltással. Az izoenzim és RAPD analízishez 150 ml tápoldatot (YEG) tartalmazó gömblombikot 10⁷ sejt/ml spóraszuszpenzió 5 ml-ével oltottunk be. A tenyészeteket 37°C-on 48 óráig rázattuk (200 rpm). Az így kapott micélium tömeget szűrővel gyűjtöttük, majd lefagyasztva tároltuk (-70°C) a felhasználásig.

A zigospóráképzés indukálására a törzseket egyenként (homotallikus zigospóra képzés kimutatása), illetve páronként, csíkhúzással malátás táptalaj felszínére oltottuk (két törzs esetén egymástól 2.5 cm távolságra). 37°C-on történő 4-5 nap inkubációs idő után vizsgáltuk a zigospóráképzést sztereomikroszkóp segítségével. A zigospórák méretének meghatározásához a teljes telep felszínét steril desztillált vízzel mostuk, az így kapott sporangiospóra és zigospóra szuszpenzióból a zigospórákat differenciál centrifugálással (2 perc, 2500 rpm) koncentráltuk. A méretek meghatározását Zeiss Laboval mikroszkóppal, okulár és objektív mikrométer felhasználásával végeztük.

3.4. IZOENZIM ANALÍZIS**3.4.1. Fehérjekivonat készítése**

A fagyasztott micélium három grammját folyékony nitrogénben kvarchomok jelenlétében szétdőrszöltük, majd 2.5 ml extrakciós puffert (0.37 M Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 5 mM β-merkaptóetanol; 1% Triton X-100) adtunk hozzá. Az extrahálást követően a mintát 4°C-on 30 percig centrifugáltuk (12 000 rpm). Az utóbbi lépést (a magas lipidtartalom miatt) a

felülúszóval megismételtük, majd a fehérjekivonathoz 1:3 arányban mintapuffert (30% glicerol, 0.25% brómfenolkék) adtunk. Az így kapott mintát a felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.4.2. Elektroforézis és enzimfestés

Az izoenzimek szeparálását poliakrilamid gélen (7.5% szeparációs és 3% gyűjtőgél) végeztük. Az elválasztás, rövid előfuttatás után (15 perc, 200V), állandó feszültség mellett (140 V) 14 órán át történt. Minden kísérletet a Protean II vertikális elektroforézis rendszerben (Bio-Rad, Richmond, CA) végeztünk 1.5×100×160 mm-es géllapok alkalmazásával.

Az enzimaktivitások detektálására felhasznált festékek:

α-észteráz (E.C. 3.1.1.2; Harris és Hopkinson 1976)

150 ml Sörensen foszfát puffer (pH 6.5), 25 mg α-naftilacetát (pár csepp acetonban feloldva), 30 mg Fast Blue B.

Glutamát dehidrogenáz (E.C. 1.4.1.2; Anne és Peberdy 1981)

15 ml 1 M Tris/HCl (pH 8.5), 7.5 ml 1 M Na-glutamát (pH 7.0), 127.5 ml desztillált víz, 30 mg NAD (nikotinsavamid adenin dinukleotid), 60 mg NBT (p-nitro-tetrazólium kék), 8 mg PMS (fenazin metosulfát).

Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (E.C. 1.1.1.49; Mulvey és Vrijenhoek 1981)

150 ml 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 300 mg glükóz-6-foszfát, 600 mg MgCl₂, 30 mg NADP (nikotinsavamid adenin dinukleotid foszfát), 60 mg NBT, 8mg PMS.

Malát dehidrogenáz (E.C. 1.1.1.38; Brewer 1970)

7.5 ml Tris-HCl (pH 8.0), 33 ml 1 M Na-malát (pH 7.0), 110 ml desztillált víz, 100 mg NAD, 60 mg NBT, 8 mg PMS.

Savas foszfatáz (E.C. 3.1.3.2; Harris és Hopkinson 1976)

150 ml 0.1 M Na-acetát (pH 4.6), 0.3 g MgCl₂, 15 mg α-naftil-foszfát, 15 mg PVP (poli-vinil pirrolidon), 30 mg Fast Blue B.

3.5. RAPD ANALÍZIS

3.5.1. DNS kivonás (LEACH és mtsi. 1986 módosítása)

Egy gramm fagyasztott micéliumot üveggyöngy jelenlétében 2 ml LETS pufferben szuszpendáltunk, majd azonnal 1:1 arányban fenol : kloroform : i-amilalkohol (25:24:1, PCI) eleggyel elkevertünk. Centrifugálás után (4°C, 20 perc, 13000 rpm) a felső fázissal a fenolozási lépést még kétszer megismételtük 10 perces centrifugálással. Egy kloroform:i-amilalkohol (24:1, CI) eleggyel végrehajtott végső fehérjementesítő lépést követően az eltávolított felső fázisból a nukleinsavakat kétszeres térfogatú 96%-os etanollal kicsaptuk (-75°C, 180 perc).

Centrifugálás (4°C, 30 perc, 12000 rpm) és vákumos beszáritás után a nukleinsav preparátumot 100 µl TE pufferbe oldottuk fel és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.5.2. DNS amplifikálás (RAPD-PCR) (HU és QUIROS 1991, WILLIAMS és mtsi. 1990)

A felhasznált oldatok

25 µl térfogatú reakcióelegy összetétele:

200-200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Pharmacia)

2.5 µl 10×inkubációs puffer

2.5 mM MgCl₂

0.5 U Taq-polimeráz

0.2 µM primer (Operon Technologies, Inc. C Random Primer kit),

2.5 µl templát DNS (50 ng/µl)

steril desztillált víz

Az amplifikálás körülményei

A reakcióelegyet 40 µl steril ásványolajjal (Sigma) rétegeztük felül. Az amplifikálás egy PTC-100-60 típusú programozható PCR-készülékben (MJ Research, Watertown, USA) történt, a következő reakciókörülmények között:

93°C, 1 perc; lánc szétválasztás

45 ciklus:

92°C, 1 perc; lánc szétválasztás

37°C, 1 perc; primer kötődés

72°C, 2 perc; lánc szintézis

72°C, 5 perc; lánc szintézis

A RAPD vizsgálatokban a következő tíztagú random primereket használtuk fel:

Primer	Szekvencia (5'→3')	Molekulasúly
OPC-01	TTCGAGCCAG	3019
OPC-02	GTGAGGCGTC	3075
OPC-04	CCGCATCTAC	5783
OPC-05	GATGACCGCC	3004
OPC-07	GTCCCGACGA	3004
OPC-13	AAGCCTCGTC	2979
OPC-20	ACTTCGCCAC	2939

3.6. PCR-RFLP

DNS amplifikálás (SAIKI és mtsi. 1988)

“Core” puffer (10 reakcióra):

10-10 µl dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP és dTTP)

50 µl 10×inkubációs puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl)

50 µl MgCl₂ (25 mM)

10 µl steril desztillált víz

“Cocktail” (10 reakcióra):

2.5 µl Taq polimeráz (5U/µl)
5-5 µl primer (100 µM)
287.5 µl steril desztillált víz
500 µl-es Eppendorf csőbe a következő oldatokat mértük össze:
15 µl "Core" puffer
30 µl "Cocktail"
5 µl templát DNS (0.02 µg/µl)

Az amplifikálás körülményei

95°C, 5 perc; lánc szétválasztás
4 ciklus :
95°C, 1 perc; lánc szétválasztás
40°C, 2 perc; primer kötődés
72°C, 3 perc; lánc szintézis
24 ciklus:
95°C, 1 perc; lánc szétválasztás
55°C, 2 perc; primer kötődés
72°, 3 perc; lánc szintézis
72°C, 5 perc; lánc szintézis

Az alkalmazott restrikciós enzimek (NBL Gene Sciences, Cramlington, U.K.) a következők voltak: *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hha*I, *Hind*III, *Kpn*I, *Pvu*II, *Rsa*I és *Xho*I

DNS gélelektroforézis

A DNS molekulák elválasztását 0.7%-os, 1.0%-os, vagy 1.2%-os agaróz/TBE , vagy agaróz/TAE gélben végeztük. Az elválasztott molekulákat etidium-bromidos festést (0.5 µg/ml) követően, UV fluoreszcenciával detektáltuk. Méret markerként leggyakrabban *Hind*III, vagy *Hind*III-*Eco*RI emésztett λ DNS-t használtunk.

3.7. SZÉNASSZIMILÁCIÓS SPEKTRUM ANALÍZIS

A 87 vegyületet teszteltünk egyedi szénforrásként. A törzseket spóraszuszpenzióként (10⁷ spóra/ml) a különböző szénforrást tartalmazó táptalajokra oltottuk. A növekedést 37°C-on történő 5 napos inkubáció után vizsgáltuk. A táptalaj készítésekor, annak rövid ideig (10 perc) tartó sterilizálásával csökkenthető a ("pókhálós") háttér növekedés, melyet az agarból esetlegesen felszabaduló tápanyagok okozhatnak. Az értékelés: nincs növekedés: -, nem egyértelműen hasznosított szénforrás: (+) vagy (-), gyenge: +, közepes: ++, erős növekedés: +++ jelekkel történt. Néhány esetben a vegyületek egyéb hatásait is megfigyelték: (g): csírázás gátolt, (K): kompakt gátlás.

3.8. SZÁMÍTÓGÉPES ADATFELDOLGOZÁS

A RAPD analízis adataiból – az amplifikációs termékek jelenléte vagy hiánya alapján – bináris mátrixot készítettünk. Az értékelésnél a sávok intenzitásbeli különbségeit nem vettük

figyelembe, noha ezek az eltérések többnyire reprodukálhatók voltak. Az adatokból Jaccard (S_1 , SOKAL és MICHENER 1958) hasonlósági koefficienszt számoltunk. A dendrogramot minden esetben csoportátlag módszerrel (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*, UPGMA, SNEATH és SOKAL 1973) szerkesztettük. A dendrogramokon a különbségi (*dissimilarity*, D) értékek lettek feltüntetve.

Az adatmátrix feldolgozását és az eredmények grafikai megjelenítését a SYNTAX 5.0 programcsomag (PODANI 1993) segítségével végeztük. Ez a szoftver alkalmas a numerikus taxonómiában használt legfontosabb matematikai analízisek elvégzésére.

3.9. GÉNKLÓNOZÁSNÁL FELHASZNÁLT MÓDSZEREK

Felhasznált törzsek

Kísérleteinket a *Rhizomucor miehei* ATCC 46344 törzsén végeztük. A reprezentatív génkönyvtár elkészítéséhez a λ FIX II fagot (Stratagene) használtuk fel. A fágfertőzés céljára a XL1-Blue MRA (P2) *E. coli* törzset (Stratagene), míg a szubklónozási kísérletek transzformációiban az *E. coli* DH5 α törzset alkalmaztuk.

DNS izolálás *Rhizomucor miehei*-ből génkönyvtár készítéséhez

YEG tápoldatban 2-3 napig rázatott tenyészetből a micéliumot leszűrtük és folyékony nitrogén jelenlétében dörzsmozsárban elporítottuk. 4 ml 55°C-os "extrakciós puffer" hozzáadása után 1 percig óvatosan ráztuk, majd 1 ml kloroform:i-amilalkohol elegy (CI; 24:1) hozzáadása után centrifugáltuk szobahőmérsékleten (10000 rpm/10 perc). A vizes fázishoz 2 térfogatnyi 96%-os etanolt (4°C) hozzáadva -20°C-on 5 percig inkubáltunk. Ezt követően szobahőmérsékleten centrifugáltuk (15 perc/15000 rpm), a csapadékot szárítottuk, majd 3 ml TE-ben feloldottuk. 3 ml fenol:kloroform (1:1) hozzáadását és 10 perc/10000 rpm-en, szobahőmérsékleten történő centrifugálást követően a vizes fázishoz 2 ml CI-elegyet mértünk és újból centrifugáltunk (10000 rpm/10 perc, 20°C). A vizes fázishoz 1/10-ed térfogat 3M Na-acetátot és 2.5 térfogat 96%-os etanolt adtunk, majd centrifugáltunk (10 perc/10000 rpm). A csapadékot beszárítottuk, majd 1.6 ml TE-ben 4°C-on 12 órán át oldódni hagytuk. 30 μ l (25 mg/ml) RNáz oldat és 30 μ l (1 mg/ml) proteináz K oldat hozzáadását követően a mintát 4 Eppendorf csőbe szétosztottuk és 2 órán át 37°C -on inkubáltuk. Ezután 1 térfogat fenol:kloroformot (PC; 1:1) mértünk hozzá, centrifugáltuk (10 perc/12000 rpm, 20°C), majd ezt a lépést megismételtük. A vizes fázishoz 1 térfogat vízzel telített kloroformot adtunk, majd centrifugáltunk (10 perc/12000 rpm). A DNS-t 1/10-ed térfogat Na-acetát (3 M) jelenlétében, 2

térfogat 96%-os etanollal kicsaptuk (5 perc, -20°C), centrifugáltuk (15 perc/12000 rpm), 70%-os etanollal mostuk, centrifugáltuk (5 perc/12000 rpm), majd 37°C-on történő beszáritás után 250 µl desztillált vízben oldottuk.

A parciális emésztés optimalizálása

100 µl genomiális DNS-hez 15 µl *Sau3AI* enzimpuffert és 35 µl steril desztillált vizet adtunk, majd ezt 9 Eppendorf csőbe szétosztottunk úgy, hogy az első csőbe 30 µl, a többibe pedig 15-15 µl oldat került. Az első csőhöz 0.5 µl (10U/µl) *Sau3AI* enzimet adtunk, amelyből nyolc lépcsőben felező hígítást készítettünk. A DNS emésztést 1 órán át 37°C-on végeztük. Az enzimreakció leállítása 4 M karbamid, 50 mM EDTA (pH 7.0), 50% szaharóz és 0.1% brómfenolkék tartalmú oldattal történt 10 perc 65°C-on való inkubálással. Gélelektroforézissel megállapítottuk, mely enzimkoncentráció eredményezte a megfelelő mértékű emésztést. Ezután az emésztést 300 µl DNS mintával is elvégeztük.

A parciálisan emésztett genomiális DNS visszaizolálása gélből

A 0.7%-os alacsony olvadáspontú agarózból készült gélből a 10-20 kb méretű DNS fragmenteket tartalmazó gélrészletet kivágtuk, majd 1/10 térfogat 10×agaráz puffer hozzáadása után 65°C-on felolvasztottuk. Ezt követően a mintákat 40°C-ra hűtöttük és β-agarázzal kezeltük (1.5 U, 1 óra, 40°C), majd 1/10 térfogat Na-acetát (3 M, pH 5.2) és 2 térfogat 96%-os szobahőmérsékletű etanol hozzáadása után 2 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután centrifugáltuk (30 perc/12000 rpm), és beszáritás után 200 µl desztillált vízben feloldottuk.

Feltöltési reakció

200 µl DNS-hez 30 µl 10×"feltöltési" puffert, 5-5 µl 10 mM dGTP-t és dATP-t, valamint 15 U Klenow enzimet adtunk, majd a reakcióelegyet 300 µl-re egészítettük ki desztillált vízzel. 20°C-on 15 percig inkubáltunk, majd 33 µl 10×STE puffert és 100 µl 1× STE puffert mértünk hozzá. Fenol:kloroformos extrakció után a DNS-t etanollal (10 perc, -20°C) kicsaptuk, majd centrifugálás után (15 perc/12000 rpm, 0°C) az üledéket beszáritottuk és 10 µl TE pufferben feloldottuk.

Alkalikus foszfatáz kezelés

5 µl DNS-hez 3 µl 10×alkalikus foszfatáz puffert, 0.1 µl (0.01 U) alkalikus foszfatáz enzimet és 22 µl desztillált vizet adtunk. Kétszer 30 percig 37°C-on inkubáltunk úgy, hogy a második inkubáció előtt újra 0.1 µl alkalikus foszfatáz enzimet mértünk az elegyhez. 2 µl

EDTA (0.5 M, pH 8.0) hozzáadása után 10 percig 75°C-on inkubáltuk, majd fenol:kloroformos és etanolos kezelés után a DNS-t 2.5 µl desztillált vízben oldottuk.

Ligálási reakció

A ligálás 16 órán át 4°C-on történt a következő reakcióelegyben :

- 1 µl λ-FIXII fág DNS (Stratagene)
- 2.5 µl feltöltött/alkalikus foszfatázzal kezelt genomiális DNS
- 0.5 µl 10× ligáz puffer
- 0.7 µl T4 DNS ligáz (3 U/µl)
- 0.3 µl desztillált víz

Fágcsomagolási reakció

A genomiális DNS tartalmú λ-FIXII fág DNS fágfejbe történő bepakolása 22°C-on 2 órán át történt (2.5 µl ligátum + 1 µl λ FIXII fág "packaging extract" (Stratagene)). A reakció leállítása 500 µl SM puffer és 20 µl kloroform hozzáadásával történt. 4°C-on hónapokig eltartható az így módon előállított DNS könyvtár.

A *Rhizomucor* génkönyvtár amplifikálása

Az XL1-Blue MRA (P2) baktérium törzset $OD_{600} = 0.6$ eléréséig neveltük LB-maltóz tápoldatban. Centrifugálást követően 10 mM $MgSO_4$ -ban felfuszpendáltuk a baktériumsejteket, majd a lambda fággal való inkubálást követően (37°C, 30 perc) fedőagarózzal (42°C) elkeverve alaptáptalaj felszínére öntöttük. A 7-8 óra után megfelelő méretűvé váló plakkokból a fágreszecskéket SM pufferrel mostuk ki (overnight, 4°C). A fáguszuspenziót 5% (v/v) kloroformmal kezeltük, centrifugáltuk, majd a felülúszóhoz 3% (v/v) kloroformot adva 4°C-on tároltuk. Hosszú idejű tárolás -70°C-on történik 7% DMSO (dimetil szulfoxid) hozzáadása után.

A *Rhizomucor* génkönyvtár titrálása

Az amplifikált könyvtárból 15µl-t, illetve ebből 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} hígítási lépcsők hasonló térfogatait 150µl - 150µl XL1-Blue MRA (P2) baktériummal inkubáltunk (37 °C-on 30 perc), majd fedőagarózzal elkeverve csészékre öntöttük.

A génkönyvtár szűrése

A génkönyvtár amplifikálásánál leírt módon történt a fágfertőzés. Az LB táptalajon 7-8 óra elmúltával plakkok jelentek meg. A csészéket 2 órára 4°C-ra helyeztük, majd membrán (Amersham N+) lenyomatot vettünk. A membránokat szárítás után (10-20 perc, szobahőmérséklet) 2 percig 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl-ban (denaturálás), 5 percig 0.2 M TRIS

(pH 7.5)/ 2×SSC (neutralizálás), végül 30 másodpercig 2×SSC-ben mostuk. A membránokat levegőn szárítottuk, majd 30 másodpercig ultraibolya (UV) fénnel kezeltük.

Jelölt próba készítése

A felhasznált *gpd*-specifikus primerek (VERDOES és mtsi. 1997):

(3005)' - cgggatccaa(ag)ctiaciggiatggc - 3'

(331-338 aminosavak: WYDNEWGY)

(3006)5'- cgggatcc(ag)taicc(cag)(ct)a(tc)tc(ag)tt(ag)tc(ag)tacca - 3'

(241-246 aminosavak: KLTGMA)

Az amplifikálás körülményei

95°C, 5 perc; lánc szétválasztás

5 ciklus

95°C, 1 perc; lánc szétválasztás

50°C, 2 perc; primer kötődés

72°C, 2 perc; lánc szintézis

25 ciklus

95°C, 1 perc; lánc szétválasztás

55°C, 2 perc; primer kötődés

72°C, 2 perc; lánc szintézis

72°C, 10 perc; lánc szintézis

A PCR reakcióelegy

200-200 µM dNTP

5 µl 10×Taq puffer

2.5 µM MgCl₂

steril desztillált víz

0.5 µM primer

2.5 U Taq-polimeráz

2 µl DNS (50ng/µl)

A mintákra 40 µl steril ásványi olajat rétegeztünk.

A próba jelölése

A gélből visszaizolált 300 bp-nyi fragmentet digoxigenines (DIG DNA labeling and detection kit; Boehringer Mannheim) módszerrel a gyártó utasítása szerint megjelöltük.

DNS visszaizolálás agaróz gélből

Az amplifikált PCR termék gélből történő visszaizolálásához: a géldarab tömegét lemértük, Eppendorf csőbe 3 térfogat NaI oldatot adtunk hozzá, majd 55°C-on 5 percig inkubáltuk (míg a gél feloldódott). Ezt követően 1 µg DNS-re 5 µl üveggyöngy ("glasmlch")-szuszpenziót mértünk, 5 percig jeges vízfürdőben inkubáltuk, majd rövid ideig (30 másodperc) centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, ismét centrifugáltuk (15 másodperc), majd az

üledéket 500 µl 70% etanollal óvatosan mostuk. Ismételt centrifugálást követően (kétszer 15 másodperc) a felülúszót eltávolítottuk, majd a mintát 37°C-on beszárítottuk. Az DNS-t 20 µl desztillált vízzel eluáltuk az üveggyöngyökről, amelyeket kétszer rövid ideig tartó centrifugálással távolítottunk el.

A gélből való DNS visszaizolálására esetenként alkalmaztuk a GeneElute (Supelco) minioszlopot is.

Hibridizációs körülmények

A hibridizációs membránt (Amersham N+) két órán át 68°C-on hibridizációs pufferrel előhibridizáltuk, majd 12 órán át 68°C-on, 2.5 ml hibridizációs pufferhez adott 15 µl jelölt DNS próbával hibridizáltuk. A próba jelöléséhez minden esetben a nem radioaktív digoxigenines jelölést (DIG DNA labeling and detection kit; Boehringer Mannheim) alkalmaztuk a gyártó utasításainak megfelelően.

A hibridizációs membránt szobahőmérsékleten kétszer öt percig 2×SSC, 0.1% SDS oldattal, majd kétszer tizenöt percig 68°C-on 0.1×SSC, 0.1% SDS oldattal mostuk. Ezt követően az 1. pufferrel 1 percig, majd a 2. pufferrel 30 percig, majd a 2. pufferhez adott 4 µl antitest konjugátummal újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Kétszer tizenöt perces mosást (1. puffer) követően a detektáláshoz 3. pufferhez adott 200 µl előhívó reagenst (p-nitro-tetrazólium kék (NBT) + 5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfát (BCIP)) használtunk.

Kompetens sejtek készítése

DH5α *E. coli* egy éjszakán át nevelt tenyészetéből 1 ml-t 100 ml LB tápoldatba átoltván a baktériumokat OD₆₆₀ = 0.4 érték eléréséig 37°C-on rázattuk. A tenyészetet centrifugáltuk (7000 rpm/10 perc, 4°C), majd a sejteket 50 ml 50 mM-os CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk. 10 percig jeges vízfürdőben inkubáltuk, ezután újra centrifugáltuk (7000 rpm/10 perc), majd a kiülepedett sejteket 1/20-nyi térfogat, 50 mM-os hideg CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk és 1 órán át jégfürdőben inkubáltuk. A kompetens sejtek –70°C-on, 15% glicerol hozzáadásával hónapokig tárolhatók.

Plazmid tisztítás

Az LB táptalajon nevelt transzformáns sejtekből a plazmid DNS-t a Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad) segítségével tisztítottuk, a gyártó utasítása szerint.

Ligálás szubklónozási kísérletekben

1 µl 10×T4 DNS ligáz puffer

1 μ l pBluescript SK (-) plazmid
1 μ l T4 DNS ligáz enzim
7 μ l DNS fragment

Ligálás 18°C-on 16 órán át történt. A reakciót : 10 perces, 65°C-os hőkezeléssel állítottuk le.

Baktérium transzformáció

350 μ l fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 5 μ l ligátumot (plazmidot) adtunk hozzá. 30 perc inkubálás után (4°C), 2 percig 42°C-on tartottuk (hősokk). 0.5 ml LB hozzáadását követően 37°C-on 1 órán át inkubáltuk, ampicillin tartalmú (100 μ g/ml) LB táptalajra szélesztettük 40 μ l IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid, 20 mg/ml) és 70 μ l X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol- β -D-galaktopiranozid, 20 mg/ml) jelenlétében. A felhasznált *E. coli* törzs a kromoszómán hordozza a β -galaktozidáz enzim C-terminálisát kódoló részt, amely önmagában funkcióképtelen. A transzformációhoz használt pBluscript vektor (az antibiotikum rezisztencia gén mellett) a fehérje N-terminális, önmagában szintén működésképtelen α -peptidjét kódolja. E két protein azonban az interallélikus komplementációhoz hasonlóan funkcióképes fehérje komplexet alkot a sejtben, aminek következtében a baktériumsejtek IPTG induktor és X-gal szubsztrát jelenlétében kékek lesznek. Az α -peptidet kódoló génszakasz klónozóhelyeire beépült inzert azonban inaktíválja azt, így az ilyen plazmidot hordozó baktériumsejtek IPTG és X-gal jelenlétében is fehérek maradnak.

A fág DNS tisztítás

A fágfertőzés után a szétesett baktérium tenyészetéhez 1 μ g/ml-es végkoncentrációban RNáz-t és DNáz-t adtunk; 37°C-on 30 percig inkubáltunk. A lizátumhoz ezután 5.8 g NaCl-ot és 9.3 g PEG₈₀₀₀-et (polietilén-glikol) adtunk (100 ml lizátumra), majd 1 órán át 4°C-on inkubáltuk. Centrifugálást követően (10000 rpm/20 perc, 4°C) a csapadékot 10 ml fágpufferben oldottuk, majd ismét centrifugáltunk (8000 rpm/2 perc, 4°C). A felülúszóhoz 100 μ l 10% SDS-t és 100 μ l 0.5M EDTA-át (pH 8.0) adtunk, majd 68°C-on 15 percig inkubáltuk. Az elegyet PCI hozzáadása után centrifugáltuk (12000 rpm/5 perc). A PCI kezelést kétszer megismételtük. A vizes fázishoz azonos térfogatban izopropanolt adtunk és -70°C-on 20 percig inkubáltuk. Centrifugálást követően (12000 rpm/10 perc, 4°C), a csapadékot 70%-os etanollal mostuk, vákuumban szárítottuk és 200 μ l desztillált vízben feloldottuk.

DNS szekvenálás

A vizsgálatainkban elemzett DNS szakaszok szekvenálása az MTA Szegedi Biológiai Központban történt. A nukleotidsorrend meghatározását Applied Biosystem 373 DNA

sequencer automata szekvenátorral végezték. A DNS szakaszok összehasonlítását nemzetközi adatbázisokban (NCBI, National Center for Biotechnology; EMBL, European Molecular Biology Laboratory) fellelhető szekvenciákkal a BLAST (ALTSZUL és mtsi.1990) és FASTA (PEARSON és mtsi. 1988) programok felhasználásával végeztük.

A *gpd* fragmentek filogenetikai analízise

Az AS szekvenciák párosítása a Clustal W szoftver (THOMPSON és mtsai, 1994) felhasználásával történt. A szekvenciaadatok filogenetikai elemzéséhez a szomszéd-összevonás (*neighbor-joining*, NJ; SAITOU és NEI 1987) analízist, míg a törzsfa elkészítéséhez a PHYLIP 3.5 programcsomagot (FELSENSTEIN 1993) használtuk fel.

4.0. PULZÁLTATOTT MEZEJŰ GÉLELEKTROFORÉZIS (PFGE)

Protoplasztképzés

A gombákat spóraszuszpenzió formájában malátás táptalaj felszínére helyezett celofán membránra oltottuk. Inkubálást követően (37°C, 17-24 óra a fajtól függően) a celofánlapokat a kinőtt fiatal telepekkel 0.5 M szorbitol oldatba helyeztük, amely 1.2% liofilezett *Helix pomatia* gyomornedv kivonatot (*Protoplast forming enzyme*, Boehringer), valamint 0.1% Novozym-et tartalmazott. Szobahőmérsékleten, gyenge rázogató mellett 0.5-1 óráig inkubáltunk. A protoplasztokat steril vattán szűrtük és centrifugálással (2000 rpm) gyűjtöttük.

Mintaelőkészítés

500 µl 1 M szorbitollal kétszer átmosott protoplaszthoz (kb. 4×10^8 protoplaszt/ml) 600 µl 1.3% agarózt (low gelling temperature agarose, Type VII, Sigma) és 100 µl Proteinase K-t (10 mg/ml, Promega) kevertünk. A megszilárdult agaróz blokkokat, 10 ml inkubációs pufferbe (1 mg/ml Proteinase K, 0.5 M EDTA, 10 mM Tris, 1% Na-laurilszarkozinát; pH 9.5) helyeztük és 24 órán át 50°C-os hőmérsékleten inkubáltuk. Végül az agaróz blokkokat 5 ml 50 mM EDTA-val mostuk és további felhasználásig 4°C-on tároltuk.

Pulzátlatott mezejű gélelektroforézis

A kromoszómális nagyságú DNS molekulák elválasztását CHEF DR II készüléken (Bio-Rad), 0.5×TBE pufferben 0.7% chromosomal grade agarose-t (Bio-Rad) tartalmazó gélben végeztük. A futató puffert (0.5×TBE) 10°C-os hőmérsékleten folyamatosan cirkuláltattuk. Az elválasztás először 75 óráig, 44 V feszültség és 5000 másodperc pulzusidő mellett, majd 80 órán át 47 V

feszültséggel és 3000 másodperc pulzusidővel, végül 75 órán keresztül 49 V feszültséggel és 2100 másodperc pulzusidővel történt. Az elektroforézist követően a gélt 1 órán át 0.5 µg/ml etidium-bromiddal festettük, ezután 12 órára desztillált vízbe helyeztük.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

A kísérletek megkezdésekor az izolátumok eredeti fajmeghatározását nem bíráltuk felül, annak ellenére, hogy az némely esetben kétségesnek bizonyult, így például az R2 esetében, amelyet két amerikai törzsgyűjtemény, két különböző fajként tart fenn (NRRL: *R. pusillus*; ATCC: *R. miehei*). Céljaink között szerepelt, hogy vizsgálataink eredményeként egy olyan identifikációs sémát is kidolgozzunk, amely a gyakorlatban biztosíthatja ezen fajok megbízható elkülönítését. Ennek használhatóságát is tesztelni kívántuk a rendelkezésünkre álló bizonytalan besorolású izolátumokkal.

A kísérletek megkezdése előtt valamennyi törzsből monosporangialis izolátumot készítettünk. Ezzel a célunk a vizsgált törzsek, illetve az azokból származó tenyészetek homogenitásának biztosítása, illetve ellenőrzése volt. Az R2 kivételével valamennyi törzset (morfológiai bélyegeit) tekintve homogénnek találtuk. Az R2 tenyészetében azonban, két, egymástól telepmorfológiai bélyegeik alapján jól elkülöníthető törzs (a későbbiekben jelölésük: R2A és R2B) keverékének bizonyult.

A numerikus taxonómiai elemzések megfelelő kiértékelhetőségének biztosítására három *Mucor*, *Rhizopus*, illetve az *Absidia* nemzetséget reprezentáló izolátumot („outgroup”) is bevontunk a kísérletekbe.

5.1. ZIGOSPÓRÁK VIZSGÁLATA

A vizsgált 23 *Rhizomucor* törzs közül 13 bizonyult homotallikus jellegűnek. A párban leoltott törzsek közül csak az R16 izolátum esetében nem sikerült zigospóra képzést kiváltani egyetlen tesztelt párosításban sem. A homotallikus *R. miehei* izolátumok átlagos zigospóra mérete 36 μm -nek, a homotallikus *R. pusillus* izolátumoké 53 μm -nek, míg a heterotallikus szexuális folyamatok révén kapott zigospórák átlagos mérete 54 μm -nek bizonyult.

Schipper (1978), a *Rhizomucor* génusz taxonómiai feldolgozásakor a zigospórák méretét az egyes fajoknál valamelyest eltérőnek találta: adatai szerint *R. pusillus* esetében a zigospóra átmérője 50 μm -nél nagyobb, míg a *R. miehei*-nél 50 μm -nél kisebb.

Elfogadva ezt kindulópontként, csak a zigospóra képzés és méret eredményeit tekintve az R7-es, valamint az R23-as törzset a *R. pusillus* fajhoz kellene sorolni. Hasonlóképpen, az R13 és az R21 („*R. miehei*”) bizonyított heterotallikus jellege egyértelműen a törzsek hibás identifikálására utal. Nincs pontos magyarázat a zigospóráképzés hiányára az R16 törzs esetében.

A kísérletek ezen szakaszában elsősorban a következő pontokban ismertetett szénasszimilációs spektrum és izoenzim analízis, valamint PCR technikák, továbbá a zigospóráképzés és a zigospórák morfológia vizsgálatának megelőzően leírt eredményei (kiegészítve telepmorfológiai és fiziológiai jellemzők vizsgálatával) már elegendő adatot nyújtottak a vizsgált törzsek fajmeghatározásának revíziójához. Ezek alapján az R7, R13, R16, R21 és R23 esetében téves a fajmegjelölés: a megadott *R. miehei* helyett *R. pusillus* fajokról van szó.

5.2. A RHIZOMUCOR FAJOK GENETIKAI VARIABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

5.2.1. Szénasszimilációs spektrum analízis

A *Rhizomucor* fajok elkülönítése az eddigiekben a sporangiospórák sejtmagszámának meghatározásával (TANSEY 1984), vagy keresztezési kísérletekkel, a zigospórák felszínének morfológiai vizsgálatával történt (SCHIPPER 1978, WEITZMAN 1995). Sokszor azonban nem egyértelműek a különbségek (TANSEY 1984), vagy pedig túl hosszú időt igényel a vizsgálat (SCHIPPER 1978).

A szénasszimilációs spektrum, valamint az izoenzim analízis is megbízhatónak bizonyult a *Mucor* génuszon belüli taxonómiai bizonytalanságok tisztázására (VÁGVÖLGYI 1996, VÁGVÖLGYI 1996).

Néhány vegyület szénforrásként történő hasznosítását már Scholer és Müller (1966, 1983) is tanulmányozta: a tiamin növekedést stimuláló hatását észlelték a *R. miehei* törzseknél, ugyanakkor ezen törzsek ellentétben a *R. pusillus* izolátumokkal képtelenek a szaharózt önnáló szénforrásként felhasználni. Azonban, ez a fiziológiai marker sem válhatott kétségek nélkül használható bélyeggé; egy későbbi vizsgálat során Branner-Jørgensen és Nielsen (1974) nem találták szignifikánsnak az eltérést a két faj izolátumainak szaharóz hasznosítása között.

Kísérleteink során a *Rhizomucor* törzsek szénforrás hasznosítási képességét 87 vegyületen teszteltük. Ezek közül 13 vegyület egyedi szénforrásként történő hasznosítására valamennyi törzs képes volt: D-lixóz, L-xilóz, maltóz, laktóz, melibióz, keményítő, szorbitol, L-alanin, L-prolin, L-tirozin, L-aszparagin, raffinóz és glicerol- α -monoacetát. Másik 13-on egyetlen törzs sem mutatott növekedést: xilán, γ -butirolaktát, vanillin, α -metil-D-xilozid, aszkorbinsav, L-glutamin, L-almasav, metanol, orotsav, L-lizin, protokatekusav, inulin, galluszsav. 13 vegyület hasznosítása nem volt egyértelmű az értékelés során: L-ramnóz, L-izoleucin, L-szerin, citozin, timin, dihidroxil- aceton, α -metil- D-galaktozid, D-glükózamin, fumársav, szukcinilsav, glükonsav, L-ornitin, uracil. 48 olyan szénforrást találtunk, amelyen a vizsgált 23 *Rhizomucor* törzs legalább egyike a többitől eltérő növekedést mutatott (5. Táblázat). Ezen táblázatban összehasonlítjuk a *Rhizomucor* törzsek szénasszimilációs képességét a másik három rokon génuszt reprezentáló faj izolátumainak szénforráshasznosítási képességével.

Ezen vizsgálati eredményekkel kapcsolatban hangsúlyoznunk kell, hogy egy adott vegyület szénforrásként történő tesztelésekor kapott negatív eredmény nem feltétlenül azt jelzi, hogy az adott *Rhizomucor* faj által nem hasznosítható szénforrásról van szó. Számos tényező (pl. a vegyület koncentrációja, hőmérséklet, pH) hozzájárulhat egy ilyen negatív eredményhez és más kísérleti körülmények között elképzelhető, hogy némiképp eltérő növekedési mintázatot észlelnénk. Ezen kitétel ellenére, eredményeink azt bizonyítják, hogy szigorúan meghatározott kísérleti körülmények között vizsgált szubsztrát hasznosítási sajátosságok (mivel indirekt módon az egyes törzsek genetikai hátterére reflektálnak), jól felhasználhatók a taxonómiai vizsgálatokban.

5. Táblázat. Kizárólagos szénforrásként eltérő módon felhasznált vegyületek listája

Vegyületek	<i>R. tauricus</i>	<i>R. miehei</i>	<i>R. pusillus</i>	<i>Rhizopus (Rp11)</i>	<i>Absidia (Ab1)</i>	<i>Mucor (N6)</i>
D-ribóz	-	++	++	(-)	+	-
D-arabinóz	- (g)	+	+	-	(-)	-
D-xilóz	-	++	++	+	++ +	+ (K)
D-glükóz	- (g)	++ +	++ +	+	++ +	++ +
D-mannóz	-	++ +	++	+	++ +	++ +
D-galaktóz	-	++	++	+	++ +	++ +
D-fruktóz	-	++	++	+	++ +	++ +
L-arabinóz	-	++	++	+	++	+
L-szorbóz	- (K)	(-)	(+)	-	(+)	+
szaharóz	++	-	+	-	++ +	- (g)
cellobióz	-	++	++	+	++ +	++ +
melecitóz	(-)	(-)	(-)	-	+	+
dextrán	- (g)			-	-	(-)
glicerol	-	-	+	+	(+)	-
i-citritol	+	(-)	+	-	-	(-)
D-mannitol	-	++	+	+	++	+
galaktitol	(+)	(-)	-	-	(+)	(-)
ribitol	-	+	+	(-)	++ +	+
mio-inozitol	-	(+)	(-)	-	-	(-)
xilitol	-	+	+	+	++	+
glicin	- (g)	-	+	+	+	(-)
L-valin	-	(+)	+	- (K)	(+)	(-)
L-leucin	-	-	-	-	+	(-)
L-metionin	-	(-)	-	- (K)	-	(-)
L-fenilalanin	(+)	-	+	(-)	(+)	(-)
L-triptofán	+	-	-	-	-	(-)
L-treonin	-	(-)	(-)	-	(-)	(-)
L-cisztein	-	(+)	(-)	-	(-)	(-)
L-aszparagin sav	-	++	+	+	++ +	++ (K)
L-glutaminsav	-	++	++	+	++ +	+
L-arginin	- (g)	- , +	+	(-)	+	(-)
L-hisztidin	(+) (K)	(-) (K)	-	- (K)	+	-
β-alanin	(+)	-	+	-	(+)	(-)
L-citrullin	-	-	(-), +	(+)	(+)	(-)

5. Táblázat. Kizárólagos szénforrásként eltérő módon felhasznált vegyületek listája (folytatás)

Vegyületek	<i>R. tauricus</i>	<i>R. miehei</i>	<i>R. pusillus</i>	<i>Rhizopus (Rp11)</i>	<i>Absidia (Ab1)</i>	<i>Mucor (N6)</i>
uridin	-	-	(+), --	-	-	-
citidin	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)
adenozin	-	(-)	(+)	(-)	+	+
L-tejsav		-	-, (+)	(-)	-	(+)
L-hidroxi-butirát	(-)	-	(-), +	-	-	(-)
β -metil-D-galaktozid	++	+, (+)	++	-	-	+
α -metil-D-mannozid	- (g)	- (K), +	- (K), +	-	-	(-)
5-keto-D-glukonsav	-	-, (+)	+	-	-	-
2-keto-D-glukonsav	-	(-), +	+	-	+	(-)
gentizinsav	+	-, +	+	-	-	-
D-glükuronsav	-	-, +	-, +	-	-	-
D-L-izocitromsav	+	-	-, +	+	+	(-)
piroszölösav	(+)	(+), +	(-), +	(+)	+	+
β -metil-D-glükozid	(-)	-, (-)	-, (-)	-	(-)	-

Eredményeink megerősítik Scholer és Müller (1966) megfigyelését a szaharóznak szénforrásként történő hasznosításával kapcsolatban. Ezen megfigyelés mellett, a gyakorlati célú fajidentifikálás számára az egyik legfontosabb eredményként, sikerült 3 további olyan vegyületet meghatározni (β -alanin, L-fenilalanin, glicin), amelyek egyedi szénforrásként történő hasznosítása a *R. pusillus* és *R. miehei* faj között megbízhatóan differenciáló értékű.

A felsorolt négy vegyület közül a *R. tauricus* hármát tudott hasznosítani önálló szénforrásként (szaharóz, fenilalanin, β -alanin). A 48 szénforrás közül egy vegyületen (L-triptofán) a *Rhizomucor* fajok közül kizárólag a *R. tauricus* mutatott növekedést. Ezen eredmények alapján felvetődött bennünk a kérdés, hogy a morfológiailag teljesen eltérő, különböző táptalajon eltérő mértékben spórázó, zigospóra létrehozására képtelen egyetlen *R. tauricus* képviselő vajon valóban különálló faj-e, vagy egy heterotallikus *R. pusillus* mutáns törzs. Vad típusú törzseknél az asszimilációs spektrum analízis jól értékelhető eredményeket mutat, azonban pleiotróf mutáció jelenlétében, amely eltérő biokémiai működést eredményez a vizsgált szervezeteknél, téves következtetés levonásához vezethet. Feltehetően a *R. tauricus* jellegzetes szén-, illetve nitrogén forrás hasznosításának hátterében is egy ilyen jellegű mutáció

áll. Pleiotróp mutánsok jól ismertek a gombák világában (pl. *Aspergillus nidullans creA* génjének mutációja, HYNES és KELLY 1977).

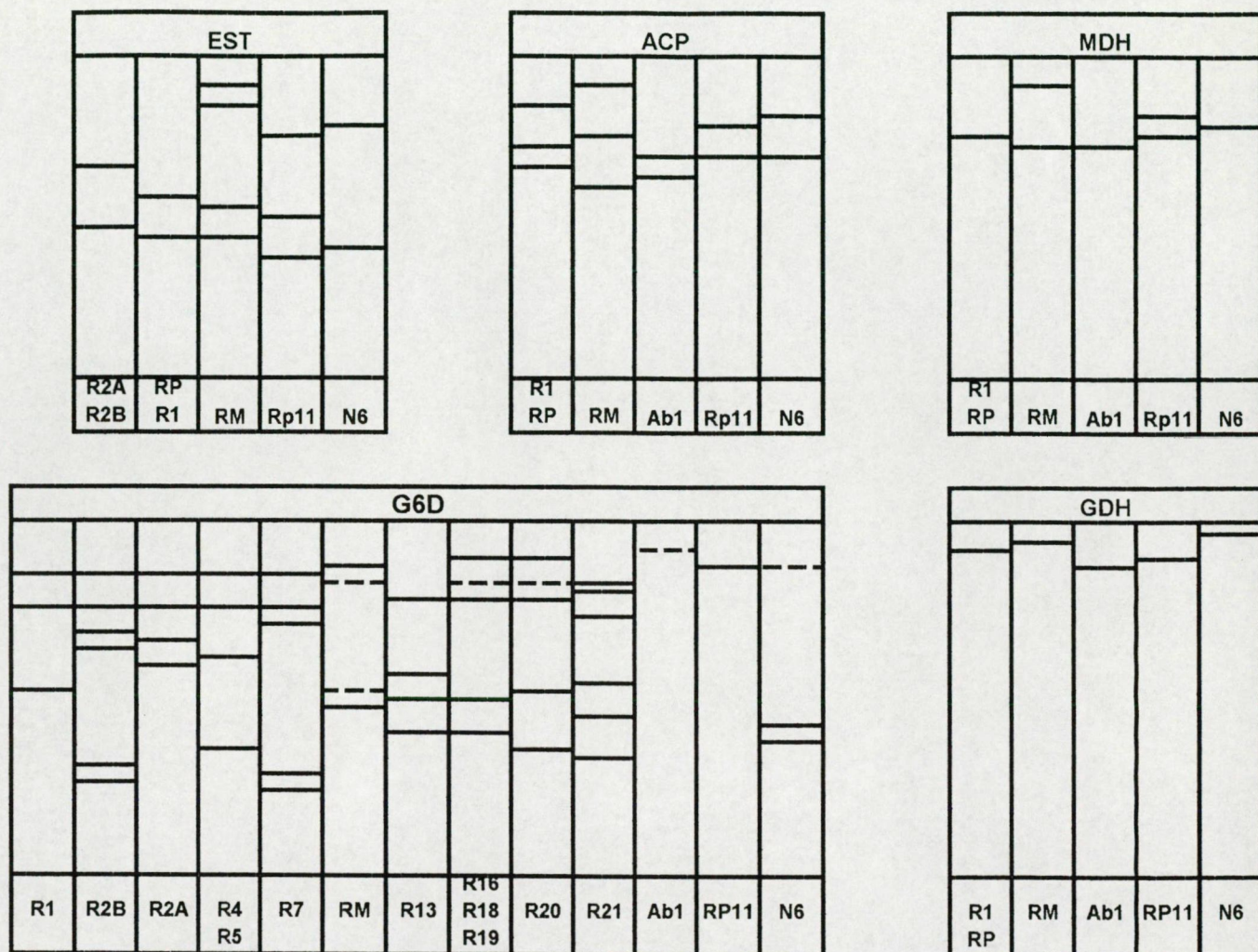
5.2.2. Izoenzim analízis

Egy populáció, vagy faj esetében az izoenzim markerekkel detektált variabilitást erősen befolyásolhatja, hogy milyen enzimszisztemek vizsgálata kerül sor. Több kísérleti adat támasztja alá azt a vélekedést, hogy egyes enzimtípusok különböző mértékű variabilitást mutatnak, a velük szemben megnyilvánuló szelekciós nyomás eltérő erőssége miatt (JOHNSON 1974).

Különböző enzimszisztemeket tesztelve, öt enzim esetében kaptunk olyan elektroforetikus mintázatot, mely alkalmasnak bizonyult a további analízisre. A legnagyobb variabilitást, ez esetben összességében 9 eltérő elektroforetikus mintázatot (elektromorfot) a G6D aktivitás vizsgálata esetén észleltünk. Az α -észteráz (EST) esetében 3, míg a savas foszfátáz (ACP), glutamát dehidrogenáz (GDH) és malát dehidrogenáz (MDH) aktivitás vizsgálatakor 2 elektromorfot tudtunk kimutatni. Ezen utóbbiak bizonyultak a legkevésbé polimorfoknak (4. Ábra).

Az egyes *Rhizomucor* törzsekhez tartozó elektromorfok listáját a 6. Táblázat tartalmazza. Ebből jól látható, hogy az eredetileg *R. miehei*-ként leírt 4 törzs (R7, R13, R16, R23), az izoenzim analízis adatai alapján is *R. pusillus* jellegeket mutat, míg a *R. tauricus* bizonyos hasonlóságot tárt fel a *R. pusillus* törzsekkel. Ez is megerősíti azon feltételezésünket, miszerint ez az izolátum egy mutáns *R. pusillus*.

Az izoenzim analízis eredményeire alapozva megállapíthatjuk, hogy meghatározhatók olyan molekuláris markerek, amelyek segítségével a *Rhizomucor* fajokat megbízhatóan megkülönböztethetjük (pl. MDH, GDH, ACP futási mintázat).



4. Ábra. *Rhizomucor* és az összehasonlító csoportként szereplő (*Absidia*, *Rhizopus* és *Mucor*) izolátumok EST, ACP, MDH, GDH és G6D enzimrendszereinek elektroforetikus mintázatai.

6. Táblázat. A vizsgált *Rhizomucor* törzsekhez tartozó elektroforetikus fenotípusok (EP)

Enzimek	EP	Az izolátumok száma	Az izolátumok kódja
MDH, GDH, ACP	A	12	R1, <i>R. pusillus</i>
	B	9	<i>R. miehei</i>
EST	A	2	R2A, R2B
	B	12	R1, <i>R. pusillus</i>
	C	9	<i>R. miehei</i>
G6D	A	1	R1
	B	1	R2B
	C	1	R2A
	D	3	R4, R5, R7
	E	9	<i>R. miehei</i>
	F	1	R13
	G	3	R16, R18, R19
	H	1	R20
	I	1	R21

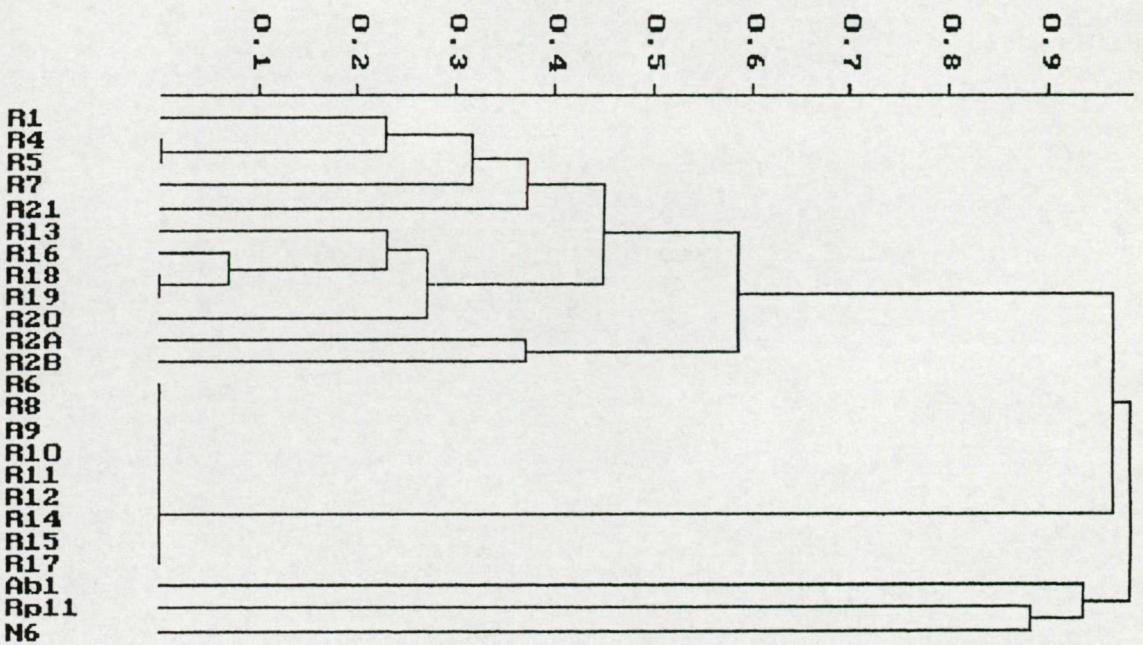
Az enzimek festésekkel detektált különböző mobilitású sávok meglétéből, illetve hiányából bináris mátrixot, ebből pedig egy hasonlósági mátrixot készítettünk, majd a csoportátlag módszer (UPGMA) segítségével dendrogramot konstruáltunk (5. Ábra). A hasonlósági mátrix és dendrogram kofenitikus koeficense 0.9963-nak adódott, amely igen jó értéket jelent.

Izoenzim profiljuk alapján a vizsgált izolátumok 3 csoportot alkotnak. Egyik csoportba a kísérletbe összehasonlításként (*outgroup*) bevont izolátumok tartoznak (N6, Ab1, Rp11), míg a másik két csoportba a *R. pusillus*, illetve a *R. miehei* vizsgált törzsei kerültek. Az izoenzim vizsgálat alapján a két fajt reprezentáló izolátumok igen nagy mértékben különböznek egymástól. Ezen különbség megközelítőleg azonos mértékű a *Rhizomucor* fajok és a rokon génuszok (*Absidia*, *Mucor* és *Rhizopus*) képviselői között kimutatottal.

Ezen túl, a *Rhizomucor* fajokon belül jelentősen eltérő mértékű genetikai variabilitást tapasztaltunk: a *R. miehei* izolátumok alkotta csoport a vizsgált markerek alapján homogénnek bizonyult, ellentétben a *R. pusillus* izolátumokkal, melyek markerei jelentős mértékű polimorfizmust mutattak. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a *R. pusillus* fajon belül homo-, illetve heterotallikus törzsek is előfordulnak, ellentétben a *R. miehei* fajjal, melynek törzsei kivétel nélkül homotallikus jelleget mutatnak, tehát önálló zigospóra képzésre képesek. Sajnálatos módon mindössze 3 homotallikus *R. pusillus* törzs állt rendelkezésünkre, így ezzel a feltételezéssel kapcsolatban egyértelmű következtetéseket nem tudtunk levonni. Mindezen eredmények azonban közvetett bizonyítékkul szolgálhatnak az ivaros ciklus természetben is gyakori lejátszódására ezen gombáknál. Ez azért érdekes, mivel kevés esetben figyeltek meg ivaros spórákat, és ezért általánosan elterjedt az a vélemény, amely szerint a zigospóráképzés a természetben csak nagyon ritkán lejátszódó esemény (ALEXOPOULOS és mtsi. 1996).

Újabban viszont a *M. piriformis* esetében több olyan adat is napvilágot látott, hogy a természetben is lejátszódik ilyen folyamat és fontos szerepet játszik a hosszabb távú túlélés biztosításában (MICHAILIDES és mtsi. 1992). Vágvölgyi és munkatársai (1996) is kimutatták, hogy azonos helyről származó *M. piriformis* szexuális és neutrális izolátumai jól elhatárolt csoportot alkotnak. A köztük levő eltérés akkora volt, mint a földrajzilag is különböző helyről származó törzsek között.

Járomspórás gombákkal végzett korábbi izoenzim vizsgálatok alapján, mivel túl nagy fajon belüli variabilitást tapasztaltak, egyes szerzők kétségbevonták a módszer alkalmazhatóságát a *Mucor* és a rokon *Mortierella* nemzetség taxonómiai problémáinak feloldására (STOUT és SHAW, 1974; HAVENS, 1976; PEBERDY és TURNER, 1968). Más eredmények (VÁGVÖLGYI és mtsi. 1996), köztük a mi eredményeink is azonban azt mutatják, hogy az izoenzim analízis eredményesen használható fajok intraspecifikus variabilitásának tanulmányozására, így lényegében egy faj delimitálására is. Más vizsgálatokból kitűnt, hogy az intraspecifikus variabilitás gyakran valóban magas, de egyes fajoknál (pl. *M. plumbeus*) igen csekély is lehet (VARGA és VÁGVÖLGYI, 1991). Ez megerősíti azt a feltevést, hogy a rokon fajoktól morfológiai karaktereik alapján megbízhatóan elkülöníthető gombák esetében (pl. *M. piriformis*, *M. plumbeus*) az észlelt variabilitás kisebb mértékű, azaz a más esetekben tapasztalt nagy "intraspecifikus" variabilitásért gyakran a tisztán morfológiai alapú törzsidentifikálás hibája is felelős lehet.



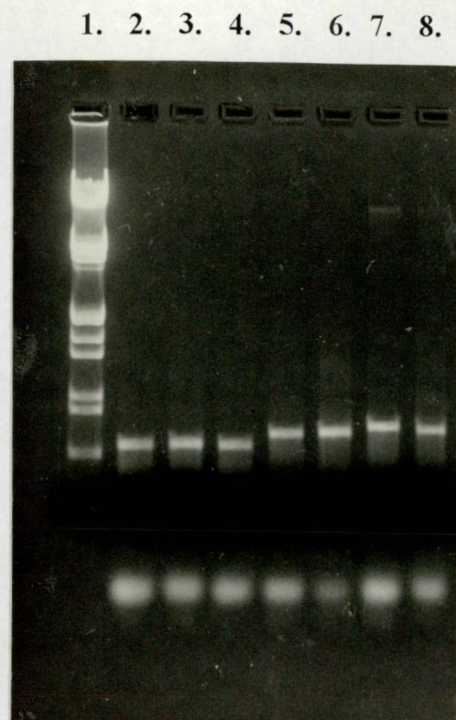
5. Ábra. A *Rhizomucor*, valamint *Mucor*, *Absidia* és *Rhizopus* izolátumok izoenzim analíziseinek adataiból Jaccard-koeficiens (Sj) segítségével az UPGMA módszerrel szerkesztett dendrogram.

5.2.3. rDNS ITS-RFLP

Ezen vizsgálat során azt a feltevésünket próbáltuk méginkább megerősíteni, miszerint a *R. tauricus* egyetlen képviselője nem képvisel különálló fajt, hanem egy mutáns heterotallikus *R. pusillus* izolátum. Kísérletünket éppen ezért nem végeztük el a rendelkezésünkre álló összes *Rhizomucor* izolátummal, a *R. tauricus*on kívül mindössze 2 *R. pusillus* (homo-, illetve heterotallikus), valamint 1 *R. miehei* törzset vontunk be a vizsgálatba.

Az ITS1 és ITS4 primerek segítségével sikeresen felszaporítottuk az általunk vizsgált járomspórás gombák riboszómális ITS régióját. A kapott PCR termék azonos méretet mutatott a *R. tauricus* és a heterotallikus *R. pusillus* esetében, míg a homotallikus *R. pusillus* és *R. miehei* amplifikációs fragment mérete az előzőektől nagyobbnak bizonyult (6. Ábra). Az ITS régió variabilitását az amplifikált DNS RFLP analizisével is vizsgáltuk. Néhány enzim (pl. *Bam*HI, *Hind*III) esetében nem kaptunk restrikciós termékeket, így kettős emésztéseket végeztünk két különböző restrikciós enzimmel (*Xba*I-*Hae*III, *Bgl*II-*Eco*RV, *Eco*RI-*Hha*I, *Hha*I-*Rsa*I). Minden esetben a *R. tauricus* és a heterotallikus *R. pusillus* azonos restrikciós mintázatot mutatott. A *Hha*I-*Rsa*I kettős emésztés eredménye a 7. Ábrán látható.

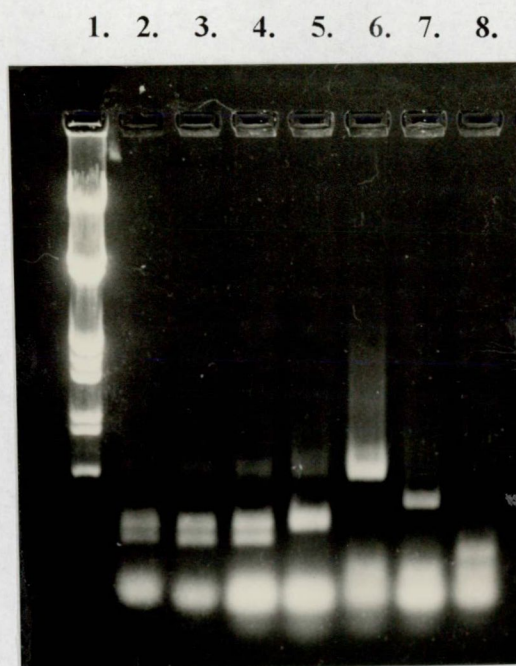
Hasonlóan az izoenzim analízis eredményéhez, ebben az esetben is különbséget tapasztaltunk a *R. pusillus* homo-, illetve heterotallikus képviselői között, illetve a *R. pusillus* és *R. miehei* izolátumok is eltérő csoportot alkottak. Az *Absidia*, *Rhizopus* és *Mucor* izolátumok teljesen eltérő amplifikációs, illetve emésztési mintázatot mutattak, mint a *Rhizomucor* csoport tagjai. A rDNS ITS fragmentek kettős emésztésének bináris értékelését a 7. Táblázat tünteti fel.



6. Ábra. A vizsgált *Rhizomucor* izolátumok ITS1/ITS4 primerekkel amplifikált ITS fragmentjei.

1. pálya: Molekulasúly marker: *EcoRI-HindIII* emésztett λ DNS

2-8. pályák: R1, R2A, R5, R6, N6, Rp11 és Ab1



7. Ábra. ITS fragmentek *HhaI-RsaI* kettősemésztése során kapott DNS fragmentek.

1. pálya: Molekulasúly marker: *EcoRI-HindIII* emésztett λ DNS

2-8. pályák: R1, R2A, R5, R6, N6, Rp11 és Ab1

7. Táblázat. A *Rhizomucor* izolátumok ITS-RFLP markereinek bináris adatai.

Enzimek	Izolátumok			
	R1	R2A	R5	R6
<i>EcoRI</i>	0	0	0	1
	1	1	1	0
	0	0	0	1
<i>HindIII</i>	0	0	0	1
	0	1	0	0
	1	0	1	0
<i>XbaI-HaeIII</i>	0	1	0	0
	1	0	1	0
	0	0	0	1
	0	0	0	1
<i>BglII-EcoRV</i>	1	1	1	0
	0	0	0	1
<i>EcoRI-HhaI</i>	0	0	0	1
	0	0	0	1
	1	1	1	0
<i>HhaI-RsaI</i>	0	0	0	1
	1	1	1	0
	0	0	0	1
	1	1	1	0

5.4.2. RAPD analízis

Hogy további adatokat nyerjünk a *Rhizomucor* fajok intraspecifikus variabilitásának jellegéről és mértékéről, RAPD-PCR eljárással nyert molekuláris markerek vizsgálatát is elvégeztük (a RAPD markerek sokkal inkább neutrálisnak tekinthetők, mint az expresszált géntermékek, pl. az izoenzymeek). Ezen vizsgálatba két új *Rhizomucor* törzset (R23 és R25), a matematikai analízis számára pedig külső kontrollként a *M. piriformis* (N6) egy törzsét is bevontuk. Összesen 7 primert teszteltünk, mindegyikkel stabil és reprodukálható amplifikációs mintázatot kaptunk.

A legkisebb mértékű polimorfizmust az OPC-02 és OPC-20 primer felhasználása során tapasztaltuk, az amplikonok száma 25 illetve 26 volt, 6-6 amplifikációs mintázatot figyelhettünk meg (8. Ábra, B). A többi esetben nagyobb mértékű DNS polimorfizmust tapasztaltunk: az OPC-04 és OPC-05 primerek használatakor 35 és 30 amplikon, 8 illetve 7 különböző amplifikációs mintázatot eredményezett. A legnagyobb mértékű variabilitást az OPC-01, OPC-07 és OPC-13 primerekkel történt PCR reakció során tapasztaltuk: az 57, 52 és 33 amplikon, 11, 13 illetve 17 mintázatot alkotott (8. Ábra, A). Egyetlen primer használatakor

sem tapasztaltunk teljesen azonos amplifikációs mintázatot a vizsgált törzseknél. Ezen különbség egyes esetben egy extra amplikon jelenlétében nyilvánult meg (mint az OPC-20, OPC-01 primer használatakor az R2A és R2B esetében), de legtöbbször törzsspecifikus különbségeket figyelhettünk meg az amplifikációs mintázatokban. Összességében a RAPD adatok nagyobb mértékű variabilitást mutattak, mint az izoenzim analízis eredményei a vizsgált *Rhizomucor* izolátumok esetében.

A 24 vizsgált gombatörzsnél 261 RAPD markert határoztunk meg. Ezeket bináris karakterként kezelve egy hasonlósági mátrixot készítettünk (a sávok intenzitásbeli különbségét nem vettük figyelembe az értékelés során), és ezt követően a csoportátlag módszer (UPGMA) segítségével dendrogramot konstruáltunk (9. Ábra). A hasonlósági mátrix és a dendrogram kofenetikus koeficiense 0,9963-nak adódott. A törzsfán két csoportra különülnek a *R. pusillus* és *R. miehei* izolátumai. Hasonlóan az izoenzim analízis eredményéhez, ebben a vizsgálatban is a *R. pusillus* nagyobb mértékű intraspecifikus variabilitást mutatott, mint a *R. miehei* faj. A *R. miehei* törzseihez detektált markerek invariabilisnak bizonyultak az OPC-05, OPC-20 és OPC-02 random tiztagú oligonukleotidokkal történt kísérletek során: 2, 2 illetve 3 különböző amplifikációs mintázatot figyelhettünk meg. A különböző mértékű genetikai variabilitás magyarázatául a fajok eltérő párosodási (mating) típusa szolgálhat. A vizsgált *R. pusillus* izolátumok között négy homotallikus törzset találtunk (R2A, R2B, R7 és R23). Hasonlóan az izoenzim analízis adataihoz, a RAPD törzsfán sem alkotnak külön csoportot a *R. pusillus* homo- illetve heterotallikus izolátumai. Érdekes megemlíteni, hogy a *Mucor piriformis* RAPD analízise során Papp és munkatársai (1997), sokkal nagyobb mértékű intraspecifikus variabilitást tapasztaltak ($D=0.7$), mint mi a *Rhizomucor* fajok ($D=0.42$ a *R. pusillus* és $D=0.22$ a *R. miehei*) esetében.

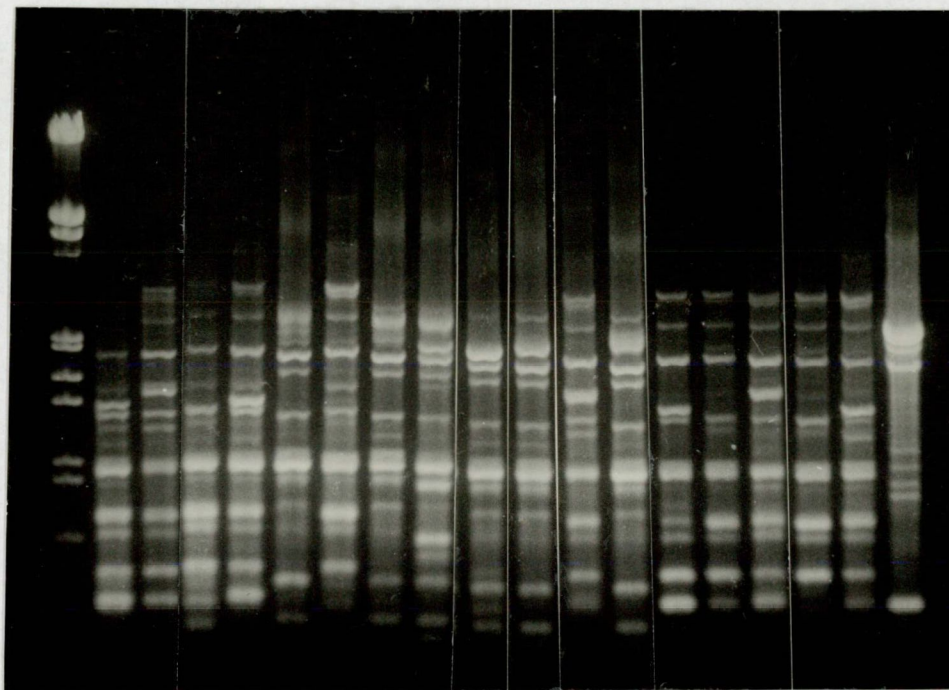
A *R. tauricus* azonos csoportot alkotott a *R. pusillus* izolátumokkal, pl. az R4-es heterotallikus *R. pusillus*-hoz hasonlítva a dendrogramon a köztük levő különbség (dissimilarity) $D=0.27$ -nek adódott. Ez az eredmény alátámasztja az izoenzim és ITS-RFLP analízis során felállított elképzelésünket, miszerint ezen izolátum a *R. pusillus* fajba tartozik.

Az R23-as törzs, melyet eredetileg *R. miehei* varietas *minor*-ként írtak le, amplifikációs mintázata alapján egyértelműen a *R. pusillus* fajba tartozik. A két *Rhizomucor* faj amplifikációs mintázata jelentős különbségeket mutatott ($D=0.95$), azonban sikerült olyan RAPD markereket meghatároznunk, melyek segítségével megbízhatóan elkülöníthető a *R. miehei* a *R. pusillus* fajtól (8. Táblázat). Ezen fajspecifikus markerek mellett, egyetlen génusz specifikus markert találtunk az OPC-20-as primerrel végzett reakció során. Ez a megközelítőleg 700 bp nagyságú DNS fragment minden *Rhizomucor* izolátumban amplifikálódott, de hiányzott a *M. piriformis* törzs amplifikációs mintázatából. Érdemes megemlíteni, hogy a két *Rhizomucor* csoport közel ugyanolyan mértékű különbséget mutatott egymáshoz képest, mint a rokon génusz

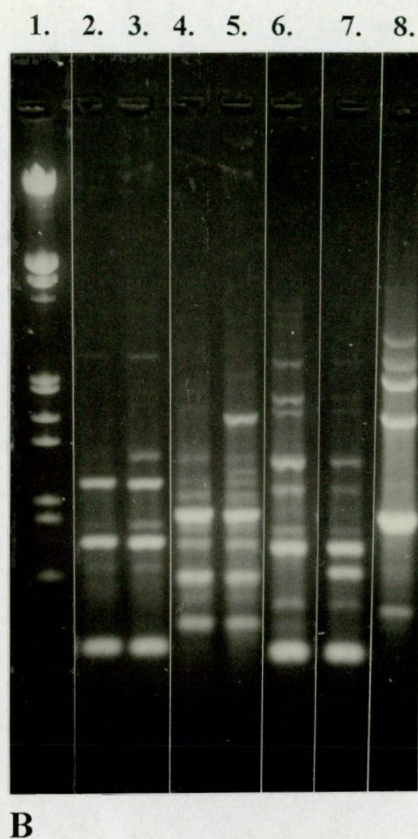
képviselőjéhez. Ezen *M. piriformis* törzs mindössze néhány közös sávot mutatott a *Rhizomucor* nemzetség izolátumaival. Két közös sávot figyelhettünk meg a *R. miehei* és *R. pusillus*-al (OPC-07 és OPC-04 primerek használatakor), valamint egy közös sávot találtunk az OPC-20 primerrel történt vizsgálatkor.

A PCR-RAPD analízis során meghatározott genetikai markerek segítségével lehetővé válik a *Rhizomucor* izolátumok gyors és biztos identifikálása. Annak ellenére, hogy a RAPD mintázatban esetlegesen előforduló halvány, gyenge sávok megjelenése nagymértékben függ a DNS minta tisztaságától (MICHELI és mtsi. 1994), ez a módszer jól használható a gyakorlatban akár előzetes DNS tisztítás nélkül is. Aufauvre-Brown és munkatársai (1993) például a PCR reakcióhoz DNS mintaként spóraszuszpenziót használtak fel.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19.



A

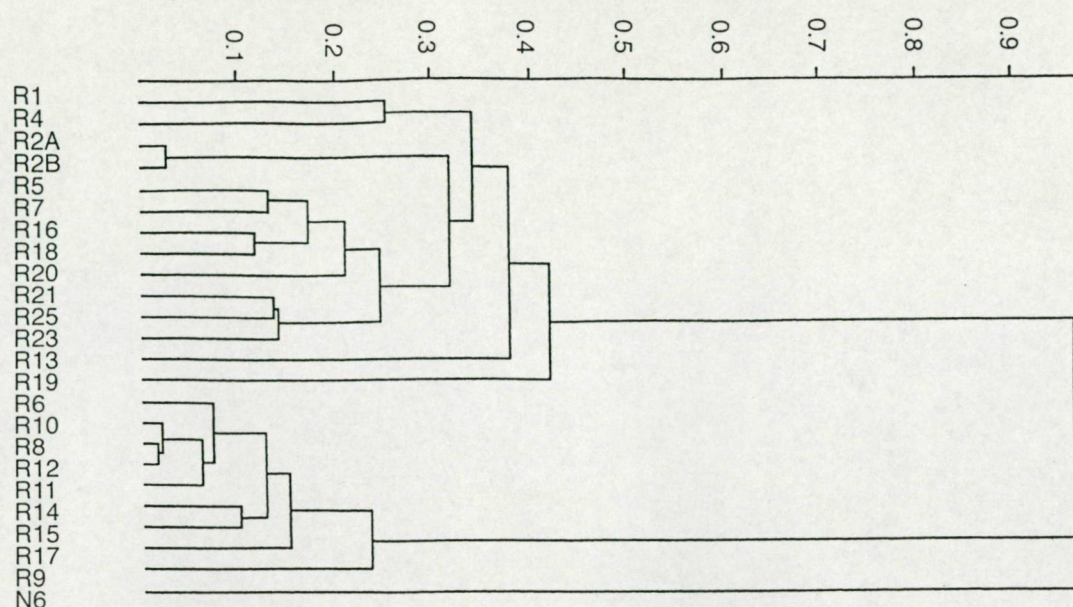


B

8. Ábra. A *Rhizomucor* izolátumok OPC-13 (A) és OPC-20 (B) primerekkel kapott amplifikációs mintázatai.

(A) 1 : Molekulasúly marker : *Hind*III-*Eco*RI emésztett λ DNS ; 2-18 : R1, R2A, (és R2B), R4, R5 (és R16), R6, R7, R8 (és R10, R15), R9, R11, R12 (és R17), R13, R14, R18, R19, R20 (és R21), R23 és R25 ; 19 : *M. piriformis* N6

(B) 1 : Molekulasúly marker : *Hind*III-*Eco*RI emésztett λ DNS ; 2-7 : R2A, R2B (és R1, R4, R5, R7, R16, R18, R19, R21, R23, R25), R8 (és R6, R10, R11, R12, R14, R15, R17), R9, R13 és R20 ; 8 : *M. piriformis* N6



9. Ábra. 23 *Rhizomucor* izolátum RAPD adataiból Jaccard-koefficiens (Sj) és UPGMA módszerrel szerkesztett dendrogram.

8. Táblázat. *R. pusillus* és *R. miehei* fajokra jellemző DNS amplifikációs fragmentek méretei.

| Primerek | Fragment méretek (bp) | |
|----------|----------------------------|------------------|
| | <i>R. pusillus</i> | <i>R. miehei</i> |
| OPC-01 | 550; 840; 1800 | 1600 |
| OPC-02 | 700 | 1200 |
| OPC-04 | 700; 1000 | 500; 1400; 1900 |
| OPC-05 | 1000 | 600; 800; 1200 |
| OPC-07 | 1000; 1400 | 1800; 2200 |
| OPC-13 | 600; 700; 1800; 2300; 2500 | 400; 1200 |
| OPC-20 | 700; 800; 1000 | 500; 830 |

5.3. A *RHIZOMUCOR MIEHEI* NRRL 5282 GENOMIÁLIS GÉNKÖNYVTÁR LÉTREHOZÁSA

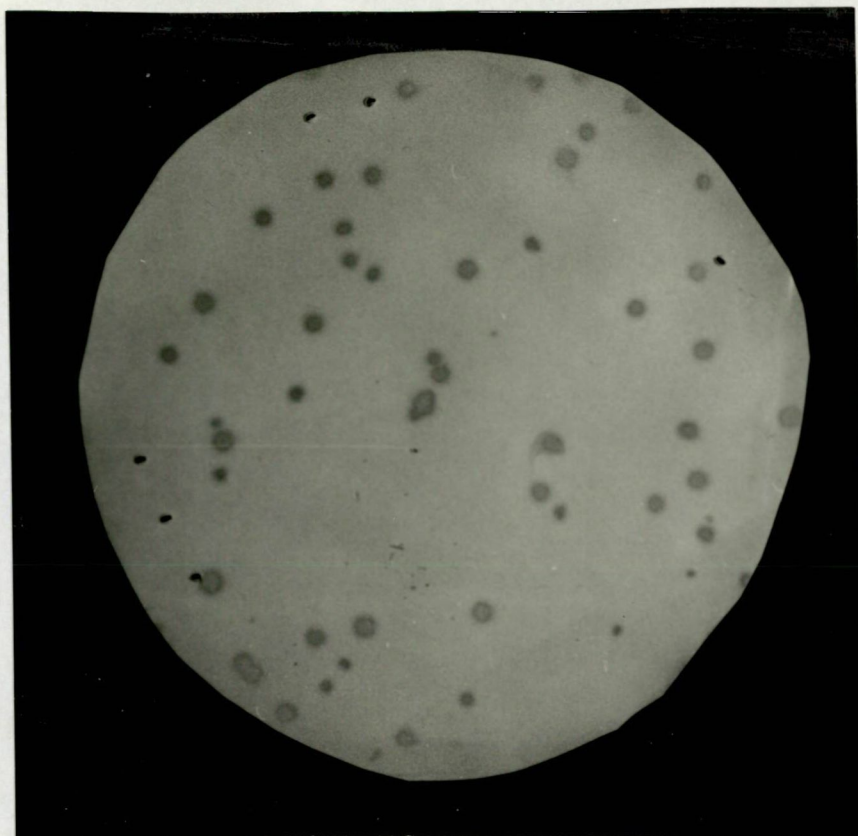
Lambda Fix II (λ FixII/*Xho*I Partial Fill-In Vector Kit, Stratagene,) fág vektor, valamint a Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) kit felhasználásával 15 kb átlagméretre szelektált *Rhizomucor* genomiális DNS inzertek beépítésével reprezentatív génkönyvtárat hoztunk létre. A génkönyvtár titerét több kísérletben ellenőrizve arra az eredményre jutottunk, hogy átlagban 4×10^4 PFU/ml-nek felel meg. Előzetes elektroforetikus kariotipizálási adatok alapján a *Rhizomucor miehei* genommérete 40 Mb körülirek adódott, amelyből kiszámítható, hogy megközelítőleg 1.8×10^4 rekombináns fág reprezentálja 99%-os valószínűséggel a teljes *Rhizomucor* genomot. A létrehozott génkönyvtár megközelítőleg 2×10^4 rekombináns fagot tartalmazott. A génkönyvtárat a biztonságos fenntartás érdekében amplifikáltuk: az amplifikált génkönyvtár (mintegy 50 ml) titere 4.4×10^4 PFU/ μ l-nek bizonyult.

5.4. HOMOLÓG *GPD* PRÓBA LÉTREHOZÁSA PCR REAKCIÓVAL

A *Rhizomucor miehei* NRRL 5282 törzséből történő genomiális DNS tisztítást követően, az Anyag és módszer részben ismertetett, a *Phaffia rhodozyma* esetében alkalmazott *gpd* specifikus primereket alkalmaztuk a polimeráz láncreakció során. Az amplifikálás egyetlen, mintegy 300 bp nagyságú terméket eredményezett, amelynek szekvenciaanalízise azt mutatta, hogy a *Rhizomucor gpd* gén egy rövid konzervatív szakaszát sikerült felszaporítanunk.

5.5. A *RHIZOMUCOR MIEHEI* GÉNKÖNYVTÁR SZÜRÉSE ÉS A REKOMBINÁNS KLÓNOK AZONOSÍTÁSA

A PCR segítségével kapott mintegy 300 bp nagyságú PCR terméket digoxigenines jelölést követően homológ próbaként alkalmaztuk a λ Fix II fágban elkészített reprezentatív génkönyvtár szűrésére. A rekombináns fágok által létrehozott plakkokra a *Rhizomucor gpd* homológ próbával hibridizálva, a mintegy 2500 rekombináns fág közül 6 olyat izoláltunk, amely hibridizációs jelet adott (a hibridizációs kísérletek szerint feltételezhetően tartalmazta a *gpd* gént vagy annak egy részletét, 10. Ábra). A legerősebb hibridizációs jelet adó rekombináns fágklón többlépcsős tisztítását követően, megkezdjük ennek részletes jellemzését. Restrikciós emésztésekkel és hibridizációs kísérletekkel igazoltuk, hogy egy megközelítőleg 6.5 kbp méretű *Rhizomucor* genomiális inzertet tartalmaz, amely erőteljesen hibridizál a homológ *gpd* próbával.



10. Ábra. A *gpd* homológ próbával jelet adott rekombináns fágok létrehozta plakkok.

5.6. SZUBKLÓNZÁSI ÉS SZEKVENÁLÁSI KÍSÉRLETEK

Az izolált rekombináns fág által tartalmazott inzertet különböző restrikciós enzimekkel (*SalI*, *PstI*, *NotI*, *BamHI*, *HindIII*, *BglII*) tovább emésztettük, majd *gpd* próbával történő hibridizálás segítségével meghatároztuk, mely fragmentek tartalmazzák a *gpd* gént. (11. Ábra). A *HindIII* emésztés során kapott 2.3 kbp-nyi fragmentet szubklónoztuk a méretű pBluescript SK (-) vektorba. Ezen klónozott fragmentet különböző restrikciós enzimekkel emésztettük (*SalI*, *KpnI*, *XhoI*, *XbaI*, *EcoRV*, *HaeIII*). A *HaeIII* enzimmel történt emésztés 900, 700 és 500 bp-nyi fragmenteket eredményezett, melyeket szintén pBluescript SK (-) plazmidba szubklónoztunk. Ezen szubklónokat első lépésben T3 és T7 primerekkel szekvenáltattuk, majd a kapott *gpd* gén egy adott régiójának megismert szekvenciája alapján különböző szekvenáló oligonukleotidokat szintetizáltattunk (12. Ábra), melyek felhasználásával több lépcsőben, különböző átfedésekkel megkaptuk a teljes *gpd* gén nukleotid szekvenciáját.

5.7. A *RHIZOMUCOR MIEHEI* GPD GÉN SZEKVENCIA ANALÍZISE

A szekvencia analízis adatai alapján bizonyosságot nyert, hogy a 2.3 kbp-nyi emésztési fragment a *R. miehei gpd* gén teljes kódoló régióját tartalmazza, valamint a promoter régióból 100 nukleotidot és a 246 bp-nyi terminális régiót (13. Ábra.). Az 1354 nukleotidnyi *gpd* kódoló régió 336 AS-at kódol, 5 intront tartalmaz, melyek hosszúsága 56 (intron IV) és 77 (intron III) nukleotid között változik. A fonalas gombák intronmérete általában kevesebb, mint 100 bp, ellentétben az emlősök és a *S. cerevisiae* intronok méretével.

| | |
|---|------|
| taacgaacctcaactttttttttacggaaaaaccaaagaaaaactatagtcacacttttttacgaacttaaacgt | 72 |
| M T V K A G I N G | 9 |
| ttacgaactctcaaaaaatacaaatcaac ATG ACT GTC AAA GCT GGA ATT AAC GGG taagct | 133 |
| F G | 11 |
| gaaaggctcttgttactatgggtagagatatcgaaattgttaaccattatttttcgtgtgaatag TTT GGC | 203 |
| R I G R I V L R A S L L N P E V E V | 29 |
| CGC ATT GGC CGC ATT GTC TTG CGA GCT TCT CTC TTG AAC CCC GAA GTC GAA GTC | 25 |
| V A I N D P F I D L E Y M | 42 |
| GTT GCT ATC AAC GAC CCT TTT ATT GAT CTC GAA TAT ATG gtaaggtggaagtgtgagc | 315 |
| V Y M F K | 47 |
| tctccggtttcaaatcgcaactctaacaatgaaacggttgcatatgttatagGTT TAC ATG TTC AAA | 380 |
| Y D S T H G R F K G T V E A K D G K | 65 |
| TAT GAC TCG ACT CAC GGT CGC TTC AAA GGC ACA GTC GAG GCC AAG GAC GGT AAA | 434 |
| L V V N G K P I S V Y A E R D P C C | 83 |
| CTC GTG GTC AAC GGC AAA CCT ATT TCT GTG TAT GCT GAA CGC GAT CCC TGC TGC | 488 |
| I P G R I G A E Y I V E S T G V F T | 101 |
| ATA CCT GGA AGA ATT GGT GCC GAG TAC ATT GTC GAG TCT ACC GGC GTC TTT ACG | 542 |
| T K E K A G A H L T G G A K K V I I | 119 |
| ACC AAG GAA AAG GCA GGA GCA CAC TTG ACC GGT GGA GCC AAG AAG GTC ATC ATC | 596 |
| S A P S A D A P M F V V G V N L E S | 137 |
| TCG GCG CCC TCG GCA GAT GCA CCC ATG TTT GTC GTT GGT GTC AAC CTC GAA AGC | 650 |
| Y S S D M Q V I S N A S C T T N C L | 155 |
| TAT TCG TCC GAT ATG CAA GTT ATC TCT AAC GCC TCA TGC ACA ACA AAC TGC CTT | 704 |
| A P L A K V I D D E F G I V E G L M | 173 |
| GCA CCT CTC GCC AAG GTT ATT GAC GAT GAG TTT GGT ATC GTG GAA GGC TTA ATG | 758 |
| T T V H A T T A T Q K T V D G P S G | 191 |
| ACT ACT GTA CAT GCA ACC ACT GCT ACG CAA AAA ACA GTG GAT GGA CCT TCC GGC | 812 |
| K D W R A G R G A G A N I I P A S T | 209 |
| AAG GAT TGG CGT GCT GGT CGT GGC GCA GGA GCA AAC ATT ATT CCT GCA TCC ACA | 866 |
| G A A K | 213 |
| GGA GCC GCT AAA G gtacggccaagaaaaaactaacgacaactcctgtaccctgattactaagtttgtt | 933 |
| A V G K V I P H L N G K | 225 |
| ttttttgcccctaagtgtatatagCT GTC GGC AAA GTT ATT CCT CAT CTC AAT GGT AAA | 991 |
| L T G M A F R V P N P D V S V V D L | 243 |
| CTA ACG GGC ATG GCA TTC CGT GTA CCT AAT CCG GAT GTG TCT GTC GTC GAC TTG | 1045 |
| T V R L E K | 249 |


```

ACA GTC CGG TTA GAG AAG  tcgtaacactgaaacattggtaacttgagacaacgtgcactcacact  1110
      S  A  S  Y  E  D  I  K  A  A  I  K  K  A  S  E  265
tgcactagAGC GCC TCT TAT GAA GAT ATC AAA GCT GCC ATC AAA AAG GCA TCT GAA  1166
      G  S  L  K  G  I  L  G  Y  T  E  D  E  V  V  S  T  D  283
GGT TCT TTG AAG GGC ATT CTT GGT TAC ACG GAA GAT GAA GTG GTA TCA ACA GAC  1220
      F  I  G  D  S  H  S  S  I  F  D  A  K  A  G  I  S  L  301
TTT ATT GGA GAC TCG CAC TCA AGT ATA TTT GAT GCG AAA GCC GGT ATC TCC CTC  1274
      N  P  N  F  V  K
AAT CCT AAC TTT GTC AAG  gtaaaccagtccttataacctaacttacaaatcatccttgcatcaaag  1339
      L  I  S  W  Y  D  N  E  Y  G  Y  318
actaacgcgtcactcacctcttctctagCTA ATT TCT TGG TAC GAC AAT GAA TAC GGA TAC  1400
      S  T  R  V  V  D  L  L  V  H  I  A  K  V  D  G  R  L  336
TCT ACA CGC GTT GTC GAT TTA CTG GTC CAC ATC GCC AAG GTC GAC GGC AGG TTG  1454
      *
TAA  ttcttgcaacgaagtgtagattttctcatttgctttcgctcattaacctcctttctctctttctctca  1524
      tctttacccttctatcttctccttctcaccgtctccagtgcaaaactggcattcatccaaactatgaaactccaac  1596
      cggcatctccattaatttctattctttttctctctctctctctcaccctctttctctcttctctctc  1668
      tctctaacacacaaattgcctccaccattgtatga  1703

```

13. Ábra. A *R. miehei* *gpd* gén nukleotid és aminosav szekvenciája.

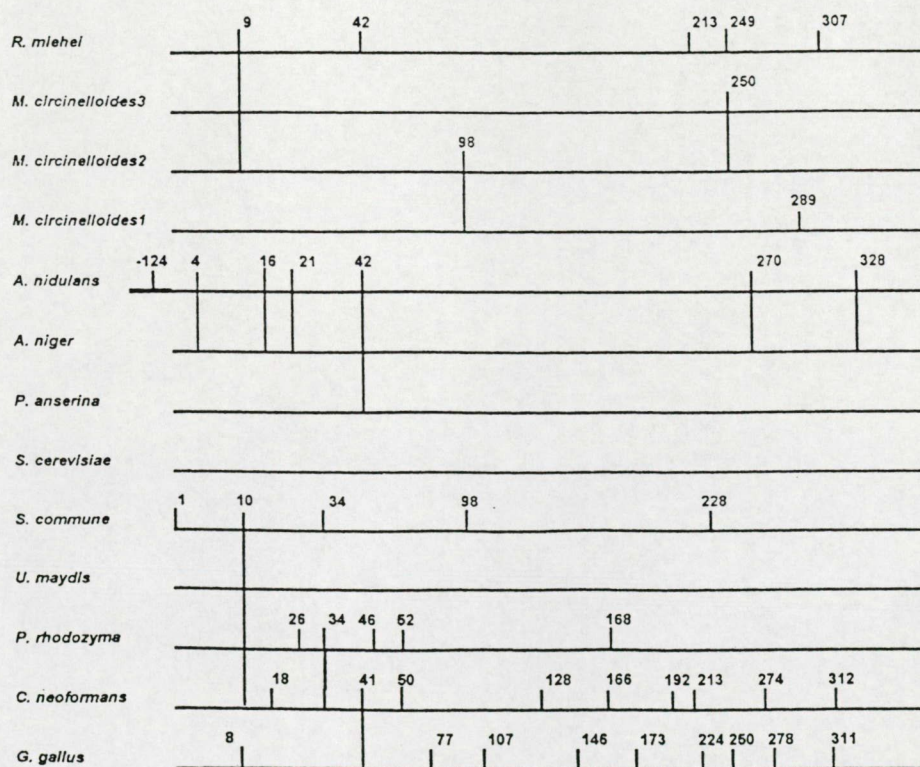
Az intronok helyzete

A fonalas gomba intronok helyzetüket tekintve általában a gén 5' vagy 3' végei közelében, illetve random helyezkedhetnek el, ellentétben a *S. cerevisiae* intronjaival, melyek általában a gén 5' vége közelében találhatók (GURR és mtsi. 1987). A *R. miehei* intronjai többnyire a gén nem-kódoló régiói közelében lokalizálódnak. Az intronok helyzetét az intron 5' illetve 3' végi konszenzus szekvenciái alapján, valamint más *gpd* gének kódoló szekvenciáival történő összehasonlítás segítségével határoztuk meg. Minden intron 5' és 3' végén jelen van a GT illetve PyAG konszenzus szekvencia motívum, valamint egy belső konzervatív szekvencia motívum is megfigyelhető [5'-(G/A)CTAAC-3'], mely a kivágódás (*splicing*) során a lasszó szerű forma kialakulásáért felelős (BALLANCE 1990).

Egyes kísérleti eredmények arra utalnak, hogy bár a különböző szervezetek ugyanazon génjei eltérő intron tartalmúak, az intronok helyzete erősen konzervált, ami ilyen alapon is lehetővé teszi a filogenetikai rokonsági kapcsolatok vizsgálatát. Harmsen és munkatársai (1992) megfigyelték, hogy az aszkomicéta és bazidiomicéta osztályon belül a fajok *gpd* gén intronjainak helyzete erősen konzervált, azonban az aszkomicéta és bazidiomicéta fajok közötti összehasonlítás során mindössze egy intront találtak azonos pozícióban.

A *R. miehei* *gpd* gén intronjainak helyzetét 9 más szervezet (bazidiomicéta, aszkomicéta és metazoa) *gpd* génjének intron helyzetével hasonlítottuk össze (14. Ábra), mely alapján a *R. miehei* I-es intronja azonos pozícióban található a rokon *M. circinelloides* 2-es és 3-as *gpd* fehérjének I-es intronjával. Kettes intronjának helyzete megegyezik az aszkomicéta *A. nidulans*, *A. niger* és *P. anserina* V.-ik, IV.-ik illetve I. intronjának helyzetével; míg a III.-ik intron a bazidiomicéta *C. neoformans* IX.-ik intronjával azonos helyen lokalizált. A IV.-ik és V.-ik intron 3' végi elhelyezkedése eltér a többi általunk vizsgált szervezet intron helyzetétől.

A *S. cerevisiae* élesztő *gpd* gén intronmentes, ezzel szemben a bazidiomicéta *P. rhodozyma* 6, míg a *C. neoformans* 11 intront tartalmaz, melyek közül mindössze kettő azonos elhelyezkedésű. Mindez az élesztő és fonalas gombák különböző evolúciós fejlődésével magyarázható. A *R. miehei* *gpd* gén intronjai közül 1-1 található azonos pozícióban mind a rokon zigomicéta *M. circinelloides*, mind az aszkomicéta és bazidiomicéta képviselők intronjaival. Ezért ez alapján nem tudunk messzemenő következtetéseket levonni a vizsgált szervezetek rokonsági kapcsolatáról.



14. Ábra. A vizsgált szervezetek *gpd* gén intronjainak helyzete.

Az 5' nem-kódoló régió

Az általunk vizsgált génben 100 nukleotidnyi promoter régióban (*upstream*) –58 nukleotidnyira a start kodontól található egy AT-tartalmú motívum (TATA, bekeretezve az ábrán), hasonlóan a *P. chrysosporium*, *A. bisporus* 1 és 2 *gpd* génhez (HARMSSEN és mtsi. 1992). Egyes fonalas gombák, így pl. a *S. commune*, *M. circinelloides* konszenzus TATA boxot tartalmaznak (TATAAA; HARMSSEN és mtsi. 1992, WOLFF és ARNAU 2002). Ezen konszenzus szekvencia 30 bp-nyira található a transzláció iniciációs helytől (tsp), míg az AT-tartalmú motívumok rendszerint 30–60 bp-nyira lehetnek a tsp helytől. Ezen nem tipikus AT-motívumok gén expresszióban betöltött szerepe nem tisztázott. Az *A. nidulans trpC* gén AT-motívumának eltávolítása nem eredményezett gén expressziós változást (HAMER és TIMBERLAKE 1987).

A promoter régióban gyakran CT-gazdag régió illetve régiók figyelhetők meg, melyek jelenléte gyakoribb az erősen kifejeződő géneknél, utalva ezzel promoter elemként való fontos szerepükre. A legtöbb fonalas gomba esetében megfigyelték, hogy a transzkripció iniciációja vagy egy ilyen pirimidin gazdag régióban vagy közvetlenül utána (*downstream*) található (GURR és mtsi. 1987). A *Rhizomucor miehei* promoter régiójában –48 és –88 nukleotidnyira a start kodonól két pirimidin gazdag régió figyelhető meg, hasonlóan a *S. commune*, *A. bisporus* és *P. chrysosporium gpd* génekhez. Az általunk klónozott promoter régió nem tartalmazta a CAAT konzervatív motívumot.

A legtöbb gombagén esetében a transzláció az első ATG kodonnál kezdődik. Magasabbrendű eukariótáknál a transzláció start pontjának pontos felismerése nagymértékben függ az ATG kodon szekvencia környezetétől. A start kodon körüli konzervatív szekvenciamotívum a riboszómához történő pontos kapcsolódást teszi lehetővé (KOZAK 1981). A Kozak-féle konszenzus szekvenciában (CCACCATGGC) –3-as pozícióban mindig purin, leggyakrabban adenin (A) található. Az általunk vizsgált gén esetében szintén A fordul elő –3 nukleotidnyira a start kodontól (TCAACATGAC).

A 3' nem-kódoló régió

Az azonosított stop kodontól (TAA) mintegy 40 bp-nyira a terminális csatlakozó szekvencia tartalmazza azt az ATTAA szekvenciát, amelyhez hasonló (pl. AATAAA) már számos gombában leírtak (GURR és mtsi. 1987). Ennek valószínűsíthetően szerepe van a mRNS 3' végének poliadenilálásában, oly módon hogy ettől a konszenzus szekvenciától mintegy 20 bp-nyira *downstream* a mRNS szál vágódik, majd ezt követően ráépül a poli-A farok. A mRNS érésében a terminális szekvencia ezen része fontos szerepet tölt be, ezért valószínűsíthető, hogy a későbbiekben a járomspórás gombákban alkalmazható transzformációs rendszer létrehozásánál nélkülözhetetlen szakaszt sikerült azonosítanunk.

A *R. miehei* *gpd* gén kodonhasználat

A különböző szervezeteknél eltérő kodonhasználat figyelhető meg, függően az izoakceptor tRNS molekulák típusától, bizonyos aminosav (AS) kodonok használata gyakoribb, míg más ugyanazon aminosavat kódoló kodonok ritkábban fordulnak elő, esetleg hiányoznak. Sokszor ugyanazon szervezeten belül is nagy különbségek lehetnek a kodonhasználatban, attól függően, mely gént vizsgáljuk. Általában a konstitutívan és erősen kifejeződő géneknél igen egyoldalú a kodonhasználat (PUNT és mtsi. 1988, HARMSSEN és mtsi. 1992, WOLFF és ARNAU 2002). Ezen táblázatból is jól kitűnik, hogy amennyiben a kodon harmadik pozíciójában purin, illetve pirimidin bázisok is előfordulhatnak, az utóbbiak a gyakoribbak (69.5%), melyek közül is a C dominál a T felett, hasonlóan a *P. rhodozyma*, *A. nidulans gpd* génhez, ellentétben viszont a *M. circinelloides gpd2* génnel, ahol a T a gyakoribb (VERDOES és mtsi. 1997, (WOLFF és ARNAU 2002). Az AS-t kódoló összes kodont figyelembe véve a *R. miehei* kodonjainak 3-as pozíciójában 63%-ban fordul elő pirimidin (33%C, 30%T, 20.5%A, 16%G). Abban az esetben, amikor ezen pozícióban purin bázis fordul elő, az A a gyakoribb. Az arginin és szerin aminosavak AGN kodonja ritkán van jelen. Az általunk vizsgált *R. miehei gpd* génnél az AS-akat kódoló 61 kodon közül 58 fordul elő (9. Táblázat).

A *Rhizomucor miehei gpd* génnél is, a fonalas gombák többségéhez hasonlóan, a stop kodonok közül az UAA található meg.

9. Táblázat. A *Rhizomucor miehei* *gpd* gén kodonhasználata.

(a) Az azonos aminosavat kódoló kodonokon belül egy adott kodon előfordulási aránya.

(b) A megfelelő kodonok száma.

| Kodon | Aminosav | GPD

A | GPD

B | Kodon | Aminosav | GPD

A | GPD

B |
|-------|----------|-------------------|-------------------|-------|----------|-------------------|-------------------|
| TTT | Phe | 0.727 | (8) | TAT | Tyr | 0.454 | (5) |
| TTC | Phe | 0.272 | (3) | TAC | Tyr | 0.545 | (6) |
| TTA | Leu | 0.148 | (3) | TAA | ---- | 1 | (1) |
| TTG | Leu | 0.288 | (6) | TAG | ---- | 0 | (0) |
| CTT | Leu | 0.095 | (2) | CAT | His | 0.333 | (2) |
| CTC | Leu | 0.333 | (7) | CAC | His | 0.666 | (4) |
| CTA | Leu | 0.095 | (2) | CAA | Gln | 1 | (2) |
| CTG | Leu | 0.048 | (1) | CAG | Gln | 0 | (0) |
| ATT | Ile | 0.438 | (14) | AAT | Asn | 0.308 | (4) |
| ATC | Ile | 0.281 | (9) | AAC | Asn | 0.692 | (9) |
| ATA | Ile | 0.062 | (2) | AAA | Lys | 0.5 | (12) |
| ATG | Met | 0.217 | (7) | AAG | Lys | 0.5 | (12) |
| GTT | Val | 0.2 | (7) | GAT | Asp | 0.571 | (12) |
| GTC | Val | 0.543 | (19) | GAC | Asp | 0.428 | (9) |
| GTA | Val | 0.086 | (3) | GAA | Glu | 0.706 | (12) |
| GTG | Val | 0.171 | (6) | GAG | Glu | 0.294 | (5) |
| TCT | Ser | 0.4 | (10) | TGT | Cys | 0 | (0) |
| TCC | Ser | 0.16 | (4) | TGC | Cys | 1 | (4) |
| TCA | Ser | 0.12 | (3) | TGA | ---- | 0 | (0) |
| TCG | Ser | 0.2 | (5) | TGG | Trp | 1 | (2) |
| CCT | Pro | 0.643 | (9) | CGT | Arg | 0.25 | (3) |
| CCC | Pro | 0.286 | (4) | CGC | Arg | 0.417 | (5) |
| CCA | Pro | 0 | (0) | CGA | Arg | 0.083 | (1) |
| CCG | Pro | 0.071 | (1) | CGG | Arg | 0.083 | (1) |
| ACT | Thr | 0.238 | (5) | AGT | Ser | 0.04 | (1) |
| ACC | Thr | 0.19 | (4) | AGC | Ser | 0,08 | (2) |
| ACA | Thr | 0.381 | (8) | AGA | Arg | 0.083 | (1) |
| ACG | Thr | 0.19 | (4) | AGG | Arg | 0.083 | (1) |
| GCT | Ala | 0.281 | (9) | GGT | Gly | 0.333 | (11) |
| GCC | Ala | 0.312 | (10) | GGC | Gly | 0.363 | (12) |
| GCA | Ala | 0.344 | (11) | GGA | Gly | 0.272 | (9) |
| GCG | Ala | 0.062 | (2) | GGG | Gly | 0.03 | (1) |

5.8. Gombák *GPD* aminosav szekvenciáinak összehasonlítása

Az összehasonlításban felhasznált *gpd* szekvenciák az EMBL Génbankból származnak. A négy különböző gomba (*R. miehei*, *M. circinelloides*, *S. commune* és *A. niger*) *gpd* aminosav szekvenciáját a Clustal W program (THOMPSON és mtsi. 1994) segítségével hasonlítottuk össze (15. Ábra). A párosítást minden esetben csak az intron mentes, kódoló szekvenciákkal végeztük. A 16. Ábra 10 szervezet (2 zigomicéta, 3 aszkomicéta, 4 bazidiomicéta, 1 metazoa) *gpd* génjének AS szekvenciáját %-os formában hasonlítja össze. Jelentős mértékű homológiát tudunk kimutatni a különböző szervezetek AS szekvenciái között, ami igazolja a *gpd* gén erősen konzervatív voltát az élővilágban. A *R. miehei gpd* protein szekvencia a legnagyobb mértékű homológiát a rokon *M. circinelloides gpd* fehérjékkel mutat (78-80%). A *R. miehei gpd* fehérje a *S. cerevisiae* aminosav szekvenciájával valamivel kisebb mértékű (67%) azonosságot tárt fel, mint az összehasonlításban részt vevő többi szervezet proteinjével (átlagosan 70%).

A zigomicéták ezen összehasonlítás alapján közelebbi rokonsági kapcsolatot mutatnak a bazidiomicétákkal, mint az aszkomicétákkal. Wolff és Arnau (2002) a *M. circinelloides gpd* gén analízise során hasonló következtetést tudott levonni. Radford (1993) 14 különböző gombafaj orotidin-5- monofoszfát dekarboxiláz génjének AS összehasonlítása során szintén a zigomicéták és bazidiomicéták közelebbi rokonságát tudta kimutatni.

A táblázatból kitűnik, hogy a fonalas aszkomicéta és bazidiomicéta gombák *gpd* fehérjei nagyobb mértékű homológiát mutatnak, mint a fonalas aszkomicéták és élesztő aszkomicéta (*S. cerevisiae*) *gpd* fehérjei. Ezen utóbbi nagymértékű eltérésre született egyik magyarázat az élesztők unicelluláris módon történő növekedését, illetve azok fakultatív fermentatív metabolizmusát jelöli meg ennek okaként. Az élesztők unicelluláris növekedése során az egyetlen sejtmagban bekövetkező esetleges mutáció nagy valószínűséggel állandósul, ellentétben a többsejtű fonalas gombákkal, ami egy sokkal gyorsabb evolúciós változást eredményez.

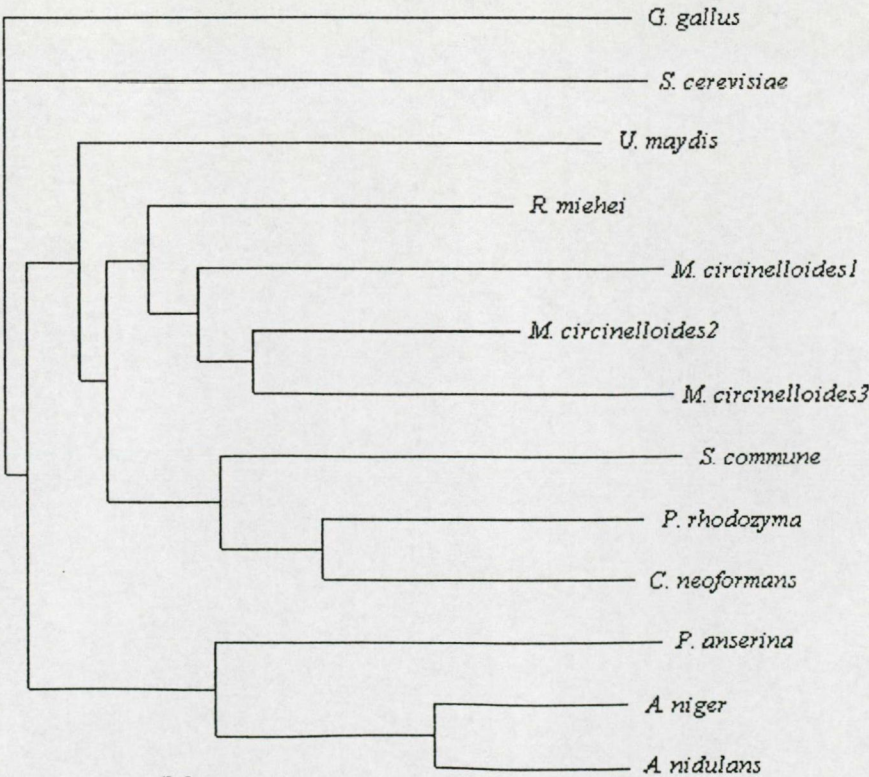
A *Gallus gallus* (csirke) *gpd* AS szekvenciája és a vizsgált gombák AS szekvenciái között is átlagban 70%-os homológia figyelhető meg. A csirke *gpd* gén nagy mérete (4646 bp), illetve intronjainak száma (10) és helyzete azonban jól tükrözi a gombákkal fennálló igen távoli rokonságát.

A szekvenciaadatok filogenetikai elemzéséhez a szomszéd-összevonás (*neighbor-joining*, NJ; SAITOU és NEI 1987) analízist használtuk, a törzsfá elkészítését (17. Ábra) pedig a PHYLIP 3.5 programcsomag segítségével végeztük. Ezen törzsfán jól elkülönülő csoportot alkotnak a zigomicéták, aszkomicéták, illetve bazidiomicéták, ugyanakkor az eddigi eredményeinkel összhangban a járomspórás gombák közelebb helyezkednek el a bazidiomicétákhoz, mint az aszkomicétákhoz, ami a közelebbi filogenetikai kapcsolatukat bizonyítja. A *S. cerevisiae* élesztő

külön ágat képez a filogenetikai törzsfán, ami ezen egysejtű gombának a fonalas aszkomicétáktól való elkülönült fejlődési útvonalt mutatja. Az általános filogenetikai következtetések levonásához azonban több szervezet, illetve több gén együttes vizsgálatára lenne szükség.

16. Ábra. Különböző szervezetek *gpd* AS szekvenciáinak %-os összehasonlítása.

| | Zigomicéták | | | | Aszkomicéták | | | | 9 | Bazidiomicéták | | | Más |
|---------------------------|-------------|-----|-----|-----|--------------|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 1. <i>R. miehei</i> | 100 | 78 | 81 | 80 | 72 | 72 | 75 | 67 | 74 | 76 | 75 | 76 | 76 |
| 2. <i>M. circin.</i> 1 | | 100 | 79 | 77 | 69 | 69 | 68 | 67 | 73 | 73 | 75 | 74 | 71 |
| 3. <i>M. circin.</i> 2 | | | 100 | 84 | 72 | 72 | 72 | 69 | 74 | 77 | 76 | 77 | 74 |
| 4. <i>M. circin.</i> 3 | | | | 100 | 70 | 70 | 69 | 68 | 74 | 76 | 73 | 74 | 71 |
| 5. <i>A. niger</i> | | | | | 100 | 89 | 80 | 68 | 69 | 71 | 72 | 74 | 74 |
| 6. <i>A. nidulans</i> | | | | | | 100 | 78 | 66 | 68 | 71 | 74 | 73 | 70 |
| 7. <i>P. anserina</i> | | | | | | | 100 | 64 | 68 | 70 | 72 | 75 | 72 |
| 8. <i>S. cerevisiae</i> 1 | | | | | | | | 100 | 64 | 63 | 64 | 65 | 66 |
| 9. <i>S. commune</i> | | | | | | | | | 100 | 83 | 69 | 66 | 63 |
| 10. <i>P. rhodozyma</i> | | | | | | | | | | 100 | 83 | 76 | 73 |
| 11. <i>C. neoformans</i> | | | | | | | | | | | 100 | 77 | 73 |
| 12. <i>U. maydis</i> | | | | | | | | | | | | 100 | 73 |
| 13. <i>G. gallus</i> | | | | | | | | | | | | | 100 |



17. Ábra. Különböző szervezetek *gpd* génjének aminosav szekvenciái alapján szomszéd-összevonó (*neighbour-joining*) módszerrel készült törzsfa.

5.9. ELEKTROFORETIKUS KARIOTIPIZÁLÁS

Az elektroforetikus kariotipizálási kísérletek részeként eddig kidolgoztuk a protoplasztképzés és a kromoszómális DNS minta készítésének módszerét *Rhizomucor* fajokból, melynek a későbbiekben a transzformációs rendszerek kidolgozásánál lesz nagy gyakorlati jelentősége.

A kariotipizálási kísérletek részeként megkezdjük az elválasztási kísérleteket kiindulásként a *M. circinelloides* esetében megfelelőnek bizonyult futási paramétereket használva (NAGY és mtsi. 1994). Kísérleteinkből kiderült, hogy bár a *Rhizomucor* genom feltehetőleg összevethető nagyságú a *Mucor* 32-38 Mb méretű genomjával a megfelelő kromoszómális elválasztáshoz további optimalizációs kísérletek szükségesek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A Mucorales rendbe tartozó *Rhizomucor* nemzetség, annak ellenére, hogy csekély számú gombafajt foglal magába (*R. pusillus* és *R. miehei*) kiemelkedő gyakorlati jelentőséggel bír. Az ide tartozó fajok humán és állati mikózisok opportunistá patogén kórokozói lehetnek. Ezen kívül a *R. miehei* rendkívül nagy jelentőségű egyes biotechnológiai és élelmiszeripari alkalmazások okán is.

Vizsgálataink célja az volt, hogy információkat nyerjünk ezen gombák ma még nagyrészt ismeretlen genetikai rendszeréről: feltárjuk intraspecifikus variabilitásukat; használható markereket azonosítsunk törzstipizálási eljárások, illetve a további genetikai analízis számára; egy adott törzsből génkönyvtárat hozunk létre, amely felhasználásával a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) struktúrgént és az ehhez kapcsolódó szabályzó régiókat klónozzuk és elemezzük. Ezen utóbbi vizsgálatok lehetőséget teremtenek az adott gén molekuláris, funkcionális és filogenetikai elemzésére, továbbá kiindulópontul szolgálhatnak további genetikai kísérletekhez. A *gpd* gén konstitutív és erősen kifejeződő volta miatt, szabályzó régiója jól használható hatékony transzformációs rendszer kifejlesztésére. Célunk volt továbbá, hogy optimalizáljuk a protoplaszt képzés körülményeit a *Rhizomucor* fajoknál, melynek a későbbiekben szintén a járomspórás gombákban reményeink szerint általánosan alkalmazható transzformációs rendszerek kiépítésénél lesz gyakorlati jelentősége. Ezen kívül elektroforetikus kariotipizálási előkísérleteket is elkezdtünk, amely során információt szerezhettünk az adott gombák genomméretéről.

Kezdeti vizsgálataink során tanulmányoztuk a rendelkezésünkre álló *Rhizomucor* izolátumok ivaros szaporodását, meghatároztuk a törzsek párosodási típusát, valamint a homotallikus, illetve heterotallikus szexuális folyamatok révén kapott zigospórák egyes morfológiai jellemzőit. Eredményeink alátámasztották az irodalomban korábban közölt megfigyeléseket, miszerint a zigospóra méretében és morfológiájában mutatkozó különbségek bár bélyegként szolgálhatnak a fajok elkülönítésében, azonban a vizsgálatok idő igényesek és esetenként önmagukban nem egyértelműek. Munkánk során többek között célunk volt, hogy meghatározzunk olyan markereket, melyek segítségével lehetővé válik a *Rhizomucor* izolátumok gyors és pontos identifikálása.

A *Rhizomucor* fajok megbízható meghatározása céljából elsőként szénasszimilációs, izoenzim és RAPD analízist végeztünk. Korábbi irodalmi adatok is utaltak arra, hogy a felsorolt módszerek használhatónak bizonyultak taxonómiai kérdések megválaszolására. A kísérleti programunk részeként ezen módszerekkel egymást megerősítő eredményeket kaptunk. Mindhárom vizsgálat során sikerült meghatároznunk olyan molekuláris markereket, melyek

segítségével a *Rhizomucor* fajok megbízhatóan elkülöníthetők egymástól. A 87 szén- illetve nitrogénforrás közül 4 bizonyult differenciáló értékűnek (szaharóz, fenilalanin, β -alanin, glicin). A *R. tauricus* mindkét fajtól való eltérő asszimilációs képességét az izolátum mutáns voltával magyarázhatjuk. A pleiotrop mutánsoknál a mutáció eltérő biokémiai működést eredményez, ami hibás következtetések levonásához vezethet az asszimilációs spektrum analízis értékelése során. A *R. tauricus* izolátum külön fajba történő sorolásának felülbíráását a későbbi kísérleteink (izoenzim, ITS-RFLP, RAPD analízis) is igazolták.

Az izoenzim analízis során öt enzimrendszert tesztelve sikerült olyan molekuláris markereket találnunk (MDH, GDH, ACP futási mintázat), melyek segítségével a *Rhizomucor* fajok megbízhatóan elkülöníthetők. A riboszómális ITS régió, valamint annak RFLP analízise során különbséget tapasztaltunk a *R. pusillus* homo-, illetve heterotallikus törzsei, valamint a *R. miehei* izolátum amplifikációs fragmentjeinek méretében. A RAPD-PCR eljárással nyert molekuláris markerek vizsgálata során faj, illetve génusz specifikus fragmenteket tudtunk meghatározni.

A *R. pusillus* és *R. miehei* izolátumok a vizsgálatok során eltérő mértékű fajon belüli genetikai variabilitást mutattak. Ezen intraspecifikus variabilitás mindkét faj esetében az izoenzim analízis során kisebb, míg a RAPD analízis során nagyobb mértékűnek bizonyult. A *R. pusillus* törzsek között homo-, illetve heterotallikus képviselők is előfordulnak ellentétben a *R. miehei* fajjal, melynek izolátumai mind homotallikusak. Ez magyarázatul szolgálhat a *R. pusillus* faj nagyobb mértékű intraspecifikus variabilitására. Eredményeink indirekt módon megerősítik azokat az újabb megfigyeléseket, amelyek szerint (a korábbi általános nézettel szemben) ezeknél a gombáknál az ivaros folyamatok a természetben is gyakran lejátszódnak és fontos szerepük van a járomspórás gombák hosszabbtávú túlélésének biztosításában. Vizsgálataink során mind a négy módszer (szénasszimilációs spektrum analízis, izoenzim analízis, ITS-RFLP, RAPD analízis) alkalmasnak bizonyult törzsidentifikálásra.

A további kísérleteink céljából tüztük ki reprezentatív génkönyvtár létrehozását egy *R. miehei* izolátumból, mely a későbbiekben segítséget nyújthat a *Rhizomucor* nemzetség genetikai állományának tanulmányozásában. Előzetes elektroforetikus kariotipizálási adatok alapján a *Rhizomucor miehei* genomméretének ismeretében kiszámítottuk, hogy megközelítőleg 1.8×10^4 rekombináns fág reprezentálja 99%-os valószínűséggel a teljes *Rhizomucor* genomot. A létrehozott génkönyvtár megközelítőleg 2×10^4 rekombináns fagot tartalmazott. A génkönyvtárat a biztonságos fenntartás érdekében amplifikáltuk: az amplifikált génkönyvtár (mintegy 50 ml) titere 4.4×10^4 PFU/ μ l-nek bizonyult. A létrehozott génkönyvtár felhasználásával sikeresen klónoztuk a *R. miehei* NRRL 5282 törzséből a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) gént; meghatároztuk a kódoló és nem kódoló (promoter és

terminális) régiók szekvenciáját. Ezek elemzésével adatokat nyertünk az adott gén molekuláris szerveződéséről, kodon használatáról, valamint más *gpd* génekkel mutatott homológiájáról.

Ennek megvalósításához polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltunk egy 300 bp-nyi régiót a *R. miehei gpd* génből, melyet specifikus próbaként használtunk fel a *R. miehei* génkönyvtár szűrésére. Különböző szubklónok létrehozásával, valamint átfedő oligonukleotidok szintetizálásával sikerült meghatároznunk a *R. miehei gpd* gén teljes kódoló régióját, valamint 100 bp-nyit a promoter régióból és a terminális régiót 246 bp hosszan.

Nagy mértékű homológiát tudtunk kimutatni a *R. miehei gpd* gén AS szekvenciája és különböző szervezetek *gpd* fehérjéi között. Ez az átlagban 70%-os homológia tükrözi a *gpd* gén nagymértékű konzervatív voltát az élővilágban. Ezen *gpd* gén AS szekvencia analízise alapján a zigomicéták a bazidiomicétákkal közelebbi kapcsolatot mutatnak, mint az aszkomicétákkal. Eredményeink alátámasztották azon korábbi megfigyeléseket is miszerint az aszkomicéta élesztők *gpd* génje, a gombák unicelluláris volta következtében igen kismértékű homológiát mutat a rokon fonalas aszkomicéták megfelelő génjeivel.

A továbbiakban a *R. miehei gpd* gén szekvencia analízise során meghatároztuk az intronok helyzetét, majd összehasonlítottuk más gomba *gpd* gén intronjainak elhelyezkedésével.

Munkánk során sikerült optimalizálnunk a *Rhizomucor* fajok protoplaszt képzésének körülményeit; elektroforetikus kariotipizálási előkísérleteket is végeztünk, mely alapján adatokat nyertünk a *Rhizomucor* fajok genomméretéről. A megfelelő kromoszómális elválasztáshoz további optimalizációs kísérletekre van szükség.

A *R. miehei gpd* gén klónozása, regulátor szekvenciáinak meghatározása, valamint a protoplasztálási körülmények optimalizálása lehetőséget teremt a későbbiekben a járomspórás gombákban (reményeink szerint általánosan alkalmazható) transzformációs rendszer kidolgozására.

7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ (SUMMARY IN ENGLISH)

GENETIC AND TAXONOMIC ANALYSIS IN THE *RHIZOMUCOR* GENUS

The members of the genus *Rhizomucor* (Zygomycetes) are distinct from *Mucor* by virtue of their thermophilic nature and some morphological traits (e.g. the formation of rhizoids). These fungi are of value in both theoretical and applied microbiology. They are good producers of different extracellular enzymes (e.g. proteases), while in other cases they may be the agents of progressive and frequently fatal opportunistic mycotic diseases. Little is known about the genetics (e.g. the level of genetic variability) and taxonomy of these organisms. The aim of the present study was to obtain information about the largely unknown genetic organization of these fungi; to reveal their intraspecific variability; to determine useful markers for a methodically simple, quick and more unambiguous strain identification and for genetic analysis; to construct a representative genomic library from *R. miehei*; and to clone the *gpd* gene from *R. miehei* and characterize the structural gene and its adjacent regulatory elements (promoter and terminator regions) at sequence level (molecular organisation, codon usage and homology with *gpd* genes of other fungi).

At the beginning of our study we examined the sexual life cycle of the *Rhizomucor* isolates, and determined their mating type and the sizes of zygospores resulted from the homo- and heterotallic sexual processes. Our results supported the earlier observations that the differences in size and morphology of zygospores are valuable tools in the taxonomy of the genus *Rhizomucor*. Certain approaches, such as determination of the number of nuclei in the sporangiospores or mating studies coupled with determination of the morphological traits of the zygospores, could supply characteristics for the delimitation of these species. However, the differences are not clear-cut in every case, or the procedure is time-consuming. One of our aims was to develop a methodically simple, quick and more unambiguous identification of the *Rhizomucor* species.

Carbon source assimilation patterns were determined, and isoenzyme, ITS-RFLP and RAPD analyse were carried out with 23 *Rhizomucor* strains obtained from various sources together with three other zygomycetous strains (*Mucor*, *Absidia*, and *Rhizopus*) as an outgroups. These methods gave comparable results and also proved useful for the determination of markers of distinctive value at the species level.

Numerous *Rhizomucor* isolates were assayed for their ability to utilize 87 various substrates as a single carbon source. Besides a difference in sucrose utilization, distinctive

differences were found in the abilities of *R. miehei* and *R. pusillus* in the utilization of glycine, phenylalanine and α -alanine. Under the same experimental conditions, *R. tauricus* utilized (to various extents) few of the same 87 compounds. It was, however, able to grow on three (sucrose, phenylalanine and α -alanine but not glycine) of the four compounds whose utilization was found to be characteristic for *R. pusillus* but not for *R. miehei*. Differences in the abilities of *R. tauricus* and the other *Rhizomucor* species in the utilization of various substrates as a single carbon source could be explained with the occurrence of pleiotropic mutation in this single isolate. Assimilation spectra work well for wild-type isolates but could be misleading if a pleiotropic mutation influencing different biochemical functions is present.

Results of isoenzyme, ITS-RFLP and RAPD studies strongly support the view that the isolate known as *R. tauricus* does not represent a true species but is a deviating heterotallic *R. pusillus* strain.

The result of the amplification of ribosomal ITS region of this species suggested the very close connection of *R. tauricus* to *R. pusillus*. No differences between *R. tauricus* and the heterotallic *R. pusillus* strain were observed in the ITS-RFLP studies, whereas no common character was found between *R. miehei* strains and either *R. pusillus* strains or *R. tauricus*.

RAPD analyses with all 7 primers tested gave reproducible amplification results. Due to the highly different amplification patterns, RAPD bands characteristic of *R. miehei* or *R. pusillus* isolates could be identified. Besides these markers, which appeared to be species-specific, only one major amplification product was found which appeared to be genus specific in our experiments.

In the course of our studies it 5 isoenzyme systems were tested that also proved useful for the determination of markers of distinctive value at a species level. The results of our investigations revealed different levels of intraspecific genetic variability within the *R. pusillus* and *R. miehei* species. *R. miehei* strains were more homogeneous genetically than the heterothallic *R. pusillus* isolates. *R. pusillus* isolates can either be homothallic and heterothallic, while all *R. miehei* isolates are homothallic. The different levels of genotypic diversity suggest a correlation with the different forms of mating behaviour of these species. These results indicate (in the contrast with earlier opinions) the existence of the sexual life cycle of this fungus in nature.

While the reading of the extent of colony growth in the carbon source assimilation experiments inevitably involves some inconsistencies (resulting in a higher variation of characteristics) the evaluation of other three methods (isoenzyme, ITS-RFLP, RAPD) determine easily countable characteristics for the identification of *Rhizomucor* isolates.

The aims of the further studies were to construct a representative genomic library from *R. miehei*, to clone the *gpd* gene from *R. miehei* and characterize the structural gene and 5' and 3' non-coding regions (promoter and terminator regions) at sequence level.

Polymerase chain reaction was used to synthesize a specific 300 bp fragment of the *gpd* gene of *R. miehei* and used as a *gpd*-specific probe to screen the genomic library of *R. miehei*. For sequence analysis several subclones were generated, and sequenced with a number of newly oligonucleotides to obtain the complete nucleotide sequence of the *gpd* gene. Nucleotide sequences of the *R. miehei gpd* gene was compared to the *gpd* gene sequences of several organisms. The *gpd* sequences used in this study were obtained from nucleotide sequence libraries (EMBL, GeneBank). Comparison of the derived amino acid (aa) sequences revealed that there is a large extent of homology among *gpd* proteins in various organisms about 70% aa sequence identity. This result confirms the fact that the *gpd* gene is a very conservative gene in nature.

On the basis of the *gpd* aa sequence zygomycetes show a closer relationship to basidiomycetes than to ascomycetes. Furthermore, our results supported those earlier observations that the *Saccharomyces*-like yeasts differ significantly from the filamentous ascomycetes. The explanation could be that the yeast are unicellular throughout their life cycles whereas the filamentous fungi are multicellular during most of their life cycles. In the course of the sequence analysis of the *R. miehei gpd* gene the positions of five introns were determined and compared with positions of introns *gpd* genes in other organisms. However these results at in contrast with earlier observations couldn't provide informations about the systematic relatedness of these organisms. In the course of our studies the protoplast preparation conditions, which will play an important role in the further transformations procedures, have also been optimised some *Rhizomucor* isolates.

Electrophoretic karyotype experiments have also been conducted to obtain some data about the genome size of the *Rhizomucor* species. Our preliminary experiments reflect that the genome size of *Rhizomucor* species is comparable with that of the *M. circinelloides* genome. To obtain a precise elektrophoretic karyotype from *Rhizomucor* strains the experimental conditions should be further optimised.

8. IRODALOMI ÁTTEKINTÉS

- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W. és BLACKWELL, M. (1996). *Introductory mycology*. 4. Ed. John Wiley and Sons, New York. 127 p.
- ANAYA, N. és RONCERO, M. I. G. (1991). Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild-type gene. *Mol. Gen. Genet.* 230, 449-455.
- ARNAU, J. és STROMAN, P. (1993). Gene replacement and ectopic integration in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Curr. Genet.* 23, 542-546.
- AUFAUVRE-BROWN, A., TANG, C. M. és HOLDEN, D. W. (1993). Detection of gene-disruption events in *Aspergillus* transformants by polymerase chain reaction direct from conidiospores. *Curr. Genet.* 24, 177-178.
- BAILEY, M. J. és SIUKA-AHO, M. (1988). Production of microbial rennin. *Biotechnol. Letters* Vol. 10. No. 3. 161-166.
- BALLANCE, D. J. (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2, 229-236.
- BALLANCE, D. J. (1991). Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. *Mol. Industr. Mycol.* 1-29.
- BAROSSO, G. és LABARERE, J. (1990). Evidence for viral and naked double-stranded RNAs in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Curr. Genet.* 18, 231-237.
- BEAUCHAMP, C. és FRIDOVICH, J. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamid gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287.
- BIDENNE, C., BLONDIN, B., DEQUIN, S. és VEZINHEIT, F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22, 1-7.
- BLITZER, A. és LAWSON, W. (1980). Patient survival factors in paranasal sinus mucormycosis. *Med. Mycol.* 90, 635-646.
- BONDE, M. R., PETERSON, G. L. és MATSUMOTO, T. T. (1989). The use of isoenzymes to identify teliospores of *Tilletia indica*. *Phytopathol.* 79, 596-599.
- BONDE, M. R., PETERSON, G. L. és MATSUMOTO, T. T. (1989). The use of isoenzymes to identify teliospores of *Tilletia indica*. *Phytopathology* 79, 596-599.
- BOWDITCH, B. M., ALBRIGHT, D. G., WILLIAMS, J. G. K. és BRAUN, M. J. (1993). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods Enzymol.* 224, 294-309.
- BOWYER, P., OSBOURN, A. E. és DANIELS, M. J. (1994). An "instant gene bank" method for heterologous cloning: Complementation of two *Aspergillus nidulans* mutant with *Gaeumannomyces graminis* DNA. *Mol. Gen. Genet.* 56, 448-454.

- BRANNER-JØRGENSEN, S. ÉS NIELSEN, I. R. (1974). Comparative enzyme patterns in *Mucor miehei* Cooney & Emerson and *Mucor pusillus* Lindt. In Second Int. Symp. Gen. Industr. Micr., Sheffield.
- BREWER, G. J. (1970). An introduction to isoenzyme techniques. Academic Press, New York.
- BRODY, H. ÉS CARBON, J. (1989). Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6260-6263.
- BRONDIJK, T. H. C., DURAN, R., VAN DER GIECEN, M., GOTSCHAL, J. C., PRINS, R. A. ÉS FÉVRE, M. (1996). *scsB*, a cDNA encoding the hydrogenosomal β subunit of succinyl-CoA synthase from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Mol. Gen. Genet. 253, 315-323.
- BRUN, C., DUBEY, D. D. ÉS HUBERMAN, J. A. (1995). pDblet, a stable autonomously replicating shuttle vector for *Schizosaccharomyces pombe*. Gene 164, 173-177.
- BRUNELLI, J. P. ÉS PALL, M. L. (1993). A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNA and other DNA sequences. Yeast 9, 1299-1308.
- BRUNS, T. D., WHITE, T. J. ÉS TAYLOR, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 22, 525-564.
- BU'LOCK, J. D. ÉS T. M. HARDY (1979). Mating reaction between sexually altered strains of *Mucor pusillus*. Exp. Mycol. 3, 194-196.
- BUCK, K. W. (1986). Fungal virology-an overview . In Fungal Virology, Ed. Buck, K. W., pp 1-84., CRC Press, Boca Raton, Florida.
- BURDON, J. J., MARSCHALL, D. R. ÉS LUIG, N. H. (1981). Isoenzyme analysis indicates that a virulent cereal rust pathogen is a somatic hybrid. Nature 293, 565-566.
- BURDON, J. J., LUIG, N. H. ÉS MARSHALL, D. R. (1983) Isozyme uniformity and virulence variation in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *P. recondita* f. sp. *tritici* in Australia. Aust. J. Biol. Sci. 36, 403-410.
- BURMESTER, A. ÉS WÖSTEMEYER, J. (1987). DNA sequence and functional analysis of an ARS-element from the zygomyceta *Absidia glauca*. Curr. Genet. 12, 599-603.
- BURMESTER, A. ÉS WÖSTEMEYER, J. (1994). Variability in genome organization of the zygomycete *Parasitella parasitica*. Curr. Genet. 26, 456-460.
- BURMESTER, A., WÖSTEMEYER, A., ARNAU, J. ÉS WÖSTEMEYER, J. (1992). The *SEG1* element: a new DNA region promoting stable mitotic segregation of plasmids in the zygomycete *Absidia glauca*. Mol. Gen. Genet. 235, 166-172.
- BÜTTNER, P., KOCH, F., VOIGT, K., QUIDDE, T., RISCH, S., BLAICH, R., BRÜCKNER, B. ÉS TUDZYNSKI, P. (1994) Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. Curr. Genet. 25, 445-450.
- CARLE, G. F. ÉS OLSON, M. V. (1984). Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field alternation gel electrophoresis. Nuc. Acids Res. 12, 5647-5664.

- CARLE, G. F. FRANK, M. ÉS OLSON, M. V. (1986). Electrophoretic separation of large molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232, 65-68.
- CHU, G., VOLLRATH, D. ÉS DAVIS, R. W. (1975). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science* 234, 1582-1585.
- CLARK, S. M., LAI, E., BIRREN, B. W. ÉS HOY, J. W. (1992). A novel instrument for separation large DNA molecules with pulsed homogenous electric fields. *Science* 241, 1203-1205.
- COOLEY, R. N. ES CATEN, C. E. (1991). Variation in electrophoretic karyotype between strains of *Septoria nodorum*. *Mol. Gen. Genet.* 228, 1582-1585.
- COONEY, D. G. ÉS EMERSON, R. (1964). *Thermophilic fungi*. San Francisco/London.
- COTTAREL, G., BEACH, D. ÉS DEUSCHLE, U. (1993). Two new multi-purpose multicopy *Schizosaccharomyces pombe* shuttle vectors, pSP1 and pSP2. *Curr. Genet.* 23, 547-548.
- CROWHURST, R. N., HAWTHORNE, B. T. RIKKERINK, E. H. A., ÉS TEMPLETON, M. D. (1991). Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 20, 391-396.
- CRUICKSHANK, R. H. ÉS PITT, J. I. (1987). The zymogram technique: isoenzyme patterns as an aid in *Penicillium* classification. *Microbiol. Sci.* 4, 14-17.
- DALBOGE, H. ÉS HELDT-HANSEN, H.P. (1994). A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes. *Mol. Gen. Genet.* 243, 253-260.
- DEPLOEY, J. J. (1985). The influence of atmosphere composition and nutrients on the germination of *Rhizomucor pusillus* sporangiospores. *Mycologia*, 77(1), 97-102.
- DOL, M. HOMMA, M., CHINDAMPORN, A. ÉS TANAKA, K. (1992). Estimation of the chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2243-2251.
- DON, R. H., COX, P. T., WAINWRIGHT, B. J., BAKER, K. ÉS MATTICK, J. S. (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 4008.
- DURAN, R., REYMOND-COTTON, P., FISCHER, M., RASCLE, C. ÉS FÉVRE, M. (1994). Cloning and expression of genes encoding enzymes of the glycolytic pathway in *Neocallimastix frontalis*. In: *Microorganisms in ruminant nutrition*. Prins RA, and Stewart CS (eds) Nottingham University Press, pp. 137-151.
- EDEL, V., STEINBERG, C., GAUTHERON, N. ÉS ALABOUVETTE, C. (1996). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycol. Res.* 101, 179-187.
- EDENS, L. E., BOM, J., LEDEBOER, A. M., MAAT, J., TOONEN, M. Y., VISSER, C. ÉS VERRIPS, C. T. (1984). Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast. *Cell* 37, 629-633.
- EVANS, E. G. V. ÉS GENTLES, J. C. (1985). *Phycomycosis*. *Essentials of Medical Mycology*.

- FABRITIUS, A. L. és 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.* 32(1), 60-65.
- FELSENSTEIN, J. (1993). PHYLIP. Phylogeny Inference Package. University of Washington, Seattle.
- FARLEY, P. C. és SULLIVAN, P. A. (1998). The *Rhizopus oryzae* secreted aspartic proteinase gene family: an analysis of gene expression. *Microbiology* 144, 2355-2366.
- FINCHAM, J. R. S. (1987). Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* 53, 148-170.
- FOSTER, L. M., KOZAK, K. R., LOFTUS, M. G., STEVENS, J. J. és ROSS, I. K. (1993). The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycol. Res.* 97, 769-781.
- GARDENER, K. és PATTERSON, D. (1988). Transverse alternating electrophoresis. *Nature* 331, 371-373.
- GARDES, M., WHITE, T. J., FORTIN, J. A., BRUNS, T. D. és TAYLOR, J. W. (1991). Identification of endogenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* 69, 180-190.
- GÁCSEER, A., HAMARI, ZS., PFEIFFER, I., VARGA, J., KEVEI, F. és KUCSERA, J. (2001). Genetic diversity in the red yeast *Cryptococcus hungaricus* and its phylogenetic relationship to some related basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.* 1, 213-220.
- GEMS, D. és CLUTTERBUCK, A. J. (1993). Co-transformation with autonomously-replicating helper plasmids facilitates gene cloning from an *Aspergillus nidulans* gene library. *Curr. Genet.* 24, 520-524.
- GEMS, D., JOHNSTONE, I. és CLUTTERBUCK, A. J. (1991). Autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98, 61-67.
- GODTFREDSEN, S. E. (1990). Microbial lipases. In: Fogarty WM, Kelly CT (eds). *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier Appl. Sci. Publ., London, pp. 255-274.
- GREY, M. és BRENDDEL, M. (1992). A ten-minute protocol for transformation *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Curr. Genet.* 22, 335-336.
- GROOM, K. M., HEYMAN, H. C., STEFFEN, M. C., HAWKINS, L. és MARTIN, N. C. (1998). *Kluyveromyces lactis* *SEF1* and its *Saccharomyces cerevisiae* homologue bypass the unknown essential function, but not the mitochondrial RNase P function of the *S. cerevisiae* *RPM2* gene. *Yeast* 14, 77-87.
- GURR, S. J., UNKLES, S. E. és KINGHORN, J. R. (1987). In: Kinghorn, J.R. (Ed.), *Gene structure in eukaryotic microbes*. IRL Press, Oxford, pp. 93-139.
- GUTHRIE, P. A. I., MAGILL, C. W., FREDERIKSEN, R. A. és ODVODY, G. N. (1992). Random Amplified Polymorphic DNA Markers: A System for Identifying and Differentiating Isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathol.* 82, 832-835.
- HAMER, L. (1997). From genes to genomes: Sequencing of filamentous fungal genomes. *Fung. Genet. Biol.* 21, 8-10.

- HAMER, J. E. ÉS TIMBERLAKE, W. E. (1987). Functional organisation of the *Aspergillus nidulans trp C* promoter. *Mol. Cell Biol.* 7, 2352-2359.
- HANFLER, J., TEEPE, H., WEIGEL, C., KRUFFT, V., LURZ, R. ÉS WÖSTEMEYER, J. (1992). Circular extrachromosomal DNA codes for a surface protein in the (+) mating type of the zygomycete *Absidia glauca*. *Curr. Genet.* 22, 319-325.
- HARMSSEN, M. C., SCHUREN, F. H., MOUKHA, S. M., VAN ZUILEN, C. M., PUNT, P. J. ÉS WESSELS, J. G. (1992). Sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycetes *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Agaricus bisporus*. *Curr. Genet.* 22, 447-454.
- HARRIS, H. ÉS HOPKINSON, D. A. (1976). *Handbook of isoenzyme analysis in human genetics*. Elsevier N. H. Biomed. Press, Amsterdam.
- HAVENS, P. L. (1976). Comparative zone electrophoresis and mating experiments in the taxonomy of *Mucor hiemalis*. *Mycotaxon* 4(1), 218-232.
- HENRION, B., CHEVALIER, G. ÉS MARTIN, F. (1994). Typing truffles species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* 98, 37-43.
- HENRION, B., LE TACON, F. ÉS MARTIN, F. (1992). Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *The New Phytologist* 122, 289-298.
- HOLLAND, M. J. ÉS HOLLAND, J. P. (1978). Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 17, 4900-4907.
- HOOD, M. T. ÉS STACHOW, C. S. (1995). Electroporation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Mol. Biol.* 47, 273-278.
- HOOG, G. S., GUÉHO, E., MASCLAUX, F., GERRITS VEN DEN ENDE, A. H. G., KWONCHUNG, K. J. ÉS MCGINNIS, M. R. (1995). Nutritional psychology and taxonomy of human pathogenic *Cladosporium-Xylohypha* species. *J. of Med. & Vet. Myc.* 33, 339-347.
- HU, J. ÉS QUIROS, C. F. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10, 505-511.
- HYNES, M. J. ÉS KELLY, J. M. (1977). Pleiotropic mutations of *Aspergillus nidulans* altered in carbol metabolism. *Molecular and General Genetics* 150, 193-204.
- INNIS, M.A., HOLLAND, M.J., MCCABE, P.C., COLE, G.E., WITTMA, V.P., TAL, R., WATT, K.W.K., GELFAND, D.H., HOLLAND, J.P. ÉS MEADE, J.H. (1985). Expression, glycolisation, and secretion of an *Aspergillus* glycoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 228, 21-26.
- JOHNSON, G. B. (1974). Enzyme polymorphism and metabolism. *Science* 184, 28-34.

- 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* 141(2), 503-512.
- JUNGEHUELSING, U., ARNTZ, C., SMITH, R. és TUDZYNSKI, P. (1994). The *Claviceps purpurea* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene: cloning, characterization and use for the improvement of dominant selection system. *Curr. Genet.* 25, 101-106.
- JUNGEHUELSING, U., ARNTZ, C., SMITH, R. és TUDZYNSKI, P. (1994). The *Claviceps purpurea* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene: cloning, characterization and use for the improvement of dominant selection system. *Curr. Genet.* 25, 101-106.
- KÁLMÁN, É. T., VARGA, J. és KEVEI, F. (1991). Characterization of interspecific hybrids within the *Aspergillus nidulans* group by isoenzyme analysis. *Can. J. Microbiol.* 37, 391-396.
- KIEL, J. A. K. W., KEIZER-GUMNICK, I., KRAUSE, T., KOMORI, M. és VEENHUIS, M. (1995). Heterologous complementation of peroxisome function in yeast: The *Saccharomyces cerevisiae* *PAS3* gene restores peroxisome biogenesis in a *Hansenula polymorpha per9* disruption mutant. *FEBS Lett.* 337, 434-438.
- KOIBUCHI, K., NAGASAKI, H., YUASA, A., KATAOKA, J. és KITAMOTO, K. (2000). Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 59-68.
- KOZAK, M. (1981). Composition and analysis of sequences upstream from the translation start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.* 12, 857-872.
- KUMEDA, Y. és ASAO, T. (1996). Single-strand conformation polymorphysm analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2947-2952.
- LAROCHE, A., GAUDET, D. A., SCHAALE, G. B., ERICKSON, R. S. és GINNS, J. (1995) Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating, RAPD nad RFLP analyses. *Mycol. Res.* 99(3), 297-310.
- LASURE, L. L., és INGLE, M. B. (1976). Some effects of temperature on zygospor formation in *Mucor miehei*. *Mycologia* Vol. LXVIII November-December.
- LEA és FEBIGER (1977). The Phycomycoses: (1) Mucormycosis, (2) Entomophthoromycosis, (3) Oomycosis. *Med. Mycol.*
- LEACH, J., FINKELSTEIN, D. B. és RAMBOSEK, J. A. (1986) Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. *Fungal. Genet. Newslett.* 33, 32-33.
- LEUCHTMANN, A., PETRINI, O., PETRINI, L. E. és CAROLL, G. C. (1992) Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. *Mycol. Res.* 96(4), 287-294.
- LICHSTEINER, S. és TIJAN, R. (1993). Cloning and properties of *Caenorhabditis elegans* TATA-box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9673-9677.

- LIU, Z. L., DOMIER, L. L. ÉS SINCLAIR, J. B. (1993). IGS-specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia* 85, 795-800.
- LU, T. H. ÉS GROTH, J. V. (1987). Isozyme detection and variation in *Uromyces appendiculatus*. *Can. J. Bot.* 66, 885-890.
- MACH, R. L., SCHINDLER, M. ÉS KUBICEK, C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr. Genet.* 25, 567-570.
- MADYASTHA, K. M. ÉS SRIVATSAN, J. (1987). Novel transformation of progesterone by a *Mucor* sp. *Can. J. Microbiol.* 33, 361-365.
- MAGDOLEN, U., MAGDOLEN, V., SCHMITT, M. ÉS BADLOW, W. (1995). Selection of specific gene probes by combined use of low-stringency PCR amplification and Southern-blot hybridization. *Curr. Genet.* 27, 390-392.
- MANCZINGER, L. ÉS POLNER, G. (1987). Cluster analysis of carbon utilization patterns of *Trichoderma* isolates. *System. Appl. Microbiol.* 9, 214-217.
- MAYR, E. (1970). *Populations, species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- MCNEMAR, M. D., GORMAN, J. A. ÉS BUCKLEY, H. R. (1997). Isolation and sequence of the gene encoding ornithine decarboxylase, *SPE1*, from *Candida albicans* by complementation of a *spe1* Δ strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1383-1389.
- MEGNEGNEAU, B., DEBETS, F. ÉS HOEKSTRA, R. F. (1993). Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 23, 323-329.
- MELJER, G., MEGNEGNEAU, B. ÉS LINDERS, E. G. A. (1994) Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. *Mycol. Res.* 98(3), 267-276.
- MICALES, J. A., BONDE, M. R. ÉS PETERSON, G. L. (1986). The use of isoenzyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* 27, 405-449.
- MICALES, J. A., BONDE, W. R. ÉS PETERSON, G. L. (1986). Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics. *Mycotaxon* 27, 57-79.
- MICHAILIDES, T. J., MORGAN, D. P., SPOTTS, R. A., BEGLINGER, C. ÉS ODIÉT, P. A. (1992). Role of nitidulid beetles and vinegar flies in the sexual cycle of *Mucor piriformis* in tree fruit orchards. *Mycologia* 84, 488-496.
- MICHEL, M. R., BOVA, R., PASCALE, E. ÉS D'AMBROSIO, E. (1994). Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucl. Acid Res.*, 22, 1921-1922.
- MICHELMORE, R. W. ÉS HULBERT, S. H. (1987). Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25, 383-404.

- MILLS, D. ÉS MCCLUSKEY, K. (1990). Electrophoretic karyotypes of fungi: The new cytology. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3, 351-357.
- MOTOAKI, T., NAKAZONO, E., TSUSHIMA, S., MORICAWA, T., ÉS MATSUMOTO, N. (1998). Characterization of two morphological groups of isolates of *Pythium ultimum* var. *ultimum* in a vegetable field. *Mycoscience* 39, 135-144.
- MUGNAI, L., BRIDGE, P. D. ÉS EVANS, H. C. (1989). A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycol. Res.* 92, 199-209.
- MULLIS, K. B. ÉS FALLONA, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- NAGY, Á., VÁGVÖLGYI, CS., BALLA, É. ÉS FERENCZY, L. (1994). Electrophoretic karyotype of *Mucor circinelloides*. *Curr. Genet.* 26, 45-48.
- NEWTON, A. C. (1987). Markers in pathogen populations. In *Genetics and Plant Pathogenesis* (P.R. Day and G.J. Jellis, eds.). *Blackwell Scientific*, Oxford, pp. 187-194.
- NEWTON, A. C., CATEN, C. E. ÉS JOHNSON, R. (1985). Variation for isozymes and double-stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts. *Plant. Pathol.* 34, 235-247.
- NIELSEN, R. I. (1978). Sexual Mutants of a Heterothallic *Mucor* Species, *Mucor pusillus*. *Exp. Mycol.* 2, 193-197.
- ORBACH, M. J., VOLLRATH, D., DAVIS, R. W. ÉS YANOFSKY (1988). An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1469-1473.
- OSIEWACZ, H. D. ÉS RIDDER, R. (1991). Genome analysis of imperfect fungi: electrophoretic karyotyping and characterization of the nuclear gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) of *Culvularia lunata*. *Curr. Genet.* 20, 151-155.
- OUTTRUP, H. ÉS BOYCE, C.O.L. (1990). Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty WM and Kelly CT (eds.). *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier Applied Sci. Publ., London, pp. 227-254.
- PAPP, T., VÁGVÖLGYI, CS., KERÉNYI, Z., NAGY, Á. ÉS MICHAILIDES, T. J. (1997). DNA amplification polymorphism of *Mucor piriformis*. *Ant. Leeuwenhoek* 72, 167-173.
- PARENT, S. A., FENIMORE, C. M. ÉS BOSTIAN, K. A. (1985). Vector systems for the expression analysis and cloning of DNA sequences in *S. cerevisiae*. *Yeast* 1, 83-138.
- PATERSON, R. R. M., BRIDGE, P. D., CROSSWAITE, M. J. ÉS HAWKSWORTH, D. L. (1989). A reappraisal of the terverticillate *Penicillia* using biochemical, physiological and morphological features III. An evaluation of pectinase and amylase isoenzymes for species characterization. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2979-2991.
- PEBERDY, J. F. ÉS TURNER, M. (1968). The esterases of *Mortierella ramanniana* in relation to taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 51, 303-312.

- PETRUNAK, D. M. ÉS CHRIST, B. J. (1992). Isozyme variability in *Alternaria solani* and *A. alternata*. *Pythopathol.* 82, 1343-1347.
- PODANI, J. (1993). *SYN-TAX*. Computer programs for multivariate data analysis in ecology and systematics. Version 5.0. User's Guide. Scientia Publishing, Budapest.
- PUNT, P. J., OLIVER, R. P., DINGEMANSE, M. A., POUWELS, P. H. ÉS VAN DEN HONDEL, C. (1987). Transformation of *Aspergillus nidulans* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56, 117-124.
- PUYESKY, M., PONCE-NOYOLA, P., HORWITZ, B.A. ÉS HERRERA-ESTRELLA, A. (1997). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in *Trichoderma harzianum* is repressed during conidiation and mycoparasitism. *Microbiology* 143, 3157-3164.
- RADFORD, A. (1993). A fungal phylogeny based upon orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *J. Mol. Evol.* 36, 389-395.
- RATKZIN, B. ÉS CARBON, J. (1977). Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 487-491.
- REVUELTA, J.L. ÉS JAYARAM, M. (1986). Transformation of *Phycomyces blakesleeana* to G-418 resistance by an autonomously replicating plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7344-7347.
- REYMOND, P., DURAND, R., HEBRAUD, M. ÉS FÈVRE, M. (1991). Molecular cloning of genes from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: expression during hydrolase induction. *FEMS Microbiol. Lett.* 77, 107-112.
- RIDDER, R. ÉS OSIEWACZ, H. D. (1992). Sequence analysis of the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) of *Podospora anserina*: use of homologous regulatory sequences to improve transformation efficiency. *Curr. Genet.* 21, 207-213.
- RIGÓ, K., VARGA, J., TÓTH, B., TÉREN, J., MESTERHÁZY, Á. ÉS KOZAKIEWICZ, Z. (2001). Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47, 000-000.
- RONCERO, M. I. G., JEPSEN, L. P., STROMAN, P. ÉS VAN HEESWIJK, R. (1989). Characterization of a *leuA* gene and ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene* 84, 335-343.
- ROYSE, D. J., SPEAR, M. C. ÉS MAY, B. (1983). Single and joint segregation of marker loci in the shiitake mushroom, *Lentinus edodes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29, 217-222.
- ROYSE, D. J., JODON, M. H., ANTOUN, G. G. ÉS MAY, B. P. (1987). Confirmation of intraspecific crossing and single and joint segregation of biochemical loci of *Volvariella volvacea*. *Exp. Mycol.* 11, 11-18.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. ÉS ERLICH, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 865-869.

- SAITO, T. ÉS TANAKA, N. (1999). Cloning and sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the ectomycorrhizal basidiomycete *Lyophyllum shimeji*. *Mycoscience* 40, 517-523.
- SAITOU, N. ÉS NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstucting phylogenic trees. *Mol. Biol. Evol.*
- SCHIPPER, M. A. A. (1978). On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. *Stud. Mycol.* 17, 53-71.
- SCHIPPER, M. A. A. ÉS STALPERS, J. A. (1980). Various aspects of the mating system in Mucorales. *Persoonia* 11, 53-63.
- SCHOLER, H. J. ÉS MÜLLER, E. (1966). Beziehungen zwischen biochemischer Leistung und Morphologie bei Pilzen aus der Familie der *Mucoraceen*. *Path. Microbiol.* 29, 730-741.
- SCHOLER, H. J., MÜLLER, E. ÉS SCHIPPER, M.A.A. (1983). Mucorales, p.9-59. *In* D. H. Howard (ed.), *Fungi pathogenic for humans and animals, part A. Biology*. Marcel Dekker, New York, N.Y.
- SCHWARTZ, D. C. ÉS CANTOR, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- SERWER, P. (1987). Gel electrophoresis with discontinuous rotation of the gel: An alternative to gel electrophoresis with changing direction of the electric field. *Electrophoresis* 8, 301-304.
- SKINNER, D. Z., BUDDE, A. D. ÉS LEONG, S. A. (1991). Molecular kayotype analysis of fungi. *In*: BENNETT, J. W., LASURE, L. L. (eds). *More gene manipulations in fungi*. Academic Press, San Diego, pp. 86-103.
- SKOVGAARD, K. és ROSENDAHL, S. (1998). Comparison of intra- and extracellular isozyme banding patterns of *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* 102(9), 1077-1084.
- SMITH, T. L. (1989). Disparate evolution of yeasts and filamentous fungi indicated by phylogenetic analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 7063-7066.
- SMITHERMAN, K. O. ÉS PEACOCK, J. E. (1995). Infections emergencies in patients with diabetes mellitus. *Med. Clin. N. Am.*
- SNEATH, P. H. A. ÉS SOKAL, R. R. (1973). *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- SOKAL, R. R. és MICHENER, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas. Sci. Bull.* 38, 1409-1438.
- SOUTHERN, E. M., ANAND, R., BROWN, W. R. A. ÉS FLECHER, D. S. (1987). A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nuc. Acids Res.* 15, 5925-5943.
- SPEAR, M. C., ROYSE, D. J. ÉS MAY, B. (1983). Atypical meiosis and joint segregation of biochemical loci in *Agaricus brunnescens*. *J. Hered.* 74, 417-420.
- STEENSMA, H. Y., DE YONGH, F. C, M. ÉS LINNEKAMP, M. (1988). The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. *Curr. Genet.* 14, 311-317.

- STOUT, D. L. ÉS SHAW, C. R. (1974). Genetic distance among certain species of *Mucor*. *Mycologia* 66, 969-977.
- SUGIYAMA, J. és YAMATOYA, K. (1990). Electrophoretic comparison of enzymes as chemotaxonomic aid among *Aspergillus* taxa: (1) *Aspergillus* sects. *Ornati* and *Cremeri*. In: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Szerk: Samson, R. A. és Pitt, J. I. Plenum Press, New York 385-393 pp.
- TAKAYA, N., YANAI, K., HORIUCHI, H., OHTA, A. ÉS TAKAGI, M. (1996). Cloning and characterization of the *Rhizopus niveus* *leu1* gene and its use for homologous transformation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (3), 448-452.
- TANSEY, M. R., KAMEL, S. M. ÉS SHAMSAI, R. (1984). The number of nuclei in sporangiospores of *Rhizomucor* species: taxonomic and biological significance. *Mycologia* 76, 1089-1094.
- TANSEY, M. R., KAMEL, S. M. ÉS SHAMSAI, R. (1984). The number of nuclei in sporangiospores of *Rhizomucor* species: taxonomic and biological significance. *Mycologia* 76: 1089-1094.
- TOOLEY, P. W. ÉS CARRAS, M. M. (1992). Separations of chromosomes of *Phytophthora* species using CHEF gel electrophoresis. *Exp. Mycol.* 16, 188-196.
- TUDZYNSKI, P. és WELTRING, K.-M. (1993). Molecular genetics of Phytopathogenic fungi. *Progress in Botany* 54, 358-372.
- VÁGVÖLGYI, C., MAGYAR, K., PAPP, T., PALÁGYI, ZS., FERENCZY, L. ÉS NAGY, Á. (1996). Value of substrate utilization data for characterization of *Mucor* isolates. *Can. J. Microbiol.* 42: 613-615.
- VÁGVÖLGYI, CS., PAPP, T., PALÁGYI, ZS., ÉS MICHAILIDES, T. J. (1996) Isozyme variation among isolates of *Mucor piriformis*. *Mycologia* 88, 602-607.
- VAN HEESWICK, R. ÉS RONCERO, M. I. G. (1984). High frequency transformation of with recombinant plasmid DNA. *Calsberg Res. Commun.* 49, 691-702.
- VAN WERT, S. L. (1990). Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate gene and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogen. *Gene* 232, 155-163.
- VARGA, J., TÓTH, B., RIGÓ, K. ÉS TÉREN, J. (2000). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *Fungal Gen. And Biol.* 30, 71-80.
- VARGA, J. ÉS VÁGVÖLGYI, CS. (1991). Isoenzyme analysis of some mesophyl *Mucor* strains. *Acta. Microbiol. Hung.* 38, 224.
- VARGA, J., VÁGVÖLGYI, CS., NAGY, Á., PFEIFFER, I., ÉS FERENCZY, L. (1995). Isoenzyme, Restriction Fragment Length Polymorphism, and Random Amplified Polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma* Miller et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 173-177.

- VARMA, A. K. ÉS KWON-CHUNG, K. J. (1999). Characterisation of the glyceraldehyde-3-phosphate gene and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogene. *Gene* 232, 155-163.
- VARMA, A. K. ÉS KWON-CHUNG, K. J. (1999). Characterisation of the glyceraldehyde-3-phosphate gene and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogene. *Gene* 232, 155-163.
- VERDOES, J. C., WERY, J., BOEKHOUT, T. ÉS VAN OOYEN, A. J. J. (1997). Molecular characterisation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Phaffia rhodozyma*. *Yeast* 13, 1231-1242.
- VILLAMÓN, E., GOZALBO, D., MARTINEZ, J. P. ÉS GIL, M. L. (1999). Purification of a biologically active recombinant glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase from *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters* 179, 61-65.
- WADA, M., BEPPU T. ÉS HORINOUCI, S. (1996). Integrative transformation of the zygomycete *Rhizomucor pusillus* by homologous recombination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 652-657.
- WAINWRIGHT (1992). *An Introduction to Fungal Biotechnology*.
- WEBSTER, J. (1980). *Introduction to fungi*. 2. Ed. Cambridge University Press, Cambridge 224. p.
- WEISS, R. L., PUETZ, D. ÉS CYBIS, J. (1985). Expression of *Aspergillus* genes in *Neurospora*. In: *Gene Manipulation in Fungi*. Benett JW and Lasure LL (eds.). Academic Press, New York, pp. 280-292.
- WEITZMAN, I., DELLA-LATTA, P., HOUSEY, G. ÉS REBATA, G. (1993). *Mucor ramossissimus* Samutsevitch isolated from a thigh lesion. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2523-2525.
- WEITZMAN, I. S. WHITTIER, J. C. MCKITRICK ÉS DELLA-LATTA, P. (1995). Zygosporos: the last word in identification of rare or atypical zygomycetes isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33: 781-783.
- WERY, J., DALDERUP, M. J. M., LINDE, J. T., BOEKHOUT, T. ÉS VAN OOYEN, A. J. J. (1996). Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast* 12, 641-651.
- WHITEWAY, D. E., VIRATA, R. L. ÉS WRISS, L. C. (1979). Mucormycosis. *Arch. Intern. Med.* 139, 944-956.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. ÉS TINGEY, S. V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18, 6531-6535.
- 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.* 19, 303-306.

- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., RAFALSKI, J. A. ÉS TINGEY, S. V. (1990). Genetic analysis with RAPD markers. *In: More gene manipulations in fungi.*
- WOODBURY, W., SPENCER, A. K. ÉS STANMANN, M. A. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44, 301-305.
- WÖSTEMEYER, J., BURMESTER, A. ÉS WEIGEL, C. (1987). Neomycin resistance as a dominantly selectable marker for transformation of the zygomycete *Absidia glauca*. *Curr. Genet.* 12, 625-627.
- YAMATOYA, K., SUGIYAMA, J. ÉS KURAISHI, H. (1990). Electrophoretic comparison of enzymes as chemotaxonomic aid among *Aspergillus* taxa: (2) *Aspergillus* sect. Flavi. *In: Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification.* Szerk. Samson, R. A. és Pitt, J. I. 395-405. *Plenum Press*, New York.
- YOSHIZUMI, H., ÉS ASHIKARI, T. (1987). *Trends Biotechnol.* 5, 277-281.
- ZERVAKIS, G ÉS LABARÉRE, J. (1992). Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing of enzyme patterns. *J. Gen. Microbiol.* 138, 635-645.

9. A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉGE

A) AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ TARTOZÓ KÖZLEMÉNYEK

FOLYÓIRATBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

1. Vastag, M., Papp, T., Kasza, Zs. and Vágvölgyi, Cs. (1998). Differentiation of *Rhizomucor* species by means of carbon source utilization and isoenzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 36, 2153-2156.
2. Vágvölgyi, Cs., Vastag, M., Ács, K. and Papp, T. (1999). *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. Mycol. Res. 103, 612-618.
3. Vastag, M., Papp, T., Kasza, Zs. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Intraspecific variation in two species of *Rhizomucor* assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Basic Microbiol. 40, 269-277.
4. Vágvölgyi, Cs., Vastag, M., Kasza, Zs., Ács, K. and Schwab, H. (2002). Cloning and sequence analysis of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from a zygomycete fungus, *Rhizomucor miehei*. FEMS Microbiol. Letters (előkészítve).

FOLYÓIRATBAN MEGJELENT POSZTER- ÉS ELŐADASKIVONATOK

1. Vastag, M., Papp, T., Nagy, Á., Palágyi, Zs., Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (1997). Delimitation of *Rhizomucor* species on the basis of genetic and physiological markers. Acta Microbiol. Hung. 44, 430-431.
2. Vastag, M., Nagy, Á., Papp, T., Ács, K. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Investigation of the taxonomic position of *Rhizomucor tauricus*. Acta Microbiol. Hung. 46, 134-135.
3. Vastag, M., Papp, T., Ács, K. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Intraspecific variability of thermophilic *Rhizomucor* species as assessed by randomly amplified polymorphic DNA. Acta Microbiol. Hung. 46, 351.

EGYÉB KONGRESSZUSI SZEREPLÉSEK

1. Vágvölgyi, Cs., Vastag, M., Papp, T., Nagy, Á. and Ferenczy, L. (1997). Physiological and molecular markers to differentiate *Rhizomucor* species. 13th ISHAM, Parma, Abstracts 101.

2. Vágvolgyi, Cs., Nagy, Á. and Vastag, M. (1998). DNA amplification polymorphism of *Rhizomucor* species. IMC-6, Jerusalem, Abstract 28.
3. Ács, K., Vastag, M., Kasza, Zs. és Vágvolgyi, Cs. (2001). A *Rhizomucor miehei* glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz génjének klónozása. MMT 2001. évi Naggyűlése, Balatonfüred, Összefoglalók.
4. Vágvolgyi, Cs., Vastag, M., Kasza, Zs. and Ács, K. (2002). Isolation and Characterization of the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Rhizomucor miehei*. IMC7, Oslo, Abstracts.

B) EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

FOLYÓIRATBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

1. Palágyi, Zs., Nagy, Á., Vastag, M., Ferenczy, L. and Vágvolgyi, Cs. (1997). Maintenance of fungal strains on cryopreservative-immersed porous ceramic beads. *Biotechnol. Tech.* 11, 249-250.
2. Vágvolgyi, Cs., Magyar, K., Papp, T., Vastag, M., Ferenczy, L. Hornok, L., and Fekete, Cs. (1998). Detection of double-stranded RNA molecules and virus-like particles in different *Mucor* species. *Ant. Leeuwenhoek* 73, 207-210.
3. Nagy, Á., Palágyi, Zs., Vastag, M., Ferenczy, L. and Vágvolgyi, Cs. (2000). Electrophoretic karyotypes of some related *Mucor* species. *Ant. Leeuwenhoek* 78, 33-37.
4. Papp, T., Vastag, M., Nagy, Á., Michailides, T.,J. and Vágvolgyi, Cs. (2001). Genetic variability of the postharvest pathogen *Gilbertella persicaria*: identification of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers correlating with (+) and (-) mating types. *Ant. Leeuwenhoek* 80, 301-309.

FOLYÓIRATBAN MEGJELENT POSZTER- ÉS ELŐADÁSKIVONATOK

1. Palágyi, Zs., Nagy, Á., Vágvolgyi, Cs., Vastag, M. and Ferenczy, L. (1997). Application of "Protect" bacterial storage system for fungal strain maintenance. EBC-8, Budapest, Abstracts 108.
2. Papp, T., Vastag, M. and Vágvolgyi, Cs. (1999). Genetic variability of the postharvest pathogen *Gilbertella persicaria*. *Acta Microbiol. Hung.* 46, 343-344.

3. Vágvölgyi, Cs., Vastag, M., Papp, T. and Kasza, Zs. (1999). Isoenzyme and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of the homothallic *Mucor genevensis*. Acta Microbiol. Hung. 46, 352.
4. Garas, K., Vastag, M., Somogyvári, F. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Applicability of the *ATB Fungus* system for rapid antifungal susceptibility testing of *Rhizomucor* isolates. Acta Microbiol. Hung. 46, 355.
5. Papp, T., Fekete, Cs., Vastag, M., Nagy, Á. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Presence of double-stranded RNA molecules and virus-like particles in *Rhizopus* strains. Acta Microbiol. Hung. 47, 333.
6. Vastag, M., Garas, K., Papp, T., Ács, K. and Vágvölgyi, Cs. (1999). The antifungal activity of lovastatin against *Rhizomucor* strains. Acta Microbiol. Hung. 47, 383-384.
7. Papp, T., Nagy, Á., Palágyi, Zs., Vastag, M. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Genetic studies on sexual processes of *Gilbertella persicaria*. Acta Microbiol. Hung. 47, 327-328.

EGYÉB KONGRESSZUSI SZEREPLÉSEK

1. Papp T., Nagy, Á., Palágyi, Zs., Vastag, M. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Genetic studies on sexual processes of *Gilbertella persicaria*. 13th. International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Abstracts 75.
2. Vastag, M., Garas, K., Papp, T., Ács, K. and Vágvölgyi, Cs. (1999). The antifungal activity of lovastatin against *Rhizomucor* strains. 13th. International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Abstracts 109.
3. Papp, T., Vastag, M., Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Investigation of the genetic variability of *Gilbertella persicaria* via molecular markers. ECFG-5, Arcachon, Abstracts 314.
4. Papp, T., Vastag, M., Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Phylogenetic position of *Gilbertella persicaria* inferred from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. ECFG-5, Arcachon, Abstracts 315.
5. Vastag, M., Palágyi, Zs., Nagy, Á., Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Investigation of the genetic variability of *Phaffia rhodozyma* via RAPD markers. ECFG-5, Arcachon, Abstracts 338.
6. Ács, K., Kasza, Zs., Vastag, M. és Vágvölgyi, Cs. (2000). A gliceráldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén klónozása és részleges szekvenálása *Mucor circinelloides*-ben. MMT 2000. évi Nagyűlése, Keszthely, Összefoglalók.

7. Papp, T., Nyilasi, I., Ács, K., Vastag, M. és Vágvolgyi, Cs. (2000). A *Gilbertella persicaria* taxonómiai helyének vizsgálata a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén és magi riboszómális-DNS szekvenciák alapján. MMT 2000. évi Naggyűlése, Keszthely; Összefoglalók.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A disszertációban ismertetett kísérleti munka a SZTE Mikrobiológiai Tanszéken készült.

Köszönöm Dr. Kevei Ferenc tanszékvezetőnek és Dr. Ferenczy Lajosnak, nyugalmazott egyetemi tanárnak, volt tanszékvezetőnek, hogy a tanszéken munkámat lehetővé tették, figyelemmel kísérték és támogatták.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Vágvölgyi Csabának, az egyetemi éveim óta tartó közvetlen, baráti munkakapcsolatért, a lelkiismeretes szakmai iránymutatásért, a hasznos elméleti és gyakorlati tanácsokért és az elmúlt évek alatt nyújtott sokrétű, önzetlen támogatásáért.

Köszönöm Dr. Papp Tamásnak a munkám során számtalanszor nyújtott szakmai segítségét.

Köszönet illeti a SZTE Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozóját, köztük Dr. Varga Jánost és Dr. Antal Zsuzsát értékes tanácsaiért, Kasza Zsoltot, Ács Klárát a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségéért, Nagy Lajos Gergelyt a fényképek elkészítéséért, valamint Kovácsné Petrina Fruzsínát és Lele Máriát a technikai segítségért.

Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom családomnak és szüleimnek, akik mindvégig mellettem álltak biztos háttérrel nyújtva munkám elvégzéséhez.