

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Bioprotekcióra alkalmas élesztőgomba izolátumok
antagonista hatásának vizsgálata és genetikai
elemzése**

Horváth Enikő

Témavezető: Gálné Dr. Miklós Ida



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Doktori Iskola

Debrecen, 2022

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Bioprotekcióra alkalmas élesztőgomba izolátumok
antagonista hatásának vizsgálata és genetikai
elemzése**

Horváth Enikő

Témavezető: Gálné Dr. Miklós Ida



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Doktori Iskola

Debrecen, 2022

1 Bevezetés

Az élesztőgombák megtalálhatóak az élő és élettelen környezetben egyaránt. Minden rendelkezésre álló életteret meghódítottak. Előfordulnak a talajban, az atmoszférában, a hidroszférában, tagjai a filloszféra mikrobiomjának, részei a szántóföldi mikrobiális közösségnek és hozzátartoznak az emberi test normál mikrobiótájához. Mindemellett fontos elemei az ember alkotta mesterséges fermentációs rendszereknek (Johnson és mtsai 2011, Buzzini és mtsai 2017).

A természetes és mesterségesen létrehozott mikrobiális közösségek tagjaiként nagy figyelem irányul a különböző mikrobiótákban betöltött szerepükre (Stratford 2006). Ez elsősorban annak köszönhető, hogy az élesztőgomba fajok és törzsek közötti kölcsönhatások befolyásolhatják a közösség populációdinamikáját. Az élelmiszerek elkészülésének folyamata során például különböző élesztőgombák szaporodnak fel vagy szorulnak ki. Ilyen láncfolyamat áll fenn a borok erjedése során, a szalámi és kolbásztermékek gyártásakor, a sajtok érlelésében, különböző kenyerek vagy a kakaó és kávébab fermentációjában. A nem megfelelő faj vagy törzs jelenléte az érési folyamatban pedig káros lehet a termék minőségére (Romano és mtsai 2006, Viljoen 2006).

Ezen túlmenően az élesztőgombáknak nem csak a mezőgazdaságban vagy az élelmiszeriparban jut szerep, egyes gombák előfordulnak az állati és emberi szervezetekben is. Fajtól és a körülményektől függően lehetnek kedvező hatásúak az emberi test számára, de akár patogénné is válhatnak (pl. *Candida* és *Cryptococcus* fajok) (Deak 2006, Cooper 2011, Johnson és mtsai 2011, Inácio és mtsai 2017). Manapság az egészségügy egyik fontos problémája, hogy bizonyos gombák túlszaporodhatnak a gyenge immunrendszerrel rendelkező betegekben vagy immunszuppresszált személyekben. Mindezt gyakran súlyosbítja, hogy az általánosan használt gombaellenes szerekkel szemben rezisztensekké válhatnak a káros gombák, s ez nagyban hozzájárul a túlélésükhöz és fertőzési képességük sikeréhez (Pelletier és mtsai 2005, Yang és mtsai 2009, Kothavade és mtsai 2010, Zuza-Alves és mtsai

2017). Ennek következtében egyre sürgetőbb új gátló szerek megtalálása ezekkel a betegségekkel összefüggő gombák ellen. Különböző kutatások irányulnak olyan bioaktív szerek megtalálására, amelyek gátolhatják e kórokozó gombák sejtosztódását vagy hifás növekedésüket (Agarwal és mtsai 2008, Pietrella és mtsai 2011). A vizsgálatok többnyire új szintetikus hatóanyagok vagy természetes szerek, mint például antimikotikus növényi olajok tesztelésére irányulnak (Agarwal és mtsai 2008, Pietrella és mtsai 2011). Emellett a gomba rezisztencia problémájának megoldására további lehetőség lehet a biokontroll képességgel rendelkező élesztőgombák vagy ezen élesztőgombák által előállított gombaellenes szerek vizsgálata és alkalmazása is. Az antagonista hatással rendelkező bioprotekcióra alkalmas élesztőgombákat alkalmazzák például mezőgazdasági károkat okozó patogénekkel szemben. Sokoldalúságuknak köszönhetően kiváló biokontroll ágens jelöltek a növényvédelemben (Loper és mtsai 2007). Az alkalmazásukkal jelentősen csökkenthető lenne környezetünk szintetikus vegyszerekkel történő terhelése is. Ugyanakkor a természetbarát biokontroll élesztőgombák elterjedését és alkalmazását nehezíti, hogy a hatékonyságukat különböző környezeti tényezők befolyásolhatják, ami antagonista teljesítményük csökkenéséhez vezet. Egy biokontroll ágensnek ugyanis képesnek kell lennie túlélni, működni és magas csíraszámban fennmaradni abban a közösségben és környezetben, melyet a mezőgazdasági kórokozók is kedvelnek. A hőmérséklet, a vízáktivitás, a pH, a növényvédő szerek/ gombaölő szerek, fém-/nehézfémionok és más antagonista mikroorganizmusok jelenléte az legfontosabb tényezők, amelyek befolyásolják a biokontrollként alkalmazni kívánt faj túlélését és működését (Kredics és mtsai 2003, Compant és mtsai 2010, Ghorbanpour és mtsai 2018).

Szerencsére a biokontroll ágensek változékonysága egy olyan probléma, ami részben leküzdhető például az élesztőgombák alkalmazásának alternatív módszerekkel történő kombinálásával, antagonista hatásukat fokozó tápanyagok alkalmazásával, különböző élesztőgombák keverékeinek használatával, a biokontroll mechanizmus

manipulálásával, fermentációs körülmények optimalizálásával. A hatékony és stressztoleráns élesztőgomba biomassa előállítása érdekében, az élesztőgomba fiziológiájának megváltoztatásával olyan készítmények kifejlesztése is elérhető, amelyek lehetővé teszik az élesztőgomba gyors alkalmazását és metabolikus aktivitásuk regenerálódását az alkalmazásuk során (Jones és Prusky 2002, Janisiewicz és mtsai 2008).

Mindezen biokontroll képességet stabilizáló és javító megoldások kifejlesztéséhez azonban alapos kutatásra van szükség. Fel kell tárnunk a mikrobák közötti kölcsönhatásokat, jellemzőiket, hiszen e kapcsolatok sokfélesége és a komplexitása még csak most kezd a felszínre kerülni (Fleet 2003b, Deak 2006, Viljoen 2006, Buzzini és mtsai 2017). Az élesztőgomba-élesztőgomba kölcsönhatások egy közösségben igen összetettek, ennek megértéséhez még több természetközeli állapotokat imitáló tanulmány szükséges.

2 Célkitűzések

Tanszékünk gyűjteménye kiváló lehetőséget nyújt a különböző élesztőgomba fajok antagonista hatásának tanulmányozására, mivel a világ minden tájáról származó izolátumokkal rendelkezünk. A törzsgyűjteményben több még leíratlan, illetve nemrégiben leírt, de kevésbé tanulmányozott élesztőgomba is megtalálható. A gyűjteménynek köszönhetően lehetőségünk nyílt olyan területekről származó izolátumokat is tanulmányozni, melyek mikroba közösségéről még viszonylag kevés információnk van. A trópusi országokból a mai napig kevés mikroorganizmus kerül nemzetközi törzsgyűjteményekbe (<http://gcm.wfcc.info/>, Robert és mtsai 2006, Wu és mtsai 2013, Groenewald és mtsai 2017).

A munkánk során célunk volt antagonista hatással rendelkező élesztőgomba izolátumok felkutatása, azok identifikálása, az izolátumok fonalas gombákkal szembeni antagonista hatásmechanizmusának tanulmányozása, valamint a gyűjteményben megtalálható, természetből izolált élesztőgombák egymásra gyakorolt hatásának vizsgálata.

3 Módszerek és kivitelezés

3.1 Taxonómiai vizsgálatok

Az asszimilációs és szaporodási tesztek során egy éjszakás, 28 °C-on YPL tápfolyadékban inkubált élesztőgomba tenyészetből desztillált vízzel szuszpenziókat készítettünk. A szuszpendált sejteket különböző szén-, és nitrogénforrást tartalmazó táptalajra helyeztük. A vizsgálathoz YNBA táptalajt használtunk fel, melyben a glükózt különböző szén- és nitrogénforrásokat alkalmaztunk.

A genomi DNS kivonása a sejtekből Hoffman és Winston (1987) leírása alapján történt. A kísérlet során a következő PCR reakcióelegyet mértük össze: 34 µl szűrt (MilliporeQ) víz; 0,6 µl MgCl₂ (25 mM); 10 µl GoTaq puffer 10x; 1 µl dNTP mix (5 mM), 1,5-1,5 µl forward és reverse primer (0,5 µM); 0,4 µl GoTaq Polymerase enzim (5 u/µl). A reakcióelegyhez 1,0 µl (100 mM) genomiális DNS-t adtunk. A reakció paraméterei: ITS1-5.8S-ITS2 PCR: 94 °C 2 p, majd 30 cikluson át: 94 °C 30 mp, 55 °C 30 mp, 72 °C 1 p; és a 30 ciklust követően: 72 °C 5 p, majd 4 °C ∞. Alkalmazott primerek: ITS1 és ITS 4 (White és mtsai 1990).

Az amplifikált ITS1-5.8S-ITS2 kódoló régió klónozásához CloneJET PCR Cloning kit-et használtuk (Thermo Scientific, #K1232). A klónozást a gyártó utasításainak megfelelően hajtottuk végre tisztított PCR termékből kiindulva.

Azt a szekvenciát használtuk fel az ITS szegmensek kereséséhez a *M. fructicola* genomban (ANFW00000000.2, NCBI Genome database), melyet több klónban is megtaláltunk (Ifrb17). Minden genomiális ITS1-5.8S-ITS2 szakaszt összehasonlítottunk egymással és a klónozott szekvenciákkal a bl2seq alkalmazással.

Az ITS1 és ITS4 (White és mtsai 1990) primereket felhasználva amplifikáltuk az ITS1-5.8S-ITS2 kódoló régiót. A szakaszok szekvencia meghatározása két irányból történt. A PCR termékek szekvencia eredményeinek kiértékeléséhez a National Center for Biotechnology Information adatbázis BLAST szolgáltatását használtuk fel. A páronkénti illesztéshez a NCBI bl2seq valamint az EMBOSS Needle programját használtuk.

A filogenetikai analízishez többszörös szekvencia illesztés szükséges, ezt a MEGA X 10.0.2. szoftver (Kumar és mtsai 2018) beépített Clustal W (Thompson és mtsai 1994) algoritmusával végeztünk el. Majd a szekvenciák végein található szekvenálási hibából adódó bizonytalan nukleotidokat a TrimAI v.1.3 program (Capella-Gutiérrez és mtsai 2009) segítségével távolítottuk el. A trimmelt szekvenciákkal dolgoztunk a hálózat elemzés során. Valamint a trimmelt szekvenciákkal újból illesztést hajtottunk végre a korábban leírt módon. Majd ezt az illesztést használtuk fel a törzsfa generálására.

A 3.1.7. pontban leírt többszörös szekvencia illesztést követően a PopART (Leigh és Bryant 2015) szoftvert alkalmazva hoztuk létre a haplotípus hálózatot. A haplotípusok közötti filogeográfiai viszonyt Median Joining alapú hálózat-építéssel tártuk fel (Bandelt és mtsai 1999).

A Maximum Likelihood filogenetikai törzsfát az IQ tree online felületét használva generáltuk a következő paraméterekkel: Szubsztitúciós modell: automatikus modellkereső. A kapott törzsfa megbízhatóságát bootstrap analízissel teszteltük (Bootstrap replikációk száma: 1000). A kapott törzsfa végleges változatát az iTOL online felületen hoztuk létre.

A MEGA X 10.0.2. szoftver (Kumar és mtsai 2018) beépített Clustal W (Thompson és mtsai 1994) algoritmusával fentebb leírt módon elvégzett többszörös illesztésektől a SplitsTree4 V4.12.8 csomaggal (Bryant és Moulton 2004) neighbor-net splits hálózatokat hoztunk létre.

A különböző aminosavakra auxotróf mutánsokat az egy éjszakán át 28 °C-on YEL tápfolyadékban előtenyésztett sejtekből UV sugárzással (Sipiczki és Ferenczy 1978) vagy N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) által hoztuk létre. A keresztezni kívánt izolátumokat komplett YPA táptalajra oltottuk hosszú csík formájában, a telep megjelenését követően két eltérő fajból származó különböző auxotrófiával rendelkező törzset, aminosavat nem tartalmazó minimál táptalajra replikáztunk oly módon, hogy azok keresztezzék egymást. Amennyiben hibridizáció történt a két különböző auxotróf

markerrel rendelkező sejtek között, a keresztezési pontban prototróf telepek jelentek meg, melyek képesek voltak előállítani a szükséges aminosavakat.

3.2 Antagonizmus vizsgálat in vitro petri-csészéken

Az élesztőgomba törzseket egy napig 28 °C-on YPL tápfolyadékban, míg a *Botrytis cinerea* fonalas gombát 1 hétig 22 °C-on YM tápfolyadékban inkubáltuk vizes rázatóban. Többféle táptalajon is elvégeztük a kísérleteket: YPA, PDA, EMMA. Az élesztőgombákból szuszpenziót ($OD_{590}=0,2$) készítettünk, melyből kivettünk 0,4 ml-t és ebből pázsitot öntöttünk a különböző táptalajt tartalmazó Petri-csészékre. A *B. cinerea* telepekből egy keveset dörzsmozsárban homogenizáltunk, majd desztillált vízzel híg szuszpenziót készítettünk. Az így kapott szuszpenzió 0,4 ml-éből szintén pázsitot öntöttünk. Száradás után az élesztőgombákból vonaltenyészetet készítettünk. Majd a *B. cinerea* fonalas gombával szembeni kísérleteinkben a petri-csészéket szobahőmérsékleten inkubáltuk hét napon keresztül. Az élesztőgomba-élesztőgomba kölcsönhatás vizsgálatakor szintén 7 napon keresztül inkubáltuk a csészéket 22 °C; 25 °C; 30 °C és 37 °C-on. A lemezek kiértékelését szemrevételezéssel végeztük, mely alapján a vizsgált élesztőgomba törzseket csoportokra osztottuk.

3.3 Metschnikowia izolátumok pulcherrimin termelésének vizsgálata

Alkalmazott tápközegek: YEA, YPA, PEA, PDA, SMA táptalajok, valamint a táptalajok kiegészítése $FeCl_3$ -oldattal oly módon, hogy a táptalajok végső $FeCl_3$ tartalma 0,005 mg/ml és 0,01 mg/ml legyen. A kísérletek során minden esetben 28 °C-on YPL folyadékban egy éjszakán át vízfürdőben inkubált előtenyészzel dolgoztunk tovább. Friss tenyészetet használva 15-15 µl élesztőgomba szuszpenziót ($OD_{590}=1,0$) juttattunk az alkalmazott táptalajok felszínére, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk a petri-csészéket.

A szénforrások hatásának tesztelésekor desztillált vízzel élesztőgomba szuszpenziókat készítettünk (1×10^6 sejt/ml). A szuszpendált sejteket különböző szénforrást tartalmazó táptalajra helyeztük, mindegyik mintából 10 µl-es cseppet pipettáztunk a táptalajokra. A vizsgálathoz SMA táptalajt használtunk fel, melyben a glükózt különböző

szénforrásokra cseréltük le. Majd megfigyeltük, hogy az élesztőgombák pigmenttermelése hogyan változik a különböző szénforrások hatására.

A pH, valamint a hőmérséklet pigmenttermelésre tett befolyását első lépésként szilárd PDA táptalajon teszteltük, melynek során a táptalajok pH-ja különböző értékekre lett állítva (pH= 5, 6, 7), 15-15 µl-t pipettáztunk a *Metschnikowia* tenyészetekből ($OD_{590}=1,0$), majd a petri-csészéket 25 °C, 30 °C és 37 °C-on inkubáltuk. A *M. andauensis*-t PDB folyadékot (kiegészítve $FeCl_3$ -oldattal (0,01 mg/ml)) tartalmazó Erlenmeyer-lombikokban tenyésztettük, melyeknek pH-ja a következő értékekre lett állítva: 4,8; 5,0; 6,0; 6,5 ill. 7,0. Az ily módon létrehozott tenyészeteket 24 °C, 25 °C, 30 °C és 37 °C-on (100 rpm) inkubáltuk három napon keresztül rázatóban. Az inkubálás során 250 µl $FeCl_3$ -oldatot (10 mg/ml) adagoltunk a tenyészetekhez a kísérlet második és harmadik napján azért, hogy a színintenzitást növeljük. A tenyészetek kémhatását naponta ellenőriztük pH papírral.

A $CuSO_4$ hatásának tesztelése során minden esetben 28 °C-on YPL folyadékban egy éjszakán át vízfürdőben inkubált tenyészzettel dolgoztunk. Friss tenyészetet használva 15-15 µl élesztőgomba szuszpenziót ($OD_{590}=1,0$) juttattunk különböző koncentrációban $CuSO_4$ -oldatot tartalmazó SMA táptalajok felszínére, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk a petri-csészéket. A $CuSO_4$ hatását $FeCl_3$ -oldat jelenlétében is megvizsgáltuk, ebben az esetben a $CuSO_4$ mellett $FeCl_3$ -oldatot is adagoltunk az SMA táptalajhoz (SMA + $CuSO_4$ 0,05 mg/ml + $FeCl_3$ 0,05 mg/ml).

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Élesztőgomba izolátumok antagonista hatásának tanulmányozása *Botrytis cinerea* fonalas gombával szemben

A törzsgyűjteményünkben megtalálható több mint 80, a világ minden tájáról származó élesztőgomba törzs antagonista hatásának tesztelését végeztük el a *postharvest* patogén *Botrytis cinerea* fonalas gombával szemben. A célunk az volt, hogy olyan élesztőgombát találjunk, mely akadályozza a fonalas gomba terjedését.

A legtöbb izolátum már a kísérlet kezdeti szakaszában sem tudta felvenni a versenyt a *B. cinerea*-val szemben. Azonban például a *Hanseniaspora thailandica* és a *Wickerhamomyces anomalus* izolátumok kis mértékben gátolták a fonalas gomba terjedését a táptalajon. A leghatékonyabbnak a pigmentet termelő *Metschnikowia* törzsek bizonyultak. Az izolátumok körül teljesen feltisztult gátló zóna alakult ki. A fajcsoport több képviselőjéről jelentették már korábban *B. cinerea* elleni antagonista hatását, mint például a *Metschnikowia pulcherrima*, *M. fructicola*, *M. andauensis* vagy a *M. sinensis* (pl. Sipiczki 2006, Karabulut és mtsai 2005, Manso és Nunes 2011, Pawlikowska és mtsai 2019). Mi megállapítottuk, hogy a vizsgált *M. ziziphicola*, *M. shanxiensis* törzsek, valamint további három pigmentet termelő *Metschnikowia* nemzetséghez tartozó izolátum is alkalmas lehet biokontrollra e fonalas gombával szemben.

4.2 Taxonómiai vizsgálatok

A bioprotekcióra alkalmas, almáról izolált pigmenttermelő *Metschnikowia* izolátumaink azonosításakor világossá vált, hogy ezeket az élesztőgombákat a hagyományos asszimilációs és szaporodási tesztekkel nem tudjuk faji szinten azonosítani a típus-törzsek közötti túl nagy hasonlóság miatt. Sipiczki és munkatársai 2013-as cikkükben pedig kimutatták, hogy a *M. andauensis* és *M. fructicola* típus-törzsek rRNS génjének nagy alegységét (26S) kódoló szakaszának D1/D2 doménje nagyon heterogén ennél fogva nem alkalmas a két faj megkülönböztetésére.

A mi eredményeink azt mutatják, hogy nem csak a cikkben említett két faj esetében mutatható ki ez a jelenség, hanem a fajcsoport több tagjára is jellemző. Tehát nem ez a megfelelő régió arra, hogy az ismeretlen izolátumainkat faji szinten azonosítsuk. És egyben azt is jelentheti, hogy a fajcsoport tagjainak elkülönítése e taxonomiai bélyeg alapján igencsak nehézkes. Figyelmünk így az ITS (Internal Transcribed Spacer) régió tanulmányozására irányult, mely DNS szakaszt a riboszómális nagy alegység mellett szintén használják a genetikai távolságok meghatározására a tömlősgombáknál (Seifert 2009, Del-Prado és mtsai 2010, Hyde és mtsai 2020).

Úgy találtuk, hogy a két fajnál a D1/D2 doménhez hasonlóan az ITS1-5.8S-ITS2 régióban is vannak kétes nukleotidok a genomból közvetlen szekvenálással kapott szekvenciákban. Azért, hogy a kétes nukleotidokból adódó problémát megoldjuk a genomból amplifikált DNS szakaszokat klónoztuk, majd egyesével meghatároztuk azok nukleotid sorrendjét. Mindegyik *M. andauensis* és a legtöbb *M. fructicola* klón egyedi szekvenciával rendelkezett. Ez a polimorfizmus nem tulajdonítható szekvenálási hibának, mivel a variábilis pozíciók nem random módon elszórtan helyezkednek el a klónokban. A *M. fructicola* típus törzséből származó klónozott szekvenciákat a nyers genom szekvenciával (Hershkovitz és mtsai 2013) összevetve további változatokat is találunk. Úgy tűnik, hogy az riboszómális RNS-t kódoló DNS egységek öt különböző helyen szétszórtan helyezkednek el a genomban, de azt meg kell jegyezni, hogy a genom (Hershkovitz és mtsai 2013) nincs teljesen összeállítva, így a riboszómális RNS-t kódoló lókuszok tényleges száma lehet akár sokkal nagyobb is.

Eredményeink azért is meglepőek, mert más részletesen tanulmányozott élesztőgomba fajoknál a riboszómális RNS-t kódoló DNS egységek nagy folyamatos tömbökbe rendeződnek és genomok közötti polimorfizmus nagyon alacsony. Ez a homogenizációnak vagy az összehangolt evolúciónak köszönhető. Az összehangolt evolúció során az rRNS egységek „horizontálisan” fejlődnek, ami azt jelenti, hogy az egyik egységben keletkezett nem káros mutációk szétterjednek az összes többi

egységben. Ennek eredményeképpen a riboszómális RNS-t kódoló DNS egységek nem egymástól függetlenül fejlődnek (pl. Ganley és Kobayashi 2007). Ez a jelenség kapcsolatban lehet azzal, hogy a sejtosztódás során, amikor a testvér kromoszómák egymásmellé rendeződnek egyenlőtlen rekombináció jöhet létre, melynek következtében riboszómális RNS-t kódoló DNS egységek cserélődhetnek ki vagy veszhetnek el (Eickbush és Eickbush 2007, Kobayashi 2008). Számítógépes modellezéssel kimutatták, hogy a homogenizáció csökkenti a mutációs terhelést (Ohta 1989). A *M. fructicola*-ban az rRNS szétszórtan helyezkedik el, így az elkülönült rövidebb ismétlődések és különálló kópiák fizikailag lehetetlenné teszik a homogenizációt.

Az *M. fructicola* típusörzs genomszekvenciájának elemzésével azt is kimutattuk, hogy e faj riboszómális RNS-t kódoló DNS-e töredezett/fragmentált, pszeudogéneket tartalmaz, és így a születés-halálozás (birth-and-death) mechanizmus által alakul, nem pedig homogenizációval, ami az élesztőgombáknál szokatlan. A gombáknál a születés-halál evolúciós mechanizmust eddig csak az 5S gének esetében tanulmányozták (Rooney és Ward 2005).

Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a *pulcherrimin* termelő fajok közötti izolációs határ nem teljes és a fajok képesek hibridizálni egymással. Ezt támasztotta alá az is, hogy a különböző *Metschnikowia* fajokból izolált auxotróf mutánsok keresztezésekor kaptunk prototróf telepeket. Azaz a fajcsoport vizsgált tagjai (*M. andauensis*, *M. fructicola*, *M. pulcherrima*, *M. sinensis*, *M. ziziphicola*, *M. shanxiensis*) képesek egymással hibridizálni, ami által lehetőség adódik az elágazott fajok (riboszómális RNS-t kódoló DNS sorozatok) újratálalkozására.

4.3 *Metschnikowia* izolátumok *pulcherrimin* termelésének vizsgálata

Az antagonista tesztekben teljesen feltisztult gátló zónát a *pulcherrimin* pigmentet termelő élesztőgombák körül figyeltünk meg, ezért e csoport tagjait választottuk ki további elemzésre. A *Metschnikowia* élesztőgombák némelyike pigmentet termel, mely által képes a postharvest patogén fonalasgombák által okozott rothadás

késleltetésére a leszüretelt gyümölcsökön. Mivel a folyamatban a *pulcherrimin* kulcsfontosságú, hiszen a pigmentet nem termelő mutánsoknak gátlóképessége megszűnik (Sipiczki 2006), munkánk során leginkább a pigment termelődését befolyásoló tenyésztési tényezők tanulmányozására fókuszáltunk.

Az élesztőgomba antagonista mikroorganizmusként való alkalmazása esetén a természetben történő túlélése szempontjából fontos, hogy milyen tápanyagokkal együtt kerül kereskedelmi forgalomba. Ez ugyanis komolyan befolyásolhatja antagonista mechanizmusának kifejeződését is (Raspor és mtsai 2010, Spadaro és mtsai 2010ab). Ezért fontos, hogy megfelelő körülményeket biztosítsunk az alkalmazott biokontroll ágensnek. A *Metschnikowia* élesztőgombák antagonista hatásmechanizmusa legfőképpen a *pulcherrimin* termelésének köszönhető. Ezért fel kell térképezni, hogy az egyes tápanyag források milyen hatással vannak a pigment képződésére.

A *M. andauensis* vizsgálatokor a különböző összetételű táptalajok közül a legintenzívebb pigment képződést komplett táptalajokon figyeltük meg, mint például a YPA, a legkisebb mértékű pirosodást pedig minimál táptalajokon tapasztaltuk. Ezért felmerült a gondolat, hogy a tápközegekben alkalmazott szén- és nitrogénforrások befolyásolhatják a pigment termelését. Mint ahogyan ezt a festékiparban nagyon fontos *Monascus purpureus* esetében is megfigyelték a kutatók. Subhasree (2011) és munkatársai a számos kipróbált szénforrás közül a maximális pigmenttermelést fruktózzal kiegészített tápközegekben érték el.

A vizsgált szénhidrát források mellett jól szaporodott a *M. andauensis*, és a legtöbb esetben eltérő mértékben ugyan, de pigmenttermelés is tapasztalható volt (pl. glükóz, fruktóz, szacharóz vagy a galaktóz). E szénhidrát források közül ki lehet emelni a szacharózt, mint potenciális adalékanyagot az antagonista élesztőgomba fitnesszének növelésére az alkalmazását megelőzően, mellyel elősegíthető a túlélése a természetben, és a leszedett gyümölcsök tárolási körülményei alatt. Ezt támasztja alá, az is, hogy Manso és Nunes (2014) a *M. andauensis* vizsgálatokor úgy tapasztalták, a

legnagyobb biomassa, a glükózzal és fruktózzal összehasonlítva, a szacharóz jelenlétében alakul ki.

Ha összevetjük ezen eredményeket a szénhidrát források *Metschnikowia* izolátumok antagonizmusára gyakorolt hatásával láthatjuk, hogy a nagy méretű gátló zóna alakult ki a szacharóz tartalmú táptalajon a tesztelt élesztőgombák körül. Ez szerencsésnek mondható, mivel a szacharóz más kereskedelemben kapható szénforráshoz hasonlítva olcsó alapanyagának számít. Ezen felül általában rendelkezésre áll, mivel gyakori élelmiszeripari melléktermék (Manso és Nunes, 2014).

A pH és hőmérséklet hatásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az alacsony pH nem kedvez az előanyag diffundálásának, míg ahogy emelkedik az érték annál kiterjedtebb a pigmentált zóna mérete. Roberts (1946) megállapította, hogy a tápközeg a pH-jának emelésével kevesebb vas-ion érhető el az élesztőgomba számára és ennek köszönhető, hogy az általuk tanulmányozott *Metschnikowia pulcherrima* kolóniák pigmentációjának intenzitása egyenes arányban csökken a tápközeg pH-jának emelkedésével, valamint fordítottan arányos a méretével. Az előanyagnak messzebbre kell vándorolnia a magasabb pH-jú táptalajban azért, hogy elegendő mennyiségű vas-ionnal találkozhasson, és a pigment kialakítása révén immobilissá váljon. A pigmentált terület és a gátló zóna határa egybeesik, tehát az élesztőgomba antagonista hatékonysága csökkenhet, ha például sérül a gyümölcs felszíne, mivel ebben az esetben alacsony pH-jú közegbe kerül.

Amennyiben az antagonista élesztőgombákat a természetben is szeretnénk alkalmazni tudnunk kell, hogy a közeg kémhatása mellett a hőmérséklet milyen hatással van a pigmenttermelésre. Megfigyeltük, hogy magasabb hőmérséklet nem kedvez az előanyag terjedésének a táptalajban. A pigmentált terület mérete a hőmérséklet emelkedésével fordítottan arányos. A magasabb hőmérséklet tehát szintén negatív hatással lehet a szóban forgó élesztőgombák antagonista hatásának kifejeződésére.

A réz és kén alapú gombaöltszereket már évszázadok óta használnak a gyümölcsök és zöltségek védelmében (Grangeteau és mtsai 2017). A réz-szulfát a fő összetevője a

Bordói lének, mely Magyarországon is engedélyezett gombaölő szer az ökológiai gazdálkodásban. A vizsgálatainkból kiderül, hogy az alkalmazott mennyiségtől függően a réz jelenléte csökkentheti, vagy akár meg is akadályozhatja a pigmentált zóna kialakulását, ezáltal in vitro semlegesítheti az élesztőgomba antagonistát hatását. A nehézfém vegyületek, ha a túlzottan nagy koncentrációban vannak jelen, morfológiai változásokat idézhetnek elő (Fomina és mtsai. 2000), a fiziológiai tulajdonságokra is hatással lehetnek, például gátolják *Geotrichum candidum* amiláz-termelését (Falihi 1998) vagy fokozzák a melanin akkumulációt egyes fonalas gombákban (Caesar-Tonthat és mtsai 1995). Éppen ezért elképzelhető, hogy a réz-ion megakadályozza az előanyag képződését vagy megzavarja a komplex képződést. Bizonyos fémionok képesek a fehérjék térszerkezetének módosítására azáltal, hogy a megfelelő kofaktor helyett kötődnek a molekulához (Lemire és mtsai 2013). Lehetséges, hogy ebben az esetben is egy ehhez hasonló mechanizmus játszódik le.

4.4 Élesztőgombák egymásra gyakorolt hatásának vizsgálata

A kísérleteink során különböző növények felszínéről gyűjtött élesztőgombák egymásra gyakorolt hatását is teszteltük. Megfigyeléseink szerint az élesztőgombák között fellépő antagonistát hatás megnyilvánulása függhet bizonyos külső környezeti tényezőktől, többek között a tápközeg összetételétől. Emellett az inkubációs hőmérséklet és a közeg pH-ja is erősen befolyásolhatja a gátló zónák megjelenését.

Az élesztőgombák közötti kölcsönhatás meglehetősen összetett folyamat, az is előfordul, hogy bizonyos fajok stimulálhatják más élesztőgombák szaporodását. Ezt alátámasztják Sipiczki adatai is, aki bizonyos fajoknál intenzívebb szaporodást figyelt meg a *Metschnikowia pulcherrima* és a *Pichia scaptomyzae* szinergista hatásának vizsgálata során a *Torulaspora delbrueckii* pázsiton (Sipiczki 2016). Meglehet, hogy bizonyos párosításokban az élesztőgombák kielégítik egymás tápanyag igényeit, de a serkentő hatás oka lehet akár az élesztőgombák autolízise is. Egy tanulmányban az n-alkánokból nyert egysejt fehérjék előállítását során élesztőgomba keverékeket alkalmaztak. A folyamatban résztvevő élesztőgombák biztosították egymás vitamin

igényét, így a vitaminokat nem volt szükséges mesterségesen a közegbe juttatni. Az élesztőgombák autolízisének tehát felbecsülhetetlen a szerepe, mivel az ilyen indirekt kölcsönhatások következtében felszabadulnak olyan aminosavak, vitaminok, melyek serkentik az élesztőgomba közösség többi tagjának szaporodását (Fleet 2001).

Az antagonistá élesztőgombákat főként gyümölcs- és zöldségfélék betakarítás utáni kórokozóival szemben vizsgálták (Wilson és mtsai 1991, Chan és Tian 2005, Heydari és Pessarakli 2010, Liu és mtsai 2013, Zhimo és mtsai 2017, Hashem és mtsai 2014), és csak kevés adat utal arra, hogy az élesztőgombák a humán betegségekhez kapcsolódó gombákat is gátolhatják (pl. Türkel és Ener 2009, Csutak és mtsai 2013, Sisti és Savini 2014, Robledo-Leal és mtsai 2018). Nem albicans *Candida* vagy más nem *Candida* fajokat, például a *Naganishia albida*-t gyakran izolálják a kórházi ellátásban részesülő páciensekből (Lee és mtsai 2004, Pelletier és mtsai 2005, Pfaller és mtsai 2008, Yang és mtsai 2009, Kothavade és mtsai 2010, Al-Sweih és mtsai 2011, Cordero-Bueso és mtsai 2014, Vivas és mtsai 2016, Nagarathnamma és mtsai 2017, Gharehbolagh és mtsai 2017, Vaezi és mtsai 2017, Zuza-Alves és mtsai 2017, Tashiro és mtsai 2018). Az egészségügyi szektor egyik fő problémája, hogy ezek a fajok gyakran ellenállnak az általánosan alkalmazott gombaellenes kezelésekkel szemben (Pelletier és mtsai 2005, Pfaller és mtsai 2008, Yang és mtsai 2009, Kothavade és mtsai 2010). Ezen gombás fertőzések következményei nagyon súlyosak lehetnek, különösen gyermekeknél, újszülötteknél vagy immunhiányos betegeknél. Így egyre sürgetőbb az új gátló szerek és lehetséges forrásaik megtalálása.

A fentiek alapján a vizsgálatunk egyik célja olyan élesztőgombák megtalálása volt, amelyek képesek gátolni a humánpatogén fajokhoz tartozó törzsek szaporodását. Típustörzseket, természetből izolált törzseket, ismert és ismeretlen antagonistá képességű fajokat egyaránt teszteltünk a klinikai szempontból fontos gombákkal szemben.

Adatainkból kiderült, hogy a humánpatogén gombákhoz tartozó törzsek valamivel toleránsabbak voltak az élesztőgombák által előállított bioaktív anyagokkal szemben,

mint a betegséggel nem összefüggő élesztőgombák (pl. *Saccharomycopsis crataegensis* és *Wickerhamomyces orientalis*). Adatainkból az is kiderült, hogy a *Kodamaea ohmeri* és a *Candida tropicalis* szaporodását a *Metschnikowia andauensis* képes gátolni, míg a *Naganishia albida* a *Wickerhamomyces anomalus* és a *Candida tropicalis* által kontrollálható.

Az antagonizmus különböző tulajdonságoknak köszönhető, mint például a tápanyagokért folyó verseny vagy a gombaellenes vegyületek kiválasztása (Liu és mtsai 2013). Az antagonista élesztőgombák által termelt enzimeknek és fehérjéknek azonban csak egy része ismert (Spadaro és Droby 2016). Nem tudjuk, hogy a vizsgált élesztőgombáink, pontosan milyen mechanizmussal voltak képesek gátolni más gomba törzseket, ezen élesztőgombák által előállított gátló anyagok azonosításához további vizsgálatokra van szükség. Azt feltételezzük, hogy a gátló törzsek többsége különböző bioaktív anyagokat képes termelni, mivel antagonista képességüket leginkább különböző kísérleti tényezők befolyásolták. Bizonyos esetekben a komplett tápközeg, míg más esetekben az alacsonyabb pH kedvez a gátlás megjelenésének. Ezek az eredmények felhívták a figyelmünket arra, hogy az antagonizmus feltételei faj- és törzs specifikusak lehetnek. Emellett a gátló zónák kialakulása erősen függ a partner mikrobától is, mely jelenség megfigyelhető a mezőgazdaságban alkalmazott mikrobiológiai biokontroll ágensek esetében is (Tian és mtsai 2018, Cekarini 2019).

A tenyésztési körülmények tanulmányozása azért volt hasznos, mert további gátló hatású törzsek felkutatásához vezethet. Az eredményeink rámutattak arra, hogy az antagonista teszteket érdemes különböző körülmények között is elvégezni, amire jó példa a *Naganishia albida* (2-1365), mellyel szemben több új antagonista hatású élesztőgombát is találtunk (pl. *Candida insectorum* 11-1193 vagy *Pichia dorogensis* 11-486).

Adataink az élesztőgombák közötti kölcsönhatások bonyolultságára is rávilágítottak, mivel a gátlás mellett szaporodási stimulációt vagy gátló- és stimulációs zónák együttes megjelenését is észrevettük.

5 Összefoglalás

A munkánk során egyik célunk antagonista hatással rendelkező élesztőgomba izolátumok felkutatása és azok identifikálása volt. A *Botrytis cinerea* postharvest patogén gombával szemben elvégzett kísérletek eredményeként elmondható, hogy több általunk tesztelt élesztőgomba is képes volt a fonalas gomba gátlására, mint például a *Hanseniaspora thailandica* és a *Wickerhamomyces anomalus* fajok képviselői. A leghatásosabbnak a pigmenttermelő *Metschnikowia* izolátumok bizonyultak, melyek körül széles, teljesen feltisztult gátló zóna alakult ki.

Ezen élesztőgombák DNS alapú azonosításakor szembesültünk azzal a problémával, hogy a genomból közvetlenül szekvenált 26S riboszómális RNS-t kódoló DNS D1/D2 régió kétes nukleotidokat tartalmaz mind a három (9/2/18, 62/1/3, 11-1062) vizsgált izolátumban. A szekvenciák NCBI adatbázisban történő homológia keresésekor világossá vált, hogy e bizonytalan nukleotidok nem teszik lehetővé az izolátumok pontos azonosítását, mivel ennek köszönhetően a három izolátum azonos mértékű egyezést mutatott a pigmenttermelő *Metschnikowia* fajcsoport több tagjával is. A többszörös szekvenciaillesztést követően kiderült, hogy a bizonytalan nukleotidok ugyanabban a pozíciókban találhatók meg a fajcsoport típustörzseiben is. A jelenséget a csoporton belül a *M. fructicola* és *M. andauensis* fajoknál korábban már leírták. Mi kimutattuk, hogy ez előfordul a fajcsoport többi tagjában is. Ezért a vizsgálatokat kiterjesztettük az ITS1-5,8S-ITS2 régióra is. Az elemzéseket a fajcsoport két tagjával, a *M. fructicola* és *M. andauensis* fajokkal kezdtük. Azt találtuk, hogy a D1/D2 doménhez hasonlóan mindkét faj ITS régiójában kétes nukleotidok találhatók, amikor a szakaszt közvetlenül a genomokból szekvenáltuk. A probléma feloldása érdekében véletlenszerűen klónoztunk az amplifikált DNS-ből, és meghatároztuk az egyes klónok szekvenciáját. Az összes *M. andauensis* és a legtöbb *M. fructicola* klón egyedi szekvenciákkal rendelkezett. A feltárt polimorfizmus nem tulajdonítható szekvenálási hibának, mivel a variábilis helyek nem véletlenszerűen szétszórtnak helyezkednek el a klónozott régiókban. A *Metschnikowia* szekvenciák

intragenomikus diverzitása a vizsgált szekvenciákban olyan nagy volt, hogy néhányuk bizonyos paralógoktól jobban különbözik, mint az egyes rendszertanilag távolabbi fajok ortológjaitól. Együtt nézve az intragenomikus D1/D2 diverzitást az ebben a tanulmányban feltárt ITS-diverzitással azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a riboszómális RNS-t kódoló DNS alapú szekvenálás nem használható a *M. andauensis* és a *M. fructicola* egymástól, és a rokon fajoktól való taxonómiai elkülönítésére. Figyelembe véve a kimutatott magas intragenomikus diverzitást, az összes korábbi törzset, melyet e fajok egyikével azonosítottak (pl. Piombo és mtsai 2018) taxonómiai szempontból újra kell vizsgálni. Ebben az összefüggésben érdemes megemlíteni, hogy mindkét faj eredeti taxonómiai leírása számos kétértelmű nukleotidot tartalmazó riboszómális RNS-t kódoló DNS szekvenciákon alapult (Kurtzman és Droby 2001, Molnar és Prillinger 2005). A magas intragenomikus diverzitás további nehézségeket okozhat környezeti minták elemzésekor, például metagenomikai analízis alkalmazásakor, mert a dolgozatban említett élesztőgombák esetén könnyen a szekvenciaadatok félreértelmezéséhez vezethet.

Az élesztőgomba mezőgazdasági kultúrákban történő alkalmazása szempontjából fontos, hogy milyen tényezők befolyásolják antagonista mechanizmusuk kifejeződését. Ezért dolgozatunk másik célja volt többet megtudni arról, hogy az élesztőgombák antagonista hatását a tenyésztési körülmények milyen mértékben befolyásolják. A *Metschnikowia* izolátumok fonalas gombákkal szembeni antagonista hatásukat az általuk termelt *pulcherrimin* pigmentnek köszönhetik. Megfigyeltük, hogy az alacsony pH, a magasabb hőmérséklet, valamint a réz-szulfát (Bordói lé összetevője) csökkenti a pigmentált zóna méretét. A tesztelt szénhidrát források közül a szacharózt érdemes kiemelni, mivel e szénforrás jelenlétében széles pigmentált zóna alakult ki a tesztelt törzsek körül. Ami szerencsésnek mondható, mivel a szacharóz gyakori élelmiszeripari melléktermék és olcsó alapanyagnak számít (Manso és Nunes, 2014).

Továbbá megállapítottuk, hogy a *M. andauensis pulcherrimin* termelését a tenyésztési közeg összetétele erősen befolyásolta. Ezek az eredmények jól egyeznek a *M. pulcherrima* esetében talált adatokkal (Roberts 1946, Sipiczki 2006, Melvydas és mtsai 2016). Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a két faj, és a *M. pulcherrima* klád több tagja is nagyon közeli rokon. Hibridizációs vizsgálataink is ezt erősítik meg. Hiszen több pigmenttermelő *Metschnikowia* fajból létrehozott auxotróf mutánsok keresztezésével sikeresen tudtunk prototróf telepeket izolálni.

Munkánk során élesztőgomba-élesztőgomba kölcsönhatásokat is vizsgáltunk. A kísérleteink rávilágítottak arra, hogy ezek a kölcsönhatások különböző típusúak lehetnek. A gátlás mellett például stimulációt is megfigyeltünk, és ezek együttes előfordulására is volt példa. Ezen kívül a megállapítottuk, hogy a humánpatogén fajokhoz tartozó törzsek sokkal toleránsabbak voltak a tesztelt élesztőgombákkal szemben, mint a betegséget nem okozó élesztőgombák. E vizsgálatok során kapott eredmények arra is rávilágítottak, hogy a *P. kudriavzevii* nehezen gátolható fajok közé tartozik. Az opportunistá humánpatogén fajok közül a *Kodamaea ohmeri* és a *Candida tropicalis* szaporodását a *Metschnikowia andauensis*, míg a *Naganishia albida* szaporodását a *Pichia anomala* vagy a *Candida tropicalis* gátolta. Továbbá kimutattuk, hogy a *M. andauensis* képes több olyan gombafaj szaporodását gátolni, amelyek izolátumai humán fertőzésekkel is kapcsolatba hozhatók. Emellett megfigyeltük, hogy a kísérleti körülmények komoly hatással lehetnek az élesztőgombák gátló képességére. A gátlás megjelenése erősen függött a táptalaj összetételétől, a pH-tól és a hőmérséklettől.

Összességében az eredményeink felhívják a figyelmet a tenyésztési körülmények antagonizmusban betöltött fontos szerepére és hozzájárulhatnak a jövőbeni vizsgálatok kísérleti körülményeinek pontos kialakításához. Az élesztőgombák ígéretes eszközei lehetnek a humánpatogén gombák elleni küzdelemnek, befolyásolhatják az antimikrobiális kezelés jövőbeni trendjeit, és új gombaellenes szerek forrásai lehetnek.

6. Tézisek

- Megállapítottuk, hogy a vizsgált *M. ziziphicola*, *M. shanxiensis* törzsek, valamint további három pigmentet termelő *Metschnikowia* nemzetséghez tartozó izolátum is alkalmas lehet biokontrollra a *Botrytis cinerea* fonalas gombával szemben.
- A bioprotekcióra alkalmas, almáról izolált pigmenttermelő *Metschnikowia* izolátumaink azonosításakor világossá vált, hogy nem csak a *M. andauensis* és *M. fructicola* típustörzsek rRNS génjének nagy alegységét (26S) kódoló szakaszának D1/D2 doménje nagyon heterogén, hanem ez a jelenség kimutatható a *Metschnikowia pulcherrima* fajcsoport több tagjában is.
- A genomon belüli magas diverzitásuknak köszönhetően a D1/D2 domén mellett az ITS régió alkalmatlan e fajok diagnosztizálására, ennél fogva a csoportba tartozó fajok/izolátumok taxonómiai helyzete felülvizsgálatra szorul.
- Az *M. fructicola* típustörzs genomszekvenciájának elemzésével azt is kimutattuk, hogy e faj riboszómális RNS-t kódoló DNS-e töredezett/fragmentált, pszeudogéneket tartalmaz, és így a születés-halálozás (birth-and-death) mechanizmus által alakul, nem pedig homogenizációval, ami az élesztőgombáknál szokatlan.
- Megállapítottuk, hogy az antagonista hatással rendelkező *M. andauensis pulcherrimin* termelését a tenyésztési közeg összetétele erősen befolyásolja. Megfigyeltük, hogy az alacsony pH, a magasabb hőmérséklet, valamint a réz-szulfát (Bordói lé összetevője) csökkenti a pigmentált zóna, ezáltal a gátló méretét.
- A kísérleteink rávilágítottak arra, hogy az élesztőgomba-élesztőgomba kölcsönhatások különböző típusúak lehetnek. A gátlás mellett például stimulációt is megfigyeltünk, és ezek együttes előfordulására is volt példa.

- Ezen kívül a megállapítottuk, hogy a növények felszínéről izolált opportunistá humánpatogén fajokhoz tartozó törzsek sokkal toleránsabbak voltak a tesztelt élesztőgombákkal szemben, mint a betegséget nem okozó élesztőgombák.
- Továbbá kimutattuk, hogy a *M. andauensis* képes több olyan gombafaj szaporodását gátolni, amelyek izolátumai humán fertőzésekkel is kapcsolatba hozhatók.

7. Köszönetnyilvánítás

Az elmúlt évek során számos embertől kaptam segítséget, az ő támogatásuk nélkül a doktori értekezésem nem készülhetett volna el.

Hálával és köszönettel tartozom témavezetőmnek Gálné Dr. Miklós Idának, hogy kitartóan segítette a munkámat, és észrevételeivel, javításaival hozzájárult a dolgozatom szakmai értékének emeléséhez.

A dolgozat jelenlegi formájában nem jöhetett volna létre Prof. Dr. Sipiczki Mátyás tanácsai, útmutatásai nélkül. Aki konzultációink, és közös munkánk során visszajelzéseivel hozzájárult tudományos szemléletmódom alakulásához.

Szeretnék köszönetet mondani minden volt kollégámnak, akik különféle módokon járultak hozzá jelen dolgozat létrejöttéhez.

Köszönöm Dr. Pfliegler Valter Péter kollégámnak, hogy emberileg és szakmailag mindvégig támogatott, és bátorított a munkám során.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak, barátaimnak azt az állandó támogatást, amit tanulmányaim során kaptam, és amiért végig bíztak bennem.

A doktori disszertáció a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal által biztosított pályázatok (FIK 20428-3/2018, TKP2020-IKA-04) és az Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Program (EFOP-3.6.1-16-2016-00022) finanszírozásában valósult meg.

Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

**Antagonistic activity and genetic analysis of yeast
isolates suitable for bioprotection**

by: Horváth Enikő

Supervisor: Gálné Dr. Miklós Ida



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2022

1 Introduction

Yeasts are found in organic and inorganic environments. They have colonized every available habitat. They are found in the soil, the atmosphere, the hydrosphere, are members of the phyllosphere microbiome, are part of the field microbial community and the normal microbiota of the human body. They are also important members of the artificial fermentation systems (Johnson et al. 2011, Buzzini et al. 2017). As members of natural and artificially created microbial communities, much attention has been focused on their role in different microbiota (Stratford 2006). This is mainly due to the fact that interactions between yeast species and strains can influence the population dynamics of the community. For example, different yeast species are multiplied or disappear during the food preparation process. A chain process occurs during the fermentation of wine, the production of salami and sausage products, the ripening of cheese, and the fermentation of various breads or cocoa and coffee beans. The presence of the inappropriate species or strain during the ripening process can be harmful to the quality of the product (Romano et al. 2006, Viljoen 2006).

In addition, yeasts play a role not only in agriculture or the food industry, some yeast also occur in animals and humans. Depending on the species and the circumstances, they can be beneficial for the human body or even pathogenic (e.g. *Candida* and *Cryptococcus* species) (Deak 2006, Cooper 2011, Johnson et al. 2011, Inácio et al. 2017). One of the important problems in health care today is that certain fungi can overgrow in patients with weak immune systems or in immunosuppressed patients. All this is aggravated by the fact that these harmful fungi can become resistant to commonly used antifungal agents, and this greatly contributes to their survival and the success of their infection ability (Pelletier et al. 2005, Yang et al. 2009, Kothavade et al. 2010, Zuza-Alves et al. 2017).

As a result, it is increasingly urgent to find new inhibitory agents against the fungi associated with these diseases. Various researches are aimed at finding bioactive

agents that can inhibit the cell division or hyphal growth of these pathogenic fungi (Agarwal et al. 2008, Pietrella et al. 2011). The studies are mostly aimed at testing new synthetic active ingredients or natural agents such as antifungal plant oils (Agarwal et al. 2008, Pietrella et al. 2011). Besides, another possibility to solve the problem of fungal resistance is application of yeasts with biocontrol capabilities or the antifungal agents they produce. Antagonistic yeasts suitable for bioprotection are used against pathogens that cause agricultural damage. Thanks to their versatility, they are excellent candidates for biocontrol agents in plant protection (Loper et al. 2007). Using them could significantly reduce the pollution on our environment with synthetic chemicals. At the same time, the distribution and use of natural biocontrol yeasts is complicated by the fact that their effectiveness can be affected by various environmental factors, which leads to a decrease in their antagonistic performance. Indeed, a biocontrol agent must be able to survive, function and maintain in high germination rates in the community and environment favored by agricultural pathogens. Temperature, water activity, pH, the presence of pesticides/fungicides, metal/heavy metal ions and other antagonistic microorganisms are the most important factors that influence the survival and function of the species to be used as a biocontrol (Kredics et al. 2003, Compant et al. 2010, Ghorbanpour et al. 2018). Fortunately, the variability of biocontrol agents is a problem that can be partially overcome, for example, by combining the use of yeasts with alternative methods, by using nutrients that increase their antagonistic effect, by using mixtures of different yeasts, by manipulating the biocontrol mechanism, and by optimizing fermentation conditions. In order to produce efficient and stress-tolerant yeast biomass, it is also possible to develop formulations that allow rapid application of yeast and recovery of their metabolic activity during application by altering the yeast physiology (Jones and Prusky 2002, Janisiewicz et al. 2008). However, extensive research is needed to develop solutions that stabilise and improve all these biocontrol capabilities. We need to explore the interactions between microbes and their characteristics, since the

diversity and complexity of these interactions are only now beginning to emerge (Fleet 2003b, Deak 2006, Viljoen 2006, Buzzini et al. 2017). Yeast-yeast interactions in a community are very complex. To understand this, we need more studies that imitating natural conditions.

2 Objectives

The strain collection of our department provides an excellent opportunity to study the antagonistic effect of different yeast species, as we have isolates from all over the world. The collection also includes several undescribed and recently described but less studied yeasts. The collection has also allowed us to study yeast isolates from areas where relatively little is known about the microbial community. To date, few microorganisms from tropical countries are included in international collections of strains (<http://gcm.wfcc.info/>, Robert et al. 2006, Wu et al. 2013, Groenewald et al. 2017).

During our work, our goal was to search for yeast isolates with antagonistic effects, to identify them, to study the mechanism of the antagonistic effect of the isolates against filamentous fungi, and examine the interactions between naturally isolated yeasts in the collection.

3 Methods and implementation

3.1 Taxonomic studies

For the assimilation and reproduction tests, suspensions were prepared from yeast cultures incubated overnight in YPL medium at 28 °C using distilled water. The suspended cells were plated on media containing different carbon and nitrogen sources. YNBA medium was used for the study, in which glucose was replaced by different carbon and nitrogen sources.

Genomic DNA was extracted from the cells as described by Hoffman and Winston (1987). The following PCR reaction mix was used in the experiment: 34 µl filtered (MilliporeQ) water; 0.6 µl MgCl₂ (25 mM); 10 µl GoTaq buffer 10x; 1 µl dNTP mix (5 mM), 1.5-1.5 µl forward and reverse primer (0.5 µM); 0.4 µl GoTaq polymerase enzyme (5 u/µl). 1.0 µl (100 mM) of genomic DNA was added to the reaction mixture. The reaction parameters were: ITS1-5.8S-ITS2 PCR: 94°C 2 p, followed by 30 cycles of 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 p; and after 30 cycles: 72°C 5 p, followed by 4°C ∞. Primers used: ITS1 and ITS 4 (White et al. 1990).

Cloning of the amplified ITS1-5.8S-ITS2 coding region was performed using the CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Scientific, #K1232). Cloning was performed according to the manufacturer's instructions starting from purified PCR product.

The sequence found in several clones (Ifrib17) were used to search for ITS segments in the *M. fructicola* genome (ANFW00000000.2, NCBI Genome database). All genomic ITS1-5.8S-ITS2 segments were compared with each other and with the cloned sequences using bl2seq.

The ITS1-5.8S-ITS2 coding region was amplified using primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990). The sequence of the sections was determined from two directions. Sequence results of PCR products were evaluated using the BLAST service of the National Center for Biotechnology Information database. For pairwise alignment, NCBI bl2seq and EMBOSS Needle were used.

Multiple sequence alignment is required for phylogenetic analysis, which is performed by MEGA X 10.0.2. software (Kumar et al. 2018) built-in Clustal W (Thompson et al. 1994) algorithm. Uncertain nucleotides resulting from sequencing errors at the ends of the sequences were then removed using the TrimAI v.1.3 program (Capella-Gutiérrez et al. 2009). The trimmed sequences were used in the network analysis. We also re-aligned the trimmed sequences as previously described. We then used this alignment to generate the phylogenetic tree.

Following the multiple sequence alignment described in Section 3.1.7, we generated the haplotype network using PopART (Leigh and Bryant 2015) software. Phylogeographic relationships between haplotypes was revealed by using Median Joining-based network construction (Bandelt et al. 1999).

The Maximum Likelihood phylogenetic tree was generated using the IQ tree online interface with the following parameters: reliability of the resulting phylogenetic tree was tested by bootstrap analysis (number of bootstrap replications: 1000). The final version of the phylogenetic tree was generated using the iTOL online interface.

From the multiple alignments performed with the Clustal W (Thompson et al. 1994) algorithm built in MEGA X 10.0.2 software (Kumar et al. 2018) as described above, we created neighbor-net split networks using the SplitsTree4 V4.12.8 package (Bryant and Moulton 2004).

Auxotrophic mutants for different amino acids were generated from cells cultured overnight at 28 °C in YEL medium by UV irradiation (Sipiczki and Ferenczy 1978) or by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). The isolates to be crossed in the form of a streak onto a complete YPA medium. After the colony formation, plates were replicated on minimal medium containing no amino acid in such a way that they crossed each other. If hybridization occurred between cells with two different auxotrophic markers, prototrophic colonies appeared at the crossing point, which were able to produce the necessary amino acids.

3.2 Antagonism test in vitro on petri dishes

Yeast strains were incubated for 1 day at 28 °C in YPL medium, while *Botrytis cinerea* were incubated for 1 week at 22 °C in YM medium in shaking water bath. The experiments were performed on different media: YPA, PDA, EMMA. And then 0.4 ml of yeast suspension ($OD_{590}=0.2$) was used to prepare a lawn for Petri dishes containing different media. A small amount of the *B. cinerea* colonies was homogenized in a pestle and mortar, then a dilute suspension was prepared with distilled water. 0.4 ml of the resulting suspension was used to prepare a lawn. After drying, a streak culture were made from the yeasts. Then, the experiments against the filamentous fungus *B. cinerea*, the petri dishes were incubated at room temperature for seven days. In the yeast-yeast interaction study, the petri dishes were also incubated for 7 days at 22°C; 25°C; 30°C and 37°C. The plates were evaluated by visual inspection, on the basis of which the tested yeast strains were divided into groups. Plates were evaluated by visual inspection, based on which the yeast strains tested were divided into groups.

3.3 Investigation of pulcherrimin production of *Metschnikowia* isolates

Media used: YEA, YPA, PEA, PDA, SMA media, as well as supplementation of these media with $FeCl_3$ solution in such way that the final $FeCl_3$ content of the media is 0.005 mg/ml and 0,01 mg/ml. In all experiments, the cultures were incubated overnight in a water bath shaker at 28 °C in YPL. Fresh cultures of yeast suspension (15-15 µl) ($OD_{590}=1.0$) was added to the surface of the media and the petri dishes were incubated at room temperature.

To test the effect of carbon sources, yeast suspensions were prepared with distilled water (1×10^6 cells/ml). The suspended cells were placed on different media containing different carbon sources, 10 µl drops of each sample were pipetted onto the media. SMA medium was used for the assay, in which the glucose was replaced by different carbon sources. We then observed how the pigment production of the yeasts changed under the influence of different carbon sources.

The influence of pH and temperature on pigment production was first tested on solid PDA media by adjusting the pH of the media to different values (pH= 5, 6, 7), 15-15 µl of *Metschnikowia* cultures ($OD_{590}= 1.0$) were pipetted to the petri dishes and the cultures were incubated at 25 °C, 30 °C and 37 °C.

M. andauensis were cultured in Erlenmeyer flasks containing PDB liquid (supplemented with $FeCl_3$ solution (0.01 mg/ml)), pH adjusted to 4,8; 5,0; 6,0; 6,5 and 7,0, respectively. During the incubation, 250 µl of $FeCl_3$ solution (10 mg/ml) was added to the cultures on the second and third day of the experiment to increase the colour intensity. The pH of the cultures was checked daily with pH test strip.

In all cases, the effect of $CuSO_4$ was tested with overnight incubated cultures in a water bath shaker at 28 °C in YPL. 15-15 µl of yeast suspension ($OD_{590}=1.0$) was applied to the surface of SMA medium containing $CuSO_4$ solution in different concentrations, and then the Petri dishes were incubated at room temperature. The effect of $CuSO_4$ was also examined in the presence of $FeCl_3$ solution, in this case, in addition to $CuSO_4$, $FeCl_3$ solution was also added to the SMA medium (SMA + $CuSO_4$ 0.05 mg/ml + $FeCl_3$ 0.05 mg/ml).

4. Results and interpretation

4.1 Study of the antagonistic effect of yeast isolates against the filamentous fungi *Botrytis cinerea*

We have tested the antagonistic activity of more than 80 yeast strains from all over the world found in our strain collection against the postharvest pathogenic filamentous fungi *Botrytis cinerea*. Our aim was to find a yeast strain that inhibits the growth of the filamentous fungi.

Most isolates were not able to compete with *B. cinerea* even in the initial phase of the experiment. However, for example, *Hanseniaspora thailandica* and *Wickerhamomyces anomalus* isolates slightly inhibited the spread of the filamentous fungi on the medium. The most effective isolates were the pigment-producing *Metschnikowia* strains. A fully cleared inhibitory zone was formed around the isolates. Antagonistic effects against *B. cinerea* have already been reported for several members of the species group, such as *Metschnikowia pulcherrima*, *M. fructicola*, *M. andauensis* or *M. sinensis* (e.g. Sipiczki 2006, Karabulut et al. 2005, Manso and Nunes 2011, Pawlikowska and et al. 2019). We found that the tested strains of *M. ziziphicola*, *M. shanxiensis*, and three additional pigment-producing isolates belonging to the genus *Metschnikowia* may also be suitable for biocontrol against the filamentous fungi.

4.2 Taxonomic studies

During the identification of our pigment-producing *Metschnikowia* isolates from apple, it became clear that we cannot identify these yeasts at the species level with traditional assimilation and reproduction tests due to the great similarity between the type strains. Sipiczki et al. (2013) showed that the D1/D2 domain of the large subunit (26S) coding region of the rRNA gene of the *M. andauensis* and *M. fructicola* type strains is highly heterogeneous and therefore not suitable for distinguishing the two species.

Our results show that this phenomenon is not only present in the two species mentioned in the article, but also in several members of the species group. Therefore, this region is not suitable for species-level identification of our unknown isolates. And it can also mean that it is very difficult to separate the members of the species group based on this region. Our attention has thus been focused on the study of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region, a DNA segment that is also used to determine genetic distances in *Ascomycetes* alongside the ribosomal large subunit (Seifert 2009, Del-Prado et al. 2010, Hyde et al. 2020).

We found that, similar to the D1/D2 domain, the ITS1-5.8S-ITS2 region in both species also contains ambiguous nucleotides in sequences obtained by direct sequencing from the genome. In order to solve the problem of ambiguous nucleotides, we cloned the DNA sequences amplified from the genome and then their nucleotide sequences were determined one by one. Each *M. andauensis* and most *M. fructicola* clones had unique sequences. This polymorphism cannot be attributed to sequencing error, since the variable positions are not randomly scattered in the clones. Comparing the cloned sequences from the *M. fructicola* type strain with the genome sequence (Hershkovitz et al. 2013), we found additional variants. The DNA units encoding ribosomal RNA appear to be scattered across the genome at five different locations, but it should be noted that the genome (Hershkovitz et al. 2013) is not fully assembled, so the actual number of loci encoding ribosomal RNA it can even be much higher.

Our results are also surprising because in other yeast species that have been studied in detail, the DNA units encoding ribosomal RNA are arranged in large continuous arrays and polymorphism between genomes is very low. This is due to homogenization or concerted evolution. In concerted evolution, rRNA units evolve “horizontally,” meaning that non-harmful mutations in one unit spread to all other units. As a result, the DNA units encoding ribosomal RNA do not evolve independently of each other (e.g. Ganley and Kobayashi 2007). This phenomenon

may be related to the fact that during cell division, when sister chromosomes are arranged next to each other, unequal recombination may occur, as a result of which DNA units encoding ribosomal RNA may be rearranged or lost (Eickbush and Eickbush 2007, Kobayashi 2008). Computer modelling has shown that homogenization reduces mutational load (Ohta 1989). In *M. fructicola*, rRNA organization is fragmented, so that isolated shorter tandems and separate copies make homogenization physically impossible. Genome sequence analysis of the *M. fructicola* strain also showed that the DNA encoding ribosomal RNA in this species is fragmented, contains pseudogenes, and thus evolves by a birth-and-death mechanism rather than by homogenization, which is unusual in yeasts. In fungi, the birth-death evolutionary mechanism has so far only been studied for 5S genes (Rooney and Ward 2005).

These results raise the possibility that the isolation boundary between pulcherrimin-producing species is not complete and that the species are able to hybridise with each other. This was also supported by the fact that prototrophic colonies were obtained when crossing auxotrophic mutants isolated from different *Metschnikowia* species. In other words, the members of the species group studied (*M. andauensis*, *M. fructicola*, *M. pulcherrima*, *M. sinensis*, *M. ziziphicola*, *M. shanxiensis*) are able to hybridize with each other, which makes it possible for the separated species (DNA sequences encoding ribosomal RNA) to reconnect.

4.3 Investigation of pulcherrimin production of *Metschnikowia* isolates

In the antagonistic tests, we observed a completely cleared inhibitory zone around the yeasts producing the *pulcherrimin* pigment, so that members of this group were selected for further analysis. Some of the *Metschnikowia* yeasts produce a pigment that is able to delay the rot caused by postharvest pathogenic filamentous fungi on harvested fruits. In our work, we have mainly focused on the study of culture factors affecting pigment production, because *pulcherrimin* is a key factor in the process, as mutants that do not produce pigment lose their inhibitory ability (Sipiczki 2006).

When yeast is used as an antagonistic micro-organism, it is important to know what nutrients it is commercialised with, as it needs to survive in nature. This may have a major impact on the expression of its antagonistic mechanism (Raspor et al. 2010, Spadaro et al. 2010ab). Therefore, it is important to provide suitable conditions for the applied biocontrol agent. The antagonistic mechanism of the *Metschnikowia* yeast is mainly due to the production of *pulcherrimin*. Therefore, it is necessary to explore the effect of individual nutrient sources on pigment formation.

When examining *M. andauensis*, we observed the most intense pigment formation on complete media, such as YPA, and the palest was observed on minimal media. Therefore, we thought that the carbon and nitrogen sources used in the culture media may influence pigment production. As was observed in *Monascus purpureus*, which is very important microorganism in the paint industry. Subhasree (2011) and colleagues achieved the maximum pigment production in medium supplemented with fructose among the many tested carbon sources. *M. andauensis* utilized the tested carbohydrates well, in most cases pigment production was also observed (e.g. glucose, fructose, sucrose or galactose), although to varying degrees. Among these carbohydrate sources, sucrose can be highlighted as a potential additive to increase the fitness of the antagonistic yeast before its which can help its survival in nature and under the storage conditions of the harvested fruits. This is also supported by the fact that Manso and Nunes (2014) observed, when studying *M. andauensis*, found that the highest biomass, compared to glucose and fructose, is produced in the presence of sucrose.

If we compare these results with the effect of carbohydrate sources on the antagonism of *Metschnikowia* isolates, we can see that a large inhibitory zone was formed on the medium containing sucrose around the tested yeasts. This is fortunate, as sucrose is a cheap raw material compared to other commercially available carbon sources. Moreover, it is generally available as it is a common by-product of the food industry (Manso and Nunes, 2014).

When examining the effect of pH and temperature, we found that low pH does not favour the diffusion of the precursor, while as the pH increases the size of the pigmented zone becomes more extensive. Roberts (1946) found that less ferrous ions are available for the yeast as the pH of the culture medium was increased, and this was the reason why the intensity of pigmentation of the studied *Metschnikowia pulcherrima* colonies decreased in direct proportion to the increase in pH of the medium. In order to encounter sufficient amounts of ferrous ions, the precursor must migrate further in the higher pH medium and become immobile through pigment formation. The border of the pigmented area and the inhibitory zone are the same, the antagonistic effect of the yeast may decrease if the surface of the fruit is damaged, because in this case it is exposed to a low pH medium. If we want to use antagonistic yeasts in nature, we need to know how temperature affects pigment production. We observed that a higher temperature does not favor the spread of the precursor in the culture medium. The size of the pigmented area is inversely proportional to the increase in temperature. Therefore, higher temperatures may also have a negative effect on the expression of the antagonistic effect of these yeasts.

Fungicides based on copper and sulphur have been used for centuries to protect weeds and vegetables (Grangeteau et al. 2017). Copper sulfate is the main component of Bordeaux mixture, which is also an approved fungicide in organic farming in Hungary. Our studies show that, depending on the amount applied, the presence of copper can reduce or even prevent the formation of the pigmented zone, thereby neutralizing the antagonistic effect of yeast in vitro. Heavy metal compounds, when present in excessively high concentrations, can induce morphological changes (Fomina et al. 2000), and can also affect physiological properties, for example inhibiting the amylase production of *Geotrichum candidum* (Falih 1998) or increasing melanin accumulation in some filamentous fungi. (Caesar-Tonthat et al. 1995). Therefore, it is conceivable that the copper ion prevents the formation of the precursor or interferes with the complex formation. Certain metal ions are able to modify the

spatial structure of proteins by binding to the molecule instead of the corresponding cofactor (Lemire et al. 2013). It is possible that a similar mechanism is at play in this case as well.

4.4 Investigating the interaction of yeasts

In our experiments we also tested the interaction of yeasts collected from the surface of different plants. According to our observations, the manifestation of the antagonistic effect between yeasts may depend on certain external environmental factors, including the composition of the culture medium. In addition, the incubation temperature and the pH of the medium can strongly influence the appearance of inhibitory zones.

The interaction between yeasts is a complex mechanism, and some species may stimulate the growth of other yeasts. This is supported by the data of Sipiczki, who observed more intensive reproduction of certain species when studying the synergistic effect of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia scaptomyzae* on *Torulaspora delbrueckii* lawns (Sipiczki 2016). It is possible that in certain combinations yeasts may provide each other's nutritional needs, but the stimulatory effect may also be due to yeast autolysis. In one study, yeast mixtures were used to produce single-cell proteins from n-alkanes. The yeasts involved in the process provided each other with the vitamins they needed, so that it was not necessary to artificially add vitamins into the medium. Thus, the role of yeast autolysis is invaluable, as such indirect interactions release amino acids and vitamins that stimulate the reproduction of other members of the yeast community (Fleet 2001).

Antagonistic yeasts have been studied mainly against post-harvest pathogens of fruits and vegetables (Wilson et al. 1991, Chan and Tian 2005, Heydari and Pessarakli 2010, Liu et al. 2013, Zhimo et al. 2017, Hashem et al. 2014), and there is little evidence that yeasts can inhibit fungi associated with human diseases (e.g. Türkel and Ener 2009, Csutak et al. 2013, Sisti and Savini 2014, Robledo-Leal et al. 2018). Non-albicans *Candida* or other non-*Candida* species, such as *Naganishia albida*, are frequently

isolated from hospitalized patients (Lee et al. 2004, Pelletier et al. 2005, Pfaller et al. 2008, Yang et al. 2009, Kothavade et al 2010, Al-Sweih et al 2011, Cordero-Bueso et al 2014, Vivas et al 2016, Nagarathnamma et al 2017, Gharehbolagh et al 2017, Vaezi et al 2017, Zuza-Alves et al 2017, Tashiro et al 2018). A major problem in the healthcare sector is that these species are often resistant to commonly used antifungal treatments (Pelletier et al. 2005, Pfaller et al. 2008, Yang et al. 2009, Kothavade et al. 2010). The consequences of these fungal infections can be very serious, especially in children, neonates or immunocompromised patients. Thus, there is an increasing urgency to find new inhibitory agents and their potential sources.

Based on the above, one of the goals of our study was to find yeasts that are able to inhibit the reproduction of strains belonging to human pathogenic species. We tested both type strains, strains isolated from nature, and species with known and unknown antagonistic abilities against clinically important fungi.

Our data showed that strains belonging to human pathogenic fungi were slightly more tolerant to bioactive substances produced by yeasts than non-disease-associated yeasts (e.g. *Saccharomycopsis crataegensis* and *Wickerhamomyces orientalis*). Our data also revealed that the reproduction of *Kodamaea ohmeri* and *Candida tropicalis* can be inhibited by *Metschnikowia andauensis*, while *Naganishia albida* can be controlled by *Wickerhamomyces anomalus* and *Candida tropicalis*.

Antagonism is due to various properties, such as competition for nutrients or secretion of antifungal compounds (Liu et al. 2013). However, only some of the enzymes and proteins produced by antagonistic yeasts are known (Spadaro and Droby 2016). We do not know the exact mechanism by which the yeasts we studied were able to inhibit other fungal strains, further studies are needed to identify the inhibitory substances produced by these yeasts. It is hypothesised that most of the inhibitory strains can produce different bioactive compounds, as their antagonistic ability was mostly influenced by different experimental factors. In some cases, the complete nutrient medium, while in other cases, the lower pH favors the appearance of inhibition. These

results have drawn our attention to the fact that antagonism conditions can be species- and strain-specific. In addition, the formation of inhibitory zones strongly depends on the partner microbes, a phenomenon also observed for microbial biocontrol agents used in agriculture (Tian et al. 2018, Cecarini 2019).

Studying the culture conditions was useful because it could lead to the search for additional strains with inhibitory effects. Our results have shown that antagonist assays should be performed under different conditions, an example is *Naganishia albida* (2-1365), against which several new yeasts with antagonistic activity have been found (e.g. *Candida insectorum* 11-1193 or *Pichia dorogensis* 11-486).

Our data also shed light on the complexity of the interactions between yeasts, as in addition to inhibition, we also noticed the stimulation of reproduction or the simultaneous appearance of inhibitory and stimulatory zones.

5 Summary

One of our goals during our work was to search for and identify yeasts with antagonistic against the postharvest pathogen *Botrytis cinerea* effects. As a result of our experiments it can be said that several tested yeasts were able to inhibit the filamentous fungi, such as some isolates of *Hanseniaspora thailandica* and *Wickerhamomyces anomalus* species. The most effective yeasts were the pigment-producing *Metschnikowia* isolates with a wide clear inhibitory zone around them. The DNA-based identification of the three pigment-producing *Metschnikowia* isolates (9/2/18, 62/1/3, 11-1062) revealed the problem that the 26S ribosomal RNA coding DNA D1/D2 region, which was directly sequenced from the genome, contained ambiguous nucleotides in all three strains (9/2/18, 62/1/3, 11-1062). When searching for homology in the NCBI database, it became clear that these nucleotides did not allow accurate identification of these isolates, as the three isolates showed similar match with several members of the pigment-producing *Metschnikowia* species group. After multiple sequence alignments, it was found that the ambiguous nucleotides can

be found in the same positions as in the type strains of the species group. The phenomenon was already described within the group for *M. fructicola* and *M. andauensis* species. We have shown that this also occurs in other members of the group. Therefore, the investigation were extended to the ITS1-5,8S-ITS2 region. Analyses were started with two members of the species group, *M. fructicola* and *M. andauensis*. We found that, like the D1/D2 domain, the ITS region of both species contained ambiguous nucleotides when the region was sequenced directly from the genomes. To resolve this problem, we randomly cloned sequences from the amplified DNA preparation and determined the sequence of each clone. All *M. andauensis* and most *M. fructicola* clones had unique sequences. The revealed polymorphism cannot be attributed to a sequencing error because the variable sites are not randomly distributed in the cloned regions. The intragenomic diversity of *Metschnikowia* sequences was so big that some of them differed more from certain paralogs than from orthologs in certain taxonomically more distant species.

Taking together the intragenomic D1/D2 diversity and the ITS diversity revealed in this study, it can be concluded that rDNA-based sequencing cannot be used for the taxonomic separation of *M. andauensis* and *M. fructicola*, neither from each other nor from other related species.

In view of the detected high intragenomic diversity, all strains which were identified with one of these species (e.g. Piombo et al. 2018), should be taxonomically re-examined. In this context, it is worth mentioning that the original taxonomic description of both species was based on rDNA sequences containing several ambiguous nucleotides (Kurtzman and Droby 2001, Molnar and Prillinger 2005).

High intragenomic diversity can cause additional difficulties when yeast communities techniques (e.g., metagenomic analysis) are applied to the investigation of environmental samples, it can easily lead to misinterpretation of sequence data.

In terms of application of yeast in the fields, it is important what are the factors that influence the expression of their antagonist mechanism. Therefore, another goal of our

research was to expand our knowledge on how culture conditions affect the antagonistic effect of yeasts.

The antagonistic effect of the *Metschnikowia* isolates against filamentous fungi can be attributed to the *pulcherrimin* pigment. We observed that low pH, higher temperature, and copper sulfate (a component of the fungicide Bordeaux mixture) reduce the size of the pigmented zone.

Among the tested carbohydrate sources, sucrose is worth highlighting, as a wide pigmented zone was formed around the tested strains in the presence of this carbon source. Which is a considerable result, as sucrose is a common low cost food industry by-product (Manso and Nunes 2014). It was found that the production and extent of the *pulcherrimin* diffusion zone was strongly influenced by the composition of the medium. These data are in good agreement with what has been found for *M. pulcherrima* (Roberts 1946, Sipiczki 2006, Melvydas et al. 2016). This is probably due to the fact that the two species and several other members of the *M. pulcherrima* clade are also very close relatives. Our hybridization studies confirm this as well. After all, we were able to successfully isolate prototrophic colonies by crossing auxotrophic mutants generated from several pigment-producing *Metschnikowia* species.

We also examined the effect of yeasts isolated from nature on each other. Our data also shed some light on the complexity and diversity of the interactions between yeasts. Growth stimulation or co-appearance of inhibitory- and stimulation zones were also noticed aside from inhibition. Our screening revealed that the strains belonging to human pathogenic species were much more tolerant to the yeast-produced bioactive agents than the non-disease-associated yeasts. The results of these studies also revealed that *P. kudriavzevii* is a species that is difficult to inhibit. Among the opportunistic human pathogenic species, the growth of *Kodamaea ohmeri* and *Candida tropicalis* was inhibited by *Metschnikowia andauensis*, while the growth of *Naganishia albida* was inhibited by *Pichia anomala* or *Candida tropicalis*.

Furthermore, we have shown that *M. andauensis* is able to inhibit the growth of several fungal species whose isolates can also be associated with human infections.

In addition, our results proved that the experimental circumstances can have a serious/substantial impact on the inhibitory capacity of the yeasts. The appearance of inhibition strongly depended on the media, pH and temperature.

Our data revealed an important role of the culturing factors on inhibition and they can contribute to the precise development of experimental conditions of future studies.

Yeasts can be promising means of the fight against pathogenic fungi, can influence future trends of the antimicrobial treatment and they can be the new sources of antifungal agents.

6. Theses

- It was found that the tested strains *M. ziziphicola*, *M. shanxiensis* and three additional pigment-producing isolates of the genus *Metschnikowia* could be suitable for biocontrol against the postharvest pathogen filamentous fungi *Botrytis cinerea*.
- During the identification of our pigment-producing *Metschnikowia* isolates from apple revealed that not only the D1/D2 domain of the large subunit (26S) coding region of the rRNA gene of the type strains *M. andauensis* and *M. fructicola* is highly heterogeneous, but this phenomenon is also detectable in several members of the *Metschnikowia pulcherrima* species group.
- Due to their high diversity within the genome, the ITS region, together with the D1/D2 domain, is not suitable for the diagnosis of these species, and therefore the taxonomic status of the species/isolates in this group needs to be revised.
- By analyzing the genome sequence of the *M. fructicola* type strain, we also showed that the DNA encoding the ribosomal RNA of this species is fragmented, it contains pseudogenes, and thus evolves by a birth-and-death mechanism rather than by homogenisation, which is unusual in yeasts.
- We found that the production of *pulcherrimin* by *M. andauensis* is strongly influenced by the composition of the culture medium. We have observed that low pH, higher temperature, and copper sulfate (a component of Bordeaux mixture) reduce the size of the pigmented zone, thus the size of the inhibitory zone.
- Our data also shed light on the complexity of the interactions between yeasts, as in addition to inhibition, we also noticed the stimulation of reproduction or the simultaneous appearance of inhibitory and stimulatory zones.

- Our data showed that strains belonging to human pathogenic fungi were slightly more tolerant to bioactive substances produced by yeasts than non-disease-associated yeasts
- Furthermore, we have shown that *M. andauensis* is able to inhibit the growth of several fungal species whose isolates have been associated with human infections.

7. Acknowledgment

Over the past years, I have received help from many people, without their support my doctoral dissertation could not have been completed.

I am grateful to my supervisor Dr. Ida Gálné Miklós for persistently helping me with my work and contributing to increasing the professional value of my thesis with her comments and corrections.

The thesis could not have been created in its current form without the advice and guidance of Prof. Dr. Mátyás Sipiczki. Who contributed to the development of my scientific approach with his feedback during our consultations and joint work.

I would like to thank all my former colleagues who contributed in various ways to the creation of this thesis.

I would like to thank my colleague Dr. Péter Valter Pfliegler for supporting and encouraging me throughout my work both personally and professionally.

Last but not least, I would like to thank my family and friends for the constant support I received during my studies and for trusting me throughout.

The doctoral dissertation was funded by grants provided by the National Research, Development and Innovation Office (FIK 20428-3/2018, TKP2020-IKA-04) and the Human Resources Development Operational Program (EFOP-3.6.1-16-2016-00022).

8 Hivatkozások/References

- Agarwal, V., Lal, P., & Pruthi, V. (2008). Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*, 165(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9077-9>
- Al-Sweih, N., Khan, Z. U., Ahmad, S., Devarajan, L., Khan, S., Joseph, L., & Chandy, R. (2011). *Kodamaea ohmeri* as an emerging pathogen: A case report and review of the literature. *Medical Mycology*, 49(7), 766–770. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.572300>
- Bandelt, H., Forster, P., Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Breuer, U., and Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23, 415–437. doi: 10.1002/yea.1374
- Bryant, D., Moulton V. (2004). Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol.*, 21(2):255-65. doi: 10.1093/molbev/msh018
- Buzzini, P., Lachance, M. A., & Yurkov, A. (2017). *Yeasts in natural ecosystems: Diversity*. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3>
- Caesar-Tonthat, T., Van Ommen, K. F., Geesey, G. G., Henson, J. M. (1995). Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. *Appl Environ Microbiol.*; 61(5), 1968-75. doi: 10.1128/AEM.61.5.1968-1975
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., Gabaldón T. (2009). TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, Volume 25, Issue 15, 1 August 2009, 1972–1973 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Cecarini, V., Cuccioloni, M., Bonfili, L., Ricciutelli, M., Valzano, M., Cappelli, A., Amantini, C., Favia, G., Eleuteri, A. M., Angeletti, M., & Ricci, I. (2019). Identification of a killer toxin from *Wickerhamomyces anomalus* with β -glucanase activity. *Toxins*, 11(10), 5–7. <https://doi.org/10.3390/toxins11100568>
- Chan, Z., & Tian, S. (2005). Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology*, 36(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.01.001>
- Compant, S., van der Heijden, M. G. A., Sessitsch, A., (2010). Climate change effects in beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 197–214. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00900.x
- Cooper Jr., C. R. (2011). Yeasts Pathogenic to Humans. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (eds) *The Yeasts taxonomic study* (Vol. 1). Elsevier B.V. 9-19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., & Valero, E. (2014). A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International*

- Journal of Food Microbiology*, 189, 189–194.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.013>
- Csutak, O., Vassu, T., Sarbu, I., Stoica, I., & Cornea, P. (2013). Antagonistic activity of three newly isolated yeast strains from the surface of fruits. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 70–77.
- Deak, T. (2006). Environmental Factors Influencing Yeasts. In: Péter, G., Rosa, C. (eds) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. Springer, Berlin, Heidelberg. 155–174. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_8
- Del-Prado, R., Cubas, P., Lumbsch, H. T., Divakar, P. K., Blanco, O., de Paz, G. A., Molina, M. C., & Crespo, A. (2010). Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of *Parmeliaceae* (Ascomycota) as a tool for taxon delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 125–133.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.014>
- Eickbush, T. H., & Eickbush, D. G. (2007). Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, 175(2), 477–485.
<https://doi.org/10.1534/genetics.107.071399>
- Falih, A. M., (1998). Comparative toxicity of heavy metals to some yeasts isolated from Saudi Arabian soil, *Bioresource Technology*, Volume 64, Issue 3, 193–198, ISSN 0960-8524, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00172-7)
- Fleet, G. H. (2001). Wine. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds) Food microbiology fundamentals and frontiers, 2nd edn. *American Society for Microbiology*, Washington, DC, 747–772.
- Fleet, G. H. (2003) (a). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Fleet, G. H. (2003) (b). Yeasts in fruit and fruit products. In: T. Boekhout and V. Robert (Eds), Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects, Behr's Verlag, Hamburg, 171–191.
- Fomina, M., Ritz, K., Gadd, G. M. (2000). Negative fungal chemotropism to toxic metals. *FEMS Microbiol Lett.*, 193(2), 207–11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09425.x
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol.*, 1;35(10):154. doi: 10.1007/s11274-019-2728-4
- Ganley, A. R. D., & Kobayashi, T. (2007). Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Research*, 17(2), 184–191.
<https://doi.org/10.1101/gr.5457707>
- Gharehbolagh, S. A., Nasimi, M., Afshari, A. K. S., Ghasemi, Z., Rezaie, S. (2017). First case of superficial infection due to *Naganishia albida* (formerly *Cryptococcus albidus*) in Iran: A review of the literature. *Curr Med Mycol.*, 3(2), 33–7.

- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., & Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>
- Grangeteau, C., David, V., Hervé, A., Guilloux-Benatier, M., & Rousseaux, S. (2017). The sensitivity of yeasts and yeasts-like fungi to copper and sulfur could explain lower yeast biodiversity in organic vineyards. *FEMS Yeast Research*, 17(8), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox092>
- Groenewald, M., Boundy-Mills, K., Čadež, N., Endoh, R., Jindamorakot, S., Pohl-Albertyn, C., Rosa, C. A., Turchetti, B. and Yurkov, A. (2017). Census of Yeasts Isolated from Natural Ecosystem and Conserved in Worldwide Collections. In: Buzzini, P., Lachance, M. A., & Yurkov, A. (eds). *Yeasts in natural ecosystems: Diversity*. Springer, Berlin, Heidelberg. 455-476. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3>
- Hashem, M., Alamri, S. A., Hesham, A. E. L., Al-Qahtani, F. M. H., & Kilany, M. (2014). Biocontrol of apple blue mould by new yeast strains: *Cryptococcus albidus* KKUY0017 and *Wickerhamomyces anomalus* KKUY0051 and their mode of action. *Biocontrol Science and Technology*, 24(10), 1137–1152. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.926857>
- HersHKovitz, V., Sela, N., Taha-Salaime, L., Liu, J., Rafael, G., Kessler, C., Aly, R., Levy, M., Wisniewski, M., & Droby, S. (2013). De-novo assembly and characterization of the transcriptome of *Metschnikowia fruticola* reveals differences in gene expression following interaction with *Penicillium digitatum* and grapefruit peel. *BMC Genomics*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-168>
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273–290. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>
- Hyde, K. D., Dong, Y., Phookamsak, R., Jeewon, R., Bhat, D. J., Jones, E. B. G., Liu, N. G., Abeywickrama, P. D., Mapook, A., Wei, D., Perera, R. H., Manawasinghe, I. S., Pem, D., Bundhun, D., Karunarathna, A., Ekanayaka, A. H., Bao, D. F., Li, J., Samarakoon, M. C., Sheng, J. (2020). Fungal diversity notes 1151–1276: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. In *Fungal Diversity Notes* (Vol. 100, Issue 1). Springer Netherlands, 239-249. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00439-5>
- Inácio, J., Daniel, H. -M. (2017). Commensalism: The Case of the Human Zymobiome. In: Buzzini, P., Lachance, M. A., & Yurkov, A. (eds) *Yeasts in natural ecosystems: Diversity*. Springer, Berlin, Heidelberg. 211-228. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-61575-2>
- Janisiewicz, W. J., Saftner, R. A., Conway, W. S., & Yoder, K. S. (2008). Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast

- antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), 374–378. <https://doi.org/10.1016/j>
- Johnson, E. A. and Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast Biotechnology. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (eds) The Yeasts taxonomic study (Vol. 1). *Elsevier B.V.* 21-44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Jones, R. W., and Prusky D. (2002). Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: a new approach for biological control of the postharvest diseases caused by *Colletotrichum coccodes*. *Phytopathology*, 92, 33–37. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.1.33
- Karabulut, O. A., Arslan, U., Ilhan, K., & Kuruoglu, G. (2005). Integrated control of postharvest diseases of sweet cherry with yeast antagonists and sodium bicarbonate applications within a hydrocooler. *Postharvest Biology and Technology*, 37(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j>
- Kobayashi, T. (2008). A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus - rDNA instability maintains genome integrity. *BioEssays*, 30(3), 267–272. <https://doi.org/10.1002/bies.20723>
- Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8), 873–880. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0>
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E., (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 37–42.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549
- Kurtzman, C. P., & Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(3), 395–399. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00045>
- Lee, Y. A., Kim, H. J., Lee, T. W., Kim, M. J., Lee, M. H., Lee, J. H., Ihm C. G. (2004). First Report of *Cryptococcus albidus*-induced disseminated Cryptococcosis in a renal transplant recipient. *Korean J Intern Med.*, 19(1), 53–7.
- Leigh, J. W., Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.*, 11(6), 371-84. doi: 10.1038/nrmicro3028
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International*

- Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Loper, J. E., Kobayashi, D. Y. and Paulsen, I. T. (2007). The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* PF-5: insights into biological control. *Phytopathology*, 97, 233–238. doi: 10.1094/PHYTO-97-2-0233
- Manso, T., & Nunes, C. (2011). *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.02.004>
- Manso, T., & Nunes, C. (2014). Growth Kinetics of the Biocontrol Agent *Metschnikowia andauensis* Pbc-2 in Submerged Batch Cultures. *International Journal of Research In Agriculture and Food Sciences*, 2(4). <http://www.ijsk.org/ijrafs.html>
- Melyvydas, V., Staneviciene, R., Balynaite, A., Vaiciuniene, J., & Garjonyte, R. (2016). Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment. *Microbiological Research*, 193, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.007>
- Nagarathnamma, T., Chunchanur, S. K., Rudramurthy, S. M., Vineetha, K. R., Ramamurthy, K., Joseph, J., & Ambica, R. (2017). Outbreak of *Pichia kudriavzevii* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Journal of Medical Microbiology*, 66(12), 1759–1764. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000645>
- Nakamura, L. K., & Hartman, P. A. (1961). *Lactobacillus*: Yeast Interrelationships1. *Journal of Bacteriology*, 81(4), 519–523. <https://doi.org/10.1128/jb.81.4.519-523.1961>
- Ohta, T. (1989). The mutational load of a multigene family with uniform members. *Genet. Res.* 53, 141–145. doi: 10.1017/S0016672300028020
- Passoth, V., Fredlund E., Druvefors U.A. and Schnurer J.. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res.* 6, 3–13. doi: 10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x
- Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H., & Kregiel, D. (2019). Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 112(10), 1425–1445. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01272-w>
- Pelletier, R., Alarie, I., Lagacé, R., & Walsh, T. J. (2005). Emergence of disseminated candidiasis caused by *Candida krusei* during treatment with caspofungin: Case report and review of literature. *Medical Mycology*, 43(6), 559–564. <https://doi.org/10.1080/13693780500220415>
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E., Dobiasova, S., Rinaldi, M., Barton, R., Veselov, A., Finquelievich, J., Tiraboschi, N., Ellis, D., Fameree, D., van den Abeele, A. M., Senterre, J. M., Lopez Colombo, A., Rennie, R., Sanche, S., Bijie, H., Santiago, A. (2008). *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS

DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 515–521. <https://doi.org/10.1128/JCM.01915-07>

Pietrella, D., Angiolella, L., Vavala, E., Rachini, A., Mondello, F., Ragno, R., Bistoni, F., & Vecchiarelli, A. (2011). Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-18>

Piombo, E., Sela, N., Wisniewski, M., Hoffmann, M., Gullino, M. L., Allard, M. W., et al. (2018). Genome sequence, assembly and characterization of two *Metschnikowia fruticola* strains used as biocontrol agents of postharvest diseases. *Front. Microbiol.* 9(593). doi: 10.3389/fmicb.2018.00593

Raspor, P., Miklič-Milek, D., Avbelj, M., & Čadež, N. (2010). Biocontrol of grey mould disease on grape caused by *Botrytis cinerea* with autochthonous wine yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 336–343.

Robert, V., Stalpers, J., Boekhout, T. and Tan, S. (2006). Yeast Biodiversity and Culture Collections. In: Péter, G., Rosa, C. (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*. Springer, Berlin, Heidelberg. 31-44. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_8

Roberts, C. (1946). The effect of iron and other factors on the production of pigment by the yeast *Torulopsis pulcherrima*. *Am J Bot.*, 33(4), 237-44. PMID: 20280146.

Robledo-Leal, E., Rivera-Morales, L. G., Sangorrin, M. P., González, G. M., Ramos-Alfano, G., Adame-Rodríguez, J. M., Alcocer-Gonzalez, J. M., Arechiga-Carvajal, E. T., & Rodríguez-Padilla, C. (2018). Identification and susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. to killer toxins. *Brazilian Journal of Biology*, 78(4), 742–749. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.175635>

Romano, P., Capece A. and Jespersen L. (2006). Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In: A. Querol and G.H. Fleet (Eds), *Yeasts in Food and Beverages*. i Berlin, 13–53.

Rooney, A. P., and Ward, T. J. (2005). Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 5084–5089. doi: 10.1073/pnas. 0409689102

Seifert, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9(SUPPL. 1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x>

Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6716–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>

Sipiczki, M. (2016). Overwintering of vineyard yeasts: Survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00212>

- Sipiczki, M., and Ferenczy, L. (1978). Enzymic methods for enrichment of fungal mutants I. Enrichment of *Schizosaccharomyces pombe* mutants. *Mutat. Res.* 50, 163–173. doi: 10.1016/0027-5107(78)90021-0
- Sipiczki, M., Pfliegler, W. P., & Holb, I. J. (2013). *Metschnikowia* Species Share a Pool of Diverse rRNA Genes Differing in Regions That Determine Hairpin-Loop Structures and Evolve by Reticulation. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067384>
- Sisti, M., & Savini, V. (2014). Antifungal properties of the human *Metschnikowia* strain IHEM 25107. *Folia Microbiologica*, 59(3), 263–266. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0290-2>
- Spadaro, D., Ciavorella, A., Dianpeng, Z., Garibaldi, A., & Gullino, M. (2010) (a). Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(2), 128–137. <https://doi.org/10.1139/W09-117>
- Spadaro, D., Ciavorella, A., Lopez-Reyes, J. G., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010) (b). Effect of culture age, protectants, and initial cell concentration on viability of freeze-dried cells of *Metschnikowia pulcherrima*. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(10), 809–815. <https://doi.org/10.1139/W10-068>
- Spadaro, D. & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, 47, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- Spadaro, D., & Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00380-5)
- Subhasree, R. S., Dinesh Babu, P., Vidyalakshmi, R., & Mohan, V. C. (2011). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Stimulation of Pigment Production by *Monascus purpureus* on Jackfruit Seeds. *International Journal of Microbiological Research*, 2(2), 184–187.
- Tashiro, A., Nei, T., Sugimoto, R., Watanabe, A., Hagiwara, J., Takiguchi, T., Yokota, H., & Kamei, K. (2018). *Kodamaea ohmeri* fungemia in severe burn: Case study and literature review. *Medical Mycology Case Reports*, 22, 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2018.07.005>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 11(22), 4673–80. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Tian, Y. qin, Li, W., Jiang, Z. tao, Jing, M. min, & Shao, Y. zhi. (2018). The preservation effect of *Metschnikowia pulcherrima* yeast on anthracnose of postharvest

mango fruits and the possible mechanism. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 95–105. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0213-0>

Türkel, S., & Ener, B. (2009). Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment *pulcherrimin*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 64(5–6), 405–410. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-5-618>

Vaezi, A., Fakhim, H., Khodavaissy, S., Alizadeh, A., Nazeri, M., Soleimani, A., Boekhout, T., & Badali, H. (2017). Caractéristiques épidémiologiques et mycologiques de la candidémie en Iran : revue systématique et méta-analyse. *Journal de Mycologie Medicale*, 27(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.02.007>

Viljoen, B. C. (2006). Yeast Ecological Interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents. In: Querol A., Fleet G. (eds), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg, 83–110. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_4

Vivas, R., Beltran, C., Munera, M. I., Trujillo, M., Restrepo, A., & Garcés, C. (2016). Fungemia due to *Kodamaea ohmeri* in a young infant and review of the literature. *Medical Mycology Case Reports*, 13, 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2016.06.001>

White, T. J. et al. (1990). Page 315 in: Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., Biles, C. L., McLaughlin, R., Chalutz, E., & Droby, S. (1991). Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection*, 10(3), 172–177. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(91\)90039-T](https://doi.org/10.1016/0261-2194(91)90039-T)

Wu, L., Sun, Q., Sugawara, H., Yang, S., Zhou, Y., McCluskey, K., Vasilenko, A., Suzuki, K. I., Ohkuma, M., Lee, Y., Robert, V., Ingsriswang, S., Guissart, F., Philippe, D., & Ma, J. (2013). Global catalogue of microorganisms (gcm): A comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualization system for microbial resources. *BMC Genomics*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-933>

Yang, B. H., Peng, M. Y., Hou, S. J., Sun, J. R., Lee, S. Y., & Lu, J. J. (2009). Fluconazole-resistant *Kodamaea ohmeri* fungemia associated with cellulitis: Case report and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(6), 493–497. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.02.003>

Zhimo, V. Y., Dilip, D., Sten, J., Ravat, V. K., Bhutia, D. D., Panja, B., & Saha, J. (2017). Antagonistic Yeasts for Biocontrol of the Banana Postharvest Anthracnose Pathogen *Colletotrichum musae*. *Journal of Phytopathology*, 165(1), 35–43. <https://doi.org/10.1111/jph.12533>

Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. (2017). An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01927>



Nyilvántartási szám: DEENK/355/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Horváth Enikő

Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10067879

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

Idegén nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Horváth, E.,** Dályai, L., Szabó, E., Barna, T., Kalmár, L., Posta, J., Sipiczki, M., Csoma, H., Miklós, I.: The antagonistic *Metschnikowia andauensis* produces extracellular enzymes and pulcherrimin, whose production can be promoted by the culture factors.
Sci. Rep. 11, 10593-10603, 2021. EISSN: 2045-2322.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89982-y>
IF: 4.379 (2020)
2. **Horváth, E.,** Sipiczki, M., Csoma, H., Miklós, I.: Assaying the effect of yeasts on growth of fungi associated with disease.
BMC Microbiol. 20 (320), 1-10, 2020. ISSN: 1471-2180.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-020-01942-0>
IF: 3.605
3. Sipiczki, M., **Horváth, E.,** Pfliegler, V. P.: Birth-and-Death Evolution and Reticulation of ITS Segments of *Metschnikowia andauensis* and *Metschnikowia fructicola* rDNA Repeats.
Front. Microbiol. 9, 1-16, 2018. EISSN: 1664-302X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01193>
IF: 4.259





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (4)

4. Papp, L. A., **Horváth, E.**, Peles, F., Pócsi, I., Miklós, I.: Insight into Yeast-Mycotoxin Relations. *Agriculture-Basel*. 11 (12), 1-13, 2021. EISSN: 2077-0472.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture11121291>
IF: 2.925 (2020)
5. Hyde, K. D., Dong, Y., Phookamsak, R., Jeewon, R., Bhat, D. J., Jones, E. B. G., Liu, N. G., Abeywickrama, P. D., Mapook, A., Wei, D., Perera, R. H., Manawasinghe, I. S., Pem, D., Bundhun, D., Karunarathna, A., Ekanayake, A. H., Bao, D. F., Li, J., Samarakoon, M. C., Chaiwan, N., Lin, C. G., Phuthacharoen, K., Zhang, S. N., Senanayake, I. C., Goonasekara, I. D., Thambugala, K. M., Phukhamsakda, C., Tennakoon, D. S., Jiang, H. B., Yang, J., Zeng, M., Huanraluek, N., Liu, J. K. (.), Wijesinghe, S. N., Tian, Q., Tibpromma, S., Brahmanage, R. S., Boonmee, S., Huang, S. K., Thiyagaraja, V., Lu, Y. Z., Jayawardena, R. S., Dong, W., Yang, E. F., Singh, S. K., Singh, S. M., Rana, S., Lad, S. S., Anand, G., Devadatha, B., Niranjan, M., Sarma, V. V., Lilmatainen, K., Aguirre-Hudson, B., Niskanen, T., Overall, A., Alvarenga, R. L. M., Gibertoni, T. B., Pfliegler, V. P., **Horváth, E.**, Imre, A., Alves, A. L., da Silva, S. A. C., Tiago, P. V., Bulgakov, T. S., Wanasinghe, D. N., Bahkali, A. H., Doilom, M., Elgorban, A. M., Maharachchikumbura, S. S. N., Rajeshkumar, K. C., Haelewaters, D., Mortimer, P. E., Zhao, Q., Lumyong, S., Xu, J., Sheng, J.: Fungal diversity notes 1151-1276: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. *Fungal Divers.* 100 (1), 5-277, 2020. ISSN: 1560-2745.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-020-00439-5>
IF: 20.372
6. Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Al-Ani, L., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K. C., Zhao, R., Aptroot, A., Leontyev, D. V., Saxena, K., Tokarev, Y. S., Dai, D. Q., Letcher, P., Stephenson, S., Ertz, D., Lumbsch, H. T., Kukwa, M., Issi, I., Madrid, H., Phillips, A. J. L., Selbmann, L., Pfliegler, V. P., **Horváth, E.**, Bensch, K., Kirk, P. M., Kolářiková, K., Raja, H. A., Radek, R., Papp, V., Dima, B., Ma, J. X., Malosso, E., Takamatsu, S., Rambold, G., Gannibal, P., Triebel, D., Gautam, A., Avasthi, S., Suetrong, S., Tindal, E., Fryar, S., Delgado, G., Réblová, M., Doilom, M., Dolatabadi, S., Pawowska, J., Humber, R., Kodsueb, R., Sánchez, C. I., Goto, B. T., Silva, D., de Souza, F., Oehl, F., da, S. G., Silva, J., Baszkowski, J., Jobim, K., Maia, L. C., Barbosa, F. A. R., Flúza, P. O., Divakar, P., Shrivoy, B. D., Castañeda-Ruiz, R. F., Somrithipol, S., Lateef, A. A., Karunarathna, S. C., Tibpromma, S., Mortimer, P. E., Wanasinghe, D. N., Phookamsak, R., Xu, J., Wang, Y., Tian, F., Alvarado, P., Li, D., Kušan, I., Matočec, N., Maharachchikumbura, S. S. N., Papizadeh, M., Heredia, G., Wartchow, F., Bakhshi, M., Boehm, E., Youssef, N., Hustad, V. P., Lawrey, J., Santiago, A., Bezerra, J., Souza-Motta, C., Firmino, A., Tian, Q., Houbroken, J., Hongsanan, S., Tanaka, K., Dissanayake, A. J., Monteiro, J. S., Grossart, H., Suija, A., Weerakoon, G., Etayo, J., Tsurukau, A., Vázquez, V., Mungai, P., Damm, U., Li, Q., Zhang, H., Boonmee, S.,



Lu, Y., Becerra, A., Kendrick, B., Brearley, F. Q., Motiejūnaitė, J., Sharma, B. O., Khare, R., Gaikwad, S., Wijesundara, D., Tang, L. Z., He, M., Flakus, A., Rodriguez-Flakus, P., Zhurbenko, M., McKenzie, E. H. C., Stadler, M., Bhat, D. J., Liu, J. K. (.), Raza, M., Jeewon, R., Nassonova, E., Prieto, M., Jayalal, R. G. U., Erdoğan, M., Yurkov, A., Schnittler, M., Shchepin, O., Novozhilov, Y., Silva-Filho, A., Liu, P., Cavender, J., Kang, Y., Mohammad, S., Zhang, L., Xu, R., Li, Y., Dayarathne, M. C., Ekanayaka, A. H., Wen, T., Deng, C., Pereira, O., Navathe, S., Hawksworth, D. L., Fan, X. L., Dissanayake, L., Kuhnert, E., Grossart, H., Thines, M.: Outline of Fungi and fungus-like taxa.

Mycosphere. 11 (1), 1060-1456, 2020. EISSN: 2077-7019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>

IF: 4.211

7. Pfliegler, V. P., **Horváth, E.**, Kállai, Z., Sipiczki, M.: Diversity of *Candida zeylanoides* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis.

Microbiol. Res. 169 (5-6), 402-410, 2014. ISSN: 0944-5013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.006>

IF: 2.561

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 42,312

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 12,243

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.07.01.





Registry number:

DEENK/355/2022.PL

Subject:

PhD Publication List

Candidate: Enikő Horváth

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10067879

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (3)

1. **Horváth, E.**, Dályai, L., Szabó, E., Barna, T., Kalmár, L., Posta, J., Sipiczki, M., Csoma, H., Miklós, I.: The antagonistic *Metschnikowia andauensis* produces extracellular enzymes and pulcherrimin, whose production can be promoted by the culture factors.
Sci. Rep. 11, 10593-10603, 2021. EISSN: 2045-2322.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89982-y>
IF: 4.996
2. **Horváth, E.**, Sipiczki, M., Csoma, H., Miklós, I.: Assaying the effect of yeasts on growth of fungi associated with disease.
BMC Microbiol. 20 (320), 1-10, 2020. ISSN: 1471-2180.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-020-01942-0>
IF: 3.605
3. Sipiczki, M., **Horváth, E.**, Pfliegler, V. P.: Birth-and-Death Evolution and Reticulation of ITS Segments of *Metschnikowia andauensis* and *Metschnikowia fructicola* rDNA Repeats.
Front. Microbiol. 9, 1-16, 2018. EISSN: 1664-302X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01193>
IF: 4.259





List of other publications

Foreign language scientific articles in international journals (4)

4. Papp, L. A., **Horváth, E.**, Peles, F., Pócsi, I., Miklós, I.: Insight into Yeast-Mycotoxin Relations.
Agriculture-Basel. 11 (12), 1-13, 2021. EISSN: 2077-0472.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture11121291>
IF: 3.408
5. Hyde, K. D., Dong, Y., Phookamsak, R., Jeewon, R., Bhat, D. J., Jones, E. B. G., Liu, N. G., Abeywickrama, P. D., Mapook, A., Wei, D., Perera, R. H., Manawasinghe, I. S., Pem, D., Bundhun, D., Karunarathna, A., Ekanayaka, A. H., Bao, D. F., Li, J., Samarakoon, M. C., Chaiwan, N., Lin, C. G., Phuthacharoen, K., Zhang, S. N., Senanayake, I. C., Goonasekara, I. D., Thambugala, K. M., Phukhamsakda, C., Tennakoon, D. S., Jiang, H. B., Yang, J., Zeng, M., Huanraluek, N., Liu, J. K. (.), Wijesinghe, S. N., Tian, Q., Tibpromma, S., Brahmanage, R. S., Boonmee, S., Huang, S. K., Thiagaraja, V., Lu, Y. Z., Jayawardena, R. S., Dong, W., Yang, E. F., Singh, S. K., Singh, S. M., Rana, S., Lad, S. S., Anand, G., Devadatha, B., Niranjani, M., Sarma, V. V., Limatainen, K., Aguirre-Hudson, B., Niskanen, T., Overall, A., Alvarenga, R. L. M., Gibertoni, T. B., Pfliegler, V. P., **Horváth, E.**, Imre, A., Alves, A. L., da Silva, S. A. C., Tiago, P. V., Bulgakov, T. S., Wanasinghe, D. N., Bahkali, A. H., Doilom, M., Elgorban, A. M., Maharachchikumbura, S. S. N., Rajeshkumar, K. C., Haelewaters, D., Mortimer, P. E., Zhao, Q., Lumyong, S., Xu, J., Sheng, J.: Fungal diversity notes 1151-1276: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa.
Fungal Divers. 100 (1), 5-277, 2020. ISSN: 1560-2745.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-020-00439-5>
IF: 20.372
6. Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Al-Ani, L., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K. C., Zhao, R., Aptroot, A., Leontyev, D. V., Saxena, K., Tokarev, Y. S., Dai, D. Q., Letcher, P., Stephenson, S., Ertz, D., Lumbsch, H. T., Kukwa, M., Issi, I., Madrid, H., Phillips, A. J. L., Selbmann, L., Pfliegler, V. P., **Horváth, E.**, Bensch, K., Kirk, P. M., Kolafíková, K., Raja, H. A., Radek, R., Papp, V., Dima, B., Ma, J. X., Malosso, E., Takamatsu, S., Rambold, G., Gannibal, P., Triebel, D., Gautam, A., Avasthi, S., Suetrong, S., Timdal, E., Fryar, S., Delgado, G., Réblová, M., Doilom, M., Dolatabadi, S., Pawowska, J., Humber, R., Kodsueb, R., Sánchez, C. I., Goto, B. T., Silva, D., de Souza, F., Oehl, F., da S. G., Silva, I., Baszkowski, J., Jobim, K., Maia, L. C., Barbosa, F. A. R., Fiuza, P. O., Divakar, P., Shenoy, B. D., Castañeda-Ruiz, R. F., Somrithipol, S., Lateef, A. A., Karunarathna, S. C., Tibpromma, S., Mortimer, P. E., Wanasinghe, D. N., Phookamsak, R., Xu, J., Wang, Y., Tian, F., Alvarado, P., Li, D., Kušan, I., Matočec, N., Maharachchikumbura, S. S. N., Papizadeh, M., Heredia, G., Warchow, F., Bakhshi, M., Boehm, E., Youssef, N., Husted, V. P., Lawrey, J., Santiago, A., Bezerra, J., Souza-Motta, C., Firmino, A., Tian, Q., Houbaken, J., Hongsanant, S., Tanaka, K., Dissanayake, A. J., Monteiro, J. S., Grossart, H., Suija, A., Weerakoon, G., Etayo, J., Tsurukau, A., Vázquez, V., Mungal, P., Damm, U., Li, Q., Zhang, H., Boonmee, S.,



Lu, Y., Becerra, A., Kendrick, B., Brearley, F. Q., Motiejūnaitė, J., Sharma, B. O., Khare, R., Gaikwad, S., Wijesundara, D., Tang, L. Z., He, M., Flakus, A., Rodríguez-Flakus, P., Zhurbenko, M., McKenzie, E. H. C., Stadler, M., Bhat, D. J., Liu, J. K. (.), Raza, M., Jeewon, R., Nassonova, E., Prieto, M., Jayalal, R. G. U., Erdoğan, M., Yurkov, A., Schnittler, M., Shchepin, O., Novozhilov, Y., Silva-Filho, A., Liu, P., Cavender, J., Kang, Y., Mohammad, S., Zhang, L., Xu, R., Li, Y., Dayaratne, M. C., Ekanayaka, A. H., Wen, T., Deng, C., Pereira, O., Navathe, S., Hawksworth, D. L., Fan, X. L., Dissanayake, L., Kuhnert, E., Grossart, H., Thines, M.: Outline of Fungi and fungus-like taxa.

Mycosphere. 11 (1), 1060-1456, 2020. EISSN: 2077-7019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>

IF: 4.211

7. Pflieger, V. P., Horváth, E., Kállai, Z., Sipiczki, M.: Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis.

Microbiol. Res. 169 (5-6), 402-410, 2014. ISSN: 0944-5013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.006>

IF: 2.561

Total IF of journals (all publications): 43,412

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 12,86

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

01 July, 2022

