

**ZÁRÓ SZAKMAI BESZÁMOLÓ A  
„A MORTIERELLALES REND (FUNGI, ZYGOMYCETES) ÁTFOGÓ  
FILOGENETIKAI ÉS TAXONÓMIAI REVÍZIÓJA MORFOLÓGIAI, FIZIOLÓGIAI  
ÉS MOLEKULÁRIS ELJÁRÁSOKKAL”  
CÍMŰ NEMZETKÖZI EGYÜTTMŰKÖDÉSI (NN) OTKA PÁLYÁZATHOZ**

OTKA azonosító: NN 75255

Témavezető: Dr. Vágölgyi Csaba

Kutatási időszak kezdete: 2010. 10. 01

Kutatási időszak vége: 2011. 10. 31.

**A pályázati program célja az volt, hogy átfogó, minden nemzetségre kiterjedő, mikroszkópos, fiziológiai és molekuláris (DNS szekvencia analízis) vizsgálatokkal tisztázzuk a Mortierellales renden belüli filogenetikai viszonyokat és a csoportot alkotó nemzetségek más járomspórás gombákhoz fűződő kapcsolatát.**

A munkát indokolta, hogy a Mortierellales rend tagjai a járomspórás gombák (Zygomycetes) egy igen figyelemre méltó csoportját alkotják: egyes ide tartozó, lipid akkumuláló fajok (pl. *Mortierella alpina*) biotechnológiai jelentőséggel bírnak, mint többszörösen telítetlen zsírsavak (pl. arachidonsav) ipari termelői, más fajok különböző szerves vegyületek biotranszformáló ágenseiként ismertek. E rendkívül fajgazdag, nagy fiziológiai és ökológiai diverzitást mutató fonalas gomba csoport részletes elemzése értékes információt szolgáltat a későbbi új bioaktív metabolitok és enzimaktivitások felfedezését célzó alap- és alkalmazott kutatások számára. A kutatási program megvalósítása jó kiindulási alap egy a járomspórás gombák kutatását célzó európai hálózat létrehozásához (pl. konzorciumalakítás EU keretprogram pályázataihoz). A magyar fél számára különösen előnyös, hogy a nemzetközi együttműködés révén bekapcsolódhat a nagy nemzetközi törzsgyűjteményeknél folyó munkákba.

A kutatási tervben a következő célkitűzések szerepeltek:

- **Egy a Mortierellales rend minden nemzetségét típustörzsekkel reprezentáló törzsgyűjtemény létrehozása.**
- **A Mortierellales rend filogenetikai vizsgálata és taxonómiai revíziója.**
- **Gyors és megbízható törzsidentifikálási módszerek kidolgozása.**

A támogatási időszak alatt a következő konkrét eredményeket értük el:

**1. Létrehoztunk egy egyedülálló a Mortierellales rend minden tenyészhető nemzetségét (*Dissophora*, *Gamsiella*, *Lobosporangium* és *Mortierella*) reprezentáló törzsgyűjteményt.**

A 215 izolátumból álló gyűjtemény mintegy 100 faj típustörzsét is tartalmazza. A törzseket regisztráltuk és elhelyeztük az SZTE Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményébe (SZMC, *Szeged Microbiological Collection*). A törzsek beszerzésére, illetve morfológiai és elektronmikroszkópos vizsgálatára sikeres szakmai együttműködést alakítottunk ki a *Jena Microbial Resource Collection* (JMRC; Friedrich-Schiller University, Jena, Németország; K. Voigt, K. Hoffmann) és a *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Baarn, Hollandia, Európa legnagyobb nemzetközi törzsgyűjteménye; R. Samson) munkatársaival. A Mortierellales gyűjtemény létrehozása nagymértékben hozzájárult a Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény utóbbi két évben bekövetkezett nagyarányú fejlesztéséhez, melynek eredményeként idén a gyűjtemény hivatalosan is tagja lett a Törzsgyűjtemények Nemzetközi

Szövetségének (*World Federation fo Culture Collections*, WFCC, regisztrációs szám: 987, rövidítés SZMC; [http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by\\_id/987](http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/987)).

**2. Molekuláris filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a Mortierellales renden belüli filogenetikai viszonyok és a rendnek az egyéb járomspórás gombacsoportokhoz, elsősorban a Mucorales rendhez (ezen belül is az Umbelopsidaceae családhoz) fűződő viszonyának feltárása érdekében. Ennek során elkészítettük a Mortierellales rend átfogó, több génre alapozott törzsfáját.**

A filogenetikai elemzéseket mind a magi riboszómális régió, mind egyes fehérjekódoló génszakaszok szekvencia adatai alapján nyert nagy adatsorokon végeztük. A pályázati időszak alatt, 105 izolátum esetében meghatároztuk a teljes ITS régió (ITS1 – 5,8S rRNS gén – ITS2), a 18S rRNS és a 28S rRNS gének, valamint 95 izolátum esetében a DNS függő RNS polimeráz II nagy alegység (*RPB1*) és a transzláció elongációs faktor 1-alfa (*tef*) fehérjekódoló gének egy-egy szakaszának nukleotid sorrendjét. A szekvenciákat a NCBI GenBank nemzetközi szekvencia adatbázisba elhelyeztük. Ez a munka természetesen magában foglalta a megfelelő PCR primerek tervezését, a PCR körülmények optimalizálását, a felszaporított DNS fragmentumok visszaizolálását, esetenként plazmidba klónozását, továbbá szekvenálását is. A kísérleti munka elején számos törzsszel végeztünk kísérleteket a citokróm oxidáz II. alegység gén (*coxII*) meghatározására és a filogenetikai munkákban történő felhasználására, de ez a génszakasz végül nem bizonyult alkalmasnak e gombacsoport azonosítására és a rokonsági viszonyok tanulmányozására. Mintegy 50 izolátum esetében meghatároztuk az aktin (*act*) és a nagy affinitású vas transzporter 1 (*FTR1*) gének egy szakaszát is. Ez utóbbi géneket a jelenleg is zajló a járomspórás gomba csoportok közti evolúciós viszonyok feltárását, valamint a járomspórás gombák fajképződési folyamatainak tanulmányozását célzó vizsgálatokban használtuk, illetve használjuk fel.

Elsőként a magi riboszómális szekvenciák (ITS régió, 18S rRNS és a 28S rRNS gének) alapján végeztük el a filogenetikai elemzést, melyben különösen a jelenlegi rendszerezés szerinti, morfológiai alapon definiált *Mortierella* nemzetség monofiletikus voltát vettük vizsgálat alá. Az elemzés eredménye egy 90 taxont (típus és referencia törzsek) magába foglaló, 5 nemzetségre kiterjedő, átfogó, multigén alapú törzsfá volt, amelyen 12 jól definiált kládot tudtunk elkülöníteni (**1. Ábra**). A magi riboszómális szekvenciák elemzésével kapott törzsfá nagymértékben ellentmond a hagyományos morfológiai alapú felosztásoknak (Linnemann 1941; Zycha és mtsi. 1969; Gams 1977) és azt mutatja, hogy a *Mortierella* nemzetség parafiletikus, amennyiben magába foglalja a *Dissophora*, *Gamsiella* és *Lobosporangium* nemzetségeket, ezért vagy ezeket kell egy nagy *Mortierella* nemzetségbe beolvasztani, vagy az utóbbit kell több monofiletikus csoportra osztani. A törzsfá alapján több taxon egy fajba történő összevonása is javasolható, pl. *M. verticillata* – *M. humilis*, vagy *G. multidivariata* – *M. mutabilis*. A Mortierellaceae család típusfaja, a *M. polycephala*, valamint a *M. polygonia* és a *M. indohii* fajokat korábban különböző szekciókba sorolták, míg a mi elemzésünk alapján közeli rokonoknak bizonyultak. Az is elmondható, hogy a korábbi elképzelésekkel ellentétben, a *M. longicollis* nem tartozik a Mortierellales rendbe, hanem a Mucorales rendbe tartozó gombákkal mutat közelebbi rokonságot.

Az elemzés során vizsgáltuk a különböző riboszómális régiók alkalmazhatóságát a család, illetve rend szintű filogenetika beclésében. Ennek során a riboszómális régióra 15 alternatív partíciónális stratégiát hasonlítottunk össze a Bayes faktorok alapján, ahol az egyik legnagyobb számú partíciót tartalmazó megközelítés bizonyult optimálisnak (azaz keverék

modellekkel a legkedvezőbb likelihood és fa-hossz értékeket adta). Mindez a riboszómális gének evolúciós mintázatainak az általánosan elfogadottnál nagyobb komplexitását jelzi. Az ITS1, 5,8S és az ITS2 lókuszek külön partícióként való kezelése jelentősen javította a modell alkalmazhatóságát, szemben azzal, mintha egy partícióként kezeltük volna őket. A 18S, 28S rRNS gének és az ITS régiók elemzése, azt sugallta, hogy e lókuszek nemcsak külön evolválódtak, de a lókuszekon belül is jelentős heterogenitás figyelhető meg.

A magi riboszómális gének szekvenciáin alapuló elemzés eredményeit egy nemzetközi folyóiratban megjelent közleményben:

**Petkovits et al. 2011. Data partitions, Bayesian analysis and phylogeny of the zygomycetous fungal family Mortierellaceae, inferred from nuclear ribosomal DNA sequences, PLoS One 6(11): e27507., IF: 4.411,**

valamint nemzetközi konferenciákon tettük közzé:

Nyilasi et al. 2009. Phylogenetic and physiological characterization of filamentous fungi belonging to the order Mortierellales., *Acta Microbiol Immunol Hung* 56(S), 219;

Wagner et al. 2010. Zygomycetes revisited: A phylogenetic revision of Mortierellales. *JSMC/JCB Workshop 'Microbes, Models & Methods'*, March 9-10, Jena, Germany, Abstracts;

Wagner et al. 2011. Reconstruction of the phylogeny of the Mortierellales based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer from the nuclear ribosomal DNA cluster, *JCB workshop: Nucleotides, Networks, Novelities*; Jena; Germany March 28-29 Abstracts 34.;

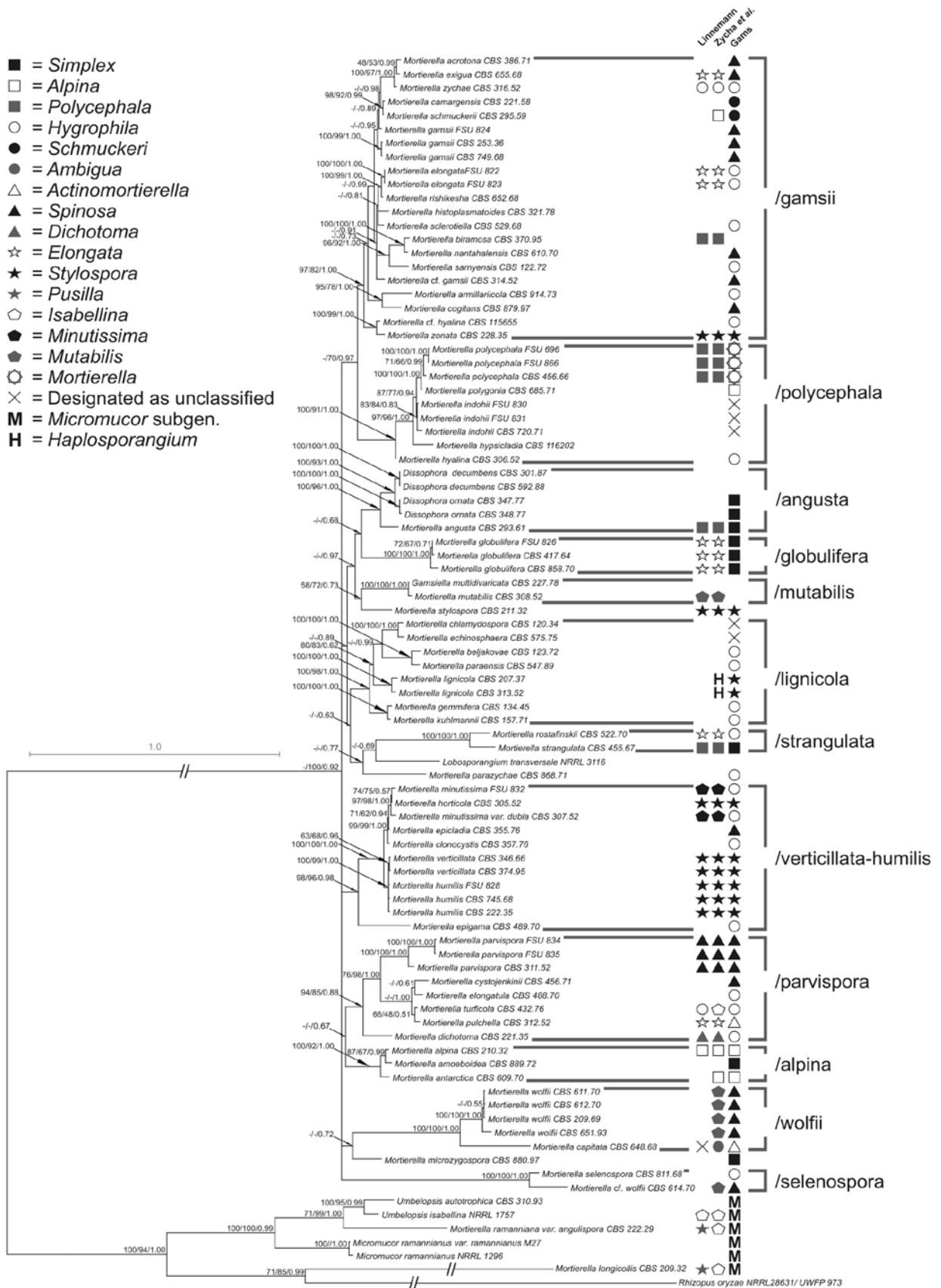
Nyilasi et al. 2011. Molecular phylogeny of Mortierellales, *Acta Microbiol Immunol Hung* 58: 196.

Mivel nagyszámú típus-, illetve referencia törzs 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 fellelhető összes *Mortierella* ITS szekvenciát és így egy közel 900 szekvenciát magába foglaló adatsorral dolgoztunk. E nagy adatsorral végzett elemzés eredményeként kapott törzsfák jelentős információkkal szolgáltak 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. Ez a téma a metagenomikai és a nagy hatékonyságú szekvenálási technikák elterjedésével a környezeti mintákból nyert szekvencia adatok interpretálása kapcsán került az érdeklődés homlokterébe. 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 szekvencia adat nem érhető el róluk, illetve azt, hogy ezen azonosíthatatlan MOTU-k mekkora aránya reprezentál valóban még le nem írt fajokat. A kérdés megválaszolásához modelleztük a típus-törzsekre vonatkozó szekvencia ismeretek növekedését és az azonosítható MOTU-k számát. Ehhez az elemzéshez, a kozmopolita *Mortierella* nemzetség, mely az egyik talajból leggyakrabban izolálható szervezet kiváló eszköznél bizonyult. A megszekvenált típus-törzsek és az azonosítható MOTU-k száma közt közel lineáris összefüggést találtunk. Az elemzés alapján meg tudtuk becsülni a *Mortierella* fajok abszolút számát és úgy találtuk, hogy az igen közel van a leírt *Mortierella* fajok számához. Eredményeink arra is következtetni engedtek, hogy a környezeti minták szekvenálása során kapott identifikálhatatlan MOTU-k nagy száma, legalábbis egyes gombacsoportokban, sokkal inkább a típus és referencia törzsekre vonatkozó szekvencia adatok elégtelen voltának tulajdonítható, mint a nagyszámú még le nem írt faj létezésének. Ezen eredményeinket a *New Phytologist* c. folyóiratban:

**Nagy et al. 2011. Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a large contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences, *New Phytol* 191: 789-794., IF: 6.516,**

és nemzetközi konferenciákon tettük közzé:

Nagy et al. 2011. How type strain sequencing affects the identifiability of environmental ITS sequences – an in silico modeling approach using *Mortierella*., *The dynamics of zygomycete research in a changing world: A workshop on Zygomycete biodiversity*; Utrecht; The Netherlands; March 3-5; Abstracts 24.



1. Ábra. A magi riboszómális szekvenciák alapján, BayesPhylogenies programmal becsült 50% többségi konszenzus filogram (az alkalmazott modell mind a hat partícióra: GTR+  $\Gamma$ ). Az ágak fölötti számok a Maximum Parszimónia (MPBS), Maximum Likelihood bootstrap (MLBS) értékeket (százalékban kifejezve), valamint a Bayes-féle poszterior valószínűségeket mutatják; a gyengén, vagy nem támogatott elágazásokat

(<50% vagy 0.5) “-” jellel jelöltük (Petkovits et al. 2011. PLoS One 6(11): e27507). Az egyes kládok mellett található szimbólumok a Mortierellales rend korábban elfogadott rendszereit kidolgozó szerzők által használt szekciókat jelzik.

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-deléciók (indelek) okozta szekvencia illesztési problémák és a fajnál magasabb rendszertani szinteken a filogenetikai feloldóképesség hiánya miatt. Elvégeztünk egy 115 ITS adatsort tartalmazó elemzést, melybe bevontuk a Mortierellales izolátumok ITS-einek illesztését is. Elemzésünkben azt találtuk, hogy mindkét probléma kiküszöbölhető a homológiák pontos illesztésével és az indeleknek a filogenetikai elemzésbe vonásával. Az indelek bevonása a filogenetikai elemzésbe szignifikánsan javította az eredményeket és növelte a feloldóképességet a törzsfák korai elágazásai mentén. Ebben a munkában teszteltük a különböző illesztési stratégiákat is. Az eredményeinket összefoglaló kéziratot közlésre benyújtottuk a *Systematic Biology* c. folyóirathoz (IF: 9.532), jelenleg bírálat alatt áll:

**Nagy et al. 2011. Re-Mind the gap! Insertion – deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the fungal internal transcribed spacer. Sys Biol, submitted.**

A magi riboszómális gének mellett, a szekvenálási munkákat kiterjesztettük több fehérjekódoló génre is. Ezek közül az *RPB1* és a *tef* szekvenciákat használtuk fel a renden belüli filogenetikai viszonyok elemzésére. A fehérjekódoló génekre alapozott filogenetikák kongruensnek bizonyultak a korábban a riboszómális régió adataiból számolt törzsfákkal. Ezért a fehérjekódoló gének és a riboszómális régió szekvenciáit egy adatsorban egyesítettük és egy ötgénes filogenetikai elemzést végeztünk számos partíciónálási és keverékmodellt tesztelve. Ebbe az elemzésbe összesen 107 törzset vontunk be; az egyesített illesztéssel a Bayes-féle MCMC analízist a MrBayes szoftverrel végeztük (Huelsenbeck és Ronquist 2001); a Markov láncokat  $10^7$  generáción futtattuk, minden századik generációt elmentve. A burn-in értékét a likelihood és a topológiai konvergencia tesztelésével határoztuk meg. A konvergenciát a likelihood értékekre a Tracer 1.4 (Rambaut és Drummond 2008), a toplógiára az AWTY (Wilgenbusch és mtsi. 2004) program segítségével teszteltük. A „poszt-burn-in” fákból 50% többségi konszenzus filogramot számoltunk (**2. Ábra**). Az elemzés megfelel a riboszómális szekvenciák alapján kapott eredményeknek és megerősíti azokat. Ugyanakkor az ötgénes elemzés során kapott törzsfá jobban feloldott a törzsfá gerince mentén és nagyobb támogatottsági értékekkel rendelkezik, mint a riboszómális szekvenciák alapján számolt fa:

Petkovits et al. 2011. A five-gene phylogeny of the Mortierellales, XVI Congress of European Mycologists (XVI CEM) Halkidiki; Greece; 19-23. September, Abstracts 217,

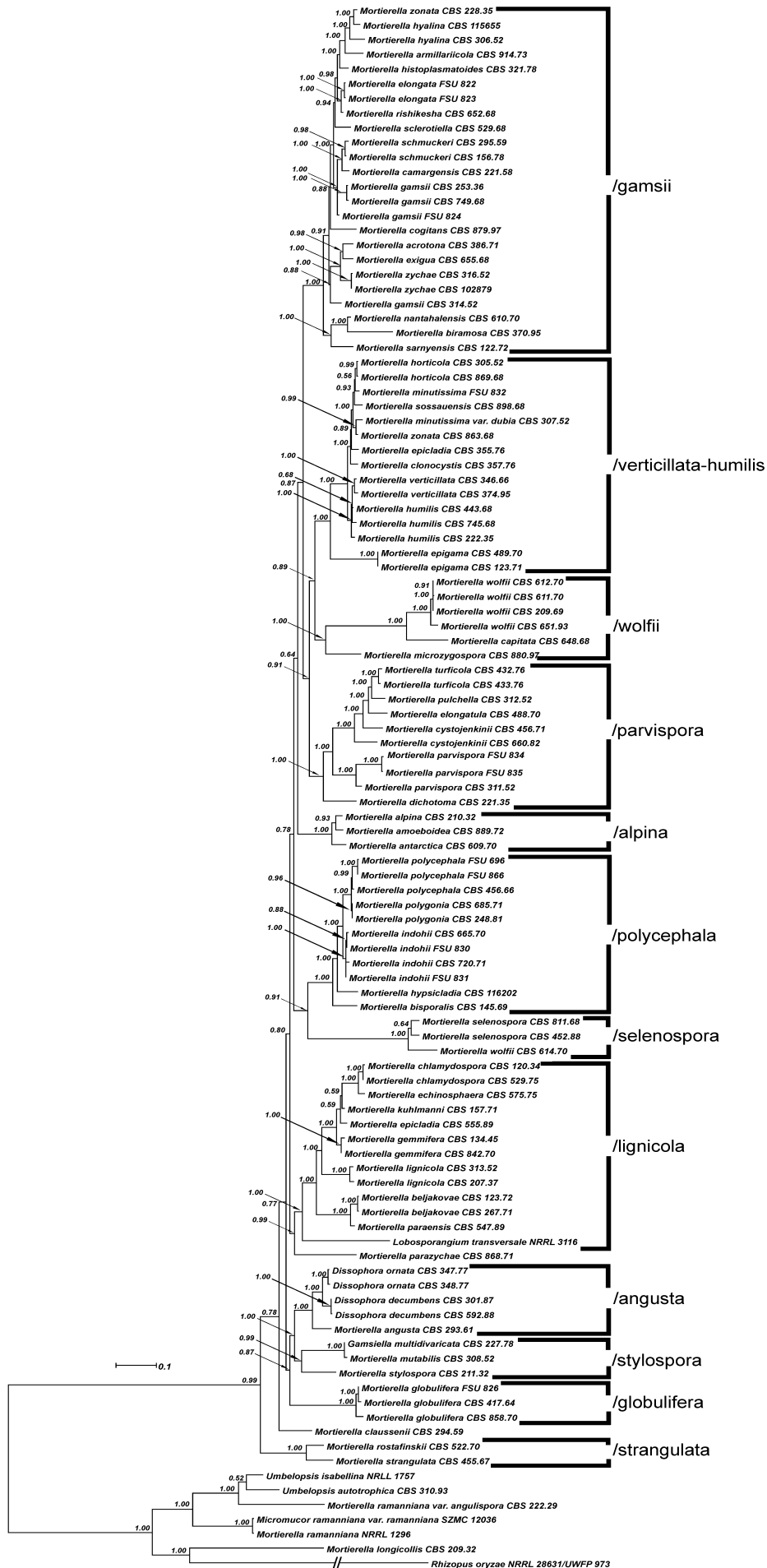
Petkovits et al. 2011. Mortierellaceae; a typical fungal group of soil samples, SOILMAP Scientific Conference, Temesvár; Romania 11-12. November Abstracts).

### **3. A molekuláris filogenetikai vizsgálatok során feltártuk egyes gyakorlati jelentőséggel bíró faj, illetve csoport filogenetikai viszonyait és megfelelő molekuláris módszert dolgoztunk ki a gyors és megbízható azonosításukra.**

Vizsgáltuk a telítetlen zsírsavak termelőjeként gazdasági jelentőséggel bíró *M. alpina* és a rokon fajok rokonsági viszonyait is. Ez alapján elmondható, hogy a korábban *M. alpina* fajba sorolt izolátumok négy fajsintű kládban különülnek el. Az azonosított fajsintű csoportokat részletesen (morfológiai, fiziológiai karakterekre vonatkozóan is) jellemeztük:

Petkovits et al. 2010. Phylogenetic analysis of the genus *Mortierella* with special emphasis on *M. alpina*., Power of Microbes, Malinska, Croatia Abstracts 117.;

Petkovits et al. 2010. Phylogenetic studies on the filamentous fungal genus *Mortierella*., 11th ISIRR, Szeged, Abstracts.



**2. Ábra.** Az ITS régió, a 18S és 28S rRNS gének, valamint a *tef* és *RPB1* szekvenciák alapján számolt 50% többségi konszenzus törzsfá. A feltüntetett értékek a poszterior valószínűségeket jelzik.

Ugyancsak részletesen jellemeztük a főleg állati patogénként ismert, termofil *M. wolfii*-t, valamint kidolgoztuk PCR alapú kimutatásának módszerét. E gomba esetében vizsgáltuk a gombaellenes szerekekkel szembeni érzékenységet is. A molekuláris alapú azonosításra vonatkozó eredményeinket egy könyvfejezetben:

**Papp et al. 2011. *Mortierella*, In: Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. Taylor and Francis, ed. Liu D, pp. 749-757.,**

valamint egy konferencia anyagban foglaltuk össze:

Papp et al. 2009. Molecular identification and phylogeny of *Mortierella wolfii*., Acta Microbiol Immunol Hung 56S, 224.

#### **4. A többgénes szekvencia adatok alapján a Mortierellales rendbe tartozó fajok molekuláris „barcoding” alapú azonosítását is kidolgoztuk.**

A szekvencia adatok elemzése alapján a törzsgyűjteményben elhelyezett törzsek és a reprezentált Mortierellales rendbe tartozó fajok molekuláris azonosítására alkalmas „barcoding” módszert dolgoztunk ki:

Hoffmann et al. 2010. A multi-locus sequence data base for molecular barcoding identification of the Mortierellales., 9th IMC, 1-6 August, Edinburgh, Scotland, Abstracts P2.108.

**Erőfeszítéseink egyik komoly elismerése volt, hogy a riboszómális RNS kódoló és az *RPB1* szekvenciákkal bekapcsolódhattunk a nemzetközi *Fungal Barcoding Consortium* munkájába is, melynek célja az volt, hogy a gombák azonosítására általánosan alkalmas referencia *barcoding* szekvenciákat azonosítson, illetve javasoljon.** Az ilyen célra használható szekvenciák tipikusan 500-700 bp hosszúak, egyetlen PCR reakcióval felszaporíthatók és konzervált régiók határolják, ami lehetővé teszi univerzális primerek alkalmazását. A referencia szekvenciák, megfelelően dokumentált és egyértelműen azonosított referencia mintákból kell, hogy származzanak, a szekvenciák mellé a szekvencia kromatogramokat is mellékelni kell. A konzorcium végül a magi riboszómális ITS (*internal transcribed spacer*) régiót javasolta univerzális DNS *barcode* markernek gombák azonosítására:

**Fungal Barcoding Consortium, Schoch et al. 2011. The nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., accepted, IF: 9.771.**

#### **5. A filogenetikai analízisek során számos a szekvencia adatok feldolgozására és elemzésére vonatkozó új technikát teszteltünk és optimalizáltunk nagy adatsorokon: pl. a szekvenciák illesztésére, a „gap”-ek figyelembe vételére, a modelltesztelésre, többféle szekvencia adatsor együttes alkalmazására, a morfológiai karakterek felhasználására és a molekuláris törzsfákra térképezésére, valamint a filogenetikai elemzésre vonatkozóan.**

A kidolgozott módszerek, az evolúciós törvényszerűségekre vonatkozó következtetések felhasználhatóak voltak más járomspórás gombák (pl. Mucorales) evolúciójával kapcsolatos általánosabb következtetések levonására, valamint más gombacsoportok filogenetikai vizsgálatait, vagy éppen molekuláris azonosításának kidolgozása során, pl.:

Hoffmann et al. 2009. Sneaking up on fungal evolution: Insights in current concepts of phylogenetic relationships of basal fungi., *Botany - Mycology* 2009. USA. Abstract ID: 92;

Nagy et al. 2009. What are phylogenetic comparative methods and what can microbiologists use them for?, *Acta Microbiol Immunol Hung* 56(S), 212;

Házi et al. 2010. *Coprinellus radicellus*, a new species with northern distribution., *Mycol Prog* 10, 363-371  
IF: 1.266;

Nagy et al. 2010. Understanding the evolutionary processes of fungal fruiting bodies: correlated evolution and divergence times in the Psathyrellaceae., *Syst Biol* 60: 303-317. IF: 9.532;

Nagy et al. 2011. *Comparative methods in fungal evolutionary biology: theory, examples and potential applications.*, In: Systematics and Evolution of Fungi, Science Publisher Enfield USA, eds. Misra JK, Tewari JP, Deshmukh SK, pp. 363-397.;

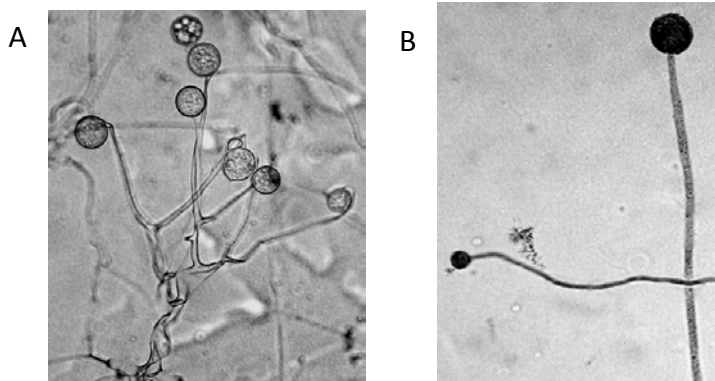
Nagy et al. 2011. Explosive diversification of autodigesting *Coprinellus* mushrooms triggered by the evolution of a new defense mechanism, *Syst Biol*, accepted, IF: 9.532.

## 6. Elvégeztük a molekuláris vizsgálatok alapján definiált (a többgénes fák kládjainak megfelelő) fajok, fajcsoportok leírását, részletes morfológiai és fiziológiai jellemzését.

Részletes fény és elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk a kládokat reprezentáló referenciatörzsekkel. Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy a *Mortierella* fajok fenotipikus jellegei erősen függenek a tenyésztési körülményektől (**3. Ábra**), ami megnehezíti az azonosítást, illetve a morfológiai karakterek filogenetikai elemzésekben való felhasználását (Petkovits et al. 2011. PLoS One 6(11): e27507).

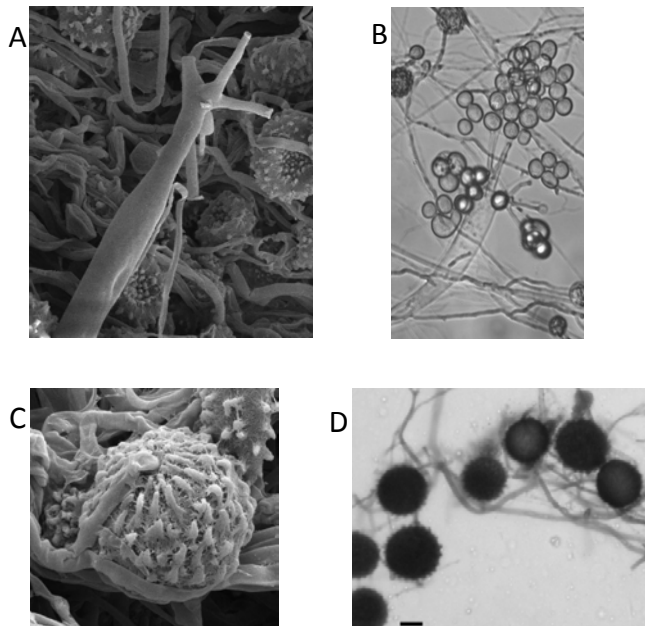
Ezért a taxonómiai leírásokhoz végzett tenyésztésnek és a morfológiai jellegek leírásának szigorúan standardizált módon kell történnie. Megállapítható, hogy a zavaró eltérések az egyes korábbi rendszerezések közt, valamint a törzsgyűjteményekbe deponált izolátumok gyakori félrehatározása az effajta standardok hiányára vezethető vissza. Ezért először ezeket a módszereket dolgoztuk ki, meghatároztuk a kládokra jellemző morfológiai markereket.

A **4-6. Ábra** a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményeire mutat néhány példát.

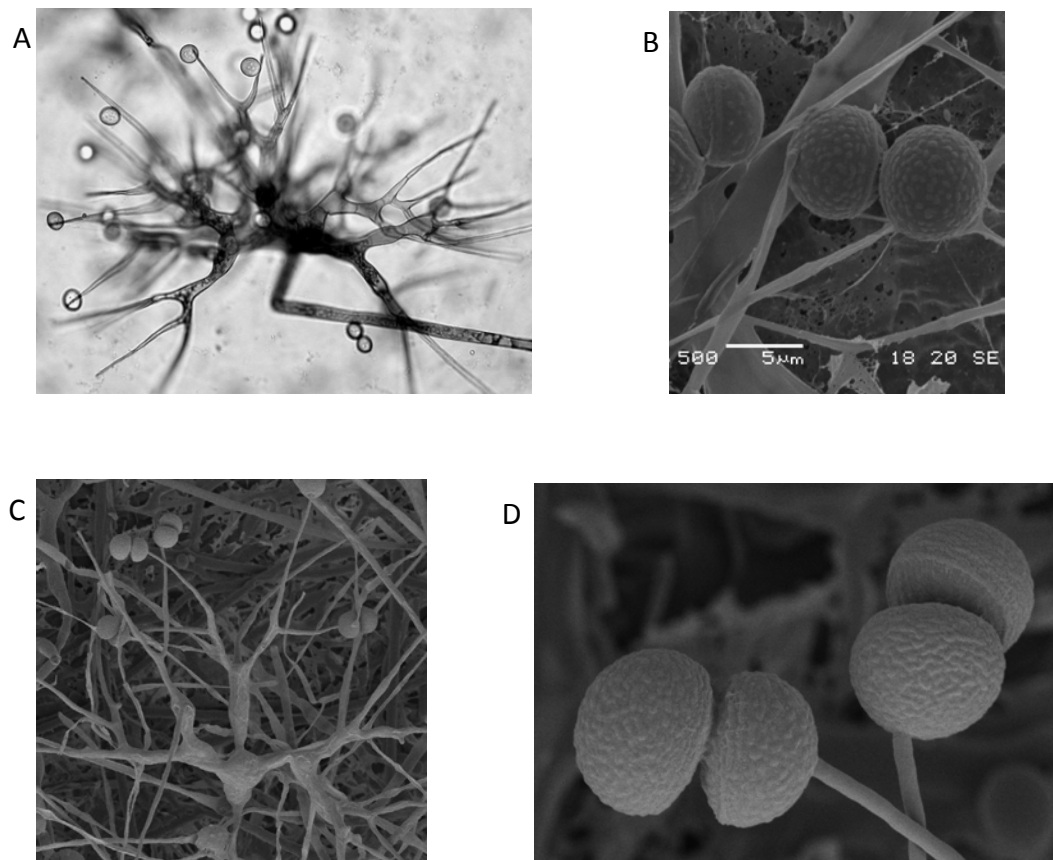


**3. Ábra.** A *M. mutabilis* sporangiumai eltérő morfológiát mutatnak zab (Oatmeal agar) (A) és malátás (Malt extract agar) táptalajon.

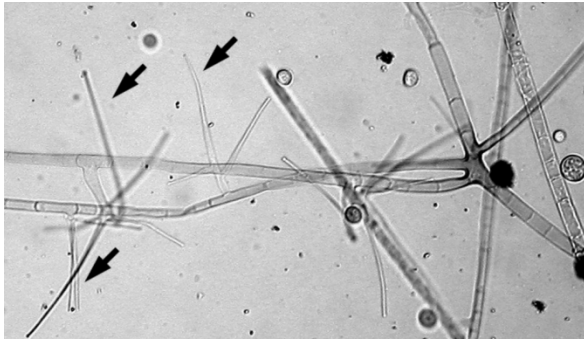




**4. Ábra.** *M. polycephala* sporangiofór scanning elektronmikroszkópos (A) és fénymikroszkópos (B), *M. polycephala* stylospóra elektronmikroszkópos (C) és *M. indohii* stylospórák fénymikroszkópos (D) képe. A *polycephala* klád tagjait korábban külön szekciókba helyezték, a molekuláris filogenetikai elemzés alapján egy jól meghatározható csoportot alkotnak. Morfológiai szempontból is jól elkülöníthetőek, mindegyikre jellemző a „tüskés” felszínű ivartalan klamidospórák, az ún. stylospórák képzése.



**5. Ábra.** A *Gamsiella multidivariata* sporangiolumainak fény- (A) és elektronmikroszkópos (B), valamint a *M. mutabilis* sporangiolumainak elektronmikroszkópos képe (C, D). A két fajt eredetileg külön nemzetségbe sorolták ugyanakkor a molekuláris vizsgálatok bizonyították közeli rokonságukat, amelyet a morfológiai vizsgálatok is igazoltak.



**6. Ábra.** A *M. verticillata* sporangifórái. A verticillata-humilis klád nyolc nagyon közeli rokonságban álló taxont foglal magába. Ezeket a fajokat a korábbi szerzők külön szekciókba sorolták. Ugyanakkor mindre jellemző a nagyon vékony, apró sporangiofórok és sporangiolumok (egy, két spórás sporangiumok) jelenléte. Vizsgálataink alapján a kládon belül a *M. verticillata* és a *M. humilis* egy fajba vonható össze.

Ezen vizsgálatok során kitűnt, hogy szükséges egyes fajok neotipizálása (pl. *M. polycephala*, vagy *M. alpina*), mások összevonása, vagy éppen felosztása. Ezt a munkát már jórészt elvégeztük jelenleg az eredmények összegzését és publikálásra előkészítését végezzük. Az eddigi eredményeket főként konferenciákon mutattuk be:

Papp et al. 2011. Phylogeny of Mortierellales based on nuclear ribosomal sequence data, *The dynamics of zygomycete research in a changing world: A workshop on Zygomycete biodiversity*; Utrecht; The Netherlands; March 3-5. Abstracts 26.;

Voigt et al. 2011. The systematics of the Mortierellales revisited (Mortierellomycotina ex Zygomycetes), *XVI Congress of European Mycologists (XVI CEM) Halkidiki*; Greece; 19-23. September Abstracts 57.,

illetve mindenképp elismerésnek tekinthető, hogy az eredmények egy része megjelenhet a CBS törzsgyűjtemény szervezésében kiadásra kerülő *Persoonia* c. folyóirat járómspórás gombák taxonómiájának szentelt különszámában; ezt a kéziratot a német partner kutatókkal közösen állítjuk össze:

**Wagner et al. 2012. Overview of the Mortierellales, Persoonia Special Issue on Zygomycetes taxonomy dedicated to Maria A.A. Schipper.**

Vizsgáltuk ezen kívül a törzsek szénforrás hasznosítási képességét, hetvenféle vegyület egyedüli szénforrásként való hasznosítását teszteltük 150 izolátum estében. Az eredményeket (a szénforrás hasznosítási adatbázist) részint az egyes csoportok, fajok jellemzésére, részint törzs/faj identifikálásra használtuk. Vizsgáltuk azt is, hogy vannak-e olyan szénforrások, melyek a filogenetikai analízisbe bevonhatók? Egyes eredmények felhasználhatók a későbbi metabolit- (pl. zsírsav) és enzimtermelő képesség vizsgálatát és/vagy módosítását célzó kutatásokban is.

Nyilasi et al. 2010. Differentiation of *Mortierella* species by carbon source utilization., *Power of Microbes in Industry and Environment*, Malinska, Croatia, September 22-25, Abstracts, 112.

Egyéb fiziológiai vizsgálatokat is végzünk, pl. megkezdjük törzsgyűjteményünk izolátumainak extracelluláris enzimtermelő képességének tesztelését (eddig mintegy 70 izolátum extracelluláris lipáz termelését vizsgáltuk), illetve az izolátumok zsírsavösszetételének, különös tekintettel a telítetlen zsírsavak termelésére, meghatározását.

Takó et al. 2009. Extracellular lipase activities in Zygomycetes., *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 250;

Takó et al. 2010. Production of extracellular lipase enzymes by Zygomycetes *Power of Microbes in Industry and Environment*, Malinska, Croatia, September 22-25, Abstracts, 131.;

Münchberg et al. 2011. Fatty acid composition and saturation in the Mortierellales (Mortierellomycotina; ex Zygomycetes), Asian Mycological Congress 7–11 August 2011 University of Incheon; Incheon; Korea.

**Összefoglalva a fentieket, elmondható, hogy a kitűzött célokat megvalósítottuk, a kutatási program eredményeként:**

**Átfogó – a Mortierellales rend nemzetségeit magába foglaló - molekuláris filogenetikai vizsgálatot végeztünk több riboszómális RNS és fehérjekódoló gén bevonásával nagy adatsorokkal. Ennek során feltártuk a Mortierellales rend rokonsági viszonyait és adatokat nyertünk egy új rendszerezés kialakításához.**

**Közel 900 szekvenciát magába foglaló ITS adatsorral végzett elemzés alapján jelentős információkat szolgáltatunk 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.**

**A *Mortierella* szekvenciákat felhasználtuk egy a gomba ITS szakaszok illeszthetőségére, feloldóképességére és alkalmazhatóságára vonatkozó elemzésben, melynek során megállapítottuk, hogy az indelek bevonása a filogenetikai elemzésbe szignifikánsan javítja az eredményeket és növeli a feloldóképességet a törzsfák korai elágazásai mentén.**

**A molekuláris filogenetikai vizsgálatok során feltártuk egyes gyakorlati jelentőséggel bíró faj, illetve csoport (pl. *M. alpina*, *M. wolfii*) filogenetikai viszonyait és megfelelő molekuláris módszert dolgoztunk ki a gyors és megbízható azonosításukra.**

**A *Mortierella* szekvenciákat felhasználtuk az általános gomba barcode kijelölését célzó elemzésben.**

**A filogenetikai analízisek során számos a szekvencia adatok feldolgozására és elemzésére vonatkozó új technikát teszteltünk és optimalizáltunk nagy adatsorokon: pl. a szekvenciák illesztésére, a „gap”-ek figyelembe vételére, a modelltesztelésre, többféle szekvencia adatsor együttes alkalmazására, a morfológiai karakterek felhasználására és a molekuláris törzsfákra térképezésére, valamint a filogenetikai elemzésre vonatkozóan.**

**Elvégeztük a molekuláris vizsgálatok alapján definiált (a többgénés fák kládjainak megfelelő) fajok, fajcsoportok leírását, részletes morfológiai (fény- és elektronmikroszkópos) és fiziológiai (szénforrás hasznosítás, enzimtermelés, zsírsavösszetétel) jellemzését, mely lehetővé teszi egy új, átfogó rendszer leírását.**

Noha a kutatási szerződésben vállalt feladatokat teljesítettük, amelyet már az eddig megjelent közlemények és konferenciaszereplések is jól tükröznek, az eredmények egy részének publikálása (elsősorban az új fajok leírása, a molekuláris elemzésekkel nyert csoportok morfológiai/fiziológiai jellemzése) még a következő évre (2012) is áthúzódik. Ezeket az eredményeket is, az eddigiekhez hasonlóan, rangos nemzetközi folyóiratokban kívánjuk publikálni.

Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy az OTKA pályázat keretében megvalósított projekt új kutatási irányok kiindulópontjául is szolgált. Ezek alapvetően két irányba haladnak, egyrészt a gombák fajképződésére vonatkozó evolúciós, másrészt a *Mortierella*-k hosszúszenlácú telítetlen zsírsavakat termelő képességének befolyásolását célzó molekuláris-genetikai kutatások irányában. Mindkét területen folyó kutatásokat szélesebb együttműködés keretében szándékozzuk folytatni. Jelen projekt sikerének köszönhető, hogy értékes kapcsolatokat sikerült kialakítani a hasonló – filogenetikai, evolúciós kutatásokkal és/vagy járomspórás gombákkal foglalkozó – területen dolgozó kutatócsoportokkal és törzsgyűjteményekkel. Ezek közül is ki kell emelni a K. Voigt által vezetett partner kutatócsoportot (F. Schiller Egyetem, Jéna, Németország), részvételünket a C. Schoch által vezetett *Fungal Barcoding Consortium* munkájában és a "Zygomycete genomics for lipid and biodiesel production" című, lipidtermelő járomspórás gombák genom szekvenálását célzó együttműködésben (S. Torres-Martinez; University of Murcia, Spanyolország). A projekt ideje alatt sikeres együttműködést alakítottunk ki az élelmiszeripari jelentőségű járomspórás gombák azonosításával, filogenetikájával és genomikájával foglalkozó G. Barbier professzor által vezetett kutatócsoporttal is (University of Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne LUBEM), melyet egy azóta elnyert Tét pályázat is segít.

A projekt megvalósításához kapcsolódóan egy M.Sc. és két B.Sc. dolgozat született, illetve egy Ph.D., egy M.Sc. és két további B.Sc. dolgozat elkészítése még folyamatban van. Jelen kutatás kiindulási alapként szolgált egy nyertes, a *Mortierellales* rendbe tartozó gombák zsírsavösszetételének elemzését és módosítási lehetőségeinek vizsgálatát célzó posztdoktori OTKA pályázathoz is (témavezető Nyilasi Ildikó; PD 101613).

## Hivatkozások

- Gams W (1977) A key to the species of *Mortierella*. *Persoonia* 9: 381-391.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Linnemann G (1941) Die Mucorineen-Gattung *Mortierella* Coemans. *Pflanzenforsch.* Jena: Verlag von Gustav Fischer. 72 p.
- Rambaut A, Drummond A (2008) Tracer v 1.4.1. Software distributed by the authors at <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Wilgenbusch JC, Warren DL, Swofford DL (2004) AWTY: a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetic inference. <http://cebcsitfsuedu/awty>.
- Zycha H, Siepmann R, Linnemann G (1969) Mucorales. Eine Beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe.

Szeged, 2011. november 29.

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba  
témavezető  
tanszékvezető egyetemi tanár