

**MTA DOKTORA PÁLYÁZAT  
DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

---

**A KAROTINOID-BIOSZINTÉZIS GENETIKAI HÁTTERE ÉS MÓDOSÍTÁSÁNAK  
LEHETŐSÉGEI JÁROMSPÓRÁS GOMBÁKBAN**

**DR. PAPP TAMÁS**



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TTIK  
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

---

**SZEGED  
2016**

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TARTALOMJEGYZÉK .....                                                                                                                       | 2  |
| 1. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....                                                                                                                | 4  |
| 2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR .....                                                                                                       | 5  |
| 2.1. A járomspórás gombák rövid jellemzése .....                                                                                            | 5  |
| 2.2. A terpénbioszintézis-kutatás főbb területei gombákban.....                                                                             | 7  |
| 2.3. A mikrobiális karotintermelés vizsgálatának jelentősége .....                                                                          | 9  |
| 2.4. Járomspórás gombák a karotinoid-bioszintézis kutatásában .....                                                                         | 11 |
| 2.5. Az általános mevalonsav-út és a terpén-bioszintézis főbb lépései gombákban .....                                                       | 13 |
| 2.6. A $\beta$ -karotin-bioszintézis specifikus lépései gombákban .....                                                                     | 17 |
| 2.7. A járomspórás gombák genetikai manipulációja.....                                                                                      | 19 |
| 3. CÉLKITŰZÉSEK.....                                                                                                                        | 21 |
| 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....                                                                                                                | 24 |
| 4.1. A vizsgálatok során használt mikroorganizmusok .....                                                                                   | 24 |
| 4.2. A gombák tenyésztése során használt fontosabb tápközegek .....                                                                         | 24 |
| 4.3. Általános molekuláris technikák .....                                                                                                  | 24 |
| 4.4. A szekvenciák elemzése .....                                                                                                           | 25 |
| 4.5. A törzsek azonosítására és a filogenetikai elemzésekhez meghatározott markerek.....                                                    | 26 |
| 4.6. A filogenetikai elemzések során használt módszerek .....                                                                               | 26 |
| 4.7. Mikroszkópos vizsgálatok .....                                                                                                         | 27 |
| 4.8. Valós idejű kvantitatív PCR .....                                                                                                      | 27 |
| 4.9. PEG-közvetítette protoplaszt-transzformáció.....                                                                                       | 27 |
| 4.10. Agrobacterium tumefaciens-közvetítette transzformáció (AMT) .....                                                                     | 28 |
| 4.11. A transzformánsok elemzése .....                                                                                                      | 28 |
| 4.12. A karotinoid- és ergoszterintartalom elemzése .....                                                                                   | 29 |
| 4.13. Statisztikai módszerek .....                                                                                                          | 29 |
| 5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK .....                                                                                                         | 30 |
| 5.1. Karotinoidtermelő gombák törzsgyűjteményének létrehozása és jellemzése .....                                                           | 30 |
| 5.1.1. A Mortierellaceae család filogenetikai vizsgálata (Nagy és mtsi. 2011, 2012b, Petkovits és mtsi. 2011, Wagner és mtsi. 2013).....    | 31 |
| 5.1.2. Karotinoidtermelő gombatörzsek azonosítása (Nagy és mtsi. 2012a, Iturriaga és mtsi. 2005, Papp és mtsi. 2006, 2001).....             | 39 |
| 5.2. Az általános mevalonsav-út kulcslépéseit meghatározó gének jellemzése és az útvonal módosítása járomspórás gombákban .....             | 44 |
| 5.2.1. A <i>M. circinelloides</i> HMG-KoA-reduktáz génjeinek jellemzése .....                                                               | 45 |
| 5.2.2. A <i>R. miehei</i> HMG-KoA-reduktáz génjének vizsgálata (Vastag és mtsi. 2004, Lukács és mtsi. 2004, 2009, Takó és mtsi. 2010) ..... | 60 |

|                                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.2.3. A <i>M. circinelloides</i> IPP-izomeráz, valamint FPP- és GGPP-szintáz génjeinek vizsgálata .....                                                                                                                       | 63  |
| 5.3. A specifikus karotinoid-bioszintézis vizsgálata: xantofillok termeltetését lehetővé tevő gének kifejeztetése <i>M. circinelloides</i> -ben .....                                                                          | 72  |
| 5.3.1. A <i>Paracoccus</i> sp. N81106 $\beta$ -karotin-ketoláz (CrtW) és -hidroxiláz (CrtZ) kifejeztetése <i>M. circinelloides</i> -ben .....                                                                                  | 73  |
| 5.3.2. A <i>X. dendrorhous</i> $\beta$ -karotin-oxigenáz (CrtS) kifejeztetése <i>M. circinelloides</i> -ben (Csernetics és mtsi. 2015).....                                                                                    | 91  |
| 5.4. A járomspórás gombák genetikai manipulációjához szükséges transzformációs rendszerek kidolgozása .....                                                                                                                    | 93  |
| 5.4.1. Heterológ gének kifejeztetését lehetővé tevő vektorok kidolgozása járomspórás gombákra (Vastag és mtsi. 2004, Papp és mtsi. 2006, Nyilasi és mtsi. 2005, 2008, Takó és mtsi. 2010, Papp és mtsi. 2012, 2013, 2016)..... | 93  |
| 6. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA .....                                                                                                                                                                              | 98  |
| 7. IDÉZETT IRODALOM .....                                                                                                                                                                                                      | 105 |
| 8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE .....                                                                                                                                                                                                  | 119 |
| Függelék .....                                                                                                                                                                                                                 | 122 |

## 1. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálával tartozom szüleimnek, feleségemnek és három gyermekemnek, hogy egész életem során feltétel nélkül, önzetlenül támogattak és számtalanszor erőt adtak céljaim eléréséhez. Soha nem tudom eléggé megköszönni feleségemnek, Ábrók Mariannának megértését és biztatását, támogatása nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom Dr. Vágvölgyi Csabának, tanáromnak, munkatársamnak és tanszékvezetőmnek, hogy elindított a kutatói pályán és megszerettette velem a mikrobiológiát és a mikroszkopikus gombák világát. Köszönöm továbbá a több mint húszéves közös munkát, a rengeteg ötletet és útmutatást. Az ő tudása, személyisége és humora alapvetően járult hozzá kutatóvá válásomhoz, barátságát igen nagy ajándéknak tartom.

Hálával gondolok Dr. Ferenczy Lajosra és Dr. Kevei Ferencre, akik pályám kezdetén segítettek és támogatták munkámat, és akiknek személyisége, példamutatása meghatározó volt számomra.

Köszönettel tartozom Dr. Arturo P. Eslavanak, Dr. Enrique Iturriaganak és Dr. Antonio Velayosnak, akiknek útmutatásával bekapcsolódhattam a karotinoid-bioszintézis kutatásába.

Külön köszönöm közvetlen munkatársaimnak Dr. Nagy Gábornak, Dr. Csernetics Árpádnak, Dr. Nyilasi Ildikónak és Dr. Takó Miklósnak a sokéves közös munkát és baráti segítséget, munkájuk meghatározó módon járult hozzá a dolgozatomban bemutatott eredményekhez.

Köszönöm Dr. Nagy Lászlónak, Dr. Krizsán Krisztinának, Dr. Linka Beátának, Dr. Kocsubé Sándornak, Dr. Lukács Gyöngyinek, Petkovits Tamásnak, Tóth Eszternek, Szarkándi János Gergőnek, Bencsik Ottónak, Tóth Dórának, Farkas Anitának és minden jelenlegi és egykori munkatársamnak, akik részt vettek a dolgozatban ismertetett kutatásokban, munkájukat és lelkesedésüket, nélkülük számos eredmény nem született volna meg.

Köszönet illeti Dr. Manczinger Lászlót, Dr. Kredics Lászlót, Dr. Galgóczy Lászlót, Dr. Szekeres Andrást és a tragikus hirtelenséggel elhunyt Dr. Varga Jánost, akiktől munkám során számtalanszor kaptam szakmai segítséget és rengeteget tanultam tőlük.

Köszönet illeti az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék minden dolgozóját. Külön is hálával tartozom Lele Máriának és Kulcsár Melindának a sokféle technikai segítségért, Dr. Palágyi Andrásnének és Lengyel Boglárkának az adminisztratív teendők végzésében nyújtott segítségükért és Farkas Elvirának a törzsgyűjtemény odaadó gondozásáért.

Köszönet illeti mindazt a sok kollégát és barátot, akik hozzájárultak kutatói és oktatói pályám alakulásához és elnézést kérek, amiért a felsorolás nem sikerülhetett teljes körűre.

## 2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR

MTA doktori értekezésem főszereplői a járomspórás gombák, azon belül is elsősorban a *Mucor circinelloides*, mint modellorganizmus. Ismerkedésemet e korábban a Zygomycetes osztályba sorolt és sokáig méltatlanul elhanyagolt gombacsoporttal még diákkörös hallgatóként kezdtem az SZTE Mikrobiológiai Tanszékén, ahol Dr. Vágvölgyi Csaba, az országban akkor előzmények nélkül, létrehozott egy, a járomspórás gombák biológiájával foglalkozó munkacsoportot, és akinek témavezetése mellett, diplomamunkámat és PhD disszertációm is (*Raktári kártevő járomspórás gombák genetikai és fiziológiai variabilitásának vizsgálata*) e gombák genetikai és molekuláris taxonómiai vizsgálatából készítettem el. A járomspórás gombák kutatásával foglalkozó csoport időközben nemzetközi ismertségre tett szert, aminek következtében meghívást kaptam a spanyolországi, Salamanca-i Egyetem Mikrobiológiai Tanszékére, Dr. Arturo P. Eslava professzor kutatócsoportjába. Itt két éven át, posztdoktor kutatóként a *Mucor* fajok karotinoid-bioszintézisének genetikai hátterét tanulmányoztam. Ez idő alatt indultak el azok a kutatási irányok (i. a járomspórás gombák, mint karotinoidtermelő szervezetek jellemzése, ii. a terpén-bioszintézis genetikai hátterének tanulmányozása; iii, a karotinoid-bioszintézis genetikai módosítása; iv, genetikai transzformációs rendszerek kidolgozása és a heterológ génexpresszió megvalósítása járomspórás gombákban), amelyek aztán későbbi munkám során meghatározóvá lettek, és amelyek eredményeit jelen dolgozatban összefoglaltam. Hazatérve és folytatva a megkezdett kutatásokat ismét bekapcsolódtam a szegedi járomspórás csoport munkájába, melynek fő célkitűzése ebben az időben szintén a hatékony molekuláris eszköztár kidolgozása volt.

A dolgozatban ismertetett kutatások fontos célja volt, hogy megvizsgáljuk a karotinoidtermelő járomspórás gombák biotechnológiai alkalmazásának biológiai feltételeit, valamint, hogy a további alap- és alkalmazott kutatásban felhasználható törzseket és módszereket hozzunk létre.

Az elmúlt két évtizedben a járomspórás gombákat illetően tudásunk jelentősen kibővült, ma már semmiképpen nem nevezhetjük őket kevésbé ismertnek vagy kutatottnak. A gombacsoport több tagja is (pl. *Phycomyces blakesleeanus*, *M. circinelloides*, *Rhizopus oryzae*) széleskörűen jellemzett modellorganizmusokká vált, melyeket a mikrobiológiai kutatások legkülönbözőbb területein felhasználnak. Szeretném remélni, hogy az ismereteknek ehhez a bővüléséhez a dolgozatban ismertetett kutatások is hatékonyan hozzájárultak.

### 2.1. A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK RÖVID JELLEMZÉSE

A járomspórás gombákat korábban, elsősorban morfológiai sajátosságaik és ivaros folyamataik hasonlósága miatt, egységes csoportnak gondolták (Zygomycota), mely a valódi gombák egyik korai ágát képviseli (ALEXOPOULOS és mtsi. 1996). Alapvető jellegeik a cönocitikus

micélium, a kitin és kitozán tartalmú sejtfal, az ivartalanul sporangiumokban képződő, önálló mozgásra nem képes spórák, valamint az ivaros folyamatok eredményeként, a gametangiumok fúziójával kialakuló járom- vagy zigospórák, melyről a csoport a nevét is kapta (*gör* zygosz - járom). Rendszertanuk jelenleg átalakulóban van, mivel molekuláris filogenetikai vizsgálatok alapján a csoport poli-, illetve parafiletikusnak bizonyult (WHITE és mtsi. 2006, HIBBETT és mtsi. 2007, VOIGT és mtsi. 2013). Az egykor ide sorolt Glomales rend arbuszkuláris mikorrhiza képző gombáit már korábban külön törzsbe helyezték (Glomeromycota) (SCHÜBLER és mtsi. 2001), a hagyományosan a Zygomycota törzsbe tartozó többi csoportot pedig négy bizonytalan helyzetű (*incerte sedis*) altörzsbe (Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina és Entomophthoromycotina) osztották szét (HIBBETT és mtsi. 2007); e csoportok filogenetikai kapcsolatai és evolúciós viszonyai jelenleg is intenzív vizsgálat tárgyát képezik (SEKIMOTO és mtsi. 2011, GRYGANSKYI és mtsi. 2013, TRETTER és mtsi. 2013, BENNY és mtsi. 2014, 2016).

A legtöbb fajt a Mucoromycotina altörzs foglalja magába; ide tartoznak az elsősorban telítetlen zsírsavtermelésük miatt tanulmányozott Mortierellales, az ektomikorrhiza- és termőtestképzésről ismert Endogonales, valamint a legváltozatosabb és legjobban tanulmányozott csoport, a Mucorales rend képviselői. E gombák többsége talajból és bomló szerves anyagból izolálható szaprofita szervezet, ugyanakkor vannak köztük gombaparazita, valamint növényi és raktári kártevő fajok is. Orvosi szempontból egyes képviselőik (pl. a *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* nemzetségek néhány tagja), mint mucormikózisokat okozó opportunistáknak érdemelnek figyelmet.

A Mucorales rend egyes tagjai biotechnológiai és ipari jelentőséggel is bírnak, elsősorban extracelluláris enzim- (pl. lipázok, proteázok) (SILVEIRA és mtsi. 2005, RODRIGUES és FERNANDEZ-LAFUENTE 2010, VOIGT és mtsi. 2016), karotinoid- (DUFOSSE 2006, VOIGT és mtsi. 2016), telítetlen zsírsav- (KAVADIA és mtsi. 2001, BELLOU és mtsi. 2012, TANG és mtsi. 2016), alkohol- (MILLATI és mtsi. 2005, KARIMI és mtsi. 2006), valamint tejsav- és egyéb szerves savtermelő (TAY és YANG 2002, BAI és mtsi. 2004, VOIGT és mtsi. 2016) szervezetekként, vagy értékes biológiai aktivitással rendelkező (pl. szteránvázas) vegyületek sztereospecifikus hidroxilálóiként (DE OLIVEIRA SILVA és mtsi. 2015). Egyes *Mucor* törzseket sajtérlelésre is felhasználnak (HERMET és mtsi. 2012), más, az *Actinomucor*, *Amylomyces*, *Mucor*, valamint *Rhizopus* nemzetségekbe tartozó gombák pedig megtalálhatók fermentált távol-keleti ételek (pl. tempeh, oncom, sufu, ragi, koji) starter kultúráiban (NOUT és AIDOO 2002, NOUT 2007, BABU és mtsi. 2009).

Néhány faj (pl. *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*, *M. hiemalis*, *R. oryzae* vagy *P. blakesleeanus*) genetikai és molekuláris biológiai munkákban használt modellszervezet; elsősorban különböző szabályozó mechanizmusok (RODRÍGUEZ-ROMERO és

CORROCHANO 2006, CORROCHANO és GARRE 2010, LEE és mtsi. 2015, RUIZ-VÁZQUEZ és mtsi. 2015), a karotin-bioszintézis (KUZINA és CERDÁ-OLMEDO 2007, ALMEIDA és CERDÁ-OLMEDO 2008, AVALOS és LIMÓN 2015, ZHANG és mtsi. 2016), az ivaros folyamatok (SCHIMEK és WÖSTEMEYER 2006, IDNURM és mtsi. 2008, CAMINO és mtsi. 2015, WÖSTEMEYER és mtsi. 2016), a gomba morfogenezis (WANG és LIN 2012, LEE és mtsi. 2015), vagy a patogenitás tanulmányozása során (IBRAHIM és mtsi. 2010, SCHWARTZE és mtsi. 2012, VOELZ és mtsi. 2015). A jelen dolgozatban ismertetett vizsgálatokban a karotintermelő *M. circinelloides* f. *lusitanicus*-t használtuk, mely az egyik leggyakrabban vizsgált járomspórás modellorganizmus (**1. ábra**). (A továbbiakban, amennyiben külön nincs jelölve, az általános *M. circinelloides* megjelölés is erre a gombára vonatkozik.)



**1. ábra.** A *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* SZMC 12082 telepmorfológiája minimál (YNB) táptalajon.

A fent említett területek mellett, a *M. circinelloides* segítségével tanulmányozzák az RNS-interferencia folyamatát és szerepét a gombasejtben (NICOLÁS és mtsi. 2010, 2015, CALO és mtsi. 2012, CERVANTES és mtsi. 2013, RUIZ-VÁZQUEZ és mtsi. 2015), a morfológiai dimorfizmus mechanizmusát (BREDENKAMP és mtsi. 2010, OCAMPO és mtsi. 2012, LEE és mtsi. 2013, 2015, VALLE-MALDONADO és mtsi. 2015), a járomspórás gombák patogenitásának genetikai és molekuláris hátterét (LI és mtsi. 2011, BASTIDAS és mtsi. 2012, SALAS és mtsi. 2012) vagy egyes, biotechnológiai szempontból potenciálisan kihasználható tulajdonságokat és folyamatokat (pl. karotinoidok, lipidek, zsírsavak, alkohol és enzimek termelése), valamint ezek szabályozását (XIA és mtsi. 2010, MITRA és mtsi. 2012, RODRÍGUEZ-FRÓMETA és mtsi. 2013, SHARMA és mtsi. 2013, ZHAO és mtsi. 2015, 2016, ZHANG és mtsi. 2016).

## **2.2. A TERPÉNBIOSZINTÉZIS-KUTATÁS FŐBB TERÜLETEI GOMBÁKBAN**

A terpénszármazékok (terpének, terpenoidok, izoprenoidok) alkotják a természetben előforduló legnagyobb és legváltozatosabb vegyületcsoportot, melyek közül eddig több mint 30.000 egyedi vegyületet írtak le (LANGE és mtsi. 2000). Terpenoidok minden élőlénycsoportban előfordulnak és mind a szerkezet, mind a funkció tekintetében rendkívüli változatosságot mutatnak. Öt szénatomos izoprén egységekből épülnek fel és ezek számától függően különböző

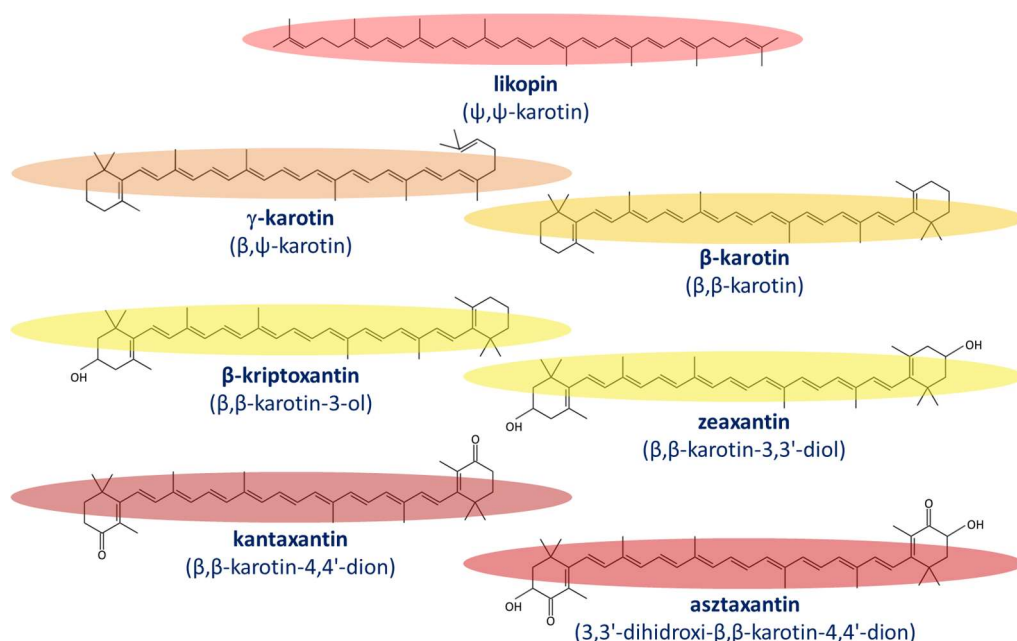
családokba sorolják őket, pl. mono- ( $C_{10}$ ), szeszkvi- ( $C_{15}$ ), di- ( $C_{20}$ ), szeszter- ( $C_{25}$ ) és triterpének ( $C_{30}$ ), karotinoidok ( $C_{40}$ ), stb. Az egyes izoprénszármazékok változatos funkciót töltenek be a különböző élőlényekben: egyes fehérjék preniloldalláncaiként részt vesznek a sejten belüli szignál és szabályozó folyamatokban, szerepet játszanak a fotoszintézis folyamatában (pl. karotinoidok és a klorofill oldalláncai), megtalálhatók az elektrontranszport láncban (ubikinon), vagy biológiai membránokban (pl. az archeák prenil-lipidjei, a baktériumok hopanoidjai, vagy az eukarióták szteroljai), lehetnek továbbá növényi hormonok (pl. gibberellinek, brasszinoszteroidok, abszcizinsav), a növényi védekezésben szerepet játszó vegyületek (fitoalexinek), feromon hatású anyagok (pl. trispórsav), vitaminok (pl. A, K, E vitaminok), antimikrobiális és számos egyéb hatású metabolitok, vagy azok alkotói (LANGE és mtsi. 2000, HOLSTEIN és HOHL 2004). A gombák is sokféle terpén-típusú anyagcsereterméket állítanak elő, melyek közt számos bioaktív másodlagos metabolit, pigment (pl. karotinoidok, helicobasidin), mikotoxin (pl. trichotecének, PR-toxin), fitotoxin (pl. botrydial, fusicoccin, ophiobolinok) és antibiotikum (pl. fuzidinsav, pleuromutilin) található (HANSON 2008). Az új bioaktív molekulák keresése, jellemzése, bioszintézisük és funkciójuk feltárása, valamint biotechnológiai alkalmazásba vonása a gombákkal kapcsolatos kutatások egyik legváltozatosabb és legdinamikusabban fejlődő területe.

Gombákban, csakúgy, mint az emberben, a terpén metabolitok bioszintézise az ún. általános mevalonsav-útról ágazik le. Különösen egyes membránalkotók (pl. az ergoszterin és a fehérjék N-glikozilációjában szerepet játszó dolikol), valamint szignál és szabályozó fehérjék farnezil és geranilgeranil oldalláncainak szintézisének keresztül, az útvonal központi lépéseit katalizáló enzimek (pl. a HMG-KoA-reduktáz) és az azokat kódoló gének működése olyan alapvető biológiai folyamatokra is hatással lehetnek, mint a morfogenezis, a dimorfizmus, a sejt integritás fenntartása, a membránszerkezet és fluiditás biztosítása, a gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység, bizonyos környezeti hatásokhoz (pl. az oxigéntenzió vagy az ozmotikus viszonyok megváltozásához) való alkalmazkodás, vagy az apoptotikus folyamatok szabályozása (DIMSTER-DENK és mtsi. 1995, ROZE és LINZ 1998, GRABINSKA és PALAMARCZYK 2002, KUZINA és mtsi. 2006, NICKERSON és mtsi. 2006, VAUPOTIČ és mtsi. 2008, BIEN és ESPENSHADE 2010, JANIĆ és mtsi. 2012, YASMIN és mtsi. 2012). Mindezen folyamatoknak alapvető szerepük van mind az esetleges biotechnológiai alkalmazások szempontjából (különösen, ha pont a terpén-bioszintézis általános lépéseit kívánjuk módosítani), mind a patogenitás kutatásában (pl. a kolonizáció és a fertőzés kialakítása során). Mivel a gomba membránkomponens ergoszterin és annak bioszintézise a legtöbb, a klinikai gyakorlatban használt gombaellenes szer célpontja, az ergoszterin-bioszintézis és az ergoszterinszint szabályozása szintén intenzíven kutatott terület (DONALD és mtsi. 1997, SONG és mtsi. 2003, MACREADIE és mtsi. 2006, BURG és ESPENSHADE 2011, ANDRADE-PAVÓN és mtsi. 2014).



### 2.3. A MIKROBIÁLIS KAROTINTERMEELÉS VIZSGÁLATÁNAK JELENTŐSÉGE

A karotinoidok zsíroldékony, konjugált kettős kötésekkel tartalmazó, izoprénvázas vegyületek. Az egyik legváltozatosabb természetes pigmentcsoport, több mint 600 féle származékot ismerünk, melyeket elsősorban növények és különböző mikroorganizmusok (baktériumok, algák és gombák) termelnek (BRITTON és mtsi. 2004). Általában sárga, narancs és vörös színűek, szerkezet szerint megkülönböztetjük az ún. karotinokat, melyek kizárólag szénből és hidrogénből épülnek fel (pl.  $\beta$ -karotin és likopin), valamint xantofillokat, melyek az előbbiek oxigéntartalmú származékai (pl.  $\beta$ -kriptoxantin, zeaxantin, kantaxantin és asztaxantin) (2. ábra) (BRITTON 1995).



2. ábra. Néhány karotin és xantofill szerkezete.

Azonkívül, hogy számos élőlény színéért felelősek, a karotinoidok sokféle egyéb alapvető funkciót is ellátnak. Fotoszintetizáló szervezetekben szerepet játszanak a fotooxidatív stresszel szembeni védekezésben és a fotoszintézis folyamatába is bekapcsolódnak, mint másodlagos fénygyűjtő molekulák (FRANK és COGDELL RJ 1996, FRANK és BRUDVIG 2004), a legtöbb élőlényben antioxidáns és az oxidatív stresszel szemben védő hatást fejtenek ki (NAGUIB 2000, SANDMANN és MISAWA 2002), fotoreceptorok alkotói lehetnek, egyes élőlényekben így részt vesznek a fototropizmus és a fototaxis folyamatában, befolyásolhatják a membránok szerkezetét, fluiditását és proton permeabilitását (BRITTON 2008).

Egyes karotinoidok (pl.  $\beta$ -karotin, lutein vagy zeaxantin) az A-vitamin előanyagaként hatással lehetnek a fényérzékelésre, a látásra, a táplálkozásra, és a sejtdifferenciálódás folyamataira (SHARMA és mtsi. 2006, FUHRMAN és mtsi. 2008), vagy növényi hormonok, gomba feromonok és egyéb bioaktív hatású vegyületek prekursorai lehetnek (AULDRIDGE és mtsi. 2006, WERNER és mtsi. 2012). Az emberi egészségre gyakorolt hatásukat (pl. antioxidáns és A-provitamin jelleg,

vagy a látásra és szem pigmentjeire, valamint a táplálkozásra kifejtett kedvező hatások, egyes daganatos betegségek és érrendszeri problémák megelőzésének lehetősége) intenzíven kutatják (FIEDOR és BURDA 2014).

A karotinoidok biotechnológiai szempontból igen értékes metabolitok, éves piacuk a 2000-es évek végén elérte az egymilliárd dollárt (DEL CAMPO és mtsi. 2007). Elsősorban az élelmiszer-, a kozmetikai-, és a gyógyszeripar területén, valamint az állattenyésztésben – mint takarmány kiegészítőket – használják fel jelentősebb mennyiségben. Az egészségre gyakorolt kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően napjainkban a karotinoidok előállítása és fogyasztása dinamikus növekvő tendenciát mutat. Az iparban felhasznált karotinoidok túlnyomó többségét még mindig kémiai szintézissel állítják elő. Ugyanakkor a mikrobiális karotintermelés megvalósítása olcsó, környezetbarát előállítási technológiák alkalmazását teszi lehetővé, mely egyben csökkentheti a szintetikus eredetű termékek arányát, ezért a mikrobiális karotinoidtermelés javítása fokozottan kutatott területté vált (ITURRIAGA és mtsi. 2000, DAS és mtsi. 2007). A legnagyobb mennyiségben előállított vegyület a  $\beta$ -karotin és a likopin, de az utóbbi években mind az alkalmazott, mind az alap kutatás egyre erőteljesebben irányul a xantofilok (pl. asztaxantin, kantaxantin, zeaxantin és  $\beta$ -kriptoxantin) termeltetésére. A  $\beta$ -karotint egyrészt antioxidáns és A-provitamin sajátosága miatt, másrészt színezékként használják élelmiszerekben (pl. vajban, margarinban, üdítőitalokban) és kozmetikumokban. Az asztaxantint és kantaxantint jelenleg leginkább takarmány kiegészítőként alkalmazzák egyes halak (pl. pisztráng és lazac), valamint szárnyasok esetében a hús, bőr és tojás színének és minőségének javítására (HIGUERA-CIAPARA és mtsi. 2006, BJERKENG 2008, BREITHAUPT 2008). A zeaxantin és  $\beta$ -kriptoxantin pedig (a luteinnel együtt) étrend kiegészítőként jelentőséggel bír az időskori makuláris degeneráció megelőzésében (BHOSALE és BERNSTEIN 2005, WU és mtsi. 2015).

Az elmúlt években többféle, mikroorganizmusokra alapozott, ipari léptékű karotinoidtermelő eljárást is kidolgoztak, illetve üzembe állítottak. Ilyen célokra legsikeresebben főként algákat, pl. *Dunaliella salina* ( $\beta$ -karotin), *Haematococcus pluvialis* ( $\beta$ -karotin, asztaxantin), és egyes gombákat, pl. *Blakeslea trispora* ( $\beta$ -karotin, likopin) használtak (DUFOSSÉ 2006, DAS és mtsi. 2007). Ugyanakkor számos alkalmazás még kísérleti fázisban van, ahol a termelés és a fermentáció hatékonyságát fokozni, illetve optimalizálni kell. A jelenleg is kutatott és potenciálisan kihasználhatónak tekintett karotinoidtermelő mikrobák közt említést érdemel több baktérium, pl. az asztaxantintermelő *Paracoccus* sp. N81106 (korábban *Agrobacterium aurantiacum*), a kantaxantintermelő *Bradyrhizobium* sp., a zeaxantintermelő *Flavobacterium multivorum* és *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, valamint több gomba, pl. a likopin- és  $\beta$ -karotin-termelő *M. circinelloides* f. *lusitanicus*, *P. blakesleeanus*, *Neurospora crassa* és *Fusarium sporotrichioides*, vagy az asztaxantintermelő *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia*

*rhodozyma*) (BHOSALE és BERNSTEIN 2005, DUFOSSÉ 2006, MATA-GÓMEZ és mtsi. 2014). Ugyancsak kutatott terület, a karotinoidtermelés megvalósítása egyes nem karotinoidtermelő, viszont biztonságosnak tekintett és/vagy a fermentációs eljárásokhoz már jól adaptált mikroorganizmusokban, rekombináns technikák segítségével. Más mikrobákból (pl. *Erwinia*, *Paracoccus*, *Alcaligenes* törzsekből) származó karotin-bioszintézis gének kifejeztetésével, sikerrel termeltettek különböző karotinoidokat *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* és *Zymomonas mobilis* segítségével (LEE és SCHMIDT-DANNERT 2002, UMENO és mtsi. 2005, DAS és mtsi. 2007, YE és BATHIA 2012, ZHAO és mtsi. 2013, REYES és mtsi. 2014, ZHU és JACKSON 2015).

## 2.4. JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK A KAROTINOID-BIOSZINTÉZIS KUTATÁSÁBAN

Mint a fenti összeállításból is kitűnik, egyes algák és baktériumok mellett több gombafaj is kiemelt célpontja a karotinoid-bioszintézissel kapcsolatos kutatásoknak (AVALOS és LIMÓN 2015). Ilyen ismert modellorganizmusok a *N. crassa*, a *X. dendrorhous* és egyes járomspórás gombák. Utóbbiak közül elméleti és gyakorlati szempontból is kiemelkednek a Mucoromycotina altörzsbe tartozó szervezetek (DUFOSSÉ 2006, TULI és mtsi. 2015, SCHWEIGGERT és CARLE 2016). Jelentőségüket mutatja, hogy az ebbe a csoportba tartozó *B. trispora* jelenleg az egyetlen olyan gombafaj, amelyet ipari  $\beta$ -karotin-termeltetésre használnak (pl. Vitatene, DSM) (ROUKAS 2016, SCHWEIGGERT és CARLE 2016). A nem patogén és mikotoxinokat sem termelő *Blakeslea* által termelt  $\beta$ -karotin élelmiszeripari felhasználásra is engedélyezett (EFSA 2012). A pigmentet két ellentétes párosodási típusú törzs (+ és -) keverékével állítják elő aerob folyadék fermentációval. Az eljárás kb. 30 mg/g<sub>[száraz tömeg]</sub> vagy 3 g/l  $\beta$ -karotin termeltetését teszi lehetővé (ITURRIAGA és mtsi. 2005). A fermentációt követően a  $\beta$ -karotin-t etil-acetáttal extrahálják, majd tisztítást és koncentrációt követően kristályos formában, vagy növényi olajokba oldva hozzák forgalomba.

Járomspórás gombákban a karotintermelés szorosan összefügg az ivaros folyamatokkal. Sok fajnál az ellentétes párosodási típusba tartozó micéliumok érintkezési zónájában élénksárga szín figyelhető meg, jelezve a  $\beta$ -karotin akkumulációját a szexuális hifákban, az ún. zigofórokban. Maguk az ivaros folyamatokat kiváltó feromonok is tulajdonképpen párosodási típus-specifikus karotinszármazékok, egyben a trispórsav (a zigofórok képződését stimuláló feromon) prekursor vegyületei (SCHIMEK és WÖSTEMEYER 2009, SUN és mtsi. 2012a). A trispórsav akár a párosodási folyamatoktól függetlenül is serkenti a  $\beta$ -karotin termelődését; a trispórsavnak ezt a  $\beta$ -karotin-szintézisre gyakorolt pozitív hatását csak járomspórás gombáknál lehet kimutatni. Nemrég a trispórsav általános szabályozó funkcióját is feltárták, a karotin-bioszintézis stimulálása mellett hatással van a zsírsavak, a szénhidrátok és az aminosavak bioszintézisére is (SUN és mtsi. 2012b).

Ugyanakkor a *B. trispora* esetében alkalmazott módszer (túltermelő mutáns törzsek szelektálása és a növekedést befolyásoló kémiai adalékanyagok adagolása a termeltetés során), úgy tűnik elérte a benne rejlő lehetőségek végső határát, a megfelelő molekuláris és genetikai eszköztár hiánya hátráltatja e gomba még hatékonyabb felhasználását (ITURRIAGA és mtsi. 2000).

Az ugyancsak a Mucoromycotina csoportba tartozó *P. blakesleeanus* a karotin-bioszintézis, a fényérzékelés és a fototropizmus biokémiai és genetikai tanulmányozásának egyik legrégebben használt modellszervezete (DELBRÜCK és REICHARDT 1956, BERGMAN és mtsi. 1969). Vizsgálták a kék fény és az ivaros folyamatok, valamint különböző kémiai anyagok karotintermelést fokozó hatását, számos karotin-bioszintézisben megváltozott, vagy karotintúltermelő törzset is előállítottak és jellemeztek (CERDÁ-OLMEDO 2001). A kék fény fokozza a  $\beta$ -karotin képződését a specifikus bioszintézis-út vonal enzimeit kódoló gének indukciójával (RUIZ-HIDALGO és mtsi. 1997, ALMEIDA és CERDÁ-OLMEDO 2008, SANZ és mtsi. 2010). A *B. trispora*-hoz hasonlóan, *Phycomyces* esetében eddig még minden genetikai transzformációs rendszer kidolgozására irányuló kísérlet kudarcot vallott, ami nagymértékben hátráltatja a folyamatban szerepet játszó gének funkcionális elemzésére és a termelés befolyásolására irányuló vizsgálatokat (ITURRIAGA és mtsi. 2005). Ez egyelőre határt szab a további kutatásoknak, különösen, ami a saját karotinféléktől (*Phycomyces* esetében ezek a  $\beta$ -karotin és a likopin) eltérő származékok (pl. zeaxantin, vagy asztaxantin) termelésének lehetőségét illeti.

Az utóbbi években intenzíven kezdték tanulmányozni az ugyancsak járomspórás *M. circinelloides* f. *lusitanicus* karotinoid-bioszintézisét is. Ez a gomba rendelkezik néhány, mind a bioszintetikus út vizsgálata, mind a lehetséges alkalmazások szempontjából rendkívül vonzó tulajdonsággal. Ilyen sajátosság pl. a *M. circinelloides* könnyebb kezelhetősége (az előző fajokhoz képest sokkal jobban használható molekuláris genetikai munkákban), a lipidakkumuláló képesség, vagy a morfológiai dimorfizmus jelensége (ITURRIAGA és mtsi. 2005, TORRES-MARTÍNEZ és mtsi. 2012), vagyis az a képesség, hogy a gomba fonális formában és bizonyos körülmények közt (pl. magas hexózkoncentráció és/vagy anaerob tenyésztési körülmények), élesztőszerűen is képes növekedni (ORLOWSKY 1991). Ez utóbbi tulajdonság a fermentációs alkalmazások szempontjából lehet különösen előnyös (ITURRIAGA és mtsi. 2005). *M. circinelloides* esetében számos a karotintermelésben megváltozott mutáns törzs is rendelkezésre áll (VELAYOS és mtsi. 1997), a karotin-bioszintézis molekuláris és genetikai hátterét, a termelésben szerepet játszó több gén funkcióját pedig részletesen elemezték, így a specifikus karotinoid-bioszintézis lépéseit és egyes a szabályozásban részt vevő enzimeket kódoló géneket azonosították és jellemezték (NAVARRO és mtsi. 2001, 2013, VELAYOS és mtsi. 2000a, b).

A karotinoidtermelés kutatásában betöltött szerepük is hozzájárult ahhoz, hogy a közelmúltban mind a *P. blakesleanus* (*P. blakesleanus* NRRL 1555, JGI, <http://genome.jgi-psf.org/Phyb12/Phyb12.home.html>), mind a *M. circinelloides* (*M. circinelloides* f. *lusitanicus* CBS 277.49, JGI, <http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.info.html>, valamint *M. circinelloides* f. *circinelloides* 1006PhL, Broad Institute, [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus\\_oryzae/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html)) esetében a teljes genom szekvenciát meghatározták, mely eredmény várhatóan e kutatások további felgyorsulásához és kiszélesedéséhez fog vezetni.

## 2.5. AZ ÁLTALÁNOS MEVALONSAV-ÚT ÉS A TERPÉN-BIOSZINTÉZIS FŐBB LÉPÉSEI GOMBÁKBAN

Minden terpénszármazék öt szénatomos izoprén egységekből épül fel. Az izoprén-bioszintézise, gombákban csakúgy, mint állatokban, a magasabb rendű növények citoplazmájában, egyes baktériumokban és archeákban, az úgynevezett mevalonsav-úton játszódik le (**3. ábra**). Baktériumokban, algákban és a növények kloroplasztiszaiban létezik egy ettől eltérő, „nem-mevalonsav-útvonal” (metileritritol-4-foszfát- vagy deoxixilulóz-5-foszfát-út), ahol az izoprénegységek bioszintézise piruvátból és gliceraldehid-3-foszfátból indul ki (LANGE és mtsi. 2000).

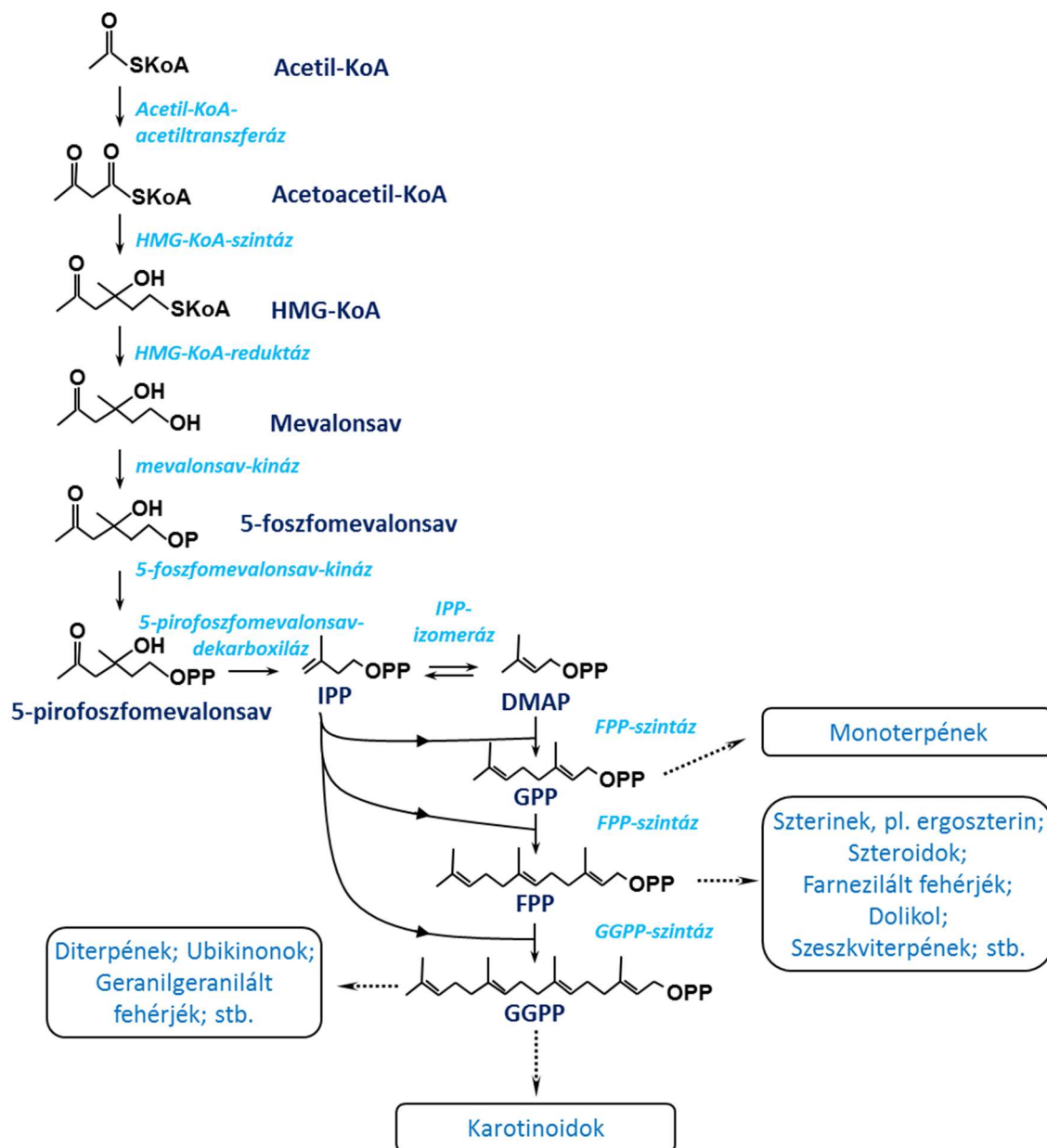
A mevalonsav-út kezdeti lépései során két acetil-koenzim A molekulából acetoacetyl-koenzim A keletkezik, majd ebből újabb acetil-koenzim A kondenzációjával 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) jön létre. Az utóbbi lépést a HMG-KoA-szintáz enzim katalizálja. A folyamat egyik központi lépése a HMG-KoA, HMG-KoA-reduktáz által katalizált, átalakulása mevalonsavvá.

Az eukarióták HMG-KoA-reduktázai egy hidrofób N-terminális és egy hidrofil C-terminális részből épülnek fel. Az előbbi általában 2-8 transzmembrán régiót és egy, a poszttranszlációs szabályozásban szerepet játszó szterol érzékelő domént (*sterol sensing domain*; SSD) tartalmaz, míg az utóbbi az aktív centrumot foglalja magába és erősen konzervált (ISTVAN és mtsi. 2000, FRIESEN és RODWELL 2004).

Az enzim emlősökben általában az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjához kapcsolódik (BURG és ESPENSHADE 2011). *S. cerevisiae*-ben két izoenzimet (HMG1 és HMG2) mutattak ki, melyek sejten belüli lokalizációjukban és szabályozásukban is különbséget mutatnak. A két fehérje az ER két különböző régiójában található: míg a HMG1 a sejtmaghoz egész közel, a HMG2 ettől távol helyezkedik el és eltérő hatást gyakorolnak az ER membránszerkezetének kialakulására is (KONING és mtsi. 1996, PROFANT és mtsi. 2000).

Mivel a HMG-KoA mevalonsavvá alakulása a terpén-bioszintézis egyik sebesség-meghatározó lépése, az enzim működése meghatározó a terpenoid metabolitok képződése

szempontjából, kifejeződése pedig erősen szabályozott mind a transzkripció szintjén, mind poszt-transzkripcionálisan (BURG és ESPENSHADE 2011).



3. ábra. Az általános mevalonsav-út és az izoprén-bioszintézis főbb lépései.

Rövidítések: IPP, izopentenil-pirofoszfát; DMAP, dimetilallil-pirofoszfát; GPP, geranyl-pirofoszfát; FPP, farnezil-pirofoszfát; GGPP, geranylgeranyl-pirofoszfát.

A fehérje degradációjában fontos szabályozó szerepet töltenek be az izoprén-bioszintézis során képződő közti- és végtermékek, így pl. a szterolok, a farnezol, a geranylgeranol, vagy éppen a karotinoidok. Az enzim módosításával befolyásolható többek közt a karotinoidok és más terpénszármazékok, vagy a membránalkotó szterolok (pl. emberben a koleszterin, vagy gombákban az ergoszterin) termelődése, ezért a HMG-KoA-reduktáz működése és szabályozása biotechnológiai és klinikai szempontból is érdekes és mind emberben, mind gombákban erősen

kutatott (ESPENSHADE és HUGHES 2007, BURG és ESPENSHADE 2011, YE és BATHIA 2012). Az enzim kompetitív inhibitorai a sztatinok, melyeket koleszterinszint csökkentő hatásuk miatt gyógyszerként alkalmaznak és kutatnak, de gombaellenes hatással is rendelkeznek (CHAMILOS és mtsi. 2006, QIAO és mtsi. 2007, GALGÓCZY és mtsi. 2009, BELLANGER és mtsi. 2016). A HMG-KoA-reduktáz túlműködtetésével számos esetben sikeresen fokozták a karotinprodukción különböző organizmusokban (SHIMADA és mtsi. 1998, WANG és KEASLING 2002, YAN és mtsi. 2012).

A mevalonsavból 5-foszfomevalonsavon keresztül 5-pirofoszfomevalonsav képződik (a folyamatot a mevalonsav-kináz és az 5-foszfomevalonsav-kináz katalizálja), ebből jön létre, az 5-pirofoszfomevalonsav-dekarboxiláz enzim segítségével, a terpénvegyületek építőegysége, az öt szénatomos izopentenil-pirofoszfát (IPP) (3. ábra).

Az izoprén-bioszintézis következő szakasza az IPP izomerizációjával kezdődik, melynek során dimetilallil-pirofoszfát (DMAPP) keletkezik. Egy DMAPP- és egy IPP-molekula kondenzációja hozza létre a tíz szénatomos geranil-pirofoszfátot (GPP, C<sub>10</sub>), majd további IPP egységek kondenzációjával öt szénatomonként hosszabbodik a szénlánc, mely a farnezil-pirofoszfát (FPP, C<sub>15</sub>) és a geranilgeranil-pirofoszfát (GGPP, C<sub>20</sub>) képződéséhez vezet. Ezeket a lépéseket a prenil-transzferázok közé tartozó izoprenil-pirofoszfát-szintázok katalizálják, melyek eltérő hosszúságú köztitermékekre specifikusak (LIANG és mtsi. 2002). Ezen enzimek közös evolúciós eredetét jelzi, hogy aminosav szekvenciájuk két erősen konzervált aszparaginsavban gazdag régiót tartalmaz. Ezek közül az első, az ún. FARM régió (*first aspartate rich motif*; D-D-X<sub>2,4</sub>-D), melynek környékén található aminosavak meghatározóak a szubsztrát specifitása szempontjából; a szubsztrát és az IPP között létrejövő új C-C kötések kialakításában ugyanakkor a második, SARM régió (*second aspartate rich motif*; D-D-X<sub>2</sub>-D) tulajdonítanak jelentőséget (LIANG és mtsi. 2002, SZKOPIŃSKA és PŁOCHOCKA 2005). Valószínű, hogy a gombák többségében a GPP és az FPP képződésért egyazon enzim, az FPP-szintáz felelős, míg a GGPP képződését a GGPP-szintáz katalizálja (OGURA és KOYAMA 1998, SZKOPIŃSKA és PŁOCHOCKA 2005). A képződő köztitermékek nem csak egymás prekursorai, de kiindulási vegyületként szolgálnak az egyes terpénszármazékok specifikus bioszintéziséhez is. Így a GPP a monoterpének, az FPP a szterolok, dolikolok, hopanoidok, szeszkviterpének, triterpének, egyes fehérjék farnezil csoportjai és a politerpének, a GGPP pedig az ubikinon prenilcsoportja, egyes fehérjék geranilgeranil oldalláncai, a diterpének és a karotinoidok előanyaga (LIANG és mtsi. 2002, HOLSTEIN és HOHL 2004). Noha az egyes prenil-szintázok (pl. az FPP- és GGPP-szintázok) az IPP-egységeket meghatározott lánchosszúságú szubsztrátokhoz kapcsolják, apró változások az aminosav sorrendben e specifitása megváltozásához vezethetnek. Például a FARM régió előtt található aminosavak cseréjével befolyásolható az, hogy az enzim milyen hosszú szénláncú prenil-

pirofoszfát molekulákat képes szubsztrátként megkötni (OHNUMA és mtsi. 1996, UMEMO és mtsi. 2005). Irányított *in vitro* evolúciós technikákkal így olyan gének állíthatók elő, amelyekről az átíródó enzimek eltérő hatékonysággal, különböző hosszúságú termékeket képeznek, akár ismert, akár teljesen új, szokatlan szénatomszámú karotinoidjellegű molekulákat (LEE és mtsi. 2005, SCHMIDT-DANNERT és mtsi. 2006).

A bioszintetikus lépések egymásra épülése miatt, a köztitermék-, illetve prekursor szintek és az izoprén-bioszintézisben résztvevő enzimek (elsősorban a már említett HMG-KoA-reduktáz, valamint az IPP-izomeráz és a különböző prenil-transzferázok) aktivitása és szabályozása alapvetően befolyásolja a specifikus utak végtermékeinek mennyiségét. A mevalonsav-út és az izoprenoid-bioszintézis egyes sebesség-meghatározó lépéseinek módosítását és a bioszintetikus út áttervezésének lehetőségeit régóta kutatják. A mikrobiális karotintermelés javítása érdekében is számos, az izoprén-bioszintézisben résztvevő gén módosításával próbálkoztak különböző organizmusokban. Például a szükséges géneket expresszáló és így karotintermelésre képes *E. coli* törzsben *H. pluvialis* és *X. dendrorhous* módosított IPP-izomeráz gének kifejeztetésével a karotinoidakkumuláció fokozható volt (KAJIWARA és mtsi 1997, MISAWA és SHIMADA 1998; ALBRECHT és mtsi. 1999). Az IPP- és a DMAPP-ellátás növelése ugyancsak többszörösére emelte a karotinprodukción likopintermelő *E. coli* törzsekben (KAJIWARA és mtsi 1997, RODRÍGUEZ-VILLALÓN és mtsi. 2008). Ugyanakkor módosított, karotintermelésre képes *C. utilis*-ben exogén IPP-izomeráz gén kifejeztetésének nem volt hatása az izoprénszármazékok mennyiségére (MISAWA és SHIMADA, 1998). Hasonló eredményre vezetett *X. dendrorhous*-ban a gomba saját IPP-izomerázának módosítása (a promóter kicserélése a *Xanthophyllomyces* erősebben kifejeződő glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz génjének promóterére) (VISSER és mtsi. 2005). Noha a GGPP-szintáz katalizálja az utolsó nem karotinspecifikus lépést a terpén-bioszintézis során, hiszen részt vesz pl. az ubikinon és számos fehérje preniloldalláncának szintézisében is, úgy tűnik, hogy karotintermelő szervezetekben a kifejeződése összehangolt a karotinoidspecifikus enzimek működésével, sőt baktériumokban génje része a karotinoid-bioszintéziséért felelős gén klasztereknek (SANDMANN 1997). A karotinoid-bioszintézis gének és a GGPP-szintáz gén összehangolt szabályozását elsőként *N. crassa*-ban figyelték meg, ahol a gén átíródását, hasonlóan a karotinoidspecifikus szakasz génjeihez, a kék fény indukálja (BAIMA és mtsi. 1991). A GGPP-szintáz által katalizált reakció sebesség-meghatározónak bizonyult a karotinoid-bioszintézis szempontjából több organizmusban (KANG és mtsi. 2005, DAS és mtsi. 2007) és módosítása, illetve túlműködtetése felhasználható a karotinoidtermelés fokozására (MATTHEWS és WURTZEL 2000, WANG és mtsi. 2000, LEE és SCHMIDT-DANNERT 2002, CHANG és KEASLING 2006, VERWAAL és mtsi. 2007, BREITENBACH és mtsi. 2011).



## 2.6. A $\beta$ -KAROTIN-BIOSZINTÉZIS SPECIFIKUS LÉPÉSEI GOMBÁKBAN

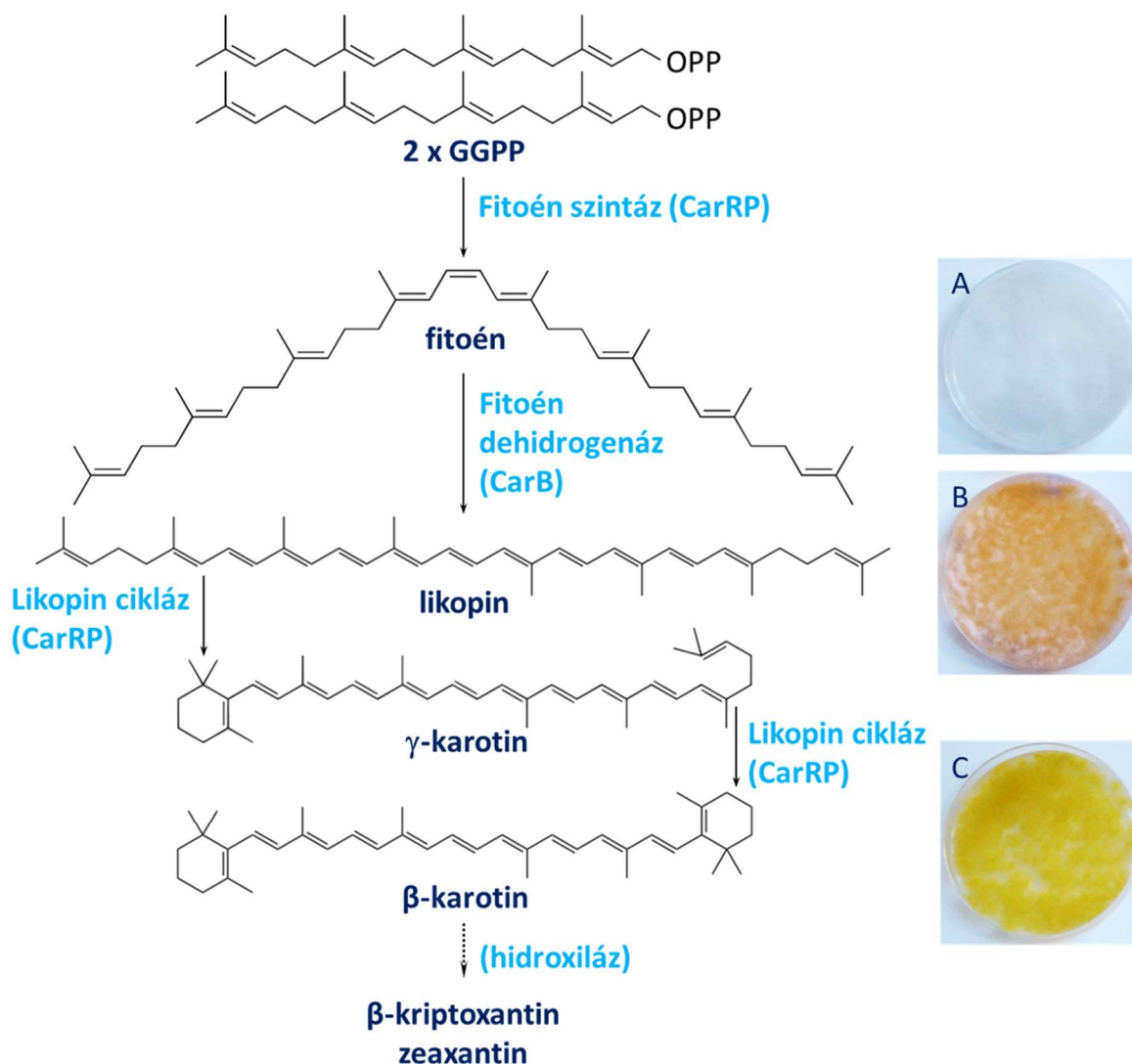
A doktori dolgozatban bemutatott kutatás modellorganizmusaként választott *M. circinelloides* f. *lusitanicus* esetében a karotinoid-bioszintézis fő terméke a  $\beta$ -karotin. E gombában a bioszintézis specifikus lépéseit és génjeit azonosították és részletesen jellemezték (VOIGT és mtsi. 2016).

A karotinoidok bioszintézise két molekula GGPP kondenzációjával kezdődik, amit a fitoén-szintáz enzim katalizál (4. ábra). Ennek eredményeként keletkezik a színtelen, de már 40 szénatomos fitoén. Gombákban a fitoén-szintáz és a  $\beta$ -karotin-bioszintézis utolsó lépéseit katalizáló likopin-cikláz aktivitásokat egyetlen gén kódolja, melyet *M. circinelloides*-ben *carRP*-nek (VELAYOS és mtsi. 2000b), *P. blakesleeanus*-ban és *B. trispora*-ban pedig *carRA*-nak (RODRÍGUEZ-SÁIZ és mtsi. 2004, SANZ és mtsi. 2011) nevezték el. A gént néhány más gombában is leírták és jellemezték, pl. *X. dendrorhous* (*crtYB*; VERDOES és mtsi. 1999), *N. crassa* (*al-2*; ARRACH és mtsi. 2002) vagy *Fusarium fujikuroi* (*carRA*; LINNEMANNSTÖNS és mtsi. 2002) esetében.

A kettős kötések kialakítását, azaz a keletkezett fitoén molekula dehidrogénezését, a *M. circinelloides*-ben a *carB* gén által kódolt fitoén-dehidrogenáz enzim végzi (VELAYOS és mtsi. 2000a). A folyamat több lépésben neurosporén képződésén keresztül valósul meg és a piros színű likopin képződéséhez vezet (4. ábra).

A bioszintézis két utolsó lépésében a likopin molekula két vége gyűrűvé záródik, kialakul a  $\beta$ -karotin. A likopin ciklizációját, azaz a jonon gyűrűk kialakítását, a már említett fitoén-szintáz/likopin-cikláz enzim végzi (CarRP). A *M. circinelloides* CarRP fehérje 614 aminosavból áll; a fitoén-szintáz aktivitásért a molekula C-terminális (P domén), míg a likopin-cikláz aktivitásért a fehérje N-terminális szakasza (R domén) felelős, utóbbi több transzmembrán régiót is tartalmaz (VELAYOS és mtsi. 2000b). Amennyiben a likopin-cikláz aktivitást hordozó R domént eltávolítjuk, mind a likopin-cikláz, mind a fitoén-szintáz aktivitás megszűnik, ha azonban a P domént töröljük, akkor a fehérje csak a fitoén-szintáz aktivitást veszti el, likopin-cikláz aktivitása megmarad (VELAYOS és mtsi. 2000b). Mindkét enzimaktivitáshoz szükség van tehát a membránon átnyúló szakaszokra, illetve a membránhoz való lehorgonyzás képességére. Mindezek alapján ITURRIAGA és mtsi. (2000) megalkották a *M. circinelloides*  $\beta$ -karotin szintézisének „multienzimikus modelljét”, mely szerint két CarRP és négy CarB molekula alkot egy komplexet, mely a CarRP R doménjének transzmembrán régióin keresztül a karotinoidok bioszintézisének helyet adó kompartment membránjába ágyazódik. A CarRP fitoén-szintáz aktivitást hordozó P doménje és a CarB kinyúlik a membránból. A négy CarB molekula mindegyike egy-egy dehidrogénezési lépést katalizál, hasonlóképpen, a két CarRP R doménjei a membránba merülve egy-egy ciklizációs lépést katalizálnak. A szintetizálódó molekula

végighalad az enzim aggregátumon, mely a képződő  $\beta$ -karotint a membrán lipidrétegébe bocsátja ki. Hasonló molekula komplexeket feltételeznek, illetve részben bizonyítottak, az ugyancsak  $\beta$ -karotint termelő *P. blakesleeanus* és az asztaxantintermelő *X. dendrorhous* esetében is (CERDÁ-OLMEDO 1987, VERDOES és mtsi. 2003, ALMEIDA és CERDÁ-OLMEDO 2008).



**4. ábra. A karotinoid-bioszintézis specifikus lépései *M. circinelloides*-ben.**

A CarRP egy bifunkcionális fehérje, melynek fitoén-szintáz és likopin-cikláz aktivitása is van. A jobb oldalon két mutáns és egy karotinoidtermelés szempontjából vad típusú *M. circinelloides* törzs tenyésztete látható; **A:** fitoén-dehidrogenáz deléciós mutáns törzs, **B:** likopin-cikláz mutáns törzs, **C:** vad típusú törzs.

A karotinoidspecifikus gének gombákban általában egymás mellett, klaszterszerűen fordulnak elő (VELAYOS és mtsi. 2000b, LINNEMANNSTÖNS és mtsi. 2002, RODRÍGUEZ-SÁIZ és mtsi. 2004, PRADO-CABRERO és mtsi. 2007). A *M. circinelloides* genomban a *carB* és a *carRP* gén fordított orientációban, egymástól egy közös, mindössze 446 bp-ból álló szabályozó régióval elválasztva helyezkedik el. A két gén összehangolt szabályozás alatt áll, mindkettő átíródását kék fény indukálja (VELAYOS és mtsi. 2000b, ITURRIAGA és mtsi. 2000). Az, hogy a kék fény fokozza a karotinakkumulációt, egyes organizmusokban, mint a már említett *N. crassa*-ban, régóta ismert

(CERDÁ-OLMEDO és CORROCHANO 1996, LINDEN és mtsi. 1997). Ugyanakkor ez a fotoreguláció nem univerzális, sőt a Mucorales rendben sem általános, a *B. trispora* esetében például nincs hatása a fénynek a karotin-bioszintézisre (ITURRIAGA és mtsi. 2000).

## 2.7. A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK GENETIKAI MANIPULÁCIÓJA

A biológiai alap kutatások és a biotechnológiai fejlesztések egyaránt igénylik a génfunkció és kifejeződés vizsgálatának és befolyásolásának rutinszerűen alkalmazható módszereit, melyek magukban foglalják a genetikai transzformációs eljárásokat, valamint megfelelő szelekciós markereket és a génkifejeződést biztosító szekvenciákat.

Járomspórás gombák esetében a leggyakrabban alkalmazott génbeviteli eljárás a polietilén-glikol- (PEG) közvetítette protoplaszt-transzformáció (VAN HEESWIJCK és RONCERO 1984, ARNAU és STROMAN 1991, ITURRIAGA és mtsi. 1992, RUIZ-HIDALGO és mtsi. 1999, NAVARRO és mtsi. 2001, QUILES-ROSILLO és mtsi. 2003, APPEL és mtsi. 2004, LARSEN és mtsi. 2004, ÁLVAREZ és mtsi. 2006). E módszerrel végezték az első sikeres járomspórás gomba-transzformációt is, éppen az általunk is vizsgált *M. circinelloides* f. *lusitanicus* esetében (VAN HEESWIJCK és RONCERO 1984). A protoplasztok képzése általában fiatal hifákból, vagy csírázó spórákból történik (ITURRIAGA és mtsi. 1992, IBRAHIM és SKORY 2007). Egyes fajok esetében a módszer alkalmazhatóságát megnehezíti a sejtfalat felépítő kitin és kitozán polimereket bontó enzimkészítmények és a megfelelően optimalizált eljárások hiánya (JUNG és mtsi. 2000). A 2000-es évek eleje óta egyre gyakrabban használják az elektroporációt (SCHILDE és mtsi. 2001, GUTIÉRREZ és mtsi. 2011, TORRES-MARTÍNEZ és mtsi. 2012, LEE és mtsi. 2013), de több esetben sikerrel alkalmazták a bioliztikus módszert (különösen az ipari és biotechnológiai fejlesztések során) (GONZALEZ-HERNANDEZ és mtsi. 1997, BARTSCH és mtsi. 2002, SKORY 2002, TAKENO és mtsi. 2004, IBRAHIM és SKORY 2007) és az *Agrobacterium tumefaciens*-közvetítette transzformációt (AMT) is (MONFORT és mtsi. 2003, MICHIELSE és mtsi. 2004, 2005, IBRAHIM és SKORY 2007). A járomspórás gombák elektroporálásához és *A. tumefaciens*-közvetítette transzformációjához általában szintén szükség van protoplasztképzésre.

Amennyiben a transzformáló DNS-t cirkuláris plazmidon juttatjuk be egy járomspórás gombába, az szinte mindig episzómálisan, autonóm replikálódó elemként marad fenn (REVUELTA és JAYARAM 1986, SUÁREZ és ESLAVA 1988, YANAI és mtsi. 1990, BURMESTER 1992, ITURRIAGA és mtsi. 1992, BENITO és mtsi. 1995, WOLFF és ARNAU 2002, QUILES-ROSILLO és mtsi. 2003, APPEL és mtsi. 2004, ORTIZ-ALVARADO és mtsi. 2006). Az így bevitt DNS nagyon ritkán integrálódik a genomba, még akkor is, ha a plazmid hosszabb homológ szakaszokat tartalmaz. Amennyiben az integráció mégis bekövetkezik, szinte mindig ektopikus, azaz véletlenszerű a beépülés (ARNAU és mtsi. 1991, ARNAU és STROMAN 1993, WADA és mtsi. 1996, YAMAZAKI és

mtsi. 1999, WOLFF és ARNAU 2002, SKORY 2002, 2004, 2005). A cirkuláris plazmidok alkalmazása általában nagy transzformációs gyakoriságot biztosít, bár az így létrehozott törzsek sokszor mitotikusan instabilak és nem szelektív körülmények közt tenyésztve gyorsan elveszítik a plazmidokat (WOLFF és ARNAU 2002; APPEL és mtsi. 2004; ORTIZ-ALVARADO és mtsi. 2006, IBRAHIM és SKORY 2007).

Nagyon alacsony gyakorisággal ugyan, de a transzformáló DNS integrációja a genomba kettős homológ rekombináció kikényszerítésével megoldható. Ebben az esetben a transzformációt olyan lineáris DNS fragmentummal végezzük, mely a bejuttatni kívánt szakasz két végén, a kettős rekombinációt irányító, extenzív (>1000 bp) homológ szakaszokat tartalmaz (IBRAHIM és SKORY 2007). Ilyen, homológ rekombináción alapuló génkicserélődéssel azonban csak néhány esetben sikerült géndeléciót megvalósítani *M. circinelloides*-ben (GUTIÉRREZ és mtsi. 2011, LEE és mtsi. 2013, YUZBASHEV és mtsi. 2015). Az AMT eljárások általában egykópiás integrációt eredményeznek, azonban szintén nem minden esetben sikerült stabil transzformánsokat nyerni ezzel a módszerrel (MONFORT és mtsi. 2003, MICHIELSE és mtsi. 2004). Járomspórás gombákból tehát nem könnyű mitotikusan stabil transzformáns törzseket előállítani. Egyes szerzők ezen organizmusok esetében feltételezik egy, a gazda genomot védő mechanizmus jelenlétét, mely meggátolja az idegen DNS genomba történő integrációját és/vagy fennmaradását (OBRAZTSOVA és mtsi. 2004, IBRAHIM és SKORY 2007). Emellett szól, hogy számos esetben számoltak be a bejuttatott DNS csonkolódásáról, illetve a transzformánsok fenntartása során bekövetkező átrendeződéséről, esetleg teljes eliminációjáról (YANAI és mtsi. 1990, BURMESTER 1992, ARNAU és mtsi. 1991, MACKENZIE és mtsi. 2000, MONFORT és mtsi. 2003). Előfordulhat, hogy a gombákba bejuttatott lineáris fragmentumok újra gyűrűvé záródnak, amelyek epizómálisan, autonóm replikálódó elemekként maradhatnak fenn és esetleg további átrendeződéseken mehetnek keresztül, ami végül ugyancsak a transzformánsok instabilitását eredményezi (SKORY 2002, 2004, 2005, IBRAHIM és SKORY 2007).

A különböző gének funkcionális elemzésére, a génkifejeződés tanulmányozására és módosítására a deléción jól alkalmazható alternatívája az RNS-alapú gécscsökkentés (TORRES-MARTÍNEZ és mtsi. 2012, MEUSSEN és mtsi. 2012). Járomspórás gombákban az RNS-interferencia mechanizmusának feltárása és jellemzése folyamatban van, ennek fő modellorganizmusa épp az általunk is vizsgált *M. circinelloides* f. *lusitanicus* (NICOLÁS és mtsi. 2010, 2015, CALO és mtsi. 2012, CERVANTES és mtsi. 2013). A génfunkció elemzésére az RNS-alapú csengetés különböző módszereit csak a legutóbbi években kezdték alkalmazni, eddig elsősorban *R. oryzae* esetében, humán patogén törzsek virulencia faktorainak vizsgálatára (IBRAHIM és mtsi. 2010) és biotechnológiai jelentőségű törzsek tejsavtermelő képességének módosítására (GHEINANI és mtsi. 2011) használták.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk fő célja, hogy megvizsgáljuk egyes  $\beta$ -karotin-termelő járomspórás gombák biotechnológiai alkalmazásának lehetőségeit és biológiai feltételeit, valamint, hogy későbbi alap- és alkalmazott kutatásokban felhasználható karotin- és xantofilltermelő törzseket és módszereket hozzunk létre, illetve dolgozzunk ki.

Mindez magában foglalja az általános mevalonsav- és a specifikus karotinoid-bioszintézis genetikai hátterének feltárását, megfelelő transzformációs rendszerek és egyéb kísérleti módszerek fejlesztését, valamint új gombatörzsek létrehozását és jellemzését. A távlati cél olyan termelő törzsek létrehozása, melyek a jelenleg ismerteknél nagyobb karotinoidprodukcióra és/vagy új karotinoidszármazékok, elsősorban xantofilok (pl. kantaxantin) termelésére képesek.

Mivel a mevalonsav-úton képződő egyéb metabolitok (pl. ergoszterin, dolikol, prenilált fehérjék) több alapvető biológiai folyamatban is szerepet játszanak, a bioszintetikus útvonal génjeinek jellemzése a biológiai alapkutatások olyan területei számára is új információkkal szolgálhat, mint a gomba morfogenezis, a dimorfizmus, a sejt integritás fenntartása, az opportunistá patogén tulajdonság és a gombaellenes szerek iránti érzékenység, vagy a környezeti változásokhoz való alkalmazkodás kutatása.

A kutatás modellorganizmusának a  $\beta$ -karotin-termelő *M. circinelloides* f. *lusitanicus*-t választottam. Egyrészt mivel egyéb sejt- és molekuláris biológiai kutatásokban hagyományosan használt modellorganizmus és így a molekulárisan legjobban jellemezett járomspórás gombák közé tartozik, másrészt mivel e gomba a molekuláris vizsgálatokban jobban alkalmazható, mint a karotin-bioszintézis kutatásában szintén használt *B. trispora* és *P. blakesleeana*. Emellett, e gombára jellemző a morfológiai dimorfizmus, mely az esetleges fermentációs alkalmazások szempontjából is előnyös lehet, de jó kísérleti hátteret biztosít a terpén-bioszintézis morfogenezisben és a környezeti változásokra adott válaszból betöltött szerepének vizsgálatához.

Mindezeket figyelembe véve, munkánk során a következő konkrét feladatokat kívántuk megvalósítani:

#### 1. Karotinoidtermelő járomspórás gombák törzsgyűjteményének létrehozása és jellemzése.

A törzsgyűjteményben elsősorban olyan járomspórás gombatörzsek elhelyezését és jellemzését terveztük, amelyek a karotintermelés befolyásolását célzó további vizsgálatokban felhasználhatók. A célkitűzés magában foglalja új, természetes karotinoid és lipidszerű metabolitokat termelő gombák (elsősorban a Mucorales és Mortierellales rend tagjainak)

azonosítását, valamint az ilyen anyagokat termelő fajok variabilitásának és filogenetikájának vizsgálatát is, különös tekintettel a Mucoromycotina altörzs eddig kevésbé vizsgált csoportjaira (pl. az olajtermelő gombákat tartalmazó Mortierellales rend). Ez utóbbi feladat elvégzését az is indokolja, hogy az irodalmi áttekintésben említett *B. trispora*, *P. blakesleanus* és *M. circinelloides* modellorganizmusokon kívül, csak nagyon korlátozott ismeretek állnak rendelkezésre más járomspórás gombák termelőképességére vonatkozóan. Ugyanakkor a mikrobiális karotinoidtermelés fejlesztése indokolná, hogy az ilyen irányú vizsgálatokat más, esetleg kedvezőbb tulajdonságú gombatörzsekre is kiterjesszük.

**2. Az általános mevalonsav-út és az izoprén-bioszintézis kulcslépéseit katalizáló enzimek (HMG-KoA-reduktáz, IPP-izomeráz, valamint FPP- és GGPP-szintázok) génjeinek funkcionális jellemzése és a  $\beta$ -karotin-termelés befolyásolása a bioszintézis-útvonal genetikai módosításával járomspórás gombákban.**

E feladat fő célja, hogy megvizsgáljuk, az említett gének, illetve az általuk kódolt enzimek, milyen szerepet játszanak a terpén- és elsősorban a karotinoid-bioszintézisben. Ugyancsak terveink között szerepelt annak elemzése, hogy e gének, melyekről azt tartják, hogy a terpén-bioszintézis sebesség-meghatározó enzimeit kódolják, felhasználhatók-e a karotinoidtermelés javítását célzó további kutatásokban.

**3. A specifikus karotin-bioszintézis módosítása és xantofilok termeltetésének lehetősége *Mucor*-ban.**

A járomspórás gombák karotinoid-bioszintézisének fő terméke a  $\beta$ -karotin. A kutatási program részeként célul tűztük ki a  $\beta$ -karotinból kiinduló, asztaxantinig vezető bioszintetikus út heterológ, bakteriális és gomba eredetű génjeinek kifejeztetését a  $\beta$ -karotin-termelő *M. circinelloides*-ben. A gének bevitelét többféle expressziós rendszerben kívántuk elvégezni, majd az így létrehozott kísérleti rendszerben kívántuk elemezni a termelt karotinoidok és xantofilok összetételét és mennyiségét. Azt reméltük, hogy e kísérletek eredményeként olyan módosított, karotinoidtermelésükben jellemzett *Mucor* törzsparkot sikerül létrehozni, mely alapul szolgálhat a további elméleti és alkalmazott kutatások számára is.

**4. A bioszintézis utak elemzéséhez és módosításához, valamint a génfunkciók vizsgálatához szükséges eljárások – mindenekelőtt a járomspórás gombákra adaptált, hatékony transzformációs rendszerek – kidolgozása.**

A karotinoidtermelésben résztvevő gének funkcionális elemzéséhez és a termelés befolyásolásához szükség van megfelelő genetikai transzformációs rendszerekre. Járomspórás gombák genetikai manipulációját nagymértékben hátráltatja a hatékony integrációt és a mitótikusan stabil transzformánsokat biztosító eljárások hiánya. Ezt figyelembe véve, célul tűztük ki, különböző hatékony – a bevitt DNS integratív és/vagy stabil autoreplikatív fennmaradását lehetővé tevő – eljárások kidolgozását. Olyan módszerek kidolgozására törekedtünk, amelyek nemcsak a modellorganizmusnak választott *M. circinelloides*, hanem más, pl. esetlegesen a karotinoid-bioszintézis kutatásába és fejlesztésébe bevonható (lásd 1. célkitűzés), járomspórás gombák vizsgálata során is felhasználhatók lehetnek.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. A VIZSGÁLATOK SORÁN HASZNÁLT MIKROORGANIZMUSOK

A dolgozatban modellorganizmusként a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* MS12 törzset (SZMC 12082) használtuk. E törzs a CBS 277.49 törzsből képzett *leuA*<sup>-</sup> és *pyrG*<sup>-</sup> mutáns (BENITO és mtsi. 1992), mely leucin és uracil auxotróf, de a karotinoidtermelésre nézve vad típusú. Emellett részletesebben vizsgáltuk a *Backusella lamprospora* SZMC 11061B (NRRL 1422), a *Gilbertella persicaria* SZMC 11089 és a *Rhizomucor miehei* SZMC 11005 (NRRL 5282) törzsét. A *crtR* és *crtS* gének izolálásához a *Xanthophyllomyces dendrorhous* SZMC 9008 (CBS 6938) törzset használtuk. A vizsgálatok során létrehozott járomspórás gombagyűjteményt a **Függelék F1. táblázata** ismerteti. A törzsgyűjteményben elhelyezett törzseket 22% glicerint és 0,01% Tween 80-t tartalmazó védőanyagban eltett spóra szuszpenziók formájában -80 °C-on tároljuk. A klónozási, vektorépítési és génexpressziós kísérletekben XL1-Blue, DH5α és TOP10F<sup>-</sup> *E. coli* törzseket használtunk, melyeket, szükség szerint 50-100 µg/ml ampicillinnel kiegészített, LB tápközegben neveltük. Az *A. tumefaciens*-közvetítette transzformációhoz az AGL1 (LAZO és mtsi. 1991), GV3101 (KONCZ és SCHELL 1986) és GV2260 (MCBRIDE és SUMMERFELT 1990) törzseket használtuk.

### 4.2. A GOMBÁK TENYÉSZTÉSE SORÁN HASZNÁLT FONTOSABB TÁPKÖZEGEK

A legtöbb vizsgálathoz (pl. karotinoid- és ergoszterintartalom méréséhez, DNS- és RNS-kivonáshoz) a gombatörzseket minimál, YNB (*yeast nitrogen base*; 1% glükóz, 0,15% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,15% Na-L-glutaminát, 0,05% YNB; pH 4,5) tápközegben neveltük. Szilárd táptalaj előállításához 2% agart adtunk a tápoldathoz; a tápközeget szükség szerint 0,05% uracillal és/vagy leucinnal egészítettük ki. Egyes vizsgálatokban a glükózt azonos mennyiségű egyéb szénforrásra cseréltük. Komplet tápközegként általában malátás (MEA; *malt extract agar*; 1% glükóz, 0,5% élesztőkivonat, 1% malátakivonat), élesztő-glükóz (YEG; *yeast extract glucose*; 1% glükóz, 0,5% élesztőkivonat), élesztő-pepton-glükóz (YPG; *yeast extract peptone glucose*; 1% glükóz, 1% pepton, 0,5% élesztőkivonat) tápközegeket alkalmaztunk (szilárd táptalaj előállításához 2% agart adtunk a tápoldatokhoz). Egyes vizsgálatokban (pl. a gombatörzsek morfológiai jellemzése) zab- (OA; *oatmeal agar*; Difco, Becton, Dickinson), vagy kukoricaliszt agart (CMA; *cornmeal agar*; 6% kukoricaliszt, 1,5% agar) használtunk.

### 4.3. ÁLTALÁNOS MOLEKULÁRIS TECHNIKÁK

Az olyan alapvető molekuláris eljárásokat, mint a baktérium transzformáció, a plazmid DNS-ek izolálása, a DNS restrikciós emésztése és ligálása, a génklónozás, a plazmid konstrukciók elkészítése, a nukleinsavak elektroforézise és hibridizációja, valamint gélből történő



visszaizolálása, az általánosan használt standard eljárások (SAMBROOK és mtsi. 1989), valamint a felhasznált kitek gyártóinak utasításai alapján végeztük. A genomi DNS tisztítása az ITURRIAGA és mtsi. (1992) által leírt CsCl/bis-benzimid grádiens centrifugálásos módszerrel vagy kereskedelmi forgalomban kapható kitekkel (pl. MasterPure Yeast DNA Purification Kit; Epicentre, vagy DNeasy Plant Mini Kit; Qiagen) történt. Az RNS-tisztítást Northern-hibridizációhoz CHOI és mtsi. (1988) módszerével, vagy TRI-reagenssel (Sigma) végeztük a gyártó utasításainak megfelelően; egyéb esetekben az E.Z.N.A Total RNA Kit II-t (Omega Biotek) használtuk a gyártó utasításait követve. A hibridizációs próbák elkészítéséhez a digoxigenin alapú PCR DIG Probe Synthesis Kitet (Roche) használtuk, a detektálást pedig „CDP-Star” (Roche) kemilumineszcens reagenssel, vagy NBT-BCIP alapú DIG DNA Detection Kittel (Roche) végeztük. A gének izolálásához, plazmid konstrukciók és a hibridizációs próbák elkészítéséhez, vagy a transzformánsok elemzéséhez számos esetben polimeráz láncreakciót alkalmaztunk. A *R. miehei* NRRL 5282 génkönyvtár készítéséhez a Lambda FIX II/*Xho*I Partial Fill-In Vector Kit (Stratagene) és a Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) kiteket használtuk a gyártó utasításai szerint (VASTAG és mtsi. 2004, LUKÁCS és mtsi. 2009). A *M. circinelloides* cDNS expressziós könyvtár elkészítéséhez a cDNA Synthesis Kitet (Stratagene) használtuk. Az így nyert DNS molekulákat, melyek végeiken *Eco*RI és *Xho*I restrikciós hasító helyeket hordoztak, pBluescript II SK plazmidba klónoztuk. A *M. circinelloides* IPP-izomeráz (*ipi*) gén teljes meghatározását a GenomeWalker Universal Kittel (Clontech) végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A plazmidok tervezéséhez és elemzéséhez a Clone Manager programot használtuk (<http://www.scied.com/index.htm>). A vizsgálatok során tervezett, illetve felhasznált plazmidokat az **F2. táblázat**, a PCR kísérletekhez tervezett indítószekvenciákat az **F3. táblázat** tartalmazza. A *M. circinelloides* *carG* gén transzkripció iniciációs helyeit primer extenziós elemzéssel állapítottuk meg BLASCO és mtsi. (2002), valamint VELAYOS és mtsi. (2003) szerint. Ehhez egy 19 tagú, a *carG* +27-45 nukleotidajával komplementer és az 5' végén 6-FAM fluorkrómmal jelölt oligonukleotidot (5' GTC TTC GGT CGA TCT TTCT 3'; Isogen) használtunk.

#### 4.4. A SZEKVENCIÁK ELEMZÉSE

A vizsgálatainkban elemezett DNS szakaszok szekvenálása az MTA Szegedi Biológiai Központban, valamint az LGC Genomics (Berlin, Németország) cégnél történt. A szekvenciák ellenőrzését, páronkénti illesztését Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) és BioEdit (HALL 1999) programokkal végeztük. Az ismert szekvenciákkal való összehasonlításhoz leggyakrabban az NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; ALTSCHUL és mtsi. 1990) szolgáltatásait (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), az izolált gének által kódolt fehérjék szekvenciájának

elemzéséhez a SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*) Expasy portáljának (<http://www.expasy.ch>) szoftvereit használtuk. A molekulatömeg és az izoelektromos pont (pI) meghatározását a ProtParam (GASTEIGER és mtsi. 2005), a transzmembrán domének keresését a HMMTOP (TUSNÁDY és SIMON 2001) és TMPred (HOFMANN és STOFFEL 1993), a fehérjékben található motívumok és domének azonosítását a MyHits Motif Scan (PAGNI és mtsi. 2007) programokkal végeztük.

#### 4.5. A TÖRZSEK AZONOSÍTÁSÁRA ÉS A FILOGENETIKAI ELEMZÉSEKHEZ MEGHATÁROZOTT MARKEREK

A törzsek azonosításához és a filogenetikai elemzésekhez a magi riboszómális DNS egyes szakaszait, azaz az ITS (*internal transcribed spacer*) régiót (mely magában foglalja az ITS1-5,8S rRNS gén-ITS2 szakaszokat), valamint a 18S (SSU) és 28S (LSU) rRNS géneket szekvenáltuk meg. Az ITS, LSU és SSU szakaszok felszaporításához az univerzális ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) és ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC), NS1 (GTA GTC ATA TGC TTG TCT C) és NS4 (CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG), valamint az LR0R (ACC CGC TGA ACT TAA GC) és LR7 (TAC TAC CAC CAA GAT CT) primereket használtuk (WHITE és mtsi. 1990, VILGALYS Mycology Lab). A reakciókörülményeket a standard protokolloknak megfelelően állítottuk be (WHITE és mtsi. 1990). A szekvenciákat a Staden Package PreGap és Gap4 programjaival (STADEN és mtsi. 2000) ellenőriztük és rendeztük össze.

#### 4.6. A FILOGENETIKAI ELEMZÉSEK SORÁN HASZNÁLT MÓDSZEREK

A szekvenciák illesztésére a ClustalW, ClustalX (THOMPSON és mtsi. 2002), Muscle (EDGAR 2004), Probcons (DO és mtsi. 2005), Probalign (ROSHAN és LIVESAY 2006) és PRANK (LÖYTYNOJA és GOLDMAN 2008), a rosszul illeszthető pozíciók kizárására a GBLOCKS 0.91b (TALAVERA és CASTRESANA 2007) programokat használtuk. Az inszerciók-deléciók (*indelek*) kódolását az ITS illesztésekben a FastGap 1.21 indel kódoló algoritmusával (BORCHSENIUS 2007), az egyes illesztésekre a szubsztitúciós modellek tesztelését a jModeltest szoftver (POSADA 2008) segítségével végeztük. Az egygénese illesztésekből becsült fák kongruenciájának megállapításához a CONSEL 0.1 programot használtuk (SHIMODAIRA és HASEWAGA 2001). A Maximum Likelihood (ML), ML bootstrap (MLBS), Maximum Parsimónia bootstrap (MPBS), Bayes-féle MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) analíziseket a RaxML 7.0.3 (STAMATAKIS 2006), PAUP 4.0b10 (SWOFFORD 2003), MrBayes 3.1.2 (HUELSENBECK és RONQUIST 2001) és BayesPhylogenies 1.0 (PAGEL és MEADE 2006) programokkal végeztük. Az 50%-os többségi szabály konszenzus filogramokat általában a PHYLIP programcsomag CONSENSE programjával (FELSENSTEIN 2004) hoztuk létre.

#### 4.7. MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK

A fény- és fluoreszcens mikroszkópos megfigyelésekhez egy AxioCam ERc 5s kamerával felszerelt AxioLab (Carl Zeiss) fluoreszcens mikroszkópot használtunk, a felvételek készítését és kiértékelését a ZEN 2011 szoftver (Carl Zeiss) segítségével végeztük. Propídium-jodid festés esetén BP 546/12 nm excitációs és LP 590 nm emissziós szűrőket (*filter set* 15; Carl Zeiss), míg Annexin V-FITC festés során BP 450-490 nm excitációs és LP 515 emissziós szűrőket (*filter set* 9; Carl Zeiss) használtunk. A *B. lamrospora* transzformánsokban, a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) kifejeződését 2X KP 490 és B427g excitációs, G-247 határoló szűrővel és 510 nm-es dikroikus tükörrel felszerelt Zeiss Jenalumar fluoreszcens mikroszkóppal végeztük (NYILASI és mtsi. 2008).

#### 4.8. VALÓS IDEJŰ KVANTITATÍV PCR

A genetikai transzformációval bejuttatott plazmidok és gének kópiaszámát, valamint a vizsgált gének transzkripcióját valós idejű kvantitatív PCR (qPCR), illetve valós idejű kvantitatív reverz transzkripció PCR (qRT-PCR) segítségével elemeztük CSERNETICS és mtsi. (2011), PAPP és mtsi. (2013) és NAGY és mtsi. (2014) szerint. A reakciókhoz a DNS-, illetve RNS-kivonásokat monosporangialis telepekből végeztük. A relatív transzkriptumszintek vizsgálatához a reverz transzkripciót Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-tel (Thermo Scientific) végeztük, random hexamer és oligo(dT)18 primerek alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. A kísérletekhez az iQ5 és a CFX96 valós idejű PCR rendszereket (Bio-Rad) használtuk, iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) vagy Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) alkalmazásával. A kapott eredményeket a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  módszer segítségével értékeltük ki (LIVAK és SCHMITTGEN 2001); referenciagénként az aktin gént (*actA*, *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genom adatbázis, scaffold\_07:2052804-2054242) használtuk, kivéve a bakteriális *crtW* gén kópiaszámának meghatározása esetében, ahol a *Mucor carG* és *isoA* génekhez viszonyítottunk (CSERNETICS és mtsi. 2011, PAPP és mtsi. 2013). A primerek (F3. táblázat) megtervezése után minden esetben teszteltük az amplifikálás körülményeit. Csak olyan primereket és körülményeket alkalmaztunk, melyekkel a vizsgált PCR termékek egyazon ciklusidő (Ct) értéknél jelentek meg, valamint az olvadási görbe (*melting curve*) analízis alapján reakciónként egy-egy specifikus terméket detektáltunk. A kísérleteket minden esetben legalább három biológiai és technikai ismétlésben végeztük.

#### 4.9. PEG-KÖZVETÍTETTE PROTOPLASZT-TRANSZFORMÁCIÓ

A protoplasztokat ITURRIAGA és mtsi. (1992) szerint, csírázó sporangiospórákból, vagy NAGY és mtsi (1994) szerint, YNB vagy YEG táptalajra helyezett celofánon nevelt fiatal tenyészetekből nyertük. Fajtól függően, a csírázó spórákat, illetve a képződött telepeket 2-3 órán

át, szobahőmérsékleten, megfelelő ozmotikus közegben oldott sejtfaloldó enzimekkel – pl. *Helix pomatia* gyomornedv kivonat, Novozyme<sub>234</sub>, (Novo Nordisk), *Trichoderma Lysing enzyme* (Sigma), vagy Streptozyme (*Streptomyces Lysing enzyme*) – kezeltük. *M. circinelloides* esetében a protoplasztáló oldat 10 mM nátrium-foszfát puffert (pH 6,4), 0,8 M szorbitot és 1,5% *Helix pomatia* gyomornedv kivonatot (CSERNETICS és mtsi. 2015), vagy 1,5 mg/ml Novozyme<sub>234</sub>-et és 4-12 U/ml Streptozyme-ot (PAPP és mtsi. 2006) tartalmazott. A genetikai transzformációhoz VAN HEESWIJCK és RONCERO (1984) módszerét adaptáltuk. A legtöbb kísérletben szelekciós markerként a *M. circinelloides* MS12 törzs uracil vagy leucin auxotrófiájának komplementálását lehetővé tevő orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxiláz (*pyrG*), illetve  $\alpha$ -izopropilmalát-izomeráz (*leuA*) géneket alkalmaztuk. Ilyenkor szelekciós táptalajként 0,8 M szorbittal és szükség szerint leucinnal vagy uracillal kiegészített YNB táptalajt (pH 3,2) használtunk. Amikor acetamidáz (*amdS*) génre alapozott direkt szelekciót alkalmaztunk, a transzformált protoplasztokat acetamid táptalajon (0,8 M szorbit, 2% glükóz, 0,05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM acetamid, 2 mM uridin, 1,5% agar) inkubáltuk.

#### 4.10. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS-KÖZVETÍTETTE TRANSZFORMÁCIÓ (AMT)

Az AMT eljárásához a saját vizsgálataink során kidolgozott protokollt alkalmaztuk (PAPP és mtsi. 2012). Az *A. tumefaciens* törzseket 100 µg/ml rifampicinnel, továbbá *helper* plazmidtól függően, 25 µg/ml gentamicinnel vagy 50 µg/ml ampicillinnel kiegészített LB tápközegben tenyésztettük. A baktériumok bináris vektorral történő transzformációját elektroporálással (400 Ω, 25 µF, 2,5 kV) végeztük. A transzformált telepek szelekciójához 50 µg/ml kanamycinnel egészítettük ki az előbbi tápközeget. A baktérium és gomba együtt tenyésztéshez indukciós tápközeget (IM) használtunk, melyben acetosziringon biztosította a *vir* gének indukcióját. Az IM tápoldat összetétele a következő volt: 1× MM sóoldat, 10 mM glükóz, 0,5% glicerin, 40 mM 2-(N-morfolin)-etánszulfonsav, 200 µM acetosziringon; a szilárd IM táptalaj ettől annyiban tért el, hogy 5 mM glükózt és 1,5% agart tartalmazott. (A 2,5× MM törzsoldat összetétele: 26,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 29,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,4 mM NaCl, 5,1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,1 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 22,3 µM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 9,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.) Az együtt tenyésztést követően a baktérium és gomba sejteket szelekciós táptalajra vittük át. Szelekciós táptalajként, a baktérium sejtek elpusztításához 300 µg/ml cefotaximot tartalmazó YNB-t használtunk, melyet a szelekció típusától függően 500 µg/ml leucinnal vagy 100 µg/ml higromicin B-vel egészítettünk ki.

#### 4.11. A TRANSZFORMÁNSOK ELEMZÉSE

A transzformánsok mitotikus stabilitását a NYILASI és mtsi. (2005), CSERNETICS és mtsi. (2011), valamint PAPP és mtsi. (2013) által leírtaknak megfelelően vizsgáltuk. A gének bevitelét

és az esetleges integrációt specifikus primerekkel végzett PCR-reakciókkal, illetve DNS hibridizációval (SAMBROOK és mtsi. 1989) bizonyítottuk. A bevitt DNS kópiaszámát és a kifejeztetett gének transzkripció szintjét qPCR, illetve qRT-PCR analízissel elemeztük. Inverz PCR (IPCR) technikát (OCHMAN és mtsi. 1988) alkalmaztunk a bejuttatott DNS gazda genomba történt integrációja helyének meghatározásához a PAPP és mtsi. (2013) által leírtak szerint.

#### 4.12. A KAROTINOID- ÉS ERGOSZTERINTARTALOM ELEMZÉSE

A karotinoidkivonást és a karotinoidminták vékonyréteg kromatográfiás elemzését PAPP és mtsi. (2006) szerint végeztük. Az összkarotinoidtartalom fotometriás meghatározásához a bepárolt karotinmintákat petroléterbe oldottuk és az abszorbanciát 450 nm-nél detektáltuk; a koncentrációk kiszámításához a  $A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2,500$  átlagos extinkciós koefficienszt használtuk (RODRIGUEZ-AMAYA 2001). A karotinoidminták részletes vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC; *high performance liquid chromatography*) történt, CSERNETICS és mtsi. (2011) szerint, egy UV/VIS detektorral felszerelt HPLC kromatográf (Shimadzu) használatával. A bepárolt mintákat 150 µl tetrahidrofuránban oldottuk fel közvetlenül az analízis előtt, a mintákból 3 µl-t injektáltunk az analízishez. Az elválasztás Prodigy C-18 (4,6 × 250, ODS 3 µm) oszlopon (Phenomenex) történt. Mobil fázisként kétféle oldószerkeverék (Solvent A: 4% víz - 96% metanol és Solvent B: 4% víz - 96% metil-terc-butiléter) gradiensét használtuk, ahol perc/Solvent A/ Solvent B = 0/99/1; 8/60/40; 13/46/54; 15/0/100; 18/0/100; 21/99/1; 25/99/1 volt, 1 ml/perc áramlási sebesség mellett. A detektálási hullámhossz 450 nm volt. Egyes esetekben más HPLC módszert is alkalmaztunk (PAPP és mtsi. 2006). A pigmentek azonosításához asztaxantin, β-karotin, likopin (Sigma), γ-karotin, β-kriptoxantin, zeaxantin, kantaxantin (Carl Roth) és echinenon (DHI Water and Environment) gyári standardokat használtunk.

Az ergoszterinkivonáshoz ALCAZAR-FUOLI és mtsi. (2008) által leírt módszert használtuk. Az ergoszterintartalom meghatározását HPLC analízissel végeztük, melyhez a már említett Shimadzu rendszert használtuk (NAGY és mtsi. 2014). A bepárolt mintákat 1 ml metanolba oldottuk, melyből 50 µl-t injektáltunk egy Prodigy C18 (4,6 × 250 mm, ODS 5 µm) oszlopra (Phenomenex). Izokratikus elválasztást végeztünk H<sub>2</sub>O/metanol (2:98 v/v) mozgófázis alkalmazásával és 1.2 ml/min áramlási sebességgel. A detektálás hullámhossza 210 és 280 nm volt. Az ergoszterin azonosításához gyári standardot (Sigma) használtunk.

#### 4.13. STATISZTIKAI MÓDSZEREK

Az adatok kiértékelését, az átlagok és szórások, valamint a különbségek szignifikanciájának kiszámítását Microsoft Office Excel programja segítségével végeztük. A szignifikancia megállapításához páros vagy kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 5.1. KAROTINOIDTERMELŐ GOMBÁK TÖRZSGYŰJTEMÉNYÉNEK LÉTREHOZÁSA ÉS JELLEMZÉSE

A járomspórás gombák közül a modellorganizmusként használt *B. trisporá*-n, *M. circinelloides*-en és *P. blakesleeanus*-on kívül jobbra csak néhány *Mucor* faj, a *M. (Amylomyces) rouxii* (MOSQUEDA-CANO és GUTIERREZ-CORONA 1995), *M. azygosporus*, *M. inaequisporus* (VAN EIJK 1972), *M. racemosus* (SZCZESNA-ANTCZAK és mtsi. 2006), *M. hiemalis* (VALADON 1976) és *M. strictus* (DEXTER és COOKE 1984), esetében vizsgálták a karotinoidtermelést. Ráadásul, e vizsgálatokban jobbra csupán az összkarotinoid-mennyiséget határozták meg bizonyos tenyésztési feltételek mellett, de a karotinoid-összetételt kevés kivételtől eltekintve nem vizsgálták. Ugyanakkor a telepszín és előzetes vizsgálatok alapján a gombacsoport számos kiváló termelő fajt tartalmazhat. Hogy képet kapjunk a karotinoidtermelő járomspórás gombák diverzitásáról és megfelelő mennyiségű törzzsel rendelkezünk a későbbi, a jelenlegieknél jobb karotinoidforrások felkutatását és kifejlesztését célzó kutatások számára, fontos célkitűzésünk volt egy megfelelően reprezentatív törzsgyűjtemény létrehozása és jellemzése. Elsődlegesen a Mucoromycotina *incertae sedis* altörzsbe (WHITE és mtsi. 2006, HIBBETT és mtsi. 2007), illetve azon belül is a Mortierellales és a Mucorales rendbe tartozó, „klasszikus” járomspórás gombák képviselőire koncentráltunk. A gyűjtemény alapját a Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményben (SZMC; <http://szmc.hu>) korábban elhelyezett, nagyszámú, a Mucorales rendbe tartozó gomba képezte. Ezt az állományt bővítettük részint saját izolálásokkal, részint más gyűjteményekből történt beszerzések útján. A gyűjteményben elhelyezett törzseket az **F1. táblázat** sorolja fel. Az elhelyezett törzsek azonosítása és jellemzése érdekében, amennyiben szükséges volt, genetikai markereket határoztunk meg. Erre a célra elsősorban a magi riboszómális DNS egyes szakaszait, azaz az ITS, valamint az SSU és LSU rRNS géneket határoztuk meg. Mivel nagyszámú járomspórás gombából, köztük típustörzsekből is, azonosítottuk az említett szekvenciákat, lehetőségünk volt bekapcsolódni a nemzetközi *Fungal Barcoding Consortium* (<http://www.fungalbarcoding.org/>) munkájába, melynek az volt a célja, hogy a gombák azonosítására általánosan alkalmas referencia- (*barcoding*) szekvenciákat azonosítson, illetve javasoljon. Az ilyen célra használható szekvenciák tipikusan 500-700 bp hosszúak, egyetlen PCR segítségével felszaporíthatók és konzervált régiók határolják, ami lehetővé teszi univerzális primerek alkalmazását. A referenciaszekvenciák megfelelően dokumentált és egyértelműen azonosított referenciamintákból kell, hogy származzanak. A szekvenciák mellé a szekvencia-kromatogramokat is mellékelni kell. A konzorcium végül a magi riboszómális ITS régiót javasolta univerzális DNS vonalkód (*barcode*) markernek gombák azonosítására (SCHOCH és mtsi. 2012, 2014).



### 5.1.1. A Mortierellaceae család filogenetikai vizsgálata (Nagy és mtsi. 2011, 2012b, Petkovits és mtsi. 2011, Wagner és mtsi. 2013)

A 445 törzset magába foglaló gyűjteményben mintegy 130, a Mortierellales rendbe tartozó törzset helyeztünk el, melyek közt a rend szinte összes fajának típustörzse megtalálható (**F1. és F4. táblázatok**). Ez a jelentős algyűjtemény lehetőséget biztosított a csoport filogenetikai viszonyainak alaposabb elemzésére. A Mortierellales rend a Mucoromycotina egyik jellegzetes és a Mucorales rend után második legnagyobb csoportja. Tipikus szaprotróf szervezetek tartoznak ide, talajban, bomló szerves anyagokon fordulnak elő. Jellegzetes lipid-, illetve olajtermelő gombák, melyek a karotinoidok mellett hosszú szénláncú (>18 C atom), többszörösen telítetlen zsírsavakat (pl. az értékes arachidonsavat) termelnek. Egyes képviselőik, pl. a *Mortierella alpina* telítetlen zsírsavtermelő képességét kutatják, illetve alkalmazzák (HIGASHIYAMA és mtsi. 2002, RATLEDGE 2004, OGAWA és mtsi. 2014, ASADI és mtsi. 2015), más fajoknak elsősorban szerves vegyületek biotranszformáló ágenseiként van biotechnológiai jelentősége (HOLLAND 2001, TRYTEK és FIEDUREK 2005). A *Mortierella* nemzetségbe tartozó gombák apatogének, egyetlen fajt, az opportunista patogén *M. wolffii*-t kivéve, mely háziállatokban okozhat ritkán vetélést, tüdőgyulladást és szisztémás fertőzéseket, elsősorban szennyezett takarmány fogyasztása következtében (RIBES és mtsi. 2000, SCHIPPER és STALPERS 2002, PAPP és mtsi. 2011). E gomba termofil tulajdonságával eltér a csoport többi tagjától.

A Mortierellales rend filogenetikai viszonyainak vizsgálatát az indokolta, hogy annak ellenére, hogy lipidtermelésük miatt nagy biotechnológiai potenciállal rendelkező organizmusoknak tartják őket, a csoport filogenetikája, a jobban jellemzett Mucorales rendével szemben, teljesen feltáratlan, taxonómiája pedig meglepően ellentmondásos volt. Utóbbi ugyanis szinte kizárólag az ivartalan szaporító képletek morfológiáján alapult (DEGAWA és TOKUMASU 1997), ami nagymértékben mesterséges rendszert eredményezett. Ez az elhanyagolt állapot pedig jelentősen akadályozta a törzsek megfelelő azonosítását, jellemzését, valamint elméleti és gyakorlati célú kutatását is.

A csoportba tartozó gombákat eredetileg a Mucorales rend egyik családjába (Mortierellaceae) sorolták, külön rendbe helyezésüket CAVALIER-SMITH (1998) javasolta, aminek indokolt voltát a későbbi molekuláris filogenetikai vizsgálatok is alátámasztották (O'DONNELL és mtsi. 2001, VOIGT és WÖSTEMEYER 2001, JAMES és mtsi. 2006). Ugyanakkor ezek a tanulmányok csak a Mortierellales és a Mucorales egymáshoz fűződő viszonyát vizsgálták, elsősorban transzlációs elongációs faktor 1-alfa, aktin, illetve magi riboszómális gének (ITS, SSU, LSU) szekvenciái alapján, de nem foglalkoztak a Mortierellales renden belüli kapcsolatokkal. Ráadásul a rend helyzete továbbra is ellentmondásos maradt: egyes szerzők a Mucoromycotina altörzsbe helyezik (HIBBETT és mtsi. 2007), míg mások, Mortierellomycotina néven, külön altörzs szintre

emelését javasolják (HOFFMANN és mtsi. 2011). Jelenleg a Mortierellales rend egyetlen családot tartalmaz (Mortierellaceae), amelyet hat nemzetség, a mintegy száz fajt magába foglaló *Mortierella*, a mindössze két-két fajt tartalmazó *Dissophora* és *Modicella*, valamint a monotipikus *Aquamortierella*, *Gamsiella* és *Lobosporangium* alkot (WHITE és mtsi. 2006, BENNY 2009). A filogenetikai vizsgálatba a rend összes nemzetségét bevontuk, kivéve az *Aquamortierella*-t és a *Modicella*-t, melyekből nem sikerült izolátumot beszerezni. Megjegyzendő, hogy e fajokat más szerzők is nem tenyésztethető gombákként írták le (WHITE és mtsi. 2006). Ennek megfelelően a vizsgálatokat 79 *Mortierella* (65 taxon), 1 *Gamsiella* (1 faj), 4 *Dissophora* (2 faj) és 1 *Lobosporangium* (1 faj) izolátummal végeztük; kulcsoportként a Mucorales testvércsoportjának tartott Umbelopsidaceae 4 (*Micromucor*, *Umbelopsis*) képviselőjét, valamint a Mucorales rendbe tartozó *Rhizopus oryzae* NRRL 28631 törzsét vontuk be. Az izolátumokat úgy válogattuk össze, hogy a vizsgálatba lehetőleg csak típus-, illetve referenciatörzsek kerüljenek. Az izolátumok DNS-éből felszaporítottuk és meghatároztuk az ITS1-5,8S rRNS-ITS2 szakaszokat magában foglaló ITS régiót, valamint az SSU és LSU géneket (a szekvenciák GenBank azonosítóit az **F4. táblázat** tartalmazza). A szekvenciákból három illesztést készítettünk. A nem átfedő szakaszok kizárása után az ITS, SSU és LSU illesztések hossza 1362, 1018 és 1504 bp volt, melyből 470, 218 és 398 karakter bizonyult parszimónia-informatívnak. Az ITS szekvenciák illesztésében található hézagokat (indelek) külön lekódoltuk egy bináris mátrix formájában, ez a bináris partíció 553 karaktert tartalmazott, melyből 349 bizonyult parszimónia-informatívnak. Mindhárom illesztés esetén a GTR+ $\Gamma$  modellt (GUINDON és GASCUEL 2003) választottuk.

Az elemzés során vizsgáltuk a különböző riboszómális régiók alkalmazhatóságát a család, illetve rendszintű filogenetika becslésében. Ennek során a riboszómális RNS-kódoló régióra 15 alternatív particionálási stratégiát hasonlítottunk össze. Az elemzés a riboszómális gének evolúciós mintázatainak az általánosan elfogadottnál nagyobb komplexitását jelezte. Az ITS1, 5,8S és az ITS2 lókuszok, valamint az indel mátrix külön partícióként való kezelése jelentősen javította a modell alkalmazhatóságát, szemben azzal, mintha egy partícióként kezeltük volna őket. Az SSU és LSU gének és az ITS régiók elemzése azt sugallta, hogy e lókuszok nemcsak külön evolválódtak, de a lókuszokon belül is jelentős heterogenitás figyelhető meg (PETKOVITS és mtsi. 2011). Gombák és növények esetében az ITS régió elemzésének alapvető szerepe van a filogenetikai vizsgálatokban, a molekuláris ökológiában, illetve a faj és törzs azonosítás és kimutatás területén. Ennek ellenére alkalmazását gyakran éri kritika, elsősorban az inszerciók-deleciók okozta szekvenciaillesztési problémák és a fajnál magasabb rendszertani szinteken, a filogenetikai feloldóképesség hiánya miatt. A nagyszámú Mucoromycotina ITS szekvencia meghatározása lehetőséget biztosított arra, hogy egy átfogó mintán vizsgáljuk, vajon az indelek bevonása az elemzésekbe milyen hatással van az ITS illesztések használhatóságára. Elvégeztünk



egy 115 ITS adatsort tartalmazó elemzést, melybe bevontuk a Mortierellales és Mucorales izolátumok ITS-einek illesztését is. Különböző stratégiákat elemezve azt találtuk, hogy mindkét probléma kiküszöbölhető a homológiák pontos illesztésével és az indeleknek a filogenetikai elemzésbe vonásával, mely szignifikánsan javította az eredményeket és növelte a feloldóképességet a törzsfák korai elágazásai mentén (NAGY és mtsi. 2012b).

Mivel az egyénes illesztések és az azokból becsült ML fák összehasonlítása kongruens eredményekre vezetett, az összes adatsort összefűztük és ezt a szupermátrixot használtuk a további elemzésekben. Az egyesített adatsor és az elemzés eredménye elérhető a nyilvános TreeBase adatbázisban ([www.treebase.org](http://www.treebase.org); azonosító: S11367). Az adatsorral Bayes MCMC, MLBS, és MPBS elemzéseket végeztünk. A Bayes-féle analízist 3 ismétlésben futtattuk  $2 \times 10^7$  generáción keresztül. A stacionárius fázis elérése után mintázott  $2 \times 10^5$  fából, az 50% többségi szabály módszerrel számolt konszenzus törzsfát az **5. ábra** mutatja. A törzsfán két nagy kládot lehet megkülönböztetni. Amint az várható volt, a külcsoporthként bevont *Umbelopsis* klád, mely a *Micromucor* törzseket is magában foglalja, a Mucorales rendbe tartozó *R. oryzae*-vel és a *Mortierella longicollis*-szal alkotott testvércsoportot (**5. ábra**).

Az Umbelopsidaceae család tagjait eredetileg a Mortierellales rendbe sorolták (GAMS 1977), de a későbbi molekuláris filogenetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a csoport a Mucorales bazális testvércsoportja (VOIGT és WÖSTEMEYER 2001, MEYER és GAMS 2003, WHITE és mtsi. 2006). A *M. longicollis*-t egyes szerzők ITS RFLP vizsgálatok alapján ugyancsak az Umbelopsidaceae családba helyezik (MEYER és GAMS 2003), elemzésünk azonban azt sugallja, hogy inkább a Mucorales rend Umbelopsidaceae-n kívüli csoportjaival áll rokonságban.

A Mortierellales/Mortierellaceae csoport egyetlen, nagy monofiletikus kládot alkot. Ugyanakkor az azon belül feltárt filogenetikai viszonyok nem tükrözik a korábbi morfológiai alapú rendszerezést, melynek során több szerző a *Mortierella* nemzetségen belül alnemzetségeket és szekciókat különböztetett meg (**5. ábra**) (LINNEMANN 1941, ZYCHA és mtsi. 1969, GAMS 1977). Ráadásul a *Dissophora*, *Gamsiella* és *Lobosporangium* nemzetségeket reprezentáló törzsek jelentős támogatottsággal a *Mortierella* nemzetségen belül helyezkednek el, ami az utóbbi csoport parafiletikus jellegét mutatja. A nagy *Mortierella* kládon belül 12 alkládot lehetett megkülönböztetni, amelyeket egy-egy reprezentatív, jól ismert képviselőjükről neveztünk el (**5. ábra**).



5. ábra. A 89 Mortierellales rendbe tartozó gombatörzs magi riboszómális DNS szekvenciái alapján készült filigram.

Az 50% többségi szabály konszenzus törzsfa a BayesPhylogenies 1.0 programmal készült (PAGEL és MEADE 2006). Az ágak fölötti számok a MPBS, MLBS és a Bayes-féle poszterior valószínűség (BPP) értékeket mutatják. A nem vagy gyengén támogatott elágazásokat (MPBS, MLBS: <50% BPP: <0,5) „-” jelzi. Az egyes taxonok mellett látható szimbólumokkal az egyes szerzők (LINNEMANN 1941, ZYCHA és mtsi. 1969, GAMS 1977) által morfológiai alapon kijelölt alnemzetségeket és szekciókat tüntettük fel.

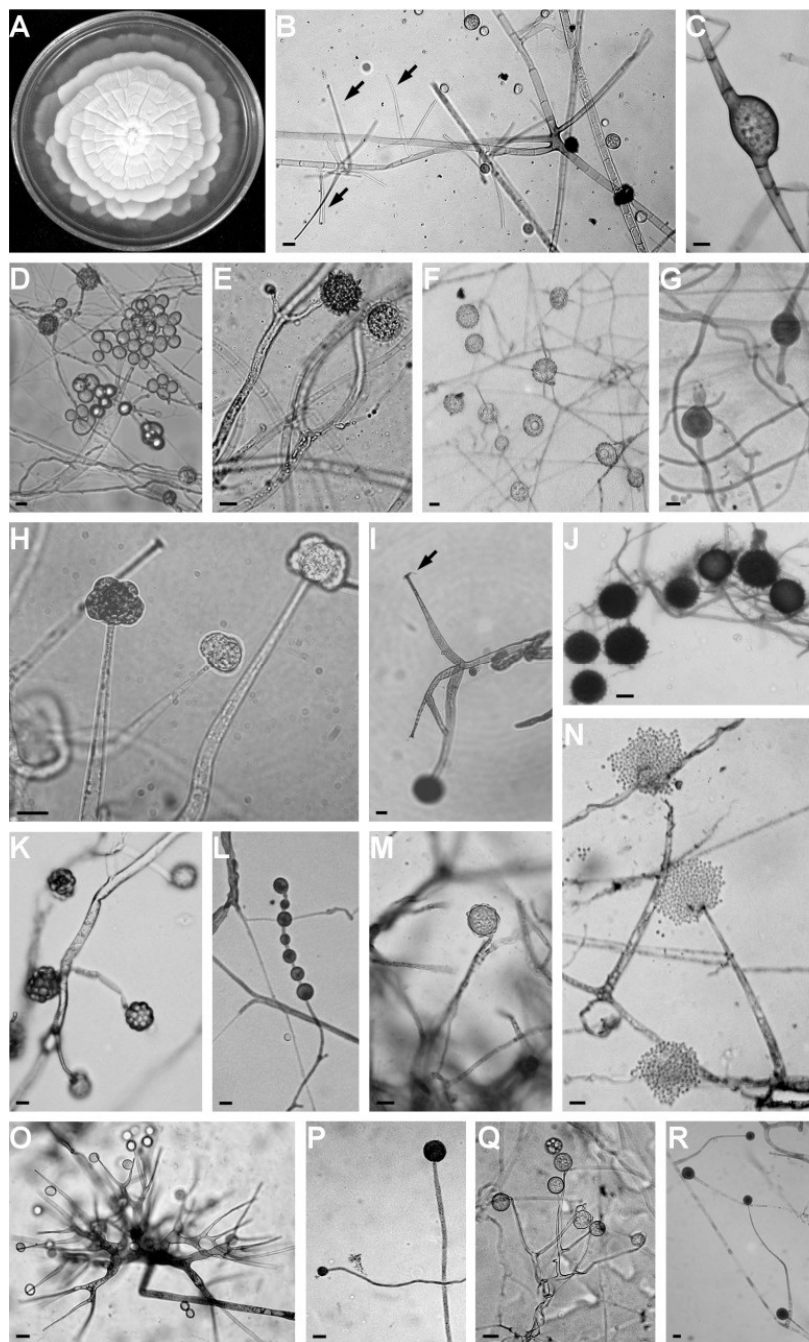
A Mortierellaceae család típusfaja, a *M. polycephala*, valamint a *M. polygonia* és a *M. indohii* fajokat korábban különböző szekciókba sorolták (GAMS 1977), míg a mi elemzésünk alapján közeli rokonoknak bizonyultak (**polycephala** klád). A *M. polycephala* és a *M. indohii* kapcsolatát korábban már felvetették a mindkét fajra jellemző, végálló, „tüskés” felszínű klamidospórák, az ún. sztilospórák jelenléte alapján (CHIEN és mtsi. 1974). Vizsgálataink során hasonló sztilospórákat találtunk a *M. polygonia* esetében is (**6/F ábra**). A törzsfán a legfajgazdagabb csoport a **gamsii** klád. A zsírsavtermelés szempontjából legígéretesebb gombákat ez, és az **alpina** klád tartalmazza; utóbbi főleg hidegtűrő fajokat foglal magába. Az **angusta** és **mutabilis** kládok a *Dissophora*, illetve *Gamsiella* nemzetségek tagjait is magukba foglalják. A *G. multidivariata* külön nemzetségbe sorolását a *Mortierella* nemzetség tagjaitól eltérő kétágú sporangiofórjaival és kétszörös sporangiumaival (**6/O ábra**) indokolták (BENNY és BLACKWELL 2004). Ugyanakkor a *M. mutabilis*-t a *Mortierella* nemzetség *Mutabilis* szekciójába sorolták és hosszú nem elágazó, vagy szimpodiálisan elágazó sporangiofórokkal jellemezték (LINNEMANN 1941, ZYCHA és mtsi. 1969). A *M. mutabilis* MEA táptalajon valóban ezt a morfológiát mutatja (**6/P ábra**), azonban bizonyos tápközegek (pl. OA) alkalmazása esetén sporangiofórjai és sporangiumai a *G. multidivariata*-ra jellemző szerveződést mutatnak (**6/Q ábra**).

Érdemes megemlíteni, hogy a sporangiofórok, sporangiumok és klamidospórák megléte vagy hiánya, továbbá alakja nagymértékben függött a használt tápközegtől és tenyésztési körülményektől (**6/F,G,P,Q ábra**). Ráadásul e jellegek tekintetében jelentős különbségeket találtunk a molekuláris módszerekkel közeli rokonságban állónak mutatkozó fajok közt és nagyfokú homopláziát detektáltunk a törzsfán, ami azt sugallja, hogy e fenotipikus karakterek nagy rátákkal evolválódtak a Mortierellales csoportban.

A törzsfá alapján több taxon egy fajba történő összevonása is javasolható. Ilyen az említett *G. multidivariata* és *M. mutabilis*, vagy a *M. verticillata* és a *M. humilis*. Az utóbbi két faj esetében korábban igazolták, hogy izolátumaik egymással ivaros szaporodásra képesek (CHIEN és mtsi. 1974), ennek ellenére külön fajként való megkülönböztetésüket a sporangiospórák elektronmikroszkóppal megfigyelt eltérő mintázataira hivatkozva fenntartották. Véleményünk szerint a molekuláris markerek szignifikáns azonossága és az ivaros szaporodásra való képesség elegendő érv a két faj összevonására.

Később egy nemzetközi együttműködés keretében, ugyancsak a három riboszómális DNS szakaszra alapozva, de egy nagyobb, 421 izolátumot magába foglaló adatsorral, mely a típustörzsek mellett nagyszámú egyedi izolátumot tartalmazott, lényegében nagyon hasonló eredményeket és nagymértékben kongruens törzsfát kaptunk (az adatsorok és a törzsfá TreeBase2 azonosítója: S13827; <http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S13827>). Ezeket kiegészítettünk az egyes kládok

részletes morfológiai leírásával és javaslatot tettünk a Mortierellaceae család taxonómiai revíziójára (WAGNER és mtsi. 2013).

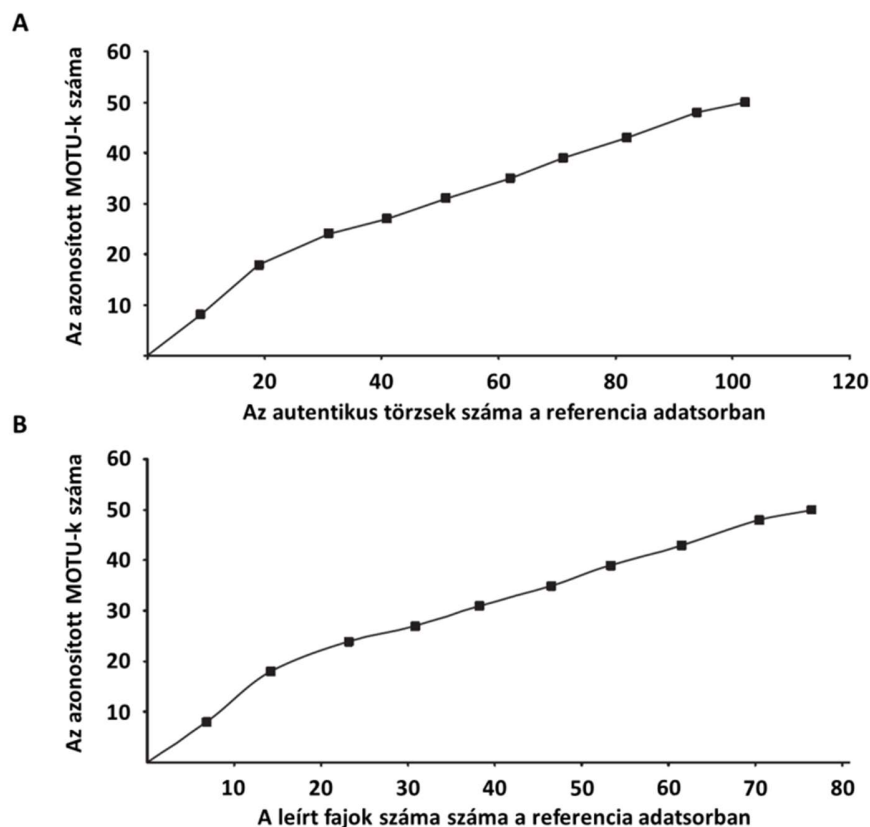


**6. ábra. A Mortierellales rendbe tartozó, egyes reprezentatív fajok makro- és mikromorfológiája.**

Jellegzetes lebenyezett telepmorfológia, *M. capitata* MEA táptalajon (A). A *M. verticillata* mikromorfológiája, a nyilak a sporangiofórokat jelzik (B). A *M. gemmifera* klamidospórája (C). A *M. polycephala* sporangiumai (D) és sztilospórái (E). A *M. polygonia* MEA táptalajon képződő sztilospórái (F) és OA táptalajon fejlődött klamidospórái (G). A *M. amoeboides* sporangiumai (H). A *M. biramosa* sporangiumtartói; a nyíl a spórák kiszabadulása után maradó gallért mutatja (I). A *M. indohii* sztilospórái (J). A *Dissophora decumbens* sporangiumai (K). A *D. ornata* klamidospórái (L) és sporangiuma (M). A *M. turficola* sporangiumai a spórák kiszabadulása után (N). A *G. multidivariata* elágazó sporangiofórai és sporangiumai (O). A *M. mutabilis* MEA táptalajon (P) és OA táptalajon képződő sporangiumai (Q). A *M. exigua* sporangiumai (R). A méretskála minden képen 10 µm.

Mivel nagyszámú típus-, illetve referenciatörzs esetében meghatároztuk a riboszómális RNS-kódoló régió szekvenciáit, ez lehetőséget biztosított egy nagyobb léptékű elemzéshez, melybe az általunk meghatározott szekvenciákon kívül bevontuk a nyilvános adatbázisokban (NCBI GenBank) fellelhető összes *Mortierella* ITS szekvenciát és így egy közel 900 szekvenciát magába foglaló adatsorral dolgoztunk. E nagy referencia-adatsorral végzett elemzés eredményeként kapott ML törzsfa (az adatsor és törzsfa TreeBase azonosítója: 11260) információkkal szolgált a különböző fajok gyakoriságára és földrajzi elterjedtségére vonatkozóan. Az elemzésből általánosabb érvényű megállapításokat is le tudunk vonni, elsősorban a különböző leírt és még le nem írt gombafajok számának becslésére vonatkozóan (NAGY és mtsi. 2011). Ez a téma a metagenomikai és a nagy hatékonyságú szekvenálási technikák elterjedésével a környezeti mintákból nyert szekvenciaadatok interpretálása kapcsán került az érdeklődés homlokterébe (HIBBETT és mtsi. 2009, 2011). Az elemzés során azt vizsgáltuk, hogy a még nem azonosított molekuláris taxonómiai kezelendő egységek (*molecular operational taxonomic unit*, MOTU) mekkora részét írták le már, annak ellenére, hogy szekvenciaadat nem volt korábban elérhető róluk, illetve hogy ezen azonosítatlan MOTU-k mekkora aránya reprezentál valóban még le nem írt fajokat. A kérdés megválaszolásához modelleztük a típustörzsekre vonatkozó szekvenciaismeretek növekedését és a szekvenciaadatok alapján azonosítható MOTU-k számát. Ehhez az elemzéshez a kozmopolita *Mortierella* nemzetség, mely az egyik, talajból leggyakrabban izolálható szervezet (KWASNA és mtsi. 2006), kiváló eszköznek bizonyult.

Az elemzés során a szekvenciákat MOTU-kba rendeztük a páronkénti ML genetikai távolságok agglomeratív osztályozásával. A páronkénti összehasonlítást a HKY evolúciós modell alkalmazásával a PAUP 4.0b10 (SWOFFORD 2003) programcsomaggal végeztük. Az átlagos láncmódszerrel (*average linkage*) végzett klaszteranalízishez a MOTHUR programot használtuk (SCHLOSS és mtsi. 2009). Az ITS régióra elfogadott konszenzusnak megfelelően (NILSSON és mtsi. 2008) a hasonlósági küszöbértéket 97%-ra állítottuk. A MOTU-k kijelölése után megpróbáltuk megbecsülni a még le nem írt *Mortierella* fajok számát oly módon, hogy modelleztük a megszekvenált autentikus törzsek fokozatosan növekvő számának hatását a környezeti minták azonosítására. Véletlenszerűen kiválasztva eltávolítottuk az autentikus törzsek 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%-át az adatsorból és meghatároztuk azon MOTU-k számát, amelyek így „elvesztették a nevüket” (azaz már nem lehetett őket egy adott fajjal megfeleltetni). Az azonosított MOTU-k (azaz az olyan MOTU-k, amelyek autentikus törzset tartalmaztak és valószínűleg egy leírt fajnak felelnek meg) számát ezután összevetettük az adatsorban megtalálható autentikus törzsek és leírt fajok számával (7. ábra).



**7. ábra. Az autentikus és típustörzsek szekvenálása hatásának modellezése.**

A görbék a GenBank adatbázisban elérhető *Mortierella* szekvenciák alapján megállapított, azonosított MOTU-k számát mutatják az elemzéshez használt referencia-adatsorba bevont autentikus törzsek (A) és fajok (B) számához viszonyítva.

Az azonosított MOTU-k száma és az autentikus törzsek számának emelkedése közel lineáris kapcsolatot mutatott. A szinonim fajnevek esetleges jelenlétének következményeként az várható, hogy a görbe telítődést mutat, ha az azonosított MOTU-k megközelítik a 100%-ot. Mivel a *Mortierella* nemzetségben számos taxonómiai szinonim ismert és nincs jele a görbe telítődésének, azt feltételezzük, hogy még számos olyan faj van, amelyek nem szerepelnek a referencia-adatbázisunkban. Ugyanakkor, a görbe meredeksége ( $y = 0.540x$ ) azt sugallja, hogy a MOTU-k 100%-os azonosítása akkor érhető el, ha az autentikus törzsek száma 170 (7/A ábra). Mivel a referencia-adatsor kb. 25%-ban redundáns volt abban az értelemben, hogy fajonként több mint egy törzset tartalmazott, a teljes fajszám 126-nak várható ( $y = 0.721x$ ; 7/B ábra). Mindez azt jelenti, hogy a GenBank-ban található *Mortierella* szekvenciák 100%-os azonosítása 126 faj, illetve 170 autentikus törzs szekvenciaszintű ismeretét igényli, ami a már ismerteken túl további 49 faj és 68 törzs meghatározását/szekvenálását jelenti. A hiányzó 49 faj természetesen tartalmaz új és olyan, már leírt fajokat is, amelyekről nem áll rendelkezésre szekvenciaadat.

Az elemzés alapján tehát meg tudtuk becsülni a *Mortierella* fajok abszolút számát (126/157) és úgy találtuk, hogy az igen közel van a leírt *Mortierella* fajok számához. Ez szerzőtől függően 100-157 (KIRK és mtsi. 2008, BENNY és mtsi. 2009; MycoBank - <http://www.mycobank.org>), ami azt sugallja, hogy a *Mortierella* fajok többségét már leírták és a már leírt fajok típustörzseinek szekvenálásával jelentősen javítható a környezeti mintákból származó meghatározatlan szekvenciaadatok identifikálása. Ez az eredmény ellentétben áll azokkal a becslésekkel, melyek szerint az azonosítatlan környezeti szekvenciák többsége még le nem írt fajokat reprezentál (HIBBETT és mtsi. 2009, 2011). Az eredmények éppen arra engednek következtetni, hogy a környezeti minták szekvenálása során kapott identifikálhatatlan MOTU-k nagy száma, legalábbis egyes gombacsoportokban, sokkal inkább a típus- és referenciatörzsekre vonatkozó szekvenciaadatok elégtelen voltának tulajdonítható, mint a nagyszámú, még le nem írt faj létezésének és aláhúzzák a pontosan identifikált és validált típus- és referenciaanyagok, valamint *barcoding* szekvenciák szükségességét.

#### **5.1.2. Karotinoidtermelő gombatörzsek azonosítása** (Nagy és mtsi. 2012a, Iturriaga és mtsi. 2005, Papp és mtsi. 2006, 2001)

Annak érdekében, hogy képet kapjunk a járomspórás gombák karotinoidtermelő képességéről és esetleg új karotinoidtermelő törzseket azonosítsunk, teszteltük a törzsgyűjtemény tagjainak karotinoidtartalmát és összetételét vékonyréteg kromatográfiás és HPLC eljárással (**F1. táblázat**). Ezen előkísérletek alapján 41, az *Amylomyces*, *Mucor*, *Blakeslea*, *Backusella*, *Dissophora*, *Gamsiella*, *Gilbertella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Umbelopsis* és *Mortierella* nemzetségekbe tartozó törzset vontunk be a karotinoid-összetétel meghatározását célzó további vizsgálatokba (**1. táblázat**).

Az egy fajhoz, illetve rokon fajokhoz tartozó törzsek karotinoidtermelő képessége nagy variabilitást mutatott. A vizsgált körülmények közt (YNB, 25 °C) a *M. azygosporus* SZMC 12015 mutatta a legnagyobb összkarotinoid-produkciót (825 µg/g<sub>[száraz tömeg]</sub>); legnagyobb mennyiségben γ-karotint termelt (387 µg/g<sub>[száraz tömeg]</sub>), bár a β-karotin-tartalma sem volt elhanyagolható (216 µg/g<sub>[száraz tömeg]</sub>). Talán az intenzív karotinoidtermelő képesség összefügg ezen gomba azigospóra (ivartalanul, vagy inkomplett ivaros folyamatok során létrejött zigospóra) képző képességével. A zigosporogenezis során képződő trispórsavról régóta ismert, hogy stimulálja a karotinoid-bioszintézist (LAMPILA és mtsi. 1985).

Mivel a β-karotin a likopin molekula két végének gyűrűvé záródásával alakul ki és a γ-karotin e folyamat egy β-gyűrűvel rendelkező köztterméke, lehetséges, hogy ez utóbbi származék fölhalmozódása egy megváltozott likopin-cikláz enzim működésének következménye.



1. táblázat. Járomspórás gombatörzsek karotinoid-összetétele YNB táptalajon és 25 °C-on.

| Faj                                                  | Törzs                   | Össz-<br>karotinoid <sup>b</sup> | Zeaxantin      | β-<br>Kriptoxantin | Likopin | γ-<br>Karotin | β-<br>Karotin |
|------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------|--------------------|---------|---------------|---------------|
| <i>Amylomyces rouxii</i>                             | SZMC <sup>a</sup> 12027 | 191                              | 10             | 23                 | 39      | 6             | 83            |
| <i>Backusella ctenidia</i>                           | SZMC 11063B             | 312                              | 5              | 20                 | 35      | 10            | 200           |
| <i>Backusella lamprospora</i>                        | SZMC 11061B             | 280                              | 5              | 19                 | 37      | 9             | 164           |
| <i>Backusella lamprospora</i>                        | SZMC 11062B             | 371                              | 7              | 25                 | 46      | 11            | 237           |
| <i>Dissophora ornata</i>                             | SZMC 11221              | 47                               | - <sup>c</sup> | -                  | 18      | 5             | 20            |
| <i>Gamsiella multidivariata</i>                      | SZMC 11224              | 115                              | -              | -                  | 9       | 10            | 81            |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                        | SZMC 11089              | 135                              | 5              | 5                  | 14      | 7             | 82            |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                        | SZMC 11090              | 44                               | -              | -                  | 21      | 3             | 14            |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                        | SZMC 11094              | 28                               | 3              | -                  | 7       | 3             | 9             |
| <i>Mortierella amoebioidea</i>                       | SZMC 11226              | 277                              | -              | -                  | 10      | 17            | 215           |
| <i>Mortierella gamsii</i>                            | SZMC 11340              | 114                              | -              | -                  | 21      | 3             | 70            |
| <i>Mortierella gemmifera</i>                         | SZMC 11201              | 120                              | -              | -                  | 13      | 8             | 86            |
| <i>Mortierella lignicola</i>                         | SZMC 11264              | 198                              | -              | -                  | 12      | 25            | 136           |
| <i>Mortierella longicollis</i>                       | SZMC 11208              | 107                              | -              | -                  | 4       | 9             | 77            |
| <i>Mortierella mutabilis</i>                         | SZMC 11202              | 57                               | -              | -                  | -       | 1             | 41            |
| <i>Mortierella rishikesha</i>                        | SZMC 11273              | 95                               | -              | -                  | 11      | -             | 75            |
| <i>Mortierella turficola</i>                         | SZMC 11207              | 235                              | -              | -                  | 5       | 17            | 207           |
| <i>Mucor azygosporus</i>                             | SZMC 12015              | 825                              | -              | 16                 | 46      | 387           | 216           |
| <i>Mucor bainieri</i>                                | SZMC 12050              | 25                               | -              | -                  | -       | -             | 20            |
| <i>Mucor bainieri</i>                                | SZMC 12064              | 438                              | 5              | 17                 | 40      | 11            | 289           |
| <i>Mucor circinelloides</i>                          | SZMC 12684              | 505                              | 3              | 27                 | 55      | 15            | 344           |
| <i>Mucor circinelloides</i>                          | SZMC 12689              | 580                              | 7              | 35                 | 80      | 21            | 360           |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>    | SZMC 12082              | 476                              | 5              | 28                 | 72      | 17            | 289           |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>griseocyanus</i>   | SZMC 12049              | 89                               | 1              | 5                  | 15      | 5             | 51            |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> | SZMC 20727              | 544                              | 4              | 30                 | 55      | 18            | 350           |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | SZMC 12074              | 464                              | 2              | 5                  | 25      | 22            | 340           |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | SZMC 0479               | 127                              | 8              | 17                 | 14      | 7             | 71            |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | SZMC 0478               | 85                               | 4              | 6                  | 8       | 5             | 55            |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | SZMC 12032              | 109                              | -              | 2                  | 9       | 6             | 76            |
| <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>             | SZMC 12056              | 363                              | -              | 2                  | 13      | 2             | 283           |
| <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>luteus</i>               | SZMC 12054              | 17                               | -              | -                  | 1       | -             | 13            |
| <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>silvaticus</i>           | SZMC 12053              | 65                               | -              | 4                  | 9       | 4             | 39            |
| <i>Mucor inequisporus</i>                            | SZMC 12055              | 46                               | -              | -                  | 1       | 2             | 35            |
| <i>Mucor mucedo</i>                                  | SZMC 0485               | 276                              | 22             | 39                 | 70      | 8             | 126           |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | SZMC 12037              | 32                               | -              | -                  | 7       | 2             | 22            |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                             | SZMC 11005              | 107                              | -              | -                  | 5       | 11            | 72            |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                             | SZMC 11009              | 112                              | -              | -                  | 5       | 12            | 85            |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                           | SZMC 13603              | 150                              | -              | -                  | 7       | 15            | 100           |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                           | SZMC 13615              | 198                              | -              | -                  | 11      | 20            | 130           |
| <i>Umbelopsis ramanniana</i>                         | SZMC 11078              | 412                              | -              | -                  | 47      | 22            | 327           |
| <i>Umbelopsis ramanniana</i>                         | SZMC 11079              | 206                              | -              | -                  | 15      | 17            | 163           |

<sup>a</sup> Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény. <sup>b</sup> A karotinoidmennyiségek µg/g<sub>[száraz tömeg]</sub> formában vannak megadva, a feltüntetett értékek 3 független tenyésztést követően mért karotinoidmennyiségek átlagai (a szórás értékeit a jobb áttekinthetőség érdekében nem tüntettük fel). A karotinoidkivonás minden esetben 4 napos, YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett, 25 °C-on végzett tenyésztést követően történt. <sup>c</sup> Karotinoid nem volt detektálható.

Minden más törzs esetében a β-karotin volt a meghatározó karotinoid termék. A *M. azygosporus* mellett, a *B. lamprospora* SZMC 11062B, *M. bainieri* SZMC 12064, *M. circinelloides* SZMC 12684 és 12689, *M. circinelloides* f. *lusitanicus* SZMC 12082 és f. *circinelloides* SZMC



20727, *M. hiemalis* SZMC 12074, *M. hiemalis* f. *hiemalis* SZMC 12056 és az *U. ramanniana* SZMC 11078 termelt számottevő mennyiségben  $\beta$ -karotint. E gombák összkarotinoid-tartalma összemérhető volt a kiváló karotinoidtermelőként számon tartott *M. circinelloides* f. *lusitanicus* CBS 277.49 törzs (NAVARRO és mtsi. 2001), valamint a *B. trispora* vad típusú izolátumainak (MEHTA és mtsi. 2003) karotinoidtartalmával.

Számos törzs képes volt a  $\beta$ -karotin mellett, annak értékes hidroxilált származékait, elsősorban  $\beta$ -kriptoxantint és zeaxantint, is szintetizálni, ami egy eddig nem jellemzett  $\beta$ -karotin-hidroxiláz aktivitás jelenlétére utal e gombákban. A karotin-bioszintézis genetikai hátterének feltárásában modellorganizmusként használt és ezért mind genetikailag, mind fiziológiailag jól jellemzett *M. circinelloides* f. *lusitanicus* MS12 törzsében (SZMC 12082) ugyancsak sikerült detektálni ezeket a xantofilokat. Kutatócsoportunk elsőként írta le járomspórás gombákban oxigenált karotinszármazékok jelenlétét (Papp és mtsi. 2006). Eredményeinket később más kutatók is megerősítették (ÁLVAREZ és mtsi. 2006). A törzsek asztaxantintermelését is teszteltük, de ezt a xantofillt csak a *M. bainieri* SZMC 12064 és a *G. persicaria* SZMC 11094 törzs kivonataiban detektáltuk, nagyon kis mennyiségben (1-2  $\mu\text{g/g}$ [száraz tömeg]). Asztaxantint ugyancsak nem azonosítottak korábban járomspórás gombákban.

A törzsek karotinoidtermelését teszteltük különböző hőmérsékleten (**2. táblázat**) és eltérő szénforrásokon (**3. táblázat**) is. Jelen dolgozatban 10 törzs esetében kapott eredményeket ismertetjük. A hőmérséklet általában jelentős, de organizmustól függően nagyon különböző hatással van a karotinoidtermelésére (BHOSALE 2004, KACZOR és PACIA 2016).

Korábban, *A. rouxii* esetében azt tapasztalták, hogy a gomba 37 °C-on mintegy háromszor annyi karotinoidot termelt, mint a növekedési optimumnak tekintett 28 °C-on (MOSQUEDA-CANO és GUTIERREZ-CORONA 1995). Kísérleteinkben, néhány kivételtől eltekintve (pl. *M. bainieri*), a vizsgált törzsek többségénél a növekedési optimumnál (22-28 °C) magasabb tenyésztési hőmérséklet szintén stimulálta a karotinoidtermelést. A karotinoidtartalom emelkedése általában 35 °C-on volt a legkifejezettebb, mivel a törzsek többsége 37 °C-on már csökkent növekedést mutatott, vagy éppenséggel nem volt képes túlélni. A legnagyobb összkarotinoid-tartalmat a *M. azygosporus* SZMC 2125 (2,1 mg/g[száraz tömeg]) és az *A. rouxii* SZMC 1207 (0,9 mg/g[száraz tömeg]) esetében mértük 35 °C-on.

Nyolc vegyület, mint kizárólagos szénforrás karotinoid-bioszintézisre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk (**3. táblázat**).

**2. táblázat. Tíz járomspórás gombatörzs összkarotinoid- és  $\beta$ -karotin-tartalma eltérő hőmérsékleten végzett tenyésztés során.**

| Törzs                                                                 | Hőmérséklet (°C) | Összkarotinoid <sup>a</sup> | $\beta$ -Karotin |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>Amylomyces rouxii</i><br>SZMC 1207                                 | 25               | 191 $\pm$ 30                | 83 $\pm$ 17      |
|                                                                       | 30               | 217 $\pm$ 27                | 173 $\pm$ 25     |
|                                                                       | 35               | 894 $\pm$ 71                | 662 $\pm$ 64     |
|                                                                       | 37               | 738 $\pm$ 34                | 565 $\pm$ 43     |
| <i>Backusella lamprospora</i><br>SZMC 11061B                          | 25               | 280 $\pm$ 25                | 164 $\pm$ 17     |
|                                                                       | 30               | 368 $\pm$ 41                | 289 $\pm$ 31     |
|                                                                       | 35               | 607 $\pm$ 45                | 378 $\pm$ 27     |
|                                                                       | 37               | 629 $\pm$ 41                | 406 $\pm$ 22     |
| <i>Backusella lamprospora</i><br>SZMC 11062B                          | 25               | 371 $\pm$ 56                | 237 $\pm$ 31     |
|                                                                       | 30               | 417 $\pm$ 17                | 266 $\pm$ 12     |
|                                                                       | 35               | 805 $\pm$ 33                | 513 $\pm$ 31     |
|                                                                       | 37               | 833 $\pm$ 26                | 530 $\pm$ 19     |
| <i>Mucor azygosporus</i><br>SZMC 12015                                | 25               | 825 $\pm$ 36                | 216 $\pm$ 24     |
|                                                                       | 30               | 919 $\pm$ 48                | 276 $\pm$ 27     |
|                                                                       | 35               | 2124 $\pm$ 72               | 818 $\pm$ 45     |
|                                                                       | 37               | 1013 $\pm$ 58               | 369 $\pm$ 41     |
| <i>Mucor bainieri</i><br>SZMC 12064                                   | 25               | 438 $\pm$ 31                | 289 $\pm$ 22     |
|                                                                       | 30               | 187 $\pm$ 28                | 121 $\pm$ 15     |
|                                                                       | 35               | 122 $\pm$ 13                | 70 $\pm$ 7       |
|                                                                       | 37               | - <sup>b</sup>              | -                |
| <i>Mucor circinelloides</i> f.<br><i>lusitanicus</i><br>SZMC 12082    | 25               | 580 $\pm$ 55                | 360 $\pm$ 51     |
|                                                                       | 30               | 483 $\pm$ 60                | 352 $\pm$ 49     |
|                                                                       | 35               | 634 $\pm$ 31                | 510 $\pm$ 26     |
|                                                                       | 37               | 379 $\pm$ 49                | 269 $\pm$ 27     |
| <i>Mucor circinelloides</i> f.<br><i>circinelloides</i><br>SZMC 20727 | 25               | 544 $\pm$ 41                | 350 $\pm$ 45     |
|                                                                       | 30               | 430 $\pm$ 37                | 280 $\pm$ 33     |
|                                                                       | 35               | 625 $\pm$ 21                | 390 $\pm$ 19     |
|                                                                       | 37               | 287 $\pm$ 23                | 135 $\pm$ 17     |
| <i>Mucor hiemalis</i><br>SZMC 12074                                   | 25               | 464 $\pm$ 32                | 340 $\pm$ 27     |
|                                                                       | 30               | 840 $\pm$ 20                | 750 $\pm$ 17     |
|                                                                       | 35               | -                           | -                |
|                                                                       | 37               | -                           | -                |
| <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i><br>SZMC 12056                | 25               | 363 $\pm$ 30                | 283 $\pm$ 26     |
|                                                                       | 30               | 658 $\pm$ 62                | 601 $\pm$ 53     |
|                                                                       | 35               | -                           | -                |
|                                                                       | 37               | -                           | -                |
| <i>Mucor mucedo</i><br>SZMC 0485                                      | 25               | 276 $\pm$ 15                | 126 $\pm$ 12     |
|                                                                       | 30               | 181 $\pm$ 21                | 161 $\pm$ 20     |
|                                                                       | 35               | 821 $\pm$ 41                | 607 $\pm$ 44     |
|                                                                       | 37               | 725 $\pm$ 50                | 565 $\pm$ 48     |

<sup>a</sup> A karotinoidmennyiségek  $\mu\text{g/g}_{[\text{száraz tömeg}]}$  formában vannak megadva, a feltüntetett értékek 3 független tenyésztést követően mért karotinoidmennyiségek átlagai  $\pm$  szórás. A karotinoidkivonás minden esetben 4 napos, YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett végzett tenyésztést követően történt. <sup>b</sup> Az adott hőmérsékleten a gomba nem volt képes növekedni.

A szénforrásokat szénasszimilációs vizsgálatok (VÁGVÖLGYI és mtsi. 1996, PAPP és mtsi. 2001) tapasztalatai alapján választottuk ki. A galaktóz és a cellobióz több törzs esetében fokozta a karotinoid- és a  $\beta$ -karotin-termelést. A trehalóz jó szénforrásnak bizonyult a *M. circinelloides* és *M.*

*hiemalis* izolátumok karotinoidtermelése szempontjából, míg az aszparaginsav *B. lamprospora* törzsek karotinoidtermelését stimulálta. Korábban a glükóz, cellobióz és maltóz bizonyult a karotinoidtermelés számára legkedvezőbb szénforrásnak *A. rouxii* esetében (MOSQUEDA-CANO és GUTIERREZ-CORONA 1995), a cellobióz pedig hatékonyan fokozta a *B. trispora* karotinoidtartalmát (DHOLAKIA és MODI 1982).

**3. táblázat. Tíz járomspórás gombatörzs összkarotinoid- és  $\beta$ -karotin-tartalma eltérő szénforrásokon végzett tenyésztés során.**

| Törzs                                                              | Szénforrás            | Összkarotinoid <sup>a</sup> | $\beta$ -Karotin |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>Amylomyces rouxii</i><br>SZMC 1207                              | Glükóz                | 191 $\pm$ 30                | 83 $\pm$ 17      |
|                                                                    | Cellobióz             | 387 $\pm$ 22                | 242 $\pm$ 17     |
|                                                                    | Galaktóz              | 302 $\pm$ 18                | 192 $\pm$ 11     |
|                                                                    | Maltóz                | 202 $\pm$ 21                | 127 $\pm$ 14     |
|                                                                    | Trehalóz              | 186 $\pm$ 13                | 116 $\pm$ 12     |
|                                                                    | Glicerín-L-monoacetát | 110 $\pm$ 10                | 70 $\pm$ 7       |
|                                                                    | Dihidroxí-aceton      | 166 $\pm$ 11                | 103 $\pm$ 12     |
|                                                                    | Aszparaginsav         | 97 $\pm$ 7                  | 62 $\pm$ 5       |
| <i>Backusella lamprospora</i><br>SZMC 11061B                       | Glükóz                | 280 $\pm$ 25                | 164 $\pm$ 17     |
|                                                                    | Cellobióz             | 555 $\pm$ 52                | 370 $\pm$ 49     |
|                                                                    | Galaktóz              | 506 $\pm$ 40                | 333 $\pm$ 37     |
|                                                                    | Maltóz                | 451 $\pm$ 27                | 281 $\pm$ 22     |
|                                                                    | Trehalóz              | 236 $\pm$ 17                | 150 $\pm$ 19     |
|                                                                    | Glicerín-L-monoacetát | - <sup>b</sup>              | -                |
|                                                                    | Dihidroxí-aceton      | -                           | -                |
|                                                                    | Aszparaginsav         | 418 $\pm$ 31                | 246 $\pm$ 25     |
| <i>Backusella lamprospora</i><br>SZMC 11062B                       | Glükóz                | 371 $\pm$ 56                | 237 $\pm$ 31     |
|                                                                    | Cellobióz             | 735 $\pm$ 41                | 476 $\pm$ 47     |
|                                                                    | Galaktóz              | 665 $\pm$ 59                | 431 $\pm$ 55     |
|                                                                    | Maltóz                | 580 $\pm$ 36                | 374 $\pm$ 31     |
|                                                                    | Trehalóz              | 300 $\pm$ 25                | 195 $\pm$ 25     |
|                                                                    | Glicerín-L-monoacetát | -                           | -                |
|                                                                    | Dihidroxí-aceton      | -                           | -                |
|                                                                    | Aszparaginsav         | 567 $\pm$ 28                | 360 $\pm$ 19     |
| <i>Mucor azygosporus</i><br>SZMC 12015                             | Glükóz                | 825 $\pm$ 36                | 216 $\pm$ 24     |
|                                                                    | Cellobióz             | 970 $\pm$ 77                | 175 $\pm$ 15     |
|                                                                    | Galaktóz              | 755 $\pm$ 63                | 156 $\pm$ 22     |
|                                                                    | Maltóz                | 770 $\pm$ 51                | 150 $\pm$ 19     |
|                                                                    | Trehalóz              | -                           | -                |
|                                                                    | Glicerín-L-monoacetát | -                           | -                |
|                                                                    | Dihidroxí-aceton      | -                           | -                |
|                                                                    | Aszparaginsav         | -                           | -                |
| <i>Mucor bainieri</i><br>SZMC 12064                                | Glükóz                | 438 $\pm$ 31                | 289 $\pm$ 22     |
|                                                                    | Cellobióz             | 525 $\pm$ 32                | 334 $\pm$ 27     |
|                                                                    | Galaktóz              | 566 $\pm$ 37                | 365 $\pm$ 28     |
|                                                                    | Maltóz                | 495 $\pm$ 41                | 309 $\pm$ 33     |
|                                                                    | Trehalóz              | 317 $\pm$ 11                | 197 $\pm$ 7      |
|                                                                    | Glicerín-L-monoacetát | 472 $\pm$ 55                | 306 $\pm$ 40     |
|                                                                    | Dihidroxí-aceton      | -                           | -                |
|                                                                    | Aszparaginsav         | 292 $\pm$ 23                | 195 $\pm$ 16     |
| <i>Mucor circinelloides</i> f.<br><i>lusitanicus</i><br>SZMC 12082 | Glükóz                | 580 $\pm$ 55                | 360 $\pm$ 51     |
|                                                                    | Cellobióz             | 541 $\pm$ 38                | 337 $\pm$ 33     |
|                                                                    | Galaktóz              | 751 $\pm$ 34                | 469 $\pm$ 31     |
|                                                                    | Maltóz                | 547 $\pm$ 27                | 346 $\pm$ 22     |
|                                                                    | Trehalóz              | 721 $\pm$ 22                | 497 $\pm$ 16     |
|                                                                    | Glicerín-L-monoacetát | 466 $\pm$ 56                | 287 $\pm$ 53     |

|                                                                       |                       |          |          |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------|----------|
| <i>Mucor circinelloides</i> f.<br><i>circinelloides</i><br>SZMC 20727 | Dihidrox-aceton       | 503 ± 46 | 307 ± 41 |
|                                                                       | Aszparaginsav         | 283 ± 15 | 179 ± 12 |
|                                                                       | Glükóz                | 544 ± 41 | 350 ± 45 |
|                                                                       | Cellobióz             | 501 ± 45 | 321 ± 38 |
|                                                                       | Galaktóz              | 712 ± 53 | 462 ± 39 |
|                                                                       | Maltóz                | 520 ± 71 | 334 ± 65 |
|                                                                       | Trehalóz              | 699 ± 49 | 517 ± 43 |
|                                                                       | Glicerín-L-monoacetát | 435 ± 31 | 301 ± 27 |
|                                                                       | Dihidrox-aceton       | 470 ± 10 | 309 ± 11 |
|                                                                       | Aszparaginsav         | 277 ± 12 | 152 ± 17 |
| <i>Mucor hiemalis</i><br>SZMC 12074                                   | Glükóz                | 464 ± 32 | 340 ± 27 |
|                                                                       | Cellobióz             | 701 ± 66 | 514 ± 51 |
|                                                                       | Galaktóz              | 487 ± 39 | 345 ± 33 |
|                                                                       | Maltóz                | -        | -        |
|                                                                       | Trehalóz              | 555 ± 27 | 409 ± 31 |
|                                                                       | Glicerín-L-monoacetát | 407 ± 26 | 299 ± 33 |
|                                                                       | Dihidrox-aceton       | 452 ± 21 | 327 ± 21 |
|                                                                       | Aszparaginsav         | 762 ± 52 | 547 ± 48 |
|                                                                       | Glükóz                | 363 ± 30 | 283 ± 26 |
|                                                                       | Cellobióz             | 545 ± 28 | 419 ± 22 |
| <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i><br>SZMC 12056                | Galaktóz              | 379 ± 38 | 292 ± 34 |
|                                                                       | Maltóz                | -        | -        |
|                                                                       | Trehalóz              | 475 ± 30 | 355 ± 27 |
|                                                                       | Glicerín-L-monoacetát | 338 ± 36 | 260 ± 28 |
|                                                                       | Dihidrox-aceton       | 415 ± 22 | 307 ± 24 |
|                                                                       | Aszparaginsav         | 593 ± 44 | 463 ± 47 |
|                                                                       | Glükóz                | 276 ± 15 | 126 ± 12 |
|                                                                       | Cellobióz             | 177 ± 6  | 111 ± 5  |
|                                                                       | Galaktóz              | 218 ± 7  | 141 ± 5  |
|                                                                       | Maltóz                | 244 ± 11 | 156 ± 9  |
| <i>Mucor mucedo</i><br>SZMC 0485                                      | Trehalóz              | 143 ± 19 | 89 ± 11  |
|                                                                       | Glicerín-L-monoacetát | 93 ± 15  | 59 ± 8   |
|                                                                       | Dihidrox-aceton       | 262 ± 19 | 164 ± 13 |
|                                                                       | Aszparaginsav         | 111 ± 14 | 74 ± 11  |

<sup>a</sup> A karotinoidmennyiségek  $\mu\text{g/g}_{[\text{száraz tömeg}]}$  formában vannak megadva, a feltüntetett értékek 3 független tenyésztést követően mért karotinoidmennyiségek átlagai  $\pm$  szórás. A karotinoidkivonás minden esetben 4 napos, a megfelelő szénforrást tartalmazó YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett végzett tenyésztést követően történt. <sup>b</sup> Az adott szénforráson a gomba nem volt képes növekedni.

Sikerült tehát egy reprezentatív járomspórás gombagyűjteményt összeállítani, mely lehetőséget biztosított az eddigi modell organizmusokhoz képest eltérő összetételű (pl. asztaxantin- vagy  $\gamma$ -karotin-termelő), illetve nagyobb karotinoidtartalmú törzseket azonosítani. Több nagy karotinoidprodukcóra képes törzset találtunk, köztük olyanokat is, amelyek termelik az értékes zeaxantint és  $\beta$ -kriptoxantint is.

## 5.2. AZ ÁLTALÁNOS MEVALONSAV-ÚT KULCSLÉPÉSEIT MEGHATÁROZÓ GÉNEK JELLEMZÉSE ÉS AZ ÚTVONAL MÓDOSÍTÁSA JÁROMSPÓRÁS GOMBÁKBAN

Elsősorban olyan gének vizsgálatára koncentráltunk, amelyek korábban más organizmusokban sebesség-meghatározónak bizonyultak az egyes terpénszármazékok, különösen a karotinoidok és az ergoszterin, képződése szempontjából. Ezért a HMG-KoA-reduktáz, az IPP-

izomeráz, valamint az FPP- és GGPP-szintázok génjeit és ezek terpén-bioszintézisre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A *M. circinelloides* mellett néhány esetben más gyakorlati jelentőségű járomspórás gombákat (pl. *Rhizomucor miehei*) is bevontunk a vizsgálatokba.

### 5.2.1. A *M. circinelloides* HMG-KoA-reduktáz génjeinek jellemzése

#### 5.2.1.1. A HMG-KoA-reduktáz gének izolálása és transzkripciójuk elemzése (Nagy és mtsi. 2014)

Állatok rendszerint egy, növények több, míg gombák egy (pl. *Schizosaccharomyces pombe*) vagy több (pl. *S. cerevisiae*) HMG-KoA-reduktázzal rendelkeznek (BASSON és mtsi. 1986, LUM és mtsi. 1996, FRIESEN és RODWELL 2004). Utóbbinál a két HMG-KoA-reduktáz esetében bizonyos munkamegosztást, eltérő szabályozást és sejten belüli lokalizációt bizonyítottak (KONING és mtsi. 1996, PROFANT és mtsi. 2000, BURG és ESPENSHADE 2011). Járomspórás gombák közül *Absidia glauca*, *B. trispora* és *P. blakesleeanus* esetében egy HMG-KoA-reduktáz gént detektáltak (BURMESTER és CZEMPINSKI 1994, RUIZ-ALBERT és mtsi. 2002), míg a *R. oryzae* genomja két feltételezett HMG-KoA gént tartalmaz. BURMESTER és CZEMPINSKI (1994) ugyancsak két gént detektált *Mucor mucedo* és *Parasitella parasitica* fajokban. E gének funkcióját azonban, a *P. blakesleeanus hmgR* kivételével, amelyet szintén csak részlegesen jellemeztek (RUIZ-ALBERT és mtsi. 2002), nem vizsgálták. A modellorganizmusnak választott  $\beta$ -karotin-termelő *M. circinelloides* genom adatbázisában (DoE Joint Genome Institute; *M. circinelloides* CBS277.49v2.0; <http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>) három feltételezett HMG-KoA-reduktáz gént (*hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3*) azonosítottunk a következő pozíciókban: scaffold\_02: 2759562-2763160; scaffold\_03: 4299175-4302130 és scaffold\_04: 4237143-4240758. Hogy megvizsgáljuk, van-e valamiféle munkamegosztás a gének és az általuk kódolt enzimek között, különösen, hogy van-e valamelyiknek specifikus szerepe a karotin- és ergoszterin-bioszintézisben, illetve a morfogenezis vagy a környezeti változásokhoz való alkalmazkodás során, a három gént és a megfelelő cDNS-eket a szekvenciaadatok alapján tervezett specifikus indítószekvenciákkal (**F3. táblázat**) felszaporítottuk és plazmidba klónoztuk. A DNS szakaszok GenBank azonosítói a következők: *hmgR1*: KJ508882; *hmgR2*: KJ508884; *hmgR3*: KJ508883.

A gének által kódolt fehérjék főbb jellegzetességeit és motívumait a **4. táblázat** tartalmazza. A HMG-KoA-reduktázok membránkötött fehérjék, az N-terminális végi hidrofób doménjük tartalmazza a transzmembrán régiókat (FRIESEN és RODWELL 2004). Ezek feltételezett száma eltérő a három fehérjében. A C-terminális doménben mind a feltételezett HMG-KoA-kötő, mind a NAD(P)H-kötő motívumokat sikerült azonosítani. A RUIZ-ALBERT és mtsi. (2002) által, a rokon *P. blakesleeanus* HMG-KoA-reduktázában azonosított rövid C-terminális PEST szignált, azaz egy, a fehérje gyors

degradációjáért felelős prolin (P), glutaminsav (E), szerin (S) és treonin (T) aminosavakban gazdag szekvenciát egyik *Mucor* HmgR fehérjében sem találtuk meg.

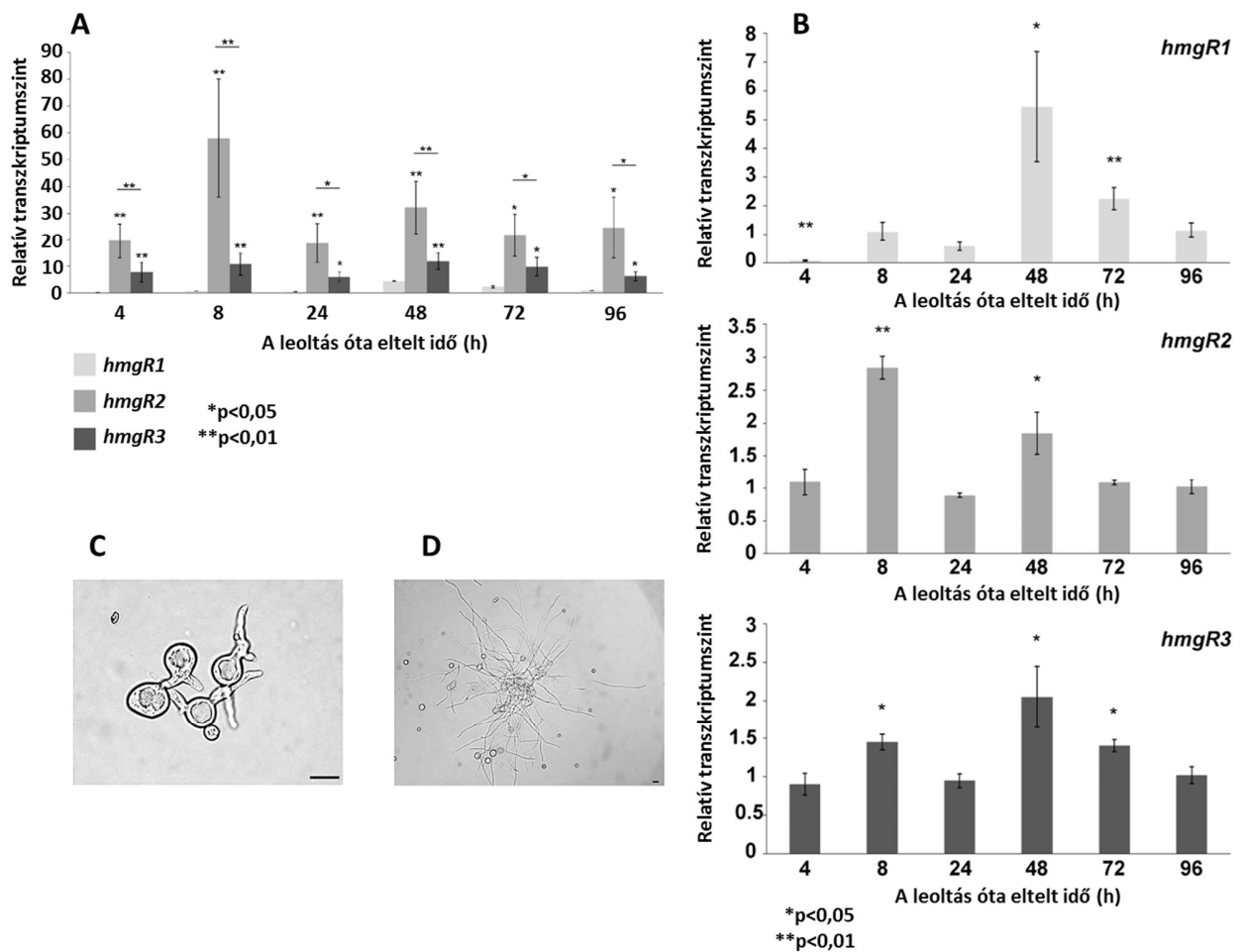
4. táblázat. A *M. circinelloides* és a *R. miehei* HmgR fehérjéinek főbb jellemzői.

|                                                         | McHmgR1                                               | McHmgR2                                               | McHmgR3                                               | RmHmgR                                                |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Hossz</b> (aminosav)                                 | 1107                                                  | 1084                                                  | 1115                                                  | 1058                                                  |
| <b>Számított molekulatömeg</b> (kDa)                    | 120,78                                                | 119,07                                                | 120,71                                                | 114,4                                                 |
| <b>Számított pI</b>                                     | 8,86                                                  | 8,33                                                  | 8,43                                                  | 8,4                                                   |
| <b>Transzmembrán hélixek száma</b>                      | 6                                                     | 8                                                     | 5                                                     | 7                                                     |
| <b>Szterol-érzékelő domén (SSD)</b> (aminosav pozíciók) | 244-407                                               | 236-388                                               | 279-443                                               | 235-399                                               |
| <b>Katalitikus domén</b> (aminosav pozíciók)            | 653-1107                                              | 633-1084                                              | 692-1115                                              | 638-1045                                              |
| <b>HMG-kötő motívumok</b> (aminosav pozíciók)           | CCENVIGYMPI<br>(717-727);<br>PMATTEGCLVA<br>(745-755) | CCENVIGYMPI<br>(697-707);<br>PMATTEGCLVA<br>(725-735) | CCENVIGYMPI<br>(756-706);<br>PMATTEGCLIA<br>(784-794) | CCENVIGYMPL<br>(701-711);<br>PMATTEGCLVA<br>(729-739) |
| <b>NAD(P)H-kötő motívumok</b> (aminosav pozíciók)       | TGDAMGMN<br>(841-848);<br>VGTVGGG<br>(991-997)        | TGDAMGMN<br>(821-828);<br>VGTIGGG<br>(971-977)        | TGDAMGMN<br>(880-887);<br>VGTIGGG<br>(1030-1036)      | TGDDMGGMN<br>(825-831);<br>IGTVGGG<br>(976-982)       |

A *M. circinelloides* *hmgR* gének qRT-PCR eljárás segítségével elemeztük. Arra voltunk kíváncsiak, vajon a három gén átíródását eltérően befolyásolják-e egyes, fiziológiai és biotechnológiai szempontból releváns környezeti hatások, azaz a tenyésztési idő, a hőmérséklet, a szénforrás, a tápközeg sótartalma és az oxigénszint megváltozása.

Hogy megvizsgáljuk az átíródás intenzitásának változását a tenyésztési idő során, a leoltást követő 4., 8., 24., 48., 72. és 96. órában végeztük az RNS-kivonást, illetve az analízist (**8. ábra**). Ha a gének relatív transzkriptumszintjeit egymáshoz viszonyítjuk, láthatjuk, hogy a teljes tenyésztési ciklus alatt a *hmgR2* fejeződött ki a legerősebben, a *hmgR1* pedig a leggyengébben (**8/A ábra**). Noha a *hmgR1* gén nagyon alacsony transzkriptumszinteket mutatott minden kísérletben, reverz transzkripció PCR segítségével a micéliumban e gén átíródását is igazoltuk (**9. ábra**). Ezzel szemben a csírázó spórákban (4 h) nem sikerült a gén kifejeződését kimutatni.

Több tanulmány is felveti, hogy a HMG-KoA-reduktáz működése és a mevalonsav-út vonal hatással van a morfogenezisre és a polarizált növekedésre (LUKÁCS és mtsi. 2009, SEILER és PLAMANN 2003, NICKERSON és mtsi. 2006), ugyanakkor viszonylag kevés információ áll rendelkezésre a spórák csírázásában és a hifák fejlődésében játszott szerepükről.

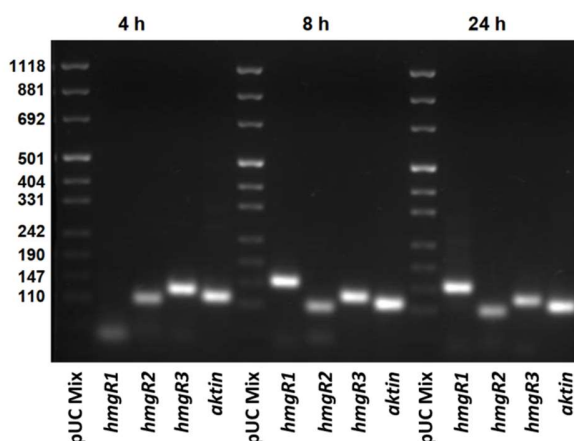


8. ábra. A *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* gének relatív transzkriptumszintjei a tenyésztési idő során (A-B), valamint a *M. circinelloides* mikromorfológiája 4 (C) és 8 (D) órával a leoltás után.

**A:** A gének relatív transzkriptumszintjei egymáshoz viszonyítva (a *hmgR1* gén 96 órával a leoltás után mért transzkriptumszintjét vettük 1-nek; a szignifikancia szint megállapításához kétmintás t-próbát végeztünk). **B:** Az egyes gének relatív transzkriptumszintjei az adott gén egy adott időpontban mutatott transzkriptumszintjéhez viszonyítva (mindegyik gén esetében a 96 órával a leoltás után mért transzkriptumszintet vettük 1-nek; a szignifikancia szint megállapításához páros t-próbát végeztünk). Az RNS-kivonáshoz az MS12 törzset YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett, 25 °C-on tenyésztettük. Három független kísérletben kapott értékek átlagát tüntettük fel, szórással együtt. Amennyiben külön nem jelöltük, a \* vagy \*\* az egységnyi értékettől való szignifikáns eltérést jelzi. A fénymikroszkópos ábrákon (C-D) a méretskála 10 µm-t jelez, a mikroszkópos vizsgálathoz a tenyésztést YNB tápoldatban végeztük, állandó megvilágítás mellett, 25 °C-on.

Egy korai vizsgálatban mindkét HMG-KoA-reduktáz génjünkben mutáns *S. cerevisiae* sejtek képtelenek voltak spóracsírázásra és vegetatív növekedésre, ugyanakkor az egyik gén jelenléte elegendő volt a megfelelő működéshez (BASSON és mtsi. 1986). *M. circinelloides* esetében, amennyiben a transzkripció szinteket ugyanazon gén egy adott időpontban mutatott transzkriptummennyiségéhez viszonyítottuk, a *hmgR2* és a *hmgR3* gén átíródása hasonló mintázatot mutatott (8/B ábra). Mindkét gén relatív transzkriptumszintje 4 órával a leoltás után magas szintet ért el jelezve, hogy mRNS-eik már a csírázó spórákban is nagyobb koncentrációban vannak jelen. Ezzel szemben,

a *hmgR1* gén transzkripciója csak a hifákban volt kimutatható. A teljes tenyésztés során a *hmgR2* 8 óra elteltével (a fiatal hifákban, amikor az első elágazások megjelennek; **8/C ábra**) mutatta a legnagyobb relatív transzkriptumszintet, míg a *hmgR1* és a *hmgR3* 48 órával a leoltás után (a fejlett micéliumban; **8/D ábra**) érte el a maximum értéket.



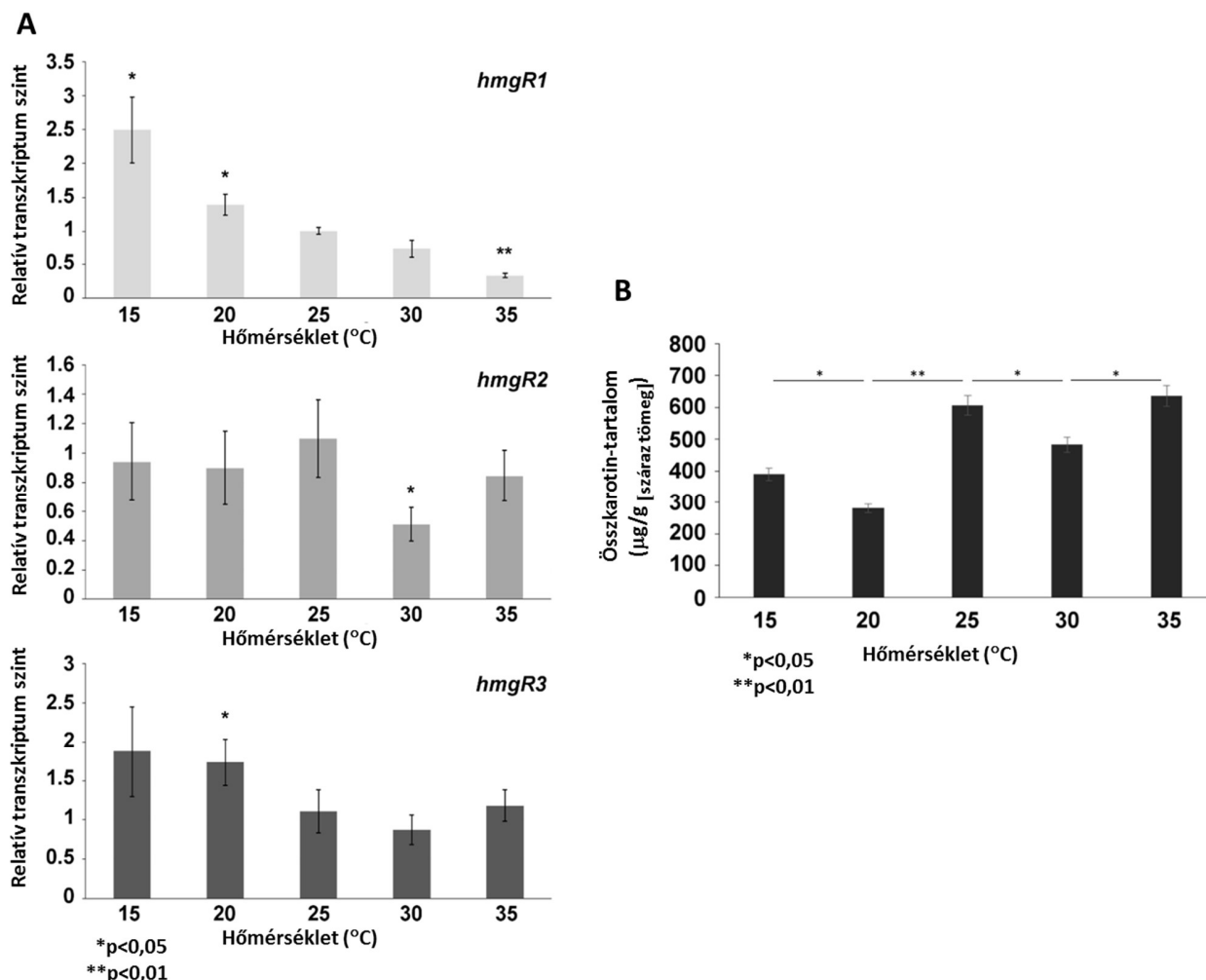
**9. ábra. A vizsgált gének átíródásának kimutatása reverz transzkripció PCR-rel.**

Az RNS- és karotnoidkivonáshoz az MS12 törzset minden esetben YNB táptalajon, állandó megvilágítás 25 °C-on tenyésztettük. A PCR körülmények azonosak voltak a qRT-PCR kísérletekben (8. ábra) alkalmazottakkal. A felszaporított termékek mérete a következő: *hmgR1*, 151 bp; *hmgR2*, 107 bp; *hmgR3*, 128 bp; *actA*, 117 bp; markerként pUC Mix-t (Thermo Scientific) használtunk.

Ismert, hogy a membránfluiditás és szerkezet, melyre az ergoszterin bioszintézisén keresztül a HMG-KoA-reduktáz is hatást gyakorol, fontos szerepet játszik a hőmérsékleti változásokhoz történő alkalmazkodásban. Emellett a tenyésztési hőmérséklet jelentősen befolyásolja a járomspórás gombák karotintermelését is (MOSQUEDA-CANO és GUTIERREZ-CORONA 1995, NAGY és mtsi. 2012a, PAPP és mtsi. 2013). Ezért megvizsgáltuk a *hmgR* gének relatív transzkripció szintjeit eltérő hőmérsékleten végzett tenyésztés során (**10. ábra**). A *hmgR1* gén transzkripciója hőmérsékletfüggést mutatott, magasabb hőmérsékleteken egyre alacsonyabb transzkriptum-mennyiségeket detektáltunk. A *hmgR2* és *hmgR3* esetében ilyen megfelelést nem tapasztaltunk, kivéve, hogy a *hmgR2* relatív transzkriptumszintje 30 °C-on szignifikáns csökkenést mutatott a 25 °C-on mérthez képest. Érdekes, hogy az eltérő hőmérsékleteken végzett tenyésztések eredményeit összehasonlítva, a gomba összkarotinoid-tartalmának és a *hmgR2* relatív transzkriptumszintjének változása hasonló lefutást mutat (**10/A,B ábra**). Ismert, hogy a tenyésztési hőmérséklet különböző módon befolyásolhatja az egyes mikroorganizmusok karotinoidtermelését. *Mucor rouxii* tenyésztési hőmérsékletét például a növekedési optimumról (28 °C) 40 °C-ra emelve a termelt karotinoidmennyiség háromszorosára nőtt (MOSQUEDA-CANO és GUTIERREZ-CORONA 1995), ugyanakkor *Dunaliella* alga esetében éppen a



hőmérséklet csökkentésének (34 °C-ról 17 °C-ra) hatására emelkedett meg a karotinoid tartalom (hét és félszeresére) (ORSET és YOUNG 1999).

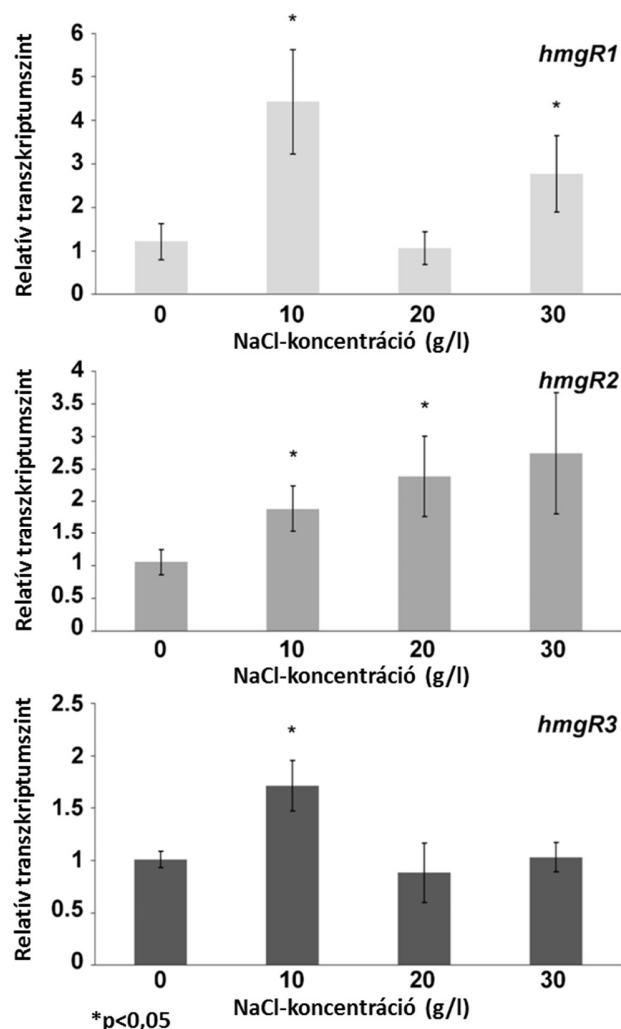


**10. ábra. A *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* gének relatív transzkriptumszintjei (A) és az MS12 törzs karotinoidtartalma (B) eltérő hőmérsékleten végzett tenyésztés során.**

**A:** Az egyes gének relatív transzkriptumszintjei az adott gén egy adott hőmérsékleten mutatott transzkriptumszintjéhez viszonyítva (mindegyik gén esetében a 25 °C-on mért transzkriptumszintet vettük 1-nek; a \* vagy \*\* az egységnyi értékkel való szignifikáns eltérést jelzi). **B:** Az MS12 karotinoidtartalma különböző hőmérsékleteken. Az RNS- és karotinoidkivonáshoz az MS12 törzset YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett 4 napon át tenyésztettük. Három független kísérletben kapott értékek átlagát tüntettük fel, szórással együtt, a szignifikancia szint megállapítása páros t-próbával történt.

A HmgR aktivitásnak és a termelt fehérje mennyiségének nagy jelentősége lehet a só stresszhez és egyáltalán az ozmotikus viszonyok megváltozásához való alkalmazkodás során, elsősorban a membránalkotó ergoszterin bioszintézisén keresztül (REP és mtsi. 2000, BURG és ESPENSHADE 2011), sőt egyes mikroorganizmusok esetében megfigyelték, hogy a környezet sótartalma a HMG-KoA-reduktáz gén transzkripció szintű szabályozására is hatott (BIDLE és mtsi.

2007). Kísérleteinkben a só stressz ugyancsak hatással volt a *M. circinelloides hmgR* génnek működésére; 10 g/l NaCl jelenlétében mindhárom gén jelentősen nagyobb transzkriptumszinteket mutatott, mint sómentes tápközegeben (11. ábra).



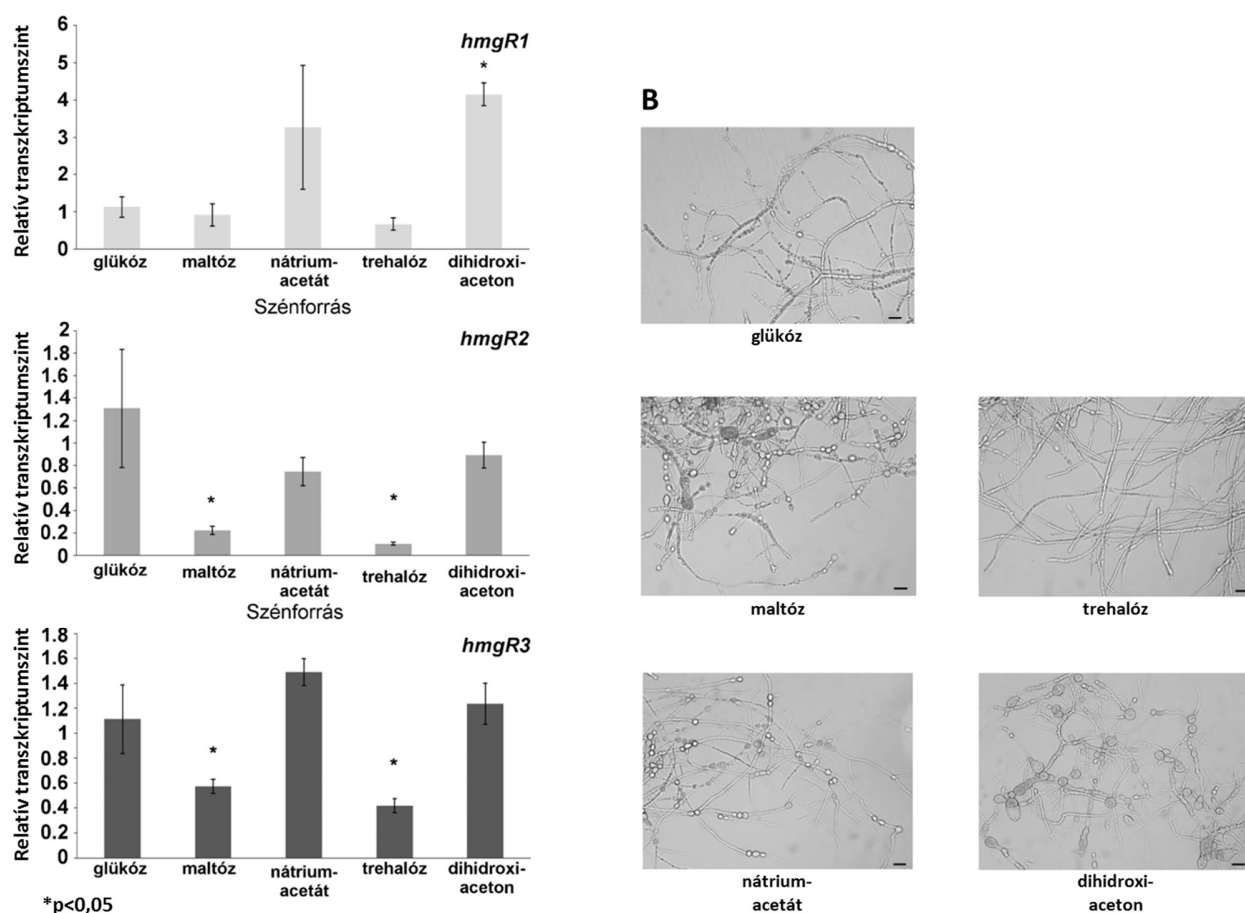
**11. ábra.** A *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* gének relatív transzkriptumszintjei eltérő NaCl tartalmú tápközegeben.

**A:** Az egyes gének relatív transzkriptumszintjei az adott gén egy adott sókoncentráción mutatott transzkriptumszintjéhez viszonyítva (mindegyik gén esetében a NaCl-t nem tartalmazó táptalajon mért transzkriptumszintet vettük 1-nek). Az RNS-kivonáshoz az MS12 törzset YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett 4 napon át, 25 °C-on tenyésztettük. Három független kísérletben kapott értékek átlagát tüntettük fel, szórással együtt, a \* az egységnyi értékettől való szignifikáns eltérést jelzi, a szignifikancia szint megállapítása páros t-próbával történt.

A *hmgR2* transzkripciója különösen érzékenyen reagált a tápközegek sótartalmának változására, amennyiben a NaCl-koncentráció emelkedését követte relatív transzkriptumszintjének emelkedése is. Emellett ez a gén a másik kettőhöz viszonyítva is extrém nagy transzkriptumszinteket ért el a sómentes tápközegekben. Korábban a HMG-KoA-reduktáz mennyiségének és aktivitásának fokozódását tapasztalták a környezet sótartalmára érzékeny *S. cerevisiae* és a mérsékelten halotoleráns

*Aureobasidium pullulans* esetében, amikor a gombákat nagy sókoncentráció jelenlétében tenyésztették (VAUPOTIČ és mtsi. 2008).

Nem találtunk adatokat arra vonatkozóan, hogy a tápközeg szénforrás tartalma hat-e a *hmgR* gének expressziójára. Ezért megvizsgáltuk a gének transzkripcióját ötféle egyedüli szénforráson végzett tenyésztést követően is (12. ábra).



12. ábra. A *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* gének relatív transzkriptumszintjei (A) és a *M. circinelloides* mikromorfológiája (B) eltérő szénforrásokon végzett tenyésztés során.

A: Az egyes gének relatív transzkriptumszintjei az adott gén egy adott szénforráson mutatott transzkriptumszintjéhez viszonyítva (mindegyik gén esetében a glükózt tartalmazó táptalajon mért transzkriptumszintet vettük 1-nek). Az RNS-kivonáshoz az MS12 törzset minden esetben YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett 4 napon át, 25 °C-on tenyésztettük. Három független kísérletben kapott értékek átlagát tüntettük fel, szórással együtt, a \* az egységnyi érték tekintett értéktől való szignifikáns eltérést jelzi, a szignifikancia szint megállapítása páros t-próbával történt. A fénymikroszkópos ábrákon (B) a méretskála 10 µm-t jelez, a mikroszkópos vizsgálathoz a tenyésztést YNB tápoldatban végeztük, állandó megvilágítás mellett, 25 °C-on.

Szénforrásként olyan vegyületeket teszteltünk, amelyek korábbi kísérleteinkben fokozták a *M. circinelloides* karotinoidtermelését (NAGY és mtsi. 2012a, PAPP és mtsi. 2013). Mindhárom gén esetében magas transzkriptumszinteket detektáltunk nátrium-acetáton és dihidroxi-acetonon. Mindkét vegyület kapcsolatban van a glikolízissal és prekursorként szolgálhat a HMG-KoA képződéséhez. Az

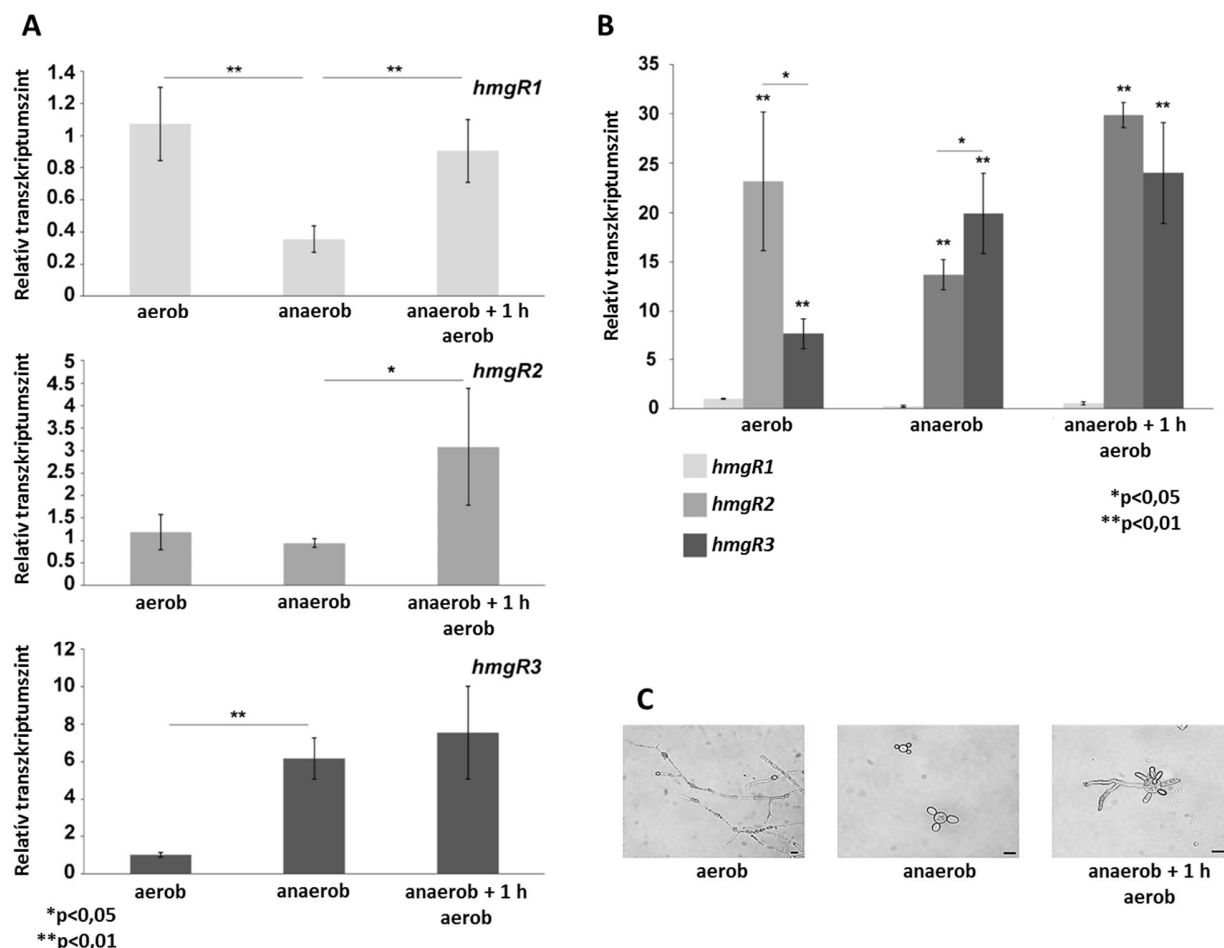
acetát hatással van az ugyancsak karotintermelő járomspórás *Blakeslea* és *Phycomyces* terpénbioszintézisére (KUZINA és CERDÁ-OLMEDO 2006) és stimulálja a HmgR enzim aktivitását *Borrelia burgorferi* esetében (VAN LAAR és mtsi. 2012). A *hmgR2* és a *hmgR3* glükózon is erőteljes transzkripciót mutatott. Korábban a glükóz kiváló szénforrásnak bizonyult a *Mucor* terpénbioszintézise és karotinoidtermelése szempontjából (MOSQUEDA-CANO és GUTIERREZ-CORONA 1995, PAPP és mtsi. 2013).

A *M. circinelloides* és néhány más rokon faj érdekes sajátossága a morfológiai dimorfizmus, vagyis az a jelenség, hogy e gombák oxigén jelenlétében fonalas növekedést mutatnak, oxigén hiányában és/vagy magas hexózkoncentráció jelenlétében viszont fonalasról élesztőszerű növekedésre váltanak (**13/C ábra**). Amikor a *M. circinelloides*-t anaerob körülmények közt tenyésztettük, a *hmgR1* gén transzkripciója szignifikánsan lecsökkent, a *hmgR3* transzkriptumszintje viszont mintegy háromszorosa volt annak, amit aerob tenyésztés során mértünk (**13/A ábra**). Ugyanakkor a *hmgR2* aerob és anaerob tenyésztés során detektált transzkriptumszintje nem tért el lényegesen egymástól.

Ha négynapos anaerob tenyésztést követően az élesztő sejteket 1 órára oxigéntartalmú közegbe helyeztük és ezzel indukáltuk az élesztő forma micéliummá fejlődésének megindulását, mindhárom gén relatív transzkriptumszintje megemelkedett és ez az emelkedés a *hmgR1* és a *hmgR2* esetében volt a legkifejezettebb. A három gén transzkripcióját egymáshoz viszonyítva aerob körülmények közt a *hmgR2*, anaerob körülmények közt a *hmgR3* átíródása volt a legintenzívebb (**13/B ábra**). Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy a környezet oxigéntartalma hatással van a *hmgR* gének átíródására *Mucor*-ban. Jól ismert, hogy az ergoszterin-bioszintézis oxigénigényes folyamat és az alacsony oxigénkoncentráció szabályozó hatását a *hmgR* gének transzkripciójára több gomba, pl. *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *S. cerevisiae* és *S. pombe*, esetében is bizonyították (BIEN és ESPENSHADE 2010). Némileg ahhoz hasonlóan, amit a *M. circinelloides* esetében tapasztaltunk, az oxigéntenzio a *S. cerevisiae* két HMG-KoA-reduktázának működésére is ellentétes hatást gyakorol: aerob körülmények közt a HMG1 erősen és stabilan kifejeződik, míg a HMG2 expressziója gátolt, anaerob tenyésztés esetén viszont, épp ellenkezőleg, a HMG2 aktivitása radikálisan megnő, míg a HMG1-gyé lecsökken (KONING és mtsi. 1996, BURG és ESPENSHADE 2011).

Vizsgáltuk a gomba ergoszterintartalmát is mind aerob, mind anaerob tenyésztést követően. Annak ellenére, hogy a *hmgR3* transzkripciója erősödött, a teljes ergoszterintartalom anaerob közegben radikálisan csökkent (0,2 mg/g<sub>[száraz tömeg]</sub>) az aerob közegben tenyésztett micélium ergoszterintartalmához (5,5 mg/g<sub>[száraz tömeg]</sub>) képest. Hasonló változást figyeltek meg korábban *Mucor*

*genevensis* esetében, ahol  $<0,3$  és  $3 \text{ mg/g}_{[\text{száraz tömeg}]}$  ergoszterintartalmat mértek anaerob és aerob tenyésztést követően (GORDON és mtsi. 1970).



**13. ábra. A *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* gének relatív transzkriptumszintjei (A-B) és a *M. circinelloides* mikromorfológiája (C) aerob és anaerob körülmények közt végzett tenyésztés során.**

**A:** Az egyes gének relatív transzkriptumszintjei az adott gén aerob tenyésztés során mutatott transzkriptumszintjéhez viszonyítva (mindegyik gén esetében az aerob tenyésztést követően mért transzkriptumszintet vettük 1-nek; a szignifikancia szint megállapításához páros t-próbát végeztünk). **B:** A gének relatív transzkriptumszintjei egymáshoz viszonyítva (a *hmgR1* gén aerob tenyésztést követően mért transzkriptumszintjét vettük 1-nek; a szignifikancia szint megállapításához kétmintás t-próbát végeztünk). Az RNS-kivonáshoz és a fénymikroszkópos vizsgálatokhoz az MS12 törzset YNB tápoldatban, állandó megvilágítás mellett 4 napon át,  $25^\circ\text{C}$ -on tenyésztettük. Három független kísérletben kapott értékek átlagát tüntettük fel, szórással együtt. Amennyiben külön nem jelöltük, a \* vagy \*\* az egységnyi érték tekintett értéktől való szignifikáns eltérést jelzi. A fénymikroszkópos ábrákon (C) a méretskála 10  $\mu\text{m}$ -t jelez.

A transzkripció vizsgálatok eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy mindhárom gén átíródik, és úgy tűnik, hogy egyes környezeti faktorok, különösen az oxigénkoncentráció és az ozmotikus viszonyok változásai, befolyásolják a működésüket. E tényezők eltérő hatást gyakorolnak a három gén transzkripciójára, az eltérő szabályozás pedig funkcióbeli különbségekre utal.

### 5.2.1.2. A *M. circinelloides hmgR* gének túlműködtetése (Nagy és mtsi. 2014)

Hogy megvizsgáljuk a *hmgR* gének hatását a *M. circinelloides* karotin- és ergoszterintermelésére, valamint egyéb tulajdonságaira, genetikai transzformációval olyan törzseket hoztunk létre, melyekben az egyes gének túlműködtetése, vagy éppen csendesítése valósítható meg.

A gének túlműködtetése egyrészt a géndózis hatás alapján történt (azaz cirkuláris plazmidokkal végzett genetikai transzformációval megemeltük a vizsgálni kívánt gének kópiaszámát), másrészt ennek során olyan plazmidokat alkalmaztunk, amelyek a három gént a *M. circinelloides* glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz 1 gén (*gpd1*) promóter (*gpd1P*) és terminális (*gpd1T*) szakaszai közé építve hordozták. A *gpd1* gén szabályozó régiói erős kifejeződést biztosítanak az expresszálni szándékozott géneknek (APPEL és mtsi. 2004, LARSEN és mtsi. 2004). A *hmgR1*, a *hmgR2* és a *hmgR3* túlműködtetéséhez szerkesztett pNG1, pNG2 és pNG3 plazmidok leírását az **F2. táblázat** tartalmazza.

Mindhárom gén esetében PEG-közvetítette protoplaszt-transzformációt alkalmaztunk, a recipiens törzs minden kísérletben a *M. circinelloides* MS12 volt. A transzformációs gyakoriság nem tért el lényegesen az egyes plazmidok esetében (6-8 transzformáns telep/10<sup>5</sup> protoplaszt). A bejuttatott plazmidok kópiaszáma némileg fluktuált az egymást követő tenyésztési ciklusok során (**5. táblázat**).

**5. táblázat.** A pNG1, a pNG2 és a pNG3 plazmidok kópiaszáma a transzformánsokban, valamint a transzformánsok és az eredeti *M. circinelloides* törzs (MS12) teljes karotinoid- és ergoszterintartalma.

| Törzs     | Plazmid kópiaszám <sup>a</sup> | Karotinoidtartalom                             | Ergoszterintartalom                          |
|-----------|--------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
|           |                                | ( $\mu\text{g/g}$ [száraz tömeg] $\pm$ szórás) | ( $\text{mg/g}$ [száraz tömeg] $\pm$ szórás) |
| MS12      | -                              | 476 $\pm$ 56                                   | 6,0 $\pm$ 0,8                                |
| MS12+pNG1 | 2-4                            | 460 $\pm$ 68                                   | 5,9 $\pm$ 1,1                                |
| MS12+pNG2 | 7-8                            | 741 $\pm$ 86**                                 | 7,4 $\pm$ 0,8*                               |
| MS12+pNG3 | 1-4                            | 846 $\pm$ 62**                                 | 6,5 $\pm$ 1,1                                |

<sup>a</sup> qPCR analízissel meghatározott plazmid kópiaszám/gazda genom. Minden transzformáció esetében, a kópiaszám, valamint a karotinoid- és az ergoszterintartalom három független transzformáns törzsben mért eredmény alapján lett feltüntetve. A kópiaszám esetében a két szélsőértéket, a karotinoid- és az ergoszterintartalom esetében a három mérés átlaga  $\pm$  a szórás adtuk meg. A \* és \*\* a kétmintás t-próbával kapott szignifikáns eltérést jelölik az MS12 megfelelő értékétől ( $p < 0,01$ , illetve  $p < 0,05$ ). Minden elemzésben, egy adott transzformáns esetében, a karotinoid-, az ergoszterin- és a DNS-kivonás ugyanazon micéliumból történt (4 napos, YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett, 25 °C-on végzett tenyésztést követően).

A transzformánsokban az emelt kópiaszámban hordozott gén transzkripció szintje szignifikánsan ( $p < 0,01$ ), géntől függően nyolc-tízszeresére emelkedett, míg a többi géné nem változott, ami mutatja a gének túlműködtetésének eredményességét. A pNG2 és pNG3 plazmidokat hordozó transzformánsok összkarotinoid-tartalma szignifikánsan nagyobb volt az eredeti MS12 törzsben mért értéknél (**5. táblázat**). Mivel a karotinoidok előanyaga is a mevalonsav-úton szintetizálódik, a HMG-KoA-reduktáz kifejeződése befolyásolhatja a karotinoidtartalmat. Korábban a kódoló gén túlműködtetésével és/vagy heterológ expressziójával sikerült növelni a

karotinoidprodukción, többek közt *C. utilis*, *N. crassa*, *S. cerevisiae* és *Y. lipolytica* gombákban (SHIMADA és mtsi. 1998, WANG és KEASLING 2002, YAN és mtsi. 2012, ZHU és JACKSON 2015).

Az ergoszterintartalom csak a *hmgR2* gént extra kópiákban hordozó transzformánsokban emelkedett meg némiképp, a többi transzformánsban nem változott (**5. táblázat**).

Vizsgáltuk a transzformánsok sztatinnal, a HMG-KoA-reduktáz szelektív gátlószereivel, szembeni érzékenységét is (**6. táblázat**). E vegyületek az enzim szubsztrátjával kompetitíven kötődnek az aktív helyhez és így gátolják annak működését. A járomspórás gombák több korábbi, köztük általunk is végzett, vizsgálatban érzékenynek bizonyultak e vegyületcsoporttal szemben (LUKÁCS és mtsi. 2004, CHAMILOS és mtsi. 2006, GALGÓCZY és mtsi. 2007, 2009, 2010, NYILASI és mtsi. 2010a,b, BELLANGER és mtsi. 2016). Lovasztatin esetében igazolták, hogy apoptózis jellegű folyamatokat indukál *Mucor*-ban, elsősorban egyes fehérjék (pl. Ras proteinek) prenilcsoportjainak szintézisében okozott zavarok következtében (ROZE és LINZ 1998). Hasonló eredményeket kaptak újabban *R. oryzae* esetében is (BELLANGER és mtsi. 2016). Meghatároztuk a fluvasztatin, a rozuvasztatin és az atorvasztatin MIC<sub>90</sub> értékét (a 90%-os növekedésgátláshoz szükséges minimális gátló koncentráció) az egyes transzformánsokkal és az eredeti MS12 törzzsel szemben (**6. táblázat**). A pNG2 és pNG3 plazmidokat hordozó törzsek jelentősen kisebb érzékenységet mutattak a sztatinnal szemben, mint az eredeti MS12 törzs.

**6. táblázat.** A fluvasztatin, rozuvasztatin és atorvasztatin, a *hmgR* géneket extra kópiában hordozó transzformánsokkal és az eredeti *M. circinelloides* törzzsel (MS12) szemben mutatott minimális gátló koncentrációja (MIC<sub>90</sub>).

| Törzs / Sztatin | Fluvasztatin<br>(µg/ml) | Atorvasztatin<br>(µg/ml) | Rozuvasztatin<br>(µg/ml) |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| MS12            | 4                       | 16                       | 32                       |
| MS12+pNG1       | 4                       | 16                       | 32                       |
| MS12+pNG2       | 32                      | 256                      | >256                     |
| MS12+pNG3       | 64                      | >256                     | >256                     |

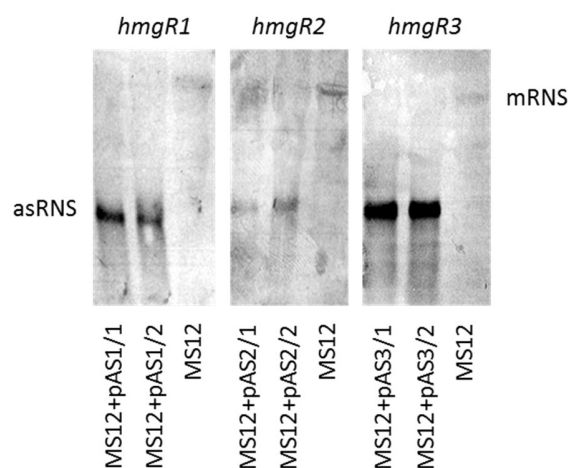
A MIC<sub>90</sub> értéket minden a transzformációs kísérletek során szelektált törzsre meghatároztuk. A teszteket 96-lyukú mikrotiter lemezen végeztük. A fluvasztatint (Lescol, Novartis), rozuvasztatint (Crestor, Astra Zeneca) és atorvasztatint (Atoris, Krka) a törzsoldatok elkészítéséhez metanolba oldottuk, majd a megfelelő koncentráció eléréséhez a hígításokat YNB tápoldattal készítettük el. Az inokulumokat szintén YNB tápoldatban készítettük el, a mikrotiter lemez lyukakba 10<sup>4</sup> sporangiospórát oltottunk. A lemezeket 25 °C-on, 48 órán át inkubáltuk, majd a tenyészetek optikai denzitását (OD<sub>620</sub>) spektrofotométerrel határoztuk meg. A kalibrációhoz a nem beoltott tápoldatot használtuk és a sztatinnalmentes tápoldatban mért értéket vettük 100%-os növekedésnek.

Tehát mind a *hmgR2*, mind a *hmgR3* gének túlműködtetése emelte a karotinoidszintet és csökkentette a gomba érzékenységét a vizsgált sztatinnal szemben. A *hmgR1* gén kópiaszámának emelése ugyanakkor nem volt hatással a vizsgált tulajdonságokra; további vizsgálatok szükségesek, hogy eldönthessük, van-e a génnek valamilyen, esetleg speciális, szerepe. Eredményeink azt jelzik, hogy a *hmgR2* és a *hmgR3* terméke részben ugyanazon folyamatokban vesz részt, illetve funkcióik átfednek. Ugyanakkor transzkripciójuk elemzése azt sugallja, hogy eltérő szabályozás alatt állnak.

Mindkét gén használhatónak tűnik a terpén- és karotin-bioszintézis javítását célzó rekombináns törzsnemesítésre is.

### 5.2.1.3. A *M. circinelloides hmgR* gének csendesítése

A *hmgR* gének csendesítését antiszensz RNS (asRNS) technikával valósítottuk meg. A csendesítési konstrukciók (pAS1, pAS2 és pAS3, ahol a számok a megfelelő gént jelölik) alapja a pPT81 plazmid volt (lásd 5.4.1. fejezet), melybe az adott *hmgR* génszakaszt fordított orientációban a *gpd1P* és *gpd1T* régiók közé építettük be *NotI-XhoI* restrikciós hasító helyeket használva (**F2. táblázat**). A génszakaszok felszaporításához használt primereket az **F3. táblázat** tartalmazza. A *hmgR1* esetében (pAS1) a csendesítéshez használt szakasz 662 bp (a gén 5' végétől számított 29-690 nukleotid), a *hmgR2* esetében (pAS2) 626 bp (a gén 5' végétől számított 21-646 nukleotid) és a *hmgR3* esetében (pAS3) 697 bp (a gén 5' végétől számított 52-748 nukleotid) hosszú volt. A létrehozott vektorokat külön-külön az MS12 törzsbe juttattuk PEG-közvetítette protoplaszt-transzformációval. A pAS1 és pAS3 vektor esetében 6-6, míg a pAS2 vektorral 3 transzformáns telepet kaptunk. A plazmidokat a gomba autonóm replikatív módon tartotta fenn, a transzformánsok tenyésztését ezért szelektív körülmények között végeztük. A transzformánsokban Northern-hibridizációval sikerült kimutatni a plazmidról átíródó asRNS molekulákat (**14. ábra**).



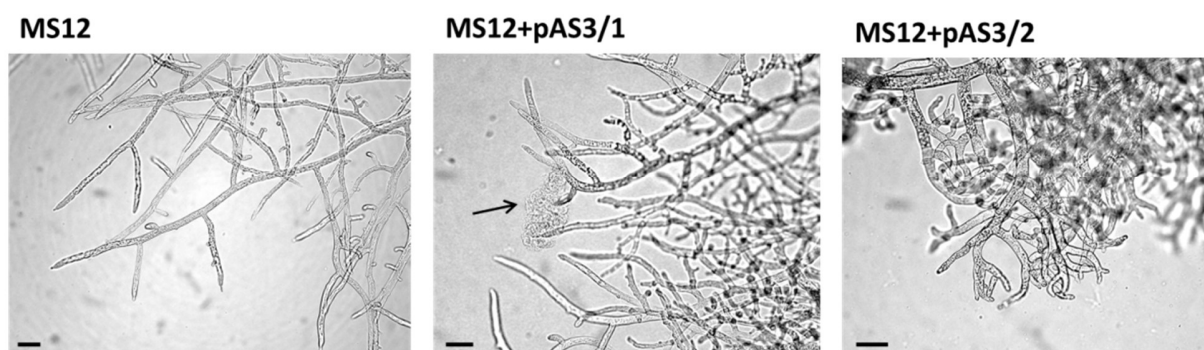
**14. ábra.** Az asRNS kimutatása a vizsgált transzformánsokban Northern-hibridizációval.  
Hibridizációs próbaként a pAS1-3 plazmidokba épített génszakaszokat használtuk.

A csendesítési hatékonyságot transzformációs kísérletenként két-két transzformáns esetében qRT-PCR analízissel vizsgáltuk. Az egy transzformációs kísérletből származó, különböző transzformánsokban némileg eltérő volt a csendesítési hatékonyság, feltételezhetően a bejuttatott plazmidok kópiaszámának eltérése miatt. A *hmgR1* gén relatív transzkripció szintje a csendesített transzformánsokban 90 (MS12+pAS1/1), illetve 70%-kal (MS12+pAS1/2), a *hmgR2* gén relatív transzkripció szintje 75%-kal (MS12+pAS2/1 és MS12+pAS2/2), míg a *hmgR3* gén relatív



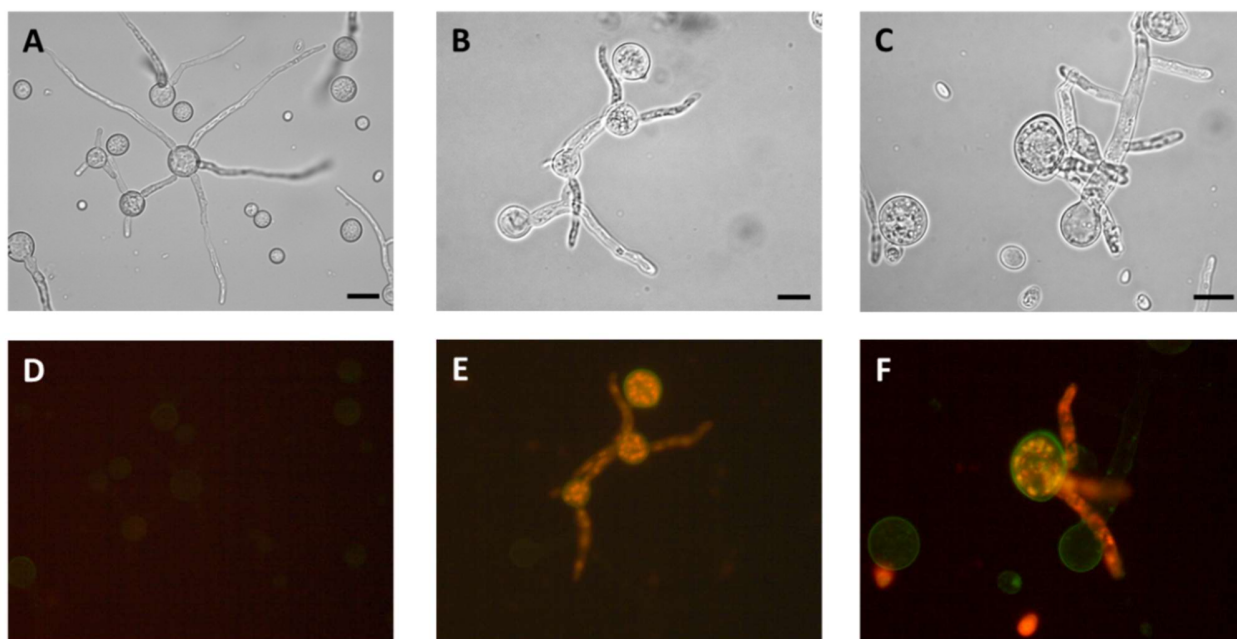
transzkripciós szintje 95 (MS12+pAS3/1) és 90%-kal (MS12+pAS3/2) csökkent az MS12-ben mért értékhez képest. A további vizsgálatok során minden gén esetében e két-két izolátumot elemeztük.

Az MS12+pAS1/1,2 és MS12+pAS2/1,2 transzformánsok spóráinak csírázó- és a telepek növekedési képessége nem különbözött jelentősen az eredeti MS12 törzsétől. Ugyanakkor mindkét MS12+pAS3 transzformáns esetében a spórák csírázása kétszer annyi időt (8 h) vett igénybe, mint az eredeti törzs esetében (4 h), telepeik átmérője ( $40 \pm 3$  mm) pedig 4 napos tenyésztést követően is szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) kisebb volt az MS12 törzsénél ( $58 \pm 7$  mm). A HMG-KoA-reduktáz szerepét a spórák csírázásában és a vegetatív sejtek növekedésében *S. cerevisiae*-ben is bizonyították (BASSON és mtsi. 1986). *Fusarium graminearum* HMG-KoA-reduktáz gén mutációjának hatására pedig a gomba növekedése lelassult és csökkent virulenciát mutatott búzával szemben (SEONG és mtsi. 2006). A hifák morfológiájának fénymikroszkópos vizsgálata szintén nem mutatott ki szignifikáns változást az MS12+pAS1 és MS12+pAS2 transzformánsokban. Az MS12+pAS3 törzsek esetében azonban a hifák rövidebbek voltak az eredeti törzshöz képest, az elágazások száma jelentősen megnőtt ( $p < 0,05$ ), a hifavégek megduzzadtak és esetenként plazmakiáramlásokat lehetett megfigyelni (**15. ábra**). Mindez arra enged következtetni, hogy *Mucor*-ban a HMGR3-nak lehet jelentősebb szerepe a spórák csírázásában, a gomba morfogenezisében és a micélium fejlődésében.



**15. ábra.** Az MS12, valamint az MS12+pAS3/1 és MS12+pAS3/2 izolátumok hifáinak fénymikroszkópos képe. A törzseket 25 °C-on, YNB tápoldatban neveltük, a vizsgálathoz a leoltástól számított 8. órában vettünk mintákat. A méretskála 10  $\mu$ m-nek felel meg. A nyíl a plazmakiáramlást mutatja.

Az MS12+pAS3 transzformánsok Annexin V-FITC és propídium-jodid festéssel apoptózisszerű folyamatokra utaló festődést mutattak (**16. ábra**). Az annexin V a plazmamembránon kifelé forduló foszfatidil-szerinhez kötődve zöld fluoreszcens fényrel az apoptózis korai fázisát detektálja, míg a propídium-jodid a sejtmagmembrán dezorganizációját követően a DNS-hez kapcsolódva piros fluoreszcens fényt bocsájt ki és az apoptózis késői szakaszára, illetve nekrotikus folyamatokra utal.

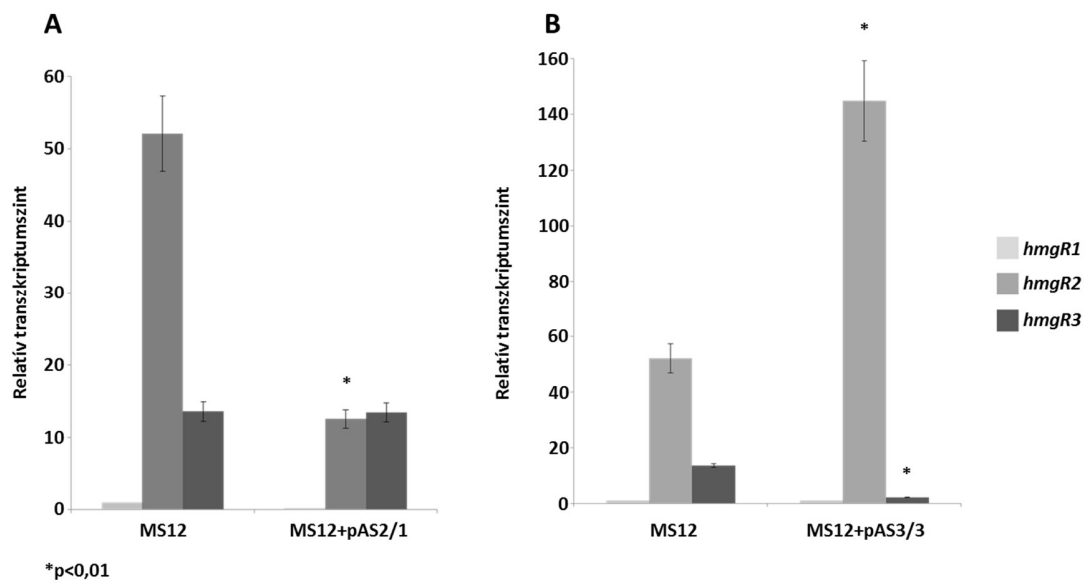


**16. ábra.** Az MS12 (A, D), valamint az MS12+pAS3/1 (B, E) és MS12+pAS3/2 (C, F) izolátumok fény- (A-C) és fluoreszcens (D-F) mikroszkópos képe Annexin V-FITC és propidium-jodid festést követően.

A festést Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit-tel (Sigma) végeztük a gyártó utasításaink megfelelően. A törzseket 25 °C-on YNB tápoldatban neveltük, a vizsgálathoz a leoltástól számított 8. órában vettünk mintákat. A méretskála 10  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

Az egyes *hmgR* gének átíródását qRT-PCR-rel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az MS12+pAS3 törzsekben, melyekben a *hmgR3* gént csendesítettük, radikálisan megnőtt a *hmgR2* gén átíródása, ugyanakkor a *hmgR2* csendesítése esetén a *hmgR3* transzkriptumszintje nem változott szignifikáns mértékben (**17. ábra**). Mindez azt is jelezheti, hogy a HmgR3 funkciójának kiesését a gomba a HmgR2 expressziójának fokozásával „igyekszik” ellensúlyozni, ami ugyancsak megerősíti egyrészt a HmgR3-nak a gomba életképességének fenntartásában játszott fontos és egyedi szerepét, másrészt a két fehérje részben átfedő funkcióját és szabályozását.

Mivel a HMG-KoA-reduktáz az izoprén-bioszintézis korai szakának központi lépését katalizálja, a gén csendesítése ezért befolyásolhatja a különböző izoprén termékek, így egyes fehérjék funkciós csoportját adó prenilcsoportok képződését is. Az FPP és GGPP fontos szerepet játszik a jelátviteli folyamatokban közreműködő, a GTP-ázok családjába tartozó, Ras és Rho fehérjék sejten belüli elhelyezkedésében, membránhoz kapcsolódásában, illetve szállításában, emellett prenilációjuk gátlása számos életfolyamat normális lejátékozódását akadályozza. Mivel e fehérjéknek alapvető szerepe van a sejtproliferáció és a differenciálódás szabályozásában, működésüket emlősökben és emberben intenzíven kutatják, többek közt a daganatok kialakulásával és lehetséges terápiájával kapcsolatban (COLEMAN és mtsi. 2004, WALKER és OLSON 2005).



**17. ábra. A *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* gének relatív transzkriptumszintjei az MS12+pAS2/1 (A) és az MS12+pAS3/3 (B) transzformánsokban az eredeti MS12 törzzsel összehasonlítva.**

Az RNS-kivonáshoz a törzseket YNB tápoldatban, állandó megvilágítás mellett 4 napon át, 25 °C-on tenyésztettük. Az MS12 *hmgR1* gén transzkriptumszintjét vettük 1-nek; a szignifikancia szint megállapításához kétmintás t-próbát végeztünk. Három független kísérletben kapott értékek átlagát tüntettük fel, szórással együtt. A \* az adott gén transzkriptumszintjének MS12-ben mért értékétől való szignifikáns eltérést jelzi.

A Ras homológok gombákban is hatással vannak a morfogenezisre, részt vesznek a környezeti változásokhoz való alkalmazkodásban, a stresszválasz kialakításában, az apoptózisban és számos más folyamatban. Mindezeket keresztül hatást gyakorolnak a patogén fajok, pl. a *Candida albicans*, a *C. neoformans* és az *Aspergillus fumigatus* virulenciájára is (FORTWENDEL 2012). *A. nidulans*-ban a *RasA* gén szükséges a konídiumok megfelelő csírázásához (OSHEROV és mtsi. 2000), míg a *RasB* homológ gén deléciója *A. fumigatus*-ban csökkentette a hifanövekedést és torzult elágazásokat idézett elő (FORTWENDEL és mtsi. 2005). Természetesen a Rho GTP-ázoknak szintén fontos szerepe van a gomba sejtek és hifák morfogenezisében (HARRIS 2011). *Mucor racemosus*-ban a HMG-KoA-reduktáz lovasztatinnal előidézett gátlása zavart okozott a Ras fehérjék prenilációjában, ami az MRas1/p20 fehérje komplex eliminálódásához és az MRas3 felhalmozódásának gátlásához vezetett. Ennek következtében a gomba növekedési rátája és spóráképzése csökkent és a sejtek tipikus apoptózisszerű tüneteket mutattak (ROZE és LINZ 1998). Megjegyzendő, hogy a közelmúltban *R. oryzae* esetében is apoptózis-indukciót detektáltak sztatín kezelés hatására, emellett csökkent a sporangiospórák csírázóképesége és a gomba virulenciája is (BELLANGER és mtsi. 2016). Lehetséges, hogy a *M. circinelloides hmgR3* gén terméke részt vesz a prenilált szignál fehérjék funkció csoportjainak bioszintézisében, ezért működésének gátlása a morfogenezis és a növekedés zavarát, valamint apoptotikus folyamatokat indukál.

A *hmgR2* és *hmgR3* csendesítésének hatására csökkent a transzformánsok karotinoid- és ergoszterintartalma is, a *hmgR1* esetében ilyen hatást nem lehetett kimutatni (7. táblázat). Ez a hatás a *hmgR3* esetében volt a legkifejezettebb.

**7. táblázat. A *hmgR* gének csendesítésének hatása a *M. circinelloides* karotin- és ergoszterintartalmára.**

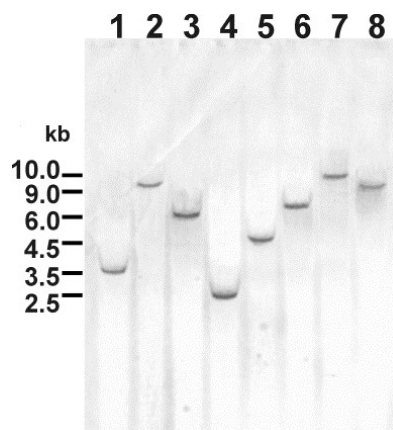
|           | Karotinoidtartalom<br>( $\mu\text{g/g}_{[\text{száraztömeg}]} \pm \text{szórás}$ ) | Ergoszterintartalom<br>( $\text{mg/g}_{[\text{száraztömeg}]} \pm \text{szórás}$ ) |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| MS12      | 476 $\pm$ 65                                                                       | 6,0 $\pm$ 0,8                                                                     |
| MS12+pAS1 | 487 $\pm$ 41                                                                       | 5,1 $\pm$ 0,12                                                                    |
| MS12+pAS2 | 357 $\pm$ 74*                                                                      | 4,4 $\pm$ 0,01*                                                                   |
| MS12+pAS3 | 193 $\pm$ 48**                                                                     | 3,8 $\pm$ 0,16**                                                                  |

A táblázatokban transzformáns típusonként két törzs, három egymástól független tenyésztése után mért eredmények átlagát tüntettük fel. Az MS12 törzs esetében mért értékektől való szignifikáns eltérést \* ( $p < 0,05$ ), illetve \*\* ( $p < 0,01$ ) jelzi. Minden méréshez a karotinoid- és az ergoszterinkivonás ugyanazon micéliumból történt (4 napos, YNB táptalajon, állandó megvilágítás mellett, 25 °C-on végzett tenyésztést követően).

Mindez, a gének túlműködtetésével kapott eredményeket is figyelembe véve, azt mutatja, hogy a karotin- és az ergoszterintermelés szempontjából a *hmgR2* és *hmgR3* működése a meghatározó, a két gén termékének funkciója e tekintetben átfed. Ugyanakkor, a *hmgR3* által kódolt enzimnek létfontosságú szerepe van a normális morfogenezis és sejtingegritás biztosításában is.

**5.2.2. A *R. miehei* HMG-KoA-reduktáz génjének vizsgálata** (Vastag és mtsi. 2004, Lukács és mtsi. 2004, 2009, Takó és mtsi. 2010)

A *Rhizomucor* nemzetség két termofil fajt foglal magába, a *R. miehei*-t és a *R. pusillus*-t. Az előbbinek kiváló extracelluláris lipáz- és proteáz- (pl. rennin) termelőként van biotechnológiai jelentősége (RODRIGUES és FERNÁNDEZ-LAFUENTE 2010, BEPPU és NISHIYAMA 2012), az utóbbi pedig, mint felbukkanó, opportunista humán patogén gomba ismert (RIBES és mtsi. 2000). A két faj lovasztatinnal szembeni érzékenységében markáns különbséget találtunk (LUKÁCS és mtsi. 2004). Mind a 9 tesztelt *R. miehei* izolátum viszonylag ellenállónak bizonyult a sztatinnal szemben, törzstől függően 64 - 128  $\mu\text{g/ml}$  lovasztatin jelenlétében is képes volt növekedésre. Ugyanakkor az általunk tesztelt 18 *R. pusillus* izolátum esetében, 4 - 8  $\mu\text{g/ml}$  lovasztatin már teljes növekedésgátlást okozott. Mivel számos járomspórás gomba több *hmgR* izogénnel rendelkezik (BURMESTER és CZEMPINSKI 1994), az eltérő érzékenység egyik lehetséges okaként a gének eltérő számát feltételeztük (LUKÁCS és mtsi. 2004). Ismert gomba HmgR szekvenciák alapján tervezett degenerált primer párral (HMG1F, HMG2R; **F3. táblázat**) a konzervált, katalitikus régió egy rövid, 314 bp-os szakaszát PCR segítségével felszaporítottuk és a kapott fragmentumot próbaként használva, Southern-hibridizációval igazoltuk, hogy – korábbi feltevéseinkkel szemben – ez a gomba egyetlen *hmgR* génnel rendelkezik (**18. ábra**).



**18. ábra. A *R. miehei* *hmgR* génnek számának vizsgálata Southern-hibridizációval.**

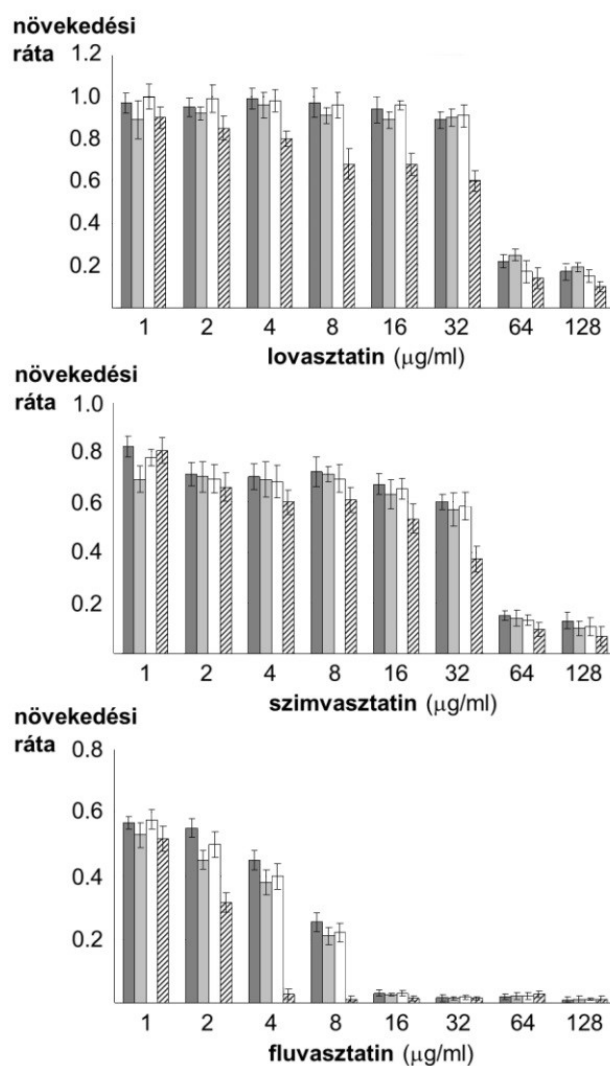
A *R. miehei* genomi DNS-t *Cl*AI (1), *Kpn*II (2), *Eco*RV (3), *Pst*II (4), *Bam*HI (5), *Xho*I (6), *Xba*I (7) és *Sac*I (8) restrikciós enzimekkel emésztettük, a hibridizációt a *hmgR* gén egy erősen konzervált szakaszát tartalmazó próbával végeztük. Az elemzésben használt enzimek a próbába nem hasítottak bele. Minden esetben egyetlen hibridizációs jelet kaptunk.

Hogy megvizsgáljuk e gén szerepét a sztatinokkal szemben mutatott rezisztenciában, valamint a gén alkalmazhatóságát a terpén-bioszintézis fokozására, a *R. miehei* génkönyvtár (Lambda FIX II genom könyvtár a *R. miehei* NRRL 5901 törzséből; átlagos inszertméret: 12 kb; kb. tizenkétszeres lefedettség) és a már említett hibridizációs próba felhasználásával izoláltuk a *R. miehei hmgR* gént (GenBank azonosító: AJ568024). A gén által kódolt fehérje főbb jellegzetességeit és motívumait a **4. táblázat** foglalja össze. A gén átíródását reverz transzkripció PCR kísérletekkel igazoltuk. Ezt követően, az izolált génre alapozva expressziós vektort (pLGY2) készítettünk, melyet *M. circinelloides*-be transzformáltunk, és ebben a rendszerben vizsgáltuk a gén hatását a sztatinok iránti érzékenységre és a terpén-bioszintézisre.

A pLGY2 plazmid elkészítéséhez a teljes *hmgR* gént, a gént határoló promóter és terminális régiókkal együtt, a szelekciós markerként használt *Mucor pyrG* gént tartalmazó pTM7 plazmidba klónoztuk (**F2. táblázat**). A plazmidot PEG-közvetítette protoplaszt transzformációval juttattuk be *M. circinelloides* MS12 törzsbe. A *Rhizomucor hmgR* génjének jelenlétét a transzformánsokban a gén variábilis, 5'-végére tervezett primerekkel (**F3. táblázat**) végzett PCR kísérletekben igazoltuk. A transzformánsok csak szelektív körülmények közt, azaz uracilmentes tápközegben tartották fenn a bejuttatott plazmidot, jelezve, hogy az nem integrálódott a genomba, hanem attól függetlenül replikálódott.

Vizsgáltuk a transzformánsok sztatinokkal szemben mutatott érzékenységét (**19. ábra**). A *Rhizomucor hmgR* gént hordozó transzformánsok kevésbé voltak érzékenyek a tesztelt sztatinokra, mint az eredeti MS12 törzs. Különösen szembetűnő volt ez a változás a fluvasztatin esetében, melyből 4 µg/ml szinte teljesen gátolta a *M. circinelloides* növekedését, míg a transzformánsok növekedési

rátája ugyanezen koncentrációnál kb. 40%-os maradt. Noha a *M. circinelloides* viszonylag kevésbé érzékeny lovasztatinra és szimvasztatinra, a transzformánsok még nagyobb rezisztenciát mutattak velük szemben. A transzformánsok csökkent érzékenysége a géndózis hatással magyarázható és azt mutatja, hogy a *R. miehei hmgR* génje hatékonyan fejeződik ki *Mucor*-ban.



**19. ábra.** A *M. circinelloides* MS12 törzs (csíkozott sávok) és három MS12+pLGY2 transzformáns (sötétszürke, szürke és fehér sávok) növekedése, különböző koncentrációjú sztatinokat tartalmazó YNB tápoldatban.

A tesztek 96-lyukú mikrotiter lemezen végeztük YNB tápoldatban. A fluvasztatin (Lescol, Novartis), lovasztatin (Lescol, Novartis) és szimvasztatin (Vasilip, Egis) törzsoldatokat metanolban oldva készítettük el. A lemezeket 28 °C-on, 48 órán át inkubáltuk, a tenyészetek optikai denzitását ( $OD_{620}$ ) spektrofotométerrel határoztuk meg. A nem beoltott tápoldattal kalibráltunk; a sztatinmentes tápoldatban mért növekedési rátát vettük 1-nek (100%-os növekedés).

Meghatároztuk a transzformánsok teljes karotinoidtartalmát (minimál táptalajon, 4 napig 25 °C-on, állandó megvilágítás mellett tenyésztve) és összehasonlítottuk azt az eredeti, recipiens törzs karotinoidtartalmával (417 µg/ml). A transzformánsok átlagos karotinoidtartalma 432 µg/ml volt,

azaz tulajdonképpen nem változott az eredeti törzshöz képest. Mivel a karotinoidok is a mevalonsav-úton képződnek, csakúgy, mint a membránalkotó ergoszterin, vagy a különböző fehérjék prenilcsoportjai, melyek képződése a sztatin kezelés hatására zavart szenved (ROZE és LINZ 1998, LUKÁCS és mtsi. 2009), és feltételezve, hogy a *R. miehei* egyetlen *hmgR* génnel rendelkezik, várható lett volna, hogy a gén kifejeződése a karotinoidprodukción is befolyásolja.

Számos korábbi vizsgálat azt sugallja, hogy járomspórás gombákban a karotinoid és az ergoszterin és talán más prenilkomponensek képződése is eltérő erre specializált kompartmentekben zajlik már a korai lépésektől (azaz a mevalonsav képződésétől) kezdve (BEJARANO és CERDA-OLMEDO 1992, RUIZ-ALBERT és mtsi. 2002, KUZINA és mtsi. 2006). Ha ez a helyzet a *M. circinelloides* esetében is, lehetséges, hogy az exogén eredetű HmgR fehérje nem jut be a megfelelő kompartmentbe, pl. a transzmembrán doméneket is tartalmazó variábilis, 5'- régió különbségei miatt. Mindenesetre az a tény, hogy a *R. miehei hmgR* kifejeződése eltérő hatást gyakorolt a *M. circinelloides* sztatinérzékenységére és karotinoid-bioszintézisére, alátámasztja az utóbbinak a többi prenilszármazék bioszintézisétől való feltételezett függetlenségét (BEJARANO és CERDA-OLMEDO 1992).

### 5.2.3. A *M. circinelloides* IPP-izomeráz, valamint FPP- és GGPP-szintáz génjeinek vizsgálata

A HMG-KoA-reduktáz által katalizált reakció mellett, a terpénvegyületek képződése szempontjából sebesség-meghatározónak tartják az IPP-egységek keletkezését és kondenzációját is, melyek során a specifikus terpenoid-bioszintézis utak prekursorai jönnek létre (lásd **3. ábra**). Ebből a szempontból korábbi vizsgálatok során az IPP és a DMAP izomerizációjáért felelős IPP-izomeráz, valamint az izoprén egységek kondenzációját katalizáló prenil-transzferázok, különösen az FPP- és GGPP-szintázok bizonyultak a legfontosabb enzimeknek (KAJIWARA és mtsi. 1997, LIANG és mtsi. 2002, SZKOPÍŃSKA és PŁOCHOCKA 2005).

#### 5.2.3.1. A *M. circinelloides* IPP-izomeráz (*ipi*) és GGPP-szintáz (*carG*) gének izolálása és jellemzése (Velayos és mtsi. 2003, Csernetics és mtsi. 2011)

*M. circinelloides* cDNS alapú expressziós könyvtárat egy *Erwinia uredovora* karotin-bioszintézis géneket hordozó és így  $\beta$ -karotin-termelésre képes *E. coli* törzsbe (VELAYOS 2000) transzformálva három olyan baktérium telepet kaptunk, melyek színe megváltozott, illetve intenzívebb sárga színű volt, mint a kontroll *E. coli* törzs. E telepek összkarotinoid-tartalma magasabb volt, mint az eredeti, nem transzformált *E. coli* törzssé. Mindhárom klón ugyanazt a cDNS-t hordozta, melynek szekvenciája nagy hasonlóságot mutatott más organizmusokból ismert IPP-izomerázokkal.

A teljes *ipi* gén és az azt határoló szakaszok nukleotid sorrendjét PCR-alapú DNS séta (*DNA walking*) technikával határoztuk meg (EMBL/GenBank azonosító: AM903092), majd a teljes 2058 bp hosszú fragmentumot PCR segítségével felszaporítottuk és pBluescript II SK plazmidba klónoztuk. A *M. circinelloides ipi* gén egy 225 aminosavból álló fehérjét kódol. A gén 4 darab 57, 57, 61 és 57 bp hosszú intront tartalmaz. Időközben meghatározták a *M. circinelloides* teljes genom szekvenciáját. Az általunk azonosított *ipi* gén és az általa kódolt fehérje teljes egyezést mutat a *M. circinelloides* genom adatbázisban található feltételezett IPP-izomeráz génnel (JGI, <http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.info.html>; scaffold 02, 4087315-4088347) és az általa kódolt aminosav szekvenciával (protein ID: 155452). A genom adatbázisban végzett keresések szerint a *M. circinelloides* egyetlen IPP-izomeráz génnel rendelkezik. Az IPI aminosav szekvenciával a *P. blakesleeanus* és *R. oryzae* genom adatbázisban végzett keresés, *P. blakesleeanus* esetében egy (protein ID: 29590), *R. oryzae* esetében pedig két (protein ID: RO3G\_13592.1 és RO3G\_07411.1) nagy hasonlóságot mutató feltételezett fehérjét eredményezett.

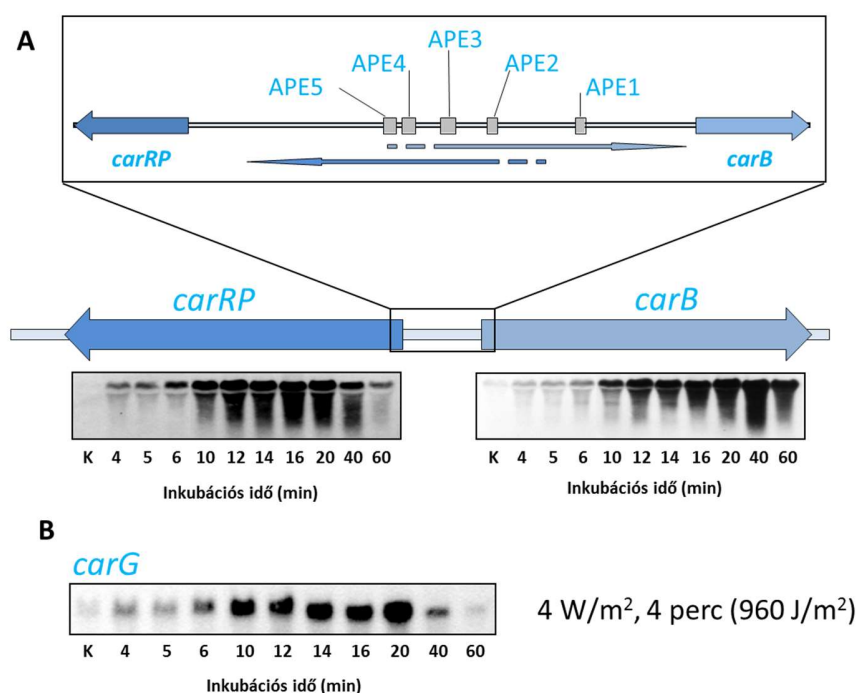
Az *ipi* gén által kódolt feltételezett fehérje számított molekulatömege 26 kDa. A katalitikus régió (18-208. aminosav) tartalmazza az ún. NUDIX (*nucleoside diphosphate linked to some other moiety X*) hidrolázok családjára jellemző konzervált domént (49-199. aminosav) (BERTHELOT és mtsi. 2012). Az aktív helyre jellemző és az enzimaktiváshoz szükséges konzervált pozíciójú ciszteint (C85) és glutaminsavat (E147) (BERTHELOT és mtsi. 2012) ugyancsak sikerült azonosítani.

A GGPP-szintáz (mely a karotinbioszintézis közvetlen prekursoraként szolgáló GGPP szintézisét katalizálja; lásd **3. ábra**) kódoló *carG* gén izolálását a Salamancai Egyetem, Genetikai és Mikrobiológiai Tanszékén végezték (VELAYOS és mtsi. 2003). E munkálatokba a kutatócsoport tagjaként magam is bekapcsolódtam. A gén izolálásához a *M. circinelloides* cDNS könyvtárát használtuk. A génkönyvtár szűréséhez a pGGPP plazmidba klónozott *Gibberella fujikuroi ggs1* génjének egy szakaszát (MENDE és mtsi. 1997) használtuk hibridizációs próbaként. A gén átíródásának iniciációs pontját, mely a -194. pozícióban található, primer extenziós elemzéssel állapítottuk meg. Az izolált gén EMBL/GenBank azonosítója: AJ276129. A *M. circinelloides carG* gén 1223 bp hosszú, 6 intront tartalmaz és egy 303 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekulatömege 34,78 kDa. Az izolált génnel végzett hibridizációs analízis szerint a *M. circinelloides* genomja egy *carG* gént tartalmaz. Ezt az eredményt később a gomba teljes genom szekvenciájának elemzése is megerősítette. Ismert prenil-szintázokkal végzett szekvencia-összehasonlítások alapján, a *M. circinelloides carG* gén által kódolt fehérje az *E*-prenilPP-szintázok, azon belül is a III. típusú GGPP-szintázok, csoportjába tartozik. A konzervált poliprenil-szintáz domén a 17. és a 270. aminosavak közt található és tartalmazza az aktív hely kialakításában szerepet játszó, a prenil-



szintázokra jellemző aszparaginsavban gazdag ún. FARM és SARM régiókat (66-80. és 185-197. aminosavak).

A *carG* gén promóterének szekvenciaelemzése során három olyan motívumot találtunk, mely hasonlóságot mutat a *N. crassa* GGPP-szintáz génjének (*al-3*) promóterében leírt ún. APE (*al-3 proximal element*) szekvenciákkal (GAANNTTCC) (CARATTOLI és mtsi. 1994). Ezek a következők voltak: GAAACTTTAC (a –50. pozícióban), GAAAAAGCTTG (a –61. pozícióban) és GAATTGCC (a –92. pozícióban). *N. crassa* esetében e motívumok esszenciálisnak bizonyultak az *al-3* gén átíródásának fény általi indukciója szempontjából és más fény indukálta gének promóterében is megtalálhatók. *M. circinelloides*-ben, a karotin-bioszintézis specifikus lépéseit kódoló *carB* és *carRP* gének promóterében szintén találtunk az APE szekvenciákhoz hasonló szakaszokat (20/A ábra). E gének esetében korábban Northern-hibridizációs elemzéssel bizonyították, hogy átíródásukat a kék fény indukálja (VELAYOS és mtsi. 2000a, 2000b).



**20. ábra. A *carG*, *carB* és *carRP* gének összehangolt fényindukciója.**

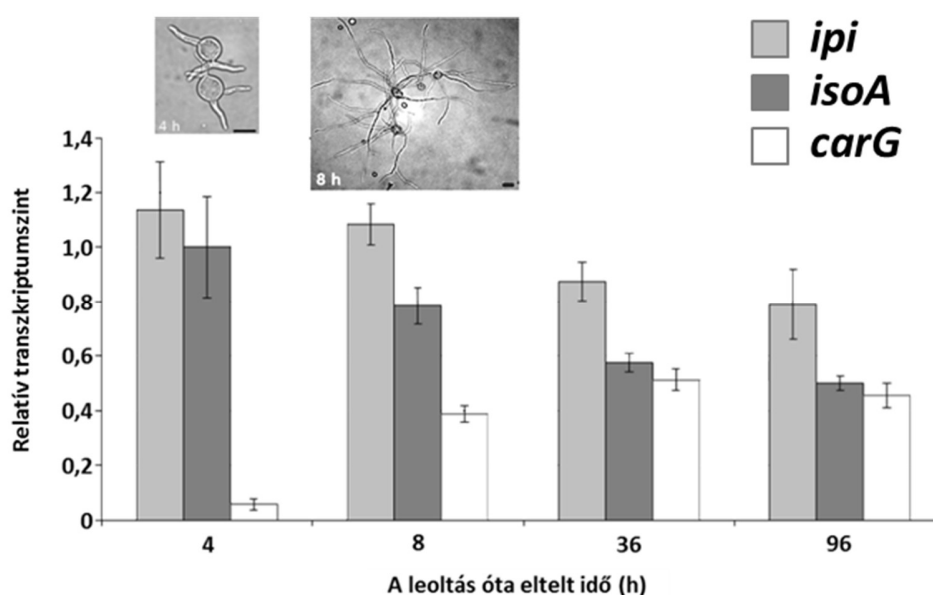
**A:** A *M. circinelloides* *carB* és *carRP* gének elhelyezkedése a genomban és az APE elemek eloszlása a két gén közös promóter régiójában, valamint egy példa a *carB* és *carRP* gének transzkriptumainak fényindukciót követő akkumulációjára; Iturriaga és mtsi. (2000) nyomán. **B:** A *carG* transzkriptumának fény indukálta akkumulációja. A transzkriptumok akkumulációjának vizsgálata specifikus génpróbákkal végzett Northern-analízissel történt. A fényindukcióra minden esetben 3 nap sötétben végzett tenyésztés után került sor 4 W/m², 4percig tartó kék fényimpulzussal (960 J/m²). Az RNS-kivonás a fényindukciót követően 4-60 perces sötétben végzett inkubáció után történt (K: folyamatosan sötétben nevelt kontroll).

A három gén (*carG*, *carB* és *carRP*) promóter szekvenciájának összehasonlításával megállapítottuk a *Mucor*-ra jellemző, az egyes gének kék fény általi indukcióját meghatározó APE

motívumok konszenzus szekvenciáját: GRAN<sub>(1-6)</sub>TTGYY.

Kék fényel történő besugárzást követő Northern-analízissel a *carG* gén esetében is bizonyítottuk, hogy a gén átíródását a kék fény indukálja, illetve fokozza (**20. ábra**). Azt is megállapítottuk, hogy a fényimpulzus ugyanolyan hatással van a *carG* transzkriptumok felhalmozódására, mint az említett karotinoidspecifikus génekére, azaz a *carG*, a *carB* és a *carRP* gének összehangolt fényszabályozás alatt állnak (VELAYOS és mtsi. 2003). Egyes fajoktól (pl. *B. trispora* vagy *X. dendrorhous*) eltérően, a fényindukció szükséges a *M. circinelloides* karotintermeléséhez (AVALOS és LIMÓN 2015). A karotintermelés fényszabályozásának háttere és a fénytől független termelés megvalósítása kutatott terület (NAVARRO és mtsi. 2001, 2013, ZHANG és mtsi. 2016).

Számos tanulmány szerint az IPP-izomeráz, valamint az FPP- és GGPP-szintázok, az általános mevalonsav-út második szakaszának sebesség-meghatározó kulcsenzimek (LEE és SCHMIDT-DANNERT 2002, DAS és mtsi. 2007, LIAO és mtsi. 2016). Ezért qRT-PCR analízis segítségével elemeztük és összehasonlítottuk az általunk leírt *ipi* és *carG*, valamint a VELAYOS és mtsi. (2004) által azonosított, az FPP-szintáz kódot *isoA* gén kifejeződését a gomba növekedése során (**21. ábra**).



**21. ábra.** A vizsgált izoprén-bioszintézis gének relatív transzkriptumszintjei a *M. circinelloides* MS12 törzsének tenyésztése során.

A *M. circinelloides* MS12 törzsét 25 °C-on, folytonos megvilágítás mellett, YNB tápközegben tenyésztettük. Az egyes mérések esetében, a reverz transzkripciót mindhárom génre ugyanabból az RNS mintából végeztük. Az *isoA* gén 4 óra elteltével mért transzkriptumszintjét vettük 1-nek.

Négy órával a leoltást követően, azaz a sporangiosopórák csírázásakor, az *ipi* és az *isoA* szignifikánsan nagyobb transzkriptumszinteket mutatott, mint a *carG*, jelezve, hogy az előbbi gének

átíródása már a csírázó spórákban intenzíven zajlik. Később a hifákban az *ipi* és az *isoA* transzkripció szintje csökken, és alacsonyabb szinten stabilizálódik, bár az *ipi* gén transzkriptumszintje még a tenyésztés negyedik napján is közel kétszerese volt a másik két gén esetében mértnek. A *carG* viszonylag egyenletesen fejeződött ki a micéliumban, valószínűleg a folytonos megvilágításnak is köszönhetően.

#### **5.2.3.2. *A M. circinelloides* IPP-izomeráz, valamint FPP- és GGPP-szintáz génjeinek hatása a karotinoidtermelésre** (Csernetics és mtsi. 2011)

Hogy megvizsgáljuk az IPP-izomeráz, valamint FPP- és GGPP-szintázok, mint az általános izoprenoid-bioszintézis kulcslépéseit katalizáló enzimek génjeinek hatását a karotinoid-bioszintézisre és alkalmazhatóságát a karotinoidtermelés javítására, olyan *M. circinelloides* törzseket hoztunk létre, amelyekben az említett enzimeket kódoló *ipi*, *isoA* és *carG* géneket túlműködtettük, majd elemeztük e törzsek karotinoidtermelését.

A gének túlműködtetéséhez olyan expressziós vektorokat építettünk, amelyek a géneket külön-külön hordozzák, de alkalmasak kotranszformációval a két gén együttes bevitelére is. Az így előállított plazmidok egy része az egyes géneket saját szabályozó régióival együtt tartalmazta (pCA10, pAVB160, pCA6), más részükben e saját promóter és terminális szakaszokat a *Mucor gpdI* gén szabályozó régióira (*gpdIP* és *gpdIT*) cseréltük (pPT83 – pPT86; **F2. táblázat**). Szelekciós markerként a *Mucor leuA* vagy *pyrG* gént használtuk, melyek a *M. circinelloides* MS12 törzs leucin, illetve uracil auxotrófiáját komplementálják. Az MS12 kettős auxotróf törzs vad típusú a karotinoidtermelésre nézve. Az egyes géneket hordozó plazmidokat, külön-külön és a lehetséges kombinációkban, PEG-közvetítette protoplaszt-transzformációval juttattuk be a recipiens törzsbe. Az egyes kísérletekben hasonló transzformációs gyakoriságot kaptunk (15-25 transzformáns/10<sup>5</sup> protoplaszt), mely nem függött attól, hogy egy vagy két plazmiddal végeztük-e a transzformációt, vagy, hogy melyik szelekciós markert alkalmaztuk. A transzformánsok Southern-hibridizációs elemzése azt mutatta, hogy azok a plazmidokat autonóm replikálódó elemként tartották fenn. A plazmidok kópiaszámát qPCR analízissel vizsgáltuk a transzformánsokban, 5 független tenyésztési ciklus során (**8. táblázat**). A plazmidok kópiaszáma 0,3 és 7 kópia/gazda genom közt változott, a kotranszformánsokban a két plazmid kópiaszáma rendszerint különböző volt. Minden transzformáns autonóm replikatív úton fenntartotta a plazmidokat mind szelektív (YNB táptalajon), mind nem-szelektív (MEA táptalajon) körülmények között, noha a kópiaszám az egyes tenyésztési ciklusok során némileg ingadozott. A transzformánsok mitotikus stabilitása nem függött attól, hogy egy vagy két plazmidot hordoznak-e.

**8. táblázat.** A bejuttatott plazmidok kópiaszáma az *ipi*, *isoA* és *carG* gének túlműködtetése érdekében létrehozott transzformánsokban és a transzformánsok karotinoidtartalma.

| Törzs                                                      | Plazmidok<br>kópiaszáma <sup>a</sup> | Összkarotinoid-<br>tartalom<br>( $\mu\text{g/g}$ [száraz tömeg]<br>$\pm$ szórás) | $\beta$ -Karotin-<br>tartalom<br>( $\mu\text{g/g}$ [száraz tömeg]<br>$\pm$ szórás) |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| MS12                                                       | –                                    | $399 \pm 27$                                                                     | $257 \pm 18$                                                                       |
| MS12+pAVB107 ( <i>leuA</i> )                               | 1 - 2                                | $408 \pm 57$                                                                     | $255 \pm 36$                                                                       |
| MS12+pEPM9 ( <i>pyrG</i> )                                 | 1                                    | $370 \pm 91$                                                                     | $232 \pm 58$                                                                       |
| MS12+pAVB107 ( <i>leuA</i> );<br>pEPM9 ( <i>pyrG</i> )     | 1<br>2                               | $417 \pm 83$                                                                     | $268 \pm 71$                                                                       |
| MS12+pPT43leu ( <i>leuA</i> )                              | 3                                    | $425 \pm 77$                                                                     | $272 \pm 49$                                                                       |
| MS12+pPT43pyr ( <i>pyrG</i> )                              | 1                                    | $395 \pm 37$                                                                     | $259 \pm 24$                                                                       |
| MS12+pPT43leu ( <i>leuA</i> );<br>pPT43pyr ( <i>pyrG</i> ) | 1 - 3<br>1 - 2                       | $400 \pm 74$                                                                     | $229 \pm 42$                                                                       |
| MS12+pCA10 ( <i>ipi</i> )                                  | 1                                    | $674 \pm 230$                                                                    | $452 \pm 159$                                                                      |
| MS12+pAVB160 ( <i>isoA</i> )                               | 0,3 - 1                              | $584 \pm 126$                                                                    | $369 \pm 84$                                                                       |
| MS12+pCA6 ( <i>carG</i> )                                  | 6 - 7                                | $718 \pm 110$                                                                    | $485 \pm 76$                                                                       |
| MS12+pCA10 ( <i>ipi</i> )<br>+pAVB160 ( <i>isoA</i> )      | 3<br>1                               | $1392 \pm 396$                                                                   | $881 \pm 248$                                                                      |
| MS12+pCA10 ( <i>ipi</i> )<br>+pCA6 ( <i>carG</i> )         | 2<br>0,3 - 1                         | $745 \pm 149$                                                                    | $452 \pm 95$                                                                       |
| MS12+pAB160 ( <i>isoA</i> )<br>+pCA6 ( <i>carG</i> )       | 2<br>2                               | $808 \pm 148$                                                                    | $463 \pm 91$                                                                       |
| MS12+pPT85 ( <i>ipi</i> *)                                 | 2                                    | $1177 \pm 218$                                                                   | $753 \pm 140$                                                                      |
| MS12+pPT83 ( <i>isoA</i> *)                                | 3 - 6                                | $1209 \pm 81$                                                                    | $794 \pm 53$                                                                       |
| MS12+pPT84 ( <i>carG</i> *)                                | 2 - 4                                | $1959 \pm 389$                                                                   | $1322 \pm 263$                                                                     |
| MS12+pPT85 ( <i>ipi</i> *)<br>+pPT83 ( <i>isoA</i> *)      | 4 - 6<br>1 - 4                       | $1504 \pm 141$                                                                   | $862 \pm 75$                                                                       |
| MS12+pPT85 ( <i>ipi</i> *)<br>+pPT84 ( <i>carG</i> *)      | 5<br>2                               | $1004 \pm 180$                                                                   | $624 \pm 116$                                                                      |
| MS12+pPT86 ( <i>isoA</i> *)<br>+pPT84 ( <i>carG</i> *)     | 1 - 6<br>1 - 4                       | $1298 \pm 350$                                                                   | $783 \pm 214$                                                                      |

<sup>a</sup>Kópiaszám / gazda genom. Minden a táblázatban feltüntetett érték öt független kísérletben kapott eredmény átlagának felel meg. A kópiaszám meghatározást és a karotinoidkivonásokat ugyanazon mintákból végeztük. A törzseket a DNS- és karotinoidkivonáshoz 1% glükóz tartalmú YNB táptalajon 4 napon át, 25 °C-on, folytonos megvilágítás mellett tenyésztettük. \* jelzi a *gpdI* promóter és terminátor szakaszokkal összeépített géneket.

A pCA10, pAVB160 és pCA6 plazmidokat, amelyek az izoprén-bioszintézis géneket a saját promóter és terminális régiók közt hordozták, tartalmazó transzformánsok összkarotinoid- és  $\beta$ -karotin-tartalma jelentősen megnőtt az eredeti törzshöz képest, a géndózis hatás következtében (8. táblázat).

A transzformánsok másik csoportja a pPT83 - pPT86 plazmidokat hordozta. Ezekben a gének túlműködéséhez, a kópiaszám növelése mellett, az erősebb kifejeződést biztosító *gpdI* szabályozó régiók is hozzájárultak. E transzformánsok karotinoidtartalma, a várakozásoknak megfelelően,

jelentősen meghaladta a nem módosított géneket extra kópiában hordozó transzformánsokét (**8. táblázat**).

Noha a plazmidok kópiaszáma ingadozott az egyes áttöltések között és ennek következtében a különböző tenyésztések során mért karotinoidmennyiségek meglehetősen nagy szórást mutattak, a kísérletek eredményei általános következtetések levonására is alkalmasak voltak. Minden kísérletben egyetlen gén bevitele (függetlenül attól, hogy az adott gén átíródását a saját vagy a *gpdI* promóter szabályozta) a következő sorrendben növelte a karotinoidprodukción:  $carG > ipi > isoA$ . Hasonlóképpen, a génkombinációkkal végzett transzformációknál, minden mérés során, az egyes kombinációk a következő sorrendben fokozták a karotinoidtermelést:  $ipi + isoA > isoA + carG > ipi + carG$  (ugyancsak függetlenül a szabályozó régiók milyenségétől). Kontrollként a transzformációs és kotranszformációs kísérleteket a csak a szelektációs marker géneket tartalmazó plazmidokkal (pEPM9, AVB107, pPT43leu és pPT43pyr) is elvégeztük. Az így nyert transzformánsok karotinoidtartalma nem tért el szignifikánsan a recipiens törzstől (**8. táblázat**), ami alátámasztja, hogy az *ipi*, *isoA* és *carG* géneket extra kópiában hordozó törzsek megnövekedett karotinoidtartalma a gének túlműködtetésének eredménye és nem vezethető vissza pusztán az auxotrófia komplementálásának következtében kialakult jobb fiziológiai állapotra.

Amennyiben csak egy gén működését módosítottuk, a legnagyobb karotintartalom azokban a transzformánsokban volt megfigyelhető, amelyekben a *carG* gén kópiaszámát emeltük, különösen, ha a bevitt gén a *gpdIP* kontrollja alatt állt. Korábban már megállapítottuk, hogy a *carG* és a  $\beta$ -karotin-bioszintézisért felelős gének közös szabályozás alatt állnak (VELAYOS és mtsi. 2003). Mindez megerősíti a gén működése és a specifikus karotinoid-bioszintézis szoros kapcsolatát.

Az *ipi* gén által kódolt IPP-izomeráz több organizmus esetében is sebesség-megatározónak bizonyult a terpén-, illetve a karotinoid-bioszintézis szempontjából. Heterológ IPP-izomeráz génekkel, illetve az IPP- és DMAP-ellátás javításával jelentősen megnövelhető volt a karotinoidtermelés rekombináns *E. coli*-ban (MISAWA és SHIMADA 1998, ALBRECHT és mtsi. 1999, RODRÍGUEZ-VILLALÓN és mtsi. 2008). Ugyanakkor élesztőkben az IPP-izomeráz gén kifejeztetése, illetve túlműködtetése nem fokozta a karotinoidtermelést (MISAWA és SHIMADA, 1998, VISSER és mtsi. 2005). Kísérleteinkben az *ipi* gén túlműködtetése pozitív hatással volt a *M. circinelloides* karotinoidtermelésére. A kópiaszám emelése önmagában másfélszeresére, az eredetinél erősebb kifejeződést biztosító *gpdIP* alkalmazásával együtt pedig több, mint háromszorosára emelte a gomba összkarotinoid-tartalmát (**8. és 9. táblázat**). A közelmúltban SUN és mtsi. (2012c) sikeresen alkalmazták a rokon *B. trispora* IPP-izomeráz génjét módosított *E. coli* karotintermelésének fokozására. Mindez azt mutatja, hogy az IPP-izomeráz járomspórás gombákban sebesség-

meghatározó a karotinoid-bioszintézis szempontjából és hatékonyan felhasználható a termelés javítására.

**9. táblázat. A *gpd1* expressziós szignálokkal összeépített izoprén-bioszintézis gének transzkripciója és a megfelelő transzformánsok karotinoidtartalma eltérő glükóztartalmú tápközegen végzett tenyésztés esetén.**

| Törzs                                                  | Glükóz-koncentráció (%) | Relatív transzkriptum-szint                               | Összkarotinoid-tartalom<br>( $\mu\text{g/g}_{[\text{száraz tömeg}]}$<br>$\pm$ szórás) |
|--------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| MS12                                                   | 1                       | kontroll <sup>a</sup>                                     | 399 $\pm$ 27                                                                          |
|                                                        | 2,5                     | <i>ipi</i> : 0,6; <i>isoA</i> : 0,7;<br><i>carG</i> : 0,7 | 490 $\pm$ 48                                                                          |
|                                                        | 5                       | <i>ipi</i> : 0,4; <i>isoA</i> : 0,5;<br><i>carG</i> : 0,4 | 436 $\pm$ 37                                                                          |
| MS12+pPT85 ( <i>ipi</i> )                              | 1                       | 11                                                        | 1177 $\pm$ 218                                                                        |
|                                                        | 2,5                     | 61                                                        | 1375 $\pm$ 575                                                                        |
|                                                        | 5                       | 49                                                        | 1102 $\pm$ 431                                                                        |
| MS12+pPT83 ( <i>isoA</i> )                             | 1                       | 17                                                        | 1209 $\pm$ 81                                                                         |
|                                                        | 2,5                     | 50                                                        | 1164 $\pm$ 132                                                                        |
|                                                        | 5                       | 52                                                        | 1104 $\pm$ 210                                                                        |
| MS12+pPT84 ( <i>carG</i> )                             | 1                       | 6                                                         | 1959 $\pm$ 389                                                                        |
|                                                        | 2,5                     | 49                                                        | 1341 $\pm$ 98                                                                         |
|                                                        | 5                       | 44                                                        | 1164 $\pm$ 37                                                                         |
| MS12+pPT85 ( <i>ipi</i> )<br>+pPT83 ( <i>isoA</i> )    | 1                       | <i>ipi</i> : 18;<br><i>isoA</i> : 34                      | 1504 $\pm$ 141                                                                        |
|                                                        | 2,5                     | <i>ipi</i> : 26;<br><i>isoA</i> : 57                      | 1407 $\pm$ 191                                                                        |
|                                                        | 5                       | <i>ipi</i> : 32;<br><i>isoA</i> : 33                      | 1379 $\pm$ 415                                                                        |
| MS12 + pPT85 ( <i>ipi</i> )<br>+pPT84 ( <i>carG</i> )  | 1                       | <i>ipi</i> : 9;<br><i>carG</i> : 2                        | 1004 $\pm$ 180                                                                        |
|                                                        | 2,5                     | <i>ipi</i> : 13;<br><i>carG</i> : 4                       | 983 $\pm$ 174                                                                         |
|                                                        | 5                       | <i>ipi</i> : 12;<br><i>carG</i> : 3                       | 758 $\pm$ 150                                                                         |
| MS12 + pPT86 ( <i>isoA</i> )<br>+pPT84 ( <i>carG</i> ) | 1                       | <i>isoA</i> : 9;<br><i>carG</i> : 8                       | 1298 $\pm$ 350                                                                        |
|                                                        | 2,5                     | <i>isoA</i> : 17;<br><i>carG</i> : 34                     | 875 $\pm$ 33                                                                          |
|                                                        | 5                       | <i>isoA</i> : 16;<br><i>carG</i> : 10                     | 729 $\pm$ 37                                                                          |

<sup>a</sup>Az egyes gének transzkriptumszintjeit minden vizsgált gén esetében, az eredeti MS12 törzs 1% glükózon mért transzkriptumszintjével hasonlítottuk össze (az utóbbit vettük 1-nek). Minden a táblázatban feltüntetett érték öt független kísérletben kapott eredmény átlagának felel meg. Az RNS- és a karotinoidkivonásokat minden esetben ugyanazon mintákból végeztük, melyhez a törzseket 25 °C-on, 4 napon át, folytonos megvilágítás mellett, YNB táptalajon tenyésztettük.

A *M. circinelloides gpd1* génjének kifejeződése ugyan folyamatos a sejtekben, de a glükózkoncentráció emelésével a gén átíródása fokozható (WOLFF és ARNAU 2002, LARSEN és mtsi. 2004). Ezért a pPT83 - pPT85 plazmidokat hordozó transzformánsok karotinoidtermelését eltérő

glükózkoncentrációk (1, 2,5 és 5%, YNB táptalajon) mellett is teszteltük, egyúttal az *ipi*, *isoA* és *carG* gének átíródását is követtük a mintákban qRT-PCR segítségével (**9. táblázat**).

Az eredeti MS12 törzsben mindhárom gén esetében, 2,5 és 5% glükózkoncentráció mellett enyhén csökkent a transzkripció szintje, a karotinoidtartalom viszont nem változott szignifikáns mértékben. A transzformánsokban ugyanakkor – a *gpd1P* működése következtében – jelentősen nagyobb transzkriptumszinteket detektáltunk, mint az MS12 törzsben. A transzformánsokban a három gén átíródása 2,5% glükózon jelentősen megnőtt az 1% glükózon végzett tenyésztéshez képest, ugyanakkor 5% glükózon már nem emelkedett tovább (vagy némileg csökkent is a 2,5% glükózon mért transzkriptumszintekhez képest). A magasabb transzkripciós szintek jelentősen nagyobb karotintartalommal jártak együtt, az MS12 törzshöz, vagy akár azokhoz a transzformánsokhoz képest, amelyek a bevitt géneket saját regulátor régióik kontrollja alatt hordozták. Mindazonáltal ezekben a törzsekben (a pPT83, pPT84, pPT85 és pPT86 plazmidokat hordozó transzformánsokban) a 2,5 és 5% glükózon mért karotinoidtermelés mértéke elmaradt attól, amit 1% glükózon végzett tenyésztés esetében mértünk, ha a karotinoidtartalmat a micélium egységnyi száraz tömegére vonatkoztattuk (**9. táblázat**). Ez azt jelenti, hogy 2,5 és 5% glükózon mért magasabb transzkriptumszintek már nem jártak együtt a száraztömegre vonatkoztatott karotinoidtartalom további emelkedésével.

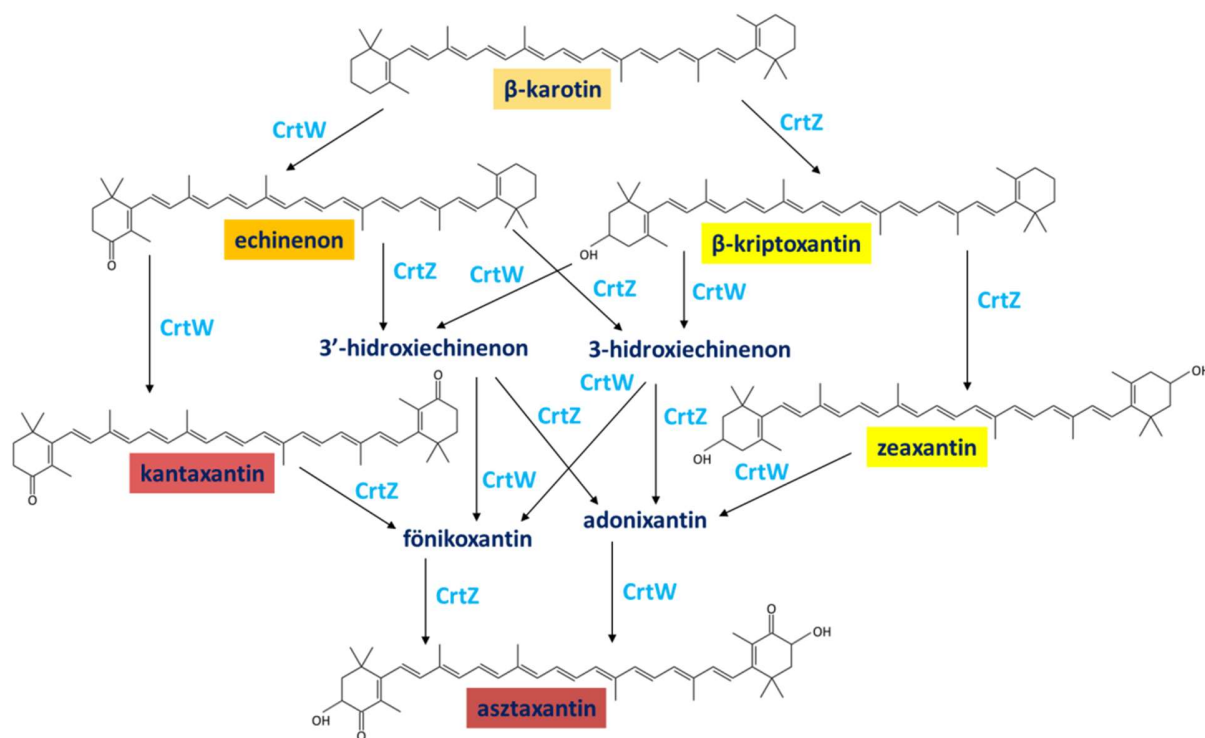
Kevés adat áll rendelkezésre arról, hogy a járomspórás gombák karotinoidtermelése szempontjából a glükóz mennyire megfelelő szénforrás. Egy régebbi tanulmányban, *A. rouxii* karotintermelése olyan komplex tápközegeben volt a leghatékonyabb, amely glükózt tartalmazott szénforrásként (MOSQUEDA-CANO és GUTIERREZ-CORONA 1995). Hasonlóképpen, a tápközegek glükózzal való kiegészítése, fokozta a lipid- és karotinoidakkumulációt *M. circinelloides*-ben és *M. racemosus*-ban (SZCZESNA-ANTCZAK és mtsi. 2006). Azokban a törzsekben, amelyek a *gpd1* szabályozó régiókkal összeépített izoprén-bioszintézis géneket hordozták, 1% glükózkoncentráció mellett lényegesen nagyobb karotinoidtartalmat sikerült elérni, mint a többi transzformánsban; ennél nagyobb glükózkoncentráció azonban úgy tűnik gátolta a bioszintézist.

Kísérleteinkben, az eredmények reprodukálhatósága és összehasonlíthatósága érdekében, a karotinoidtartalom elemzéséhez a tenyésztést minden esetben minimál táptalajon (YNB) végeztük. E rendszerben mg-os nagyságrendű szárazanyag tartalomra vonatkoztatott összkarotinoid-produkciót értünk el. Ez a mennyiség összemérhető a *B. trispora*, mely jelenleg az egyetlen ipari karotinoidtermelésre használt fonalas gomba, vad típusú törzseivel, illetve nem optimalizált tenyésztési körülmények közt elérhető karotinoidtartalommal (KIM és mtsi. 1997, MEHTA és mtsi. 2003). A *B. trispora* IPP-izomeráz és GGPP-szintáz génjeit karotintermelő *E. coli* törzsekben túlműködtetve szintén hasonló karotinoidprodukciót sikerült elérni (SUN és mtsi. 2012c).

Természetesen azt gondoljuk, hogy az általunk előállított törzsek termelőképessége a fermentációs körülmények optimalizálásával jelentősen fokozható. Mindenesetre a fent ismertetett kísérletek azt mutatják, hogy a *M. circinelloides* karotinoidtermelése eredményesen fokozható az izoprén-bioszintézis gének kópiaszámának emelésével és erőteljes kifejeződést biztosító regulátor szekvenciák alkalmazásával. Eredményeink nem csak a karotinoid-bioszintézissel direkt kapcsolatban álló *carG*, hanem a korábbi lépésekért felelős *ipi* és *isoA* gének alkalmazhatóságát is bizonyították.

### 5.3. A SPECIFIKUS KAROTINOID-BIOSZINTÉZIS VIZSGÁLATA: XANTOFILLOK TERMELTETÉSÉT LEHETŐVÉ TEVŐ GÉNEK KIFEJEZTETÉSE *M. CIRCINELLOIDES*-BEN

A különböző organizmusokban a  $\beta$ -karotinból további vegyületek képződhetnek, melyek közül a legfontosabbak a xantofilok, azaz a  $\beta$ -karotin oxigéntartalmú funkciós csoportokat hordozó származékai (lásd 2. ábra). Ebbe a csoportba tartozik a rendkívül értékes asztaxantin, kantaxantin, zeaxantin és  $\beta$ -kriptoxantin is. Utóbbiak lényegében az asztaxantinképződés köztitermékeinek is tekinthetők (22. ábra).



22. ábra. A  $\beta$ -karotin-asztaxantin átalakulás lehetséges lépései és köztitermékei *Paracoccus* sp. N81106 esetében; MISAWA és mtsi. (1995) nyomán. Az egyes lépéseket eltérő hatásfokkal, de ugyanaz a két enzim képes katalizálni; CrtW:  $\beta$ -karotin-ketoláz; CrtZ:  $\beta$ -karotin-hidroxiláz.

A  $\beta$ -karotin - asztaxantin konverzióhoz két enzim, egy  $\beta$ -karotin-hidroxiláz és egy ketoláz, elegendő. Az egyes mikroorganizmusokban előforduló ilyen típusú enzimekre általában jellemző,



hogy egyszerre egy funkciós csoportot kapcsolnak a  $\beta$ -karotinvázra, ugyanakkor nemcsak a kiinduló vegyületként szolgáló  $\beta$ -karotint tudják szubsztrátként hasznosítani, hanem az abból, akár saját tevékenységük eredményeként képződő, részlegesen hidroxilált, illetve oxigenált származékokat is. Ennek következtében a folyamat során  $\beta$ -karotinból változatos termékek keletkezhetnek (**22. ábra**). Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk az asztaxantin, a kantaxantin és egyéb xantofilok termeltetésének lehetőségét *M. circinelloides*-ben, egy asztaxantintermelő tengeri baktérium, a *Paracoccus* sp. N81106, valamint az ugyancsak asztaxantintermelő bazídiumos élesztő, a *Xanthophyllomyces dendrorhous* bioszintézis génjeit fejeztettük ki *M. circinelloides*-ben és létrehoztunk egy megváltozott karotinoid-összetételű *M. circinelloides* mutánsparkot. Ebben a rendszerben lehetőség nyílt az egyes eredeti, vagy a módosított bioszintézis utak elemzésére (pl. a képződő termékek arányának meghatározására), vagy annak vizsgálatára, hogy a gének túlműködése, vagy az izoprén út módosítása, milyen hatással van az egyes karotinok és xantofilok képződésére.

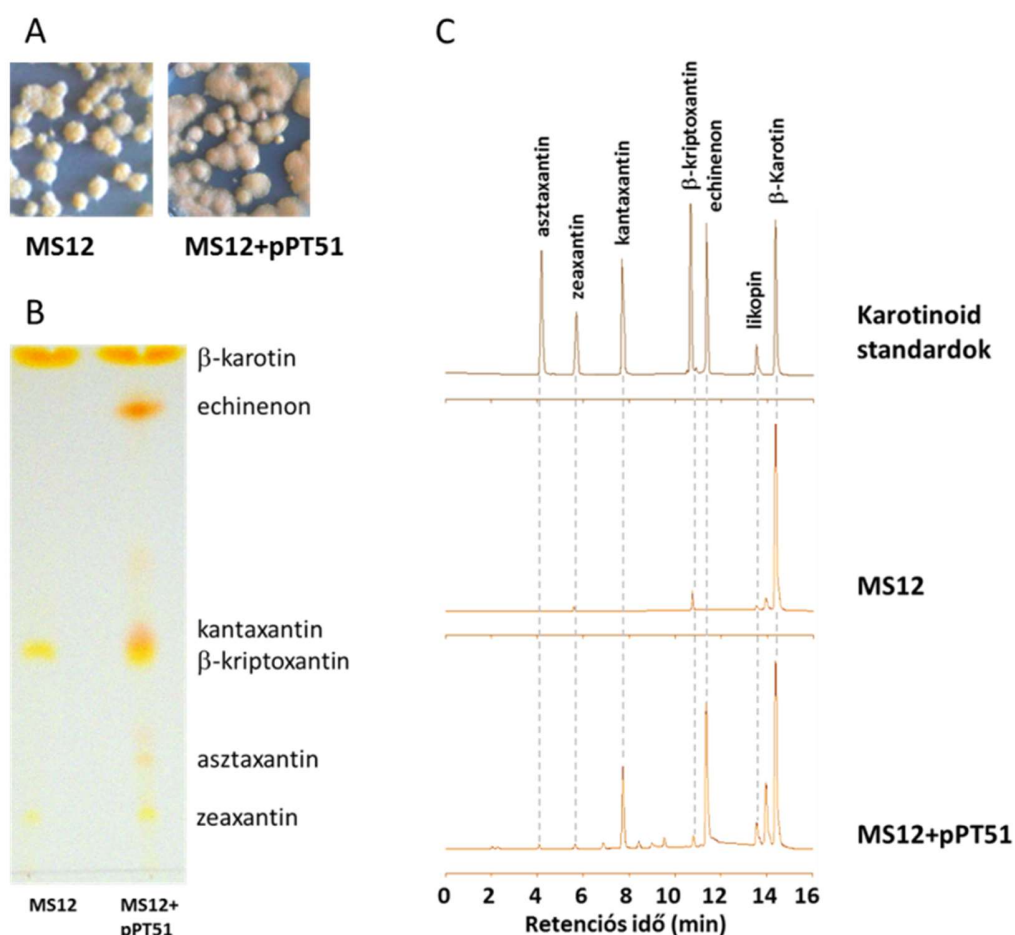
### **5.3.1. A *Paracoccus* sp. N81106 $\beta$ -karotin-ketoláz (CrtW) és -hidroxiláz (CrtZ) kifejeztetése *M. circinelloides*-ben**

A *Paracoccus* sp. N81106 (*A. auranticum*) karotinoid-bioszintézisért felelős génklasztere régóta ismert és jellemzett (MISAWA és mtsi. 1995, FRASER és mtsi. 1997). E génklaszter két tagja, a *crtW* és *crtZ*, kódolja az asztaxantin képződéséhez szükséges  $\beta$ -karotin-ketolázt és a  $\beta$ -karotin-hidroxilázt (**22. ábra**). Munkánk során e bakteriális géneket használtuk fel annak vizsgálatára, hogy kivitelezhető-e *Mucor*-ban a xantofiltermelés.

#### **5.3.1.1. A *crtW* és *crtZ* gének kifejeztetése autonóm replikálódó plazmidok segítségével** (Papp és mtsi. 2006, Csernetics és mtsi. 2011)

Vizsgálatainkhoz először olyan expressziós vektorokat hoztunk létre, amelyek a bakteriális géneket, hogy kifejeződésüket a gombában biztosítsuk, a *M. circinelloides gpdI* szabályozó szakaszai (*gpdIP* és *gpdIT*) közé építve hordozzák. A pPT50 plazmid, a *gpdIP-crtZ-gpdIT* kazetta mellett, a *M. circinelloides pyrG*, míg a pPT51 plazmid, a *gpdIP-crtW-gpdIT* szakasz mellett, a *M. circinelloides leuA* gént hordozta szelekciós markerként (**F2. táblázat**). PEG-közvetítette protoplaszt-transzformációt alkalmazva, e cirkuláris plazmidokat külön-külön, illetve együttesen is bejuttattuk a *M. circinelloides* kétszeres auxotrófiával (*leu<sup>-</sup>* és *ura<sup>-</sup>*) markerezett MS12 törzsébe. Ezzel kutatócsoportunk elsőként végezte el és írta le egy járomspórás gomba kotranszformációját (Papp és mtsi. 2006). A transzformációs gyakoriság minden kísérletben meglehetősen magas volt (50-90

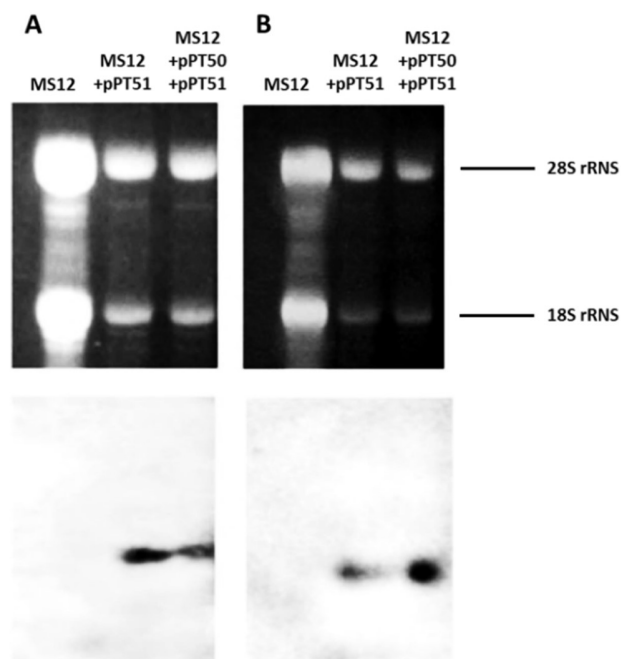
transzformáns/10-15  $\mu\text{g}$  DNS/ $10^5$  protoplaszt). Southern hibridizációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a bejuttatott plazmidok nem integrálódtak a genomba, hanem attól függetlenül replikálódtak. Mint azt az irodalmi áttekintésben is említettem, a járomspórás gombák a bejuttatott cirkuláris plazmidokat szinte mindig episzómálisan tartják fenn és az ilyen elemek integrációja a genomba nagyon ritka esemény (lásd ITURRIAGA és mtsi. 1992, BENITO és mtsi. 1995, WOLFF és ARNAU 2002, QUILES-ROSILLO és mtsi. 2003, APPEL és mtsi. 2004, Skory 2005, ORTIZ-ALVARADO és mtsi. 2006, IBRAHIM és SKORY 2007). A bevitt plazmidok kópiaszáma minden vizsgált tenyésztési ciklus során nagyon alacsony maradt, hasonlóan IBRAHIM és SKORY (2007) megfigyeléseihez. A recipiens törzs sárga színe enyhén narancsszínűre változott azokban a transzformánsokban, melyek a *crtW* gént tartalmazó pPT51 plazmidot hordozták (azaz az MS12+pPT51 (23/A ábra) és az MS12+pPT50+pPT51 törzsekben), míg a pPT50, azaz a *crtZ* gén bevitele önmagában nem okozott fenotípus változást.



23. ábra. A *crtW* gént hordozó MS12+pPT51 transzformáns, valamint a recipiens MS12 törzs telepmorfológiája YNB táptalajon (A) és karotinoid-összetételének vékonyréteg kromatográfiás (B) és HPLC (C) vizsgálata.

A bevitt bakteriális gének átíródását a transzformánsokban Northern-analízissel igazoltuk (24. ábra), majd elemeztük a transzformánsok karotinoid-összetételét (23/B,C ábra, 10. táblázat).

Amint azt elsőként bizonyítottuk (lásd 5.1.2. fejezet), a *M. circinelloides* képes a  $\beta$ -karotin hidroxilált származékainak, a zeaxantinnak és a  $\beta$ -kriptoxantinnak a termelésére, azaz feltételezhetően rendelkezik egy még nem azonosított  $\beta$ -karotin-hidroxiláz aktivitással. A csak a *crtZ* gént hordozó MS12+pPT50 transzformánsok karotinoidspektruma ennek megfelelően ugyan nem változott meg a recipiens törzshöz képest, de a bakteriális  $\beta$ -karotin-hidroxiláz kifejeződése következtében a két hidroxilált származék mennyisége megemelkedett (**10. táblázat**).



**24. ábra. Northern-analízis digoxigenin jelölt *crtW* (A) és *crtZ* (B) génpróbákkal.**  
A felső paneleken az RNS-minták agaróz gél elektroforézise, míg az alsókon az ugyanazon mintákkal végzett hibridizáció eredménye látható.

Mind az MS12+pPT51, mind az MS12+pPT50+pPT51 törzsek, az MS12-re is jellemző  $\beta$ -karotin és  $\beta$ -kriptoxantin mellett, képesek voltak echinenon, kantaxantin és asztaxantin – azaz a  $\beta$ -karotin keto-származékainak – termelésre is. Mivel a *M. circinelloides* eleve képes a  $\beta$ -karotin hidroxilációjára, a csak a *crtW* gént expresszáló transzformánsok is termeltek asztaxantint, azaz egyetlen enzim, a  $\beta$ -karotin-ketoláz bevitele is elegendő az asztaxantinképződés kiváltásához ebben a gombában.

Mivel az izoprén-bioszintézis három génjének (azaz az *ipi*, *isoA* és *carG* géneknek) túlműködtetésével fokozni lehetett a  $\beta$ -karotin-produkciót és rendelkezésünkre álltak az ehhez szükséges expressziós vektorok, kotranszformációs kísérleteket végeztünk a *crtW* gént hordozó pPT51 és az egyes izoprén-bioszintézis géneket hordozó pPT82 (*ipi*), pPT83 (*isoA*) és pPT84 (*carG*) plazmidokkal.

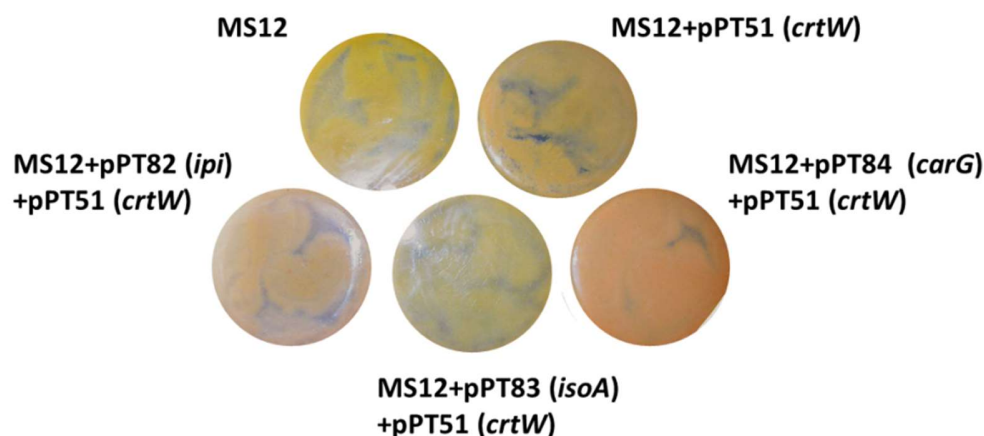
Amint az a korábbi vizsgálatok alapján várható volt, a kotranszformánsok összkarotinoid-tartalma, az MS12 és a csak a bakteriális géneket hordozó törzsekhez képest jelentősen megemelkedett (10. táblázat). A kotranszformánsok telepszíne az MS12 törzshöz képest megváltozott, jelezve az oxigenált karotinoidok jelenlétét (25. ábra).

**10. táblázat. A pPT50 és pPT51 plazmidokat autoreplikatív módon hordozó transzformánsok és a recipiens MS12 törzs karotinoid-összetétele, valamint a plazmidok kópiaszáma és a kifejeztetett gének relatív transzkriptumszintjei.**

| Törzs            | $\beta$ -Karotin | $\gamma$ -Karotin | Likopin | $\beta$ -Kriptox. <sup>a</sup> | Zeax.  | Kantax. | Echi.   | Asztax. | Össz-karotinoid | Plazmid kópiaszám <sup>b</sup> | Relatív transzkriptum-szint            |
|------------------|------------------|-------------------|---------|--------------------------------|--------|---------|---------|---------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------------|
| MS12             | 259 ± 13         | 14 ± 1            | 6 ± 2   | 29 ± 3                         | 6 ± 3  | -       | -       | -       | 399 ± 27        | -                              | Kontroll <sup>c</sup>                  |
| MS12+pPT50       | 287 ± 22         | 17 ± 5            | 4 ± 3   | 55 ± 7                         | 15 ± 4 | -       | -       | -       | 455 ± 50        | pPT50: 0,2                     | - <sup>d</sup>                         |
| MS12+pPT51       | 268 ± 13         | 17 ± 4            | 5 ± 2   | 35 ± 2                         | 1 ± 1  | 10 ± 2  | 11 ± 3  | 3 ± 2   | 478 ± 28        | pPT51: 0,2                     | <i>crtW</i> : 1                        |
| MS12+pPT50+pPT51 | 270 ± 12         | 15 ± 4            | 4 ± 3   | 22 ± 5                         | 2 ± 1  | 13 ± 2  | 17 ± 5  | 2 ± 1   | 410 ± 37        | pPT50: 0,2<br>pPT51: 1         | - <sup>d</sup>                         |
| MS12+pPT82+pPT51 | 513 ± 15         | 74 ± 8            | 24 ± 3  | 22 ± 3                         | 5 ± 1  | 65 ± 1  | 108 ± 8 | 1 ± 1   | 1053 ± 98       | pPT82: 2;<br>pPT51: 1          | <i>ipi</i> : 18;<br><i>crtW</i> : 2,4  |
| MS12+pPT83+pPT51 | 527 ± 22         | 32 ± 4            | 17 ± 3  | 24 ± 3                         | 6 ± 2  | 4 ± 1   | 5 ± 2   | 1 ± 1   | 807 ± 35        | pPT83: 3;<br>pPT51: 0,2        | <i>isoA</i> : 16;<br><i>crtW</i> : 0,9 |
| MS12+pPT84+pPT51 | 366 ± 14         | 69 ± 12           | 41 ± 7  | 15 ± 2                         | 2 ± 1  | 44 ± 3  | 145 ± 7 | 2 ± 1   | 924 ± 146       | pPT84: 7;<br>pPT51: 0,07       | <i>carG</i> : 9;<br><i>crtW</i> : 4,9  |

<sup>a</sup>Rövidítések:  $\beta$ -Kriptox. -  $\beta$ -kriptoxantin; Zeax. - zeaxantin; Kantax. - kantaxantin; Echi. - echinenon; Asztax. - asztaxantin.

<sup>b</sup>Kópiaszám / gazda genom. <sup>c</sup>Az *ipi*, *isoA* és *carG* esetében az MS12 törzsben, a *crtW* esetében az MS12+pPT51 törzsben mért transzkriptumszintet vettük 1-nek. A táblázatban feltüntetett karotinoid-mennyiségek öt független tenyésztést követő HPLC analízis eredményeinek átlagértékei ( $\mu\text{g/g}_{[\text{száraz tömeg}]}$  ± szórás). Az RNS- és a karotinoidkivonáshoz a törzseket 25 °C-on, 4 napon át, folytonos megvilágítás mellett, YNB táptalajon tenyésztettük.



**25. ábra. A pPT51 plazmidot hordozó transzformánsok, valamint az MS12 törzs színe.**  
A tenyésztés YNB táptalajon, 4 napon át folytonos megvilágítás mellett, 25 °C-on történt.

Annak ellenére, hogy mindegyik képes volt xantofillok termelésére, a termelt karotinoidok aránya az egyes kotranszformánsokban eltérő volt. Azokban a transzformánsokban, amelyekben a

*crtW* gén kifejeztetése mellett az *ipi*, vagy a *carG* gént is túlműködtettük, a kantaxantin- és az echinenontartalom jelentősen megnőtt (**10. táblázat**), feltehetően a nagyobb rendelkezésre álló prekursor- ( $\beta$ -karotin) mennyiség miatt. Ugyanakkor a pPT51 és a pPT83 (*isoA*) kotranszformációjával előállított törzs lényegesen kevesebb xantofillt termelt, mint a csak *crtW* gént hordozó transzformáns (MS12+pPT51). Ezt az eredményt nehéz megmagyarázni, de mivel az FPP-szintáz működése egyéb fontos terpenoidok (pl. ergoszterin, dolikol, ubikinon, farnezilált fehérjék) mennyiségére is hatással van (LIANG és mtsi. 2002, GRABINSKA és PALAMARCZYK 2002, SZKOPÍŃSKA és PŁOCHOCKA 2005, KUZINA és mtsi. 2006), túlműködtetése esetleg indirekt módon hathat a  $\beta$ -karotin-ketoláz aktivitására a szintézis szabályozása, a kompartmentalizáció, vagy a membránszerkezet megváltozásán keresztül. Az asztaxantin mennyisége minden transzformáns esetében nagyon alacsony maradt, ami azt jelzi, hogy a *M. circinelloides*  $\beta$ -karotin-hidroxiláza nem vagy csak kis affinitással képes a kantaxantint szubsztrátként hasznosítani. Azt is meg kell jegyezni, hogy ugyan az *ipi* és a *carG* gének túlműködtetésével, az MS12+pPT51 törzsben mérthez képest, a xantofill-termelés fokozható volt, de minden transzformánsban a  $\beta$ -karotin maradt a fő karotinoid-termék, azaz a konverzió korántsem volt teljes.

#### 5.3.1.2. A *crtW* gén integrációja a *M. circinelloides* genomba (Papp és mtsi. 2013)

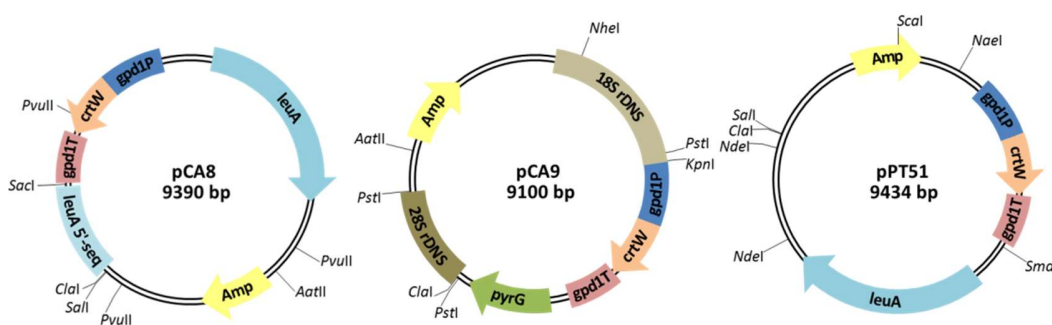
Korábbi kísérleteinkben, amikor a *Paracoccus* sp. N81106 törzs *crtW* génjét autonóm replikálódó plazmid (pPT51) bejuttatásával fejeztettük ki *Mucor*-ban, mind a plazmidok kópiaszáma, mind a termelt xantofillok mennyisége alacsony maradt. Annak érdekében, hogy a bejuttatott *crtW* gén kópiaszámát megemeljük és nagyobb xantofill produkcióra képes, mitótikusan stabil transzformánsokat állíthassunk elő, megkíséreltük a gént integrálni a *M. circinelloides* genomjába.

E kísérletek elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk, lehetséges-e stabil, kantaxantintermelő *M. circinelloides* törzsek előállítása. Ezt az értékes keto-karotinoidot elsősorban táplálék, illetve, főként halak és szárnyasok esetében, takarmány kiegészítőként alkalmazzák (BHOSALE és BERNSTEIN 2005; DUFOSSÉ 2006), az EU-ban és az Egyesült Államokban engedélyezett ételszínezék, illetve kiegészítő (E161g; FOOD STANDARD AGENCY 2014, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 2014). A kantaxantin erősebb antioxidáns, mint a  $\beta$ -karotin (PALOZZA és KRINSKY 1992, AVALOS és LIMÓN 2015) és számos egyéb kedvező hatást tulajdonítanak neki, többek közt apoptózist indukált humán rákos sejtvonalakban (KUMARESAN és mtsi. 2008; PALOZZA és mtsi. 1998), csökkentette számos daganattípus kialakulásának kockázatát állatmodellekben (MAYNE és PARKER 1989). Noha számos baktériumot, pl. *Bradyrhizobium* sp. (LORQUIN és mtsi. 1997), *Dietzia natronolimnaea* HS-1 (ROSTAMI és mtsi. 2014), *Corynebacterium michiganense* (SAPERSTEIN és

STAR 1954), *Micrococcus roseus* (COONEY és mtsi. 1966), *Brevibacterium* sp. KY 4313 (NELIS és DE LEENHEER 1989) és *Gordonia jacobaea* MV-1 (DE MIGUEL és mtsi. 2001; VEIGA-CRESPO és mtsi. 2005) és néhány mikroalgát, pl. *Chlorella pyrenoidosa* (CZYGAN 1964) és *Chlorella zofingiensis* (PELAH és mtsi. 2004), azonosítottak és írtak le, mint kantaxantintermelő organizmust, az élelmiszeriparban és állattenyésztésben használt pigmentet elsősorban kémiai szintézissel állítják elő (ERNST 2002, DUFOSSÉ 2006). A kantaxantin iránti kereslet folyamatosan nő, és fokozott igény mutatkozik a természetes eredetű, illetve mikrobiológiai előállítás fejlesztése iránt is (BHOSALE és BERNSTEIN 2005, GHARIBZAHEDI és mtsi. 2013).

A gén bevitelét PEG-közvetítette protoplaszt-transzformációval terveztük megvalósítani, kétféle stratégiát alkalmazva, egyrészt kettős homológ rekombinációval, ami elvileg irányított génbevitelt tesz lehetővé, másrészt restriktációs enzim közvetítette integrációval (*restriction enzyme mediated integration*, REMI), melyet főként nagy gyakoriságú ektopikus integrációk elérésére használnak.

A *crtW* gén integrációjának megvalósításához kétféle vektort készítettünk (pCA8 és pCA9), melyek alapja a pPT51 plazmid volt (26. ábra; F1. táblázat).



**26. ábra.** A *crtW* gén *M. circinelloides* genomba történő integrációjához szerkesztett plazmidok. Az ábrán az egyes lineáris fragmentumok és a transzformánsok hibridizációs elemzéséhez szükséges próbák kivágásához használt restriktációs enzimek hasító helyei kerültek feltüntetésre.

E plazmidok is a *gpdI* promóter és terminális régió közé építve hordozták a *crtW* gént, szelekciós markerként pedig ezúttal is a *pyrG* vagy a *leuA* gént használtuk. A pCA8 vektor esetében a *gpdP-crtW-gpdT* kazettát a szelekciós markerként is szolgáló *leuA*, és az attól 5' irányban található régió közé építettük, annak érdekében, hogy biztosítsuk a kettős homológ rekombinációhoz szükséges DNS szakaszokat. A pCA9 esetében a *gpdP-crtW-gpdT* kazettát, a *pyrG* szelekciós markerrel együtt, a *M. circinelloides* genomból PCR segítségével felszaporított 18S és 28S rDNS szekvenciák közé építettük; itt e szakaszok szolgáltak homológ szekvenciaként a kettős rekombináció irányítására.

Kettős homológ rekombinációval kikényszeríthető a transzformáló DNS integrációja a genomba. Ilyenkor a vektor a bejuttatni kívánt szakasz két végén, a kettős rekombinációt irányító, a

recipiens genom egyes régióival homológ szekvenciákat tartalmaz. Járomspórás gombák esetében az eredményes integrációhoz még az is szükséges, hogy a transzformációt cirkuláris plazmidok helyett lineáris DNS fragmentummal végezzük (lásd 2.7 alfejezet). Amennyiben a plazmidot csak egy restrikciós enzimmel linearizáljuk, a plazmid az esetek túlnyomó többségében recirkularizálódik, majd az intakt plazmidokhoz hasonlóan, a homológ szakaszok ellenére is episzómálisan marad fenn, vagy elvész (TORRES-MARTÍNEZ és mtsi. 2012, GARRE és mtsi. 2015). Mindezeket figyelembe véve a pCA8 plazmidból a *ClaI* és *AatII* enzimekkel kivágott pCA8lf, valamint a pCA9 plazmidból az *AatII* és *NheI* enzimekkel kivágott pCA9lf fragmentumokkal végeztük a transzformációt (**26. ábra**). Az egyes kísérletekben 10-15 µg linearizált DNS-t adtunk a protoplasztokhoz.

A REMI módszer alkalmazásakor, a transzformáló lineáris fragmentum mellett, azokat a restrikciós enzimeket is hozzáadjuk a protoplasztokhoz, amelyekkel előzőleg a vektorunkat is emésztettük. Ilyenkor a transzformáló lineáris DNS fragmentumon kívül az enzimek is bejuthatnak a sejtmagba és a genomi DNS-t hasíthatják, majd annak – elsősorban a kettős száltöréseket javító, a nem homológ végek összekapcsolását végző mechanizmus (*non-homologous end joining*, NHEJ) által végbemenő – újbóli összerendeződése során végbemehet az idegen DNS beépülése a genomba (MAIER és SCHÄFER 1999, MULLINS és KANG 2001, OLMEDO-MONFIL és mtsi. 2004). A REMI módszert korábban sikeresen használták számos aszkuszos és bazídiumos gomba genetikai manipulálására, járomspórás gombáknál azonban eddig nem alkalmazták (VOS és mtsi. 2014). A transzformációt többféle, a pPT51, pCA8 és pCA9 plazmidokból kiemésztett fragmentummal is teszteltük; a felhasznált DNS szakaszokat a **11. táblázat** foglalja össze, a restrikciós hasítóhelyek helyzetét a **26. ábrán** tüntettük fel.

**11. táblázat. A *crtW* gén REMI transzformációval történő beviteléhez használt lineáris DNS fragmentumok.**

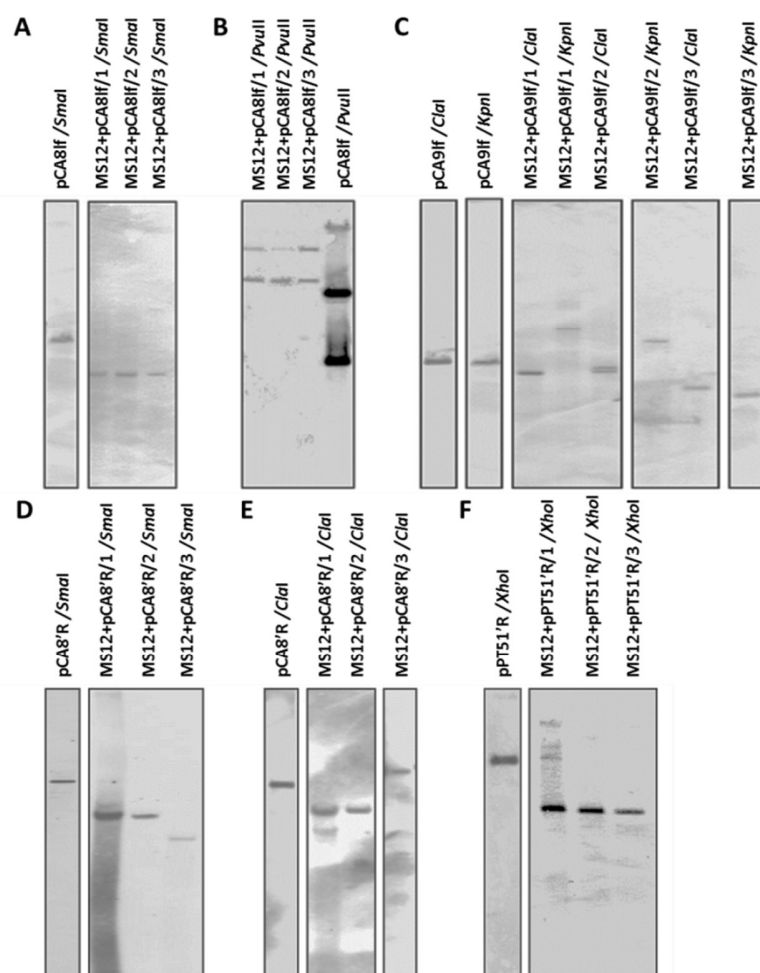
| Fragmentum elnevezése | Plazmid | A fragmentum kivágásához használt restrikciós enzimek |
|-----------------------|---------|-------------------------------------------------------|
| pCA8'R                | pCA8    | <i>SalI</i> , <i>SacI</i>                             |
| pCA9'R1               | pCA9    | <i>ClaI</i> , <i>KpnI</i>                             |
| pCA9'R2               | pCA9    | <i>PstI</i> , <i>KpnI</i>                             |
| pPT51'R1              | pPT51   | <i>NaeI</i> , <i>NdeI</i>                             |
| pPT51'R2              | pPT51   | <i>NaeI</i> , <i>ClaI</i>                             |
| pPT51'R3              | pPT51   | <i>SalI</i> , <i>ScaI</i>                             |

A transzformáció során, előzetes optimalizáció alapján, a protoplasztokhoz 10 µg DNS-t és az egyes fragmentumok linearizálására használt enzimekből 30 unit mennyiséget adtunk, majd ezt az elegyet 30 percig jégen, azt követően pedig másfél órán keresztül 33 °C-on inkubáltuk.

A lineáris fragmentumokkal PEG-közvetítette protoplaszt-transzformációt végeztünk. A pCA9'R1 és a pCA9'R2 fragmentumokon kívül, az összes tesztelt DNS szakasszal kaptunk

transzformáns telepeket. A transzformációs gyakoriság minden kísérletben alacsonynak bizonyult (1-4 transzformáns/ $10^5$  protoplaszt) és nem volt növelhető a transzformáló DNS mennyiségének fokozásával. A transzformáló DNS kettős homológ rekombinációval történő integrációja ritka esemény járomspórás gombák esetében (IBRAHIM és SKORY 2007), ami magyarázhatja az alacsony transzformációs gyakoriságot. REMI esetében eltérőek a tapasztalatok, korábbi vizsgálatokban fajtól, a transzformáló DNS-től és az alkalmazott enzimektől függően igen eltérő transzformációs hatékonyságot tapasztaltak (VOS és mtsi. 2014). Mindenesetre ez volt az első eset, hogy egy járomspórás gombát ezzel a módszerrel sikeresen transzformáltak (GARRE és mtsi. 2015).

A sikeres transzformációs kísérletek (azaz a pCA8lf, pCA9lf, pCA8'R és a pPT51'R1-3 fragmentumok alkalmazása) során a bejuttatott fragmentumok integrálódtak a genomba (27. ábra).



**27. ábra. Példák a *crtW* gén jelenlétének és integrációjának kimutatására végzett Southern-analízisre.**

**A - B:** A pCA8lf fragmentum és 3 MS12+pCA8lf transzformánsból tisztított DNS *SmaI* és *PvuII* restrikciós enzimmel emésztve. **C:** A pCA9lf fragmentum és 3 MS12+pCA9lf transzformánsból tisztított DNS *ClaI* és *KpnI* restrikciós enzimmel emésztve. **D - E:** A pCA8'R fragmentum és 3 MS12+ pCA8'R transzformánsból tisztított DNS *SmaI* és *ClaI* restrikciós enzimmel emésztve. **F:** A pPT51'R fragmentum és 3 MS12+ pPT51'R/1 transzformánsból tisztított DNS *XhoI* restrikciós enzimmel emésztve. Hibridizációs próbaként digoxigenninnel jelölt *crtW* gént használtunk, a hibridizációs analízist a transzformációt követő második-ötödik tenyésztési ciklusok során végeztük.



A transzformánsok mitotikus stabilitásának ellenőrzéséhez mind szelektív (YNB), mind nem szelektív (MEA) táptalajon, 15 egymást követő cikluson át tenyésztettük az izolált törzseket, majd PCR analízissel bizonyítottuk a bevitt DNS jelenlétét a telepekben. A pCA8lf és a pCA9lf fragmentumokkal nyert transzformánsok mindegyike, a REMI módszerrel létrehozott törzsek közül pedig csak a pCA8'R és a pCA51'R3 fragmentumokkal transzformáltak bizonyultak mitotikusan stabilnak. A REMI transzformáció során az alkalmazott enzim fajtája és mennyisége, illetve a megfelelő hasítóhelyeknek a recipiens genomban található pozíciói és az integráció helye fontos faktora az integrálódott DNS stabilitásának. Ezért a megfelelő transzformációs gyakoriságot és stabilitást biztosító enzimek és arányok erősen függnék a gazdától és általában nem lehet előre megjósolni a kísérletek sikerességét (WELD és mtsi. 2006, VOS és mtsi. 2014).

A stabilnak bizonyult transzformánsok esetében, IPCR technika (OCHMAN és mtsi. 1988) segítségével igyekeztünk meghatározni az integráció helyét. Minden vizsgált MS12+pCA8lf és MS12+pCA8'R transzformáns elemzése azt mutatta, hogy az integráció homológ helyre, azaz a *leuA* gén és az azzal 5' irányban szomszédos régió közé történt. Ugyanakkor ektopikus integrációkat detektáltunk a tesztelt MS12+pCA9lf és MS12+pPT51'R3 transzformánsokban. Ezen integrációs események a *M. circinelloides* genom különböző szakaszait érintették (12. táblázat).

**12. táblázat. Az MS12+pCA9lf és az MS12+pCA51'R transzformánsok genomi DNS-ének IPCR analízisével feltárt régiók helyzete a *M. circinelloides* CBS 277.49 genomban.**

| Transzformáns   | Scaffold    | 5' pozíció | 3' pozíció |
|-----------------|-------------|------------|------------|
| MS12+pCA9lf/1   | scaffold_01 | 5431430    | 5431782    |
| MS12+pCA9lf/2   | scaffold_06 | 2480876    | 2481326    |
| MS12+pPT51'R3/2 | scaffold_09 | 46692      | 47033      |
| MS12+pPT51'R3/4 | scaffold_09 | 46720      | 47066      |

A transzformánsok genomi DNS-ének IPCR analízisével meghatározott szekvenciákkal BLAST kereséseket végeztünk a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genom adatbázisban (DoE JGI; *M. circinelloides* CBS277.49 v2.0; <http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>; adatbázis: *Mucor circinelloides* v2\_masked\_scaffolds); a scaffold-ok sorszáma és a nukleotid pozíciók az ezen adatbázisban talált régiók helyzetét jelölik.

Ismert, hogy mivel a restrikciós enzimek a genomi DNS-t számos helyen hasíthatják, a REMI transzformáció gyakran eredményez ektopikus integrációt (TURGEON és mtsi. 2010). Ugyanakkor a pCA9lf fragmentummal végzett transzformációs kísérletben kettős homológ rekombinációval végbemenő integrációra számítottunk. Talán a fragmentum két végére épített homológ szakaszok nem voltak elég kiterjedtek az integráció „irányításához”. Az ugyancsak járomspórás *R. oryzae* esetében igazolták, hogy a NHEJ mechanizmus rendkívül aktív és domináns a homológ rekombinációval szemben, ez az oka, hogy amennyiben megtörténik, általában nem homológ helyre integrálódik a

bevitt DNS (SKORY 2005, IBRAHIM és SKORY 2007). Hasonló folyamat állhat az általunk tapasztaltak mögött is.

Az IPCR elemzés eredményei több transzformánsban is a bejuttatott DNS több kópiában történt integrációját és/vagy átrendeződését sugallták. A betranszformált *crtW* gén kópiaszámának vizsgálatát qPCR analízissel végeztük (**13. táblázat**).

A *Mucor* fajok általában többmagvú protoplasztokat és spórákat, valamint cönocitikus micéliumot képeznek, ezért az elsődleges integratív transzformánsok rendszerint heterokariotikusak a bejuttatott DNS-re nézve (ARNAU és mtsi. 1991, IBRAHIM és SKORY 2007). Ahhoz, hogy homokariotikus törzseket nyerhessünk, a transzformánsokból monosporangialis telepeket kell izolálni, melyeket több cikluson keresztül szelektív körülmények közt kell tenyészteni és az egyes tenyésztési ciklusok közt ugyancsak monosporangialis telepeket kell továbboltani. Kísérletünkben az egymást követő generációk során a bevitt DNS kópiaszáma minden transzformánsban jelentősen megemelkedett.

Néhány transzformánsban (pl. MS12+pCA8lf/1-2, MS12+pCA9lf/1 és MS12+pPT51'R3/2) a kópiaszám a 13. tenyésztési ciklus után meglepően magasnak bizonyult. Az MS12+pCA8lf/1 és a MS12+pCA9lf/1 esetében az IPCR analízis eredménye is azt sugallta, hogy a bevitt DNS sok tandem ismétlődő kópiában található egy adott régióban. Egyes esetekben, pl. az MS12+pCA8lf/1 transzformánsban, a *crtW* gén relatív kópiaszáma a 200 kópia/genom számot is meghaladta (**13. táblázat**). Ez az extrém magas kópiaszám a Southern-hibridizációs és az IPCR adatok figyelembevételével többféleképpen magyarázható. Az egyik lehetőség szerint a gomba genomjába integrálódott idegen DNS kivágódott, majd recirkularizációt követően nagy kópiaszámban felszaporodott. A transzformáló DNS átrendeződését és recirkularizációját különböző járomspórás gombákban már többször megfigyelték (YANAI és mtsi. 1990, ARNAU és mtsi. 1991, TAKAYA és mtsi. 1996, MACKENZIE és mtsi. 2000, OBRAZTSOVA és mtsi. 2004).

A plazmid menekítési kísérletekkel a MS12+pCA8'R transzformánsokból a bejuttatott lineáris DNS-nél kisebb, 2-5,5 kb méretű cirkuláris plazmidokat sikerült izolálni. E plazmidok szekvenciájának vizsgálata a transzformáló DNS-ből származó átrendeződött és csonkolt szakaszok jelenlétét tárta fel, amelyek azonban nem tartalmazták a *crtW* gént vagy annak darabjait. Az előbbi magyarázat ellen szól az is, hogy az ilyen folyamatok általában a transzformáns instabilitását és a heterológ DNS elvesztését eredményezik, esetünkben azonban a vizsgált transzformánsok fenntartották az idegen DNS-t, melynek relatív kópiaszáma jelentősen megnőtt. Azt is érdemes megjegyezni, hogy a kópiaszám a későbbi tenyésztések során nem ingadozott, pedig ez a cirkuláris plazmidokat hordozó törzsek esetében általában megfigyelhető (lásd 5.3.1.1. alfejezet).

**13. táblázat. A bejuttatott *crtW* gén kópiaszáma és a gént kifejező transzformánsok karotinoid-összetétele a transzformációt követő 3. és 13. tenyésztési ciklus során.**

| Törzs           | Tenyésztési ciklus | Kópiaszám | Likopin        | $\beta$ -Karotin  | $\gamma$ -Karotin | $\beta$ -Kriptoxantin | Zeaxantin      | Echinenon                | Kantaxantin              | Asztaxantin         | Össz-karotinoid |
|-----------------|--------------------|-----------|----------------|-------------------|-------------------|-----------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------|
| MS12            | -                  | -         | 12 $\pm$ 2 (3) | 249 $\pm$ 23(61)  | 22 $\pm$ 4 (5)    | 26 $\pm$ 7 (6)        | 8 $\pm$ 1 (2)  | -                        | -                        | -                   | 412 $\pm$ 31    |
| MS12+pCA8lf/1   | 3                  | 3         | 9 $\pm$ 1 (2)  | 296 $\pm$ 12 (49) | 29 $\pm$ 4 (5)    | 18 $\pm$ 3 (3)        | 8 $\pm$ 2 (1)  | 31 $\pm$ 13 (5)          | 16 $\pm$ 7 (3)           | 1 $\pm$ 0,8 (0,2)   | 604 $\pm$ 41    |
|                 | 13                 | 250       | 12 $\pm$ 2 (2) | 43 $\pm$ 5 (8)    | 32 $\pm$ 8 (6)    | 26 $\pm$ 4 (5)        | 4 $\pm$ 1 (1)  | <b>117</b> $\pm$ 5 (22)  | <b>148</b> $\pm$ 21 (28) | 3 $\pm$ 1 (0,6)     | 529 $\pm$ 29    |
| MS12+pCA8lf/2   | 3                  | 12        | 10 $\pm$ 1 (1) | 295 $\pm$ 31 (43) | 38 $\pm$ 7 (6)    | 14 $\pm$ 3 (2)        | 6 $\pm$ 2 (1)  | 60 $\pm$ 8 (9)           | 65 $\pm$ 9 (9)           | -                   | 692 $\pm$ 63    |
|                 | 13                 | 55        | 15 $\pm$ 3 (2) | 78 $\pm$ 7 (13)   | 41 $\pm$ 6 (7)    | 15 $\pm$ 3 (3)        | 6 $\pm$ 1 (1)  | <b>135</b> $\pm$ 19 (22) | <b>123</b> $\pm$ 18 (20) | 2 $\pm$ 0,5 (0,4)   | 614 $\pm$ 52    |
| MS12+pCA8lf/3   | 3                  | 0,03      | 12 $\pm$ 2 (2) | 373 $\pm$ 55 (49) | 32 $\pm$ 4 (4)    | 21 $\pm$ 3 (3)        | 9 $\pm$ 2 (1)  | 27 $\pm$ 5 (4)           | 16 $\pm$ 2 (2)           | 1 $\pm$ 0,1 (0,1)   | 757 $\pm$ 71    |
|                 | 13                 | 0,07      | 10 $\pm$ 2 (2) | 295 $\pm$ 33 (46) | 30 $\pm$ 4 (5)    | 18 $\pm$ 4 (3)        | 9 $\pm$ 1 (1)  | 43 $\pm$ 7 (7)           | 20 $\pm$ 3 (3)           | 1 $\pm$ 0,2 (0,1)   | 644 $\pm$ 52    |
| MS12+pCA9lf/1   | 3                  | 0,5       | 11 $\pm$ 1 (2) | 377 $\pm$ 34 (55) | 30 $\pm$ 7 (4)    | 24 $\pm$ 3 (4)        | 7 $\pm$ 1 (1)  | 9 $\pm$ 1 (1)            | 6 $\pm$ 1 (1)            | -                   | 688 $\pm$ 47    |
|                 | 13                 | 140       | 12 $\pm$ 1 (2) | 190 $\pm$ 31 (30) | 32 $\pm$ 4 (5)    | 16 $\pm$ 2 (3)        | 8 $\pm$ 1 (1)  | 57 $\pm$ 9 (9)           | 71 $\pm$ 8 (11)          | 2 $\pm$ 0,5 (0,2)   | 636 $\pm$ 43    |
| MS12+pCA9lf/2   | 3                  | 0,5       | 21 $\pm$ 2 (3) | 397 $\pm$ 78 (51) | 31 $\pm$ 3 (4)    | 32 $\pm$ 2 (4)        | 10 $\pm$ 2 (1) | 11 $\pm$ 1 (1)           | 9 $\pm$ 1 (1)            | -                   | 785 $\pm$ 72    |
|                 | 13                 | 62        | 15 $\pm$ 2 (2) | 281 $\pm$ 21 (40) | 35 $\pm$ 4 (5)    | 20 $\pm$ 2 (3)        | 5 $\pm$ 1 (1)  | 45 $\pm$ 5 (7)           | 50 $\pm$ 5 (7)           | 2 $\pm$ 0,2 (0,3)   | 697 $\pm$ 36    |
| MS12+pCA8'R/2   | 3                  | 0,9       | 10 $\pm$ 2 (2) | 358 $\pm$ 42 (67) | 30 $\pm$ 5 (6)    | 29 $\pm$ 4 (5)        | 11 $\pm$ 2 (2) | 5 $\pm$ 1 (1)            | 3 $\pm$ 0,5 (0,5)        | 0,3 $\pm$ 0 (0,1)   | 533 $\pm$ 75    |
|                 | 13                 | 1,12      | 14 $\pm$ 1 (3) | 360 $\pm$ 37 (67) | 30 $\pm$ 4 (5)    | 25 $\pm$ 4 (5)        | 7 $\pm$ 1 (1)  | 4 $\pm$ 1 (1)            | 8 $\pm$ 1 (2)            | 0,7 $\pm$ 0,1 (0,1) | 540 $\pm$ 63    |
| MS12+pCA8'R/4   | 3                  | 45        | 12 $\pm$ 1 (3) | 209 $\pm$ 35 (52) | 25 $\pm$ 3 (6)    | 18 $\pm$ 3 (4)        | 6 $\pm$ 1 (2)  | 31 $\pm$ 3 (8)           | 37 $\pm$ 4 (9)           | -                   | 405 $\pm$ 74    |
|                 | 13                 | 50        | 12 $\pm$ 1 (3) | 196 $\pm$ 39 (48) | 31 $\pm$ 6 (8)    | 16 $\pm$ 2 (4)        | 6 $\pm$ 1 (2)  | 29 $\pm$ 3 (7)           | 44 $\pm$ 7 (11)          | -                   | 407 $\pm$ 70    |
| MS12+pCA8'R/5   | 3                  | 1,22      | 8 $\pm$ 2 (2)  | 325 $\pm$ 49 (66) | 28 $\pm$ 5 (6)    | 29 $\pm$ 5 (6)        | 14 $\pm$ 2 (3) | 6 $\pm$ 1 (1)            | 3 $\pm$ 0,5 (1)          | -                   | 495 $\pm$ 91    |
|                 | 13                 | 1,41      | 13 $\pm$ 1 (3) | 337 $\pm$ 53 (66) | 28 $\pm$ 3 (6)    | 25 $\pm$ 5 (5)        | 6 $\pm$ 1 (1)  | 4 $\pm$ 1 (1)            | 8 $\pm$ 1 (2)            | 0,4 $\pm$ 0 (0,1)   | 508 $\pm$ 54    |
| MS12+pPT51'R3/2 | 3                  | 3         | 23 $\pm$ 4 (5) | 58 $\pm$ 17 (13)  | 51 $\pm$ 5 (11)   | 17 $\pm$ 2 (4)        | 4 $\pm$ 1 (1)  | <b>120</b> $\pm$ 27 (26) | <b>109</b> $\pm$ 12 (24) | 0,4 $\pm$ 0 (0,1)   | 460 $\pm$ 46    |
|                 | 13                 | 75        | 11 $\pm$ 2 (2) | 40 $\pm$ 12 (8)   | 28 $\pm$ 3 (6)    | 21 $\pm$ 2 (4)        | 8 $\pm$ 1 (2)  | 97 $\pm$ 21 (19)         | <b>119</b> $\pm$ 13 (24) | 0,1 $\pm$ 0 (0,02)  | 501 $\pm$ 35    |
| MS12+pPT51'R3/4 | 3                  | 0,001     | 12 $\pm$ 1 (2) | 359 $\pm$ 61 (61) | 25 $\pm$ 3 (4)    | 20 $\pm$ 4 (3)        | 9 $\pm$ 1 (2)  | 7 $\pm$ 2 (1)            | 6 $\pm$ 1 (1)            | 0,5 $\pm$ 0,1 (0,1) | 583 $\pm$ 71    |
|                 | 13                 | 0,01      | -              | 390 $\pm$ 69 (54) | 21 $\pm$ 4 (3)    | 38 $\pm$ 4 (5)        | 10 $\pm$ 2 (1) | 6 $\pm$ 2 (1)            | 10 $\pm$ 2 (1)           | 1 $\pm$ 0,2 (0,2)   | 729 $\pm$ 75    |

A feltüntetett mennyiségek három független tenyésztés adataiból számolt átlagértékek; a karotinoidok mennyiségét HPLC analízissel állapítottuk meg és  $\mu\text{g/g}_{[\text{száraz tömeg}]}$   $\pm$  szórás formában adtuk meg; zárójelben az egyes karotinoidoknak a teljes karotinoid-tartalmon belüli aránya (%) került feltüntetésre. A 100  $\mu\text{g/g}_{[\text{száraz tömeg}]}$ -nél nagyobb kantaxantin- és echinenonértékek vastagon szedett karakterekkel lettek kiemelve. A kópiaszám meghatározáshoz a DNS- és a karotinoidkivonásokat minden esetben ugyanazon mintákból végeztük, melyhez a törzseket 25 °C-on, 4 napon át, folytonos megvilágítás mellett, YNB táptalajon tenyésztettük.

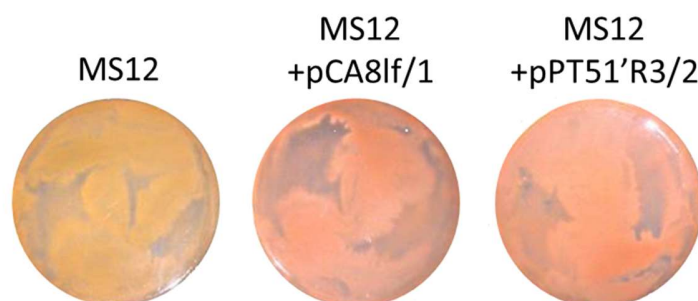
A másik lehetőség, hogy a korábban említett aktív NHEJ mechanizmus következtében a transzformáló lineáris fragmentumok összekapcsolódtak és az így keletkezett óriásmolekula (konkatemer) integrálódott a genomba, amit az IPCR eredmények is megerősítenek, mivel több esetben a *crtW* gént tartalmazó fragmentumok tandem ismétlődése volt megfigyelhető. Tandem ismétlődő módon integrálódott szekvenciák, természetesen a REMI módszer alkalmazása során is gyakran létrejönnek (WELD és mtsi. 2006, VOS és mtsi. 2014), bár az igazán extrém kópiaszámokat a MS12+pCA8lf/1 és a MS12+pCA9lf/1 esetében detektáltuk.

Néhány korai munkában hasonló jelenséget tapasztaltak *R. oryzae* és *R. niveus* transzformációja során is, ráadásul az utóbbi gombát az általunk is használt *M. circinelloides leuA* génnel transzformálták (LIOU és mtsi. 1992, HORIUCHI és mtsi. 1995). *R. oryzae* esetében leírták, hogy a gomba transzformációja során a bevitt DNS-t tandem ismétlődések formájában hordozó, autonóm replikálódó óriásmolekulák képződhetnek (SKORY 2002, 2005). Ugyanakkor ilyen nagy molekulású cirkuláris képleteket a mi transzformánsainkban nem tudtunk kimutatni. Továbbá fontos hangsúlyozni, hogy a transzformációtól számított kb. 10. passzálás után az említett törzsek stabilnak bizonyultak és a karotinoidtermelésükben sem voltak megfigyelhetők szignifikáns ingadozások a további tenyésztések során.

Néhány transzformánsban, pl. az MS12+pCA8lf/3 és az MS12+pPT51'R3/4 törzsekben, a *crtW* kópiaszáma nem érte el a genomonkénti egy kópiát, jelezve, hogy ezek a törzsek heterokariotikusak maradtak a bevitt DNS-re nézve (13. táblázat).

#### 5.3.1.3. A *crtW* gént a genomba integráltan hordozó, mitótikusan stabil *M. circinelloides* törzsek karotinoidtartalmának elemzése (Papp és mtsi. 2013)

A növekvő kópiaszámmal párhuzamosan egyes transzformánsok kezdeti sárgás színe narancsos-vörösesre változott jelezve a keto-karotinoidok feldúsulását (28. ábra), mely a *crtW* gén erősebb kifejeződésével magyarázható.



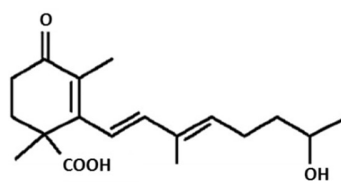
28. ábra. A recipiens MS12 és két, a *crtW* gént a genomba integrálva hordozó transzformáns törzs telepszíne. A tenyésztés YNB táptalajon, 4 napon át folytonos megvilágítás mellett, 25 °C-on történt.

Ezekben a transzformánsokban (MS12+pCA8lf/1-2 és MS12+pPT51'R3/4) a transzformációt követő 13. tenyésztés során a kantaxantin- és az echinenontartalom meghaladta a 100 µg/g[száraz tömeg] mennyiséget (**13. táblázat**). Hasonló kantaxantinprodukción mérték korábban a *crtW* donor *Paracoccus* sp. N81106 esetében is (YOKOYAMA és MIKI 1995). Megjegyzendő, hogy 55 kópia körülbelül ugyanakkora kantaxantinprodukción eredményezett, mint 250. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a karotinoidtermelés növelését egy bizonyos szint után korlátozhatja a rendelkezésre álló prekursorok, pl. a β-karotin, mennyisége. Emellett, az idegen enzim kifejeződése sem fokozható korlátlanul a gén kópiaszámának emelésével, hisz itt is korlátot állít a gombasejt enzimszintézis- és folding-kapacitása (PALOMARES és mtsi. 2004).

Ugyan a *crtW* gén kópiaszáma más transzformánsokban is magas volt (pl. az MS12+pCA9lf/1-2 és az MS12+pCA8'R/4 törzsekben), a termelt keto-karotinoidok mennyisége nem emelkedett meg az ennek megfelelően várt mértékben (**13. táblázat**). Ez az eredmény megerősíti, hogy az integráció helye, az esetleges átrendeződések és az idegen gén – különösen, ha több kópiában van jelen – csendesítése jelentősen befolyásolhatja a heterológ expressziót, amint ezt több fonalas gomba esetében korábban megfigyelték (VERDOES és mtsi. 1995, LIANG és mtsi. 1996, LUBERTOZZI és KEASLING 2009).

A kantaxantintartalom tehát több transzformánsban is jelentősen megnőtt azokhoz a transzformánsokhoz képest, melyek a *crtW* gént autonóm replikálódó plazmidokon hordozták, ugyanakkor az asztaxantintermelés továbbra is minimális maradt az endogén β-karotin-hidroxiláz gyenge aktivitásának megfelelően (**13. táblázat**).

Érdekes módon a *crtW* gént a genomba integráltan hordozó transzformánsok többségének összkarotinoid-tartalma valamivel magasabb volt, mint az eredeti MS12 törzsé (**13. táblázat**), ami azt jelzi, hogy a keto-származékok képződése és/vagy jelenléte stimulálja a β-karotin-képződést. Ismert, hogy mind a gomba által termelt β-karotin, mind egyes származékai visszahatnak a gombák, illetve a *M. circinelloides* β-karotin-bioszintézisére (LAMPILA és mtsi. 1985, FRASER és mtsi. 1996, BHOSALE 2004). Lehetséges, hogy a kantaxantin- és echinenonképződés miatt lecsökkent β-karotin-szint gyakorolt pozitív hatást negatív visszacsatolással a karotinoid-bioszintézisben szerepet játszó gének, illetve enzimek aktivitására. Másrészt a kantaxantin és az echinenon maguk is stimulálhatják a β-karotin-képződést. E xantofilok keto-csoportokat hordoznak a β-jonon gyűrűiken (**22. ábra**), ami korábban esszenciálisnak bizonyult egyes β-karotin-származékok, pl. a trispórsav (**29. ábra**), karotinoid útvonalat szabályozó hatása szempontjából (BHOSALE 2004).



29. ábra. A trispórsav szerkezete.

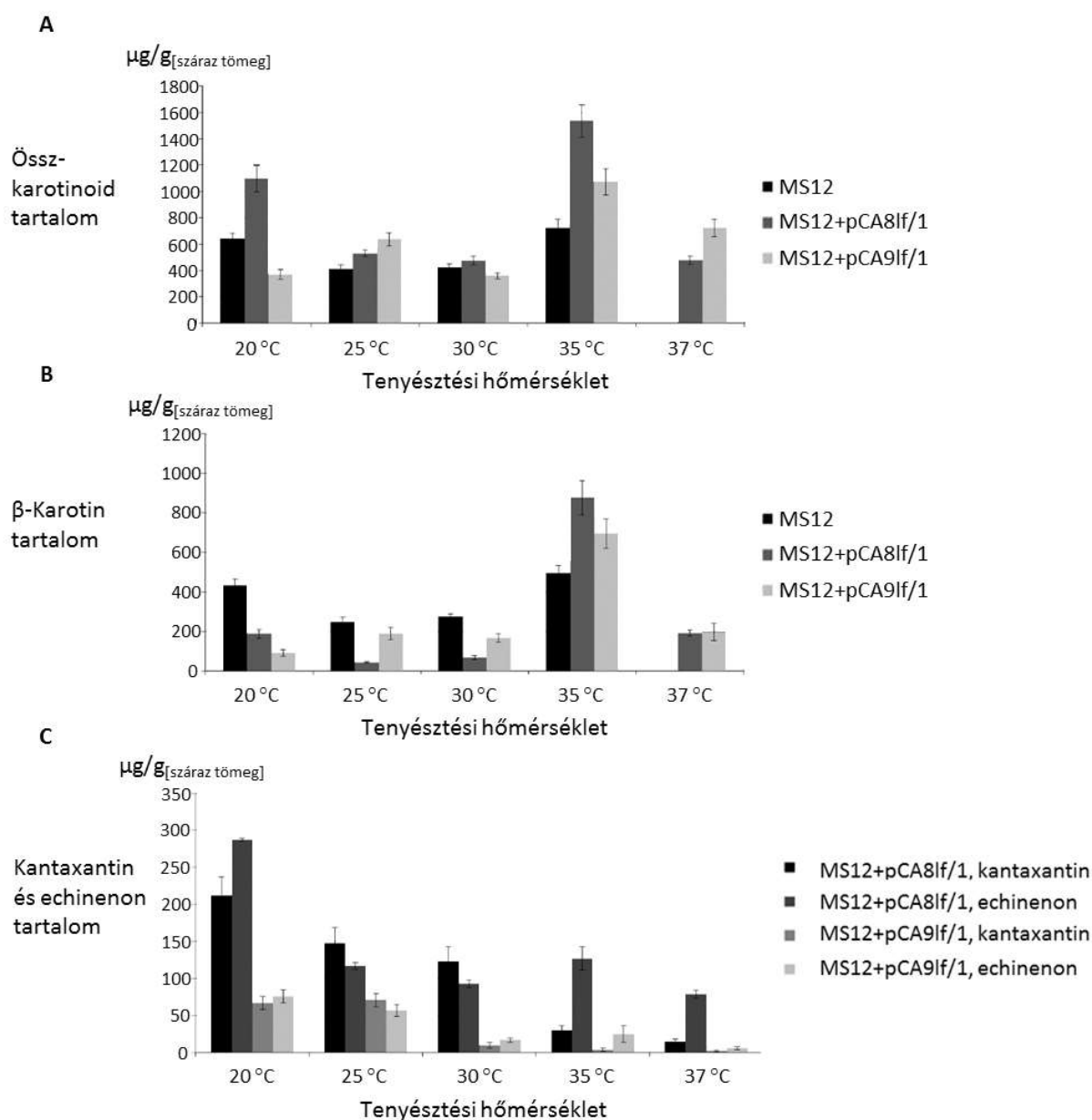
A trispórsav és származékai a járomspórás gombák ivaros folyamataiban kulcsszerepet játszó feromonszerű anyagok, melyek, akárcsak a retinol és származékai, oxidatív hasítással képződnek  $\beta$ -karotinból és pozitív visszacsatolással fokozzák a karotinoid-bioszintézist (SCHIMEK és WÖSTEMEYER 2009). *B. trispora* és *P. blakesleeanus* esetében az ellentétes, (+) és (-) párosodási típusú törzsek együtt tenyésztésével („mated cultures”) többszörösére fokozható a  $\beta$ -karotin-termelés és ezt az eljárást a *Blakeslea*-ra alapozott ipari fermentációk során is alkalmazzák (MEHTA és CERDÁ-OLMEDO 2001, DUFOSSE 2006, KUZINA és mtsi. 2008). Ismert, hogy állatokban a retinsav olyan retinoid-kötő fehérjékhez kapcsolódik, amelyek aztán transzkripciós faktorként számos gén átíródását szabályozzák (BASTIEN és ROCHETTE-EGLY 2004). A retinsav- és a retinoid-származékok transzkripciót szabályozó hatásához hasonló mechanizmust feltételeznek a járomspórás gombák és a trispórsav, illetve származékai esetében is (SCHIMEK és WÖSTEMEYER 2009). Valóban, a trispórsav, sőt a retinol is, fokozza a karotin- és trispórsav-bioszintézisben szerepet játszó gének átíródását *Blakeslea*-ban és *Mucor*-ban (SCHMIDT és mtsi. 2005, SAHADEVAN és mtsi. 2013). A trispórsav és egyes származékai biológiai hatásában a  $\beta$ -jonon gyűrűn (C-4) található keto-csoportnak nagy jelentősége van (WETZEL és mtsi. 2009). Lehetséges, hogy ez a hasonlóság játszik szerepet a keto-karotinoidok esetleges karotinoid-bioszintézist serkentő hatásában.

A **13. táblázatban** megadott karotinoidmennyiségeket minimál táptalajon, szobahőmérsékleten végzett tenyésztést követően mértük. Hogy adatokat nyerjünk a xantofilltermelés optimalizálásához, két transzformáns, az MS12+pCA8lf/1 és az MS12+pCA9lf/1 esetében megvizsgáltuk néhány tenyésztési körülmény, azaz a hőmérséklet, valamint egyes szénforrások hatását is a karotinoidtermelésre.

A tenyésztési hőmérséklet hatásának vizsgálatához a két transzformánst, valamint a recipiens MS12 törzset YNB táptalajon tenyésztettük 20, 25, 30, 35 és 37 °C-on, majd meghatároztuk és összehasonlítottuk a karotinoid-összetételüket (**30. ábra**).

A legnagyobb összkarotinoid- és  $\beta$ -karotin-produkciót minden esetben 35 °C-on tapasztaltuk. A transzformánsok ezen a hőmérsékleten szembetűnően több  $\beta$ -karotin-t termeltek, mint az eredeti MS12 törzs, ami a már említett szabályozással függhet össze. Az előbbiekkal ellentétben a

transzformánsok kantaxantin- és echinenontermelése 20 °C-on volt a legintenzívebb (30. ábra), aminek hátterében talán a kifejeztetett enzim eltérő hőmérséklet optimuma állhat. Bár az enzimet eddig még nem jellemezték, azokban a kísérletekben, ahol a *crtW* gén donoraként használt *Paracoccus* sp. N81106 asztaxantintermelésének fejlesztése volt a cél, a fermentációt 22-25 °C-on végezték (IDE és mtsi. 2012).



**30. ábra.** A tenyésztési hőmérséklet hatása az MS12, az MS12+pCA8lf/1 és az MS12+pCA9lf/1 törzsek összkarotinoid- (A), β-karotin- (B), valamint kantaxantin- és echinenon- (C) termelésére.

A diagram három független kísérletben kapott eredmény átlagértékeit tünteti fel szórással együtt; gombatörzseket 25 °C-on, folytonos megvilágítás mellett, YNB táptalajon tenyésztettük.

A hőmérséklet fontos faktor a karotinoid-bioszintézis szempontjából, ugyanakkor az egyes organizmusok esetében eltérő hatást gyakorol a termelésre (BHOSALE 2004, GHARIBZAHEDI és mtsi. 2013). *H. pluvialis* például magas hőmérsékleten jelentősen több karotinoidot termel, mint alacsony hőmérsékleten, ugyanakkor a *X. dendrorhous* esetében ismert, hogy alacsony hőmérsékletet igényel az asztaxantintermeléshez (AMBATI és mtsi. 2014). Korábban, eredményeinkhez hasonlóan, *A. rouxii* esetében is azt tapasztalták, hogy a hőmérséklet emelésével többszörösére nőtt a karotinprodukción (MOSQUEDA-CANO és GUTIEREZ-CORONA 1995).

A *M. circinelloides* f. *lusitanicus* 36 °C feletti hőmérsékleten nem vagy extrém gyenge növekedést mutat (SCHIPPER 1976). Ennek megfelelően, 37 °C-on az MS12 törzs esetében az általunk alkalmazott YNB táptalajon nem tapasztaltunk növekedést. Ugyanakkor a kantaxantintermelő transzformánsok ezen a hőmérsékleten is túléltek, sőt képesek voltak annyi micéliumot képezni, hogy karotinoidtartalmukat is meg tudtuk határozni (**30. ábra**). KUMARESAN és mtsi. (2008) kantaxantintermelő mutáns *Aspergillus carbonarius* esetében ugyancsak kapcsolatba hozták a pigment jelenlétét a törzs megnövekedett termotoleranciájával. A kantaxantin beépülhet a membránba és már igen kis koncentrációban is jelentős hatást gyakorolhat annak szerkezeti és dinamikus tulajdonságaira, ami általában magában foglalja a membrán rigiditásának fokozódását is (SUJAK és mtsi. 2007). A kantaxantinnek ez a membránfluiditásra és szerkezetre gyakorolt hatása valószínűleg kapcsolatba hozható azzal, hogy a transzformánsok magasabb hőmérsékleten is képesek növekedni. Ehhez járulhat az is, hogy a kantaxantin védelmet nyújthat a magasabb hőmérsékleten fokozottabban termelődő reaktív oxigénfélésekkel szemben. Valóban, membránmodellekben a kantaxantin sokkal hatékonyabbnak bizonyult a szabad gyökökkel szemben, mint a  $\beta$ -karotin (PALOZZA és KRINSKY 1992, AVALOS és LIMÓN 2015).

Az említett két transzformáns esetében vizsgáltuk különböző vegyületek, mint egyedüli szénforrások hatását a karotinoidtartalomra és összetételre (**14. táblázat, 31. ábra**). Olyan vegyületeket választottuk ki, melyek a korábbi szénasszimilációs spektrum vizsgálatok során befolyásolták a karotinoidtartalmat (VÁGVÖLGYI és mtsi. 1996, NAGY és mtsi. 2012a).

A glükóz, mannóz és trehalóz és fruktóz mindkét transzformáns esetében jó szénforrásnak bizonyult a karotinoidtermelés szempontjából. Korábban, a vizsgált szénforrások közül a glükóz, maltóz és cellobióz fokozta legnagyobb mértékben a karotinoidtermelést *A. rouxii*-ban (MOSQUEDA-CANO és GUTIEREZ-CORONA, 1995).

Az MS12+pCA8lf/1 transzformáns esetében a dihidroxi-aceton és az L-aszparaginsav alkalmazása a  $\beta$ -karotin szinte teljes keto-származékokká, főleg kantaxantinná történő átalakulását

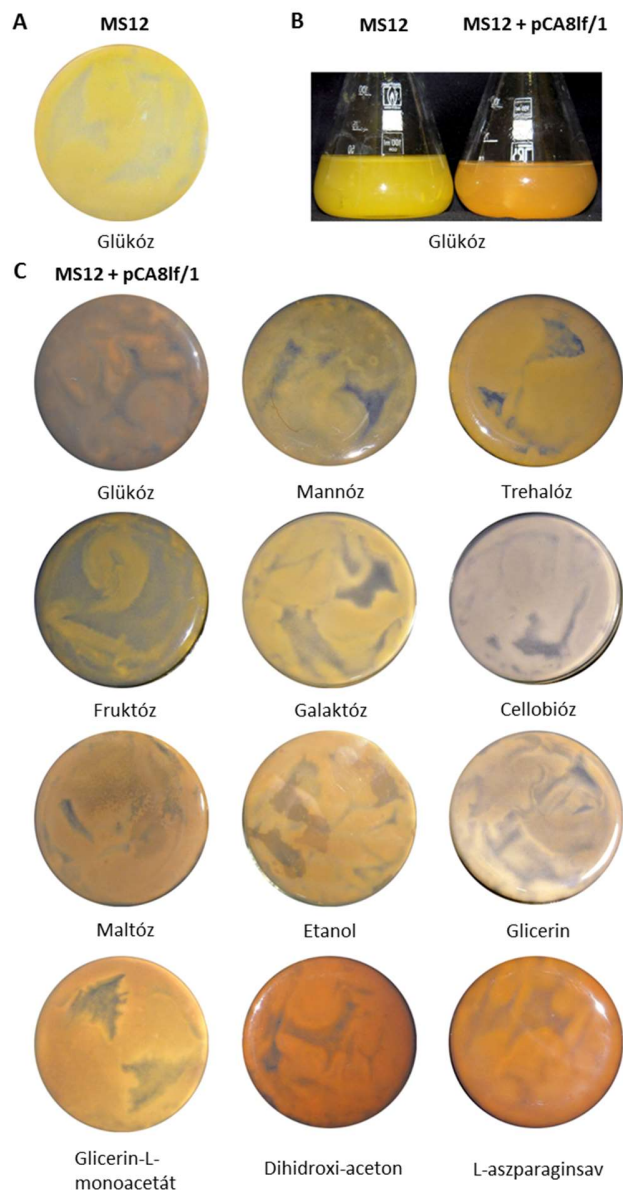


eredményezte (**14. táblázat**). Azt feltételezzük, hogy mindkét vegyület elsősorban a *gpd1* promóter indukcióján keresztül fokozta a *crtW* gén transzkripcióját és így járult hozzá a keto-karotinoid-szint emeléséhez. Az MS12+pCA8lf/1 törzs glükózon (20 °C-on, lásd **30. ábra**), trehalózon és a már említett dihidroxi-acetonon és L-aszparaginsavon (**14. táblázat**) több mint 200 µg/g[száraz tömeg] kantaxantint termelt.

**14. táblázat. Különböző szénforrások hatása két *crtW* gént kifejező *M circinelloides* transzformáns és az eredeti MS12 törzs karotinoidtartalmára.**

| Törzs         | Szénforrás            | Összkarotinoid | β-Karotin     | Kantaxantin          | Echinenon     |
|---------------|-----------------------|----------------|---------------|----------------------|---------------|
| MS12          | Glükóz                | 412 ± 31       | 245 ± 12 (60) | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 511 ± 24       | 34 ± 8 (7)    | 169 ± 15 (33)        | 103 ± 7 (20)  |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 596 ± 51       | 215 ± 30 (36) | 80 ± 17 (13)         | 65 ± 14 (11)  |
| MS12          | Mannóz                | 524 ± 41       | 344 ± 26 (66) | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 749 ± 68       | 74 ± 12 (10)  | 198 ± 17 (26)        | 165 ± 18 (22) |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 799 ± 85       | 271 ± 40 (34) | 139 ± 23 (17)        | 84 ± 16 (10)  |
| MS12          | Trehalóz              | 310 ± 32       | 186 ± 18 (60) | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 684 ± 57       | 61 ± 16 (9)   | <b>209</b> ± 12 (31) | 149 ± 10 (22) |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 781 ± 61       | 268 ± 31 (34) | 122 ± 19 (16)        | 88 ± 7 (11)   |
| MS12          | Fruktóz               | 582 ± 79       | 318 ± 12 (64) | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 595 ± 59       | 88 ± 23 (15)  | 109 ± 18 (18)        | 136 ± 35 (23) |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 746 ± 91       | 199 ± 50 (27) | 139 ± 45 (19)        | 86 ± 11 (12)  |
| MS12          | Galaktóz              | 472 ± 48       | 246 ± 17 (58) | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 584 ± 81       | 68 ± 9 (12)   | 153 ± 26 (26)        | 124 ± 19 (21) |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 631 ± 75       | 166 ± 45 (26) | 108 ± 17 (17)        | 108 ± 23 (17) |
| MS12          | Cellobióz             | 211 ± 21       | 127 ± 11 (60) | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 314 ± 18       | 19 ± 3 (6)    | 114 ± 8 (36)         | 58 ± 5 (19)   |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 203 ± 19       | 56 ± 8 (28)   | 43 ± 7 (21)          | 18 ± 3 (9)    |
| MS12          | Maltóz                | 315 ± 32       | 172 ± 10 (54) | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 428 ± 78       | 27 ± 7 (6)    | 139 ± 29 (33)        | 82 ± 15 (19)  |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 385 ± 53       | 95 ± 12 (25)  | 49 ± 15 (13)         | 27 ± 12 (7)   |
| MS12          | Etanol                | 360 ± 41       | 129 ± 14 (34) | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 341 ± 44       | 40 ± 9 (12)   | 117 ± 17 (34)        | 28 ± 8 (8)    |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 208 ± 27       | 14 ± 5 (7)    | 85 ± 11 (41)         | 35 ± 7 (17)   |
| MS12          | Glicerín              | 236 ± 30       | 98 ± 14 (41)  | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 411 ± 47       | 53 ± 14 (13)  | 79 ± 11 (19)         | 35 ± 7 (8)    |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 437 ± 32       | 50 ± 7 (11)   | 163 ± 21 (37)        | 34 ± 5 (8)    |
| MS12          | Glicerín-L-monoacetát | 172 ± 22       | 99 ± 4 (58)   | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 430 ± 70       | 40 ± 17 (9)   | 169 ± 15 (39)        | 69 ± 11 (16)  |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 402 ± 54       | 126 ± 20 (38) | 71 ± 13 (18)         | 42 ± 6 (11)   |
| MS12          | Dihidroxi-aceton      | 325 ± 45       | 184 ± 9 (57)  | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 426 ± 61       | 15 ± 2 (4)    | <b>232</b> ± 21 (55) | 35 ± 10 (8)   |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 590 ± 41       | 77 ± 10 (13)  | 144 ± 21 (24)        | 142 ± 23 (24) |
| MS12          | L-aszparaginsav       | 334 ± 27       | 194 ± 4 (58)  | -                    | -             |
| MS12+pCA8lf/1 |                       | 494 ± 64       | 21 ± 4 (4)    | <b>222</b> ± 28 (45) | 78 ± 13 (16)  |
| MS12+pCA9lf/1 |                       | 609 ± 58       | 204 ± 24 (38) | 50 ± 6 (8)           | 87 ± 14 (14)  |

A feltüntetett mennyiségek három független tenyésztés adataiból számolt átlagértékek; a karotinoidok mennyiségét HPLC analízissel állapítottuk meg és µg/g[száraz tömeg] ± szórás formában adtuk meg; zárójelben az egyes karotinoidoknak a teljes karotinoidtartalom belüli aránya (%) került feltüntetésre. A 200 µg/g[száraz tömeg]-nél nagyobb kantaxantinértékek vastagon szedett karakterekkel lettek kiemelve. A karotinoidkivonáshoz a törzseket 25 °C-on, 4 napon át, folytonos megvilágítás mellett, YNB táptalajon tenyésztettük, ahol a glükózt a megfelelő szénforrásra (1%) cseréltük.



**31. ábra.** Az eredeti MS12 törzs telepszíne glükóz tartalmú szilárd minimál (YNB) táptalajon (A), az MS12 és az MS12+pCA8lf/1 törzs színe glükóztartalmú minimál (YNB) tápoldatban (B), valamint az MS12+pCA8lf/1 törzs telepszíne különböző szénforrásokat tartalmazó, szilárd minimál (YNB) táptalajon (C).

A tenyésztéseket 4 napon át, 1% szénforrást tartalmazó YNB táptalajon, illetve tápoldatban, 25 °C-on, folytonos megvilágítás mellett végeztük. Mivel a telepek felszínén a képződő sporangiosopórák a micélium színének megfigyelését akadályozta, minden esetben alulról fényképeztük a Petri-csészéket.

Ezen eredmények alapján egy komplett, glükózt és dihidroxi-acetont is tartalmazó szilárd táptalaj (2,5% glükóz, 1% dihidroxi-aceton, 1% pepton; 0,5% élesztőkivonat, 2% agar) alkalmazásával 25 °C-on, állandó megvilágítás mellett tenyésztve, 400-500 µg/g<sub>[száraz tömeg]</sub> kantaxantintermelést sikerült elérni, szinte teljes β-karotin - kantaxantin konverzió mellett. Ezek a mennyiségek összemérhetők vad típusú kantaxantintermelő organizmusok, pl. *G. jacobaea* (200

$\mu\text{g/g}$ [száraz tömeg]) (VEIGA-CRESPO és mtsi. 2005), *Bradyrhizobium* sp. (260  $\mu\text{g/g}$ [száraz tömeg]) (LORQUIN és mtsi. 1997), *Brevibacterium* sp. KY 4313 (600  $\mu\text{g/g}$ [száraz tömeg]) (NELIS és DE LEENHEER 1989) és *Haloferax alexandrinus* (700  $\mu\text{g/g}$ [száraz tömeg]) (ASKER és OHTA 2002), kantaxantintartalmával.

### 5.3.2. A *X. dendrorhous* $\beta$ -karotin-oxigenáz (CrtS) kifejeztetése *M. circinelloides*-ben (Csneretics és mtsi. 2015)

A *X. dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) bazídiumos élesztő fő karotinoidterméke az asztaxantin, mely hasonlóan a *Paracoccus* sp. N81106 törzs esetében ismertetett sémához (**22. ábra**),  $\beta$ -karotinból képződik. E gombánál azonban a konverzió lépéseit nem egy külön  $\beta$ -karotin-ketoláz és egy hidroxiláz, hanem egyetlen, a citokróm P450 enzimek közé tartozó  $\beta$ -karotin-oxigenáz (CrtS) katalizálja (ÁLVAREZ és mtsi. 2006, NIKLITSCHKEK és mtsi. 2008). Aktív állapotban a CrtS enzim redukált formában van jelen, amit egy citokróm P450-reduktáz (CrtR) biztosít; a *crtR* gén deléciója asztaxantintermelésre képtelen *X. dendrorhous* mutánsokat eredményezett (ALCAÍNO és mtsi. 2008). Hogy megvizsgáljuk a *crtS* és a *crtR* gének kifejeztetésének hatását a *M. circinelloides* karotinoidtermelésére, a *X. dendrorhous* CBS 6938 törzs felhasználásával expressziós vektorokat készítettünk.

Az említett törzs cDNS-ének felhasználásával a *crtS* (GenBank azonosító: HG939455) és a *crtR* (GenBank azonosító: LN554260) gént felszaporítottuk, majd a *crtS* gént a pPT81 plazmidba (lásd 5.4.1. fejezet), a *crtR* gént pedig a pPT86 plazmidba (CSERNETICS és mtsi. 2011), az *isoA* gén helyére építettük. Az így kapott pPT81-crtS és pPT86-crtR plazmidok a *pyrG*, illetve a *leuA* gént hordozták szelektációs markerként és mindkét kifejeztetni kívánt gén a *Mucor gpd1P* és *gpd1T* szakaszok szabályozása alatt állt (**F2. táblázat**).

A plazmidokat, külön-külön és együtt is, PEG-közvetítette protoplaszt-transzformációval az MS12 törzsbe juttattuk, majd elemeztük a transzformánsok karotinoid-összetételét. A transzformációs gyakoriság  $15\text{--}30$  telep/ $10^5$  protoplaszt volt. Transzformációként tíz transzformáns telepet izoláltunk a további vizsgálatokhoz (a továbbiakban feltüntetett kópiaszám, relatív transzkriptumszint és karotinoidtartalom értékek a tíz transzformánsban meghatározott értékek átlagainak felelnek meg). A bejuttatott plazmidok kópiaszámát és a kifejeztetett gének relatív transzkripció szintjét qRT-PCR kísérletekkel határoztuk meg. A pPT81-crtS és pPT86-crtR relatív kópiaszáma 1 és 10/genom között változott és az egyes plazmidok kópiaszáma általában eltért a kotranszformánsokban. A *crtS* és a *crtR* gének relatív transzkripció szintje alacsony maradt a transzformánsokban (az *actA* génhez viszonyított transzkripció szintjük 0,002 és 1,32 közt változott). A transzformánsok Southern-hibridizációs analízise azt mutatta, hogy azok a plazmidokat autonóm replikatív módon tartották fenn.

A törzsek stabilnak bizonyultak, mind szelektív (YNB), mind nem szelektív (MEA) tápközegben, tíz tenyésztési ciklust követően is.

A transzformánsok karotinoid-összetételét a **15. táblázat** tartalmazza. Amint az várható volt, a *crtR* kifejeztetése önmagában nem változtatta meg a *M. circinelloides* karotinoid-összetételét. A *crtS* gént hordozó transzformánsokban viszont körülbelül kétszeresére emelkedett a hidroxilált  $\beta$ -karotin-származékok, a zeaxantin és a  $\beta$ -kriptoxantin szintje. Továbbá, e törzsek kis mennyiségben ugyan, de termeltek kantaxantint, echinenont és asztaxantint is. Korábban ÁLVAREZ és mtsi. (2006) már kifejeztették a *crtS* gént *M. circinelloides*-ben, de a *Xanthophyllomyces* eredetű enzimnek csak a  $\beta$ -karotin-hidroxiláz aktivitását mutatták ki; legalábbis nem sikerült keto-származékokat (pl. asztaxantint vagy kantaxantint) detektálniuk.

**15. táblázat.** A pPT81-*crtS* és pPT86-*crtR* plazmidokat autoreplikatív módon hordozó transzformánsok és a recipiens MS12 törzs karotinoid-összetétele, valamint a bejuttatott plazmidok kópiaszáma.

| Törzs                                                    | $\beta$ -<br>Karotin | $\gamma$ -<br>Karotin | Likopin    | $\beta$ -<br>Kriptox. <sup>a</sup> | Zeax.      | Kantax.   | Echi.     | Asztax.   | Össz-<br>karotinoid | Plazmid<br>kópiaszám <sup>b</sup>      |
|----------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|------------|------------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|---------------------|----------------------------------------|
| MS12                                                     | 280 $\pm$ 12         | 23 $\pm$ 3            | 11 $\pm$ 3 | 24 $\pm$ 4                         | 8 $\pm$ 3  | -         | -         | -         | 424 $\pm$ 34        | -                                      |
| MS12<br>+pPT86- <i>crtR</i> /1-10                        | 321 $\pm$ 17         | 31 $\pm$ 3            | 11 $\pm$ 2 | 29 $\pm$ 4                         | 10 $\pm$ 3 | -         | -         | -         | 462 $\pm$ 42        | 2-4                                    |
| MS12<br>+pPT81- <i>crtS</i> /1-10                        | 315 $\pm$ 19         | 33 $\pm$ 4            | 11 $\pm$ 2 | 43 $\pm$ 6                         | 18 $\pm$ 3 | 3 $\pm$ 1 | 3 $\pm$ 1 | 2 $\pm$ 1 | 469 $\pm$ 35        | 1-10                                   |
| MS12<br>+pPT81- <i>crtS</i><br>+pPT86- <i>crtR</i> /1-10 | 371 $\pm$ 27         | 36 $\pm$ 3            | 15 $\pm$ 3 | 55 $\pm$ 7                         | 19 $\pm$ 3 | 4 $\pm$ 2 | 3 $\pm$ 2 | 4 $\pm$ 2 | 554 $\pm$ 49        | <i>crtS</i> : 2-5<br><i>crtR</i> : 1-3 |

<sup>a</sup>Rövidítések:  $\beta$ -Kriptox. -  $\beta$ -kriptoxantin; Zeax. - zeaxantin; Kantax. - kantaxantin; Echi. - echinenon; Asztax. - asztaxantin.

<sup>b</sup>Kópiaszám / gazda genom; minden esetben tíz-tíz transzformánsban határoztuk meg a kópiaszámot. A táblázatban feltüntetett karotinoidmennyiségek transzformációs kísérletenként tíz-tíz transzformáns három független tenyésztését követő HPLC analízis eredményeinek átlagértékei ( $\mu\text{g/g}_{[\text{száraz tömeg}]} \pm \text{szórás}$ ). A DNS- és a karotinoidkivonáshoz a törzseket 25 °C-on, 4 napon át, folytonos megvilágítás mellett, YNB táptalajon tenyésztettük.

Nem volt lényeges különbség a csak *crtS*-t kifejező, valamint a *crtS*-t és *crtR*-t koexpresszáló transzformánsok karotinoidtermelése és összetétele között, ami azt mutatja, hogy a *M. circinelloides* rendelkezik a CrtS enzimet redukáló aktivitással. Ennek megfelelően egyetlen gén, a *crtS* kifejeztetése elegendő a *M. circinelloides* karotinoidtermelésének javításához, illetve módosításához. Ugyanakkor, kísérleteinkben a cirkuláris plazmidon bejuttatott és kifejeztetett gén viszonylag kis hatékonysággal vezetett a  $\beta$ -karotin oxigenált származékainak képződésére, hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz, amikor a bakteriális *crtZ* és *crtW* géneket fejeztettük ki *Mucor*-ban cirkuláris plazmidok segítségével (PAPP és mtsi. 2006). A hatékonyabb konverzió érdekében ebben az esetben is szükség lehet a gén genomba integrálására, illetve átíródásának javítására.

#### 5.4. A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK GENETIKAI MANIPULÁCIÓJÁHOZ SZÜKSÉGES TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZEREK KIDOLGOZÁSA

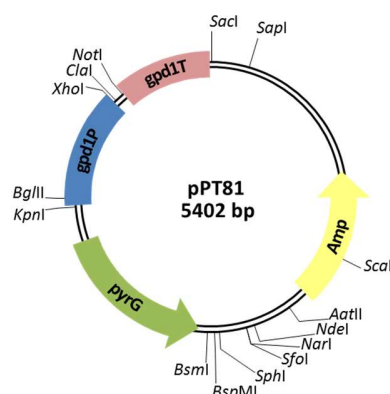
A *Mucor* gének funkcionális elemzéséhez, a terpén- és karotinoid-bioszintézis befolyásolásához szükség volt megfelelő genetikai transzformációs rendszerekre. Járomspórás gombák genetikai manipulációját nagymértékben hátráltatta a hatékony, és stabil integrációt biztosító eljárások, valamint a rutinszerűen alkalmazható vektorok hiánya (IBRAHIM és SKORY 2007). Ezt figyelembe véve fontos célunk volt, hogy a genetikai vizsgálatokhoz és a további rekombináns törzsnemesítési munkákhoz szükséges metodikai háttérrel létrehozzuk. Több általunk kidolgozott, illetve először használt módszert, melyek közül az egyik legnagyobb jelentőségű a REMI transzformáció adaptálása erre *M. circinelloides*-re, ismertettünk a korábbi fejezetekben, így ezek további bemutatásától eltekintünk.

##### 5.4.1. Heterológ gének kifejeztetését lehetővé tevő vektorok kidolgozása járomspórás gombákra (Vastag és mtsi. 2004, Papp és mtsi. 2006, Nyilasi és mtsi. 2005, 2008, Takó és mtsi. 2010, Papp és mtsi. 2012, 2013, 2016)

A továbbiakban azon általánosan felhasználható vektorok és transzformációs rendszerek kidolgozását ismertetem, amelyek heterológ gének kifejeztetését teszik lehetővé ezekben a gombákban akár a karotinoidtermelés vagy más fermentációs eljárás javítása, akár általános genetikai vizsgálatok érdekében. Elsőként olyan plazmidokat hoztunk létre, amelyek valamely erőteljesen kifejeződő, járomspórás gomba gén promóter és terminális régióit tartalmazzák, köztük megfelelő restriktációs helyekkel, hogy a kifejeztetni kívánt gén könnyen a megfelelő helyre építhető legyen. Ilyen plazmidok az általunk izolált és jellemzett *R. miehei* gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén (*gpd*; GenBank azonosító: AF387315) szabályozó régióra épülő pPT80a és pPT80b, melyek a *M. circinelloides leuA* és *pyrG* géneit tartalmazzák szelekciós markerként (**F2. táblázat**). A vektorokkal sikerült a *M. circinelloides* MS12 törzs leucin, illetve uracil auxotrófiáját komplementálni, azaz a *Rhizomucor gpd* promóter képes volt a *Mucor* gének átíródását biztosítani. Mivel a legtöbb járomspórás gombából nem áll rendelkezésre auxotróf mutáns (e vizsgálatok idején pl. *R. miehei*-ből sem) és a járomspórás gombákra jellemző rezisztencia miatt a legtöbb általánosan használt antibiotikum rezisztencia gén nem vagy nem megfelelően használható erre a célra, olyan vektort is készítettünk, melyben a direkt szelekciót az acetamid nitrogén forrásként való hasznosítását lehetővé tevő, *Aspergillus nidulans*-ból származó acetamidáz gén (*amdS*) biztosítja. A pPT79 vektorban az *amdS* gén kifejeződését a *R. miehei gpd* gén promóter és terminális szakaszai biztosítják (**F2. táblázat**). A plazmiddal, a *M. circinelloides* MS12 törzsön kívül, sikeresen transzformáltuk a *B.*

*lamprospora* SZMC 11061B, a *G. persicaria* SZMC 11089 és a *R. miehei* SZMC 11005 törzsét. A transzformánsok a plazmidokat autonóm replikatív módon tartották fenn, a mitotikus stabilitás pedig alacsony maradt (a transzformánsokból nyert sporangiospórák kb. 1-3%-a képzett telepet). A transzformánsok fennmaradása szempontjából az acetamidáz hasznosítás gyenge szelekciót biztosított. Hasonló eredményeket kaptak korábban *R. oryzae* transzformációja esetében is (MICHIELSE és mtsi. 2004).

A *M. circinelloides* genom három *gpd* gént tartalmaz, melyek közül a *gpdI* kifejeződését korábban igazolták és jellemezték (WOLFF és ARNAU 2002). A gén szabályozó régiói felhasználhatók voltak *A. niger* glükóz-oxidáz *M. circinelloides*-ben történő kifejeztetésére, a génkifejeződés pedig a glükózkoncentráció emelésével fokozható volt (LARSEN és mtsi. 2004). A *gpdI* promóter és terminális szakaszokra alapozva olyan általánosan használható vektort építettünk (pPT81; **32. ábra, F2. táblázat**), amely alkalmas idegen gének *Mucor*-ban és egyéb járomspórás gombákban történő kifejeztetésére és további vektorok építésére is. E vektorokkal nemcsak gomba, hanem bakteriális géneket is sikerült kifejeztetni *Mucor*-ban.

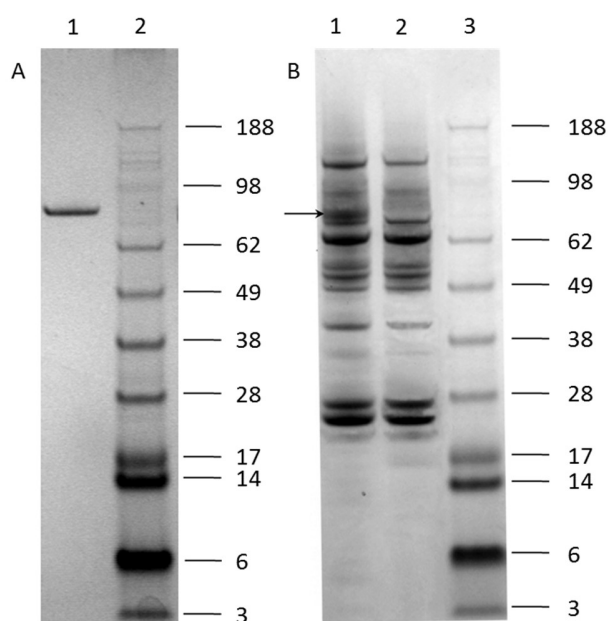


**32. ábra.** A *Mucor gpdI* promóter és terminális régiókat tartalmazó pPT81 plazmid.

A pPT81 plazmidra alapozva, a terpén- és karotinoid-bioszintézis módosítására használt, már említett vektorokon (pl. pAS1-3, pNG1-3, pCA9, pPT50, pPT81-crtS, pPT82-84) kívül, olyan konstrukciókat is készítettünk, amelyek alkalmasak a *M. circinelloides* enzimtermelésének befolyásolására. A pTM8 vektor a kiváló cellulózbontó *R. miehei* NRRL 5282  $\beta$ -glükózidáz génjét (*bgl*) tartalmazta a *Mucor gpdIP* és *gpdIT* régiók közé építve (**F2. táblázat**).

A plazmidot PEG-közvetítette protoplaszt-transzformációval *M. circinelloides* MS12 törzsébe juttattuk. A transzformációs gyakoriság 3 transzformáns/transzformáció volt, a transzformánsok elemzése azt mutatta, hogy a plazmid nem integrálódott a genomba. Az eredeti MS12 törzs viszonylag alacsony  $\beta$ -glükózidáz aktivitással rendelkezik (0,11 és 7,18 U/ml térfogati aktivitás búzakorpát

tartalmazó folyadék tenyészetben, illetve szilárd fázisú fermentációban). Ehhez képest a pTM8 plazmidot hordozó transzformánsok  $\beta$ -glükózidáz aktivitása mind folyadék tenyészetben (0,31-0,37 U/ml), mind szilárd fázisú fermentáció során (19,6-23,3 U/ml) jelentősen, több mint háromszorosára emelkedett. Búzakorpán végzett szilárd fázisú fermentációt követően a transzformáns tenyészetek szűrleteiből fehérjekivonást hajtottunk végre, majd ezt a mintát Sephadex G100 oszlopon részlegesen tisztítottuk. A fehérje kivonat SDS-PAGE elemzésével az MS12 fehérje mintázatában egy, a *Rhizomucor* BGL méretének megfelelő sáv megjelenését detektáltuk (**33. ábra**). Amellett, hogy sikerült fokozni a *M. circinelloides*  $\beta$ -glükózidáz-termelését, a pTM8 vektor alkalmas volt a *R. miehei* *bgl* gén funkcionálisának vizsgálatára, illetve igazolására is.

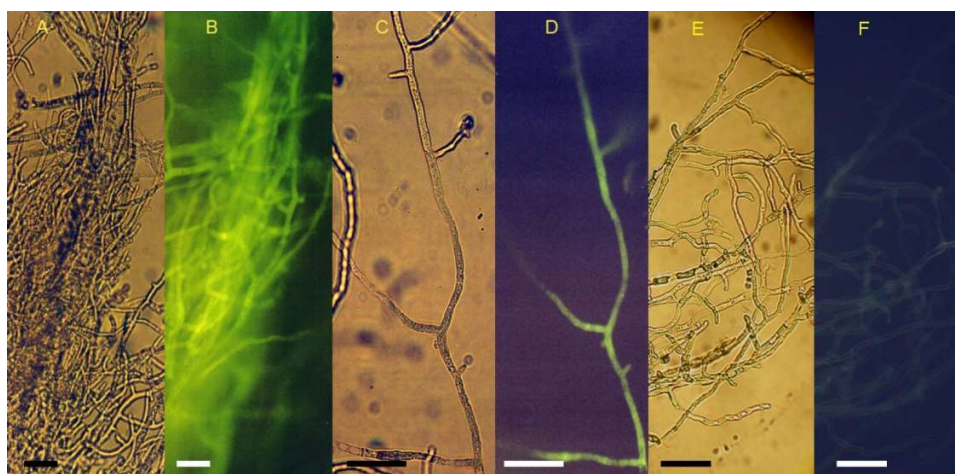


**33. ábra. A *R. miehei* NRRL 5282 törzsből tisztított  $\beta$ -glükózidáz enzim (A), valamint a *M. circinelloides* MS12 törzsből és egy pTM8 vektort hordozó transzformánsból részlegesen tisztított fehérje minták (B) SDS-PAGE analízise.**

A minták sorrendje a következő: A/1: 4  $\mu$ g tisztított *R. miehei*  $\beta$ -glükózidáz; A/2: SeeBlue Plus 2 Standard molekulásúly marker (Invitrogen); B/1 részlegesen tisztított fehérjekivonat az MS12+pTM8 törzsből; B/2 részlegesen tisztított fehérjekivonat az MS12 törzsből, B/3: SeeBlue Plus 2 Standard molekulásúly marker (Invitrogen). Az enzimmtisztításhoz a törzseket desztillált vízzel (130 ml) nedvesített búzakorpán (130 g), szilárd fázisú fermentációban neveltük 6 napig, *M. circinelloides* esetében 25 °C-on, *R. miehei* esetében 37 °C-on. A tenyészeteket 0,1 M acetát pufferrel (pH 5,0) extraháltuk (12 h, 4 °C). A nyers kivonatokban ammónium-szulfáttal frakcionált kisózást végeztünk (12 h, 4 °C), a csapadékot acetát pufferben (0,1 M, pH 5,0) vettük fel (a 75 és 85% telítettség között kapott frakció csapadéka mutatta a legmagasabb hidrolitikus aktivitást). A kisózási lépések utáni tömény enzimmkivonat további tisztítását Sephadex G-100 töltetű oszlopon (Sigma; 4-150 kDa; 27  $\times$  400 mm) végeztük; 50 mM acetát pufferrel (pH 6,0) 0,5 ml/min áramlási sebesség mellett eluáltunk. A legmagasabb enzimaktivitást mutató frakciókat egyesítettük, majd Macro-Prep HQ anioncserélő oszlopra (BioRad; 12,6  $\times$  40 mm) vittük. Az enzimet 1 ml/min átfolyási sebességgel, 0-1 M NaCl, lineáris gradiensben történő változtatásával eluáltuk. A tisztítás végső lépését Sephacryl S-200HR oszlopon (GE Healthcare; 5-250 kDa; 16  $\times$  60 mm) végeztük; 50 mM acetát pufferrel (pH 5,0) 0,5 ml/min áramlási sebesség mellett eluáltunk. A részleges tisztítás csak a kisózást és a Sephadex G-100 kromatográfiát foglalta magában. Az SDS-PAGE gélelektroforézist XCell SureLock Mini-Cell futtató kádban (Novex), NuPage Bis-Tris gélen (Invitrogen), NuPage MES SDS futtató puffer (Invitrogen) felhasználásával, a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A detektáláshoz 0.0025% Coomassie Brilliant Blue R-250 festést használtunk.



Olyan vektorokat is szerkesztettünk, melyek *Agrobacterium*-közvetítette transzformációra voltak alkalmasak (pCA15 és pNYI8; **F2. táblázat**). E vektorok alapja a pPT81 plazmidon kívül a pPK2 bináris vektor volt (COVERT és mtsi. 2001). A pCA15 vektor a bakteriális *crtW* gént tartalmazta és egykópiás integrációt tett lehetővé a *M. circinelloides* genomjába. pNYI8 vektor segítségével a bakteriális higromicin B rezisztencia gént (*hph*), valamint a zöld fluoreszcens fehérje génjét (*gfp*) nemcsak *M. circinelloides*-ben, hanem az ugyancsak karotinoidtermelő *B. lamprospora* gombában is ki tudtuk fejeztetni (**34. ábra**).



**34. ábra. A *gfp* gén kifejeződése *B. lamprospora* transzformánsokban.**

A és C: két pNYI8 vektorral transzformált törzs hifáinak fénymikroszkópos felvétele; B és D: ugyanazon hifák fluoreszcens mikroszkópos képe; E és F: az eredeti, nem transzformált törzs (SZMC 11061B) fénymikroszkópos képe és autofluoreszcenciája. A méretskála minden képen 50  $\mu\text{m}$ -nek felel. A mikroszkópos vizsgálathoz a törzseket YEG táptalajra helyezett celofán korongra oltottuk és 18 órán át, 25 °C-on tenyésztettük.

E vizsgálatok célja egy járomspórás gombákra adaptált AMT protokoll létrehozása (PAPP és mtsi. 2012) és tesztelése volt. A módszert mind sporangiospórák, mind protoplasztok transzformációjára kidolgoztuk. Kísérleteinkben az AGL1 (LAZO és mtsi. 1991), GV3101 (KONCZ és SCHELL 1986) és GV2260 (MCBRIDE és SUMMERFELT 1990) *A. tumefaciens* törzseket teszteltük, de más, *helper* plazmidot tartalmazó törzs is alkalmazható. A logaritmikus fázisban lévő, IM tápoldatban nevelt *A. tumefaciens* tenyészet ( $\text{OD}_{660} = 0,6-0,8$ ) 100  $\mu\text{l}$ -éhez azonos mennyiségű sporangiospóra szuszpenziót ( $10^5-10^6$  sporangiospóra/ml), vagy 1:5 arányban protoplasztokat adtunk és a keveréket IM táptalajra helyezett celofán korongokra szélesztettük, majd 28 °C-on 1-3 napig inkubáltuk. Az együtt tenyésztés hőmérsékletének megfelelőnek kellett lennie mind a *vir* gének aktivációjához, mind a *M. circinelloides* növekedéséhez. Az együtt tenyésztést követően a celofán korongokat szelekciós táptalajra helyeztük át, ahol kb. 5 nap után jelentek meg a transzformáns telepek. A baktérium-gomba együtt tenyésztést folyékony indukciós tápoldatban is elvégezhetjük, ilyenkor 25-28 °C-on, 16 órán



át tartó, IM tápoldatban történő rázatás (150 rpm) után centrifugálással (2160 g, 15 perc, 4 °C) összegyűjtjük a sejteket, majd ezt a keveréket visszük ki a szelektív táptalajra. A transzformációs gyakoriság kísérlettől függően 1-15 transzformáns per transzformáció volt, a bejuttatott DNS általában egy kópiában integrálódott a genomba. Sajnos járomspórás gombákban az AMT módszerrel nyert transzformánsok gyakran mitótikusan instabillnak bizonyulnak, molekuláris elemzésük pedig DNS-átrendeződéseket mutat ki (MONFORT és mtsi. 2003, MICHIELSE és mtsi. 2004). Hasonló instabilitást mi is tapasztaltunk a kísérleteink során.

## 6. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A dolgozatban ismertetett kutatások során  $\beta$ -karotin-termelő járomspórás gombákban, mindenekelőtt a modellorganizmus *M. circinelloides*-ben vizsgáltuk a karotinoid-összetételt, valamint az általános mevalonsav/izoprén- és a specifikus karotinoid-bioszintézis utat és annak genetikai hátterét. Emellett az alap- és alkalmazott kutatásban felhasználható transzformációs rendszereket dolgoztunk ki, valamint új törzseket hoztunk létre és jellemeztünk a gombacsoport további tanulmányozásához. A legfontosabb eredményeket az alábbiakban foglalom össze:

1. Létrehoztunk egy 445 járomspórás gombatörzset magába foglaló gyűjteményt, mely hozzáférhető módon, a Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményben került elhelyezésre. A gyűjtemény az ország leggazdagabb járomspórás gomba génbankja, a Mucoromycotina altörzs Mucorales és Mortierellales rendjének 138 fajtát reprezentálja. A gyűjteménybe került izolátumokat meghatároztuk, illetve a korábbi azonosítást molekuláris módszerekkel ellenőriztük. A gyűjtemény megfelelő alapot kínál további alap- és alkalmazott kutatásokhoz, pl. különböző metabolitok (pl. enzimek, szerves savak, lipidek, karotinoidok) bioszintézisének vizsgálatához.
2. A járomspórás gombagyűjtemény tagjainak azonosításához nagy mennyiségű specifikus szekvenciaadatot (pl. elsősorban ITS, LSU, SSU) generáltunk. Ezek közül nagyszámú szekvencia (elsősorban a *Mortierellales* rend és az *Umbelopsis* nemzetség típusfajaira vonatkozóan) bekerült a nemzetközi *Fungal Barcoding Consortium* által e gombák identifikálására létrehozott, validált referenciaszekvenciák adatbázisába (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA177353>), valamint hozzájárult, hogy a magi riboszómális ITS régiót jelölték ki univerzális DNS vonalkód markernek gombák azonosítására.
3. Molekuláris filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a lipidtermelő fajokról ismert *Mortierellales* renden belüli filogenetikai viszonyok feltárása érdekében. Ennek során elkészítettük a *Mortierellales* rend átfogó, több génre alapozott törzsfáját. Megállapítottuk, hogy a *Mortierellales* rend és a *Mortierellaceae* család egyetlen monofiletikus csoportot alkot, de a tradicionális, morfológiai alapon kijelölt *Mortierella* nemzetség poli-, illetve parafiletikus és a család taxonómiai revízióra szorul. A családon belül elkülönítettük és mind molekuláris szinten, mind morfológiailag jellemeztük a monofiletikus csoportokat, valamint javaslatot tettünk az osztályozás felülvizsgálatára.
4. Az átfogó szekvenciaadatsor lehetőséget nyújtott a magi riboszómális régióknak a család, illetve rendszintű filogenetika becslésében történő alkalmazhatóságának vizsgálatára. A tesztelt taxonok esetében a riboszómális gének evolúciós mintázatainak az általánosan elfogadottnál nagyobb

komplexitását tapasztaltuk, ami alapján az ITS1, 5,8S és az ITS2 lókuszok, valamint az indel mátrix külön partícióként való kezelését javasoljuk. Nagyszámú *Mucoromycotina* ITS szekvencia tesztelésével azt is megállapítottuk, hogy az inszerciók-deléciók bevonása a filogenetikai elemzésekbe jelentősen javítja az ITS illesztések használhatóságát és növeli a feloldóképességet a törzsfák korai elágazásai mentén.

5. Az általunk meghatározott szekvenciákon kívül, az adatbázisokban fellelhető *Mortierella* ITS szekvenciák bevonásával előállítottunk egy közel 900 szekvenciát magába foglaló adatsort is. Ezen adatsorral végzett elemzés információkkal szolgált a *Mortierella* fajok gyakoriságára és földrajzi elterjedtségére vonatkozóan. Az elemzésből általánosabb érvényű megállapításokat is le tudtunk vonni, elsősorban a leírt és még le nem írt gombafajok számának becslésére vonatkozóan. Meg tudtuk becsülni a *Mortierella* fajok abszolút számát és úgy találtuk, hogy az közel van a leírt *Mortierella* fajok számához. Eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a környezeti minták szekvenálása során kapott identifikálhatatlan MOTU-k nagy száma, legalábbis egyes gombacsoportokban, sokkal inkább a típus- és referenciatörzsekre vonatkozó szekvenciaadatok elégtelen voltának tulajdonítható, mintsem nagyszámú még le nem írt faj létezésének.

6. A járomspórás gombák reprezentatív törzsgyűjteményének összeállítása lehetővé tette, hogy teljesebb képet kapjunk a járomspórás gombák karotinoidtermelő képességéről. Teszteltük a gyűjtemény tagjainak karotinoid-összetételét, továbbá 41 izolátum (mely 11 nemzetséget reprezentált) esetében HPLC analízissel részletesen elemeztük a karotinoid-összetételt. Több olyan gombatörzset azonosítottunk melyek összkarotinoid-tartalma összemérhető volt a modellorganizmusként használt *M. circinelloides* f. *lusitanicus*, valamint a karotinintermelésre használt *B. trispora* vad típusú izolátumainak karotinoidtartalmával. A már jellemzett gombatörzsekhez képest eltérő összetételű (pl. asztaxantin-,  $\gamma$ -karotin-, zeaxantin-, vagy  $\beta$ -kriptoxantin-termelő) törzseket is azonosítottunk. Elsőként írtuk le járomspórás gombákban oxigenált karotinszármazékok jelenlétét.

7. Több járomspórás gombatörzs esetében vizsgáltuk a hőmérséklet és különböző szénforrások karotinoidtartalomra gyakorolt hatását. Általánosságban elmondható, hogy járomspórás gombák esetében a növekedési optimumnál magasabb tenyésztési hőmérséklet fokozza a karotinoidtermelést. A különböző szénforrások eltérő hatással voltak az egyes törzsek karotinoidtartalmára, de a glükóz, galaktóz, cellobióz és a trehalóz több törzsnél is a karotinoidtermelés szempontjából kedvező szénforrásnak bizonyult.

8. Azonosítottuk a terpén- és karotinoid-bioszintézis egyik meghatározó enzimének, a HMG-KoA-reduktáznak három feltételezett génjét a modellorganizmusként választott *M. circinelloides* genomjában. A géneket az azokat határoló régiókkal együtt, valamint a megfelelő cDNS-eket izoláltuk, *in silico* vizsgálatokkal meghatároztuk a gének által kódolt, feltételezett fehérjék főbb tulajdonságait.

9. A *M. circinelloides* három *hmgR* génjének átíródását eltérő körülmények közt (azaz eltérő tenyésztési idők, hőmérséklet, szénforrások, sókoncentráció, valamint oxigén jelenléte, vagy hiánya esetén) qRT-PCR módszerrel elemeztük. Igazoltuk mindhárom gén átíródását. A teljes tenyésztési ciklus alatt, aerob körülmények közt a *hmgR2* fejeződik ki a legerősebben, a *hmgR1* pedig a leggyengébben. A *hmgR2* és *hmgR3* mind a csírázó spórákban, mind a micéliumban átíródik, a *hmgR1* transzkriptumai azonban csak a hifákban vannak jelen. Megállapítottuk, hogy a tápközeg sókoncentrációja és oxigéntartalma erőteljes hatást gyakorol a *hmgR* gének kifejeződésére, de bizonyos szénforrások (pl. glükóz, dihidrox-aceton, nátrium-acetát) és a hőmérséklet is jelentősen befolyásolják egyes gének relatív transzkriptumszintjeit. A tenyésztési körülmények megváltozása tehát eltérő hatást gyakorolt a három gén transzkripciójára, ami eltérő szabályozásukat jelzi.

10. Genetikai transzformációval olyan *M. circinelloides* törzseket hoztunk létre, melyekben az egyes *hmgR* gének túlműködtetése valósul meg. Mind a *hmgR2*, mind a *hmgR3* gének túlműködtetése emelte a gomba összkarotinoid-tartalmát és csökkentette sztatinnal szembeni érzékenységet. Ugyanakkor az ergoszterintartalom csak a *hmgR2* gént túlműködtető törzsekben emelkedett meg, a *hmgR1* gén kópiaszámának emelése pedig nem volt hatással a vizsgált tulajdonságokra. Eredményeink azt jelzik, hogy annak ellenére, hogy eltérő szabályozás alatt állnak, a *hmgR2* és a *hmgR3* terméke részben ugyanazon folyamatokban vesz részt, illetve funkcióik átfednek. Azt is megállapítottuk, hogy mindkét gén felhasználható a karotinoid-bioszintézis javítását célzó fejlesztésekben.

11. Olyan *M. circinelloides* törzseket is létrehoztunk, melyekben a *hmgR* géneket asRNS technikával csendesítettük, majd elemeztük a törzsek fenotípusát és a gének kifejeződését. A *hmgR2* és *hmgR3* gének csendesítésének hatására csökkent a gomba karotinoid- és ergoszterintartalma, ami ugyancsak a két gén átfedő funkciójára utal. Míg a *hmgR1* és *hmgR2* gének csendesítése nem volt lényeges hatással a spórák csírázására, a növekedésre és a morfológiára, a *hmgR3* gének csendesítése esetén csökkent csírázóképeséget, lassabb növekedést, torzult mikro- és makromorfológiát, valamint apoptotikus folyamatokat detektáltunk. Mindez azt jelzi, hogy a karotinoid- és ergoszterin-bioszintézisben betöltött szerepe mellett, a *hmgR3* működése hatással van a spórák csírázóképeségének fenntartására és a gomba morfogenezisére. Megállapítottuk azt is, hogy a *hmgR3*

transzkripciójának csendesítése esetén a *hmgR2* gén átíródása jelentősen megemelkedik, azt sugallva, hogy talán a *hmgR3* kiesésének kompenzációjáról van szó, ami az utóbbi génnek és termékének a gomba életfolyamataiban betöltött alapvető szerepét, valamint a két gén szabályozásának kapcsolatát jelzi.

12. Izoláltuk és jellemeztük a *R. miehei* HMG-KoA-reduktáz génjét, bizonyítottuk, hogy a *M. circinelloides*-től eltérően, e gomba genomja egyetlen *hmgR* gént tartalmaz. Nagyszámú *Rhizomucor* izolátumot tesztelve megállapítottuk, hogy a *R. miehei* ellenálló a HMG-KoA-reduktáz szelektív gátlószerével, a lovasztatinnal szemben. A *Rhizomucor hmgR* gént *M. circinelloides*-ben kifejeztetve sikerült csökkenteni utóbbi érzékenységet lovasztatinnal és szimvasztatinnal szemben. Ugyanakkor a heterológ expresszióknak a *M. circinelloides* karotinoid-bioszintézisére nem volt hatása, ami alátámasztja az utóbbinak a többi prenilszármazék (pl. ergoszterin, vagy egyes fehérjék prenilcsoportjai) bioszintézisétől való feltételezett függetlenségét.

13. Izoláltuk és jellemeztük a *M. circinelloides* IPP-izomeráz (*ipi*) és GGPP-szintáz (*carG*) génjeit és vizsgáltuk kifejeződésüket a tenyésztési ciklus során. A gének által kódolt enzimek, a HMG-KoA-reduktázhoz hasonlóan, kulcsszerepet töltenek be a mevalonsav/izoprén-útvonalban. A *carG* gén promóterében olyan, ún. APE motívumokat azonosítottunk, melyek feltehetően a gén átíródásának fény általi indukciójában játszanak szerepet. A *carG* gén promóterét összehasonlítva az ugyancsak fény indukálta, specifikus karotinoid-bioszintézis gének (*carB* és *carRP*) promótereivel megállapítottuk a *Mucor*-ra jellemző APE motívumok konszenzus szekvenciáját. Besugárzást követő Northern-analízissel bizonyítottuk a *carG* gén kék fény általi indukcióját és a *carG*, valamint az említett karotinoidspecifikus gének összehangolt fényszabályozását.

14. Vizsgáltuk az IPP-izomeráz, valamint az FPP- és GGPP-szintázok alkalmazhatóságát a karotinoidtermelés javítására. Ennek érdekében olyan *M. circinelloides* törzseket hoztunk létre, amelyekben az említett enzimeket kódoló *ipi*, *isoA* és *carG* géneket (külön-külön, vagy két-két gént kombinációban) túlműködtettük. A transzformánsok karotinoidtermelése minden esetben megemelkedett a recipiens törzshöz képest. A *M. circinelloides* karotinoidtermelése eredményesen fokozható volt az izoprén-bioszintézis gének kópiaszámának emelésével és erőteljes kifejeződést biztosító szabályozó szekvenciák alkalmazásával. Egyetlen gén módosítása esetén a gének túlműködtetése a következő sorrendben növelte a karotinoidproduktot: *carG* > *ipi* > *isoA*. A génkombinációkkal végzett transzformációk során az egyes kombinációk a következő sorrendben fokozták a karotinoidtermelést: *ipi* + *isoA* > *isoA* + *carG* > *ipi* + *carG*. Eredményeink megerősítik a *carG* gén és a karotinoid-bioszintézis korábban feltárt szoros kapcsolatát. Megállapítottuk, hogy a

GGPP-szintáz működésének befolyásolása alkalmas a karotinoidtermelés javítására. Bizonyítottuk, hogy több élesztőfajjal szemben, az IPP-izomeráz működése *M. circinelloides*-ben sebesség-meghatározó a karotinoid-bioszintézis szempontjából és felhasználható a termelés javítására.

15. Az asztaxantintermelő tengeri baktérium, a *Paracoccus* sp. N81106, valamint az ugyancsak asztaxantintermelő bazídiumos élesztő, a *X. dendrorhous* bioszintézis génjeit *M. circinelloides*-ben kifejeztetve létrehoztunk egy módosított karotinoid-összetételű (xantofilltermelésre képes törzsekől álló) mutánsparcokat. A törzsek felhasználhatók a bioszintézis utak elemzésére, a képződő termékek arányának meghatározására, továbbá annak vizsgálatára, hogy a génműködés, vagy az izoprén út módosítása milyen hatással van a karotinoidok képződésére.

16. A *Paracoccus* sp. N81106 *crtW* és *crtZ* génjeit, melyek a  $\beta$ -karotin asztaxantinná alakulásához szükséges  $\beta$ -karotin-ketolázt és a  $\beta$ -karotin-hidroxilázt kódolják, először olyan plazmidokon juttattuk be *M. circinelloides*-be, amelyeket a transzformánsok autonóm replikatív úton tartottak fenn. A két gént külön-külön és kombinációban (egymással és a mevalonsav-út egyes génjeivel) fejeztettük ki a gombában. Ezen kísérletek során kutatócsoportunknak elsőként sikerült xantofilltermelő járomspórás gombatörzseket genetikai transzformációval előállítani. Mivel a *M. circinelloides* eleve képes zeaxantin- és  $\beta$ -kriptoxantin-termelésre, a csak a *crtZ* gént kifejező törzsek karotinoidspektruma nem változott meg a recipiens törzshöz képest, de a két hidroxilált származék mennyisége megemelkedett. A *crtW* gént expresszáló transzformánsok képesek voltak a  $\beta$ -karotin keto-származékainak, azaz az echinenonnak, a kantaxantinnak és az asztaxantinnak a termelésére.

17. Mivel az izoprén-bioszintézis három génjének (azaz az *ipi*, *isoA* és *carG* géneknek) túlműködtetésével fokozni lehetett a  $\beta$ -karotin-produkciót és rendelkezésünkre álltak az ehhez szükséges expressziós vektorok, kotranszformációs kísérleteket végeztünk a *crtW* gént hordozó pPT51 és az egyes izoprén-bioszintézis géneket hordozó pPT82 (*ipi*), pPT83 (*isoA*) és pPT84 (*carG*) plazmidokkal. E kísérletek eredményeképpen a kotranszformánsok összkarotinoid-tartalma az MS12 és a csak a bakteriális géneket hordozó törzsekhez képest jelentősen megemelkedett. Megállapítottuk, hogy az *ipi* és a *carG* gének túlműködtetésével, az MS12+pPT51 törzsben mérthez képest, a xantofilltermelés fokozható volt. Ugyancsak bebizonyosodott, hogy ha a xantofill-bioszintézishez szükséges heterológ expressziót cirkuláris plazmidok alkalmazásával valósítjuk meg, a  $\beta$ -karotin marad a transzformánsokban a fő karotinoid termék, azaz a konverzió nem lesz teljes.

18. Vektorokat szerkesztettünk a bakteriális *crtW* génnek a *M. circinelloides* genomba történő integrálásához, majd megvalósítottuk az integrációt többféle módszerrel. Ennek során elsőként

valósítottunk meg sikeres REMI transzformációt járomspórás gombában. Olyan *M. circinelloides* törzseket állítottunk elő, melyek stabilan hordozták és örökölték a bevitt gént. Elemeztük a transzformánsokban a bejuttatott DNS további sorsát, az integráció helyét és az esetleges genom átrendeződéseket, amivel információkat szolgáltatunk a járomspórás gombák genetikai transzformációja során lezajló folyamatokról.

19. Elemeztük a bakteriális *crtW* gént a genomba integráltan hordozó *M. circinelloides* törzsek karotinoidtartalmát. A kantaxantintartalom több transzformánsban jelentősen megnőtt a *crtW* gént autonóm replikálódó plazmidokon hordozó törzsekhez képest. Több olyan mitotikusan stabil törzset sikerült előállítani, melyekben a kantaxantin- és echinenontartalom megközelítette a *crtW* donor *Paracoccus* sp. N81106 keto-karotinoid-tartalmát. Igazoltuk ugyanakkor, hogy a karotinoidtermelés nem fokozható korlátlanul a gén kópiaszámának emelésével, mivel egy bizonyos szint után a rendelkezésre álló prekursorok mennyisége, valamint a gombasejt enzimszintézis- és folding-kapacitása korlátozóvá válik. Ezzel egyidejűleg megállapítottuk, hogy a *crtW* gént a genomba integráltan hordozó transzformánsok többségének karotinoidtartalma magasabb, mint az eredeti MS12 törzsé, ami azt jelzi, hogy a keto-származékok képződése stimulálja a karotinoid-bioszintézist. Megállapítottuk, hogy a kantaxantintermelő *M. circinelloides* törzsek magasabb hőmérsékleten is túléltek, mint az elsősorban  $\beta$ -karotint termelő vad típus. Feltételezzük, hogy a kantaxantinnak a membránfluiditásra és szerkezetre gyakorolt hatása, valamint a  $\beta$ -karotinnál erőteljesebb antioxidáns jellege állhat a jelenség hátterében.

20. Különböző szénforrások tesztelésével olyan tápközeget állítottunk össze, melyen egyes transzformánsokkal megvalósítható volt a teljes  $\beta$ -karotin - kantaxantin konverzió és a termelt keto-karotinoidmennyiség megközelítette a vad típusú kantaxantintermelő mikroorganizmusokét.

21. Sikeresen kifejeztettük a *X. dendrorhous* bazídiumos élesztő asztaxantin bioszintéziséért felelős, a citokróm P450 családba tartozó  $\beta$ -karotin-oxigenázt (CrtS) *M. circinelloides*-ben. A *crtS* gént hordozó transzformánsokban körülbelül kétszeresére emelkedett a hidroxilált  $\beta$ -karotin-származékok szintje. Igazoltuk, hogy a *crtS* kifejeződése *M. circinelloides*-ben is eredményez asztaxantinképződést. Megállapítottuk, hogy a *M. circinelloides* képes az exogén eredetű CrtS enzim redukciójára, azaz az aktív enzimforma létrehozására, tehát egyetlen gén, a *crtS*, kifejezetése elegendő a *M. circinelloides* karotinoidtermelésének módosításához.

22. Olyan általánosan felhasználható vektorokat és transzformációs rendszereket dolgoztunk ki, amelyek heterológ gének kifejeztetését teszik lehetővé különböző járomspórás gombákban. A *M.*

*circinelloides* és a *R. miehei* gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz génjeinek promóter és terminális régióra alapozva olyan plazmidokat szerkesztettünk, amelyek a különböző gének nagy hatékonyságú kifejeződését teszik lehetővé járomspórás gombákban. Az *A. nidulans*-ból származó acetamidáz génre alapozva direkt szelekciós rendszert dolgoztunk ki e gombák genetikai transzformációjára. Olyan vektorokat is szerkesztettünk, melyek *A. tumefaciens*-közvetítette transzformációra voltak alkalmasak.

23. A létrehozott vektorok segítségével először alkalmaztuk, optimalizáltuk és jellemeztük e módszert több járomspórás gombafaj esetében. A vektorokat alkalmaztuk a karotinoid-bioszintézis befolyásolására, a zöld fluoreszcens fehérje kifejeztetésére és extracelluláris enzim ( $\beta$ -glükózidáz) gén heterológ expressziójára többféle járomspórás gombában, pl. *M. circinelloides*-ben, *B. lamprospora*-ban, *G. persicaria*-ban és *R. miehei*-ben.



## 7. IDÉZETT IRODALOM

- Albrecht M, Misawa N, Sandmann G (1999) Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids b-carotene and zeaxanthin. *Biotechnol Lett* 21: 791-795.
- Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, Niklitschek M, Sepúlveda D, Baeza M, Cifuentes V (2008) Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol* 8:169.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Garcia-Effron G, Lopez JF, Grimalt JO, Cuenca-Estrella JM, Rodriguez-Tudela JL (2008) Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* 73: 339-347.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) Introductory Mycology. John Wiley and Sons, New York, pp. 291-295
- Almeida ER, Cerdá-Olmedo E (2008) Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr Genet* 53: 129-137.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Álvarez V, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL, Gudiña EJ, Godio RP, Martín JF, Barredo JL (2006) The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of β-carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet Biol* 43: 261-272.
- Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG (2014) Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Marine Drugs* 12: 128-152.
- Andrade-Pavón D, Sánchez-Sandoval E, Rosales-Acosta B, Ibarra JA, Tamariz J, Hernández-Rodríguez C, Villa-Tanaca L (2014) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductases from fungi: A proposal as a therapeutic target and as a study model. *Rev Iberoam Micol* 31: 81-85.
- Appel KF, Wolff AM, Arnau J (2004) A multicopy vector system for genetic studies in *Mucor circinelloides* and other zygomycetes. *Mol Genet Genomics* 271: 595-602.
- Arnau J, Jepsen LP, Stroman P (1991) Integrative transformation by homologous recombination in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Mol Gen Genet* 225: 193-198.
- Arnau J, Stroman P (1993) Gene replacement and ectopic integration in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Mol Gen Genet* 23: 542-546.
- Arrach N, Schmidhauser T, Avalos J (2002) Mutants of the carotene cyclase domain of al-2 from *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics* 266: 914-921.
- Asadi SZ, Khosravi-Darani K, Nikoopour H, Bakhoda H (2015) Evaluation of the effect of process variables on the fatty acid profile of single cell oil produced by *Mortierella* using solid-state fermentation. *Crit Rev Biotechnol* 35: 94-102.
- Asker D, Ohta Y (2002) Production of canthaxanthin by *Haloferax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 743-750.
- Auldrige ME, McCarty DR, Klee HJ (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* 9: 315-321.
- Avalos J, Limón MC (2015) Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet* 61: 309-324.
- Babu PD, Bhakyaraj R, Vidhyalakshmi R (2009) A low cost nutritious food “tempeh”- a review. *World J Dairy Food Sci* 4: 22-27.
- Bai DM, Zhao XM, Li XG, Xu SM (2004) Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of l (+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *Biochem Eng J* 18: 41-48.
- Baima S, Macino G, Morelli G (1991) Photoregulation of the albino-3 gene in *Neurospora crassa*. *J Photochem Photobiol* 11: 107-115.
- Bartsch S, Schimek C, Wöstemeyer J (2002) Microprojectile bombardment as a reliable method for transformation of the mucoralean fungus *Absidia glauca*. *Mycoscience* 43: 213-217.
- Basson ME, Thorsness M, Rine J (1986) *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5563-5567.
- Bastidas RJ, Shertz CA, Lee SC, Heitman J, Cardenas ME (2012) Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKB12-dependent inhibition of Tor. *Eukaryot Cell* 11: 270-281.
- Bastien J, Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid target genes. *Gene* 17: 1-16.
- Bejarano ER, Cerda-Olmedo E (1992) Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*. *FEBS J* 306: 209-212.
- Bellanger AP, Shirazi F, Gebremariam T, Tatara AM, Albert ND, Lewis RE, Ibrahim AS, Kontoyiannis DP (2016) Sub-minimum inhibitory concentrations of statins attenuate the virulence of *Rhizopus oryzae*. *J Infect Dis* 214: 114-121.
- Bellou S, Moustogianni A, Makri A, Aggelis G (2012) Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by zygomycetes grown on glycerol. *Appl Biochem Biotechnol* 166: 146-158.

- Benito EP, Campuzano V, López-Matas MA, de Vicente JI, Eslava AP (1995) Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication of *Mucor circinelloides* OMPdecase-deficient mutants. *Mol Gen Genet* 248: 126-135.
- Benito EP, Díaz-Mínguez JM, Iturriaga EA, Campuzano V, Eslava, AP (1992) Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides* *pyrG* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene* 116: 59-67.
- Benny GL (2009) Zygomycetes. URL: <http://www.zygomycetes.org>. Accessed 05 March 2015.
- Benny GL, Blackwell M (2004) Lobosporangium, a new name for *Echinosporangium* Malloch and *Gamsiella*, a new genus for *Mortierella multidivariata*. *Mycologia* 96: 143-149.
- Benny GL, Humber RA, Voigt K (2014) 8 Zygomycetous Fungi: Phylum Entomophthoromycota and Subphyla Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: Systematics and Evolution Part A, The Mycota; VII. McLaughlin DJ, Spatafora JW (eds.) Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 209-250.
- Benny GL, Smith ME, Kirk PM, Tretter ED, White MM (2016) Challenges and future perspectives in the systematics of Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: Biology of Microfungi, Fungal Biology Series. Li D-W (ed.) Springer International Publishing, pp. 65-126.
- Beppu T, Nishiyama M (2012) Mucorpepsin. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds.) Academic Press, London, UK, pp.154-156.
- Bergman K, Burke PV, Cerdá-Olmedo E, David CN, Delbrück M, Foster KW, Goodell EW, Heisenberg M, Meissner G, Zalokar M, Dennison DS, Shropshire W, Jr. (1969) *Phycomyces*. *Bacteriol Rev* 53: 99-157.
- Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, Peruch F (2012) Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie* 94: 1621-1634.
- Bhosale P (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 351-361.
- Bhosale P, Bernstein PS (2005) Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 445-455.
- Bidle KA, Hanson TE, Howell K, Nannen J (2007) HMG-CoA reductase is regulated by salinity at the level of transcription in *Haloflex volcanii*. *Extremophiles* 11: 49-55.
- Bien CM, Espenshade PJ (2010) Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryot Cell* 9: 352-359.
- Bjerkeng B (2008) Carotenoids in aquaculture: fish and crustaceans. In: Carotenoids. Britton G, Liaanen-Jensen S, Pfander H (eds.), Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp. 237-254.
- Blasco JL, García-Sánchez MA, Ruiz-Herrera J, Eslava AP, Iturriaga EA (2002) A gene coding for ornithine decarboxylase (*odcA*) is differentially expressed during the *Mucor circinelloides* yeast-to-hypha transition. *Res Microbiol* 153: 155-164.
- Borchsenius F (2007) FastGap 1.0.8. Department of Biological Sciences, University of Aarhus, Aarhus, Denmark.
- Bredenkamp A, Velankar H, van Zyl WH, Görgens JF (2010) Effect of dimorphic regulation on heterologous glucose oxidase production by *Mucor circinelloides*. *Yeast* 27: 849-860.
- Breitenbach J, Visser H, Verdoes JC, Ooyen AJJ, Sandmann G (2011) Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Lett* 33: 755-761.
- Breithaupt DR (2008) Xanthophylls in poultry feeding. In: Carotenoids. Britton G, Liaanen-Jensen S, Pfander H (eds.), Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp. 255-264.
- Britton G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9: 1551-1558.
- Britton G (2008) Function of intact carotenoids. In: Carotenoids. Britton G, Liaanen-Jensen S, Pfander H (eds.), Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp. 198-212.
- Britton G, Liaanen-Jensen S, Pfander H (2004) Carotenoids Handbook. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Burg JS, Espenshade PJ (2011) Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res* 50: 403-410.
- Burmester A (1992) Transformation of the mycoparasite *Parasitella simplex* to neomycin resistance. *Curr Genet* 21: 121-124.
- Burmester A, Czempinski K (1994) Sequence comparison of a segment of the gene for 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase in zygomycetes. *Eur J Biochem* 220: 403-408.
- Calo S, Nicolás FE, Vila A, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM (2012) Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol* 83: 379-394.
- Camino LP, Idnurm A, Cerdá-Olmedo E (2015) Diversity, ecology, and evolution in *Phycomyces*. *Fungal Biol* 119:1007-1021.
- Carattoli A, Cogoni C, Morelli G, Macino G (1994) Molecular characterization of upstream regulatory sequences controlling the photoinduced expression of the albino-3 gene of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 13: 787-795.
- Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev* 73: 203-266.

- Cerdá-Olmedo E (1987) Carotene. In: *Phycomyces*. Cerdá-Olmedo E, Lipson ED (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 199-222.
- Cerdá-Olmedo E (2001) *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev* 25: 503-512.
- Cerdá-Olmedo E, Corrochano LM (1996) Photoregulation of fungal gene expression. In: Light as an Energy Source and Information Carrier in Plant Physiology. Jennings RC, Zucchelli G, Ghatti F, Colombetti G (eds.), Plenum Press. New York, pp. 285-292.
- Cervantes M, Vila A, Nicolás FE, Moxon S, de Haro JP, Dalmay T, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM (2013) A single argonaute gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS One* 8: e69283.
- Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP (2006) Lovastatin has significant activity against Zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 96-103.
- Chang MC, Keasling JD (2006) Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nature Chem Biol* 2: 674-681.
- Chien C-Y, Kuhlman EG, Gams W (1974) Zygospores in two *Mortierella* species with “stylospores”. *Mycologia* 66: 114-121.
- Choi HT, Revuelta JL, Sadhu C, Jayaram M (1988) Structural organization of the TRP1 gene of *Phycomyces blakesleeanus*: implications for evolutionary gene fusions in fungi. *Gene* 71: 85-95.
- Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF (2004) RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 355-366.
- Cooney JJ, Marks HW, Smith AM (1966) Isolation and identification of canthaxanthin from *Micrococcus roseus*. *J Bacteriol* 92: 342-345.
- Corrochano LM, Garre V (2010) Photobiology in the Zygomycota: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet Biol* 47: 893-899.
- Covert SF, Kapoor P, Lee M, Briley A, Nairn CJ (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol Res* 105: 259-264.
- Csernetics Á, Nagy G, Iturriaga EA, Szekeres A, Eslava AP, Vágvölgyi C, Papp T (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet Biol* 48: 696-703.
- Csernetics Á, Tóth E, Farkas A, Nagy G, Bencsik O, Vágvölgyi C, Papp T (2015) Expression of *Xanthophyllomyces dendrorhous* cytochrome-P450 hydroxylase and reductase in *Mucor circinelloides*. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 321-336.
- Czygan FC (1964) Canthaxanthin as a secondary carotenoid in certain green algae. *Experientia* 20: 573-574.
- Das A, Yoon S-H, Lee S-H, Kim J-Y, Oh D-K, Kim S-W (2007) An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 505-512.
- De Miguel T, Sieiro C, Poza M, Villa TG (2001) Analysis of canthaxanthin and related pigments from *Gordonia jacobaea* mutants. *J Agric Food Chem* 49: 1200-1202.
- de Oliveira Silva E, Furtado NAJC, Aleu J, Collado IG (2015) Non-terpenoid biotransformations by *Mucor* species. *Phytochem Rev* 14: 745-764.
- Degawa Y, Tokumasu S (1997) Zygospore formation in *Mortierella capitata*. *Mycoscience* 38: 387-394.
- Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1163-1174.
- Delbrück M, Reichardt W (1956) System analysis for the light growth reactions of *Phycomyces*. In: Cellular Mechanisms in Differentiation and Growth. Rudnick D (ed.), Princeton University Press, Princeton, NJ. pp. 3-44.
- Dexter Y, Cooke RC (1984). Fatty acids, sterols and carotenoids of the psychrophile *Mucor strictus* and some mesophilic *Mucor* species. *Trans Br Mycol Soc* 83: 455-461.
- Dholakia JN, Modi VV (1982) Fermentative production of  $\beta$ -carotene and extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Blakeslea trispora* grown on cellobiose. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 15: 33-35.
- Dimster-Denk D, Schafer WR, Rine J (1995) Control of RAS mRNA level by the mevalonate pathway. *Mol Biol Cell* 6: 59-70.
- Do CB, Mahabhashyam MS, Brudno M, Batzoglou S (2005) PROBCONS: probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome Res* 15: 330-340.
- Donald KA, Hampton RY, Fritz IB (1997) Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3341-3344.
- Dufossé L (2006) Food grade pigments. *Food Technol Biotechnol* 44: 313-321.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792-1797.

- EFSA - European Food Safety Authority (2012) Scientific Opinion on the re-evaluation of mixed carotenes (E 160a (i)) and beta-carotene (E 160a (ii)) as a food additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). *EFSA Journal* 10: 2593
- Ernst H (2002) Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure Appl Chem* 74: 1369-1382.
- Espenshade PJ, Hughes AL (2007) Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 41: 401-427.
- Felsenstein J (2004) Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, pp. 664.
- Fiedor J, Burda K (2014) Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6: 466-488.
- Food and Drug Administration (2014) Colour Additive Status List. <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=45c5f37eb3160b3e2e784493e08d16e7&h=L&n=pt21.1.73&r=PART&ty=HTML> (frissítve: 2015.01.20.)
- Food Standard Agency (2014) Current EU approved additives and their E Numbers. <http://www.food.gov.uk/science/additives/enumberlist#.UNHvJ2ewVbE> (frissítve: 2014.12.30.)
- Fortwendel JR (2012) Ras-mediated signal transduction and virulence in human pathogenic fungi. *Fungal Genom Biol* 2: 105.
- Fortwendel JR, Zhao W, Bhabhra R, Park S, Perlin DS, Askew DS, Rhodes JC (2005) A fungus-specific ras homolog contributes to the hyphal growth and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4: 1982-1989.
- Frank HA, Brudvig GW (2004) Redox functions of carotenoids in photosynthesis. *Biochemistry* 43: 8607-8615.
- Frank HA, Cogdell RJ (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol* 63: 257-264.
- Fraser PD, Miura Y, Misawa N (1997) *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 272: 6128-6135.
- Fraser PD, Ruiz-Hidalgo MJ, Lopez-Matas MA, Alvarez MI, Eslava AP, Bramley PM (1996) Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides*. *Biochim Biophys Acta* 1289: 203-208.
- Friesen JA, Rodwell VW (2004) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol* 5: 248.
- Fuhrman JA, Schwalbach MS, Stingl U (2008) Proteorhodopsins: an array of physiological roles? *Nat Rev Microbiol* 6: 488-494.
- Galgóczy L, Lukács G, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi C (2010) Antifungal activity of statins and their interaction with amphotericin B against clinically important Zygomycetes. *Acta Biol Hung* 61: 356-365.
- Galgóczy L, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi C (2009) Are statins applicable for the prevention and treatment of zygomycosis? *Clin Infect Dis* 49: 483-484.
- Galgóczy L, Papp T, Lukács G, Leiter É, Pócsi I, Vágvölgyi C (2007) Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. *FEMS Microbiol Lett* 270: 109-115.
- Gams W (1977) A key to the species of *Mortierella*. *Persoonia* 9: 381-391.
- Gharibzadeh SMT, Razavi SH, Mousavi SM (2013) Microbial canthaxanthin: Perspectives on biochemistry and biotechnological production. *Eng Life Sci* 13: 408-417.
- Garre V, Barredo JL, Iturriaga EA (2015) Transformation of *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* Protoplasts. In: Genetic Transformation Systems in Fungi, Vol. 1. Berg MA, Maruthachalam K (eds.), Springer International Publishing, pp. 49-59.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: The Proteomics Protocols Handbook. Walker JM (ed.), Humana Press, pp. 571-607.
- Gheinani AH, Jahromi NH, Feuk-Lagerstedt E, Taherzadeh MJ (2011) RNA silencing of lactate dehydrogenase gene in *Rhizopus oryzae*. *J RNAi Gene Silencing* 7: 443.
- Gonzalez-Hernandez GA, Herrera-Estrella L, Rocha-Ramirez V, Roncero MI, Gutierrez-Corona JF (1997) Biolistic transformation of *Mucor circinelloides*. *Mycol Res* 101: 953-956.
- Gordon PA, Stewart PR, Clark-Walker DG (1970) Fatty acid and sterol composition of *Mucor genevensis* in relation to dimorphism and anaerobic growth. *J Bacteriol* 107: 114-120.
- Grabinska K, Palamarczyk G (2002) Dolichol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an insight into the regulatory role of farnesyl diphosphate synthase. *FEMS Yeast Res* 2: 259-65.
- Gryganskyi AP, Humber RA, Smith ME, Hodge K, Huang B, Voigt K, Vilgalys R (2013) Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota. *Persoonia* 30: 94-105.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Syst Biol* 52: 696-704.
- Gutiérrez A, López-García S, Garre V (2011) High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J Microbiol Methods* 84: 442-446.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hanson JR (2008) The Chemistry of Fungi. RSC Publishing, Cambridge, UK, pp. 73-116

- Harris SD (2011) Cdc42/Rho GTPases in fungi: variations on a common theme. *Mol Microbiol* 79: 1123-1127.
- Hermet A, Méheust D, Mounier J, Barbier G, Jany JL (2012) Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol* 116: 692-705.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111: 509-547.
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzler D, Nuhn M, Kirk PM, Nilsson RH (2011) Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biol Rev* 25: 38-47.
- Hibbett DS, Ohman A, Kirk PM (2009) Fungal ecology catches fire. *New Phytol* 184: 279-282.
- Higashiyama K, Fujikawa S, Park EY, Shimizu S (2002) Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnol Bioprocess Eng* 7: 252-267.
- Higuera-Ciajara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Rev Food Sci Nutr* 46: 185-196.
- Hoffmann K, Voigt K, Kirk PM (2011) Mortierellomycotina subphyl. nov., based on multi-gene genealogies. *Mycotaxon* 115: 353-363.
- Hofmann K, Stoffel W (1993) TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374: 166-172.
- Holland HL (2001) Biotransformation of organic sulfides. *Nat Prod Rep* 18: 171-181.
- Holstein SA, Hohl RJ (2004) Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids* 39: 293-309.
- Horiuchi H, Takaya N, Yanai K, Nakamura M, Ohta A, Takagi M (1995) Cloning of the *Rhizopus niveus* *pyr4* gene and its use for the transformation of *Rhizopus delemar*. *Curr Genet* 27: 472-478.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ibrahim AS, Gebremariam T, Lin L, Luo G, Hussein MI, Skory CD, French SW, Edwards JE Jr., Spellberg B (2010) The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. *Mol Microbiol* 77: 587-604.
- Ibrahim AS, Skory CD (2007) Genetic manipulation of zygomycetes. In: Medical Mycology. Kavanagh K (ed.), John Wiley and Sons, pp. 305-326.
- Ide T, Hoya M, Tanaka T, Harayama S (2012) Enhanced production of astaxanthin in *Paracoccus* sp. strain N-81106 by using random mutagenesis and genetic engineering. *Biochem Eng J* 65: 37-43.
- Idnurm A, Walton FJ, Floyd A, Heitman J (2008) Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature* 451: 193-196.
- Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J (2000) Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J* 19: 819-830.
- Iturriaga EA, Díaz-Minguez JM, Benito EP, Álvarez MI, Eslava AP (1992) Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus* *leu1* gene. *Curr Genet* 21: 215-223.
- Iturriaga EA, Papp T, Breum J, Arnau J, Eslava AP (2005) Strain and culture conditions improvement for b-carotene production in *Mucor*. In: Microbial Processes and Products, Methods in Biothenology series; 18. Barredo JL (ed.) Humana Press, Totowa, pp. 239-256.
- Iturriaga EA, Velayos A, Eslava AP (2000) Structure and function of genes involved in the biosynthesis of carotenoids in the Mucorales. *Biotechnol Bioprocess Eng* 5: 263-274.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V *et al.* (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Janik A, Juchimiuk M, Kruszewska JS, Orłowski J, Pasikowska M, Palamarczyk G (2012) Impact of yeast glycosylation pathway on cell integrity and morphology. In: Glycosylation. Petrescu S (ed.) InTech, <http://www.intechopen.com/books/glycosylation/impact-of-yeast-glycosylation-pathway-on-cell-integrity-and-morphology>.
- Jung MK, Ovechkina Y, Prigozhina N, Oakley CE, Oakley BR (2000) The use of beta-D-glucanase as a substitute for Novozym 234 in immunofluorescence and protoplasting. *Fung Genet Newslett* 47: 65-66.
- Kaczor A, Pacia MZ (2016) Impact of stress factors on carotenoid composition, structure and bioavailability in microbial sources. In: Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology. Baranska M, Kaczor A (eds.) John Wiley & Sons, pp. 241-260.
- Kajiwarra S, Fraser PD, Kondo K, Misawa N (1997) Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* 324: 421-426.
- Kang MJ, Lee YM, Yoon SH, Kim JH, Ock SW, Jung KH, Shin YC, Keasling JD, Kim SW (2005) Identification of genes affecting lycopene accumulation in *Escherichia coli* using a shot-gun method. *Biotechnol Bioeng* 91: 636-642.
- Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ (2006) Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Technol* 40: 138-144.
- Kavadia A, Komaitis M, Chevalot I, Blanchard F, Marc I, Aggelis G (2001) Lipid and  $\gamma$ -linolenic acid accumulation in strains of zygomycetes growing on glucose. *J Am Oil Chem Soc* 78: 341-346.

- Kim SW, Seo WT, Park YH (1997) Enhanced production of b-carotene from *Blakeslea trispora* with Span 20. *Biotechnol Lett* 19: 557-560.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) Dictionary of the fungi, 10th ed., CABI, Wallingford, UK.
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of the TL -DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204: 383-396.
- Koning AJ, Roberts CJ, Wright RL (1996) Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. *Mol Biol Cell* 7: 769-789.
- Kumaresan N, Sanjay KR, Venkatesh KS, Kadeppagari R-K, Vijayalakshmi G, Umesh-Kumar S (2008) Partially saturated canthaxanthin purified from *Aspergillus carbonarius* induces apoptosis in prostate cancer cell line. *Appl Microbiol Biotechnol* 80: 467-473.
- Kuzina V, Cerdá-Olmedo E (2006) Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus*. *Appl Environ Microbiol* 72: 4917-4922.
- Kuzina V, Cerdá-Olmedo E (2007) Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 991-999.
- Kuzina V, Domenech C, Cerdá-Olmedo E (2006) Relationships among the biosyntheses of ubiquinone, carotene, sterols, and triacylglycerols in Zygomycetes. *Arch Microbiol* 186: 485-493.
- Kuzina V, Ramírez-Medina H, Visser H, van Ooyen AJ, Cerdá-Olmedo E, van den Berg JA (2008) Genes involved in carotene synthesis and mating in *Blakeslea trispora*. *Curr Genet* 54: 143-152.
- Kwasna H, Ward E, Bateman GL (2006) Phylogenetic relationships among Zygomycetes from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. *Mycol Res* 110: 501-510.
- Lampila LE, Wallen ISE, Bullerman LB (1985) A review of factors affecting biosynthesis of carotenoids by the order Mucorales. *Mycopathologia* 90: 65-80.
- Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13172-13177.
- Larsen GG, Appel KF, Wolff AM, Nielsen J, Arnau J (2004) Characterization of the *Mucor circinelloides* regulated promoter gpd1P. *Curr Genet* 45: 225-234.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Nat Biotechnol* 9: 963-967.
- Lee PC, Petri R, Mijts BN, Watts KT, Schmidt-Dannert C (2005) Directed evolution of *Escherichia coli* farnesyl diphosphate synthase (IspA) reveals novel structural determinants of chain length specificity. *Metab Eng* 7: 18-26.
- Lee PC, Schmidt-Dannert C (2002) Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 1-11.
- Lee SC, Li A, Calo S, Heitman J (2013) Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog* 9: e1003625.
- Lee SC, Li A, Calo S, Inoue M, Tonthat NK, Bain JM, Louw J, Shinohara ML, Erwig LP, Schumacher MA, Ko DC (2015) Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol* 97: 844-865.
- Li CH, Cervantes M, Springer DJ, Boekhout T, Ruiz-Vazquez RM, Torres-Martínez SR, Heitman J, Lee SC (2011) Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog* 7: e1002086.
- Liang PH, Ko TP, Wang AHJ (2002) Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem* 269: 3339-3354.
- Liang SH, Skory CD, Linz JE (1996) Characterization of the function of the ver-1A and ver-1B genes, involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 62: 4568-4575.
- Liao P, Hemmerlin A, Bach TJ, Chye ML (2016) The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnol Adv* 34: 697-713.
- Linden H, Ballario P, Macino G (1997) Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 22: 141-150.
- Linnemann G (1941) Die Mucorineen-Gattung *Mortierella* Coemans. Pflanzenforsch. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Linnemannstöns P, Prado M, Fernández-Martín R, Tudzynski B, Avalos J (2002) A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*. *Mol Genet Genomics* 267: 593-602.
- Liou CM, Yanai K, Horiuchi H, Takagi M (1992) Transformation of a *Leu<sup>-</sup>* mutant of *Rhizopus niveus* with the *leuA* gene of *Mucor circinelloides*. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1503-1504.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method. *Methods* 25: 402-408.
- Lorquin J, Molouba F, Dreyfus BL (1997) Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol* 63: 1151-1154.
- Löytynoja A, Goldman N (2008) An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10557-10562

- Lubertozzi D, Keasling JD (2009) Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnol Adv* 27: 53-75.
- Lukács G, Papp T, Nyilasi I, Nagy E, Vágvölgyi C (2004) Differentiation of *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivities to lovastatin. *J Clin Microbiol* 42: 5400-5402.
- Lukács G, Papp T, Somogyvári F, Csérnetics Á, Nyilasi I, Vágvölgyi C (2009) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. *Ant van Leeuwenhoek* 95: 55-64.
- Lum PY, Edwards S, Wright R (1996) Molecular, functional and evolutionary characterization of the gene encoding HMG-CoA reductase in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 12: 1107-1124.
- Mackenzie DA, Wongwathanarat P, Carter AT, Archer DB (2000) Isolation and use of a homologous histone H4 promoter and a ribosomal DNA region in a transformation vector for the oil-producing fungus *Mortierella alpina*. *Appl Environ Microbiol* 66: 4655-4661.
- Macreadie IG, Johnson G, Schlosser T, Macreadie PI (2006) Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS Microbiol Lett* 262: 9-13.
- Maier FJ, Schäfer W (1999) Mutagenesis via insertional – or restriction enzyme-mediated – integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi - Minireview. *Biol Chem* 380: 855-864.
- Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar CN (2014) Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Fact* 13:12.
- Matthews PD, Wurtzel ET (2000) Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 396-400.
- Mayne ST, Parker RS (1989) Antioxidant activity of dietary canthaxanthin. *Nutr Cancer* 12: 225-236.
- McBride KE, Summerfelt KR (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 14: 269-276.
- Mehta BJ, Cerdá-Olmedo E (2001) Genetics. Intersexual partial diploids of phycomyces. 158: 635-641.
- Mehta BJ, Obratsova IN, Cerdá-Olmedo E (2003) Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of  $\beta$ -carotene and lycopene. *Appl Environ Microbiol* 69: 4043-4048.
- Mende K, Homann V, Tudzynski B (1997) The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and expression. *Mol Gen Genet* 255: 96-105.
- Meussen BJ, de Graaff LH, Sanders JP, Weusthuis RA (2012) Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol* 94: 875-886.
- Meyer W, Gams W (2003) Delimitation of *Umbelopsis* (Mucorales, Umbelopsidaceae fam. nov.) based on ITS sequence and RFLP data. *Mycol Res* 107: 339-350.
- Michielse CB, Hooykas PJJ, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* 48: 1-17.
- Michielse CB, Salim K, Ragas P, Ram AFJ, Kudla B, Jarry B, Punt J, van den Hondel CAMJJ (2004) Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Mol Genet Genomics* 271: 499-510.
- Millati R, Edebo L, Taherzadeh MJ (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme Microbial Technol* 36: 294-300.
- Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwara S, Saito T, Ohtani T, Miki W (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol* 177: 6575-6584.
- Misawa N, Shimada H (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotechnol* 59: 169-181.
- Mitra D, Rasmussen ML, Chand P, Chintareddy VR, Yao L, Grewell D, Verkade JG, Wang T, van Leeuwen J (2012) Value-added oil and animal feed production from corn-ethanol stillage using the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Biores Tech* 107: 368-375.
- Monfort A, Cordero L, Maicas S, Polaina J (2003) Transformation of *Mucor miehei* results in plasmid deletion and phenotypic instability. *FEMS Microbiol Lett* 224: 101-106.
- Mosqueda-Cano G, Gutierrez-Corona JF (1995) Environmental and developmental regulation of carotenogenesis in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Curr Microbiol* 31: 141-145.
- Mullins AD, Kang S (2001) Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants - review. *Cell Mol Life Sci* 58: 2043-2052.
- Naguib Y.M. (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem* 48: 1150-1154.
- Nagy Á, Vágvölgyi C, Balla É, Ferenczy L (1994) Electrophoretic karyotype of *Mucor circinelloides*. *Curr Genet* 26: 45-48.
- Nagy G, Csérnetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Vágvölgyi C, Papp T (2012a) Carotenoid composition of Mucorales fungi. *Afr J Microbiol Res* 6: 7265-7270.

- Nagy G, Farkas A, Csernetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Nyilasi I, Vágvolgyi C, Papp T (2014) Transcription analysis of the three HMG-CoA reductase genes of *Mucor circinelloides*. *BMC Microbiol* 14: 93.
- Nagy GL, Kocsubé S, Csanádi Z, Kovács GM, Petkovits T, Vágvolgyi C, Papp T (2012b) Re-mind the gap! Insertion – deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) of fungi. *PLoS One* 7: e49794.
- Nagy GL, Petkovits T, Kovács GM, Voigt K, Vágvolgyi C, Papp T (2011) Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a high contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. *New Phytol* 191: 789-794.
- Navarro E, Lorca-Pascual JM, Quiles-Rosillo MD, Nicolás FE, Garre V, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol Genet Genomics* 266: 463-470.
- Navarro E, Peñaranda A, Hansberg W, Torres-Martínez S, Garre V (2013) A white collar 1-like protein mediates opposite regulatory functions in *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet Biol* 52: 42-52.
- Nelis HJ, De Leenheer AP (1989) Reinvestigation of *Brevibacterium* sp strain KY-4313 as a source of canthaxanthin. *Appl Environ Microbiol* 55: 2505-2510.
- Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM (2006) Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol* 72: 3805-3813.
- Nicolás FE, Moxon S, de Haro JP, Calo S, Grigoriev IV, Torres-Martínez S, Moulton V, Ruiz-Vázquez RM, Dalmay T (2010) Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucl Acids Res* 38: 5535-5541.
- Nicolás FE, Vila A, Moxon S, Cascales MD, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Garre V (2015) The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics* 16: 1.
- Niklitschek M, Alcaino J, Barahona S, Sepulveda D, Lozano C, Carmona M, Marcoleta A, Martínez C, Lodato P, Baeza M, Cifuentes V (2008) Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* 41: 93-108.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH (2008) Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinform* 4: 193-201.
- Nout MJR, Aidoo KE (2002) Asian Fungal Fermented Food. In: Industrial Applications, The Mycota; X. Osiewacz HD (ed.) Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 23-47.
- Nout RM (2007) The colonizing fungus as a food provider. In: Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food. Dijksterhuis J, Samson RA (eds.) CRC Press, Boca Raton, pp. 335-352.
- Nyilasi I, Ács K, Papp T, Vágvolgyi C (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol* 50: 415-420.
- Nyilasi I, Kocsubé S, Krizsán K, Galgóczy L, Pesti M, Papp T, Vágvolgyi C (2010a) *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. *FEMS Microbiol Lett* 307: 175-184.
- Nyilasi I, Kocsubé S, Pesti M, Lukács G, Papp T, Vágvolgyi C (2010b) *In vitro* interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. *J Med Microbiol* 59: 200-205.
- Nyilasi I, Papp T, Csernetics Á, Vágvolgyi C (2008) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the zygomycete fungus, *Backusella lamprospora*. *J Basic Microbiol* 48: 59-64.
- O'Donnell K, Lutzoni FM, Ward TJ, Benny GL (2001) Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): Evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia* 93: 286-296.
- Obratzsova IN, Prados N, Holzmann K, Avalos J, Cerdá-Olmedo E (2004) Genetic damage following introduction of DNA in *Phycomyces*. *Fung Genet Biol* 41: 168-180.
- Ocampo J, McCormack B, Navarro E, Moreno S, Garre V, Rossi S (2012) Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryot Cell* 11: 989-1002.
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.
- Ogawa J, Sakuradani E, Kishino S, Ando A, Yokozeki K, Shimizu S (2014) Microbial production of functional polyunsaturated fatty acids and their derivatives. In: Microbial Production, From Genome Design to Cell Engineering. Anazawa H, Shimizu S (eds.) Springer, Japan. pp. 207-218.
- Ogura K, Koyamat T (1998) Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem Rev* 98: 1263-1276.
- Ohnuma S, Narita K, Nakazawa T, Ishida C, Takeuchi Y, Ohto , Nishino T (1996) A role of the amino acid residue located on the fifth position before the first aspartate-rich motif of farnesyl diphosphate synthase on determination of the final product. *J Biol Chem* 271: 30748-30754.
- Olmedo-Monfil V, Cortés-Penagos C, Herrera-Estrella A (2004) Three decades of fungal transformation. In: Recombinant Gene Expression. Balbás P, Lorence A (eds.) Humana Press, Totowa, pp. 297-313.
- Orlowsky M (1991) *Mucor* dimorphism. *Microbiol Rev* 55: 234-258.



- Orset S, Young AJ (1999) Low-temperature-induced synthesis of  $\alpha$ -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J Phycol* 35: 520-527.
- Ortiz-Alvarado R, Gonzalez-Hernandez GA, Torres-Guzman JC, Gutierrez-Corona JF (2006) Transformation of *Mucor circinelloides* with autoreplicative vectors containing homologous and heterologous ARS elements and the dominant *Cbxr* carboxine-resistance gene. *Curr Microbiol* 52: 178-181.
- Osherov N, Mathew J, May GS (2000) Polarity-defective mutants of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 31: 181-188.
- Pagel M, Meade A (2006) BayesPhylogenies 1.0. Software. URL: <http://www.evolution.reading.ac.uk/SoftwareMain.html>.
- Pagni M, Ioannidis V, Cerutti L, Zahn-Zabal M, Jongeneel CV, Hau J, Martin O, Kuznetsov D, Falquet L (2007) MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue): W433-W437.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT (2004) Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol* 267: 15-52.
- Palozza P, Krinsky NI (1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch Biochem Biophys* 297: 291-295.
- Palozza P, Maggiano N, Calviello G, Lanza P, Piccioni E, Ranelletti FO, Bartoli GM (1998) Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines. *Carcinogenesis* 19: 373-376.
- Papp T, Csernetics Á, Nagy G, Bencsik O, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvölgyi C (2013) Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 4937-4950.
- Papp T, Csernetics Á, Nyilasi I, Vágvölgyi C, Iturriaga EA (2012) Integration of a bacterial  $\beta$ -carotene ketolase gene into the *Mucor circinelloides* genome by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. In: Microbial Carotenoids from Fungi, Methods and Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 898. Barredo, J-L (ed.) Humana Press, New York. pp. 123-132.
- Papp T, Hoffmann K, Nyilasi I, Petkovits T, Wagner L, Vágvölgyi C, Voigt K (2011) *Mortierella*. In: Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. Liu D (ed.) Taylor & Francis Group, London, UK, pp. 749-757.
- Papp T, Nyilasi I, Csernetics Á, Nagy G, Takó M, Vágvölgyi C (2016) Improvement of industrially relevant biological activities in Mucoromycotina fungi. In: Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. Schmoll M, Dattenböck C (eds.), Springer International Publishing, pp. 97-118.
- Papp T, Vastag M, Michailides TJ, Ferenczy L, Vágvölgyi C (2001) Genetic variability of the postharvest pathogen *Gilbertella persicaria*: identification of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers correlating with (+) and (-) mating types. *Ant van Leeuwenhoek* 80: 301-309.
- Papp T, Velayos A, Bartók T, Eslava AP, Vágvölgyi C, Iturriaga EA (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 526-531.
- Pelah D, Sintov A, Cohen E (2004) The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 483-486.
- Petkovits T, Nagy GL, Hoffmann K, Wagner L, Nyilasi I, Griebel T, Schnabelrauch D, Vogel H, Voigt K, Vágvölgyi C, Papp T (2011) Data partitions, Bayesian analysis and phylogeny of the zygomycetous fungal family Mortierellaceae, inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *PLoS One* 6: e27507.
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253-1256.
- Prado-Cabrero A, Scherzinger D, Avalos J, Al-Babili S (2007) Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase *CarX* from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* 6: 650-657.
- Profant DA, Roberts CJ, Wright RL (2000) Mutational analysis of the karmellae-inducing signal in Hmg1p, a yeast HMG-CoA reductase isozyme. *Yeast* 16: 811-827.
- Qiao J, Kontoyiannis DP, Wan Z, Li R, Liu W (2007) Antifungal activity of statins against *Aspergillus* species. *Med Mycol* 45: 589-593.
- Quiles-Rosillo MD, Ruiz-Vázquez RM, Torres-Martínez S, Garre V (2003) Cloning, characterization and heterologous expression of the *Blakeslea trispora* gene encoding orotidine-5-monophosphate decarboxylase. *FEMS Microbiol Lett* 222: 229-236.
- Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815.
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275: 8290-8300.
- Revuelta JL, Jayaram M (1986) Transformation of *Phycomyces blakesleeanus* to G-418 resistance by an autonomously replicating plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7344-7347.
- Reyes LH, Gomez JM, Kao KC (2014) Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. *Metab Eng* 21: 26-33.

- Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ (2000) Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 13: 236-301.
- Rodrigues RC, Fernández-Lafuente R (2010) Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J Mol Catal B: Enzym* 64: 1-22.
- Rodríguez-Amaya DB (2001) A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. Research, ILSI Press, Washington, USA.
- Rodríguez-Frómata RA, Gutiérrez A, Torres-Martínez S, Garre V (2013) Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 3063-3072.
- Rodríguez-Romero J, Corrochano LM (2006) Regulation by blue light and heat shock of gene transcription in the fungus *Phycomyces*: proteins required for photoinduction and mechanism for adaptation to light. *Mol Microbiol* 61: 1049-1059.
- Rodríguez-Sáiz M, Paz B, De La Fuente JL, López-Nieto MJ, Cabri W, Barredo JL (2004) *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 70: 5589-5594.
- Rodríguez-Villalón A, Pérez-Gil J, Rodríguez-Concepción M (2008) Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. *J Biotechnol* 135: 78-84.
- Roshan U, Livesay DR (2006) Probalign: Multiple sequence alignment using partition function posterior probabilities. *Bioinformatics* 22: 2715-2721.
- Rostami F, Razavi SH, Sepahi AA, Gharibzadeh SMT (2014) Canthaxanthin biosynthesis by *Dietzia natronolimnaea* HS-1: effects of inoculation and aeration rate. *Braz J Microbiol* 45: 447-456.
- Roukas T (2016) The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Crit Rev Biotechnol* 36: 424-433.
- Roze LV, Linz JE (1998) Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Genet Biol* 25: 119-133.
- Ruiz-Albert J, Cerdá-Olmedo E, Corrochano LM (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Mol Genet Genomics* 266: 768-777.
- Ruiz-Hidalgo MJ, Benito EP, Sandmann G, Eslava AP (1997) The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol Gen Genet* 253: 734-744.
- Ruiz-Hidalgo MJ, Eslava AP, Alvarez MI, Benito EP (1999) Heterologous expression of the *Phycomyces blakesleeanus* phytoene dehydrogenase gene (*carB*) in *Mucor circinelloides*. *Curr Microbiol* 39: 259-264.
- Ruiz-Vázquez RM, Nicolás FE, Torres-Martínez S, Garre V (2015) Chapter two-distinct RNAi pathways in the regulation of physiology and development in the fungus *Mucor circinelloides*. *Adv Genet* 91: 55-102.
- Sahadevan Y, Richter-Fecken M, Kaerger K, Voigt K, Boland W (2013) Early and late trisporoids differentially regulate  $\beta$ -carotene production and gene transcript levels in the mucoralean fungi *Blakeslea trispora* and *Mucor mucedo*. *Appl Environ Microbiol* 79: 7466-7475.
- Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Alvarez E, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J (2012) *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole and amphotericin B in a murine invasive infection by *Mucor circinelloides*: poor efficacy of posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 2246-2250.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Sandmann G (1997) High level expression of carotenogenic genes for enzyme purification and biochemical characterization. *Pure Appl Chem* 69: 2163-2168.
- Sandmann G., Mlisawa N. (2002) Fungal carotenoids. In: Industrial Applications, The Mycota; X. Osiewacz HD (ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp.247-262.
- Sanz C, Benito EP, Orejas M, Alvarez MI, Eslava AP (2010) Protein-DNA interactions in the promoter region of the *Phycomyces carB* and *carRA* genes correlate with the kinetics of their mRNA accumulation in response to light. *Fungal Genet Biol* 47: 773-781.
- Sanz C, Velayos A, Álvarez MI, Benito EP, Eslava AP (2011) Functional analysis of the *Phycomyces carRA* gene encoding the enzymes phytoene synthase and lycopene cyclase. *PloS One* 6: e23102.
- Saperstein S, Star MP (1954) The ketonic carotenoid canthaxanthin isolated from a colour mutant of *Corynebacterium michiganense*. *Biochem J* 57: 273-275.
- Schilde C, Wöstemeyer J, Burmester A (2001) Green fluorescent protein as a reporter for gene expression in the mucoralean fungus *Absidia glauca*. *Arch Microbiol* 175: 1-7.
- Schimek C, Wöstemeyer J (2006) Pheromone action in the fungal groups Chytridiomycota, and Zygomycota, and in the Oomycota. In: Growth, Differentiation and Sexuality, The Mycota; I. Kües U, Fischer R (eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 215-231.
- Schimek C, Wöstemeyer J (2009) Carotene derivatives in sexual communication of zygomycete fungi. *Phycochemistry* 70: 1867-1875.
- Schipper MAA (1976) On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Stud Mycol* 12: 1-40.
- Schipper MAA, Stalpers JA (2002) Zygomycetes: the order Mucorales. In: Pathogenic Fungi in Humans and Animals, 2<sup>nd</sup> ed., Mycology Series, Howard DH (ed.) 16: 67-125.

- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537-7541.
- Schmidt AD, Heinekamp T, Matuschek M, Liebmann B, Bollschweiler C, Brakhage AA (2005) Analysis of mating-dependent transcription of *Blakeslea trispora* carotenoid biosynthesis genes *carB* and *carRA* by quantitative real-time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 549-555.
- Schmidt-Dannert C, Lee PC, Mijts BN (2006) Creating carotenoid diversity in *E. coli* cells using combinatorial and directed evolution strategies. *Phytochem Rev* 5: 67-74.
- Schoch CL, Robbertse B, Robert V, Vu D, Cardinali G, Irinyi L, Meyer W, Nilsson RH, Hughes K, Miller AN, Kirk PM *et al.* (2014) Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. *Database* 2014:bau061.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW, Miller AN *et al.* (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 6241-6246.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421.
- Schwartz VU, Hoffmann K, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi C, de Hoog S, Voigt K, Jacobsen ID (2012) *Lichtheimia* species exhibit differences in virulence potential. *PLoS One* 7: e40908.
- Schweiggert RM, Carle R (2016) Carotenoid production by Bacteria, Microalgae, and Fungi. In: Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology. Baranska M, Kaczor A (eds.) John Wiley and Sons, Chichester, UK, p.217.
- Seiler S, Plamann M (2003) The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* 14: 4352-4364.
- Sekimoto S, Rochon DA, Long JE, Dee JM, Berbee ML (2011) A multigene phylogeny of *Olpidium* and its implications for early fungal evolution. *BMC Evol Biol* 11: 1.
- Seong K, Li L, Hou Z, Tracy M, Kistler HC, Xu JR (2006) Cryptic promoter activity in the coding region of the HMG-CoA reductase gene in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* 43: 34-41.
- Sharma AK, Spudich JL, Doolittle WF (2006) Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol* 14: 463-469.
- Sharma S, Hiteshi K, Gupta R (2013) Effect of immobilized polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC-6025 on wine fermentation. *Biotechnol Appl Biochem* 60: 196-202.
- Shimada H, Kondo K, Fraser P, Miura Y, Saito T, Misawa N (1998) Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl Environ Microbiol* 64: 2676-2680.
- Shimodaira H, Hasegawa M (2001) CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* 17: 1246-1247.
- Silveira GGD, Oliveira GMD, Ribeiro EJ, Monti R, Contiero J (2005). Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. *Braz Arch Biol Tech* 48: 931-937.
- Skory CD (2002) Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol Genet Genomics* 268: 397-406.
- Skory CD (2004) Repair of plasmid DNA used for transformation of *Rhizopus oryzae* by gene conversion. *Curr Genet* 45: 302-310.
- Skory CD (2005) Inhibition of non-homologous end joining and integration of DNA upon transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol Genet Genomics* 274: 373-383.
- Song JL, Lyons CN, Holleman S, Oliver BG, White TC (2003) Antifungal activity of fluconazole in combination with lovastatin and their effects on gene expression in the ergosterol and prenylation pathways in *Candida albicans*. *Med Mycol* 41: 417-425.
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000) The Staden Package. *Methods Mol Biol* 132: 115-130.
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Suárez T, Eslava AP (1988) Transformation of *Phycomyces* with a bacterial gene for kanamycin resistance. *Mol Gen Genet* 212: 120-123.
- Sujak A, Gabrielska J, Milanowska J, Mazurek P, Strzałka K, Gruszecki WI (2005). Studies on canthaxanthin in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1712: 17-28.
- Sun J, Li H, Sun X, Yuan Q (2012a) Trisporic acid stimulates gene transcription of terpenoid biosynthesis in *Blakeslea trispora*. *Proc Biochem* 47: 1889-1893.
- Sun J, Li H, Yuan Q (2012b) Metabolic regulation of trisporic acid on *Blakeslea trispora* revealed by a GC-MS-based metabolomic approach. *PLoS One* 7: e46110.
- Sun J, Sun XX, Tang PW, Yuan QP (2012c) Molecular cloning and functional expression of two key carotene synthetic genes derived from *Blakeslea trispora* into *E. coli* for increased  $\beta$ -carotene production. *Biotechnol Lett* 34: 2077-2082.

- Swofford DL (2003) PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Szczesna-Antczak M, Antczak T, Piotrowicz-Wasiak M, Rzyńska M, Binkowska N, Bielecki S, (2006) Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. *Enzyme Microbial Technol* 39: 1214-1222.
- Szkopińska A, Płochocka D (2005) Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochim Pol* 52: 45-55.
- Takaya N, Yanai K, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M (1996) Cloning and characterization of the *Rhizopus niveus leu1* gene and its use for homologous transformation. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 448-452.
- Takeno S, Sakuradani E, Murata S, Inohara-Ochiai M, Kawashima H, Ashikari T, Shimizu S (2004) Establishment of an overall transformation system for an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 419-425.
- Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol* 56: 564-577.
- Tang X, Zan X, Zhao L, Chen H, Chen YQ, Chen W, Song Y, Ratledge C (2016) Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. *Microbial Cell Fact* 15: 35.
- Tay A, Yang ST (2002) Production of L (+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 80: 1-12.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* 2.3.1-2.3.22.
- Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Garre V, López-García S, Navarro E, Vila A (2012) Molecular tools for carotenogenesis analysis in the zygomycete *Mucor circinelloides*. In *Microbial Carotenoids from Fungi, Methods and Protocols*, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 898. Barredo, J-L (ed.) Humana Press, New York. pp. 85-107.
- Tretter ED, Johnson EM, Wang Y, Kandel P, White MM (2013) Examining new phylogenetic markers to uncover the evolutionary history of early-diverging fungi: comparing MCM7, TSR1 and rRNA genes for single- and multi-gene analyses of the Kickxellomycotina. *Persoonia* 30: 106-125.
- Trytek M, Fiedurek J (2005) A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation. *Biotechnol Lett* 27: 149-153.
- Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, Sharma AK (2015) Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *J Food Sci Technol* 52: 4669-4678.
- Turgeon BG, Condon B, Liu J, Zhang N (2010) Protoplast transformation of filamentous fungi. In: *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi, Methods in Molecular Biology*, Vol. 638. Sharon A (ed.), Humana Press, Springer, New York, pp 3-19.
- Tusnády GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17: 849-850.
- Umeno D, Tobias AV, Arnold FH (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 51-78.
- Vágvölgyi C, Magyar K, Papp T, Palágyi Zs, Ferenczy L, Nagy Á (1996) Value of substrate utilization data for characterization of *Mucor* isolates. *Can J Microbiol* 42: 613-615.
- Valadon LRG (1976). Carotenoids as additional taxonomic characters in fungi: a review. *Trans Br Mycol Soc* 67: 1-15.
- Valle-Maldonado MI, Jácome-Galarza IE, Gutiérrez-Corona F, Ramírez-Díaz MI, Campos-García J, Meza-Carmen V (2015) Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Mol Biol Rep* 42:705-711.
- van Eijk GW (1972) Presence of carotenoids and ergosterol in *Mucor azygosporea* and in *Mucor inaequisporus*. *Ant van Leeuwenhoek* 38: 163-167.
- van Heeswijk R, Roncero MIG (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res Commun* 49: 691-702.
- van Laar TA, Lin YH, Miller CL, Karna SLR, Chambers JP, Seshu J (2012) Effect of levels of acetate on the mevalonate pathway of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* 7: e38171.
- Vastag M, Kasza Z, Ács K, Papp T, Schwab H, Vágvölgyi C (2004) Cloning and sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the zygomycetes fungus *Rhizomucor miehei*. *Ant van Leeuwenhoek* 86: 111-119.
- Vaupotič T, Veranic P, Petrovič U, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A (2008) HMG-CoA reductase is regulated by environmental salinity and its activity is essential for halotolerance in halophilic fungi. *Stud Mycol* 61: 61-66.
- Veiga-Crespo P, Blasco L, dos Santos FR, Poza M, Villa TG (2005) Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production. *Int Microbiol* 8: 55-58.
- Velayos A (2000) Carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. PhD Thesis. Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.
- Velayos A, Blasco JL, Alvarez MI, Iturriaga EA, Eslava AP (2000a) Blue-light regulation of the phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* 210: 938-946

- Velayos A, Eslava AP, Iturriaga EA (2000b) A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur J Biochem* 267: 1-12
- Velayos A, Fuentes-Vicente M, Aguilar-Elena R, Eslava AP, Iturriaga EA (2004) A novel fungal prenyl diphosphate synthase in the dimorphic zygomycete *Mucor circinelloides*. *Curr Genet* 45: 371-377.
- Velayos A, López-Matas MA, Ruiz-Hidalgo MJ, Eslava AP (1997) Complementation analysis of carotenogenic mutants of *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet Biol* 22: 19-27.
- Velayos A, Papp T, Aguilar-Elena R, Fuentes-Vicente M, Eslava AP, Iturriaga EA, Álvarez MI (2003) Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase, is up-regulated by blue light in *Mucor circinelloides*. *Curr Genet* 43: 112-120.
- Verdoes JC, Krubasik P, Sandmann G, Van Ooyen AJJ (1999) Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* 262: 453-461.
- Verdoes JC, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ (1995) Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 195-205.
- Verdoes JC, Sandmann G, Visser H, Diaz M, van Mossel M, van Ooyen AJ (2003) Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl Environ Microbiol* 69: 3728-3738.
- Verwaal R, Wang J, Meijnen JP, Visser H, Sandmann G, van den Berg JA, van Ooyen AJ (2007) High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 73: 4342-4350.
- Vilgalys Mycology Lab, Duke University. URL: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>.
- Visser H, Sandmann G, Verdoes JC (2005) Xanthophylls in fungi. In: Microbial Processes and Products, Methods in Bioethnology series; 18. Barredo JL (ed.) Humana Press, Totowa, pp. 257-272.
- Voelz K, Gratacap RL, Wheeler RT (2015) A zebrafish larval model reveals early tissue-specific innate immune responses to *Mucor circinelloides*. *Dis Mod Mechan* 8: 1375-1388.
- Voigt K, Wolf T, Ochsenreiter K, Nagy G, Kaerger K, Shelest E, Papp T (2016) Genetic and metabolic aspects of primary and secondary metabolism of the Zygomycetes In: Biochemistry and Molecular Biology, The Mycota; III. Hoffmeister D (ed.) Springer International Publishing, p. 414.
- Voigt K, Vaas L, Stielow B, de Hoog GS (2013) The zygomycetes in a phylogenetic perspective. *Persoonia* 30: i-iv.
- Voigt K, Wöstemeyer J (2001) Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1a genes. *Gene* 270: 113-120.
- Vos AM, Lugones LG, Wösten HAB (2014) REMI in molecular fungal biology. In: Genetic Transformation Systems in Fungi, Vol. 1. Berg MA, Maruthachalam K (eds.), Springer International Publishing, pp. 273-287.
- Wada M, Beppu T, Horinouchi S (1996) Integrative transformation of the zygomycete *Rhizomucor pusillus* by homologous recombination. *Appl Microbiol Biotechnol* 45: 652-657.
- Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, Papp T, Vágvölgyi C, de Hoog GS, Verkley G, Voigt K (2013) A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia* 30: 77-93.
- Walker K, Olson MF (2005) Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Curr Opin Genet Dev* 15: 62-68.
- Wang C, Oh MK, Liao JC (2000) Directed evolution of metabolically engineered *Escherichia coli* for carotenoid production. *Biotechnol Prog* 16: 922-926.
- Wang GY, Keasling JD (2002) Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*. *Metab Eng* 4: 193-201.
- Wang L, Lin X (2012) Morphogenesis in fungal pathogenicity: shape, size, and surface. *PLoS Pathog* 8: e1003027.
- Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA, Ridgway HJ (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res* 16: 31-44.
- Werner S, Schroeter A, Schimek C, Vlaic S, Wöstemeyer J, Schuster S (2012) Model of the synthesis of trisporic acid in Mucorales showing bistability. *IET Syst Biol* 6: 207-214.
- Wetzel J, Scheibner O, Burmester A, Schimek C, Wöstemeyer J (2009) 4-Dihydrotrisporin-dehydrogenase, an enzyme of the sex hormone pathway of *Mucor mucedo*: purification, cloning of the corresponding gene, and developmental expression. *Eukaryot Cell* 8: 88-95.
- White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J (2006) Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* 98: 872-884.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) Academic Press, San Diego, pp 315-322.
- Wolff AM, Arnau J (2002) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) and use of the *gpdI* promoter in recombinant protein production. *Fungal Genet Biol* 35: 21-29.

- Wöstemeyer J, Schimek C, Wetzel J, Burmester A, Voigt J, Schulz E, Ellenberger S, Siegmund L (2016) 10 Pheromone action in the fungal groups Chytridiomycetes and Zygomycetes and in the Oophytes. In: Growth, Differentiation and Sexuality, 3rd ed., The Mycota; I. Wendland J (ed.), Springer International Publishing, pp. 203-234.
- Wu J, Cho E, Willett WC, Sastry SM, Schaumberg DA (2015) Intakes of lutein, zeaxanthin, and other carotenoids and age-related macular degeneration during 2 decades of prospective follow-up. *JAMA Ophthalmol* 133: 1415-1424.
- Xia C., Zhang J, Zhang W, Hu B (2011) A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnol Biofuels* 4: 15.
- Yamazaki H, Ohnishi Y, Takeuchi K, Mori N, Shiraishi N, Sakata Y, Suzuki H, Horinouchi S (1999) Genetic transformation of a *Rhizomucor pusillus* mutant defective in asparagine-linked glycosylation: production of a milk-clotting enzyme in a less-glycosylated form. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 401-409.
- Yan GL, Wen KR, Duan CQ (2012) Enhancement of  $\beta$ -carotene production by over-expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* 64: 159-163.
- Yanai K, Horiuchi H, Takagi M, Yano K (1990) Preparation of protoplasts of *Rhizopus niveus* and their transformation with plasmid DNA. *Agric Biol Chem* 54: 2689-2696.
- Yasmin S, Alcazar-Fuoli L, Gründlinger M, Puempel T, Cairns T, Blatzer M, Lopez JF, Grimalt JO, Bignell E, Haas H (2012) Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E497-504.
- Ye VM, Bathia SK (2012) Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts. *Biotechnol Lett* 34: 1405-1414.
- Yokoyama A, Miki W (1995) Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiol Lett* 128: 139-144.
- Yuzbashev TV, Larina AS, Vybornaya TV, Yuzbasheva EY, Gvilava IT, Sineoky SP (2015) Repetitive genomic sequences as a substrate for homologous integration in the *Rhizopus oryzae* genome. *Fungal Biol* 119: 494-502.
- Zhang Y, Navarro E, Cánovas-Márquez JT, Almagro L, Chen H, Chen YQ, Zhang H, Torres-Martínez S, Chen W, Garre V (2016) A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate  $\beta$ -carotene over-producing strains by genetic engineering. *Microb Cell Fact* 15: 1.
- Zhao L, Cánovas-Márquez JT, Tang X, Chen H, Chen YQ, Chen W, Garre V, Song Y, Ratledge C (2016) Role of malate transporter in lipid accumulation of oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 1297-1305.
- Zhao J, Li Q, Sun T, Zhu X, Xu H, Tang J, Zhang X, Ma Y (2013) Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving  $\beta$ -carotene production. *Metab Eng* 17: 42-50.
- Zhao L, Tang X, Luan X, Chen H, Chen YQ, Chen W, Song Y, Ratledge C (2015) Role of pentose phosphate pathway in lipid accumulation of oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *RSC Advances* 5: 97658-97664.
- Zhu Q, Jackson EN (2015) Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Curr Opin Biotechnol* 36: 65-72.
- Zycha H, Siepmann R, Linnemann G (1969) Mucorales. Eine Beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe. Lehre, J. Cramer.

## 8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

A megjelenés évének impakt faktorával és hivatkozási adatokkal (független idézők száma).

- A.1. Csernetics Á, Nagy G, Iturriaga EA, Szekeres A, Eslava AP, Vágvolgyi C, **Papp T** (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fung Genet Biol* 48: 696-703. **IF: 3,737 Független idéző: 8**
- A.2. Csernetics Á, Tóth E, Farkas A, Nagy G, Bencsik O, Vágvolgyi C, **Papp T** (2015) Expression of *Xanthophyllomyces dendrorhous* cytochrome-P450 hydroxylase and reductase in *Mucor circinelloides*. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 321-336. **IF: 1,532 Független idéző: 2**
- A.3. Iturriaga EA, **Papp T**, Breum J, Arnau J, Eslava AP (2005) Strain and culture conditions improvement for  $\beta$ -carotene production in *Mucor*. In: Barredo JL (ed.) *Microbial Processes and Products*. Totowa: Humana Press, pp. 239-256. (Methods in Biothenology series; 18.) **Független idéző: 10**
- A.4. Lukács G, **Papp T**, Nyilasi I, Nagy E, Vágvolgyi C (2004) Differentiation of *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivities to lovastatin. *J Clin Microbiol* 42: 5400-5402. **IF: 3,439 Független idéző: 21**
- A.5. Lukács G, **Papp T**, Somogyvári F, Csernetics Á, Nyilasi I, Vágvolgyi C (2009) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. *Ant Leeuwenhoek* 95: 55-64. **IF: 1,983 Független idéző: 4**
- A.6. Nagy G, Csernetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Vágvolgyi C, **Papp T** (2012a) Carotenoid composition of Mucorales fungi. *Afr J Microbiol Res* 6: 7265-7270.
- A.7. Nagy G, Farkas A, Csernetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Nyilasi I, Vágvolgyi C, **Papp T** (2014) Transcription of the three HMG-CoA reductase genes of *Mucor circinelloides*. *BMC Microbiol* 14: 93 **IF: 2,729 Független idéző: 1**
- A.8. Nagy LG, Kocsubé S, Csanádi Z, Kovács GM, Petkovits T, Vágvolgyi C, **Papp T** (2012b) Re-mind the gap! Insertion – deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) of fungi. *PLOS ONE* 7: e49794. **IF: 3,730 Független idéző: 19**
- A.9. Nagy LG, Petkovits T, Kovács G M, Voigt K, Vágvolgyi C, **Papp T** (2011) Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a high contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. *New Phytol* 191: 789-794. **IF: 6,645 Független idéző: 30**
- A.10. Nyilasi I, Ács K, **Papp T**, Nagy E, Vágvolgyi C (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol* 50: 415-420. **IF: 0,918 Független idéző: 13**
- A.11. Nyilasi I, **Papp T**, Csernetics A, Vágvolgyi C (2008) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the zygomycete fungus *Backusella lamprospora*. *J Basic Microbiol* 48: 59-64. **IF: 1,051 Független idéző: 6**
- A.12. **Papp T**, Csernetics Á, Nagy G, Bencsik O, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvolgyi C (2013) Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 4937-4950. **IF: 3,811 Független idéző: 4**
- A.13. **Papp T**, Csernetics Á, Nyilasi I, Vágvolgyi C, Iturriaga EA (2012) Integration of a bacterial  $\beta$ -carotene ketolase gene into the *Mucor circinelloides* genome by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. In: Barredo, José-Luis (ed.) *Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Vol. 898. New York: Humana Press, pp. 123-132.
- A.14. **Papp T**, Nyilasi I, Csernetics Á, Nagy G, Takó M, Vágvolgyi C (2016) Improvement of industrially relevant biological activities in Mucoromycotina fungi. In: Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. Schmoll M, Dattenböck C (eds.), Springer International Publishing, pp. 97-118.
- A.15. **Papp T**, Vastag M, Michailides TJ, Ferenczy L, Vágvolgyi C (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. **IF: 2,066 Független idéző: 5**
- A.16. **Papp T**, Velayos A, Bartok T, Eslava A, Vágvolgyi C, Iturriaga E (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 526-531. **IF: 2,441 Független idéző: 18**
- A.17. Petkovits T, Nagy LG, Hoffmann K, Wagner L, Nyilasi I, Griebel T, Schnabelrauch D, Vogel H, Voigt K, Vágvolgyi C, **Papp T** (2011a) Data partitions, Bayesian analysis and phylogeny of the zygomycetous fungal family Mortierellaceae, inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *PLOS One* 6: e27507. **IF: 4,092 Független idéző: 10**

- A.18. Takó M, Tóth A, Nagy LG, Krisch J, Vágvolgyi C, **Papp T** (2010) A new  $\beta$ -glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *Ant Leeuwenhoek* 97: 1-10. **IF: 1,673 Független idéző: 12**
- A.19. Vastag M, Kasza Z, Acs K, **Papp T**, Schwab H, Vágvolgyi C (2004) Cloning and sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the zygomycetes fungus *Rhizomucor miehei*. *Ant Leeuwenhoek* 86: 111-119. **IF: 2,915 Független idéző: 13**
- A.20. Velayos A, **Papp T**, Aguilar-Elena R, Fuentes-Vicente M, Eslava AP, Iturriaga EA, Alvarez MI (2003) Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase, is up-regulated by blue light in *Mucor circinelloides*. *Curr Genet* 43: 112-120. **IF: 2,168 Független idéző: 19**
- A.21. Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, **Papp T**, Vágvolgyi C, de Hoog GS, Verkley G, Voigt K (2013) A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia* 30: 77-93. **IF: 4,225 Független idéző: 20**

**Összesített impact faktor: 49,155; összes független hivatkozások száma: 215.**

### **A dolgozat témájához kapcsolódó további közlemények:**

- B.1. Blaskó A, Belágyi J, Dergez T, Deli J, Papp G, **Papp T**, Vágvolgyi C, Pesti M (2008) Effect of polar and non-polar carotenoids on *Xanthophyllomyces dendrorhous* membranes by EPR. *Eur Biophys J* 37: 1097-1104. **IF: 2,409 Független idéző: 3**
- B.2. Csernetics Á, Tóth E, Farkas A, Nagy G, Bencsik O, Manikandan P, Vágvolgyi C, **Papp T** (2014) Expression of a bacterial  $\beta$ -carotene hydroxylase in canthaxanthin producing mutant *Mucor circinelloides* strains. *Acta Biol Szeged* 58: 139-146.
- B.3. Galgóczy L, Lukács G, Nyilasi I, **Papp T**, Vágvolgyi C (2010) Antifungal activity of statins and their interaction with amphotericin B against clinically important Zygomycetes. *Acta Biol Hung* 61: 356-365. **IF: 0,793 Független idéző: 6**
- B.4. Galgóczy L, Nyilasi I, **Papp T**, Vágvolgyi C (2009) Are statins applicable for the prevention and treatment of zygomycosis? *Clin Infect Dis* 49: 483-484. **IF: 8,195 Független idéző: 8**
- B.5. Galgóczy L, **Papp T**, Vágvolgyi C (2009) *In vitro* interaction between suramin and fluvastatin against clinically important Zygomycetes. *Mycoses* 52: 447-453. **IF: 1,402 Független idéző: 5**
- B.6. Kotogán A, Kecskeméti A, Szekeres A, **Papp T**, Chandrasekaran M, Kadaikunnan S, Alharbi NS, Vágvolgyi C, Takó M (2016) Characterization of transesterification reactions by Mucoromycotina lipases in non-aqueous media. *J Mol Catal B: Enzym* 127: 47-55 **IF: 2,189 Független idéző: 1**
- B.7. Kotogán A, Németh B, Vágvolgyi C, **Papp T**, Takó M (2014) Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in Mucoromycotina strains. *Food Technol Biotechnol* 52: 73-82. **IF: 0,92 Független idéző: 4**
- B.8. Krizsán K, Bencsik O, Nyilasi I, Galgóczy L, Vágvolgyi C, **Papp T** (2010) Effect of the sesterterpene-type metabolites, ophiobolins A and B, on zygomycetes fungi. *FEMS Microbiol Lett* 313: 135-140. **IF: 2,040 Független idéző: 7**
- B.9. Nagy G, Imre G, Csernetics Á, Petkovits T, Nagy LG, Szekeres A, Vágvolgyi C, **Papp T** (2011) A prenyl pyrophosphate synthase gene from the zygomycete fungus, *Gilbertella persicaria*. *Acta Biol Szeged* 55: 7-12.
- B.10. **Papp T**, Nyilasi I, Csernetics Á, Galgóczy L, Vágvolgyi C (2008) Molecular studies on Zygomycetes fungi causing opportunistic infections. *Rev Med Microbiol* 19: 39-46. **IF: 0,750**
- B.11. Palágyi Z, Linka B, **Papp T**, Vágvolgyi C (2006) Isolation and characterization of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutants with altered carotenoid content. *Acta Aliment* 35: 223-228. **IF: 0,253**
- B.12. Schoch CL, Robbertse B, Kovács GM, Krizsán K, **Papp T**, Petkovits T, Vágvolgyi C, Federhen S [101] (2014) Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. *Database* 2014: Paper bau061. **IF: 3,372, Független idéző: 12**
- B.13. Schoch CL, Seifert KA, Knapp DG, Kovács GM, Nagy LG, Nyilasi I, **Papp T**, Petkovits T, Vágvolgyi C, Schindel D [156] (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109: 6241-6246. **IF: 9,737 Független idéző: 680**



- B.14. Somogyvári F, Vágvölgyi C, **Papp T** (1996) Electrofusion of *Mucor circinelloides* protoplasts. *Biotechnol Tech* 10: 607-610. **IF: 0,558 Független idéző: 4**
- B.15. Takó M, Farkas E, Lung Sz, Krisch J, Vágvölgyi C, **Papp T** (2010) Identification of acid- and thermotolerant extracellular  $\beta$ -glucosidase activities in Zygomycetes fungi. *Acta Biol Hung* 61: 101-110. **IF: 0,793 Független idéző: 5**
- B.16. Vágvölgyi C, Heinrich H, Ács K, **Papp T** (2004) Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Ant Leeuwenhoek* 86: 181-188. **IF: 2,915 Független idéző: 13**
- B.17. Vágvölgyi C, Magyar K, **Papp T**, Palágyi Z, Ferenczy L, Nagy Á (1996) Value of substrate utilization data for characterization of *Mucor* isolates. *Can J Microbiol* 42: 613-616. **IF: 1,184 Független idéző: 5**
- B.18. Vastag M, **Papp T**, Kasza Z, Vágvölgyi C (1998) Differentiation of *Rhizomucor* species by carbon source utilization and isoenzyme analysis. *J Clin Microbiol* 36: 2153-2156. **IF: 3,579 Független idéző: 13**

**Összesített impakt faktor: 41,089; összes független hivatkozások száma: 766.**

**A+B if.: 90,244; Független hivatkozások A+B: 981.**

### **Scientometriai adatok:**

Publikációim összesített impakt faktora: 212,5.

Ebből az első és utolsó szerzőségű publikációk impakt faktora: 84,0.

A publikációkra kapott független hivatkozások száma: 1563.

Hirsch index: 20.

A disszertáció alapját képező dolgozatok impakt faktora 49,155.

A disszertáció alapját képező dolgozatokra kapott független hivatkozások száma: 215.

## FÜGGELÉK

### Rövidítések jegyzéke

|              |                                                                                              |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>actA</i>  | <i>Mucor circinelloides</i> aktin gén                                                        |
| <i>al-2</i>  | <i>Neurospora crassa</i> fitoén-szintáz/likopin-cikláz gén                                   |
| <i>al-3</i>  | <i>Neurospora crassa</i> GGPP-szintáz gén                                                    |
| <i>amdS</i>  | <i>Aspergillus nidulans</i> acetamidáz gén                                                   |
| AMT          | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -közvetítette transzformációt                               |
| APE          | <i>al-3 proximal element</i>                                                                 |
| ATCC         | American Type Culture Collection                                                             |
| BGL          | <i>Rhizomucor miehei</i> $\beta$ -glükózidáz                                                 |
| <i>bgl</i>   | <i>Rhizomucor miehei</i> $\beta$ -glükózidáz gén                                             |
| BLAST        | Basic Local Alignment Search Tool                                                            |
| CarB         | fitoén-dehidrogenáz                                                                          |
| <i>carB</i>  | fitoén-dehidrogenáz gén                                                                      |
| <i>carG</i>  | <i>Mucor circinelloides</i> GGPP-szintáz                                                     |
| <i>carRA</i> | fitoén-szintáz/likopin-cikláz gén ( <i>Blakeslea</i> , <i>Phycomyces</i> , <i>Fusarium</i> ) |
| CarRP        | <i>Mucor circinelloides</i> fitoén-szintáz/likopin-cikláz                                    |
| <i>carRP</i> | <i>Mucor circinelloides</i> fitoén-szintáz/likopin-cikláz gén                                |
| CBS          | Centraalbureau voor Schimmelcultures                                                         |
| CMA          | cornmeal agar, kukoricaliszt agar                                                            |
| CNCTC        | Czech National Collection of Type Cultures                                                   |
| CrtR         | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> citokróom P450-reduktáz                                 |
| <i>crtR</i>  | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> citokróom P450-reduktáz gén                             |
| CrtS         | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> $\beta$ -karotin-oxigenáz                               |
| <i>crtS</i>  | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> $\beta$ -karotin-oxigenáz gén                           |
| CrtW         | <i>Paracoccus</i> sp. N81106 $\beta$ -karotin-ketoláz                                        |
| <i>crtW</i>  | <i>Paracoccus</i> sp. N81106 $\beta$ -karotin-ketoláz gén                                    |
| <i>crtYB</i> | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> fitoén-szintáz/likopin-cikláz gén                       |
| CrtZ         | <i>Paracoccus</i> sp. N81106 $\beta$ -karotin-hidroxiláz                                     |
| <i>crtZ</i>  | <i>Paracoccus</i> sp. N81106 $\beta$ -karotin-hidroxiláz gén                                 |
| DMAPP        | dimetilallil-pirofoszfát                                                                     |
| EMBL         | European Molecular Biology Laboratory                                                        |
| ER           | endoplazmatikus retikulum                                                                    |
| ETH          | Swiss Federal Institute of Technology Culture Collection                                     |
| FARM         | first aspartate rich motif, első aszparaginsavban gazdag motívum                             |
| FPP          | farnezil-pirofoszfát                                                                         |
| FRR          | CSIRO Food Research Culture Collection                                                       |
| FSU          | Fungal Reference Centre                                                                      |
| GFP          | green fluorescent protein, zöld fluoreszcens fehérje                                         |
| GGPP         | geranilgeranil-pirofoszfát                                                                   |
| <i>ggsI</i>  | <i>Gibberella fujikuroi</i> GGPP-szintáz gén                                                 |
| <i>gpdI</i>  | <i>Mucor circinelloides</i> glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz 1 gén                     |
| <i>gpdIP</i> | <i>Mucor circinelloides</i> glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz 1 gén promóter            |
| <i>gpdIT</i> | <i>Mucor circinelloides</i> glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz 1 gén terminális          |
| GPP          | geranil-pirofoszfát                                                                          |
| HMG1         | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A 1                        |
| HMG2         | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A 2                        |
| HMG-KoA      | 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A                                                          |
| HmgR         | HMG-KoA-reduktáz                                                                             |
| <i>hmgR</i>  | HMG-KoA-reduktáz gén                                                                         |

|              |                                                                                            |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>hmgR1</i> | <i>Mucor circinelloides</i> HMG-KoA-reduktáz 1 gén                                         |
| <i>hmgR2</i> | <i>Mucor circinelloides</i> HMG-KoA-reduktáz 2 gén                                         |
| <i>hmgR3</i> | <i>Mucor circinelloides</i> HMG-KoA-reduktáz 3 gén                                         |
| <i>hph</i>   | higromicin B-foszfotranszferáz gén                                                         |
| HPLC         | <i>high performance liquid chromatography</i> ; nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia    |
| IM           | <i>induction medium</i> ; indukciós tápközeg                                               |
| IMI          | <i>CABI Bioscience Genetic Resource Collection</i>                                         |
| <i>indel</i> | inszerció-delécio                                                                          |
| IPCR         | inverz PCR                                                                                 |
| IPI          | <i>Mucor circinelloides</i> IPP-izomeráz                                                   |
| <i>ipi</i>   | <i>Mucor circinelloides</i> IPP-izomeráz gén                                               |
| IPP          | izopentenil-pirofoszfát                                                                    |
| <i>isoA</i>  | <i>Mucor circinelloides</i> FPP-szintáz                                                    |
| ITS          | <i>internal transcribed spacer</i> , belső átíródó elválasztó (szakasz)                    |
| JGI          | <i>Joint Genome Institute</i> , DOE, USA                                                   |
| LB           | Luria-Bertani tápközeg                                                                     |
| <i>leuA</i>  | <i>Mucor circinelloides</i> $\alpha$ -izopropilmalát-izomeráz gén                          |
| LSU          | <i>large subunit</i> ; 28S rRNS gén                                                        |
| McHmgR1      | <i>Mucor circinelloides</i> HMG-KoA-reduktáz 1                                             |
| McHmgR2      | <i>Mucor circinelloides</i> HMG-KoA-reduktáz 2                                             |
| McHmgR3      | <i>Mucor circinelloides</i> HMG-KoA-reduktáz 3                                             |
| MCMC         | <i>Markov chain Monte Carlo</i>                                                            |
| MEA          | <i>malt extract agar</i> , maláta kivonatos agar                                           |
| MIC          | <i>minimal inhibiting concentration</i> ; minimális gátló koncentráció                     |
| ML           | <i>Maximum Likelihood</i>                                                                  |
| MLBS         | <i>Maximum Likelihood bootstrap</i>                                                        |
| MOTU         | <i>molecular operational taxonomic unit</i> , molekuláris taxonómiai kezelendő egység      |
| MPBS         | <i>Maximum Parsimónia bootstrap</i>                                                        |
| MUFS         | <i>Department of Microbiology and Biochemistry, University of Orange Free State</i>        |
| NCBI         | <i>National Center for Biotechnology Information</i>                                       |
| NHEJ         | <i>non-homologous end joining</i> ; nem homológ végek összekapcsolása                      |
| NRRL         | <i>Agricultural Research Service Culture Collection</i>                                    |
| NUDIX        | <i>nucleoside diphosphate linked to some other moiety X</i>                                |
| OA           | <i>oatmeal agar</i> , zabliszt agar                                                        |
| PEG          | polietilén-glikol                                                                          |
| <i>pyrG</i>  | <i>Mucor circinelloides</i> orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxiláz gén                       |
| qPCR         | kvantitatív, valós idejű PCR                                                               |
| qRT-PCR      | kvantitatív, valós idejű reverz transzkripció PCR                                          |
| REMI         | <i>restriction enzyme mediated integration</i> , restrikciós enzim közvetítette integráció |
| RmHmgR       | <i>Rhizomucor miehei</i> HMG-KoA-reduktáz                                                  |
| SARM         | <i>second aspartate rich motif</i> , második aszparaginsavban gazdag motívum               |
| SIB          | <i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>                                                   |
| SSD          | <i>sterol sensing domain</i> , szterol érzékelő domén                                      |
| SSU          | <i>small subunit</i> ; 18S rRNS gén                                                        |
| SZMC         | <i>Szeged Microbiological Collection</i> , Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény                |
| WRLCN        | <i>Welcome Bacterial Collection</i>                                                        |
| YEG          | <i>yeast extract glucose</i> , élesztőkivonat-glükóz tápközeg                              |
| YNB          | <i>yeast nitrogen base</i> , élesztő nitrogénforrás tápközeg                               |
| YPG          | <i>yeast extract peptone glucose</i> , élesztőkivonat-glükóz-pepton tápközeg               |

**F1. táblázat. A Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény (SZMC) járomspórás gombákat tartalmazó algyűjteménye és az egyes törzsek által termelt karotinoidok.**

| Fajnév                                                             | SZMC kód | Egyéb törzsgyűjteményi kód | Eredet                               | Karotinoid     |
|--------------------------------------------------------------------|----------|----------------------------|--------------------------------------|----------------|
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 250      | -                          | - / -                                | K <sup>b</sup> |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 677      | -                          | - / -                                | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11050A   | MUFS 090 <sup>a</sup>      | - / -                                | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11051A   | NRRL 3104                  | - / -                                | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11052A   | NRRL 1706                  | - / -                                | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11053A   | NRRL 13011                 | sufu / Csungking, Kína               | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11054A   | -                          | - / -                                | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11055A   | NRRL 685                   | - / -                                | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11056A   | NRRL 22424                 | Sufu / -                             | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11057A   | -                          | - / -                                | K              |
| <i>Actinomucor elegans</i>                                         | 11058A   | NRRL 2227                  | - / -                                | K              |
| <i>Actinomucor repens</i>                                          | 49       | -                          | - / -                                | K              |
| <i>Amylomyces rouxii</i>                                           | 12026    | -                          | - / -                                | K, Kr, Z       |
| <i>Amylomyces rouxii</i>                                           | 12027    | ATCC 24905                 | Rizs fermentáció / -                 | K, Kr, Z       |
| <i>Amylomyces rouxii</i>                                           | 4052     | -                          | - / -                                | K, Kr, Z       |
| <i>Backusella circina</i>                                          | 11059A   | NRRL 2446                  | Talaj / Florida, USA                 | K, Kr          |
| <i>Backusella circina</i>                                          | 11060B   | NRRL 3293                  | Talaj / New Jersey, USA              | K, Kr          |
| <i>Backusella ctenidia</i>                                         | 11063B   | NRRL 6239                  | Sivatagi talaj / Kalifornia, USA     | K, Kr, Z       |
| <i>Backusella ctenidia</i>                                         | 11064B   | NRRL 6238                  | Bozótpatkány ürülék / Nevada, USA    | K, Kr, Z       |
| <i>Backusella lamprospora</i>                                      | 249      | -                          | - / -                                | K, Kr, Z       |
| <i>Backusella lamprospora</i>                                      | 11061B   | MUFS A8                    | - / -                                | K, Kr, Z       |
| <i>Backusella lamprospora</i>                                      | 11062B   | NRRL 1422                  | - / -                                | K, Kr, Z       |
| <i>Dissophora decumbens</i>                                        | 11337    | CBS 592.88                 | Tölgy-juhar avar / Rhode Island, USA | K              |
| <i>Dissophora decumbens</i>                                        | 11206    | CBS 301.87                 | Fahulladék / Rhode Island, USA       | K              |
| <i>Dissophora ornata</i>                                           | 11356    | CBS 347.77                 | Talaj / Kolumbia                     | K              |
| <i>Dissophora ornata</i>                                           | 11221    | CBS 348.77                 | Talaj / Kolumbia                     | K              |
| <i>Gamsiella multivaricata</i>                                     | 11224    | CBS 227.78                 | Fatuskó / Oroszország                | K              |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 247      | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 248      | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11087    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K              |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11088    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11089    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11090    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11091    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11092    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11093    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11094    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | A, K, Z        |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11095    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11096    | -                          | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11097    | -                          | Nektarin / Kalifornia, USA           | K              |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11098    | -                          | Nektarin / Kalifornia, USA           | K              |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11099    | -                          | Nektarin / Kalifornia, USA           | K              |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11100    | -                          | Nektarin / Kalifornia, USA           | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11085    | IMI 101628                 | Nektarin / Kalifornia, USA           | K, Kr, Z       |
| <i>Gilbertella persicaria</i>                                      | 11086    | CBS 389.95                 | Őszibarack / Kalifornia, USA         | K, Kr, Z       |
| <i>Lichtheimia hesseltiensei</i>                                   | 11372    | FSU 6202                   | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia corymbifera</i>                                     | 11361    | FSU 9682                   | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia corymbifera</i>                                     | 11367    | FSU 10164                  | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia corymbifera</i>                                     | 12631    | -                          | - / Szeged, Magyaró.                 | K              |
| <i>Lichtheimia hyalospora</i>                                      | 11363    | FSU 10160                  | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia hyalospora</i>                                      | 11364    | FSU 10161                  | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia hyalospora</i>                                      | 11365    | FSU 10162                  | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia hyalospora</i>                                      | 11366    | FSU 10163                  | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia ornata</i>                                          | 11368    | FSU 10165                  | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia ornata</i>                                          | 11370    | FSU 10167                  | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia ramosa</i>                                          | 11360    | FSU 6197                   | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia ramosa</i>                                          | 11362    | FSU 9927                   | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia ramosa</i>                                          | 11369    | FSU 10166                  | - / -                                | K              |
| <i>Lichtheimia sphaerocystis</i>                                   | 11371    | FSU 10079                  | - / -                                | K              |
| <i>Lobosporangium transversale</i>                                 | 11334L   | NRRL 3116                  | Talaj / Nevada, USA                  | K              |
| <i>Micromucor (Umbelopsis) ramannianus</i>                         | 11079    | NRRL 1296                  | - / -                                | K              |
| <i>Micromucor (Umbelopsis) ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i> | 12036    | M27                        | - / -                                | K              |
| <i>Micromucor ramannianus</i>                                      | 484      | -                          | - / Magyaró.                         | K              |
| <i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i>              | 11078    | -                          | - / -                                | K              |
| <i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i>              | 11080    | NRRL 5844                  | - / -                                | K              |

|                                                                    |       |              |                                             |      |
|--------------------------------------------------------------------|-------|--------------|---------------------------------------------|------|
| <i>Micromucor rammanianus</i>                                      | 1018  | WRLCN(M) 304 | - / -                                       | K    |
| <i>Mortierella (Umbelopsis) ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> | 11234 | CBS 222.29   | - / Oroszo.                                 | K    |
| <i>Mortierella acrotona</i>                                        | 11231 | CBS 386.71   | Talaj / Rajasthan, India                    | n.d. |
| <i>Mortierella alliacea</i>                                        | 21869 | FSU 11178    | <i>Pseudotsuga menziesii</i> / Németo.      | n.d. |
| <i>Mortierella alpina</i>                                          | 11317 | FSU 2698     | - / -                                       | K    |
| <i>Mortierella alpina</i>                                          | 11294 | FSU 695      | Talaj / Magyaró.                            | K    |
| <i>Mortierella alpina</i>                                          | 11213 | CBS 210.32   | Talaj / Ausztrália                          | K    |
| <i>Mortierella amoeboides</i>                                      | 11226 | CBS 889.72   | <i>Chromelosporium</i> sp. / Németo.        | K    |
| <i>Mortierella angusta</i>                                         | 11254 | CBS 293.61   | Talaj / Anglia                              | K    |
| <i>Mortierella antarctica</i>                                      | 11217 | CBS 609.70   | Sziklahasadék / Antarktis típus             | n.d. |
| <i>Mortierella armillariicola</i>                                  | 11239 | CBS 914.73   | <i>Armillaria mellea</i> / Baarn, Hollandia | n.d. |
| <i>Mortierella bainieri</i>                                        | 21870 | FSU 11181    | <i>Hygrophorus olivaceoalbus</i> / Belgium  | n.d. |
| <i>Mortierella beljakovae</i>                                      | 20730 | CBS 267.71   | <i>Pinus taeda</i> / Észak-Karolina, USA    | n.d. |
| <i>Mortierella beljakovae</i>                                      | 11232 | CBS 123.72   | Talaj / Ukrajna                             | n.d. |
| <i>Mortierella biramosa</i>                                        | 11255 | CBS 370.95   | Eredi talaj / Kína                          | n.d. |
| <i>Mortierella bisporalis</i>                                      | 11354 | CBS 145.69   | <i>Tuber magnatum</i> / Olaszó.             | n.d. |
| <i>Mortierella bisporalis</i>                                      | 11320 | FSU 9675     | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella camargensis</i>                                     | 11227 | CBS 221.58   | Homokos talaj / Camargue, Franciaó.         | n.d. |
| <i>Mortierella capitata</i>                                        | 11256 | CBS 648.68   | Eredi talaj / Rishikesh, India              | n.d. |
| <i>Mortierella chlamydospora</i>                                   | 11344 | CBS 529.75   | Hollandia                                   | n.d. |
| <i>Mortierella chlamydospora</i>                                   | 11219 | CBS 120.34   | <i>Antirrhinum majus</i> / -                | n.d. |
| <i>Mortierella clausenii</i>                                       | 11268 | CBS 294.59   | Talaj / Svájc; típus                        | n.d. |
| <i>Mortierella clonocystis</i>                                     | 11238 | CBS 357.76   | Talaj / Gran Canaria, Spanyolország         | n.d. |
| <i>Mortierella cogitans</i>                                        | 11237 | CBS 879.97   | Fakéreg / Nagano, Japán                     | n.d. |
| <i>Mortierella cystojenkini</i>                                    | 11345 | CBS 660.82   | Talaj / Hollandia                           | n.d. |
| <i>Mortierella cystojenkini</i>                                    | 11229 | CBS 456.71   | Mezőgazdasági talaj / Wageningen, Hollandia | n.d. |
| <i>Mortierella dichotoma</i>                                       | 11269 | CBS 221.35   | Egér ürülék / Németo.                       | n.d. |
| <i>Mortierella echinosphaera</i>                                   | 11251 | CBS 575.75   | Begónia / Aalsmeer, Hollandia               | n.d. |
| <i>Mortierella elasson</i>                                         | 11359 | CBS 219.29   | - / USA                                     | K    |
| <i>Mortierella elasson</i>                                         | 21860 | FSU 11189    | <i>Ananas sativus</i> gyökér / USA          | K    |
| <i>Mortierella elongata</i>                                        | 11284 | FSU 9721     | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella elongata</i>                                        | 11308 | FSU 822      | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella elongata</i>                                        | 11318 | FSU 823      | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella elongatula</i>                                      | 11241 | CBS 488.70   | Városi hulladék / Németo.                   | n.d. |
| <i>Mortierella epicladia</i>                                       | 11352 | CBS 555.89   | Talaj / Brazília                            | n.d. |
| <i>Mortierella epicladia</i>                                       | 11247 | CBS 355.76   | Talaj / Gran Canaria, Spanyolország         | n.d. |
| <i>Mortierella epigama</i>                                         | 20731 | CBS 123.71   | Városi hulladék / Németo.                   | n.d. |
| <i>Mortierella epigama</i>                                         | 11210 | CBS 489.70   | Városi hulladék / Németo.                   | n.d. |
| <i>Mortierella exigua</i>                                          | 11257 | CBS 655.68   | Mezőgazdasági talaj / Allahabad, India      | n.d. |
| <i>Mortierella fimbricystis</i>                                    | 21868 | FSU 11180    | Moha / Argentína                            | n.d. |
| <i>Mortierella gamsii</i>                                          | 11340 | FSU 825      | Talaj / USA                                 | K    |
| <i>Mortierella gamsii</i>                                          | 11258 | CBS 253.36   | Erdei talaj / Németo.                       | n.d. |
| <i>Mortierella gamsii</i>                                          | 11309 | FSU 824      | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella gamsii</i>                                          | 11215 | CBS 749.68   | Talaj / Baarn, Hollandia                    | n.d. |
| <i>Mortierella gamsii</i>                                          | 11259 | CBS 314.52   | Erdei talaj / Németo.                       | n.d. |
| <i>Mortierella gemmifera</i>                                       | 11376 | CBS 842.70   | Talaj / Anglia                              | K    |
| <i>Mortierella gemmifera</i>                                       | 11201 | CBS 134.45   | Fenyőerdő talaja / Nottingham, Anglia       | n.d. |
| <i>Mortierella globulifera</i>                                     | 11333 | FSU 827      | Talaj / Svédország                          | n.d. |
| <i>Mortierella globulifera</i>                                     | 11260 | CBS 417.64   | Talaj / Németo.                             | K    |
| <i>Mortierella globulifera</i>                                     | 11209 | CBS 858.70   | <i>Dactylis glomerata</i> gyökér / Anglia   | K    |
| <i>Mortierella globulifera</i>                                     | 11329 | FSU 826      | - / -                                       | K    |
| <i>Mortierella histoplasmatoides</i>                               | 11338 | CBS 321.78   | Trágya / Louisiana, USA                     | n.d. |
| <i>Mortierella horticola</i>                                       | 11353 | CBS 869.68   | Talaj / Németo.                             | n.d. |
| <i>Mortierella horticola</i>                                       | 11218 | CBS 305.52   | Németo.                                     | n.d. |
| <i>Mortierella humilis</i>                                         | 11346 | CBS 745.68   | Talaj / Hollandia                           | n.d. |
| <i>Mortierella humilis</i>                                         | 11220 | CBS 222.35   | Fenyőerdő talaja / Mexikó                   | n.d. |
| <i>Mortierella humilis</i>                                         | 11331 | FSU 828      | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella humilis</i>                                         | 11302 | CBS 745.68   | Talaj / Baarn, Hollandia                    | n.d. |
| <i>Mortierella hyalina</i>                                         | 11348 | CBS 654.68   | Öztrágya / India                            | n.d. |
| <i>Mortierella hyalina</i>                                         | 11262 | CBS 306.52   | Komposzt / Németo.                          | n.d. |
| <i>Mortierella hyalina</i>                                         | 11261 | CBS 115655   | <i>Triticum aestivum</i> / London, Anglia   | n.d. |
| <i>Mortierella hygroskopica</i>                                    | 11312 | FSU 2573     | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella hypsicladia</i>                                     | 11270 | CBS 116202   | Denevér ürülék / Kyushu, Japán              | n.d. |
| <i>Mortierella indohii</i>                                         | 11349 | CBS 665.70   | Talaj / Hollandia                           | n.d. |
| <i>Mortierella indohii</i>                                         | 11297 | FSU 830      | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella indohii</i>                                         | 11283 | FSU 831      | - / -                                       | n.d. |
| <i>Mortierella indohii</i>                                         | 11253 | CBS 720.71   | Állati ürülék / Georgia, USA                | n.d. |
| <i>Mortierella kuhlmanni</i>                                       | 11271 | CBS 157.71   | <i>Pinus palustris</i> / Dél-Karolina, USA  | n.d. |
| <i>Mortierella lignicola</i>                                       | 11264 | CBS 207.37   | <i>Korhadó fa</i> / Kolumbia                | K    |
| <i>Mortierella lignicola</i>                                       | 11265 | CBS 313.52   | Talaj / Németo.                             | K    |
| <i>Mortierella longicollis</i>                                     | 11208 | CBS 209.32   | Homokos talaj / Victoria, Ausztrália        | K    |
| <i>Mortierella longigemmata</i>                                    | 21867 | FSU 11194    | Talaj / Németo.                             | n.d. |

|                                                  |       |              |                                          |             |
|--------------------------------------------------|-------|--------------|------------------------------------------|-------------|
| <i>Mortierella microzygospora</i>                | 21864 | CBS 880.97   | Talaj / Shiga, Japán                     | n.d.        |
| <i>Mortierella minutissima</i>                   | 11336 | FSU 833      | Erdei talaj / USA                        | n.d.        |
| <i>Mortierella minutissima</i>                   | 11327 | FSU 2734     | - / -                                    | n.d.        |
| <i>Mortierella minutissima</i>                   | 11305 | FSU 832      | - / -                                    | n.d.        |
| <i>Mortierella minutissima</i> var. <i>dubia</i> | 11235 | CBS 307.52   | Talaj / Németo.                          | n.d.        |
| <i>Mortierella mutabilis</i>                     | 11202 | CBS 308.52   | - / Németo.                              | K           |
| <i>Mortierella nantahalensis</i>                 | 11222 | CBS 610.70   | Talaj / Észak-Karolina, USA              | n.d.        |
| <i>Mortierella oligospora</i>                    | 21861 | FSU 11197    | Talaj / Rishikesh, Rewa, India           | n.d.        |
| <i>Mortierella paraensis</i>                     | 11272 | CBS 547.89   | Esőerdő talaja / Brazília                | n.d.        |
| <i>Mortierella parazychnae</i>                   | 11223 | CBS 868.71   | <i>Pinus sylvestris</i> / Hollandia      | n.d.        |
| <i>Mortierella parvispora</i>                    | 21486 | FSU 2736     | - / -                                    | n.d.        |
| <i>Mortierella parvispora</i>                    | 11266 | CBS 304.52   | Talaj / Németo.                          | n.d.        |
| <i>Mortierella parvispora</i>                    | 11225 | CBS 311.52   | Talaj / Németo.                          | n.d.        |
| <i>Mortierella parvispora</i>                    | 11304 | FSU 834      | - / -                                    | n.d.        |
| <i>Mortierella parvispora</i>                    | 11313 | FSU 835      | - / -                                    | n.d.        |
| <i>Mortierella polycephala</i>                   | 11296 | FSU 867      | Talaj / Egyesült Királyság               | n.d.        |
| <i>Mortierella polycephala</i>                   | 11315 | FSU 759      | Erdei egér ürülék / Ukrajna              | n.d.        |
| <i>Mortierella polycephala</i>                   | 11355 | CBS 456.66   | Erdei egér ürülék / Ukrajna              | n.d.        |
| <i>Mortierella polycephala</i>                   | 11298 | FSU 696      | - / -                                    | n.d.        |
| <i>Mortierella polycephala</i>                   | 11295 | FSU 866      | - / -                                    | n.d.        |
| <i>Mortierella polygonia</i>                     | 11347 | CBS 248.81   | Talaj / Hollandia                        | n.d.        |
| <i>Mortierella polygonia</i>                     | 11203 | CBS 685.71   | Talaj / Wageningen, Hollandia            | K           |
| <i>Mortierella pulchella</i>                     | 11339 | CBS 312.52   | <i>Picea abies</i> gyökér / Németo.      | n.d.        |
| <i>Mortierella reticulata</i>                    | 21862 | CBS 523.70   | Erdei talaj / Észak-Karolina, USA        | n.d.        |
| <i>Mortierella rishikeshi</i>                    | 11273 | CBS 652.68   | Erdei talaj / Rishikesh, India           | K           |
| <i>Mortierella roseonana</i>                     | 11350 | CBS 473.74   | Talaj / Victoria, Ausztrália             | K           |
| <i>Mortierella rostafinskii</i>                  | 11249 | CBS 522.70   | Talaj / Georgia, USA                     | K           |
| <i>Mortierella sarnyensis</i>                    | 11274 | CBS 122.72   | Fenyőerdő / Ukrajna                      | n.d.        |
| <i>Mortierella schmuckeri</i>                    | 11373 | CBS 295.59   | Talaj / Queretaro, Mexikó                | n.d.        |
| <i>Mortierella sclerotiella</i>                  | 11214 | CBS 529.68   | Egér ürülék / Ukrajna                    | n.d.        |
| <i>Mortierella selenospora</i>                   | 11342 | CBS 452.88   | Talaj / Indonézia                        | n.d.        |
| <i>Mortierella selenospora</i>                   | 11204 | CBS 811.68   | Gombakomposzt / Horst, Hollandia         | n.d.        |
| <i>Mortierella simplex</i>                       | 21863 | FSU 11200    | Komposzt / Baarn, Hollandia              | n.d.        |
| <i>Mortierella sossauensis</i>                   | 11343 | CBS 898.68   | Talaj / Gibraltár                        | n.d.        |
| <i>Mortierella strangulata</i>                   | 11267 | CBS 455.67   | Róka ürülék / Baarn, Hollandia           | n.d.        |
| <i>Mortierella stylospora</i>                    | 11275 | CBS 211.32   | Homokos talaj / Victoria, Ausztrália     | n.d.        |
| <i>Mortierella tuberosa</i>                      | 21865 | FSU 11201    | Talaj / Észak-Karolina, USA              | K           |
| <i>Mortierella turficola</i>                     | 21485 | CBS 433.76   | <i>Sphagnum recurvum</i> / Hollandia     | n.d.        |
| <i>Mortierella turficola</i>                     | 11207 | CBS 432.76   | <i>Sphagnum recurvum</i> / Hollandia     | K           |
| <i>Mortierella verticillata</i>                  | 11230 | CBS 315.52   | Erdőtalaj / Németo.                      | n.d.        |
| <i>Mortierella verticillata</i>                  | 11233 | CBS 220.58   | Talaj / Francia.                         | n.d.        |
| <i>Mortierella verticillata</i>                  | 11240 | CBS 225.35   | Németo.                                  | n.d.        |
| <i>Mortierella verticillata</i>                  | 11205 | CBS 346.66   | Tundra talaj / Alaszka                   | n.d.        |
| <i>Mortierella verticillata</i>                  | 11236 | CBS 374.95   | Erdei talaj / Kína                       | n.d.        |
| <i>Mortierella vinacea</i>                       | 11316 | FSU 2701     | - / -                                    | K           |
| <i>Mortierella wolfii</i>                        | 11245 | CBS 209.69   | Meddőhányó / Keele, Anglia               | n.d.        |
| <i>Mortierella wolfii</i>                        | 11244 | CBS 611.70   | Szarvasmarha tüdő / Új-Zéland            | n.d.        |
| <i>Mortierella wolfii</i>                        | 11286 | CBS 612.70   | Széna / Új-Zéland                        | n.d.        |
| <i>Mortierella wolfii</i>                        | 11243 | CBS 651.93   | Gombakomposzt / Horst, Hollandia         | n.d.        |
| <i>Mortierella wolfii</i>                        | 11242 | CBS 614.70   | Széna / Új-Zéland                        | n.d.        |
| <i>Mortierella zonata</i>                        | 11374 | CBS 863.68   | Erdei talaj / Nagy-Britannia             | n.d.        |
| <i>Mortierella zychnae</i>                       | 11228 | CBS 228.35   | Gomphidius glutinosus / Németo.          | n.d.        |
| <i>Mortierella zychnae</i>                       | 11375 | CBS 102879   | Campanotus pennsylvanicus / Kanada       | n.d.        |
| <i>Mortierella zychnae</i>                       | 11212 | CBS 316.52   | <i>Populus tremula</i> / Allgäu, Németo. | n.d.        |
| <i>Mucor albo-ater</i>                           | 12037 | WRLCN(M) 27  | - / -                                    | K           |
| <i>Mucor albo-ater</i>                           | 12038 | -            | - / -                                    | K           |
| <i>Mucor albo-ater</i>                           | 12039 | -            | - / -                                    | K           |
| <i>Mucor aligarensis</i>                         | 1411M | -            | - / -                                    | K           |
| <i>Mucor amphibiorum</i>                         | 12014 | CBS 763.74   | Béka / Németo.                           | K           |
| <i>Mucor azygosporus</i>                         | 12015 | CBS 292.63   | Gyík ürülék / USA                        | K, Kr       |
| <i>Mucor bainieri</i>                            | 12050 | NRRL A-11496 | Talaj / India                            | K           |
| <i>Mucor bainieri</i>                            | 12064 | ATCC 42642   | - / -                                    | A, K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 12684 | -            | Faanyag / Devecser, Magyaró.             | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 12686 | -            | Tűzifa / Devecser, Magyaró.              | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 20679 | -            | Faanyag / Devecser, Magyaró.             | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 20680 | -            | Pince / Devecser, Magyaró.               | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 20727 | -            | - / -                                    | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 20729 | -            | - / -                                    | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 12028 | FRR 2109     | Mogyoró / Queensland, Ausztrália         | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 12029 | FRR 2480     | Temze iszap / Anglia                     | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 12033 | FRR 2479     | Magvak / India                           | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 12041 | CNCTC 1350   | - / -                                    | K, Kr, Z    |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 12065 | -            | - / -                                    | K, Kr, Z    |

|                                                      |       |              |                                              |          |
|------------------------------------------------------|-------|--------------|----------------------------------------------|----------|
| <i>Mucor circinelloides</i>                          | 12066 | -            | - / -                                        | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i>                          | 12082 | MS12         | - / Salamanca, Spanyolország                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i>                          | 1414M | -            | - / -                                        | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i>                          | 1415M | -            | - / -                                        | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> | 12067 | MUFS 055     | Kerti talaj / Dél-Afrika                     | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>griseocianus</i>   | 12069 | MUFS 029     | Kerti talaj / Dél-Afrika                     | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>gryseo-cyanus</i>  | 12049 | NRRL A-7420  | Talaj / Norvégia                             | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i>      | 12003 | CBS 243.67   | Mucormikózis / Dél-Afrika                    | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i>      | 12068 | MUFS 056     | Kerti talaj / Dél-Afrika                     | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>    | 12030 | ATCC 1216b   | - / -                                        | K, Kr, Z |
| <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>    | 12007 | CBS 236.35   | Németo.                                      | K, Kr, Z |
| <i>Mucor corticolus</i>                              | 12031 | -            | Gyümölcs / Magyaró.                          | K        |
| <i>Mucor corticolus</i>                              | 12057 | NRRL 3617    | Talaj / Ausztria                             | K        |
| <i>Mucor corticolus</i>                              | 12058 | NRRL 3616    | Talaj / Ausztria                             | K        |
| <i>Mucor corticolus</i>                              | 1409M | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor corticolus</i>                              | 1410M | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor cylindrosporus</i>                          | 12013 | CBS 204.28   | - / Francia.                                 | K        |
| <i>Mucor flavus</i>                                  | 12002 | CBS 234.35   | Németo.                                      | K        |
| <i>Mucor fragilis</i>                                | 482   | -            | Magyaró.                                     | K        |
| <i>Mucor fuscus</i>                                  | 1403M | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor fuscus</i>                                  | 12042 | ETH 8820/1   | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor fuscus</i>                                  | 12043 | ETH 8820/1   | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor fuscus</i>                                  | 12052 | NRRL A-16057 | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor genevensis</i>                              | 550   | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor genevensis</i>                              | 12060 | NRRL 1756    | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor genevensis</i>                              | 12061 | NRRL 1758    | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor genevensis</i>                              | 12062 | NRRL 1821    | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor genevensis</i>                              | 12063 | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor genevensis</i>                              | 12072 | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor genevensis</i>                              | 1413M | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor guillermondi</i>                            | 12011 | CBS 174.27   | <i>Periplaneta americana</i> ürülék / Orosz. | K        |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 12032 | WRLCN(M) 328 | - / -                                        | K, Kr    |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 12679 | -            | Faanyag / Devecser, Magyaró.                 | K        |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 20678 | -            | Tüzifa / Devecser, Magyaró.                  | K, Kr    |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 478   | -            | - / Magyaró.                                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 479   | -            | - / Magyaró.                                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 1404M | -            | - / -                                        | K, Kr    |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 1406M | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 1408  | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor hiemalis</i>                                | 12074 | -            | - / -                                        | K, Kr, Z |
| <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>             | 12056 | NRRL 3624    | - / Michigan, USA                            | K, Kr    |
| <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>luteus</i>               | 12054 | NRRL 3632    | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>sylvaticus</i>           | 12053 | NRRL 3642    | Talaj / Németo.                              | K, Kr    |
| <i>Mucor indicus</i>                                 | 12006 | CBS 226.29   | - / Svájc                                    | K        |
| <i>Mucor inequisporus</i>                            | 1407M | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor inequisporus</i>                            | 12055 | NRRL 3626    | <i>Diospyros kaki</i> / Japán                | K        |
| <i>Mucor irregularis</i>                             | 20721 | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor irregularis</i>                             | 20723 | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor memphitis</i>                               | 12059 | NRRL 2597    | Kalifornia, USA                              | K        |
| <i>Mucor memphitis</i>                               | 1412M | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor minutus</i>                                 | 12008 | CBS 586.67   | - / India                                    | K        |
| <i>Mucor mucedo</i>                                  | 253   | -            | - / -                                        | K, Kr, Z |
| <i>Mucor mucedo</i>                                  | 485   | -            | - / Magyaró.                                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor mucedo</i>                                  | 1405M | -            | - / -                                        | K, Kr, Z |
| <i>Mucor mucedo</i>                                  | 12034 | WRLCN(M) 122 | Tölgyfakéreg / -                             | K, Kr, Z |
| <i>Mucor mucedo</i>                                  | 12044 | -            | - / -                                        | K, Kr, Z |
| <i>Mucor nederlandicus</i>                           | 12012 | CBS 735.70   | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor neutralensis</i>                            | 12079 | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12075 | -            | Nektarin / Kalifornia, USA                   | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12076 | -            | Nektarin / Kalifornia, USA                   | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12077 | -            | Nektarin / Kalifornia, USA                   | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12078 | -            | Nektarin / Kalifornia, USA                   | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12080 | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12083 | -            | Talaj / Kalifornia, USA                      | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12084 | -            | Narancs / Kalifornia, USA                    | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12085 | -            | Narancs / Kalifornia, USA                    | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12086 | -            | - / Kalifornia, USA                          | K        |
| <i>Mucor piriformis</i>                              | 12087 | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor plasmaticus</i>                             | 12000 | CBS 275.49   | Egér ürülék / Hollandia                      | K, Kr    |
| <i>Mucor plumbeus</i>                                | 906   | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                                | 1001  | -            | - / -                                        | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                                | 12021 | -            | Gyümölcs / Magyaró.                          | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                                | 12635 | -            | Gabona / Csepel, Magyaró.                    | K        |

|                                                |       |              |                                       |          |
|------------------------------------------------|-------|--------------|---------------------------------------|----------|
| <i>Mucor plumbeus</i>                          | 12071 | MUFS 169     | - / -                                 | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                          | 1025  | FRR 2412     | Erjedő almalé / Ausztrália            | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                          | 12020 | -            | Gyümölcs / Magyaró.                   | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                          | 12022 | ATCC 56635   | - / -                                 | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                          | 12023 | ATCC 42423   | Alpesi talaj, Kanada                  | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                          | 12024 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                          | 12025 | WRLCN(M) 370 | - / -                                 | K        |
| <i>Mucor plumbeus</i>                          | 12070 | MUFS 162     | Szavanna talaj / Dél-Afrika           | K        |
| <i>Mucor psychrophilus</i>                     | 12009 | CBS 288.71   | Juh trágya / Oroszoro.                | K        |
| <i>Mucor racemosum</i>                         | 12046 | CNCTC 1591   | - / -                                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosum</i>                         | 12047 | -            | - / -                                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 472   | -            | - / Magyaró.                          | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 473   | -            | - / Magyaró.                          | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 474   | -            | - / Magyaró.                          | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 475   | -            | - / Magyaró.                          | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 12045 | -            | Gyümölcs / Magyaró.                   | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 12048 | -            | - / -                                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 12633 | -            | Gabona / Csepel, Magyaró.             | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 1402M | -            | - / -                                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 12035 | WRLCN(M) 202 | - / -                                 | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 12073 | CBS 225.37   | Talaj / -                             | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i>                         | 20963 | -            | - / Franciaó.                         | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i> f. <i>chibinensis</i>   | 12005 | CBS 636.67   | Talaj / Oroszország                   | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i> f. <i>racemosus</i>     | 12051 | NRRL 3640    | - / Svájc                             | K, Kr, Z |
| <i>Mucor racemosus</i> f. <i>sphareosporus</i> | 12004 | CBS 115.08   | - / Norvégia                          | K, Kr, Z |
| <i>Mucor spinosus</i>                          | 477   | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Mucor strictus</i>                          | 12001 | CBS 576.66   | Talaj / Ausztria                      | K        |
| <i>Mucor zonatus</i>                           | 12010 | CBS 148.69   | Talaj / Németo.                       | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 14513 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 14514 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 14515 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 14516 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 14517 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11003 | NRRL 3169    | - / Kalifornia USA                    | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11005 | NRRL 5282    | - / India                             | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11006 | CBS 370.71   | Humán köpet / Hollandia               | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11007 | NRRL 5284    | Rothadó alma / USA                    | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11008 | NRRL 5901    | Tehén placenta / Dakota, USA          | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11009 | NRRL 6303    | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11011 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11012 | CBS 360.92   | Humán mikózis / Melbourne, Ausztrália | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11014 | ETH M4918    | Komposzt / Svájc                      | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11028 | CBS 370.71   | Humán köpet / Hollandia               | K        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                       | 11029 | CBS 360.92   | Humán mikózis / Melbourne, Ausztrália | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 555   | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11000 | NRRL 2543    | Állati mikózis / Anglia               | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11001 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11002 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11004 | NRRL 3310    | - / India                             | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11010 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11013 | -            | Trachea váladék / Svájc               | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11015 | WRLCN(M) 231 | Állati mikózis / Anglia               | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11016 | FRR 2490     | - / Ausztrália                        | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11017 | -            | - / Lengyelország                     | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11018 | FRR 1652     | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11019 | NRRL 6304    | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11020 | NRRL 6399    | Denevér ürülék / India                | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11021 | NRRL 6401    | - / Kalifornia, USA                   | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11022 | NRRL 3638    | Vízirtató / Wisconsin, USA            | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11023 | CBS 354.68   | Kukorica / Hollandia                  | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11024 | CBS 184.67   | Lótrágya / Nevada, USA                | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11025 | NRRL 3469    | - / Berkley, Kalifornia, USA          | K        |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                     | 11026 | -            | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus arrhizus</i>                       | 21290 | FSU 8743     | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus arrhizus</i>                       | 21291 | FSU 5857     | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus caespitosus</i>                    | 21303 | CBS 427.87   | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus homothallicus</i>                  | 13623 | NRRL 2538    | Talaj / Guatemala                     | K        |
| <i>Rhizopus homothallicus</i>                  | 21302 | FSU 2530     | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus lyococcus</i>                      | 21292 | FSU 10053    | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus lyococcus</i>                      | 21293 | FSU 10645    | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus microsporus</i>                    | 21296 | FSU 10049    | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus microsporus</i>                    | 21297 | FSU 10059    | - / -                                 | K        |
| <i>Rhizopus microsporus</i>                    | 21298 | FSU 10066    | - / -                                 | K        |



|                                                         |       |             |                                 |   |
|---------------------------------------------------------|-------|-------------|---------------------------------|---|
| <i>Rhizopus microsporus</i>                             | 21299 | FSU 9932    | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>     | 13619 | NRRL 514    | Tempeh / Indonézia              | K |
| <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>     | 13622 | NRRL 2710   | Tempeh / Indonézia              | K |
| <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> | 13647 | -           | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> | 13644 | CBS 220.92  | Humán mikózis / Hollandia       | K |
| <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> | 13645 | CBS 102.277 | Humán mikózis / -               | K |
| <i>Rhizopus niveus</i>                                  | 13625 | CBS 403.51  | / Japán                         | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 495   | -           | / Szeged, Magyaró.              | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 497   | -           | / Szeged, Magyaró.              | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 502   | -           | - / Szeged, Magyaró.            | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13611 | -           | cukkini / Kalifornia, USA       | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13616 | -           | füge / Kalifornia, USA          | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 8100R | -           | Mucormikózis / USA              | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13617 | MUFS R5     | - / Dél-Afrika                  | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13618 | NRRL 1526   | Tempeh / Illinois, USA          | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13620 | NRRL 2908   | Kínai élesztő / Kína            | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13621 | NRRL 1472   | - / Illinois, USA               | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13633 | CBS 112.07  | - / Hollandia                   | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13634 | CBS 260.28  | Kínai élesztő / Kína            | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13635 | -           | Humán mikózis / Texas, USA      | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13642 | CBS 109.939 | Humán mikózis / Toronto, Kanada | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 13643 | CBS 146.90  | Humán mikózis / Hollanida       | K |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                  | 8124R | NRRL 28631  | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus racemosum</i>                               | 4053  | -           | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus schipperae</i>                              | 13641 | CBS 138.95  | Humán mikózis / USA             | K |
| <i>Rhizopus schipperae</i>                              | 13646 | -           | Humán mikózis / USA             | K |
| <i>Rhizopus schipperae</i>                              | 21304 | FSU 10234   | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus sexualis</i>                                | 21300 | FSU 2531    | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus sexualis</i>                                | 21301 | CBS 102880  | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 2001R | -           | Paradicsom / Szeged, Magyaró.   | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 2002R | -           | Őszibarack / Szeged, Magyaró.   | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 2003R | -           | Gyümölcs / Szeged, Magyaró.     | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 2004R | -           | Dió / Szeged, Magyaró.          | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 2005R | -           | Rizs / Magyaró.                 | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 2006R | -           | Rizs / Magyaró.                 | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 2007R | -           | Őszibarack / Szeged, Magyaró.   | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 13609 | -           | Nektarin / Kalifornia, USA      | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 13610 | -           | Nektarin / Kalifornia, USA      | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 13614 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 13637 | -           | - / Szeged, Magyaró.            | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 21294 | FSU 9996    |                                 | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                              | 21295 | FSU 9872    |                                 | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 503   | -           | - / Magyaró.                    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 504   | -           | - / Magyaró.                    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 498   | -           | - / Szeged, Magyaró.            | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 506   | -           | talaj / Illinois, USA           | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 11101 | -           | Nektarin / Kalifornia, USA      | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 13629 | CBS 117.43  | Árpa / Hollandia                | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 13630 | CBS 320.35  | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 13631 | CBS 319.35  | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>         | 13632 | CBS 398.95  | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13600 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13601 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13602 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13603 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13604 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13605 | -           | - / Kalifornia, USA             | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13606 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13607 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13608 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13612 | -           | - / Kalifornia, USA             | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13613 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13615 | -           | Őszibarack / Kalifornia, USA    | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13624 | CBS 609.82  | Ragi / -                        | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13626 | CBS 389.95  | - / -                           | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13627 | CBS 347.49  | Tempeh / Indonesia              | K |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>       | 13628 | CBS 109.76  | Kenyér / Svájc                  | K |
| <i>Saksanaea vasiformis</i>                             | 11071 | NRRL 2443   | Talaj / India                   | K |
| <i>Syncephalastrum racemosum</i>                        | 47    | -           | - / -                           | K |
| <i>Thamnostylum piriforme</i>                           | 547   | -           | - / -                           | K |
| <i>Thamnostylum piriforme</i>                           | 11075 | MUFS 025    | - / -                           | K |
| <i>Thamnostylum piriforme</i>                           | 4056  | -           | - / -                           | K |
| <i>Umbelopsis angularis</i>                             | 11252 | CBS 603.68  | Talaj / Baarn, Hollandia        | K |

|                                 |       |            |                        |   |
|---------------------------------|-------|------------|------------------------|---|
| <i>Umbelopsis autotrophica</i>  | 11276 | CBS 310.93 | Talaj / Nagy-Britannia | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11076 | NRRL 1757  | Talaj / Wisconsin, USA | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11077 | -          | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11290 | FSU 925    | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11291 | FSU 926    | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11292 | FSU 1716   | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11293 | FSU 2831   | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11319 | FSU 923    | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11321 | FSU 2892   | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11322 | FSU 954    | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11323 | FSU 910    | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11324 | FSU 909    | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11325 | FSU 924    | - / -                  | K |
| <i>Umbelopsis isabellina</i>    | 11335 | FSU 922    | - / -                  | K |
| <i>Zygorhynchus macrocarpus</i> | 11073 | NRRL 2663  | - / Franciao.          | K |
| <i>Zygorhynchus moelleri</i>    | 11074 | NRRL 1625  | - / -                  | K |

<sup>a</sup> A trözsgyűjtemények rövidítései: ATCC, American Type Culture Collection, USA; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia; CNCTC, Czech National Collection of Type Cultures, Prága, Cseh Köztársaság; ETH, Swiss Federal Institute of Technology Culture Collection, Zürich, Svájc; FRR, CSIRO Food Research Culture Collection, North Ryde, Új-Dél-Wales, Ausztrália; FSU, Fungal Reference Centre, Jéna, Németország; IMI, CABI Bioscience Genetic Resource Collection, Nagy-Britannia; MUFS, Department of Microbiology and Biochemistry, University of Orange Free State, Dél-Afrika; NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois, USA; SZMC, Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény, Szeged, Magyarország; WRLCN, Welcome Bacterial Collection, Beckham, Nagy-Britannia.

<sup>b</sup> A mintákban kimutatott karotinoidok rövidítései: A, asztaxantin; K,  $\beta$ -karotin; Kr,  $\beta$ -kriptoxantin; Z, zeaxantin; n.d., karotinoid nem volt detektálható.

**F2. táblázat. A kísérletek során felhasznált és létrehozott plazmidok és főbb jellemzőik.**

| Plazmid <sup>a</sup> | Genotípus/Leírás                                                                                                                                     | Hivatkozás/Forrás              |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>p18S</b>          | <i>M. circinelloides</i> 18S rDNS 1826 bp-os szakasza pUC18 plazmidban, Ap <sup>r</sup>                                                              | PAPP és mtsi. 2013             |
| <b>p28S</b>          | <i>M. circinelloides</i> 28S rDNS 1497 bp-os szakasza pUC18 plazmidban, Ap <sup>r</sup>                                                              | PAPP és mtsi. 2013             |
| <b>p18S-28S</b>      | <i>M. circinelloides</i> 18S és 28S rDNS-ek egy-egy 1826 és 1405 bp-os szakasza pUC18 plazmidban, Ap <sup>r</sup>                                    | PAPP és mtsi. 2013             |
| pAVB107              | <i>leuA</i> pBluescript II SK plazmidban, Ap <sup>r</sup>                                                                                            | VELAYOS 2000                   |
| pAVB160              | <i>isoA</i> , <i>leuA</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                                                          | VELAYOS 2000                   |
| pAVB161              | <i>carG</i> , <i>leuA</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                                                          | VELAYOS 2000                   |
| <b>pAS1</b>          | <i>hmgR1</i> 662 bp-os szakasza fordított orientációban a pPT43 plazmidban, <i>gpdIP</i> és <i>gpdIT</i> közé építve, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>  | NAGY és mtsi. 2015             |
| <b>pAS2</b>          | <i>hmgR2</i> 662 bp-os szakasza fordított orientációban a pPT43 plazmidban, <i>gpdIP</i> és <i>gpdIT</i> közé építve, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>  | NAGY és mtsi. 2015             |
| <b>pAS3</b>          | <i>hmgR3</i> 662 bp-os szakasza fordított orientációban a pPT43 plazmidban, <i>gpdIP</i> és <i>gpdIT</i> közé építve, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>  | NAGY és mtsi. 2015             |
| pBluescript II SK    | Általános <i>E. coli</i> klónozó és expressziós vektor, Ap <sup>r</sup>                                                                              | Stratagene                     |
| <b>pCA2</b>          | <i>gpdIP-crtW-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                           | PAPP és mtsi. 2013             |
| <b>pCA6</b>          | <i>carG</i> , <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                                                          | CSERNETICS és mtsi. 2011       |
| <b>pCA7</b>          | <i>leuA</i> pUC18 plazmidban, Ap <sup>r</sup>                                                                                                        | PAPP és mtsi. 2013             |
| <b>pCA8</b>          | <i>gpdIP-crtW-gpdIT</i> expressziós kazetta a <i>leuA</i> gén és annak 5'-szomszédos (downstream) régiója közé építve, <i>leuA</i> , Ap <sup>r</sup> | PAPP és mtsi. 2013             |
| <b>pCA9</b>          | <i>gpdIP-crtW-gpdIT</i> expressziós kazetta 18S és 28S rDNS szakaszok közé építve, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                     | PAPP és mtsi. 2013             |
| <b>pCA10</b>         | <i>ipi</i> , <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                                                           | CSERNETICS és mtsi. 2011       |
| <b>pCA15</b>         | <i>gpdIP-crtW-gpdIT</i> expressziós kazetta pPK2 bináris plazmidba építve, <i>pyrG</i> , Kn <sup>r</sup>                                             | PAPP és mtsi. 2013             |
| pEPM9                | <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                                                                        | BENITO és mtsi. 1992           |
| pEPM901              | <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                                                                        | BENITO és mtsi. 1992           |
| <b>pLGY2</b>         | <i>Rm_hmgR</i> pTM7 plazmidban, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                                        | LUKÁCS és mtsi. 2009           |
| <b>pNG1</b>          | <i>gpdIP-hmgR1-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                          | NAGY és mtsi. 2014             |
| <b>pNG2</b>          | <i>gpdIP-hmgR2-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                          | NAGY és mtsi. 2014             |
| <b>pNG3</b>          | <i>gpdIP-hmgR3-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                          | NAGY és mtsi. 2014             |
| <b>pNYI8</b>         | RB, <i>gpdIP-hph-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>gpdIP-gfp-gpdIT</i> expressziós kazetta, LB, <i>pBR322 ori</i> , Kn <sup>r</sup>                  | NYILASI és mtsi. 2008          |
| pPK2                 | RB, <i>An_gpdP-hph-An_trpCT</i> expressziós kazetta, LB, <i>pBR322 ori</i> , Kn <sup>r</sup>                                                         | COVERT és mtsi. 2001           |
| <b>pPT43</b>         | <i>gpdIP</i> , <i>gpdIT</i> pBluescript II SK plazmidban, Ap <sup>r</sup>                                                                            | PAPP és mtsi. 2006             |
| <b>pPT43leu</b>      | <i>leuA</i> pPT43 plazmidban, Ap <sup>r</sup>                                                                                                        | CSERNETICS és mtsi. 2015       |
| <b>pPT50</b>         | <i>gpdIP-crtZ-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                           | PAPP és mtsi. 2006             |
| <b>pPT51</b>         | <i>gpdIP-crtW-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>leuA</i> , Ap <sup>r</sup>                                                                           | PAPP és mtsi. 2006             |
| <b>pPT79</b>         | <i>Rm_gpdP-amdS-Rm_gpdT</i> expressziós kazetta, Ap <sup>r</sup>                                                                                     | PÉTERI és mtsi. 2007           |
| <b>pPT80a</b>        | <i>Rm_gpdP-leuA-Rm_gpdT</i> expressziós kazetta, Ap <sup>r</sup>                                                                                     | LUKÁCS és mtsi. 2009           |
| <b>pPT80b</b>        | <i>Rm_gpdP-pyrG-Rm_gpdT</i> expressziós kazetta, Ap <sup>r</sup>                                                                                     | LUKÁCS és mtsi. 2009           |
| <b>pPT81</b>         | <i>pyrG</i> pPT43 plazmidban, Ap <sup>r</sup>                                                                                                        | CSERNETICS és mtsi. 2011, 2015 |

| Plazmid <sup>a</sup> | Genotípus/Leírás                                                           | Hivatkozás/Forrás        |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>pPT81-crtS</b>    | <i>gpdIP-crtS-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup> | CSERNETICS és mtsi. 2015 |
| <b>pPT82</b>         | <i>gpdIP-ipi-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>  | CSERNETICS és mtsi. 2011 |
| <b>pPT83</b>         | <i>gpdIP-isoA-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup> | CSERNETICS és mtsi. 2011 |
| <b>pPT84</b>         | <i>gpdIP-carG-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup> | CSERNETICS és mtsi. 2011 |
| <b>pPT85</b>         | <i>gpdIP-ipi-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>leuA</i> , Ap <sup>r</sup>  | CSERNETICS és mtsi. 2011 |
| <b>pPT86</b>         | <i>gpdIP-isoA-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>leuA</i> , Ap <sup>r</sup> | CSERNETICS és mtsi. 2011 |
| <b>pPT86-crtR</b>    | <i>gpdIP-crtR-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>leuA</i> , Ap <sup>r</sup> | CSERNETICS és mtsi. 2015 |
| pSP73                | Általános <i>E. coli</i> klónozó és expressziós vektor, Ap <sup>r</sup>    | Promega                  |
| <b>pTM7</b>          | <i>pyrG</i> pSP73 plazmidban, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>                | LUKÁCS és mtsi. 2009     |
| <b>pTM8</b>          | <i>gpdIP-bgl-gpdIT</i> expressziós kazetta, <i>pyrG</i> , Ap <sup>r</sup>  | TAKÓ és mtsi. 2010       |
| pUC18                | Általános <i>E. coli</i> klónozó vektor, Ap <sup>r</sup>                   | Thermo Scientific        |
| <b>pZ4</b>           | <i>ipi</i> cDNS pBluescript II SK plazmidban, Ap <sup>r</sup>              | CSERNETICS és mtsi. 2011 |

A dolgozatban ismertetett kutatások során készített plazmidok neve vastagon van szedve.

Rövidítések: *amdS*, *Aspergillus nidulans* acetamidáz gén; *An\_gpdP*, *A. nidulans* glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz promóter; *An\_trpCT*, *A. nidulans* triptofán-bioszintézis gén terminátor régiója; Ap<sup>r</sup>, ampicillin rezisztencia gén; *bgl*, *Rhizomucor miehei* β-glükozidáz gén; *carG*, *Mucor circinelloides* geranilgeranil-pirofoszfát-szintáz gén; *crtR*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* citokróom P450-reduktáz gén; *crtS*, *X. dendrorhous* citokróom P450 hidroxiláz/asztaxantin-szintáz gén; *crtW*, *Paracoccus* sp. N81106 β-karotin-ketoláz gén; *crtZ*, *Paracoccus* sp. N81106 β-karotin-hidroxiláz gén; *gfp*, zöld fluoreszcens fehérje gén; *gpdIP*, *M. circinelloides* glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz promóter; *gpdIT*, *M. circinelloides* glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz terminátor; *hmgR1*, *M. circinelloides* HMG-KoA-reduktáz 1 gén; *hmgR2*, *M. circinelloides* HMG-KoA-reduktáz 2 gén; *hmgR3*, *M. circinelloides* HMG-KoA-reduktáz 3 gén; *hph*, higromicin B-foszfotranszferáz gén; *ipi*, *M. circinelloides* izopentenil-pirofoszfát-izomeráz gén; *isoA*, *M. circinelloides* farnezil-pirofoszfát-szintáz gén; Kn<sup>r</sup>, kanamicin rezisztencia gén; LB, *A. tumefaciens* T-DNS baloldali határszekvencia (*left boarder*); *leuA*, *M. circinelloides* α-izopropilmalát-izomeráz gén; *pyrG*, *M. circinelloides* orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxiláz gén; RB, *A. tumefaciens* T-DNS jobboldali határszekvencia (*right boarder*); *Rm\_gpdP*, *R. miehei* glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz promóter; *Rm\_gpdT*, *R. miehei* glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz terminátor; *Rm\_hmgR*, *R. miehei* HMG-KoA-reduktáz gén.

**F3. táblázat. A jelen dolgozatban ismertetett munkák során tervezett fontosabb primerek**

| Primer                                                                                                                                | Szekvencia (5' - 3')                         | Termék                                             | A termék mérete (bp) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------|
| A M. circinelloides hmgR, ipi, isoA és carG gének felszaporításához használt indítószekvenciák                                        |                                              |                                                    |                      |
| Hmg-coA2f                                                                                                                             | GGCCTGCAGATGATCAATCTGCTGTCCTAT               | hmgR1                                              | 3740 (gDNS)          |
| Hmg-coA2r                                                                                                                             | TTCGCGGCCGCTATAAGATGCAATTTCCCGTT             |                                                    | 3346 (cDNS)          |
| Hmg-coA3f                                                                                                                             | TTCGTCGAATGTTGAAAAACGTCAAAAAAGAT             | hmgR2                                              | 3595 (gDNS)          |
| Hmg-coA3r                                                                                                                             | TTCGCGGCCGCTATGATTTAATAACAACCTCCA            |                                                    | 3222 (cDNS)          |
| Hmg-coA4f                                                                                                                             | TTCGTCGACATGGCGTCTGCTCTCCCCATCA              | hmgR3                                              | 3491 (gDNS)          |
| Hmg-coA4r                                                                                                                             | TTCGCGGCCGCTTAGGATTTGATGCAGGTT               |                                                    | 3345 (cDNS)          |
| ipi1                                                                                                                                  | GGCTCGAGATGGCCCCCTGATTTGAAGGAATA             | ipi                                                | 929 (gDNS)           |
| ipi2                                                                                                                                  | CTCGCGGCCGCTTAGAAGCCTAAACGATGAATGGT          |                                                    | 697 (cDNS)           |
| fpp1                                                                                                                                  | GGCTCGAGATGGTTGCTGTCAAATTACA                 | isoA                                               | 1510 (gDNS)          |
| fpp2                                                                                                                                  | CTCGCGGCCGCTTATTTAGTACGCTTGTA                |                                                    | 1078 (cDNS)          |
| ggpp1                                                                                                                                 | GGCTCGAGATGCTCAACTCACACAACAG                 | carG                                               | 1480 (gDNS)          |
| ggpp2                                                                                                                                 | CTCGCGGCCGCTAGTCGTTGGTGGCCTCTA               |                                                    | 931 (cDNS)           |
| A M. circinelloides gének qPCR analiziséhez használt indítószekvenciák                                                                |                                              |                                                    |                      |
| H1_RT_F                                                                                                                               | CAGAAACAACCTCACATGCCCTGGC                    | a hmgR1 gén egy szakasza                           | 151                  |
| H1_RT_R                                                                                                                               | TAATAGCTGGAAGTGGATCGTCGG                     |                                                    |                      |
| H2_RT_F                                                                                                                               | CTCGTATCATCTGTGCCTCTG                        | a hmgR2 gén egy szakasza                           | 107                  |
| H2_RT_R                                                                                                                               | AGCAGTGTACGGTTGTGAG                          |                                                    |                      |
| hmgR3_RTf                                                                                                                             | GAATCCAGTCTGTTGCCTCTCCA                      | a hmgR3 gén egy szakasza                           | 128                  |
| hmgR3_RTTr                                                                                                                            | GAGTCACCGTCAATGTTTCATGGGA                    |                                                    |                      |
| MCactinF                                                                                                                              | CACTCCTTCACTACCACCGCTGA                      | az aktin gén egy szakasza                          | 117                  |
| MCactinR                                                                                                                              | GAGAGCAGAGGATTGAGCAGCAG                      |                                                    |                      |
| ipireal-time1                                                                                                                         | ATGTGGACCAACACTTGCTGCTC                      | az ipi gén egy szakasza                            | 119                  |
| ipireal-time2                                                                                                                         | TTGATGCCAAGCTCATGCTCCAG                      |                                                    |                      |
| isoAreal-time1                                                                                                                        | ATCTCGACTGTTACGGTGCTCCT                      | az isoA gén egy szakasza                           | 119                  |
| isoAreal-time2                                                                                                                        | CTTGCGTTGTTTCGGGATTAGCCA                     |                                                    |                      |
| carGreal-time1                                                                                                                        | CAACATCATCAGCCAGAAGCCCA                      | az carG gén egy szakasza                           | 148                  |
| carGreal-time2                                                                                                                        | ACCACCCAAACGCTTGATTTCCT                      |                                                    |                      |
| A pNG1-3 plazmidok transzformánsokban történő kimutatására használt indítószekvenciák                                                 |                                              |                                                    |                      |
| Gdpd                                                                                                                                  | CATGAAGTGTGAGACATTGCGA                       | gpd1P 3' vége -                                    | -                    |
| png1rev                                                                                                                               | TGTTGTCTCGATTGAATGGCTGG                      | hmgR1 gén 5' vége                                  | 656                  |
| png2rev                                                                                                                               | TCCACAGGATTGGCGGTCTAT                        | hmgR2 gén 5' vége                                  | 869                  |
| png3rev                                                                                                                               | CAGCGTGTGGTCAATGGTGTT                        | hmgR3 gén 5' vége                                  | 538                  |
| A M. circinelloides hmgR gének csendesítéséhez és a Northern-hibridizációs próba elkészítéséhez használt indítószekvenciák            |                                              |                                                    |                      |
| H1CSf                                                                                                                                 | TTCGCGGCCGCTCACTGGCTTCATGAACCGGCT            | a hmgR1 gén egy szakasza (fordított orientációban) | 662                  |
| H1CSr                                                                                                                                 | CCGCTCGAGAGCAATGTTCTTCATAATCCGAA             |                                                    |                      |
| H2CSf                                                                                                                                 | TTCGCGGCCGCGAGATAACCCGTTCCGATATTTG           | a hmgR2 gén egy szakasza (fordított orientációban) | 626                  |
| H2CSr                                                                                                                                 | CCGCTCGAGTCATTGTCATGTAGTTTGGTTGT             |                                                    |                      |
| H3CSf                                                                                                                                 | TTCGCGGCCGCTCCAGCGTCTTTGGCAAAGGCA            | a hmgR3 gén egy szakasza (fordított orientációban) | 697                  |
| H3CSr                                                                                                                                 | TTCCTCGAGGGGTGTCCCGTGTGGAGAGCGAC             |                                                    |                      |
| A R. miehei hmgR génjének kimutatásához és a Southern-hibridizációs próba elkészítéséhez használt indítószekvenciák                   |                                              |                                                    |                      |
| HMG1F                                                                                                                                 | CCATGGCIACIACIGARGG                          | a hmgR gén egy szakasza                            | 314                  |
| HMG2R                                                                                                                                 | CATRITTCATICCCAT                             |                                                    |                      |
| L20                                                                                                                                   | CCAGCAAGGATACGCCGATAA                        | a hmgR gén egy szakasza                            | 623                  |
| L22                                                                                                                                   | CACGCACATCTTGTCGGGTAA                        |                                                    |                      |
| A Paracoccus sp. N81106 törzs génjeinek felszaporításához és qPCR analiziséhez használt indítószekvenciák                             |                                              |                                                    |                      |
| crtZ1                                                                                                                                 | GGCTCGAGATGACCAATTTCTGATC                    | crtZ gén                                           | 507                  |
| crtZ2                                                                                                                                 | CTCGCGGCCGCTCACGTGCGCTCTGCGCCTC              |                                                    |                      |
| crtW1                                                                                                                                 | GGCTCGAGATGAGCGCACATGCCCTGC                  | crtW gén                                           | 748                  |
| crtW2                                                                                                                                 | CTCGCGGCCGCTCATGCGGTGTCCCCCTTGGTG            |                                                    |                      |
| crtWreal-time1                                                                                                                        | CTTCATCGGCACCTATTTCCGGCT                     | a crtW gén egy szakasza                            | 149                  |
| crtWreal-time2                                                                                                                        | CGAACACGAACAGCTGGATCGAC                      |                                                    |                      |
| A X. dendrorhous törzsek génjeinek felszaporításához, valamint qPCR és Southern-hibridizációs analiziséhez használt indítószekvenciák |                                              |                                                    |                      |
| XantcrtS1                                                                                                                             | GGCATCGATATGTTTCATCTTGGTCTTGCTC <sup>a</sup> | crtS                                               | 1674                 |

| Primer                                                                                                                       | Szekvencia (5' - 3')                        | Termék                                | A termék mérete (bp) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| XantcrtS2                                                                                                                    | CTTGCGGCCGCTCATTGACCGGCTTGACCT              |                                       |                      |
| XantcrtR1                                                                                                                    | GACTCGAGATGGCCACACTCTCCGATCTTGTC            |                                       |                      |
| XantcrtR2                                                                                                                    | AATGCGGCCGCTACGACCAGACGTCCATCAACAA          | <i>crtR</i>                           | 2241                 |
| crtSreal-time1                                                                                                               | CCGATCCGAAAGTCTTCAACC                       | a <i>crtS</i> gén egy szakasza        | 110                  |
| crtSreal-time2                                                                                                               | CGCCGTAACAACACCATCTC                        |                                       |                      |
| crtRreal-time1                                                                                                               | TCTTCTCCGAAACTTCACCC                        | a <i>crtR</i> gén egy szakasza        | 177                  |
| crtRreal-time2                                                                                                               | CTGTCCGTCGCTAATCATTG                        |                                       |                      |
| <b>Az új transzformációs rendszerek és vektorok létrehozása érdekében tervezett indítószekvenciák</b>                        |                                             |                                       |                      |
| gpd1Pf                                                                                                                       | GGGGGCCCGTGTTGGATGAACAATTCAT                | <i>M. circinelloides</i> <i>gpd1P</i> | 738                  |
| gpd1Pr                                                                                                                       | GGTCTGAGATTATATAAATATATAGAGATA              |                                       |                      |
| gpd1Tf                                                                                                                       | GGGCGGCCGCTCGTAAATCATTTCTAGTC               | <i>M. circinelloides</i> <i>gpd1T</i> | 621                  |
| gpd1Tr                                                                                                                       | GGGAGCTCGCGATGACAATAACGCGCAT                |                                       |                      |
| Rm_gpdPf                                                                                                                     | GGTGGTATTGTTGACATTCAAG                      | <i>R. miehei</i> <i>Rm_gpdP</i>       | 963                  |
| Rm_gpdPr                                                                                                                     | GATGTTGAATGCCGTGTAAGCC                      |                                       |                      |
| Rm_gpdTf                                                                                                                     | GGAAATTTTGTGTTAGTTCGCT                      | <i>R. miehei</i> <i>Rm_gpdT</i>       | 486                  |
| Rm_gpdTr                                                                                                                     | ATCGATCAGACTATCACCGCAA                      |                                       |                      |
| rib1                                                                                                                         | CTC GAG CTC CTG GTT GAT CCT GCT TGT AGT CA  | <i>M. circinelloides</i> 18S rDNS     | 1829                 |
| rib2                                                                                                                         | CTC GGT ACC AAT GAT CCT TCC GCA GGT TCA CCT | egy szakasza                          |                      |
| rib3                                                                                                                         | CTC GGA TCC TAA TCA ATA ATT TTG GCT TGT CCA | <i>M. circinelloides</i> 28S rDNS     | 1501                 |
| rib5                                                                                                                         | AGA GTT TCC TCT GGC TTC ACC CTA TTC A       | régió egy szakasza                    |                      |
| <b>A <i>crtW</i> gén <i>M. circinelloides</i> genomba történt integrációjának ellenőrzéséhez tervezett indítószekvenciák</b> |                                             |                                       |                      |
| leuAv8inv1                                                                                                                   | CTGGTCATGAAGTGCCCTTTGAGGT                   | MS12+pCA8lf, IPCR                     | nem ismert           |
| leuAe8inv2                                                                                                                   | CTCGCTCGTCTACTAGCAGGTTGT                    |                                       |                      |
| gpdPe8inv3                                                                                                                   | GGCTGCGCGTGGTTCACACTAAT                     | MS12+pCA8lf, IPCR                     | nem ismert           |
| arsMe8inv4                                                                                                                   | GTTTGGCTGTGCTCATCGCACT                      |                                       |                      |
| 18S9inv1                                                                                                                     | GTAATTTGCACGCCTGCTGCCT                      | MS12+pCA9lf, IPCR                     | nem ismert           |
| 28S9inv2                                                                                                                     | CCGTCTTGAAACACGGACCAAGGA                    |                                       |                      |
| pl51inv1                                                                                                                     | CAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGT                  | MS12+pPT51'R, IPCR                    | nem ismert           |
| pl51inv2                                                                                                                     | GGGCTAGACTGCTCTCCAAATGCA                    |                                       |                      |
| pl8remiinv2                                                                                                                  | CACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGT                   | MS12+pCA8'R, IPCR                     | nem ismert           |
| gpdTv8remiinv1                                                                                                               | GCTGTTACTGTTACTATCGCCCT                     |                                       |                      |
| amprev1                                                                                                                      | GGCGACACGAAATGTTGAATAC                      | plazmid menekítés                     | nem ismert           |
| amprev2                                                                                                                      | CGAAATAGACAGATCGCTGAG                       |                                       |                      |

<sup>a</sup> Az aláhúzott nukleotidok az indítószekvenciák 5' végére tervezett restrikciós hasítóhelyeket jelölik.

**F4. táblázat. A Mortierellaceae család filogenetikai helyzetének vizsgálatához használt gombatörzsek törzsgyűjteményi száma, a típustörzsek státusza és a meghatározott szekvenciák NCBI GenBank azonosítója. A felsorolt törzsek a Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény járomspórás gombagyűjteményének tagjai.**

| Fajnév                                                                       | SZMC <sup>a</sup><br>azonosító | Egyéb<br>törzsgyűjteményi<br>azonosító | Státusz <sup>b</sup>                                    | NCBI GenBank azonosító |          |          |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------|----------|----------|
|                                                                              |                                |                                        |                                                         | SSU                    | ITS      | LSU      |
| <i>Dissophora decumbens</i>                                                  | SZMC 11206                     | CBS 301.87                             | –                                                       | HQ667439               | HQ630275 | HQ667354 |
| <i>D. decumbens</i>                                                          | SZMC 11337                     | CBS 592.88                             | –                                                       | HQ667440               | HQ630276 | HQ667355 |
| <i>D. ornata</i>                                                             | SZMC 11356                     | CBS 347.77                             | <i>M. ornata</i> holotípus                              | HQ667441               | HQ630277 | HQ667356 |
| <i>D. ornata</i>                                                             | SZMC 11221                     | CBS 348.77                             | <i>M. ornata</i> holotípus                              | HQ667442               | HQ630278 | HQ667357 |
| <i>Gamsiella multivaricata</i>                                               | SZMC 11224                     | CBS 227.78                             | <i>M. multivaricata</i><br>izotípus                     | HQ667475               | HQ630314 | HQ667391 |
| <i>Lobosporangium transversale</i>                                           | SZMC 11334L                    | NRRL 3116                              | –                                                       | HQ667488               | –        | HQ667404 |
| <i>Micromucor (Umbelopsis)</i><br><i>ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i> | SZMC 12036                     | M27                                    | –                                                       | HQ667452               | HQ630288 | –        |
| <i>Mi. (Umbelopsis) ramannianus</i>                                          | SZMC 11079                     | NRRL 1296                              | –                                                       | –                      | HQ630289 | HQ667366 |
| <i>Mortierella acrotona</i>                                                  | SZMC 11231                     | CBS 386.71                             | típus                                                   | HQ667489               | HQ630328 | HQ667405 |
| <i>M. alpina</i>                                                             | SZMC 11213                     | CBS 210.32                             | <i>M. renispora</i> autentikus<br>törzs                 | HQ667501               | HQ630345 | HQ667421 |
| <i>M. amoeboidea</i>                                                         | SZMC 11226                     | CBS 889.72                             | típus                                                   | HQ667502               | HQ630346 | HQ667422 |
| <i>M. angusta</i>                                                            | SZMC 11254                     | CBS 293.61                             | <i>M. polycephala</i> var.<br><i>angusta</i> neotípus   | HQ667443               | HQ630279 | HQ667358 |
| <i>M. antarctica</i>                                                         | SZMC 11217                     | CBS 609.70                             | típus                                                   | HQ667503               | HQ630347 | HQ667423 |
| <i>M. armillariicola</i>                                                     | SZMC 11239                     | CBS 914.73                             | típus                                                   | HQ667446               | HQ630282 | HQ667361 |
| <i>M. beljakovae</i>                                                         | SZMC 11232                     | CBS 123.72                             | típus                                                   | –                      | HQ630352 | HQ667428 |
| <i>M. biramosa</i>                                                           | SZMC 11255                     | CBS 370.95                             | <i>M. wuyishanensis</i> típus                           | HQ667473               | HQ630312 | HQ667389 |
| <i>M. camargensis</i>                                                        | SZMC 11227                     | CBS 221.58                             | típus                                                   | HQ667492               | HQ630331 | HQ667408 |
| <i>M. capitata</i>                                                           | SZMC 11256                     | CBS 648.68                             | <i>M. vesiculosa</i> típus                              | –                      | HQ847055 | HQ667418 |
| <i>M. chlamydospora</i>                                                      | SZMC 11219                     | CBS 120.34                             | <i>Azygozygum</i><br><i>chlamydosporum</i><br>szüntípus | HQ667508               | HQ630354 | HQ667430 |
| <i>M. clonocystis</i>                                                        | SZMC 11238                     | CBS 357.76                             | típus                                                   | HQ667479               | HQ630318 | HQ667395 |
| <i>M. cogitans</i>                                                           | SZMC 11237                     | CBS 879.97                             | típus                                                   | HQ667445               | HQ630281 | HQ667360 |
| <i>M. cystojenkinii</i>                                                      | SZMC 11229                     | CBS 456.71                             | típus                                                   | HQ667504               | HQ630348 | HQ667424 |
| <i>M. dichotoma</i>                                                          | SZMC 11269                     | CBS 221.35                             | szüntípus                                               | HQ667477               | HQ630316 | HQ667393 |
| <i>M. echinosphaera</i>                                                      | SZMC 11251                     | CBS 575.75                             | holotípus                                               | –                      | GU559985 | HQ667431 |
| <i>M. elongata</i>                                                           | SZMC 11308                     | FSU 822                                | –                                                       | HQ667494               | HQ630336 | HQ667412 |
| <i>M. elongata</i>                                                           | SZMC 11318                     | FSU 823                                | –                                                       | HQ667495               | HQ630337 | HQ667413 |
| <i>M. elongatula</i>                                                         | SZMC 11241                     | CBS 488.70                             | típus                                                   | HQ667505               | HQ630349 | HQ667425 |
| <i>M. epicladia</i>                                                          | SZMC 11247                     | CBS 355.76                             | típus                                                   | HQ667480               | HQ630319 | HQ667396 |
| <i>M. epigama</i>                                                            | SZMC 11210                     | CBS 489.70                             | típus                                                   | HQ667453               | HQ630290 | HQ667367 |
| <i>M. exigua</i>                                                             | SZMC 11257                     | CBS 655.68                             | típus                                                   | HQ667490               | HQ630329 | HQ667406 |
| <i>M. gamsii</i>                                                             | SZMC 11258                     | CBS 253.36                             | <i>M. spinosa</i> szüntípus                             | HQ667497               | HQ630339 | HQ667415 |
| <i>M. gamsii</i>                                                             | SZMC 11309                     | FSU 824                                | –                                                       | HQ667498               | HQ630341 | HQ667417 |
| <i>M. gamsii</i>                                                             | SZMC 11215                     | CBS 749.68                             | típus                                                   | –                      | HQ630340 | HQ667416 |
| <i>M. gamsii</i>                                                             | SZMC 11259                     | CBS 314.52                             | <i>M. spinosa</i> szüntípus                             | HQ667468               | HQ630307 | HQ667384 |
| <i>M. gemmifera</i>                                                          | SZMC 11201                     | CBS 134.45                             | típus                                                   | HQ667456               | HQ630293 | HQ667371 |
| <i>M. globulifera</i>                                                        | SZMC 11260                     | CBS 417.64                             | <i>M. ericetorum</i> típus                              | –                      | HQ847056 | HQ667370 |
| <i>M. globulifera</i>                                                        | SZMC 11209                     | CBS 858.70                             | neotípus                                                | HQ667454               | HQ630291 | HQ667368 |
| <i>M. globulifera</i>                                                        | SZMC 11329                     | FSU 826                                | –                                                       | HQ667455               | HQ630292 | HQ667369 |
| <i>M. histoplasmatoides</i>                                                  | SZMC 11338                     | CBS 321.78                             | típus                                                   | HQ667470               | HQ630309 | HQ667386 |
| <i>M. horticola</i>                                                          | SZMC 11218                     | CBS 305.52                             | szüntípus                                               | HQ667483               | HQ630322 | HQ667399 |
| <i>M. humilis</i>                                                            | SZMC 11220                     | CBS 222.35                             | szüntípus                                               | HQ667485               | HQ630325 | HQ667401 |
| <i>M. humilis</i>                                                            | SZMC 11331                     | FSU 828                                | –                                                       | HQ667486               | HQ630326 | HQ667402 |
| <i>M. humilis</i>                                                            | SZMC 11302                     | CBS 745.68                             | –                                                       | HQ667487               | HQ630327 | HQ667403 |
| <i>M. hyalina</i>                                                            | SZMC 11262                     | CBS 306.52                             | <i>M. hygrophila</i> var. <i>minuta</i><br>szüntípus    | HQ667460               | HQ630297 | HQ667376 |
| <i>M. hyalina</i>                                                            | SZMC 11261                     | CBS 115655                             | <i>Hydrophora hyalina</i><br>izotípus                   | HQ667509               | HQ630355 | HQ667432 |
| <i>M. hypsicladia</i>                                                        | SZMC 11270                     | CBS 116202                             | típus                                                   | –                      | HQ630302 | HQ667379 |
| <i>M. indohii</i>                                                            | SZMC 11297                     | FSU 830                                | –                                                       | EU736291               | HQ630299 | EU736318 |
| <i>M. indohii</i>                                                            | SZMC 11283                     | FSU 831                                | –                                                       | HQ667462               | HQ630300 | HQ667438 |
| <i>M. indohii</i>                                                            | SZMC 11253                     | CBS 720.71                             | izotípus                                                | HQ667461               | HQ630298 | HQ667377 |
| <i>M. kuhlmanni</i>                                                          | SZMC 11271                     | CBS 157.71                             | típus                                                   | HQ667457               | HQ630294 | HQ667372 |
| <i>M. lignicola</i>                                                          | SZMC 11264                     | CBS 207.37                             | <i>Haplosporangium</i><br><i>lignicola</i> típus        | HQ667511               | HQ630357 | HQ667435 |
| <i>M. lignicola</i>                                                          | SZMC 11265                     | CBS 313.52                             | <i>M. sepedonioides</i> típus                           | HQ667510               | –        | HQ667434 |
| <i>M. longicollis</i>                                                        | SZMC 11208                     | CBS 209.32                             | autentikus törzs                                        | HQ667451               | HQ630287 | HQ667365 |
| <i>M. microzygospora</i>                                                     | SZMC 21864                     | CBS 880.97                             | típus                                                   | HQ667478               | HQ630317 | HQ667394 |
| <i>M. minutissima</i>                                                        | SZMC 11305                     | FSU 832                                | –                                                       | EU736292               | HQ630324 | EU736319 |
| <i>M. minutissima</i> var. <i>dubia</i>                                      | SZMC 11235                     | CBS 307.52                             | szüntípus                                               | HQ667484               | HQ630323 | HQ667400 |

|                                                           |            |            |                                                                 |          |          |          |
|-----------------------------------------------------------|------------|------------|-----------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| <i>M. mutabilis</i>                                       | SZMC 11202 | CBS 308.52 | szüntípus                                                       | HQ667476 | HQ630315 | HQ667392 |
| <i>M. nantahalensis</i>                                   | SZMC 11222 | CBS 610.70 | típus                                                           | HQ667472 | HQ630311 | HQ667388 |
| <i>M. paraensis</i>                                       | SZMC 11272 | CBS 547.89 | típus                                                           | –        | HQ630353 | HQ667429 |
| <i>M. parazychnae</i>                                     | SZMC 11223 | CBS 868.71 | típus                                                           | HQ667447 | HQ630283 | HQ667362 |
| <i>M. parvispora</i>                                      | SZMC 11225 | CBS 311.52 | szüntípus                                                       | HQ667458 | EU484279 | HQ667373 |
| <i>M. parvispora</i>                                      | SZMC 11304 | FSU 834    | –                                                               | HQ667459 | HQ630295 | HQ667374 |
| <i>M. parvispora</i>                                      | SZMC 11313 | FSU 835    | –                                                               | –        | HQ630296 | HQ667375 |
| <i>M. polycephala</i>                                     | SZMC 11355 | CBS 456.66 | –                                                               | –        | HQ630335 | HQ667411 |
| <i>M. polycephala</i>                                     | SZMC 11298 | FSU 696    | –                                                               | HQ667493 | HQ630332 | HQ667409 |
| <i>M. polycephala</i>                                     | SZMC 11295 | FSU 866    | –                                                               | –        | HQ630333 | HQ667410 |
| <i>Mortierella polygonia</i>                              | SZMC 11203 | CBS 685.71 | típus                                                           | HQ667463 | HQ630301 | HQ667378 |
| <i>M. pulchella</i>                                       | SZMC 11339 | CBS 312.52 | autentikus törzs                                                | HQ667507 | HQ630351 | HQ667427 |
| <i>M. (Umbelopsis) ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> | SZMC 11234 | CBS 222.29 | neotípus                                                        | HQ667450 | HQ630286 | HQ667364 |
| <i>M. rishikeshi</i>                                      | SZMC 11273 | CBS 652.68 | típus                                                           | HQ667469 | HQ630308 | HQ667385 |
| <i>M. rostaftinskii</i>                                   | SZMC 11249 | CBS 522.70 | neotípus                                                        | HQ667512 | HQ630358 | HQ667436 |
| <i>M. sarnyensis</i>                                      | SZMC 11274 | CBS 122.72 | típus                                                           | HQ667474 | HQ630313 | HQ667390 |
| <i>M. schmuckeri</i>                                      | SZMC 11373 | CBS 295.59 | szüntípus                                                       | HQ667496 | HQ630338 | HQ667414 |
| <i>M. sclerotiella</i>                                    | SZMC 11214 | CBS 529.68 | típus                                                           | HQ667471 | HQ630310 | HQ667387 |
| <i>M. selenospora</i>                                     | SZMC 11204 | CBS 811.68 | típus                                                           | HQ667499 | HQ630343 | HQ667419 |
| <i>M. strangulata</i>                                     | SZMC 11267 | CBS 455.67 | neotípus                                                        | HQ667513 | HQ630359 | HQ667437 |
| <i>M. stylospora</i>                                      | SZMC 11275 | CBS 211.32 | típus                                                           | HQ667444 | HQ630280 | HQ667359 |
| <i>M. turficola</i>                                       | SZMC 11207 | CBS 432.76 | neotípus                                                        | HQ667506 | HQ630350 | HQ667426 |
| <i>M. verticillata</i>                                    | SZMC 11205 | CBS 346.66 | <i>M. marburgensis</i><br>szüntípus                             | HQ667481 | HQ630320 | HQ667397 |
| <i>M. verticillata</i>                                    | SZMC 11236 | CBS 374.95 | <i>Haplosporangium</i><br><i>attenuatissimum</i> típus          | HQ667482 | HQ630321 | HQ667398 |
| <i>M. wolfii</i>                                          | SZMC 11245 | CBS 209.69 | –                                                               | HQ667464 | HQ630303 | HQ667380 |
| <i>M. wolfii</i>                                          | SZMC 11244 | CBS 611.70 | –                                                               | HQ667467 | HQ630306 | HQ667383 |
| <i>M. wolfii</i>                                          | SZMC 11286 | CBS 612.70 | –                                                               | HQ667465 | HQ630304 | HQ667381 |
| <i>M. wolfii</i>                                          | SZMC 11243 | CBS 651.93 | –                                                               | HQ667466 | HQ630305 | HQ667382 |
| <i>M. wolfii</i>                                          | SZMC 11242 | CBS 614.70 | –                                                               | HQ667500 | HQ630344 | HQ667420 |
| <i>M. zonata</i>                                          | SZMC 11228 | CBS 228.35 | típus                                                           | –        | HQ630356 | HQ667433 |
| <i>M. zychae</i>                                          | SZMC 11212 | CBS 316.52 | típus                                                           | HQ667491 | HQ630330 | HQ667407 |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                    | SZMC 8124R | NRRL 28631 | –                                                               | AF113440 | –        | AY213626 |
| <i>Umbelopsis autotrophica</i>                            | SZMC 11276 | CBS 310.93 | <i>Mortierella ramanniana</i><br>var. <i>autotrophica</i> típus | HQ667449 | HQ630285 | HQ667363 |
| <i>U. isabellina</i>                                      | SZMC 11076 | NRRL 1757  | –                                                               | HQ667448 | HQ630284 | –        |

<sup>a</sup> Rövidítések: CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia; FSU, Fungal Reference Centre, Jéna, Németország; NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois, USA; SZMC, Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény, Szeged, Magyarország; SSU, 18S rRNS gén; ITS, magi riboszómális ITS1-5,8S rRNS gén-ITS2; LSU, 28S rRNS gén.

<sup>b</sup> A törzsek taxonómiai státusza a Mycobank adatbázisban (<http://www.mycobank.org/>) megadottak szerint került feltüntetésre.