

**A *Mucor* nemzetség genetikai és taxonómiai vizsgálata molekuláris markerek
alkalmazásával**

Doktori (PhD) tézisek

Dr. Vágvölgyi Csaba



Szeged

1995

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A mikroszkópikus gombák esetében a részletes genetikai analízis egyik alapfeltétele a könnyen alkalmazható genetikai markerek megléte. Klasszikus genetikai markerekkel (legtöbbször auxotrófia és rezisztencia markerek) jelölt gombatörzsek alkalmazásával lehetőség nyílik különböző genetikai felépítésű gombatörzsek keresztezésére, hibridek, illetve rekombináns törzsek előállítására. Ez a megközelítés, számos esetben járult hozzá elméleti, vagy gyakorlati szempontból fontos gombatörzsek genetikai állományának megismeréséhez. Mivel az ilyen markerek (mutációk) bevitele, elsősorban az ipari törzsek egy jelentős részében előnytelen, szükség lehet olyan, különleges protoplasztfúziós rendszerek alkalmazására, amelyek feleslegessé teszik a partnerek, vagy legalábbis az egyik partner mutáltatását. Ilyen módszer a hőinaktiválás, a kémiai inaktiválás, vagy az izolált sejtorganellumok átvitele. Alkalmazásuk esetén mindkét partner, vagy legalábbis a donor genetikai állománya változatlanul, indukált mutációk nélkül vehet részt a fúziós folyamatban.

A kutatási program kezdeti (a későbbtől tematikailag elkülönülő) időszakának célkitűzése, egy mikroszkópikus fonalagomba, az *Aspergillus nidulans* sejtmagjainak intakt állapotban történő izolálása volt. Vizsgálni kívántuk, hogy milyen tényezők és hogyan befolyásolják a sejtmagizolálás eredményét. Megkíséreltük továbbá az izolált sejtmagok recipiens *A. nidulans* protoplasztokba történő bevitelét.

Az utóbbi években több olyan eljárás is született, melyek segítségével nagyszámú, a gomba genetikai rendszerét jellemző természetes markert határozhatunk meg. Ezek, bár szelekciós hatásuk nincs, a korábban említett protoplasztfúziós kísérletekben is szerepet kaphatnak, mint a fúziós esemény nyomonkövetésének elősegítői. Igazi jelentőségre azonban a természetes gombapopulációk és különböző rendszertani csoportok genetikai variabilitásának vizsgálatában tettek szert. Sajátos módon a nagy fajszámú és igen elterjedt *Mucor* nemzetség képviselői az ilyen jellegű vizsgálatokból mindeddig kimaradtak.

A *Mucor* nemzetség tagjai elsősorban a talajból izolálható szaprofita gombák. Az ide tartozó fajok gyakran vizsgált modell szervezetek, elsősorban különböző szabályzó mechanizmusok, szexuális folyamatok, vagy a gomba morfogenezis tanulmányozásakor. Köztük számos, orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk. Orvosi területen ezek a gombák, mint a mucormikózist okozó opportunistá patogének érdemelnek figyelmet. Egyes törzsek jó extracelluláris enzimtermelőként, mások a szteroidvázak vegyületek sztereospecifikus hidroxilálójaként kerülnek élelmiszeripari és gyógyszeripar felhasználásra. Nem elhanyagolható szerepük van egyes élelmiszeripari termékek, vagy különböző növényi eredetű mezőgazdasági termények károsításában.

A *Mucor* fajok a növénykárosító gombák azon csoportjába tartoznak, melyek elsősorban az alacsony hőmérséketen tárolt lédús terményeknél, mint másodlagos raktári kártevők képesek kártételre. A génusz tagjai közül, azonban csak néhányat izoláltak ilyen fertőzésekkel kapcsolatban; az alkalmanként előforduló *M. circinelloides*, *M. fragilis*, *M. hiemalis*, *M. racemosus* és *M. strictus* mellett, elsősorban a *M. mucedo* és a *M. piriformis* azonosítható ilyen esetekben. Figyelembe véve az előfordulás gyakoriságát és a kártétel nagyságát, kiemelkedő fontosságúnak tekinthetők a *M. piriformis* okozta fertőzések.

A leírtak alapján meglepő, hogy alig került olyan adat publikálásra, amely *M. piriformis* törzsek karakterizálásából, vagy valamely karakter populácószintű variabilitásának tanulmányozásából származik. Ezért a kutatási programunk célkitűzése az, hogy különböző molekuláris markerek vizsgálata révén képet kapjunk a *Mucor* nemzetségbe tartozó fajok, közülük is elsősorban a *M. piriformis* genetikai variabilitásáról.

Régóta ismertek azok az eljárások, melyek lehetőséget nyújtanak egy adott enzim különböző formáinak, az ún. izoenzimeknek az analízisére. Ezek az izoenzimiek létrejöhetnek ha: (a) több génlokusz különböző, de azonos funkciót betöltő polipeptidláncot kódol, (b) egy lokusz több allélja hozza létre a különböző

enzimformákat, (c) posztranszlációs módosítások un. másodlagos izoenzimeket hoznak létre. A különböző izoenzim formák eltérő elektroforetikus mobilitásuk alapján elválaszthatók és specifikus festésekkel detektálhatók.

Az izoenzim analízis különböző taxonómiai problémák megoldásakor, elsősorban fajok, illetve faj alatti kategóriák elkülönítésére használható: pl. *Alternaria*, *Beauveria* és *Rhizoctonia* fajok taxonómiájának revíziója. A növénypatogén mikroszkópikus gombák között azonban arra is találunk példát, amikor az izoenzim analízis nem bizonyult alkalmasnak rokon fajok elkülönítésére (pl. *Pythium*).

Az eltérő enzimformák alapján meghatározott, lényegében genetikai markerek megfelelőek egy fajon, vagy populáción belüli variabilitás kimutatására is. Egyes fitopatogén gombáknál ilyen izoenzim markereket eltérő virulenciájú csoportok azonosítására is sikerült felhasználni.

A genetikai variabilitás kimutatására többféle eljárást kínál a polimeráz láncreakció alkalmazása. Lehetőség van többek között a genom egy adott régiójának (pl. az ITS szakaszok a rDNA-ben) amplifikálására, vagy random szintetikus oligonukleotid primerek alkalmazására (Random Amplified Polimorphic DNA; RAPD). A RAPD technika segítségével felszaporíthatók azok a DNS szakaszok, melyek a primerekkel homológ invertált ismétlődő szekvenciák közé esnek. A RAPD már számos mikroszkópikus gomba (pl. *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*) esetében bizonyult rendkívül érzékeny, elsősorban fajon belüli különbségek kimutatására alkalmazható eljárásnak. Lehetőség van a RAPD amplifikációs termékek RFLP és PFGE analízisekben próbaként történő felhasználására is.

A mikroszkópikus gombák genomjának összetettsége, ugyanakkor kromoszómáik kis mérete a klasszikus citológiai és genetikai vizsgálatokat nagyon megnehezíti. A PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) segítségével azonban, a DNS molekulák mintegy 12 Mb nagyságig egymástól fizikailag szétválaszthatók, ezáltal lehetővé válik a kromoszómák számának és méretének meghatározása. A fitopatogén gombák közül az először tanulmányozott *Ustilago maydis* rendkívül nagy variabilitást

mutatott; valamennyi izolátum elektroforetikus kariotípusa eltérő volt. Ez a kromoszóma polimorfizmus (CLP, Chromosomal length polymorphism), amely elsősorban inszerciók, duplikációk és transzlokációk révén jöhet létre, különböző mikroszkópikus gombáknál eltérő mértékű. Az elektroforetikus kariotipizálás, különösen specifikus génpróbákat felhasználó hibridizációs kísérletekkel kiegészítve, izolátumok azonosítására, illetve faj alatti rendszertani kategóriák elkülönítésére alkalmas eljárás.

Mikroszkópikus gombatörzsek jellemzésére az általuk hordozott extrakromoszómális elemek, így például a mikovírusok is felhasználhatók. Kimutatásuk általában a vírusgenom detektálásával történik, amely szinte minden eddigi esetben kettősszalú RNS (dsRNA). A vírushordozás, amely általában nem köthető fenotípusos változásokhoz, egyes fitopatogén gombák esetében lényegesen befolyásolhatja a törzs patogenitását (pl. *Endothia parasitica*, *Helminthosporium victoriae*). A kettősszalú RNS elemek kitűnően felhasználhatók fitopatogén gombák epidemiológiai markereiként is.

A kutatási program a következő főbb kérdésekre kívánt választ adni:

1. Melyek azok a tipizálási eljárások, melyek segíthetik a különböző *Mucor* fajok, illetve egy faj különböző törzseinek azonosítását. Összhangba vannak-e ezek az eredmények a *Mucor* nemzetség jelenleg elfogadott rendszertani felosztásával.
2. Milyen mértékű a genetikai állomány variabilitása a *M. piriformis*-on belül.
3. Korrelációba hozhatók-e a különböző molekuláris-genetikai analízissel nyert karakterek a vizsgált törzsek valamely biológiai jellemzőivel.
4. Kimutatható-e, és ha igen, milyen gyakorisággal, extrakromoszómális elemek (plazmid, vírus) jelenléte *Mucor* izolátumokban.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. A sejtmagizolálási és protoplasztfúziós kísérleteket *Aspergillus nidulans* auxotrófia és morfológiai markereket hordozó törzseivel végeztük.
2. Ezen kísérletek során felhasznált módszerek a következők voltak: sejtfeltárási eljárások, preparatív centrifugálási eljárások, spektrofotometriás módszerek, protoplasztfúziós technikák (kémiai és elektrofúzió), fény- és elektronmikroszkópia, továbbá általános mikrobiológiai technikák.
3. A genetikai (és biokémiai) markerek variabilitását a következő *Mucor* fajok esetében vizsgáltuk: *M. albo-ater*, *M. aligarensis*, *M. circinelloides*, *M. corticolus*, *M. fragilis*, *M. fuscus*, *M. hiemalis*, *M. mucedo*, *M. piriformis*, *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *M. ramannianus* és *M. rouxii*.
4. Az izoenzim analízis során alkalmazott módszerek: fehérje gélelektroforézis, izoenzim festési technikák. A RAPD vizsgálatok során alkalmazott módszerek: polimeráz láncreakció, nukleinsav gélelektroforézis. Az elektroforetikus kariotipizálás felhasznált technikái: protoplasztképzési módszerek, pulzálatott gélelektroforetikus eljárások (OFAGE, Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis; CHEF, Contour Clamped Homogeneous Electric Field), DNS hibridizációs módszerek. A numerikus taxonómiai elemzésekhez egyes *Mucor* törzsek esetében szénasszimilációs tesztek és API-ZYM mikroteszteket is használtunk. A fiziológiai tesztek továbbá az izoenzim analízis és a RAPD analízis eredményeivel elvégeztük a numerikus taxonómiában használt legfontosabb matematikai analíziseket.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. A kutatási program első időszakában sikerült kidolgoznunk egy olyan eljárást, amely lehetővé teszi intakt sejtmagok izolálását *A. nidulans* protoplasztokból. Meghatároztuk továbbá azokat a feltételeket, amelyek mellett ezek a sejtmagok recipiens protoplasztokba átvihetők voltak. Ezt a kariodukciót 5×10^{-7} - 1×10^{-8} gyakorisággal sikerült megvalósítani.

2. Eredményeinkkel sikerült cáfolnunk azt az állítást, miszerint az izoenzim analízis a nagy fajon belüli variabilitás miatt nem alkalmazható faj delimitálásra a *Mucor* nemzetségen belül. Bár a fajon belüli eltéréseket egyes esetekben valóban nagynak találtuk (pl. *M. circinelloides*, *M. racemosus*), de más fajok esetében (pl. *M. plumbeus*) ez igen csekély is lehetett. Ezen eltérések magyarázhatók úgy, hogy a nagy "fajon belüli" variabilitás a törzsidentifikálás elégtelenségéből származik; a morfológiai karakterei alapján a többitől megbízhatóbban elkülöníthető fajok esetében (*M. plumbeus*) az észlelt polimorfizmus kisebb. Nem zárható ki azonban hogy az eredmények valóban az egyes *Mucor* fajok genetikai állományának erősen eltérő variabilitását tükrözik.

3. Az intraspecifikus variabilitást a legnagyobb törzsszámmal vizsgált *M. piriformis* esetében tanulmányoztuk részletesebben. Egy elmélet szerint a viszonylag meghatározott környezeti feltételek között élő specializálódott patogének és az obligát paraziták kisebb genetikai variabilitást mutatnak, mint a szélesebb gazda- és szubsztrátspektrummal rendelkező fakultatív patogén, vagy a szaprofita gombák. Eredményeink nem támasztják alá ezt a hipotézist: a szaprofita *M. piriformis* izoenzim markereinek variabilitása közepesnek mondható. 59 izolátumra hét elektroforetikus fenotípus (EP) detektálható, de az izolátumok 93%-a három EP valamelyikébe tartozik.

4. Egyes *M. piriformis* izolátumok (29 izolátum) felhasználásával, amelyek párosodási típusa is meghatározásra került, sikerült olyan izoenzim markereket azonosítani (MDH, EST, G6DH enzimrendszerekkel), melyek lehetővé teszik a szexuális interakcióra képes (+ és - párosodási típusú) izolátumok elkülönítését a neutrális ("aszexuális") izolátumoktól. Ez az első alkalom, hogy ilyen típusú korreláció ismertté válik egy *Mucor* nemzetséghez tartozó gomba esetében. Morfológiai, illetve patogenitásbeli jellemzőkkel a vizsgált izoenzim markerek nem mutattak hasonló összefüggést.
5. Nyolc különböző oligonukleotid primer felhasználásával 59 *M. piriformis* izolátum RAPD analízisét is elvégeztük. A létrehozott amplifikációs mintázatok száma primerenként erősen eltérő: két primer esetében (OPC-05, OPC-07) három-három, az OPC-08 segítségével hét, az OPC-01 esetében nyolc, míg az OPC-12 és OPC-13 primerek alkalmazásakor kilenc-kilenc volt. A RAPD segítségével a neutrális izolátumokban kimutatott polimorf lokuszok száma (48%), jelentősen meghaladja a párosodási reakcióra képes (+ és -) izolátumokét (34%). Mindaddig nem állt rendelkezésre bizonyíték arra nézve, hogy az ivaros folyamatok (zigospóráképzés) végbemennek-e egy természetes *M. piriformis* populációban; ha igen milyen gyakorisággal és milyen feltételek esetén. Eredményeink kísérletes bizonyítékot szolgáltatnak arra nézve, hogy ez az ivaros szaporodási ciklus feltehetőleg természetes körülmények között is végbemegy.
6. Hasonlóan néhány mikroszkópikus gombánál tapasztalhoz, a RAPD segítségével kimutatott variabilitás meghaladja az izoenzimek segítségével detektáltat. Ennek ellenére a RAPD vizsgálatok adataiból is meghatároztunk olyan markereket, amelyek korrelációba hozhatók a vizsgált gombatörzsek szexuális tulajdonságaival; segítségükkel elkülöníthetők a neutrális és a párosodási képességgel rendelkező izolátumok.
7. Az elektroforetikus kariotipizálás módszerét alkalmazva, először sikerült adatokat nyerni különböző *Mucor* fajokat reprezentáló törzsek kromoszómaszámára, a

kromoszómális DNS méretére és a genom nagyságára vonatkozóan. Mindazok a korábbi próbálkozások, melyek klasszikus citológiai módszerek alkalmazásával kísérelték meg kondenzált kromoszómák kimutatását valamely *Mucor* törzsből, sikertelenek voltak. A vizsgálataink, melyeket eddig a *M. plumbeus*, *M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. bainieri* és a *M. mucedo* fajokhoz tartozó törzseken végeztünk, igen nagy kromoszóma polimorfizmust (CLP) tártak fel, lényegében törzsszintű különbségek létét jelezve. Ilyen nagyon variábilis elektroforetikus kariotípust már több gombafaj így, pl. *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Ustilago hordei* esetében kimutattak. A CLP úgy tűnik, meglehetősen általános sajátosság különböző gombafajokban, a varabilitás mértéke azonban erősen eltérő lehet. Kistler és Miao hipotézise szerint, a meiosis szelekciós hatású a kromoszóma aberrációkkal szemben, ezért a meiosis előfordulásának gyakorisága fordítottan arányos a CLP mértékével. Ezen hipotézis megalapozottsága vizsgálataink révén könnyebben eldönthető.

8. Heterológ génpróba felhasználásával két, egyébként jelentős CLP-t felmutató, *M. circinelloides* törzs esetében a rRNS-t kódoló régió kromoszómához rendelését is megvalósítottuk. Ezek az eredmények az első lépést jelentik a *Mucor* törzsek genetikai térképezéséhez, amely a többmagvú meiospórák bonyolult kariotikus állapota és az igen rossz csírázási képességük miatt, klasszikus genetikai eljárásokkal mindeddig lehetetlennek bizonyult.
9. A kutatási program során elsőnek sikerült azonosítanunk kettősszálú RNS elemeket egy *Mucor* törzsben (*M. ramannianus* NRRL 1296). Ezt megelőzően csak egyetlen, mtDNS preparátum elektronmikroszkópos vizsgálatából származó megfigyelés jelezte kisméretű extrakromoszómáli elemek jelenlétét *M. racemosus*ban. Nagyszámú *Mucor* törzs (102 izolátum) vizsgálata révén további öt esetben (egy-egy *M. mucedo*, *M. hiemalis*, *M. aligarensis* és két *M. corticohus*) mutattuk ki, feltehetően virális eredetű RNS szegmentek jelenlétét. Ezen vírushordozó törzsek

esetében nem találtunk megkülönböztető, a vírushordozással összefüggésbe hozható fenotípusos bélyegeket.

10. Megvizsgáltuk és meghatároztuk, néhány más analízis (szubsztrát hasznosítási tesztek, Api-ZYM mikrotesztek) hasznosíthatóságát *Mucor* fajok numerikus taxonómiai elemzéseiben.

4. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. **Vágvölgyi, Cs.**, Kucsera, J., and Ferenczy, L. (1988). A physical method for separation of *Saccharomyces cerevisiae* cells according to their ploidy. *Can. J. Microbiol.* 34, 1102-1104.
2. **Vágvölgyi, Cs.**, Brückner, B., and Frankó, A. (1990) Size-dependent regeneration of *Gibberella* protoplasts. *Acta Microbiol. Hung.* 37, 375-378.
3. **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1991) Isolation of nuclei from *Aspergillus nidulans* protoplasts. *FEMS Letters* 82, 247-252.
4. **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1992) Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Experientia* 48, 271-272.
5. **Vágvölgyi, Cs.**, Varga, J., and Ferenczy, L. (1993) Detection of double-stranded RNA in *Mucor ramannianus*. *Fungal Genet. Newslett.* 40, 79.
6. Nagy, Á., **Vágvölgyi, Cs.**, Balla, É., and Ferenczy, L. (1994) Electrophoretic karyotype of *Mucor circinelloides*. *Curr. Genet.* 26, 45-48.
7. Nagy, Á., Garamszegi, N., **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1994) Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. *FEMS Microbiol Letters* 123, 315-318.
8. Varga, J., Kevei, F., **Vágvölgyi, Cs.**, Vriesema, A., and Croft, J. H. (1994) Double-stranded RNA mycoviruses in section *Nigri* of the *Aspergillus* genus. *Can. J. Microbiol.* 40, 325-329.
9. Nagy, Á., **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1995) Simple method for obtaining chromosomal DNA for orthogonal field alteration gel electrophoresis analysis from *Phaffia rhodozyma*. *BioTechniques* 18, 63-65.
10. Varga, J., **Vágvölgyi, Cs.**, Nagy, Á., and Ferenczy, L. (1995) Isoenzyme, restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma* Miller et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 173-177.
11. **Vágvölgyi, Cs.**, Papp, T., and Michailides, M. (1995) Isoenzyme characterization of *Mucor piriformis*. *Mycol. Res.* (submitted for publication).
12. Palágyi, Zs., Nagy, Á., **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1995) A mutation strategy to obtain mutants of the asthaxantin producing *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* (submitted for publication).
13. **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1995) Patterns of substrate utilization by different *Mucor* species. *J. Basic Microbiol.* (in manuscript)

14. **Vágvölgyi, Cs., Varga, J., Papp, T. and Ferenczy, L.** (1995) The taxonomic value of isozyme analysis in the genus *Mucor*. J. Gen. Appl. Microbiol. (in manuscript)

5. ELŐADÁSOK ÉS POSZTER BEMUTATÁSOK

1. **Vágvölgyi, Cs., and Ferenczy, L.** (1985). Sejtmagizolálás *Aspergillus nidulans* protoplasztokból. Congress of Hung. Microbiol. Soc., Kecskemét 1985, Abstracts, 124.
2. **Ferenczy, L., and Vágvölgyi, Cs.** (1985). Intraspecifikus sejtmagátültetés *Aspergillus nidulans*ban. Congress of Hung. Microbiol. Soc., Kecskemét 1985, Abstracts, 125.
3. **Vágvölgyi, Cs.** (1985). Isolation of nuclei from *Aspergillus nidulans* protoplasts. 2nd Workshop on Microbial Protoplasts, Weimar 1985, Abstracts.
4. **Vágvölgyi, Cs.** (1985). Rapid system of protoplast purification for high frequency fusion. 2nd Workshop on Microbial Protoplasts, Weimar 1985, Abstracts.
5. **Vágvölgyi, Cs., Kucsera, J., and Ferenczy, L.** (1987). Ploidy-dependent separation of *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts on density gradients. In Proc. 4th European Congress on Biotechnology 1987, O. M. Neijssel, R. R. van der Meer, and K. Ch. A. M. Luyben, eds. (Amsterdam: Elsevier), 506-507.
6. **Vágvölgyi, Cs., Kucsera, J., and Ferenczy, L.** (1988). Centrifugal separation of *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts with different ploidy levels. Acta Microbiol. Hung. 35, 204.
7. **Brückner, B., Vágvölgyi, Cs., and Frankó, A.** (1989) *Fusarium moniliforme* protoplasztok regenerációjának vizsgálata. Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Eger 1989, Abstracts.
8. **Frankó, A., and Vágvölgyi, Cs.** (1990) Electrotransformation of *Aspergillus nidulans* protoplast subclasses. In 4th Int. Mycological Congress, Regensburg 1990, Abstracts 183.
9. **Vágvölgyi, Cs., and Manczinger, L.** (1990) Separation of chromosomes from *Mucor circinelloides*. In 4th Int. Mycological Congress, Regensburg 1990, Abstracts 344.
10. **Vágvölgyi, Cs., and Ferenczy, L.** (1990) Transfer of isolated nuclei into fungal protoplasts. In 4th Int. Mycological Congress, Regensburg 1990, Abstracts 344.
11. **Varga, J., and Vágvölgyi, Cs.** (1991) Isoenzyme analysis of some mesophyl *Mucor* strains. Acta Microbiol. Hung. 38, 224.

12. Korom, K., Frankó, A., **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1991) Optimisation of electrofusion for protoplasts of *Aspergillus nidulans*. Acta Microbiol. Hung. 38, 224.
13. **Vágvölgyi, Cs.**, Nagy, Á., Varga, J., Palágyi, Zs., and Ferenczy, L. (1994) Value of some molecular markers for species delimitation in the genus *Mucor*. 7. Int. Congr. Mycol. Div. IUMS, Prague, Abstracts, 324.
14. Nagy, Á., **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1994) Pulsed field electrophoresis of *Mucor* chromosomal DNA. ECFG-2, Lunteren, Abstracts.
15. Varga, J., Vriesema, A., **Vágvölgyi, Cs.**, and Kevei, F. (1994) Double stranded RNA mycoviruses in *Aspergillus niger* strains. Acta Microbiol. Hung. 41, 319.
16. Kevei, F., Varga, J., **Vágvölgyi, Cs.**, Kucsera, J., Nagy, Á., Pfeiffer, I., and Ferenczy, L. (1994) Interpretation of compatibility relations among black *Aspergilli* on the basis of their molecular characters. Acta Microbiol. Hung. 41, 348.
17. Nagy, Á., **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1994) Electrophoretic karyotyping of *Mucor* species. Acta Microbiol. Hung. 41, 353.
18. Varga, J., **Vágvölgyi, Cs.**, Nagy, Á., and Ferenczy, L. (1995) Molecular characterization of *Phaffia rhodozyma* strains. Acta Microbiol. Hung. 42, 135.
19. Nagy, Á., **Vágvölgyi, Cs.**, Palágyi, Zs., and Ferenczy, L. (1995) Analysis of chromosomal DNA polymorphism of *Phaffia rhodozyma*. Acta Microbiol. Hung. 42, 133.
20. **Vágvölgyi, Cs.**, Papp, T., and Ferenczy, L. (1995) Intraspecific variation in isozyme patterns of *Mucor piriformis* isolates. Acta Microbiol. Hung. 42, 127-128.
21. Nagy, Á., **Vágvölgyi, Cs.**, and Ferenczy, L. (1995) Preparation of chromosomal DNA from yeasts of biotechnological importance. Acta Microbiol. Hung. 42, 134.