



1949

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

Doktori (PhD) értekezés

Horváth Enikő

Témavezető: Gálné Dr. Miklós Ida

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2022

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai
Doktori Tanács **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola** Doktori Iskola
Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki programja keretében
készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD)
fokozatának elnyerése céljából.*

*Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD
disszertáció részét.*

Debrecen, 2022.....

.....

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Horváth Enikő** doktorjelölt 2012- 2015. között a fent megnevezett Doktori
Iskola **Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki** programjának keretében
irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló
alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a
tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2022

.....

a témavezető aláírása

Bioprotekcióra alkalmas élesztőgomba izolátumok antagonistahatásának vizsgálata és genetikai elemzése

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki tudományágban
Írta: Horváth Enikő okleveles Biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája
(Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki Doktori programja) keretében

Témavezetők:

Témavezető neve

Gálné Dr. Miklós Ida

Témavezető neve

.....

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Batta Gyula

tagok: Dr. Pfeiffer Ilona

Dr. Batta Gyula

A doktori szigorlat időpontja:2015.11.12.....

Az értekezés bírálói:

.....

.....

A bírálóbizottság:

elnök:

tagok:

.....

.....

.....

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	4
2	Célkitűzések	8
3	Irodalmi áttekintés.....	9
3.1	Élesztőgombák szerepe a mikrobiológiai közösségekben.....	9
3.2	Élesztőgombák rendszerezése.....	16
3.3	A <i>Metschnikowia</i> nemzetséghez tartozó <i>pulcherrimin</i> termelő izolátumok rendszertani története.....	19
3.4	A <i>pulcherrimin</i> termelő <i>Metschnikowia</i> fajok jellemzése	22
3.4.1	A <i>pulcherrimin</i> termelő <i>Metschnikowia</i> izolátumok szerepe a gyümölcsök és zöldségek védelmében	22
3.4.2	A <i>pulcherrimin</i> termelő <i>Metschnikowia</i> izolátumok antagonista hatásmechanizmusa	25
4	Anyagok és módszerek	32
4.1	Felhasznált törzsek	32
4.2	Anyagok.....	36
4.2.1	Felhasznált tápközegek.....	36
4.2.2	Oldatok	37
4.3	Módszerek és kivitelezés	38
4.3.1	Taxonómiai vizsgálatok.....	38
4.3.1.1	Asszimilációs és szaporodási tesztek.....	38
4.3.1.2	Genomi DNS izolálása.....	38
4.3.1.3	PCR (Polymerase chain reaction).....	39
4.3.1.4	Az amplifikált ITS1-5.8S-ITS2 kódoló régió klónozása	40
4.3.1.5	ITS szekvenciák keresése a <i>Metschnikowia fructicola</i> CBS 8853 ^T genom szekvenciájában	41
4.3.1.6	Szekvencia elemzés	41

4.3.1.7	Többszörös szekvencia illesztés	42
4.3.1.8	Haplotípus elemzés – Haplotípus hálózat generálása	42
4.3.1.9	Filogenetikai törzsfa generálása	42
4.3.1.10	Auxotróf mutánsok létrehozása	44
4.3.1.11	A <i>Metschnikowia</i> fajok auxotróf mutáns törzseinek hibridizálása.....	45
4.3.1.12	Kromoszóma preparáció.....	46
4.3.2	Antagonizmus vizsgálat in vitro petri-csészéken.....	48
4.3.2.1	Élesztőgomba izolátumok lehetséges antagonista hatásának feltérképezése	48
4.3.2.2	<i>Metschnikowia</i> izolátumok <i>pulcherrimin</i> termelésének vizsgálata.....	49
5	Eredmények	51
5.1	Élesztőgomba törzsek antagonista hatásának tesztelése <i>Botrytis cinerea</i> fonalas gombával szemben	51
5.2	Taxonómiai problémák a <i>Metschnikowia</i> izolátumok azonosítása során	53
5.2.1	Az <i>Metschnikowia</i> izolátumok 26S riboszómális RNS gén D1/D2 doménjének elemzése	53
5.2.2	A <i>Metschnikowia</i> izolátumok ITS régiójának elemzése	54
5.2.3	CHEF elektrokarotipizálás.....	63
5.2.4	A <i>Metschnikowia</i> auxotróf mutáns törzsek hibridizálása.....	64
5.3	<i>Metschnikowia</i> izolátumok <i>pulcherrimin</i> termelésének vizsgálata.	67
5.3.1	Környezeti tényezők hatása a pigmenttermelésre	67
5.3.1.1	Tápközeg befolyása a pigmenttermelésre	67
5.3.1.2	Szénforrások hatása a pigmenttermelésre	68
5.3.1.3	A pH és a hőmérséklet hatása a pigmenttermelésre	71

5.3.1.4	Réz hatása a <i>Metschnikowia andauensis</i> szaporodására és <i>B. cinerea</i> val szembeni gátló hatására	73
5.4	Élesztőgomba-élesztőgomba kölcsönhatás vizsgálata	75
5.4.1	A kölcsönhatások típusa	75
5.4.2	Az antagonista hatás kifejeződésének mértékét befolyásoló tényezők	79
5.4.3	A <i>Pichia kudriavzevii</i> szaporodása nehezen gátolható élesztőgombákkal	82
5.4.4	Az antagonizmus kifejeződése fajspecifikus lehet.....	85
6	Eredmények megbeszélése	86
6.1	Élesztőgomba izolátumok antagonista hatásának tanulmányozása <i>Botrytis cinerea</i> fonalas gombával szemben	86
6.2	Taxonómiai vizsgálatok.....	87
6.3	<i>Metschnikowia</i> izolátumok <i>pulcherrimin</i> termelésének vizsgálata.	91
6.4	Élesztőgombák egymásra gyakorolt hatásának vizsgálata	96
7	Összefoglalás	100
8	Summary	104
9	Köszönetnyilvánítás	108
10	Referenciák	109
11	Mellékletek	132

1 Bevezetés

Az élesztőgombák, mely alatt az egysejtű, bimbózással szaporodó aszkuszos és bazídiumos gombákat értjük, megtalálhatóak az élő és élettelen környezetben egyaránt. Minden rendelkezésre álló életteret meghódítottak. Előfordulnak a talajban, az atmoszférában, a hidroszférában (sós és édesvizekben egyaránt), 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, ahol az élesztőgombák gyakran baktériumokkal, fonalas gombákkal és vírusokkal élnek együtt, valamint az eukarióta sejtműködés alapvető kutatási alanyaként, 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,

Schisler 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 e 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.

A mikrobiális közösségek változásainak hátterében és egy-egy faj túlszaporodása mögött több tényező is állhat, ilyenek például az eltérő tápanyagigény, érzékenység a többi élesztőgomba által termelt metabolitokra (pl. etanol) vagy az ún. killer toxinokra (Schmitt és Breinig 2006). A sejtek közötti távolság szintén befolyással van a sejtválaszra (Arneborg és mtsai 2005).

E tulajdonságukat kiaknázva alkalmaznak például antagonista hatással rendelkező bioprotekcióra alkalmas élesztőgombákat mezőgazdasági károkat okozó patogénekkal szemben. Sokoldalúságuknak köszönhetően kiváló biokontroll ágens jelöltek a növényvédelemben (Loper és mtsai 2007).

A *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus* és *Pseudozyma* nemzetségekben számos faj rendelkezik erős gombaellenes tulajdonságokkal, az általuk termelt lítikus enzimek, toxikus fehérjék, zsírsavak és az etil-acetát által potenciálisan használhatóak a gombák elleni biológiai védekezésben. Néhány élesztőgombafaj kereskedelmi forgalmazásra már rendelkezésre áll a gyümölcsöket, zöldségeket és gabonaféléket károsító gombák *pre-* és *postharvest* kezelésére (Fleet 2003a, Spadaro és Gullino 2004b, Breuer és Harms 2006, Passoth és mtsai 2006).

Az élesztőgomba alapú biokontroll termékek jelenléte a piacon azt mutatja, hogy használatuk a növénybetegségek elleni védekezésben kereskedelmi szempontból is megvalósítható (Jones és Prusky 2002, Janisiewicz és mtsai 2008, Junaid és mtsai 2013). Az alkalmazásukkal ráadásul 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 vízakaktivitás, 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 biomassza 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. Mindemellett genetikai módosítással is lehetséges a biokontroll hatékonyság növelése, legyen szó az élesztőgomba saját, antagonista hatásért felelős génjének/génjeinek expresszióját fokozó változtatásokról vagy akár élesztőgombák alkalmazásáról más élőlényektől származó gének heterológ kifejeződésére (Jones és Prusky 2002, Janisiewicz és mtsai 2008).

Mindezen biokontroll képességet stabilizáló és javító megoldások kifejlesztéséhez azonban alapos kutatásra van szükség. Fel kell tárunk 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 informáciánk 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 Irodalmi áttekintés

3.1 Élesztőgombák szerepe a mikrobiológiai közösségekben

Egy közösség folyamatos fejlődése során megváltoznak a környezeti körülmények, a mikrobák kölcsönhatásba lépnek egymással. Például egy faj stimulálhatja más fajok növekedését vagy szaporodását azáltal, hogy megváltoztatja a pH-t, növekedési faktorokat termel, befolyásolja az elérhető oxigén mennyiségét stb. (Viljoen 2006). Az élesztőgombák számos ökoszisztéma fontos tagjai (Buzzini és mtsai 2017, Péter és mtsai 2017), különböző módon léphetnek kölcsönhatásba egy mikrobaközösség tagjaival, melyben élnek. A kölcsönhatás típusait tekintve beszélhetünk például neutralizmusról, kommenzalizmusról, mutualizmusról, parazitizmusról, kompetícióról vagy akár antibióziszról is (Starmer és Lachance 2011, Begerow és mtsai. 2017, Inácio és Daniel 2017, Klassen és mtsai. 2017, Mittelbach és Vannette 2017, Yurkov és Pozo 2017). Az elmúlt évtizedekben számos olyan élesztőgombát izoláltak gyümölcsökről, fermentált termékekből, talajból és egyéb természetes környezetből, melyeknek jelentős szerepe lehet a mikrobiális kölcsönhatásokban (Viljoen 2006).

Az antagonista hatással rendelkező élesztőgombák biokontroll szerként is alkalmazhatóak. A mikrobiológiai biokontroll ágensek esetében a hatásmechanizmusukat tekintve beszélhetünk indirekt és a direkt antagonizmusról (Junaid és mtsai 2013, Spadaro és Droby 2016, Ghorbanpour és mtsai 2018, Köhl és mtsai 2019).

Az indirekt antagonizmus alatt a tápanyagokért és az élettérért történő versengést értjük (Köhl és mtsai 2019). A különböző mikroorganizmusok versengenek egymással a tápanyagokért és a térért, ezt a küzdelmet a biokontroll élesztőgombák elsődleges hatásmechanizmusának tekintik

(Freimoser és mtsai 2019). Ha egy növényi kórokozó sejt- és szövetelhalást vált ki az általa megfertőzött növényen, az elhalt szöveteket a szaprofita életmódot folytató nem patogén mikroorganizmusok is kolonizálhatják, ami versenyt eredményez a tápanyagokért és az élőhelyért (Köhl és mtsai 2019). Ebből következik, hogy az erősen kompetitív mikroorganizmusok potenciális jelöltek a biológiai védekezésben (Köhl és mtsai 2019). A gyümölcsökön keletkezett sebekben a kórokozók inváziója elleni védelmének egyik módja a gyorsan kolonizáló élesztőgombák bevetése a megsebzett felületeken (Spadaro és Droby 2016). Az élesztőgombák a szénhidrátok széles skáláját képesek fogyasztani, és kedvező körülmények között gyorsan képesek szaporodni a tápanyagban gazdag gyümölcsök sebeiben (Spadaro és mtsai 2010a).

A tápanyagok megszerzéséért való küzdelem egy speciális esete a vasért folyó küzdelem. A vas szinte minden gomba növekedéséhez nélkülözhetetlen, ebből kifolyólag a vasért való versengésről a kutatók úgy gondolják, hogy jelentős szerepet játszik a betakarítás utáni kórokozók biokontrolljában (Saravanakumar és mtsai 2008). A mikrobák szaporodásában nehezítő tényező lehet a vas korlátozott hozzáférhetősége, mely a Fe^{3+} ionok alacsony oldhatóságának köszönhető (Köhl és mtsai 2019). A vas megszerzésére például számos mikroorganizmus különféle kis molekulatömegű sziderofórokat állít elő, melyek nagy affinitással kötődnek a vashoz (van Loon 2000). A biológiai védekezésben azok a mikrobiális törzsek alkalmazhatóak, amelyek képesek nagy mennyiségű, a vashoz nagy affinitással kötődő sziderofórok termelésére (Köhl és mtsai 2019). A biokontroll élesztőgombák esetében a vasért folytatott versengés fontos hatásmechanizmusként ismert (Spadaro és Droby 2016).

A tápanyag megszerzése mellett a kolonizáló képesség is fontos szerepet játszhat a betakarítás utáni növényi kórokozókkal szembeni védelemben. A

különböző mikrobák általi biofilm képzés egy speciális, és rendkívül sikeres stratégia a térért való versengésben (Freimoser és mtsai 2019). A gyümölcsfelületeken történő sikeres megtelepedéshez az antagonista mikrobának képesnek kell lennie arra, hogy olyan specifikus tulajdonságokkal rendelkezzen, amelyek elősegítik a tapadását, megtelepedését és szaporodását ezeken a felületeken. A legtöbb esetben ez a tulajdonság egy biofilm képzéséhez kapcsolódik. A biofilm kialakításának képessége is egy hatékony hatásmechanizmus a biokontroll élesztőgombák esetében (Freimoser és mtsai 2019).

A tápanyagokért és a térért való versengés akkor lehet hatékony biokontroll mechanizmus, ha az antagonista élőlény kellő mennyiségben, megfelelő időben és helyen van jelen, valamint a korlátozott erőforrásokat hatékonyabban tudja felhasználni, mint a kórokozó (Spadaro és Droby 2016, Ghorbanpour és mtsai 2018).

Az élesztőgombák termelhetnek különböző antimikrobiális vegyületeket, melyekkel közvetlenül akadályozzák más mikrobák szaporodását, növekedését, terjeszkedését. Ez esetben már direkt antagonizmusról beszélünk (Junaid és mtsai 2013).

Az élesztőgombák termelhetnek többek között különböző sejtlízist okozó enzimeket (pl. glükánáz, kitináz, proteáz) (Spadaro és Droby 2016, Freimoser és mtsai 2019). Számos sejtroncsoló hatású különböző enzimet termelő élesztőgombáról számoltak már be a kutatók az elmúlt években (Spadaro és Droby 2016, Ghorbanpour és mtsai 2018, Freimoser és mtsai 2019). Emellett illékonyvegyületeket, killer toxinokat előállító élesztőgombák is ismertek (Spadaro és Droby 2016).

A *Pichia membranifaciens* például két killer toxint (PMKT és PMKT2) képes termelni, amelyek aktívak a romlást okozó élesztőgombák és fonalas gombák ellen (Santos és mtsai 2009).

Számos gombafaj termel illékony gombaellenes anyagokat (Mari és mtsai 2012). E vegyületek termelésére képes gombák potenciálisan felhasználhatók gombaellenes szerként (Spadaro és Droby 2016).

Az indirekt és direkt antagonizmus mellett érdemes megemlíteni az élesztőgombák indukált rezisztenciában betöltött szerepét is. Egyes biokontroll élesztőgombák ugyanis szisztémás rezisztenciát válthatnak ki a növényekben a kórokozók széles körével szemben, e tulajdonságuk pedig hozzájárulhat a biokontroll tevékenységükhöz (Freimoser és mtsai 2019).

Az élesztőgombák és a különböző mikrobaközösségek tagjai között kialakult kölcsönhatásokat (szimbiózis, mutualizmus, kommenzalizmus, stb.) sikeresen aknázzák ki az iparban is (Viljoen 2006). Kevert mikrobiológiai populációkat alkalmaznak az iparban az íz fokozására, a magasabb hozam eléréséhez, a pH csökkentésére, ami által megelőzik a nem kívánatos mikrobák megjelenését, valamint azért, hogy stabilitást teremtsenek, vagy elérjék a kívánt a fiziológiai tulajdonságokat. Az élesztőgombák ezeknek szerves részei, számos mechanizmussal és tevékenységgel járulnak hozzá a minőség megtartásához (Viljoen 2006, Fleet 1998, 2007, Johnson és Echavarri-Erasun 2011, Tamang és mtsai 2016, Arevalo-Villena és mtsai 2017).

Például a *Pichia stipitis* és *Saccharomyces cerevisiae* közös tenyésztésben történő alkalmazása magasabb etanol kihozatalt eredményez a mezőgazdasági hulladékból származó glükóz és xilóz együttes fermentációja során (Grootjen és mtsai 1991).

Az *Endomycopsis fibuliger* és *Candida utilis* együttes alkalmazása pedig magasabb egysejtes fehérje kihozatalt eredményez a keményítő tartalmú szennyvíz kezelése során azáltal, hogy az *E. fibuliger* dextrinekké és alacsony molekulatömegű cukrokká hidrolizálja keményítőt, amivel felszabadítja a *C. utilis* számára hasznosítható anyagokat (Jarl 1969, 1971).

Az élesztőgombák emellett olyan fermentációval készülő élelmiszerek mikroba közösségének is fontos részei, mint például a kovászos kenyér, különböző erjesztett tejtermékek, szójaszós, gabonafélék, a sör vagy a bor (Fleet 1998, 2007, Viljoen 2006, Johnson és Echavarri-Erasun 2011, Tamang és mtsai, 2016 Arevalo-Villena és mtsai 2017).

E fermentált élelmiszerek előállításában a baktériumok, és azon belül is túlnyomórészt a tejsavbaktériumok játszik a legfontosabb szerepet (Tamang és mtsai 2016). A tejsavbaktériumok különböző szerves savakat termelnek, amelyek a közeg pH-értékének csökkenéséhez vezetnek. Ez gátolja a nemkívánatos kórokozók szaporodását, és elősegíti az élesztőgombák növekedését. Ezért a tejsavbaktériumok és az élesztőgombák közötti kölcsönhatás, amelyet számos fermentált élelmiszerben és italban alkalmaznak, alapvető szerepet játszik e termékek tartósításában. Ezekben az ökoszisztémákban az élőlények versenyezhetnek például ugyanazért a tápanyagért, vagy akár elő is segíthetik egymás növekedését (Viljoen 2006).

A kenyérkovászbán például tejsavbaktériumok (*Lactobacillus sanfrancisco*) és élesztőgombák (*Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces exiguus*) élnek együtt (Tamang és mtsai 2016). A *Lactobacillus* fajok elsődlegesen a maltózt hasznosítják. Ebből a tevékenységből felszabaduló glükózt így az élesztők tudják fermentálni. Mivel a *S. exiguus* törzsek nem képesek maltózt hasznosítani, ez a szakasz leginkább kommenzalizmusnak tekinthető. Normál fermentációs körülmények között az élesztők a maltóz lebontásából

felszabaduló glükózt hasznosítják, melynek eredményeképpen CO₂-t termelnek a kelesztéshez (Steinkraus 1979, Sugihara 1985).

A szójaszósز előállításának első szakaszában a keményítő enzimatisz hidrolízise megy végbe az *Aspergillus oryzae* vagy az *Aspergillus sojae* aerob tevékenysége által (Sugiyama 1984). Ezt követően az első szakaszból felszabaduló egyszerű cukrokat a *Lactobacillus delbrueckii*, *Pediococcus halophilus* és *Zygosaccharomyces rouxii* fajok fermentálják anaerob módon. A tejsavbaktériumok tejsavat termelnek, ami csökkenti a pH-t, elősegítve a *Z. rouxii* növekedését, ami erőteljes alkoholos fermentációt eredményez (Sugiyama 1984).

Számos élesztőgomba része a sajtok starterkultúrájának is (Tamang és mtsai 2016). Proteolitikus (Besançon és mtsai 1992) és lipolitikus (Siewert 1986) aktivitásukkal, aromakomponensek képzésével és az érlelésben való részvétellel (Tamang és mtsai 2016) járulnak hozzá a végtermék sajátos jellegéhez. Az élesztőgombák a sajtokban jelen lévő tejsavat hasznosítva növelik a közeg pH-ját, és olyan növekedési faktorokat választanak ki, amelyek elősegítik a *Brevibacterium linens* szaporodását, ami elengedhetetlen a rúzsflórával készült sajt érleléséhez (Marth 1978).

Végül, de nem utolsó sorban több gombafaj, így az élesztőgombák is lehetnek humánpatogének (Deak 2006, Cooper 2011, Inácio és mtsai 2017). A humánpatogén gombák gyakran súlyos fertőzéseket okoznak, elsősorban immunhiányos személyeknél, ezzel jelentősen hozzájárulva e személyek morbiditásához és mortalitásához (Carreras és mtsai 2011).

A legismertebb oportunista humánpatogén élesztőgomba a *Candida albicans*, mely az emberi kandidiázis körülbelül 50–90%-áért felelős (Martins és mtsai 2014). Tanulmányok számolnak be arról, hogy a gombás szepszist gyakran a nem *albicans* fajok, mint például a *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), vagy más nem

Candida fajok, mint a *Naganishia albida* (korábban *Cryptococcus albidus*) vagy a *Kodamaea ohmeri* okozhatják (Lee és mtsai 2004, Pfaller és mtsai 2008, Yang és mtsai 2009, Kothavade és mtsai 2010, Al-Sweih és mtsai 2011, Nagarathnamma és mtsai 2017, Tashiro és mtsai 2018, Vivas és mtsai 2016, Gharehbolagh és mtsai 2017, Osei Sekyere 2018). A *Naganishia albidát* izolálták transzplantáción átesett páciensekből és különböző léziókból (Lee és mtsai 2004, Gharehbolagh és mtsai 2017). A *Pichia kudriavzevii* pedig az ötödik leggyakoribb oka a kandidémiás fertőzéseknek, mely fajt különféle földrajzi régiókban is izolálták hematológiai-onkológiai vagy újszülött osztályokon (Pelletier és mtsai 2005, Pfaller és mtsai 2008, Nagarathnamma és mtsai 2017). *Kodamaea ohmeri* sejteket csecsemőből és újszülöttből, léziókból és vérből is kimutattak (Yang és mtsai 2009, Al-Sweih és mtsai 2011, Vivas és mtsai 2016, Tashiro és mtsai 2018). A trópusi országokban a *C. tropicalis* izolálják az egyik leggyakrabban a kandidémiában és kandiduriában szenvedő emberekből (De Aguiar Cordeiro és mtsai 2015). Ez a gomba embert és állatokat egyaránt képes megfertőzni, emésztőrendszeri inváziókat vagy ízületi gyulladásokat okozva (Kothavade és mtsai 2010, De Aguiar Cordeiro és mtsai 2015, Zuza-Alves és mtsai 2017). A kandidémiát okozó fajok előfordulási gyakorisága függ, az adott régiótól, a betegek életkorától vagy az orvosi beavatkozások típusától (Martins és mtsai 2014). A nem albicans *Candida* vagy más élesztőgomba fajok által okozott fertőzések száma jelentősen megnőtt az elmúlt években. Ezek a fertőzések nagy kihívást jelentenek az egészségügyi szektorban, mivel ezek a humánpatogén gombák erős virulenciával rendelkeznek, és gyakran ellenállnak az általánosan alkalmazott gombaellenes kezeléseknek (Kunyeit és mtsai 2019).

3.2 Élesztőgombák rendszerezése

Az élesztőgombák esetében a fenotípusos különbségeken (spóráképzés, sejt alakja, mérete), fiziológiai kritériumok (szén- és nitrogénforrások hasznosítása, szaporodási tesztek) és a reprodukció módján alapuló faji szintű elkülönítés egészen a kilencvenes évekig meghatározó volt (Barnett 2004). A hetvenes évektől kezdve azonban egyre inkább alapkövetelménnyé vált a molekuláris biológiai módszerek alkalmazása, mivel az örökítő anyag elemzésén alapuló eljárások függetlenek az élesztőgomba fiziológiai állapotától (Kurtzman 1993, Kurtzman és Robnett 1998, Barnett 2004). Ebből kifolyólag az élesztőgombák azonosítása és rendszerezése jelentős átalakuláson ment keresztül az elmúlt évtizedekben. A fajmeghatározásra használt fenotípusos vizsgálatok, amelyek sokszor pontatlanok, napjainkra kiegészültek a riboszómális RNS kis- (SSU) és nagy alegységét (LSU) kódoló gének, valamint az ITS (internal transcribed spacer) régió szekvencia elemzésén alapuló módszerekkel. A génszekvenciák alapján végzett filogenetikai elemzése vezetett az élesztőgombák rendszerezésének felülvizsgálatához, amely majdnem minden nemzetséget érint.

A Wheeler és Meier által szerkesztett 2000-ben megjelent könyvből, melyben a különböző fajkonceptiókat tárgyalják, kiderül, hogy nincs általánosan alkalmazható fajkonceptió (Wheeler és Meier 2000. *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. Columbia University Press). Ami különösen igaz a karakterszegény, nem kizárólagosan szexuálisan szaporodó mikroorganizmusok esetében, mint amilyenek például az élesztőgombák is. Annak eldöntéséhez, hogy egy törzs egy adott fajhoz tartozik-e, fontos ismerni a törzsek hasonlóságát az adott fajon belül (Vu és mtsai 2016). A törzsek élesztőgombafajokon belüli hasonlóságának vizsgálatáról korábban számos tanulmány beszámolt (Peterson és Kurtzman 1991, Kurtzman és

Robnett 1998, Fell és mtsai 2000, Scorzetti és mtsai 2002, Sugita és mtsai 2002, Kurtzman 2014). Ezekben a tanulmányokban az élesztőgombafajok megkülönböztetésére szolgáló küszöbérték megadását a már előzetesen meghatározott élesztőgombafajok fajon belüli törzseinek hasonlóságára alapozva adták meg a kutatók. Míg Vu és munkatársai 2016-ban megjelent cikkében a szerzők a faji szintű taxonómiai határt úgy határozták meg, hogy a fajok közötti hasonlósághoz rendeltek hozzá egy határértéket. A kutatók végül azt a következtetést vonták le, hogy egy élesztőgomba faj törzsei 1%-nál kisebb eltérést mutatnak mind az ITS, mind az LSU régiókban, mely összhangban a van a korábbi tanulmányok eredményeivel.

Mint ahogy a fentiekből kiderült, az egyes élesztőgomba törzsek gyors azonosítására ma már rutinszerűen használjuk a riboszómális RNS nagy alegységét (LSU) kódoló gén D1/D2 régiójának nukleotid szekvenciájából adódó különbségeket, mely régió igencsak konzervált (Kurtzman és Robnett 1998, Scorzetti és mtsai 2002, Lachance 2018).

Az LSU mellett az ITS régiót szintén alkalmazzák az aszkomikóta gombák azonosítására (Schoch és mtsai 2012, Kurtzman és mtsai 2018). Az ITS régió (internal transcribed spacer, ITS1, 5.8S rDNA és ITS2) a riboszómális kis- (SSU 18S) és nagy (LSU 26S) alegységeket kódoló gének között helyezkedik el a riboszómális RNS-t kódoló DNS egységén belül, mely a gombák túlnyomó többségében hosszú egymás utáni ismétlődő blokkokba rendeződött egységet alkot. Multigén család tagjaként ezek az egységek összehangolt evolúciónak vannak kitéve, amely a szekvenciákat homogenizálja (Ganley és Kobayashi 2007). A riboszómális RNS-t kódoló DNS cisztronok nagyon sokszor ismétlődnek a genomban azért, hogy elegendő rRNS termelődhessen/álljon rendelkezésre, amikor nagy szükség van a riboszómákra. A legtöbb olyan fajnál, melyeknél a molekuláris adatok rendelkezésre állnak, a riboszómális RNS-t kódoló DNS cisztronok

jellegzetes intergenikus régiókkal vannak körülvéve, egymás utáni ismétlődésekbe tömörülnek (riboszómális RNS-t kódoló DNS-ismétlődések) folytonos tömböket alkotva (Torres-Machorro és mtsai 2010). A nagyszámú ismétlődések ellenére a nukleotid polimorfizmus a riboszómális RNS-t kódoló DNS sorozaton belül szokatlanul nagyon alacsony (például Ganley és Kobayashi 2007).

Az összehangolt evolúció által (Zimmer és mtsai 1980, Elder és Turner 1995) az ismétlődések a tömbön belül evolúciós időléptékben hosszútávon is egységesek maradnak. Ez biztosítja, hogy az egyik ismétlődésben fellépő mutáció eltűnjön vagy szétterjedjen a tömbön belül, míg nem teljesen fixálódik.

Az ITS régiók együtt íródnak át az rRNS-t kódoló génekkel a cisztronon belül, de az általuk kódolt szakasz végül nem lesz része az érett riboszómának. Egy specifikus hasítási eljárással, amelyet maga az ITS transzkriptum másodlagos szerkezete katalizál, kivágódik a riboszómális prekursor RNS-ből (pre rRNS) (Venema és Tollervey 1999, Coleman 2015). Emiatt az ITS régiók evolúciósan semlegesen fejlődnek (Schlotterer és mtsai 1994), ami alkalmassá teszi őket, mint genomikai markereket, taxonómiai identifikációra és filogenetikai rekonstrukcióra. (Hillis és Dixon 1991). Mivel a szekvencia hasonlóságuk nagyobb fajon belül, mint fajok között, ezért az ITS régió a gombák hivatalos bárkódja lett a közelmúltban (Schoch és mtsai 2012, Wijayawardene és mtsai 2020).

3.3 A *Metschnikowia* nemzetséghez tartozó *pulcherrima* termelő izolátumok rendszertani története

A *Metschnikowiaceae* család jelenleg három nemzetséget foglal magába, ezek a *Clavispora*, *Kodamaea* és a *Metschnikowia* (Wijayawardene és mtsai 2020). A család elkülönülése a *Debaryomycetaceae* kládtól nem egyértelmű és még jelenleg is tisztázásra vár (Shen és mtsai 2016, Wijayawardene és mtsai 2020). A *Metschnikowia* nemzetséget több mint 100 évvel ezelőtt írták le (Kamienksi 1899) (Kurtzman és mtsai 2018). A fajok többsége jellegzetes hosszú, tű alakú aszkospórákat képez. A csoport tagjai világszerte elterjedtek, a szárazföldi fajok többnyire virágokról, gyümölcsök felszínéről származnak. Emellett a *Metschnikowia bicuspidata* klád tagjai a sórák (*Artemia* spp.) parazitái. A *M. pulcherrima* klád pedig különösen értékes a mezőgazdaság számára, mivel a *M. pulcherrima* és a *M. fructicola* biokontroll-szerként hatékonyan gátolja a fonalas gombák által okozott *postharvest* rothadásokat a tárolt gyümölcsökön (Kurtzman és mtsai 2018).

Míg az élesztőgomba fajokat XX. században a metabolikus különbségek alapján különítették el egymástól, a közelmúltban végzett vizsgálatok kimutatták, hogy e klasszikus karakterek között sok esetben megfigyelhető, hogy a különböző taxonokban egymástól függetlenül párhuzamosan alakultak ki (Shen és mtsai 2016). Az élesztőgomba izolátumok DNS alapú filogenetikai elemzése minden taxont érint, mely alól a *Metschnikowia* nemzetség sem kivétel. Többek között ennek is köszönhető, hogy évről évre változik a nemzetségbe sorolt fajok száma. Jó példa erre Kurtzman 2018-ban közölt cikke (Kurtzman és mtsai 2018). A kutatócsoport tagjai molekuláris biológiai módszerekkel újrazvizsgáltak több törzsgyűjteményi izolátumot, melyeket sok évvel korábban fenotípusuk alapján *M. pulcherrima* vagy *Metschnikowia reukaufii* néven azonosítottak. A vizsgálatok eredményeként

így például 4 új *Metschnikowia* faj került leírásra, köztük a *pulcherrimint* termelő *Metschnikowia rubicola* (Kurtzman és mtsai 2018).

Pitt és Miller 1968-ban közölt cikkéből tudjuk, hogy a *pulcherrimin* termelő élesztőgombákról az első leírások a múlt század elején születtek (Lindner 1901) (Pitt és Miller 1968). E két kutató a korábban *Candida pulcherrima*-ként leírt fajt spóráképzésének módja alapján (új név: *Metschnikowia pulcherrima*) a *Metschnikowia* nemzetségbe sorolta. Ily módon a két kutató egységesítette a *pulcherrimin* pigmentet termelő élesztőgombák nevezéktanát és rendszertanát.

A *Metschnikowia pulcherrima* csoportban jelenleg kilenc olyan faj ismert, amelyek mindannyian képesek *pulcherrimin* előállítására (*M. andauensis*, *M. citriensis*, *M. fructicola*, *M. persimmonensis*, *M. pulcherrima*, *M. rubicola*, *M. shanxiensis*, *M. sinensis*, *M. ziziphicola*) (Sipiczki 2020). Itt meg kell jegyezni, hogy a *M. persimmonensis* filogenetikai helyzete bizonytalan, mert a riboszómális RNS géneket kódoló DNS szekvenciái (D1/D2, ITS és 18S) különböző fajok típusörzseinek szekvenciáival mutatják a legnagyobb hasonlóságot, emellett rendszertani leírása sem teljes, de a *M. citriensis* esetében is hasonló problémák merültek föl (Sipiczki 2020).

A *pulcherrimin* termelő élesztőgombákat korábban a hagyományos asszimilációs és szaporodási tesztek, valamint a 26S riboszómális RNS gén D1/D2 régiójának elemzésével kombinálva írták le a kutatók. Azonban ezeknek a ma is használt módszereknek az eredményei a fajok természetes változékonysága miatt néha nagyon bizonytalanok (Kurtzman és Robnett 1998, Kang és mtsai 2017, Kurtzman és mtsai 2018). Erre jó példa a *Metschnikowia* nemzetség *pulcherrimin* termelő csoportjának asszimilációs tesztekre adott válasza. Kurtzman és Droby (2001) például megállapította, hogy a *M. pulcherrima* és a *M. fructicola* ugyanolyan választ ad az

élesztőgomba taxonómiában általánosan alkalmazott standardizált fermentációs és asszimilációs tesztekre.

Ez a nagyfokú fajok közötti hasonlóság, valamint a fajon belüli variabilitás jellemzi a fajcsoport többi tagját is (Molnar 2005, Xue és mtsai 2006, Lachance 2011, 2016, Kurtzman és mtsai 2011, 2018). Ezek az adatok azt sugallják, hogy az asszimilációs tesztek eredményeit nem szabad e fajok azonosításakor alapvető szempontnak tekinteni.

A *Metschnikowia* fajok leírása a hagyományos asszimilációs tesztek és 26S riboszómális RNS-t kódoló DNS nagy alegységének D1/D2 doménjének elemzése alapján történt. Azonban Sipiczki és munkatársai (2013) felvetik annak a lehetőségét, hogy a *pulcherrimin* termelő csoport bizonyos tagjai között a faji határok nem olyan egyértelműek. Két faj 26S riboszómális RNS gén D1/D2 doménjének szekvencia vizsgálata során (*M. fructicola*, *M. andauensis*) az egy telepől kiinduló DNS izolálást követően felszaporított riboszómális RNS-t kódoló DNS szakaszt klónozva meglepő módon azt tapasztalták, hogy egy izolátumon belül is nagy lehet a változatosság. A két típus törzsből származó klónozott szekvenciák egymással keveredve alkotnak kisebb csoportokat a törzsfán, vagyis nem különülnek el jól egymástól. Ez azt jelenti, hogy a típus törzsek D1/D2 doménje igencsak heterogén.

3.4 A *pulcherrimin* termelő *Metschnikowia* fajok jellemzése

3.4.1 A *pulcherrimin* termelő *Metschnikowia* izolátumok szerepe a gyümölcsök és zöldségek védelmében

A *Metschnikowia* nemzetség *pulcherrimin* termelő tagjai közül a mai napig a *M. pulcherrima* (Piano és mtsai 1997, Janisiewicz és mtsai 2008, Spadaro és mtsai 2010ab, De Curtis és mtsai 2012, Türkel és mtsai 2014, Oro és mtsai 2018, Wachowska és mtsai 2018, stb.), a *M. fructicola* (Kurtzman és Droby 2001, Karabulut és mtsai 2005, Hershkovitz és mtsai 2013, Banani és mtsai 2015, Lorenzini és mtsai 2018, stb.), a *M. andauensis* (Manso és Nunes 2011, 2014), a *M. citriensis* (Liu és mtsai 2019) és a *M. persimmonesis* (Kang és mtsai 2017) fajok antagonista hatását tanulmányozták a kutatók.

A *M. fructicola* felhasználásával növényvédő szer is készült, mely a kétezres évek elején került kereskedelmi forgalomba (ShemerTM; *Metschnikowia fructicola*, Bayer Crop Science, AG).

Az élesztőgombákat alkalmazhatjuk mind a szüretelést követő ún. *postharvest*, mind a betakarítást megelőző (*preharvest*) időszakban is (Karabulut és mtsai 2003). Valamint lehetőség van akár integrált használatukra is, mivel bizonyos peszticideknek (kén, réz, etanol, acibenzolár) minimális negatív hatása van rájuk. Mi több, a különböző vegyszerekkel történő együttes használatuk (pl. nátrium-hidrogén-karbonát, CaCl₂) növelheti is a növénypatogénekkel szembeni hatékonyságukat (Spadaro és mtsai 2004a, Comitini és Ciani 2008, Csutak és mtsai 2013, Cordero-Bueso és mtsai 2014, Grangeteau és mtsai 2017). Ezen kívül a még hatékonyabb védelem érdekében kombinálhatjuk őket egyéb antagonista mikrobákkal, mint például a *Papiliotrema laurentii* (korábban: *Cryptococcus laurentii*) (Janisiewicz és mtsai 2008, Conway és mtsai 2005) vagy *Kloeckera apiculata* (ivaros alak *Hanseniaspora uvarum*) (Karabulut és mtsai 2005).

A szóban forgó élesztőgombákat a növénypatogének számos képviselőjével szemben tesztelték a kutatók. A mezőgazdasági kártevők közül hatékonyan veszik fel a versenyt a szüretelést követően fellépő *postharvest* patogének közül például az *Aspergillus carbonarius* (Bleve és mtsai 2006, Türkel és Ener 2009, De Curtis és mtsai 2012, Oro és mtsai 2018), az *Aspergillus clavatus* (Sipiczki 2006), az *Aspergillus flavus* (Türkel és Ener 2009), az *Aspergillus fumigatus* (Türkel és Ener 2009), az *Aspergillus flavipes* (Sisti és Savini 2014), az *Aspergillus oryzae* (Türkel és mtsai 2014), az *Aspergillus parasitarius* (Türkel és mtsai 2014), az *Aspergillus rubrum*, az *Aspergillus terreus*, az *Aspergillus versicolor* (Sisti és Savini 2014), a *Botrytis cinerea* (Piano és mtsai 1997, Sipiczki 2006, Ruiz-Moyano és mtsai 2016, Oro és mtsai 2018), a *Colletotrichum acutatum* (Conway és mtsai 2005, Oro és mtsai 2018), a *Gilbertella persicaria* (Sipiczki 2006), a *Monilinia fructicola* (Banani és mtsai 2015, Oro és mtsai 2018), a *Monilinia laxa* (Zhang és mtsai 2010, Oro és mtsai 2014a, Ruiz-Moyano és mtsai 2016), a *Monilinia* spp. (Spadaro és mtsai 2002), a *Mucor circinelloides* (Sipiczki 2006), a *Mucor piriformis* (Sipiczki 2006), a *Penicillium digitatum* (Kinay és Yildiz 2008, HersHKovitz és mtsai 2013, Oro és mtsai 2018), a *Penicillium expansum* (Spadaro és mtsai 2002, Karabulut és mtsai 2005, Janisiewicz és mtsai 2008, Liu és mtsai 2011, de Paiva és mtsai 2017), a *Penicillium glabrum* (Sinigaglia és mtsai 1998), a *Penicillium italicum* (Manso és Nunes 2011, Türkel és mtsai 2014), a *Penicillium roqueforti* (Türkel és mtsai 2014), a *Rhizopus stolonifer* (Sipiczki 2006, Manso és Nunes 2011), a *Rhizopus* sp. (Türkel és mtsai 2014) fajokkal szemben.

A pigmenttermelő *Metschnikowia* élesztőgombák a legeredményesebb gátlást a szürkepenészes rothadást okozó *B. cinerea* ellen érik el, míg például az *Alternaria* sp. (Karabulut és mtsai 2003, Spadaro és mtsai 2002), *Alternaria alternata* (Oro és mtsai 2018, Prendes és mtsai 2018), *Aspergillus niger*

(Karabulut és mtsai 2003, Bleve és mtsai 2006, Sipiczki 2006, Türkel és Ener 2009, Türkel és mtsai 2014), *Fusarium* sp. (Türkel és mtsai 2014) patogénekkal szemben kevésbé tudják felvenni a versenyt.

A *Metschnikowia* élesztőgombák előnye, hogy többféle gyümölcs tárolása során is alkalmazhatóak a *postharvest* patogénekkal szemben. Legyen szó különböző alma termésűekről: alma (Manso és Nunes 2011, Spadaro és mtsai 2002, 2004a, 2010a, 2013, Conway és mtsai 2005, Janisiewicz és mtsai 2001, Piano és mtsai 1997), körte (Manso és Nunes 2011, Sipiczki 2020), vagy csonthéjasokról: őszibarack (Zhang és mtsai 2010, Banani és mtsai 2015), nektarin (Ruiz-Moyano és mtsai 2016), cseresznye (Karabulut és mtsai 2005, Oro és mtsai 2014b, de Paiva és mtsai 2017); citrusfélékről: narancs, mandarin, grapefruit (Kinay és Yildiz 2008, Manso és Nunes 2011, Hershkowitz 2013, Parafati és mtsai 2016); vagy úgynevezett bogyós termésű gyümölcsökről mint például a szőlő (Karabulut és mtsai 2003, Parafati és mtsai 2015) vagy az eper (Oro és mtsai 2018).

Ezen felül egyes *Metschnikowia* fajok képesek bizonyos humánpatogének szaporodását is visszaszorítani *in vitro* petri-csészén: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* (Türkel és Ener 2009, Csutak és mtsai 2013, Robledo-Leal és mtsai 2018); *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton shoenleinii*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans* (Sisti és Savini 2014); *Trichosporon mucoides*, *Trichoderma* spp. (Türkel és Ener 2009); *Proteus vulgaris* (Türkel és Ener 2009); *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* (Leverentz és mtsai 2006); *Escherichia coli* (Sipiczki 2006).

3.4.2 A *pulcherrimin* termelő *Metschnikowia* izolátumok antagonista hatásmechanizmusa

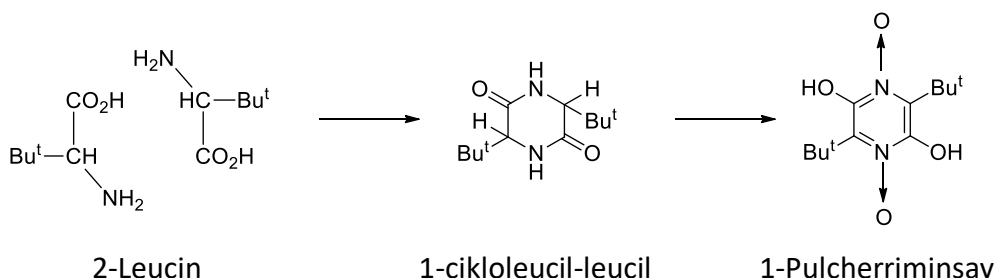
A *Metschnikowia* nemzetség egyes tagjai vöröses-gesztenyebarna pigmentet (*pulcherrimin*) termelnek, amely egy diffúzibilis szintelen előanyagból alakul ki. A pigment felhalmozódik az élesztőgombák körül a táptalajban egy pigmentált udvart létrehozva. A zóna határát elérve a gyümölcsök *postharvest* romlását okozó fonalas gombák növekedése megtorpan, így azok bizonyos ideig nem képesek tovább terjeszkedni az élesztőgomba által képzett telep irányába (Sipiczki 2006, Sipiczki 2020). A zónát elérve a fonalas gombák által képzett hifák végeiken lizálnak, növekedésük leáll.

A nagyobb pigmentált udvart kialakító élesztőgomba izolátumok nagyobb gátló zónát képeznek a fonalas gombákkal szemben. Ez már önmagában is bizonyítja a *pulcherrimin* pigment és az antagonizmus közötti összefüggést. A mesterségesen létrehozott pigmentet nem termelő mutánsok pedig nem képesek gátolni a fonalas gombák növekedését (Sipiczki 2006).

A *Metschnikowia pulcherrima* által termelt *pulcherrimin* vizsgálatával, szerkezetének meghatározásával már a múlt században is foglalkoztak a kutatók. Már akkor kiderült, hogy az anyag nagyon különbözik a korall rózsaszín vagy vörös pigmentektől (ezek általában zsírban oldódó karotinoidok), amelyeket a kromogén élesztőgombák gyakran termelnek (Punkari és Henrici 1933, Kluyver és mtsai 1953). Kluyver 1953-ban megjelent cikkében (Kluyver és mtsai 1953) felmerült, hogy talán sziderofór (sziderofórok: olyan kelát képző anyagok, melyek segítségével a vas sejtbe való transzportja megvalósul) lehet a szóban forgó vegyület, de a későbbi vizsgálatok ezt is cáfolták (Cook és Slater 1956, MacDonald 1965). Ezen kívül Sipiczki 2006-os cikkében rávilágít arra, hogy a sziderofóroktól eltérő

módon a *pulcherrimin* képződése során megköti a vasat és immobilizálódik a táptalajban.

A *pulcherrimin* egy dibázikus, diffúzibilis széntelen előanyagból, az úgynevezett *pulcherriminsav*ból alakul ki spontán módon, tehát nem enzimatis reakciók révén. A prekursor lehetséges keletkezésének módját, melynek alap építő eleme a leucin, MacDonald írta le 1965-ben (MacDonald 1965). Az 1. ábra. A *pulcherriminsav* keletkezésének lépései (MacDonald 1965 alapján, saját szerkesztés) szemlélteti a folyamatot, mely MacDonald eredményei szerint a sejten belül játszódik le. Ezt a feltételezést erősítheti meg Sipiczki megfigyelése, aki a következő kísérletet hajtotta végre. Leucint nem tartalmazó táptalajra oltott egy leucin auxotrófiával rendelkező *Schizosaccharomyces pombe* törzset, mely mellé egy *pulcherrimin* termelő izolátumot helyezett. A leucin előállítására nem képes *S. pombe* törzs nem tudott szaporodni a *Metschnikowia* izolátum jelenlétében (Sipiczki 2006). Ez az eredmény arra utalhat, hogy a *pulcherriminsav* alapvető építő eleme a leucin nincs jelen a táptalajban, tehát a prekursor előállítása nem a sejten kívül történik.



1. ábra. A *pulcherriminsav* keletkezésének lépései (MacDonald 1965 alapján, saját szerkesztés)

Az előanyag a táptalajban diffúz módon terjed, majd vas ionnal (Fe^{3+}) találkozva oxigén jelenlétében komplexet alkot, aminek következtében mobilitását elveszti (MacDonald 1965). Az így keletkezett nagy

molekulatömegű pigment vízben és szerves savakban oldhatatlan (Kluyver Kluyver és mtsai 1953, Cook és Slater 1954).

A *pulcherrimin* képződését az elmúlt évtizedekben több szempontból is vizsgálták.

A vas jelenléte a táptalajban például elengedhetetlen a pigment képződéséhez (Punkari és Henrici 1933). Roberts (1946) pedig rámutatott arra, hogy minél több a táptalaj vas tartalma (vas (III)-ammónium-citrát, vas (III)-ammónium-szulfát), annál erősebb a pigment színének intenzitása és ezzel ellentétes a pigment kiterjedése a tápközegben. Sipiczki (2006) tropolonnal végzett kísérlete pedig szintén igazolja, hogy a pigment képződéséhez vas jelenléte szükséges. A tropolonról tudni lehet, hogy nagy affinitással kötődik a vashoz (Diouf és mtsai 2002). Tropolon jelenlétében a *Metschnikowia* által képzett kolónia nem vált pirossá, és nem alkotott pigmentált udvart az agarban (Sipiczki 2006).

Němcová (2021) kutatócsoportjának Raman-spektroszkópiás eredményei pedig azt bizonyítják, hogy minél nagyobb a táptalaj vas tartalma, annál nagyobb mennyiségben képződik a pigment. Mindemellett leírják, hogy a vas koncentráció függvényében módosul a pigment tápközegben vagy biomasszában történő felhalmozódása. Ha a közegben a vas mennyisége egy bizonyos szinten van, akkor pigmentáció tapasztalható a biomasszában és a közegben is. Ezt a szintet kritikus szintként definiálják, és különbözik a különféle baktérium- és élesztőgomba törzseknél. Ha a vas szintje a kritikus szint alatt van, akkor a pigment megjelenése a táptalajban figyelhető meg, azonban amikor a közegben a vas szintje magasabb, a biomasszában lép fel pigmentáció, és a tenyésztő közeg színe nem változik. Így a biomassza vagy a közeg színintenzitása a vasionok koncentrációjától függ (Němcová és mtsai 2021).

Roberts (1946) szerint a vas megkötésére befolyással lehet a tápközeg kémhatása, mivel a pH emelkedésével kevesebb vas(III)-ion áll rendelkezésre. Ő úgy tapasztalta, hogy a pH csökkenésével nő a pigment intenzitása és ezzel ellentétesen csökken a pigmentált terület mérete. Az oxigén szintén befolyással lehet a pigment kialakulására. Punkari (Punkari és Henrici 1933) is megemlíti cikkében, hogy a pigment kialakulása oxigén és vas-só jelenlétében történik. Roberts (1946) pedig leírja, hogy az oxigénhiányos körülmények között tenyésztett élesztőgomba nem termel pigmentet (igaz oxigén hiányos környezetben maga az élesztőgomba is igen lassan szaporodik). Szintén e cikkben említik, hogy az anaerob körülmények között tenyésztett telepeket aerob körülmények közé téve, a pigment képzés 5 és fél óra múlva megindul. Kluver, aki a pigment szerkezetének meghatározásán dolgozott, 1953-ban megjelent cikkében (Kluver és mtsai 1953) leírja, hogy több pigmentet tudtak kinyerni a petri-csészén, oxigén dús körülmények között tartott tenyészetből, mint a folyadékban szaporított élesztőgombákból, akár álló, akár rázatott kultúráról legyen szó.

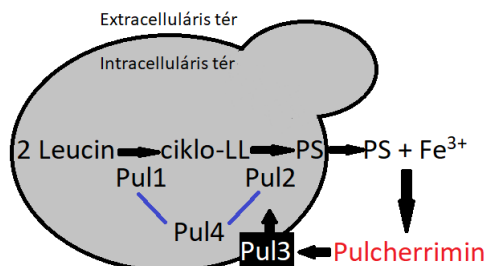
Roberts (1946) kijelenti, hogy a fény nem befolyásolja a pigment termelését, hiszen a sötétben, természetes, illetve mesterséges fényben nevelt tenyészetek pigmenttermelésében nem figyeltek meg különbséget. A hőmérséklet hatását is több kutató tanulmányozta. Roberts (1946) a legintenzívebb pigmenttermelést 7 °C és 13 °C között tapasztalta. Emellett megfigyelte azt is, hogy a diffúzió mértéke a hőmérséklet emelkedésével egyenes arányban növekszik 31 °C-ig, a magasabb hőmérsékletekről nem tesz említést. Végül azt a következtetést vonta le, hogy a hőmérséklet valószínűleg nem a pigment termelésére van hatással, hanem magát a diffúziót befolyásolja. Melvydas és mtsai (2016) azt szerették volna kideríteni, hogy a *Metschnikowia* telepek körül megjelenő pigment mikor és miért alkot koncentrikus köröket. Vizsgálataik során megfigyelték, hogy az alacsonyabb (20 °C, 25 °C)

hőmérséklet jobban kedvez a koncentrikusság kialakulásának, míg 30 °C-on egyetlenegy darab erősen pigmentált gyűrűt figyeltek meg.

Fontos hatása van még a *Metschnikowia* sejtek közötti kölcsönhatásnak is. Roberts (1946) megfigyelte, hogy a telepek körül kialakult zóna annál nagyobb, minél hígabb sejt szuszpenziót viszünk ki a táptalajra. És mivel a pigmentált területen belülről nem képesek terjeszkedni a fonalas gombák, a zóna méretének igen nagy jelentősége van a gátlás szempontjából.

A biokontroll élesztőgombák túlélése szempontjából az is fontos, hogy milyen tápanyagokkal együtt kerülnek a természetbe. Ez befolyásolhatja antagonista mechanizmusának kifejeződését is. Sipiczki (2006) és Melvydas és mtsai (2016) is megállapították, hogy a komplett táptalaj jobban kedvez a *pulcherrimin* képződésének a minimális tápanyag tartalmú táptalajokkal szemben.

Ma már arra is lehetőségünk van, hogy a végtermék szerkezeti elemzése mellett az anyag keletkezésének molekuláris biológiai hátterét is feltárjuk. Krause és mtsai (2018) a *pulcherrimin* termelő *Kluyveromyces lactis* vizsgálata során egy 4 génből álló géncsoportot azonosított, melyek a *pulcherrimin* bioszintéziséért és felhasználásáért lehetnek felelősek. A négy gén közül kettő a PUL1 és PUL2 a *pulcherrimininsav* (PS) szintézisét végző enzimeket kódol, a PUL4 egy transzkripciósfaktor, mely a PUL1 és PUL2 működését szabályozza, míg a PUL3 a pigment transzportját teszi lehetővé (2. ábra).



2. ábra. A PUL gének feltételezett szerepének modellje a pigment termelésében és újrafelvételben (Krause 2018 alapján saját szerkesztés). PUL1 és PUL2 a pulcherriminsav (PS) szintézisét végző enzimeket kódol, a PUL4 egy transzkripció faktor, mely a PUL1 és PUL2 működését szabályozza, míg a PUL3 a pigment transzportját teszi lehetővé. A kék vonalak a PUL gén expressziójának PUL4 általi szabályozását jelentik.

A géncsoportot bioinformatikai módszerekkel a *Metschnikowia fructicola* egy izolátumában is azonosítani tudták. A kutatócsoport azt is megállapította, hogy számos faj, köztük a *Saccharomyces cerevisiae* is csak a két felhasználásért felelős gént tartalmazza. Ezek a teljes PUL klasztert nem tartalmazó fajok sohasem pigmentáltak. A géncsoport filogenetikai elemzése pedig azt sugallja, hogy a *pulcherrimin* bioszintézise és felhasználása ősi eredetű a sarjadzó élesztőgombáknál, viszont a gének egy része sok fajban elveszett az evolúció során (Krause és mtsai 2018).

Habár egy a *pulcherrimin* termelésért felelős génklasztert már azonosítottak a kutatók, jelenleg még mindig nincs teljes képünk a mechanizmusról, mely valószínűleg egy igen összetett, több környezeti tényező és gén által befolyásolt folyamat. Gore-Lloyd és mtsi (2018) például egy transzkripció faktort kódoló gént (*snf2*) azonosítottak, melyben egy pontmutáció korai stop kodont eredményezett. Az *snf2* pigmentet nem termelő mutánsokban a PUL1/PUL2 gének transzkripció szintje is erősen csökkent, ami arra enged következtetni, hogy az *snf2*-nek regulátor szerepe van a *pulcherrimin* bioszintézisében. Továbbá a kutatócsoport kimutatta, hogy az *snf2* mutáns nem szintetizálta a *pulcherrimin* egyik prekursorát sem, illetve nem tudták azonosítani egyik bomlástermékét sem, valamint antagonistá hatása is csökkent.

Mindezekből az adatokból láthatjuk, hogy több nyitott kérdés is van a pigment termelésével kapcsolatban. Mivel a pigment termelése és az élesztőgomba antagonistája hatása szorosan összefügg, fontos hogy minél többet tudjunk meg a *pulcherrimin* szintéziséről és az azt befolyásoló külső környezeti és belső örökletes tényezőkről.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált törzsek

1. táblázat. A kísérletekbe bevont törzsek listája. Az élesztőgombák gyűjtését és azonosítását a 26S riboszómális RNS gén D1/D2 régiója alapján Sipiczki Mátyás végezte.

Faj neve	Azonosító	Eredet
<i>Aureobasidium pullulans</i>	11-501	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Botrytis cinerea</i>	T4	Levis és mtsai (1997)
<i>Botrytis cinerea</i>	1	Magyarország, Tarcál
<i>Candida boidinii</i>	11-484	Brunei (Borneó)
<i>Candida butyri</i>	11-513	Laosz, Luangprabang
<i>Candida citri</i>	11-469	Brunei (Borneó)
<i>Candida ethanolica</i>	11-473	Brunei (Borneó)
<i>Candida glabrata</i>	11-523	Laosz, Vientián
<i>Candida insectorum</i>	11-1193	Palau, Ngerekebesang
<i>Candida intermedia</i>	11-504	Laosz, Luangprabang
<i>Candida jaroonii</i>	11-506	Laosz, Luangprabang
<i>Candida jaroonii</i>	11-512	Laosz, Luangprabang
<i>Candida jaroonii</i>	11-514	Laosz, Luangprabang
<i>Candida magnifica</i>	2-1366	SzírIA, Palmüra
<i>Candida orthopsilosis</i>	11-493	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Candida parapsilosis</i>	11-519	Laosz, Vientián
<i>Candida parapsilosis</i>	11-525	Laosz, Vientián
<i>Candida pseudointermedia</i>	11-488	Brunei (Borneó)
<i>Candida stigmatis</i>	11-465	India, Haidarábád
<i>Candida suratensis</i>	11-507	Laosz, Luangprabang
<i>Candida suratensis</i>	11-509	Laosz, Luangprabang
<i>Candida suratensis</i>	11-510	Laosz, Luangprabang
<i>Candida tropicalis</i>	11-471	Fülöp-szigetek, Caticlan
<i>Candida tropicalis</i>	11-476	Brunei (Borneó)
<i>Candida tropicalis</i>	11-521	Laosz, Vientián
<i>Candida tropicalis</i>	11-1188	Palau, Ngerekebesang

<i>Candida verbasci</i>	11-1055	Grúzia, Tbiliszi
<i>Diutina bernali</i>	DEBM179	Barro Colorado-sziget, Panama
<i>Diutina sipiczki</i>	DEBM180	Barro Colorado-sziget, Panama
<i>Diutina sipiczki</i>	DEBM181	Barro Colorado-sziget, Panama
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	11-472	Brunei (Borneó)
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	11-491	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	11-492	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	11-495	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	11-497	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	11-499	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11-494	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Kodamaea ohmeri</i>	11-466	India, Haidarábád
<i>Kodamaea ohmeri</i>	11-490	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Kodamaea ohmeri</i>	11-500	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Kuraishia borneana</i> (korábban <i>Candida borneana</i>)	11-487	Brunei (Borneó)
<i>Kwoniella heveanensis</i>	11-515	Laosz, Vientián
<i>Kwoniella heveanensis</i> (korábban <i>Cryptococcus heveanensis</i>)	11-518	Laosz, Vientián
<i>Metahyphopichia laotica</i>	11-511	Laosz, Luangprabang
<i>Metahyphopichia laotica</i>	11-516	Laosz, Vientián
<i>Metschnikowia andauensis</i> HA 1657	11-1120	Austrian Centre of Biological Resources and Applied Mycology (ACBR), University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Austria
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i> CBS 9803	11-1158	Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands
<i>Metschnikowia fructicola</i> CBS 8853	11-579	Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands

<i>Metschnikowia koreensis</i>	11-464	India, Haidarábád
<i>Metschnikowia koreensis</i>	11-482	Brunei (Borneó)
<i>Metschnikowia laotica</i>	11-524	Laosz, Luangprabang
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CBS 5833	11-578	Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CBS 610	11-11	Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	11-1069	Grúzia, Gori
<i>Metschnikowia shanxiensis</i> CBS 10359	11-1090	Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands
<i>Metschnikowia sinensis</i> CBS 10357	11-1088	Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands
<i>Metschnikowia</i> sp.	9/2/18	Magyarország, Szerencs
<i>Metschnikowia</i> sp.	62/1/3	Magyarország, Nyírbátor
<i>Metschnikowia</i> sp.	11-1062	Grúzia, Tbiliszi
<i>Metschnikowia ziziphicola</i> CBS 10358	11-1089	Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands
<i>Meyerozyma caribbica</i>	11-505	Laosz, Luangprabang
<i>Naganishia albida</i>	2-1365	Szíría, Aleppó
<i>Ogataea dorogensis</i>	11-486	Brunei (Borneó)
<i>Ogataea minuta</i>	11-483	Brunei (Borneó)
<i>Papiliotrema flavescens</i> (korábban <i>Cryptococcus</i> <i>flavescens</i>)	11-489	Fülöp-szigetek, Banaue
<i>Pichia bruneiensis</i>	11-485	Brunei (Borneó)
<i>Pichia kluyveri</i>	11-1135	Guatemala, Tikal
<i>Pichia kudriavzevii</i>	11-460	Sri Lanka, Colombo
<i>Pichia kudriavzevii</i>	11-462	Sri Lanka, Colombo
<i>Pichia kudriavzevii</i>	11-498	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Pichia kudriavzevii</i>	11-1146	Salvador
<i>Pichia kudriavzevii</i>	11-1147	Salvador

<i>Pichia manshurica</i>	11-480	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Pichia chibodasensis</i>	11-477	Brunei (Borneó)
<i>Pichia chibodasensis</i>	11-478	Brunei (Borneó)
<i>Pichia terricola</i> (korábban <i>Issatchenkia terricola</i>)	11-475	Brunei (Borneó)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	S288c	Yeast Genetic Stock, Berkeley, California
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11-481	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	11-463	Sri Lanka, Colombo
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	11-496	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Saturnispora diversa</i> (korábban <i>Candida diversa</i>)	11-470	Brunei (Borneó)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> CBS 7264; L972h ⁻	L972h-	U. Leopold, Bern
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	11-1185	Palau, Ngerekebesang
<i>Starmerella bacillaris</i> (korábban <i>Candida zemplinina</i>)	11-479	Fülöp-szigetek, Manila
<i>Starmerella caucascia</i>	11-1071	Azerbajdzsán, Baku
<i>Starmerella meliponinorum</i>	11-467	India, Haidarábád
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	11-468	Brunei (Borneó)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	11-474	Brunei (Borneó)
<i>Trichosporon asahii</i>	11-1127	Guatemala, Tikal
<i>Wickerhamiella sergipiensis</i> (korábban <i>Candida sergipensis</i>)	11-517	Laosz, Vientián
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	11-502	Laosz, Luangprabang
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	11-503	Laosz, Luangprabang
<i>Wickerhamomyces orientalis</i>	11-461	Sri Lanka, Gálle
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (korábban <i>Pichia anomala</i>)	11-520	Laosz, Vientián
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (korábban <i>Pichia anomala</i>)	11-522	Laosz, Vientián

4.2 Anyagok

4.2.1 Felhasznált tápközegek

2. táblázat. A kísérletek során felhasznált tápközegek.

<u>EMMA 100 ml</u> 0,3 g $C_8H_5O_4K$ 0,55 g $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ 0,5 g NH_4Cl 2,0 g glükóz 2 ml EMMML sóoldat 0,1 ml vitamin oldat 0,01 ml nyomelem oldat 2,0 g agar	<u>SML/SMA 100 ml</u> 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 g KH_2PO_4 (7,4 mM) 0,05 g $MgSO_4 \times 7H_2O$ 1,5 g glükóz 100 μl Wickerham vitamin oldat SMA: + 2,0 g agar	<u>PEA 100 ml</u> (Fluka 07915) 3,9 g Burgonya kivonat 2,0 g agar
<u>PDA 100 ml</u> (potato dextrose agar) (Scharlau 01-483-500) 3,9 g burgonya glükóz 2,0 agar	<u>PDB 100 ml</u> (potato dextrose broth) (Scharlau 02-483-500) 2,4 g burgonya glükóz	<u>YEA 100 ml</u> 1,0 g élesztőgomba kivonat 2,0 g glükóz 2,0 g agar
<u>YPL/YPA 100 ml</u> 2,0 g élesztőgomba kivonat 2,0 g pepton 4,0 g glükóz YPA: + 2,0 g agar	<u>YM/YMA 100 ml</u> 0,3 g maláta kivonat 0,3 g élesztőgomba kivonat 5,0 g pepton 1,0 g glükóz YMA: + 2,0 g agar)	<u>YNBA 100 ml</u> (yeast nitrogen base) (Difco 239210) 0,67 g élesztőgomba nitrogén bázis 2,0 g agar
<u>V8 100 ml</u> (1:19) 95 ml desztillált víz 5 ml szűrt V8 zöldséglé 2,0 g agar pH= 5,2	<u>LB/LBA 100 ml</u> 1,0 g Tripton 1,0 g NaCl 0,5 g Élesztőgomba kivonat LBA: + 2,0 g agar	

4.2.2 Oldatok

3. táblázat. A kísérletek során felhasznált oldatok.

<u>FeCl₃-oldat</u> 100 ml (10 mg/ml) 1 g FeCl ₃ 100 ml Millipore víz	<u>CuSO₄-oldat törzsoldat</u> 100 ml (10 mg/ml) 1 g CuSO ₄ 100 ml Millipore víz	<u>10xTE-oldat</u> 100 mM Tris 100 mM EDTA (pH=8,0)
<u>CPES puffer</u> Citromsav 40 mM Na ₂ HPO ₄ 120 mM (pH= 6,0) EDTA 20 mM Sorbitol 1,2 M	<u>Lízis puffer</u> EDTA 0,45 M (pH=8,0) Tris 10mM (pH= 8,0) N-Laurylsarcosine1% 0,5 mg/ml Proteinase K (Sigma 1002133245)	<u>Zymoliase-20T törzsoldat</u> (20 mg/ml) (MP Biomedicals ImmunO™) 20 mg Zymoliase-20T 1 ml CPES puffer
<u>Alacsony olvadáspontú agaróz gél</u> (1%) 10 ml (BioRad) 0,1 g alacsony olvadáspontú agaróz 10 ml CPES puffer	<u>Agaróz gél</u> 100ml (1,0 %) (BioRad) 1,0 g agaróz gél 100 ml 1 X TBE puffer	<u>1 X TBE puffer</u> EDTA 0,5 M, pH= 8,0 Bórsav 0,5 M

4.3 Módszerek és kivitelezés

4.3.1 Taxonómiai vizsgálatok

4.3.1.1 Asszimilációs és szaporodási tesztek

Az egy éjszakás, 28 °C-on YPL tápfolyadékban inkubált élesztőgomba tenyészetből 1 ml desztillált vízzel szuszpenziókat készítettünk Eppendorf-csőben. A szuszpendált sejteket különböző szén-, és nitrogénforrást tartalmazó táptalajra helyeztük, mindegyik mintából 5-5 db 20µl-es cseppet pipettáztunk a táptalajokra. A vizsgálathoz YNBA táptalajt használtunk fel, melyben a glükózt különböző szén- és nitrogénforrásokat alkalmaztunk (1. melléklet).

4.3.1.2 Genomi DNS izolálása

A genomi DNS kivonása a sejtekből Hoffman és Winston (1987) leírása alapján történt a következő módon:

Egy éjszakás, 28 °C-on YPA táptalajon inkubált sejttenyészetből gombostűfejnyi mintát szuszpendáltunk 100 µl LiAc 200 mM+1%-os SDS-t tartalmazó mikrocentrifuga csövekben. Ezt követően a mintákat 5 percig inkubáltuk szárazblokkban 95 °C-on, majd jégre helyeztük. A következő lépésben 400-400 µl abszolút etanolt adtunk a csövekhez és -20 °C-on, 30 percig inkubáltuk. Utolsó lépésben a mintákat centrifugáltuk (10000 rpm, 4 °C, 5 perc), eltávolítottuk a felülúszót, végül a genomi DNS-t 1x-es TE oldatban vettük fel.

4.3.1.3 PCR (Polymerase chain reaction)

A kísérlet során a következő reakcióelegyet mértük össze:

34 µl szűrt (MilliporeQ) víz

0,6 µl MgCl₂ (25 mM)

10 µl GoTaq puffer 10x (Promega)

1 µl dNTP mix (5 mM dATP, 5 mM dTTP, 5 mM dGTP, 5 mM dCTP)
(Fermentas MBI)

1,5-1,5 µl forward és reverse primer (0,5 µM) (IDT, Inc.)

0,4 µl GoTaq Polymerase enzim (5 u/µl) (Promega)

A reakcióelegyhez 1,0 µl (100 mM) genomiális DNS-t adtunk.

A reakciót a következő paraméterekkel végeztük:

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 ∞ (Applied Biosystem 2720)

Alkalmazott primerek (White és mtsai 1990):

ITS1 (381) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4 (382) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

5 µl PCR termék és 5 µl - a minta vándorlásának szemmel történő követését lehetővé tévő - puffer (Thermo Scientific™, DNA Gel Loading Dye 6X) elegyét 100 ml 1%-os agaróz gélben (hozzáadva 5 µl etídium-bromid 10 mg/ml törzsoldatból, Sigma E8751-5G), 1x TBE pufferben 120 V-on futtattuk. A futtatás során GeneRuler 1 kb DNS markert (Fermentas MBI, SM 0311) alkalmaztunk.

A DNS fragmenseket a BioDoc-It Imaging System UV transzillumiátorával tettük láthatóvá.

A keletkezett PCR termékeket Na-acetát-etanolos módszerrel tisztítottuk. A 45µl térfogatú termékhez 4,5µl 3M-os nátrium acetátot adtunk és 112,5 µl - 20°C-os 100%-os etanolt adtunk, a mixet szuszpendáltuk, majd szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk. Ezután 5 percig 10000rpm-en centrifugáltuk, majd a leöntöttük a felülúszót. A tisztított minták beszáritása steril lamináris fülkében történt, 30 percen keresztül. Majd a terméket 25 µl nukleáz mentes vízben vettük fel.

4.3.1.4 Az amplifikált ITS1-5.8S-ITS2 kódoló régió klónozása

Az 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.

Plazmid konstrukció létrehozása

Első lépésben 1 µl tisztított PCR terméket, 10 µl reakció puffert, 1 µl DNA Blunting enzimet és 6 µl nukleáz mentes vizet mértünk össze eppendorf csövekben. A mintákat szuszpendáltuk, majd 70 °C-on 5 percig inkubáltuk. A következő lépésben 1 µl pJET 1.2. Blunt cloning vectort, 1 µl T4 DNS ligáz enzimet adtunk a jégre helyezett mintákhoz. Ezt egy 30 perces inkubáció követte szobahőmérsékleten.

***E. coli* DH5-alpha kompetens sejtek transzformálása**

Kompetens sejteket hozzáadtuk a reakcióelegyhez, majd a mintákat 30 percig inkubáltuk jégen. Ezt követően a kompetens sejteket 42 °C-on 2 percig inkubáltuk (hősokk). Majd 600 µl LB-t adtunk a szuszpenzióhoz, majd ismét inkubációs lépés következett 37 °C-on 30 percig. A regenerálódott tenyészetekből 200-200 µl-t szélesztettünk ampicillint (100 µg/mL)

tartalmazó LB csészékre. Tenyészeteket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk, majd izoláltuk a transzformáns telepeket.

4.3.1.5 ITS szekvenciák keresése a *Metschnikowia fructicola* CBS 8853^T genom szekvenciájában

Azt a szekvenciát használtuk fel az ITS szegmensek kereséséhez a *M. fructicola* genomban (ANFW000000000.2, NCBI Genome database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>), melyet több klónban is megtaláltunk (Ifrb17). Minden genomiális ITS1-5.8S-ITS2 szakaszt összehasonlítottunk egymással és a klónozott szekvenciákkal a bl2seq alkalmazással

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&DATABASE=n/a&QUERY=&SUBJECTS=).

4.3.1.6 Szekvencia elemzés

Az ITS1 és ITS4 (White és mtsai 1990) primereket felhasználva amplifikáltuk az ITS1-5.8S-ITS2 kódoló régiót. Az amplifikátumok szekvencia meghatározását a GENEART AG, németországi laboratóriumában végezték. A szakaszok szekvencia meghatározása két irányból történt. A szekvenciákat a GenBankban helyeztük el (KM213977-KM213984 és KM243743-KM243748). A PCR termékek szekvencia eredményeinek kiértékeléséhez a National Center for Biotechnology Information adatbázis BLAST szolgáltatását használtuk fel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi>).

A páronkénti illesztéshez a NCBI bl2seq valamint az EMBOSS Needle programját (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) használtuk.

4.3.1.7 Többszörös szekvencia illesztés

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 (Pairwise Alignment: Gap Opening Penalty: 15; Gap Extension Penalty: 6, Multiple Alignment: Gap Opening Penalty: 15, Gap Extension Penalty: 6). Majd a szekvenciák végein található szekvenálási hibából adódó bizonytalan nukleotidokat a TrimAI v.1.3 program (<http://phylemon.bioinfo.cipf.es/utilities.html>) (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.

4.3.1.8 Haplotípus elemzés – Haplotípus hálózat generálása

A 4.3.1.7. pontban leírt többszörös szekvencia illesztést követően a PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) (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 haplotípusokat összekötő vonalakon lévő vonások jelzik az eltérések számát két adott szekvencia között.

4.3.1.9 Filogenetikai törzsfa generálása

4.3.1.9.1 *Metschnikowia* nemzetség pontos fajszerelmének megadása

Ahhoz, hogy a lehető legpontosabb törzsfát létrehozzuk, első lépésként össze kellett gyűjtenünk a *Metschnikowia* nemzetséghez tartozó összes fajt. Ehhez több adatbázis is a rendelkezésünkre áll, mint például a Mycobank, Species Fungorum, vagy a Catalogue of Life. A Mycobank adatbázisa (<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&>

ViewMode=Basic) közvetlenül a Nemzetközi Mikológiai Egyesülettől (<http://www.ima-mycology.org/>) gyűjti az adatokat, így ezt az adatbázist használtuk referenciaként a kutatásaink során. Mindemellett az itt feltüntetett fajok jelenlegi taxonómiai helyzetét egyesével is ellenőriztük, melynek során az adott faj rendszertani besorolásával foglalkozó cikkeket kerestünk a nemzetközi szakirodalomban (NCBI pubmed). A törzsfa generálásához, és egyéb filogenetikai elemzésekhez a *Metschnikowia* nemzetségbe tartozó fajok típustörzsének szekvenciáit (amennyiben rendelkezésre álltak) az NCBI Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?cmd=search>) és UNITE (<https://unite.ut.ee/>) adatbázisából töltöttük le.

4.3.1.9.2 A filogenetikai törzsfa létrehozása

A Maximum Likelihood filogenetikai törzsfát az IQ tree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) online felületét használva generáltuk a következő paraméterekkel: Szubsztitúciós modell: automatikus modellkereső (a fajok közötti rokonsági kapcsolatokat a TIM2+F+I+G4 evolúciós modell írja le a legjobban), Korreláció értéke 0,99, LRT SH elágazási teszt: 1000 ismétlés. A kapott törzsfa megbízhatóságát bootstrap analízissel teszteltük (Bootstrap replikációk száma: 1000). Az elemzés 64 nukleotid szekvenciát érintett. A végleges adatkészletben összesen 390 pozíció szerepelt. Állandó helyek száma: 140 (= az összes pozíció 35,8974% -a). Az invariáns (állandó vagy kétértelmű állandó) helyek száma: 140 (= az összes hely 35,8974% -a). A kapott törzsfa végleges változatát az iTOL (<https://itol.embl.de/>) online felületen hoztuk létre. Külső csoportként a *Clavispora lusitaniae*-t választottuk a *Metschnikowiaceae* család *Clavispora* nemzetségéből.

4.3.1.9.3 Hálózat elemzés - neighbor-net splits grafikonok generálása

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. Ezekben az elemzésekben a távolság számításához a HKY 85 modellt (Hasegawa és mtsai 1985) használtuk. A neighbor-net (szomszédhálózatok) létrehozásához az egyenlő szög beállítást választottuk. A teszt a rekombináció jelenlétének kimutatására (Bruen és mtsai 2006) az Splits Tree4 csomagban elérhető.

4.3.1.10 Auxotróf mutánsok létrehozása

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. Az N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin esetében a következő módon jártunk el: 0,45 ml (10^8 sejt/100 μ l) sűrűségű sejtuszpenzióhoz adtunk 0,05 ml N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin-t (Törzsoldat: 1 mg/ml). Ezt követően a tenyészetet tovább inkubáltuk egy órán át annak érdekében, hogy a mérég az osztódó sejtekre, ezáltal az éppen megkettőződő DNS-re hasson. A sejteket YPA táptalajra szélesztettük és a tenyészeteket egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Majd a tenyészeteket replikáztuk minimál SMA (hozzáadott aminosavat nem tartalmaz) táptalajra, ahol a mérgezést követően 20%-os túlélési arányt tapasztaltunk. A lehetséges aminosavakra auxotróf mutánsok azonosítása szintén Sipiczki és Ferenczy (1978) leírása alapján történt. Az azonosított és a keresztezéshez felhasznált auxotróf mutánsok listáját a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. A keresztezéshez felhasznált *Metschnikowia* auxotróf mutánsok listája. A táblázatban a mutánsok egyedi sorszámmal ellátott azonosítóját követően, zárójelben tüntettük fel az adott mutáns aminosav auxotrófiáját az aminosav nevének nemzetközi hárombetűs rövidítését használva.

<i>M. pulcherrima</i> (11-578)	<i>M. fructicola</i> (11-579)	<i>M. andauensis</i> (11-1120)
5. (his ⁻), 12. (ade ⁻), 13. (lys ⁻)	3. (pro ⁻), 16. (•)*	23. (ade ⁻), 24. (asp ⁻), 25. (ade ⁻), 26. (•)*, 28. (arg ⁻), 29. (lys ⁻), 30. (•)*, 32. a (try ⁻), 32. b (•)*
<i>M. sinensis</i> (11-1088)	<i>M. ziziphicola</i> (11-1089)	<i>M. shanxiensis</i> (11-1090)
41. (ade ⁻), 42. (ade ⁻), 44. (met ⁻), 45. (met ⁻)	33. (asp ⁻), 36. (•)*, 37. (•)*, 1621. (lys ⁻), 1622. (ade ⁻)	19. (asp ⁻), 1620. (his ⁻)

*Ismeretlen auxotrófia

4.3.1.11 A *Metschnikowia* fajok auxotróf mutáns törzseinek hibridizálása

Első lépésként a keresztezni kívánt izolátumokat komplett YPA táptalajra oltottuk hosszú csík formájában, majd a petri-csészéket szobahőmérsékleten inkubáltuk egy éjszakán át. A telep megjelenését követően két eltérő fajból származó különböző auxotrófiával rendelkező törzset, aminosavat nem tartalmazó minimál (SMA) 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. A keresztezési pontból származó telepeket friss SMA táptalajra oltottuk azért, hogy biztosan prototróf telepeket izoláljunk.

4.3.1.12 Kromoszóma preparáció

A kromoszóma preparációt a *pulcherrimin* termelő *Metschnikowia* fajokra átdolgozva Csoma és Sipiczki (2008) módszere alapján végeztük 2-merkaptóetanol és Zymoliase-20T (ImmunO™) használatával:

Előtenyészet készítése:

Élesztőgombákat YPL folyadékban szaporítottuk egy éjszakán át 28 °C-on stationer fázisig.

Szferoplaszt készítése 2-merkaptóetanollal a külső mannán komponensek eltávolítása érdekében:

Első lépésben a $1,3 \times 10^9$ sejt/ml sejtsűrűségű szuszpenziót centrifugáltuk (5000 rpm, 5 perc, szobahőmérséklet). Majd a sejteket MilliPore (MQ) vízben mostuk. Ezt a sejtek centrifugálása követte (5000 rpm, 5 perc, szobahőmérséklet). A felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket 2,1 ml MQ víz + 1,4 ml 10xTE oldatban vettük fel. A következő lépésben 17,5 µl 2-merkaptóetanolt adtunk a sejtsuszpenzióhoz. A sejteket 15 percig 30 °C-on óvatos rázatás mellett inkubáltuk. Majd a szuszpenziót ismét centrifugáltuk (5000 rpm, 5 perc, szobahőmérséklet). A sejteket ezt követően 4,0 ml CPES pufferben szuszpendáltuk. Újabb centrifugálást követően (5000 rpm, 5 perc, szobahőmérséklet) a sejteket 500 µl CPES + Zymoliase-20T (60 U/ml) pufferben ($1,3 \times 10^9$ sejt/500 µl) vettük fel. Majd a mintákat 30 °C-on 30 percig folyamatos óvatos rázatás (70 rpm) mellett inkubáltuk. Az így létrehozott sejtsuszpenzióhoz (500 µl) 500 µl 2.0% alacsony olvadáspontú agarózt adtunk, és a keveréket formába öntöttük, majd a mintákat megszilárdulásukig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A kialakított dugókat proteináz K-t (50 µg/ml) tartalmazó lízis pufferbe helyeztük, majd egy éjszakán át 50 °C-on inkubáltuk.

A lízis puffer eltávolítása után a mintákat 1xTE pufferben 50 °C-on 20 percig inkubáltuk. Utolsó lépésben eltávolítottuk a TE puffert, majd a mintákat 1xTE pufferben szobahőmérsékleten egy órán keresztül inkubáltuk.

Kromoszómák elválasztása:

A kromoszómák elválasztásához a CHEF Mapper® XA System készüléket alkalmaztuk. A formába öntött mintákat 1,0 %-os agaróz gélbe helyeztük.

A kromoszómák elválasztása 1 X TBE pufferben három szakaszban történt: I. Blokk: 48 ó, 2400 mp; II. Blokk 2: 70 ó, 3000 mp; III. Blokk: 48 ó, 3300 mp, közrezárt szög: 106°, 1.5 V/cm⁻¹; 166 óra, 14 °C.

A kromoszómák láthatóvá tétele a gélelektroforézist követően:

Gélt etídium-bromidban (0,01 mg/ml) áztattuk 20 percen át. Majd a gélt 1xTBE pufferben egy héten keresztül 4 °C-on áztattuk. A kromoszómák láthatóvá tétele egy hét után BioDoc-It Imaging System UV transzilluminátor segítségével történt.

4.3.2 Antagonizmus vizsgálat in vitro petri-csészéken

4.3.2.1 Élesztőgomba izolátumok lehetséges antagonista hatásának feltérképezése

A kísérlet során az élesztőgombák azon tulajdonságát vizsgáltuk, milyen mértékben gátolják más gombák növekedését vagy szaporodását. 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 oltókaccsal 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 táptalajok pH-ját HCl:MQ (1:1) és NaOH (5M) oldatokkal állítottuk a kívánt értékekre (pH=5 és pH=6). A lemezek kiértékelését szemrevételezéssel végeztük, mely alapján a vizsgált élesztőgomba törzseket csoportokra osztottuk.

4.3.2.2 *Metschnikowia* izolátumok *pulcherrimin* termelésének vizsgálata

4.3.2.2.1 Tápközeg befolyása a pigmenttermelésre

Alkalmazott tápközegek: YEA, YPA, PEA, PDA, SMA táptalajok, valamint e 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 előtenyésztettel dolgoztunk tovább.

Friss tenyészetet használva 15-15 µl élesztőgomba szuszpenziót ($\text{OD}_{590}=1,0$) jutattunk az alkalmazott táptalajok felszínére, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk a petri-csészéket. A törzsek körül kialakult pigmentált zóna méretét tolómérővel határoztuk meg.

Negatív kontrollként az *S. cerevisiae* egy izolátumát (S288C) valamint *M. chrysoperlae* (CBS 9803) élesztőgombákat alkalmaztunk, mely mikroorganizmusok nem termelnek pigmentet.

4.3.2.2.2 Szénforrások hatása a pigmenttermelésre

Eppendorf-csőben 1 ml 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 törzsekre jellemző adatokat az 1. táblázatban foglaltam össze. Az előzetes vizsgálatok alapján 10 szénhidrát forrást választottunk, melyek esetében pigmenttképződést tapasztaltunk több faj esetében.

4.3.2.2.3 pH és hőmérséklet hatása a pigmenttermelésre

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 (OD₅₉₀= 1,0), majd a petri-csészéket 25 °C, 30 °C és 37 °C-on inkubáltuk.

A *M. andauensis*-t PDB folyadékot (kiegészítve FeCl₃-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 FeCl₃-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.

4.3.2.2.4 CuSO₄ hatása a *Metschnikowia* izolátumok gátló hatására

A kísérletek során minden esetben 28 °C-on YPL folyadékban egy éjszakán át vízfürdőben inkubált tenyészettel dolgoztunk.

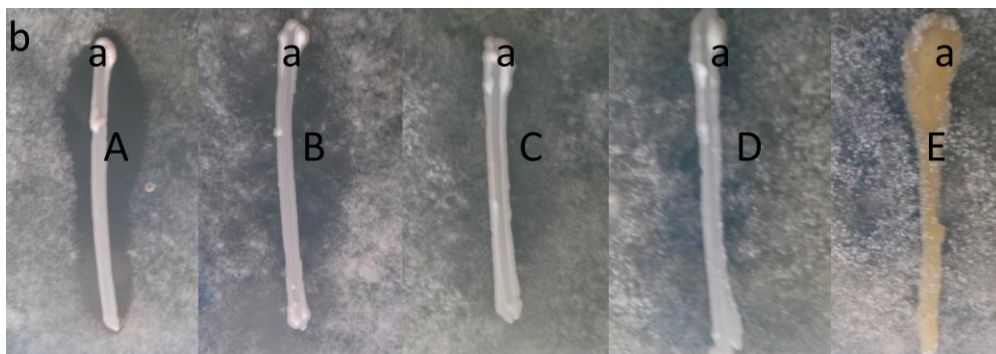
Friss tenyészetet használva 15-15 µl élesztőgomba szuszpenziót (OD₅₉₀=1,0) jutattunk különböző koncentrációban CuSO₄-oldatot tartalmazó SMA táptalajok felszínére, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk a petri-csészéket. A CuSO₄ hatását FeCl₃-oldat jelenlétében is megvizsgáltuk, ebben az esetben a CuSO₄ mellett FeCl₃-oldatot is adagoltunk az SMA táptalajhoz (SMA + CuSO₄ 0,05 mg/ml + FeCl₃ 0,05 mg/ml).

Negatív kontrollként az *S. pombe* egy izolátumát (L972 h⁻) valamint *M. chrysoperlae* (CBS 9803) élesztőgombákat alkalmaztuk, mely mikroorganizmusok nem rendelkeznek antagonista hatással.

5 Eredmények

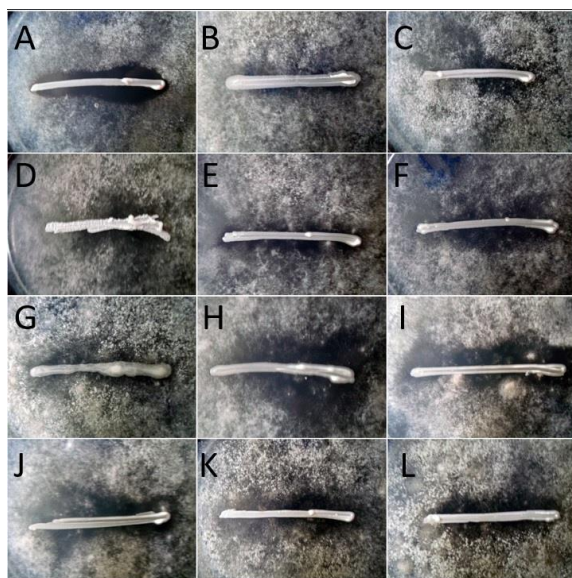
5.1 Élesztőgomba törzsek antagonista hatásának tesztelése *Botrytis cinerea* fonalas gombával szemben

A világ minden tájáról származó élesztőgombák lehetséges antagonista hatását teszteltük *B. cinerea* fonalas gombával szemben (2. melléklet), mely az egyik leggyakoribb jelentős mezőgazdasági károkat okozó *postharvest* patogén (Williamson és mtsai 2007). A vonaltenyészetek kiértékelését szemrevételezéssel végeztük, mely alapján a vizsgált élesztőgomba törzseket csoportokra osztottuk aszerint, hogy az élesztőgomba milyen mértékben volt képes a fonalas gombát gátolni (2. melléklet). 1-es kategóriába soroltuk azokat az izolátumokat, melyek a gátolt zóna méretét nem számítva olyan udvart képeztek, melynek határán belül a fonalas gomba nem volt képes tovább terjeszkedni (8. ábra A). Az ötös kategóriába pedig azok az izolátumok kerültek, melyeket részben vagy egészben elleptek a *B. cinerea* hifái (8. ábra E).



3. ábra. Élesztőgomba izolátumok (a) *Botrytis cinerea* (b) fonalasgomba növekedésével szembeni kölcsönhatásainak típusa a kísérlet második napján, PDA táptalajon (saját szerkesztés). Kategóriák: 1.: Tiszta áttetsző gátló zóna (A) 2.: Opálos, majdnem áttetsző gátló zóna (B) 3.: Kevésbé nő a *Botrytis cinerea* az élesztőgomba törzs környezetében, de nincs feltisztult gátló zóna (C) 4.: Nincs gátló zóna, a telepet szorosan körül növi a *B. cinerea* (D) 5.: A telepet benövi a *B. cinerea* (E).

Az előzetes vizsgálatok során több izolátum is ígéretesnek tűnt (2. kategória), mint például a *Hanseniaspora thailandica* (11-472, 11-492, 11-499), *Hanseniaspora uvarum* (11-494), *Metschnikowia koreensis* (11-464, 11-482), *Ogataea minuta* (11-483), *Pichia bruneiensis* (11-485), *Pichia kluyveri* (11-1135), *P. kudriavzevii* (11-460, 11-462), *Saccharomycopsis crataegensis* (11-463), *Wickerhamomyces anomalus* (11-502, 11-503, 11-520, 11-522) vagy a *Wickerhamiella sergipiensis* (11-517). Ezek közül is kitűntek a rozsdabarna pigmentet termelő *Metschnikowia* izolátumok (1. kategória) (9/2/18, 62/1/3, 11-1062). A tesztelt élesztőgombák többsége azonban nem tudta felvenni a versenyt a fonalas gombával szemben, illetve nem gyakorolt számottevő gátló hatást a fonalas gomba növekedésére. Ahogy az 4. ábrán látszik, a *pulcherrimin* termelő *Metschnikowia* törzsek (4. ábra A) hatékonyságát egyik izolátum sem múlta felül (2. melléklet).



4. ábra. Különböző élesztőgomba izolátumok gátló hatása *Botrytis cinerea* fonalas gombával szemben (saját szerkesztés). A: 1. kategória B-L.2. kategória A: *Metschnikowia* sp. (11-1062) B: *Pichia kudriavzevii* (11-460) C: *P. kudriavzevii* (11-464) D: *Kodamaea ohmeri* (11-466) E: *Saturnispora diversa* (11-470) F: *Hanseniaspora thailandica* (11-472) G: *Ogataea minuta* 11-483 H: *H. thailandica* (11-492) I: *H. thailandica* (11-494) J: *H. thailandica* (11-499) K: *Wickerhamomyces anomalus* (11-503) L: *W. anomalus* (11-520). A fotók a kísérlet 2. napján készültek. Pázsitot alkotó törzs: *B. cinerea* (T4).

5.2 Taxonómiai problémák a *Metschnikowia* izolátumok azonosítása során

5.2.1 Az *Metschnikowia* izolátumok 26S riboszómális RNS gén D1/D2 doménjének elemzése

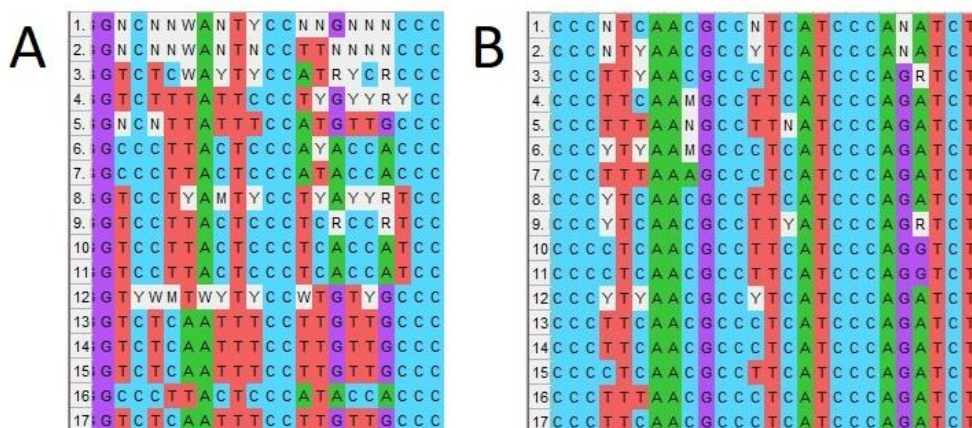
Mivel az antagonista tesztekben a *Metschnikowia* törzsek nagyon jól szerepeltek, de nem minden törzsnek volt biztos a faji hovatartozása, ezért elkezdtük a törzsek DNS alapú taxonómiai vizsgálatát.

A fajok jelenlegi taxonómiai helyzetét nemzetközi adatbázisokban ellenőrizve, valamint a nemzetség rendszertanával foglalkozó cikkeket tanulmányozva kijelenthetjük, hogy a *Metschnikowia* nemzetség jelenleg 64 fajt foglal magába, ez alapján egy nemzetközi együttműködésben készült összefoglaló tanulmányban mutattuk be a nemzetség diverzitását (Wijayawardene és mtsai 2020). Ezek között több olyan faj is megtalálható, amelyek képesek a *pulcherrimin* előállítására (Sipiczki 2020).

Az ismeretlen izolátumaink azonosítása érdekében első lépésként szekvenciaelemzést végeztünk, melynek során az izolátumok 26S riboszómális RNS gén D1/D2 doménjét hasonlítottuk össze az NCBI nucleotid adatbázisban szereplő szekvenciákkal. A vizsgált *Metschnikowia* izolátumok (9/2/18, 62/1/3, 11-1062) 95-98%-os egyezést mutattak a *M. pulcherrima*, *M. fructicola*, *M. andauensis*, *M. sinensis*, *M. shanxiensis*, *M. ziziphicola*, valamint a *M. chrysoperlae* fajokkal is.

Ha a találatokban szereplő típustörzsek és a meghatározni kívánt izolátumaink szekvenciáit egymáshoz illesztjük, akkor láthatjuk, hogy az eltérések a Sipiczki (2013) és munkatársai által a *M. fructicola* és *M. andauensis* fajoknál meghatározott pozíciókban találhatóak (5. ábra). Ez azt jelenti, hogy a fajcsoport többi tagjánál is variábilis ez a régió, és ez alapján

nem lehet egyértelműen faji szinten azonosítani a három ismeretlen pigmenttermelő izolátumunkat.



5. ábra. Variábilis régiók a *Metschnikowia* izolátumok D1/D2 doménjében (saját szerkesztés). A: variábilis régió 1 (VR1) B: variábilis régió 2 (VR2). A és B ábrán szereplő törzsek azonosítói: 1-3.: az azonosítani kívánt törzsek (1.: 9/2/18; 2.: 62/1/3, 3.: 11-1062) 4. *Metschnikowia andauensis* (HA 1657) típusörzs szekvenciája (AJ745110.1) 5. A *Metschnikowia fructicola* (NRRL Y-27328) típusörzs szekvenciája (AF360542.1) 6-17. *Metschnikowia pulcherrima* fajcsoport különböző fajainak típusörzseiből származó szekvenciák, melyek az NCBI adatbázisban történt keresés eredményeként 95-98%-os egyezést mutattak az azonosítani kívánt törzsek szekvenciáival. N/W/M/Y/R: Kétes nukleotidok IUPAC jelölése a genomból közvetlenül szekvenált szekvenciákban.

5.2.2 A *Metschnikowia* izolátumok ITS régiójának elemzése

Mivel a 26S riboszómális RNS gén D1/D2 domén vizsgálata nagyfokú variabilitást mutatott, a *M. fructicola* és *M. andauensis* fajok típusörzseit kezdtük el vizsgálni. A típusörzsekből származó ITS1 és ITS4 primerekkel amplifikált ITS régiót ITS1 primerrel szekvenáltuk. Az ITS1 szegmens esetében a kromatogramok nem voltak olvashatóak, és az 5.8S és ITS2 szakaszok 20%-a kétes nukleotidokat tartalmazott. Abban az esetben, amikor ITS4 primerrel történt a szekvenálás az előbbi két szegmensben (5.8S és ITS2) ugyancsak előfordultak kis számban kétes nukleotidok bizonyos pozíciókban, az ITS1 ebben az esetben is kaotikus volt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az ITS régió az riboszómális RNS-t kódoló DNS egységen

belül a D1/D2 doménnel együtt (Sipiczki és mtsai 2013) heterogén mindkét törzs esetében, s ez okozza a szekvenálási „hibákat”. Azért, hogy kiderítsük elméletünk helytálló-e, a felszaporított szakaszt klónoztuk ((6 darab klón a *M. andauensis* (Ian) és 7 darab klón a *M. fructicola* (Ifr) típus törzsek esetében)) és egyenként szekvenáltuk (3. melléklet).

Egyik klónozott szekvencia sem tartalmazott kétes nukleotidokat, viszont számos pozícióban különböztek egymástól. Méretük a többi *Metschnikowia* fajéhoz volt hasonló. A 8 *M. fructicola* szekvenciából 5 azonos (Ifr4, Ifr6, Ifrb13, Ifrb15 és Ifrb17), míg a *M. andauensis* klónok mindegyike egyedi szekvenciával rendelkezett.

A legtöbb különbség az *M. andauensis* Ian51 és *M. fructicola* Ifrc26 között volt (26 szubsztitúció és egy 1 inszerció vagy deléció) (5. táblázat pirossal jelölve), de ez a különbség alig volt nagyobb, mint a legnagyobb különbség a két fajon belül (26 *M. andauensis* esetében és 24 *M. fructicola* esetében) (5. táblázat Késsel jelölve). Az ITS1 sokkal változatosabb az ITS2-nél. Clustal analízissel az összes klónozott szekvencia 34 pozícióban volt variábilis az ITS1 régióban és 4 helyen az ITS2-ben. Öt *M. fructicola* klón és egy *M. andauensis* klón azonos ITS2 szekvenciával rendelkezett. Az 5.8S génben csak egy helyen volt polimorfizmus. Ebben a pozícióban az összes *M. andauensis* és két *M. fructicola* szekvencia citozint tartalmazott, míg két *M. fructicola* timinnel rendelkezett.

5. táblázat. A klónozott ITS szekvenciák (*Metschnikowia andauensis*: Ian, *Metschnikowia fruticola*: Ifr) páronkénti illesztéseinek különbségei (szubsztitúciók, inszerciók vagy deléciók) (saját szerkesztés). A legtöbb különbség az *M. andauensis* Ian51 és *M. fruticola* Ifrc26 között volt (26 szubsztitúció és egy 1 inszerció vagy deléció) (a táblázatban pirossal jelölve), de ez a különbség alig volt nagyobb, mint a legnagyobb különbség a két fajon belül (26 *M. andauensis* esetében és 24 *M. fruticola* esetében) (a táblázatban kékkel jelölve).

Klónozott szekvenciák azonosítói	Ian 5	Ian 6	Ian 10	Ian 42	Ian 43	Ian 51	Ifr 4	Ifr 6	Ifr 9	Ifrb 13	Ifrb 15	Ifrb 17	Ifrc 26
Ian6	11												
Ian10	21	22											
Ian42	6	10	25										
Ian43	5	6	26	6									
Ian51	11	4	26	8	6								
Ifr4	11	7	23	7	11	7							
Ifr6	11	7	23	7	11	7	0						
Ifr9	10	10	23	6	10	13	7	7					
Ifrb13	11	7	23	7	11	7	0	0	7				
Ifrb15	11	7	23	7	11	7	0	0	7	0			
Ifrb17	11	7	23	7	11	7	0	0	7	0	0		
Ifrc26	20	23	15	24	25	27	24	23	21	24	24	24	
Ifrc27	11	15	23	9	11	13	13	12	11	12	12	12	22

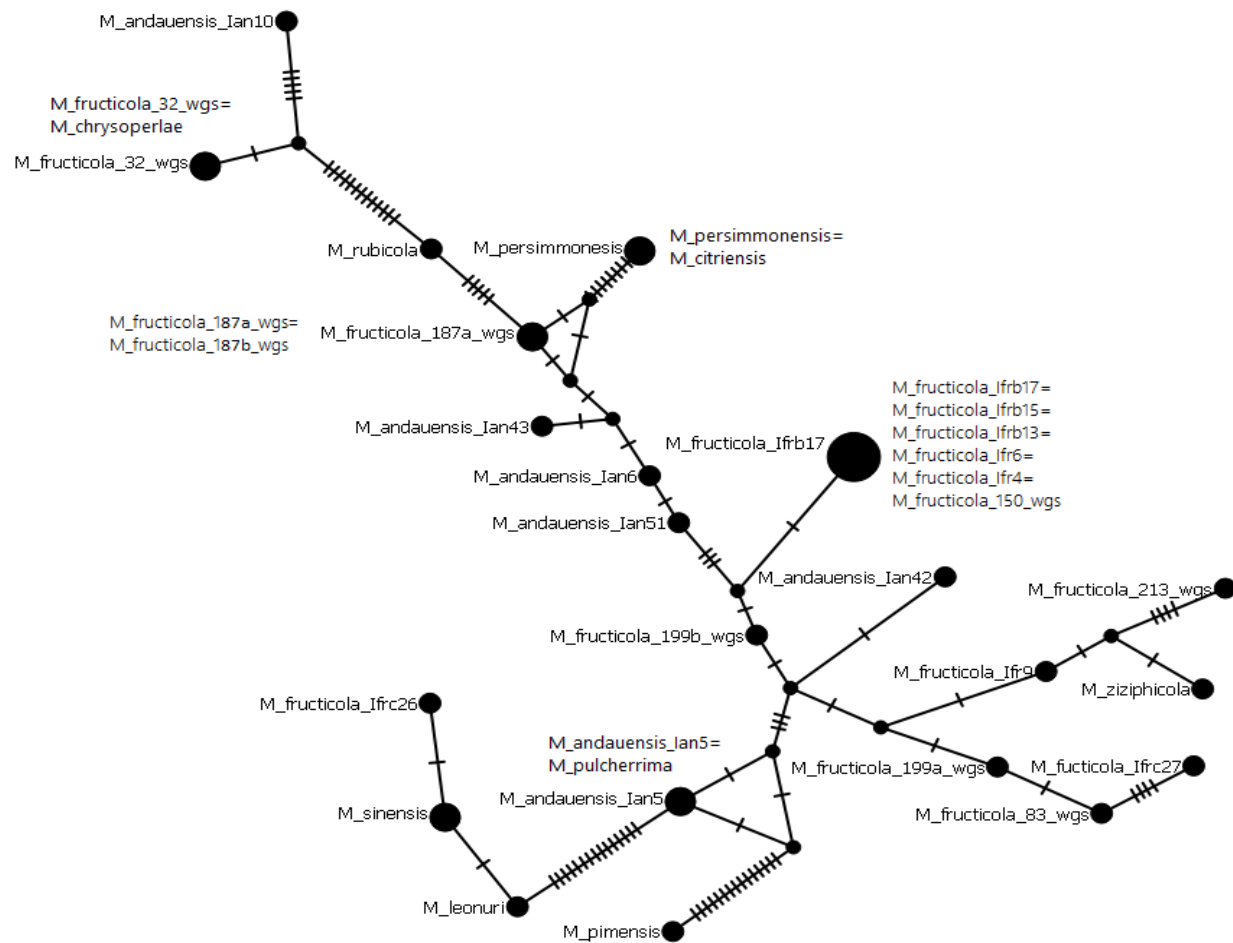
Az ITS1 régió 10 helyen tér el az Ian51-es szekvencia esetében a *M. rubicola* (NRRL Y-6064) és 14 pozícióban a *M. persimmonensis* (KCTC 12991BP) számú szekvenciáktól (4. melléklet). Az Ifrc26 ITS1 régiója 24 szubsztitúcióban különbözött az Ifrb17-től, de csak 3 szubsztitúcióban a *M. leonuri* (NRRL Y-6546) szekvenciájától (4. melléklet).

Haplotípus hálózat

A haplotípusok közötti viszonyokat a pigmenttermelő fajcsoporton belül a 6. ábrán követhetjük nyomon. A statisztikai elemzés a típustörzsek szekvenciáit egyetlen hálózatba csoportosította (6. ábra). A hálózaton belül a *M. fructicola* és *M. andauensis* törzsek szekvenciái nem alkottak külön csoportot. Ez azt jelenti, hogy a két faj ITS-szekvenciájának közös evolúciós története lehet, mely során a törzsek riboszómális RNS-t kódoló DNS egységei többször is kölcsönhatásba léptek egymással.

Érdekes, hogy a fajon belüli különbségek nagyobbak mindkét izolátum esetében, mint az egyes szorosan kapcsolódó fajok típustörzseinek bizonyos klónozott szekvenciái közötti különbségek. Például az Ian10 26 pozícióban különbözik az Ian51-től, míg csak 18 pozícióban tér el a *M. rubicola* (NRRL Y-6064) szekvenciájától (6. ábra/ 4. melléklet), de például a *M. andauensis* Ian5 szekvenciája azonos a *M. pulcherrima* (NRRL_Y_7111) szekvenciájával. Azt is észrevehetjük, hogy a *M. fructicola* genomjából azonosított 32_wgs szekvencia teljesen megegyezik a pigmentet nem termelő *M. chrysoperlae* szekvenciájával (CBS:9803) (6. ábra/ 4. melléklet). A fajcsoport többi tagjában is találunk azonos szekvenciákat, ilyen a *M. persimmonensis* (KCTC 12991BP) és a *M. citriensis* (CICC 33213).

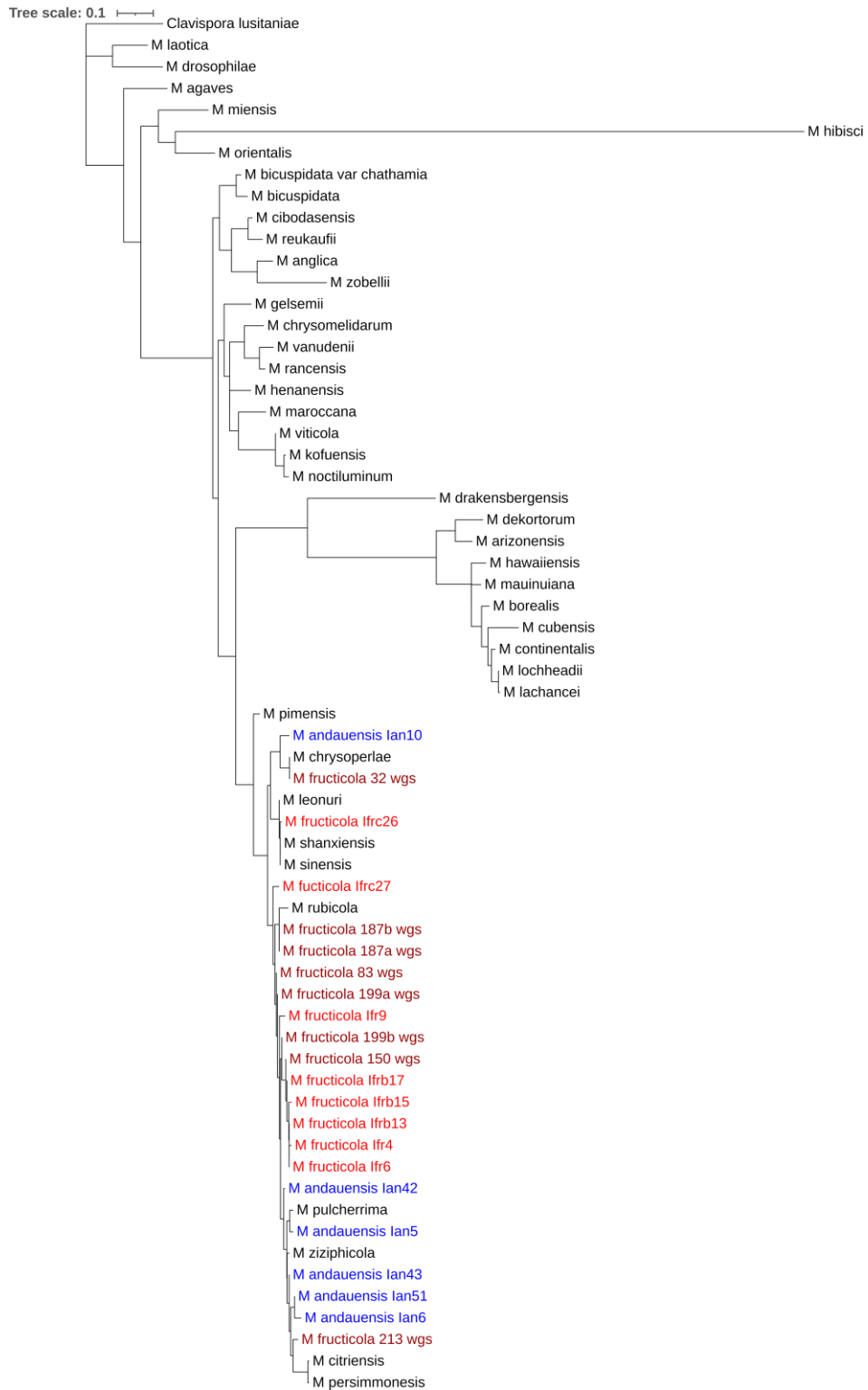
6. ábra. (Következő oldal). A ITS haplotípusok közötti viszonyok a *Metschnikowia pulcherrima* fajcsoporton belül (saját szerkesztés). A haplotípusok egymáshoz való viszonyát Median Joining alapú hálózat-építéssel tártuk fel. A haplotípusokat összekötő vonalakon lévő vonások jelzik az eltérések számát két adott szekvencia között.



Filogenetikai törzsfa

Ha a *Metschnikowia* nemzetség fajainak (típustörzsek szekvenciái) leszármazási viszonyait Maximum Likelihood módszerrel létrehozott filogenetikai fán ábrázoljuk, láthatjuk, hogy az ún. nagy spórás fajok jól elkülönülnek a kis spórás *M. pulcherrima* csoporttól (*M. pimensis*, *M. andauensis*, *M. chrysoperlae*, *M. fructicola*, *M. leonuri*, *M. shanxiensis*, *M. sinensis*, *M. rubicola*, *M. pulcherrima*, *M. ziziphicola*, *M. citriensis*, *M. persimmonensis*). A kis spórás fajok kisebb mértékben különböznek a legközelebbi közös őstől és egymástól, mint a nagy spórás fajok. A közös őstől történő elválásuk óta mindannyian közel azonos mértékben változtak és nagyon közeli rokonok maradtak. Ha ezen a fán a *M. fructicola* és *M. andauensis*-ből származó klónozott szekvenciák elhelyezkedését egymástól függetlenül egyenként kiemelve nézzük, akkor láthatjuk, hogy a fajcsoport tagjai olyannyira közeli rokonok, hogy a két faj (*M. fructicola* és *M. andauensis*) némelyike közelebbi rokonságban áll (az egyes klónozott szekvenciáik alapján) a csoportba tartozó egyéb fajokkal, mint fajon belül a klónozott szekvenciák egymáshoz képest való „rokonsága”. Pl. a *M. fructicola*, az Ifrc27 klónozott szekvencia alapján közelebbi rokonságban áll a *M. rubicola*-val, mint a fajon belüli Ifr9 szekvenciával (7. ábra).

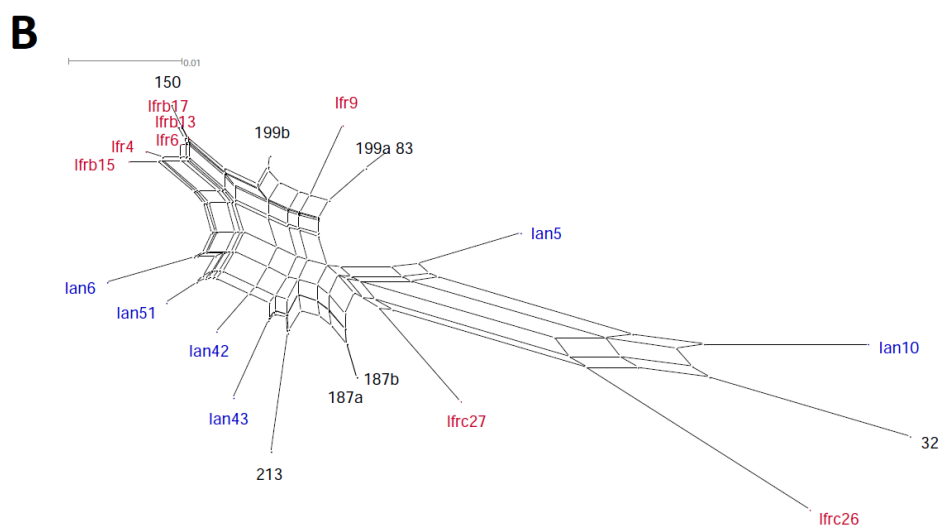
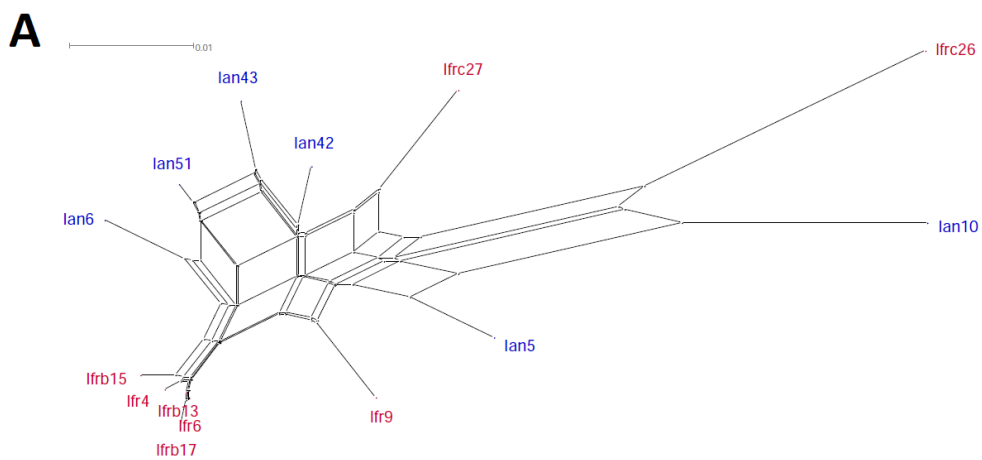
7. ábra. (következő oldal) A *Metschnikowia pulcherrima* fajcsoport ITS1/ITS2 szekvenciájának molekuláris filogenetikai analízise Maximum Likelihood módszerrel (saját szerkesztés). Az ábrán a legnagyobb logaritmusos valószínűségű fa látható. Az ágakon a 60% feletti bootstrap értékeket tüntettük fel. Kékkel jelölve a *M. andauensis*-ből származó klónok. Pirossal jelölve a *M. fructicola*-ból származó klónok. Bordóval jelölve a *M. fructicola* 277 genomból származó szekvenciák.



Filogenetikai hálózat analízis

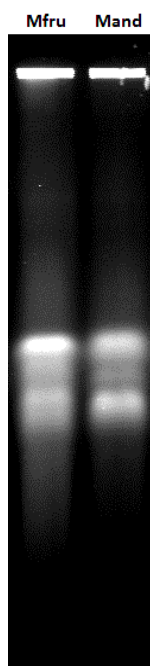
A Split gráfban egy-egy csomópont egyetlen éllel (filogenetikai dendrogramhoz hasonló szakaszok) vagy párhuzamos élek halmazával (hálózatot alkotó szakaszok) kapcsolódhat a többi csomóponthoz. Ez utóbbiak hasonló valószínűségű alternatív evolúciós lehetőségeket ábrázolnak, emellett felvetik annak a lehetőségét is, hogy a már elágazott részek újra találkozhatnak (hálózatos/retikulációs rész). A hálózati élek nagy száma egyértelműen bizonyítja, hogy a retikuláció jelentős szerepet játszott a vizsgált ITS-szegmensek fejlődésében. A dobozszerű struktúrák megerősítették azt az elképzelésünket, hogy a vizsgált szekvenciák evolúciójában valóban történt retikuláció (8. ábra). A retikuláció olyan összetett folyamatokat foglal magában, mint a genetikai elemek horizontális átadása és cseréje, hibridizáció és rekombináció.

8. ábra. (következő oldal) A *Metschnikowia andauensis* és *Metschnikowia fructicola* klónozott ITS régiójának filogenetikai hálózatelemzése (saját szerkesztés): Kékkel jelölve a *M. andauensis*-ből származó klónok. Pirossal jelölve a *M. fructicola*-ból származó klónok. Feketével jelölve a *M. fructicola* 277 genomból származó szekvenciák.



5.2.3 CHEF elektrokariotipizálás

Mivel a taxonómiai vizsgálatok és a filogenetikai analízisek arra utaltak, hogy a *M. fructicola* és a *M. andauensis* nagyon közeli rokonok, kromoszóma analízis vizsgálatokat is végeztünk ennek bizonyítására. A 9. ábrán megfigyelhetjük, hogy a *M. fructicola* és a *M. andauensis* kromoszóma mintázata megegyezik. Ez az eredmény is egy újabb bizonyíték arra, hogy a két faj nagyon közeli rokonságban áll egymással, kariotípusuk alapján nehezen különböztethetőek meg egymástól.



9. ábra. A *Metschnikowia fructicola* és *Metschnikowia andauensis* kromoszóma mintázata (saját szerkesztés). A kromoszómák elválasztásának paraméterei: I. Blokk: 48h, 2400s; II. Blokk 2: 70h, 3000s; III. Blokk: 48h, 3300s, közrezárt szög: 106°, 1.5 V/cm-1; 166 óra 14 °C.

5.2.4 A *Metschnikowia* auxotróf mutáns törzsek hibridizálása

A szekvencia elemzések alapján láthatjuk, hogy a *pulcherrimin* termelő fajok között igen nagy a hasonlóság. Felmerül a lehetőség, hogy ha ennyire közeli rokonok, talán képesek hibrideket létrehozni. Ennek tisztázása érdekében megkíséreltük a fajokat keresztezni egymással. Ehhez első lépésként különböző aminosavakra auxotróf mutánsokat állítottunk elő, majd azokat keverten tenyésztve, a prototróf hibrideket szelektáltuk. A keresztezésekhez már nem csak a *M. fructicola* és *M. andauensis* mutánsait, hanem további pigmenttermelő fajok auxotróf mutánsait is bevontuk, hogy részletesebb képet kapjunk a faji határokról. A keresztezésekbe összesen hat pigmenttermelő faj (*M. pulcherrima*, *M. fructicola*, *M. andauensis*, *M. sinensis*, *M. ziziphicola*, *M. shanxiensis*) 26 mutánsát vontuk be (6. táblázat). A *M. pulcherrima* mindegyik fajjal képes volt hibridizálni. Láthatjuk, hogy a fajok sok esetben képesek voltak egymással hibridizálni, a *M. ziziphicola* például az *M. fructicola*-n kívül szintén minden párosításban képzett hibrideket. Ugyanezt figyeltük meg a *M. andauensis* esetében is, mely a *M. shanxiensis*-en kívül minden tesztelt fajjal képzett prototróf telepeket a keresztezési pontokban (6. táblázat. *Pulcherrimin* termelő *Metschnikowia* fajcsoport tagjainak hibridizálása).

Azonban nem minden párosításban alakultak ki prototróf telepek (azaz feltételezett hibridek) (6. táblázat). Ez jelentheti azt, hogy bizonyos mutánsok sterilek (pl. 24-es *M. andauensis*, vagy a 1620-as *M. shanxiensis* mutáns), vagy utalhat arra, hogy a fajcsoport tagjai párosodási típusokkal rendelkeznek, és emiatt bizonyos párosításokban szexuálisan inkompatibilisek egymással.

Utóbbi elképzelésünket erősíti meg, hogy az aszkuszos élesztőgombák szexuális aktivitását a fajok többségében a MAT lókuszt határozza meg,

amelyet a *Metschnikowiaceae* család tagjaiban is megtaláltak. Lee és munkatársai (2018) a *M. pulcherrima* fajcsoporton belül a *M. fructicola* genomjában már azonosította a párosodási típus kialakításáért felelős kódoló régiót (Lee és mtsai 2018).

Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a fajok között sok esetben nem tökéletes a faji izoláció. Azért, hogy árnyaltabb képet kapjunk a fajok rokonsági viszonyairól még további keresztezéseket kell végrehajtanunk és még több mutánst kell bevonnunk a vizsgálatainkba.

6. táblázat. *Pulcherrimin* termelő *Metschnikowia* fajcsoport tagjainak hibridizálása (saját szerkesztés).

	<i>M.pul.</i>				<i>M.fru.</i>			<i>M.and.</i>								<i>M.sin.</i>				<i>M.ziz.</i>					<i>M.sha.</i>	
<i>M.pul.</i>	5.																									
	12.	+	12.																							
	13.	-	+	13.																						
<i>M.fru.</i>	3.	-	-	-	3.																					
	9.	N/A	N/A	N/A	-	9.																				
	16.	+	-	-	+	-	16.																			
<i>M.and.</i>	23.	+	-	+	+	-	-	23.																		
	24.	-	-	-	-	-	-	-	24.																	
	25.	+	-	+	+	-	-	-	25.																	
	26.	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	26.																
	28.	+	-	-	+	-	-	-	-	-	28.															
	29.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	29.														
	30.	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	30.													
	32.a	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	32.a											
	32.b	N/A	N/A	N/A	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	32.b										
<i>M.sin.</i>	41.	+	-	+ ^p	N/A	N/A	N/A	+	-	-	+	-	-	-	+	-	41.									
	42.	+ ^p	-	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	42.								
	44.	+ ¹	-	+ ¹	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	44.							
	45.	+	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	45.						
<i>M.ziz.</i>	33.	+	+	+ ¹	-	N/A	-	-	-	+	N/A	-	+	N/A	-	N/A	+	-	-	-	33.					
	36.	+	+1	+	-	N/A	-	+	-	+	N/A	-	+	N/A	+	N/A	-	-	-	-	+	36.				
	37.	-	-	-	-	N/A	-	-	-	+	N/A	-	+	N/A	+	N/A	-	-	-	-	+	-	37.			
	1621	+	-	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	+	-	-	1621		
	1622	+	+ ^p	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	+	+	-	-	1622	
<i>M.sha.</i>	19.	+	-	+	-	N/A	-	-	-	-	N/A	-	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	19.	
	1620	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1620

+: metszéspontban prototróf telepek jelentek meg (+^p: csak pár telep +¹: 1 telep) N/A: nincs adat -: metszéspontban nem jelent meg prototróf telep

M.pul.= *M. pulcherrima* *M.fru.*= *M. fructicola* *M.and.*= *M. andauensis* *M.sin.*= *M. sinensis* *M.ziz.*= *M. ziziphicola* *M.sha.*= *M. shanxiensis*

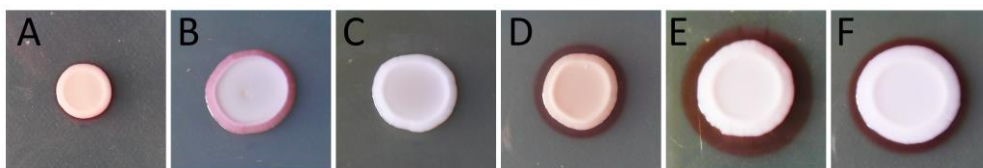
5.3 *Metschnikowia* izolátumok *pulcherrimin* termelésének vizsgálata

5.3.1 Környezeti tényezők hatása a pigmenttermelésre

Mivel a korábbi antagonista tesztekben a *Metschnikowia* fajok jól szerepeltek, s az antagonista képességük összefügg a *pulcherrimin* termelésükkel, ezért a továbbiakban a pigmenttermelő képességük és a tenyésztési körülmények kapcsolatának vizsgálatával foglalkoztunk.

5.3.1.1 Tápközeg befolyása a pigmenttermelésre

Az eredményeink azt mutatták, hogy az élesztőgombák fenntartására szolgáló különböző táptalajokon az izolátumok igen változatos módon termelik a pigmentet (10. ábra). Az alkalmazott táptalajok közül a legintenzívebb pigment képződést komplett táptalajokon figyeltük meg, mint például a YPA (élesztőgomba kivonat, pepton, glükóz) (10. ábra E). Ezt követi a PDA (Scharlab) (burgonya kivonat, glükóz) (10. ábra D) és végül a minimál táptalajok, mint az SMA (különböző sók, vitamin és glükóz) (10. ábra A). Érdekes, hogy a különböző gyártóktól származó burgonyakivonatot tartalmazó táptalajok között is megfigyelhetünk különbségeket. Míg a Scharlab termékén megfigyelhető pigmenttermelés (10. ábra D), addig az Applichem termékén a pirosodás elmarad (10. ábra C).



10. ábra. *Metschnikowia andauensis* pigmenttermelése különböző táptalajokon (saját szerkesztés). (A) SMA (különböző sók, vitaminok, glükóz), (B) PE (burgonya kivonat és glükóz) (C) PDA (burgonya dextróz, Applichem) (D) PDA (burgonya dextróz, Scharlab) (E) YEA (élesztőgomba kivonat, glükóz) (F) YPA (élesztőgomba kivonat, pepton, glükóz)

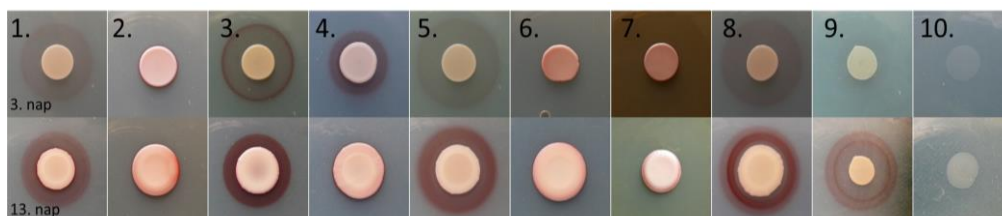
5.3.1.2 Szénforrások hatása a pigmenttermelésre

A vizsgált táptalajok különböző tápanyagösszetételűek, ezért első lépésként különböző szénforrások hatását vizsgáltuk pigmenttermelő *Metschnikowia* fajok bevonásával. Az előzetes vizsgálatok alapján 10 szénhidrát forrást választottunk, melyek esetében pigmentképződést tapasztaltunk több faj esetében is (1. melléklet). A további vizsgálatokat *M. andauensis*-el végeztük, mely intenzív pigmenttermelése révén ideális alany a fajcsoport által termelt pigment tulajdonságainak tanulmányozására, de kísérleteinkbe bevontunk több, eddig kevésbé, vagy egyáltalán nem tanulmányozott pigmenttermelő izolátumot is.

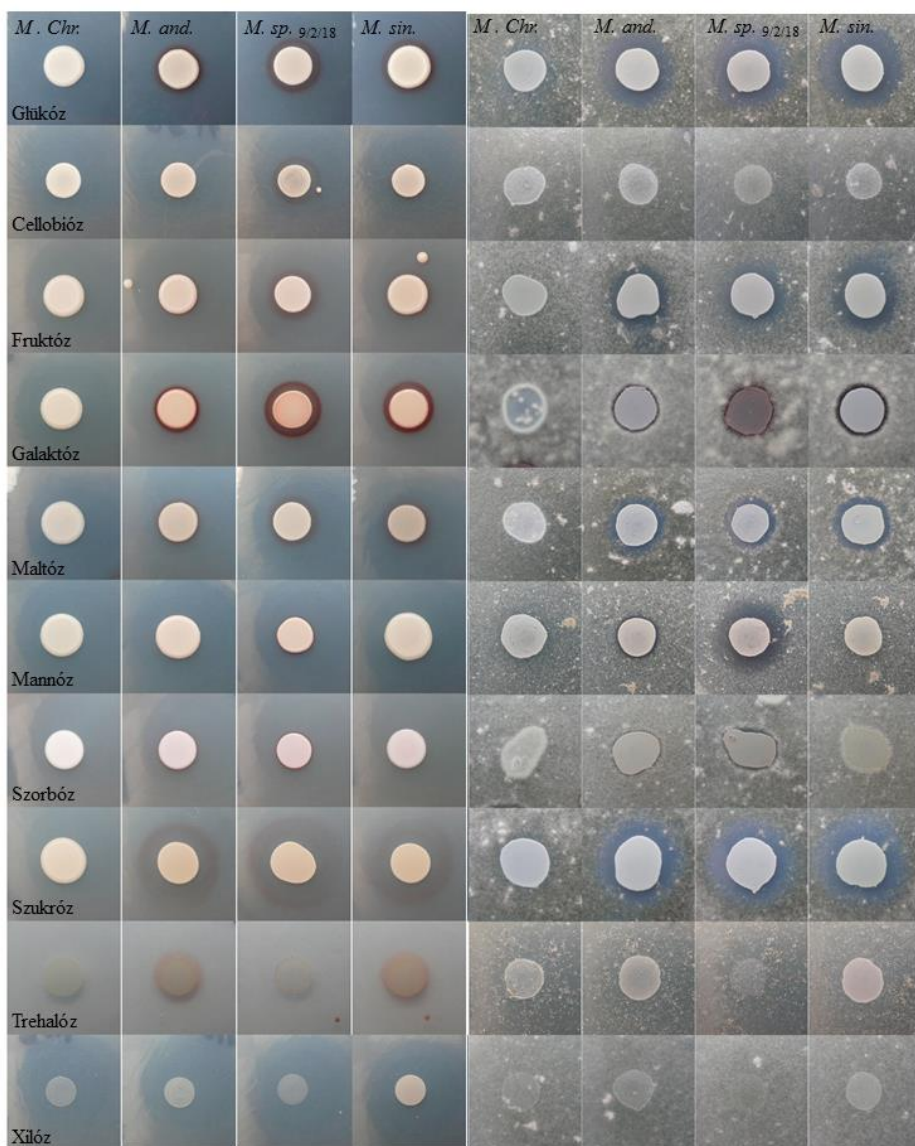
A tíz szénhidrát forrást többnyire jól hasznosította a *M. andauensis*. Azonban bizonyos szénforrások mellett lassabban szaporodott (Molnár és Prillinger 2005), ilyen a trehalóz és a xilóz is (11. ábra 9. és 10.). E két szénforrás esetében a kísérlet kezdeti fázisában egyáltalán nem figyelhetünk meg pigmenttermelést (11. ábra 3. nap 9. és 10.). A 13. napon végül a trehalózzal kiegészített táptalajon a *M. andauensis* körül nagyméretű, halvány pigmentált zóna alakult ki (11. ábra 13. nap és 9.). Azonban ez már késő ahhoz, hogy az élesztőgomba antagonista hatása időben kifejeződjön, ahogyan azt a 12. ábrán (trehalóz) is megfigyelhetjük. Az 12. ábrán a fotók a kísérlet ötödik napján készültek, amikor még a pigmentált zóna nem tudott kialakulni a trehalózzal kiegészített táptalajon a *Metschnikowia* törzsek körül. Láthatjuk, hogy így a gátlás is elmarad. Ugyanezt figyeltük meg a xilózzal kiegészített táptalajokon is (12. ábra xilóz), mely szénhidrát forrás esetében szemmel láthatóan egyáltalán nem történt pigmenttermelés sem a kísérlet kezdeti fázisában, sem a 13. napon (11. ábra 10.).

A telepek színének intenzitásában nem tapasztaltunk figyelemre méltóan nagy eltérést. Viszont a kialakult pigmentált terület méretében és színének

erősségében már jelentősebb különbségeket is észlelhetünk. Például a legsötétebb zóna minden esetben a galaktózzal kiegészített táptalajon alakult ki (11. ábra 3.), habár mérete elmaradt többek között a szacharóz vagy a maltóztól (11. ábra 5. és 8.).



11. ábra. *Metschnikowia andauensis* által képzett pigmentált zóna megjelenése különböző szénforrásokon (4 g/ 100 ml) a kísérlet 3. és 13. napján (saját szerkesztés). 1. Cellobióz 2. Fruktóz 3. Galaktóz 4. Glükóz 5. Maltóz 6. Mannóz 7. Szorbóz 8. Szacharóz 9. Trehalóz 10. Xilóz.

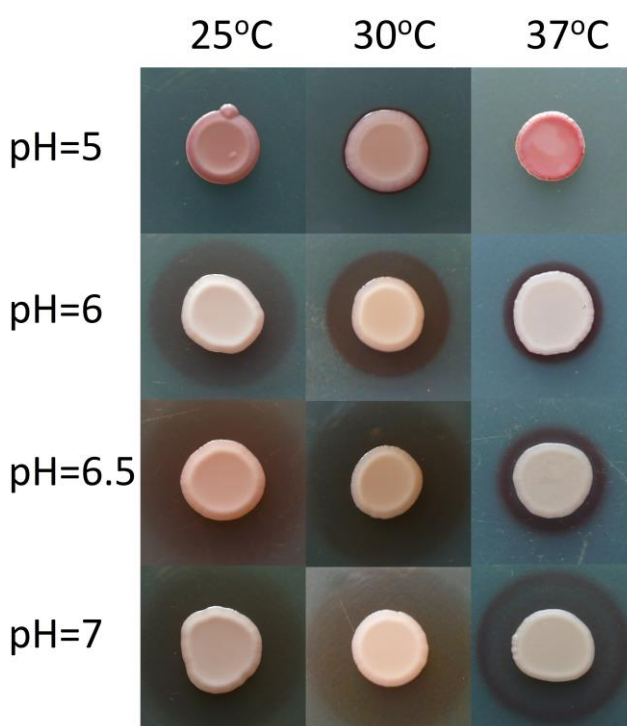


12. ábra. Különböző szénforrások hatása a *pulcherrimin* termelésre (saját szerkesztés). Balról jobbra haladva pigmentet nem termelő negatív kontrollként alkalmazott *Metschnikowia chrysoperlae*, majd különböző pigmenttermelő izolátumok következnek. Elsőként a *M. andauensis*, majd egy tanszéki izolátum *Metschnikowia* sp., végül pedig a *M. sinensis*. A törzsek antagonista hatását *Botrytis cinerea*-val szemben teszteltük. (B) *B. cinerea* által képzett pázsit. Alkalmazott táptalaj: SMA+ 4 g/100 ml szénforrás + FeCl₃-oldat (0,005 mg/ml). A fotók a kísérlet 5. napján készültek.

5.3.1.3 A pH és a hőmérséklet hatása a pigmenttermelésre

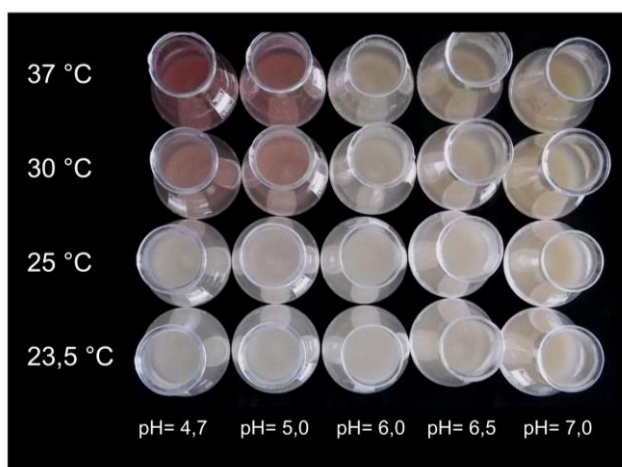
A pH és a hőmérséklet együttes hatását a 13. ábra jól szemlélteti. Első lépésként szilárd táptalajon teszteltük a *M. andauensis* pigmenttermelését. A 13. ábraán láthatjuk, hogy az alacsony pH (pH= 5) nem kedvez az előanyag diffundálásának, míg ahogy emelkedik az érték annál kiterjedtebb a pigmentált zóna mérete

A 13. ábra azt is megfigyelhetjük, hogy a magasabb hőmérséklet nem kedvez az előanyag terjedésének a táptalajban.



13. ábra. Hőmérséklet és pH hatása a *Metschnikowia andauensis pulcherrimin* termelésre (saját szerkesztés). Táptalaj: PDA, kiegészítve FeCl₃-oldattal (0.01 mg/ml), agar koncentráció: 1.5%. A képek a kísérlet 3. napján készültek.

Az eddigi megfigyelésekben olyan környezetben vizsgálták az élesztőgombákat, mely lehetővé teszi a diffúzió létrejöttét. Ezért számolnunk kell azzal az eshetőséggel, hogy ezek az adatok inkább a diffúzióról adnak információt, nem pedig ténylegesen keletkezett pigment mennyiségéről. Azért, hogy kiderítsük a közeg kémhatása és a hőmérséklet együttesen hogyan hatnak a *pulcherrimin* képződésére a diffúziót lehetővé tevő szilárdító közeg kiiktatásával, tápfolyadékban is elvégeztük a kísérletet. A 14. ábra láthatjuk, hogy a pirosodás tápfolyadékban (PDB) 30 °C fölött, alacsony pH-n vált szemmel láthatóvá, valamint a tenyészetek színének intenzitása egyenes arányban növekszik a hőmérséklet emelkedésével és a pH csökkenésével. (14. ábra).



14. ábra. Hőmérséklet és pH hatása a *Metschnikowia andauensis* pigmenttermelésére (saját szerkesztés). A *Metschnikowia* sejtek tenyésztése vas (III)-kloriddal kiegészített PDB folyadékban történt. A tenyészetek pH-ja nem változott a napok előrehaladtával. A kísérlet 2. és 3. napján a tenyészetek 250µl vas (III)-klorid oldattal (10mg/ml) lettek kiegészítve a nagyobb mennyiségű pigment előállítására érdekében. A fotók a kísérlet 3. napján készültek.

5.3.1.4 Réz hatása a *Metschnikowia andauensis* szaporodására és *B. cinereaval* szembeni gátló hatására

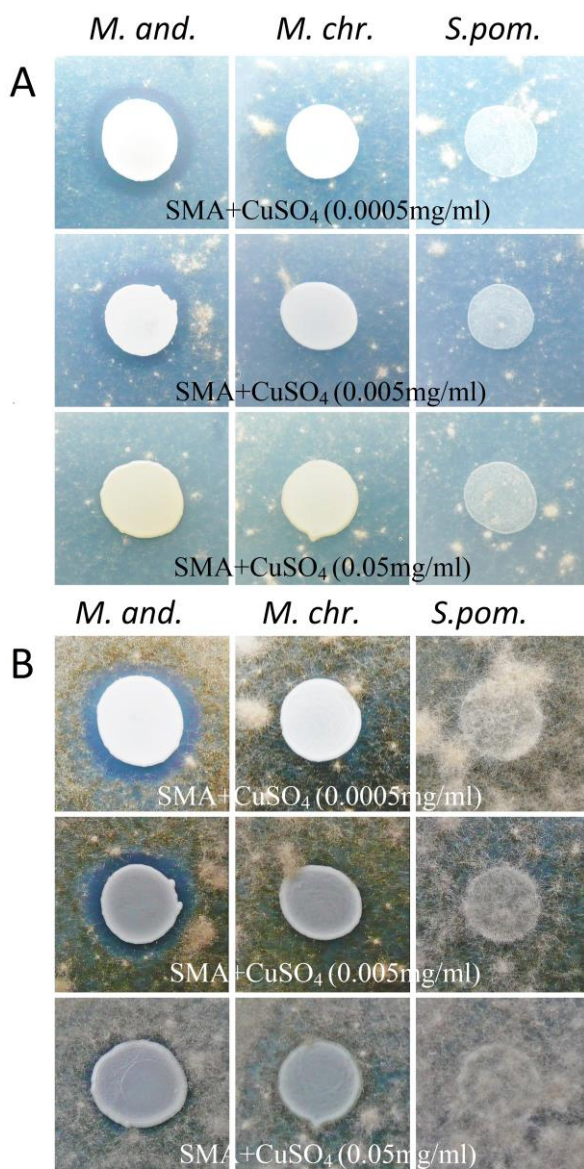
Mivel a réz (pl. Bordóilé) és kén alapú gombaölő szerek Magyarországon is engedélyezettek az ökológiai gazdálkodásokban (EU jogszabály, 889/2008/EK), megnéztük, hogy a CuSO_4 (Bordóilé összetevője) milyen hatással lehet a *M. andauensis pulcherrimin* termelésére és ezáltal az antagonista hatásának kifejeződésére.

A folyadékban és táptalajon elvégzett kísérleteink során, úgy tapasztaltuk, hogy az általunk tanulmányozott *Metschnikowia andauensis* szaporodására a CuSO_4 negatív hatással van, bár az alkalmazott koncentráció nem teljesen gátolta a sejtosztódást (15. ábra).



15. ábra. CuSO_4 negatív hatása a *Metschnikowia andauensis* szaporodására (saját szerkesztés). *M. andauensis* (1×10^6 sejt/ml) SMA, SMA+ CuSO_4 (0,05 mg/ml) valamint SMA + CuSO_4 (0,05 mg/ml) + FeCl_3 (0,05 mg/ml) oldatokkal kiegészített táptalajon. A fotók a kísérlet második napján készültek.

És ami még fontosabb, hogy az alkalmazott mennyiségtől függően csökkentheti, vagy akár meg is akadályozhatja a pigmentált zóna kialakulását (16. ábra), ezáltal in vitro semlegesíti az élesztőgomba antagonista hatását. A 16. ábra (B) láthatjuk, hogy a CuSO_4 koncentrációjának növelésével egyenes arányban csökken a gátló zóna mérete. A 0,05 mg/ml CuSO_4 tartalmú táptalajon pedig teljesen megszűnik.



16. ábra. CuSO₄ hatása a *Metschnikowia andauensis* *Botrytis cinerea* ellen kifejtett gátló hatására (saját szerkesztés). A: a kísérlet második napján készült fotók. B: a kísérlet ötödik napján készült fotók. *M. and.*: *M. andauensis* (11-1120). *M. chr.*: *M. chrysoperlae* (11-1158) negatív kontrollként alkalmazott antagonista hatásáról nem ismert pigmentet nem termelő *Metschnikowia* faj. *S.pom.*: *S. pombe* (L972) antagonista hatásáról nem ismert faj. Táptalaj: SMA, kiegészítve különböző koncentrációjú CuSO₄-oldattal (0.0005 mg/ml, 0.005 mg/ml, 0.05 mg/ml).

5.4 Élesztőgomba-élesztőgomba kölcsönhatás vizsgálata

5.4.1 A kölcsönhatások típusa

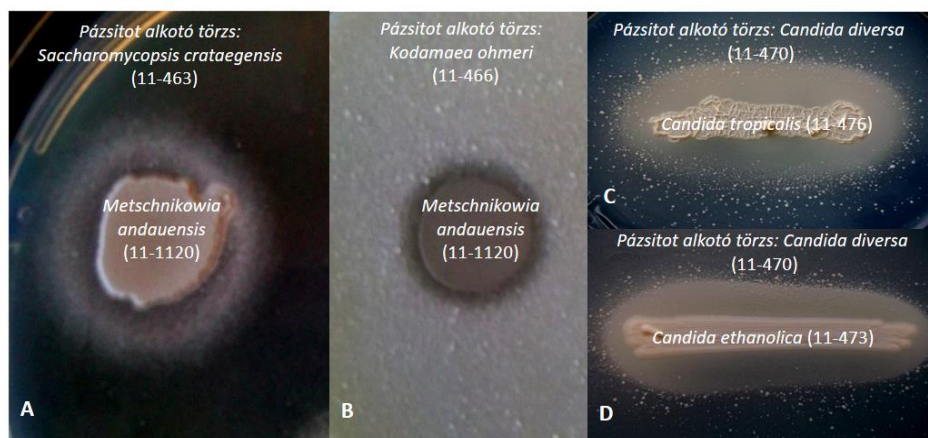
Számos élesztőgombát teszteltünk, melyek között megtalálható biokontroll képességéről ismert, és még e szempontból nem vizsgált fajok egyaránt (7. táblázat). Valamint eredményeink kiértékelésénél azt is figyelembe vettük, hogy a növények és gyümölcsök felszínéről izolált élesztőgombák között megtalálhatóak potenciálisan humánpatogén fajok is.

Az élesztőgomba-élesztőgomba kölcsönhatásokat megfigyeléseink alapján 3 típusba soroltuk. Semleges hatásnak tekintettük minden olyan esetet, ahol nem tapasztaltunk szemmel látható kölcsönhatást. Tehát mind a pázsitként alkalmazott, mind a pázsitra oltott élesztőgomba zavartalanul szaporodott a petri-csészén. Egy élesztőgomba negatív hatással volt egy másikra, amennyiben körülötte feltisztult gátló zóna alakult ki (17. ábra B). Valódi feltisztult gátlózónát ritkán figyeltünk meg. És érdekes módon egyes esetekben serkentő hatás volt megfigyelhető a tesztelt törzsek körül (7. táblázat, S-el jelölve). Például a *Candida diversa* (*Saturnispora diversa*, 11-470) képes serkenteni a *Candida ethanolica* (11-473, 17. ábra D) és *C. tropicalis* (11-476, 17. ábra C) izolátumok sejteinek szaporodását. Emellett gátló- és stimulációs zónák együttes előfordulása is kimutatható (IS-el jelezve a 7. táblázat, 17. ábra A). És amint a 7. táblázat mutatja, a megvizsgált élesztőgomba fajok közül az *M. anaduensis* volt az egyik leghatékonyabban gátló faj.

7. táblázat. Az élesztőgombák képesek gátolni a gombás fertőzést okozó fajokhoz tartozó törzsek szaporodását (saját szerkesztés). +: gátló zóna jelenléte -: nincs gátlás S: serkentő hatás I-S: gátló- és stimulációs zónák együttes előfordulása nd: nincs vizsgálva. Táptalaj: EMMA, pH=7, szobahőmérséklet.

	Pázsitot alkotó gombás fertőzést okozó fajok					Pázsitot alkotó gombás fertőzést nem okozó fajok					
Tesztelt izolátumok	11-462 <i>Pichia kudriavzevii</i>	11-466 <i>Kodamaea ohmeri</i>	11-471 <i>Candida tropicalis</i>	2-1365 <i>Naganishia albida</i>	11-465 <i>Candida stigmatis</i>	11-463 <i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	11-467 <i>Starmerella meliponinorum</i>	11-468 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	11-469 <i>Candida citri</i>	11-470 <i>Saturnispora diversa</i>	11-461 <i>Wickerhamomyces orientalis</i>
Biokontroll aktivitásukról ismert fajok											
<i>Pichia kudriavzevii</i> 11-460	-	-	-	-	-	+	-	S	+	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalous</i> 11-502	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 11-481	-	-	-	S	-	+	nd	+	-	-	+
<i>Candida tropicalis</i> 11-476	-	-	-	+	-	+	-	-	-	S	-
<i>Pichia guilliermondii</i> 11-505	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	S
<i>Metschnikowia andauensis</i> 11-1120	-	+	+	-	+	I-S	+	+	+	+	+
<i>Metschnikowia</i>	-	-	-	S	+	S	+	-	+	+	+

<i>pulcherrima</i> 11-578											
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 11-11	-	-	-	S	+	S	-	-	-	+	+
Biokontroll aktivitásukról nem ismert fajok											
<i>Candida stigmatis</i> 11-465	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora thailandica</i> 11-472	-	-	-	S	-	+	-	-	-	-	+
<i>Candida ethanolica</i> 11-473	-	-	-	-	-	+	-	-	-	S	+
<i>Ogataea dorogensis</i> 11-486	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Papilioterma flavescens</i> 11-489	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	S
<i>Candida verbasci</i> 11-1055	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Wickerhamomyces orientalis</i> 11-461	-	-	-	-	S	-	+	-	-	-	-



17. ábra. Az élesztőgombák között fellépő kölcsönhatások típusa (saját szerkesztés). (A) Gátló- és stimulációs zóna együttes megjelenése a *Metschnikowia andauensis* körül *Saccharomycopsis crataegensis* (11-463) pázsiton (B) Feltisztult gátló zóna a *M. andauensis* (11-1120) törzs körül *Kodamaea ohmeri* (11-466) pázsiton. Serkentő hatás a (C) *Candida tropicalis* (11-476) és a (D) *C. ethanolica* (11-473) körül *C. diversa* (11-470) pázsiton.

5.4.2 Az antagonista hatás kifejeződésének mértékét befolyásoló tényezők

Korábbi tanulmányok (pl. Raspor és mtsai 2010, Spadaro és mtsai 2010b, Sipiczki 2006) és az eddigi eredményeink (lásd. *Metschnikowia andauensis pulcherrimin* termelésének vizsgálata) arra utalnak, hogy a táptalaj és a tenyésztési körülmények erősen befolyásolhatják a mikrobák biokontroll aktivitását. Így megismételtük kísérleteinket a humán gombás fertőzést okozó fajok egyikével (*N. albida*, 2-1365) eltérő pH-értékű, hőmérsékletű, minimál (EMMA) és komplett (YPA) táptalajokat és további teszt-törzseket alkalmazva.

Megfigyeltük, hogy az élesztőgombák közötti kölcsönhatást a tenyésztési körülmények erősen befolyásolták (8. táblázat). A pH-érték vagy a táptalaj összetételének változása a különböző fajok esetében eltérően befolyásolta a törzsek gátlóhatásának megnyilvánulását (18. ábra, 8. táblázat).

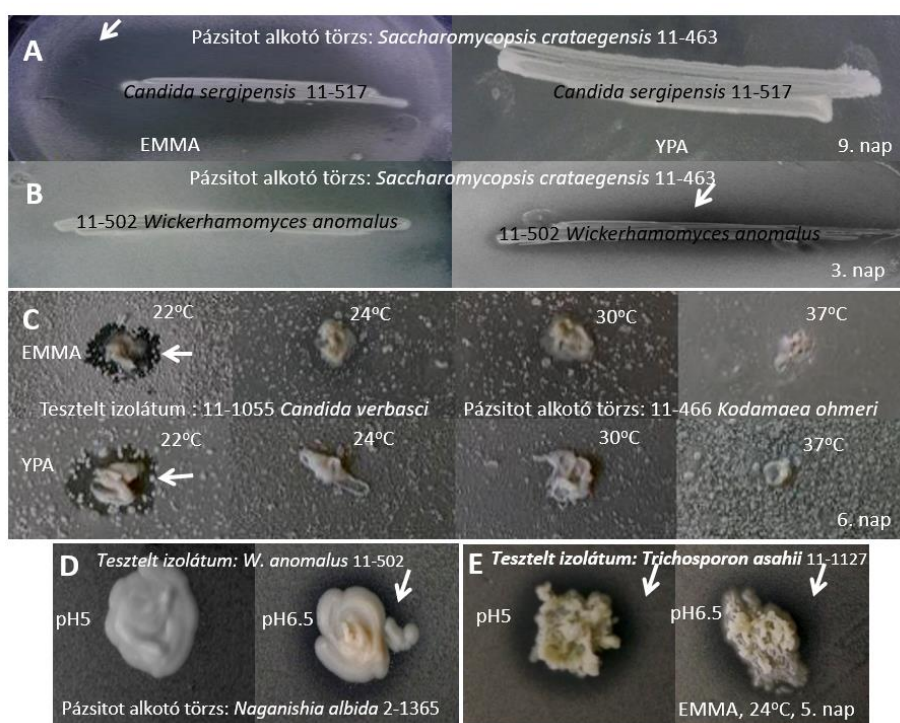
Bizonyos törzsek csak tápanyagban szegény táptalajon mutattak antagonizmust (pl. *W. sergipiensis* 11-517, 18. ábra A), míg más törzsek csak komplett táptalajon képeztek gátló zónát (pl. *Sporidiobolus ruineniae* 11-1185, 8. táblázat, vagy *W. anomalus* 11-502, 18. ábra B).

Hasonlóképpen, az inkubációs hőmérséklet is befolyásolhatja a gátlási zóna megjelenését. A gátlás bizonyos esetekben csak alacsonyabb (22 °C, 24 °C) hőmérsékleten jelent meg (például *Wickerhamomyces orientalis* 11-461, 8. táblázat vagy *Candida verbasci* 11-1055, 18. ábra C).

További kísérleteink azt is kimutatták, hogy az antagonizmus megjelenése függhet a tápközeg pH-jától. A *W. anomalus* (11-502) például pH=5-ös értéken nem gátolta a *N. albida* (2-1365) szaporodását, míg a pozitív eredményt kaptunk pH=6,5-ös értéken (18. ábra D, 8. táblázat). Hasonló eredményeket kaptunk a 11-476 és a 11-1188 *C. tropicalis* törzsek esetében

is (8. táblázat). Ezzel szemben *Ogataea dorogensis* (11-486) csak 5-ös pH értéken tud gátló zónát képezni (8. táblázat), míg a *Trichosporon asahii* (11-1127) ezen a téren kevésbé volt érzékeny a pH-változásokra (8. táblázat, 18. ábra E).

Bizonyos izolátumok, mint például a *Candida insectorum* (11-1193) minden körülmények között képes volt gátlolni a *N. albida* (2-1365) szaporodását (8. táblázat).



18. ábra. Az antagonista hatás megnyilvánulását befolyásoló tényezők (saját szerkesztés). (A) *W. sergipiensis* 11-517 csak tápanyagban szegény táptalajon mutat antagonizmust. (B) *W. anomalus* 11-502 csak komplett táptalajon képez gátló zónát. (C) A *C. verbasci* 11-1055 csak 22 °C-on képes gátlolni a *K. ohmeri* 11-466-os izolátumát. (D) A *W. anomalus* (11-502) pH=6,5-ös értéken gátlta a *N. albida* (2-1365) szaporodását. (E) A *Trichosporon asahii* (11-1127) nem volt érzékeny a pH-változásokra.

8. táblázat. Tenyésztési körülmények hatása az élesztőgombák közötti kölcsönhatások megnyilvánulására (saját szerkesztés). +: gátló zóna jelenléte -: gátló zóna hiánya nd: nincs vizsgálva, S: stimuláció I-S: gátló- és stimulációs zóna együttes előfordulása

Tesztelt izolátum megnevezése	Pázsitként alkalmazott törzs: <i>Naganishia albida</i> (2-1365)							
	Táptalaj típusa							
	YPA		EMMA		YPA		EMMA	
	Inkubációs hőmérséklet							
	24°C				30°C			
	Tápközeg pH értéke							
	pH=5	pH=6.5	pH=5	pH=6.5	pH=5	pH=6.5	pH=5	pH=6.5
<i>P. kudriavzevii</i> 11-460	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. kudriavzevii</i> 11-1146	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>W. anomalus</i> 11-502	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>S. cerevisiae</i> 11-481	-	-	-	S	-	-	+	-
<i>C. tropicalis</i> 11-476	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>P. guilliermondi</i> 11-505	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. andauensis</i> 11-1120	-	-	I-S	-	+	-	+	-
<i>M. pulcherrima</i> 11-578	-	-	S	-	-	-	S	-
<i>M. pulcherrima</i> 11-11	-	-	S	S		-	S	-
<i>C. stigmatis</i> 11-465	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. thailandica</i> 11-472	-	-	-	S	-	-	-	-
<i>C. ethanolica</i> 11-473	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. dorogensis</i> 11-486	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>P. flaveszens</i> 11-489	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. verbasci</i> 11-1055	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. orientalis</i> 11-461	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> 11-523	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. asahii</i> 11-1127	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>P. kluyveri</i> 11-1135	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. ruineniae</i> 11-1185	+	+	-	-	+	+	-	S
<i>C. insectorum</i> 11-1193	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. magnifica</i> 2-1366	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> 11-1188	+	+	-	-	+	+	-	-

5.4.3 A *Pichia kudriavzevii* szaporodása nehezen gátolható élesztőgombákkal

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy bizonyos élesztőgombák érzékenyebben reagálnak tőlük eltérő fajok jelenlétére, míg mások ellenálló képessége nagyobb (7. táblázat). Ilyen ellenállónak bizonyult a *P. kudriavzevii*. Ezért megismételtük a kísérleteinket úgy, hogy a *P. kudriavzevii* két törzsét (11-460, 11-462) használtuk pázsitként, és megvizsgáltuk a tesztelt törzsek gátló hatását a fajjal szemben.

Egyik vizsgálati törzs sem gátolta a *P. kudriavzevii* szaporodását sem minimál, sem komplett táptalajon (szobahőmérséklet, pH=7) (9. táblázat). Kijelenthetjük, hogy a *P. kudriavzevii* egy viszonylag ellenálló faj. Ezzel ellentétben például a *S. crataegensis* (11-463) érzékeny törzsnek mondható, mivel számos faj gátolta a szaporodásukat (9. táblázat).

9. táblázat. Különböző élesztő izolátumok antagonista hatásának tesztelése a *Pichia kudriavzevii* és a *Saccharomycopsis crataegensis* fajokkal szemben (saját szerkesztés). + : gátló zóna kialakult a tesztelt törzs körül; - : gátló zóna nem alakult ki a tesztelt törzs körül. Inkubációs hőmérséklet: szobahőmérséklet.

	Pázsítként alkalmazott izolátumok	
	<i>Pichia kudriavzevii</i> 11-460 és 11-462	<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> 11-463
Tesztelt izolátum megnevezése	Táptalaj típusa	
	EMMA/YPA	EMMA/YPA
<i>Aureobasidium pullulans</i> 11-501	-/-	-/+
<i>Candida boidinii</i> 11-484	-/-	-/-
<i>Kuraishia borneoana</i> 11-487	-/-	-/-
<i>Candida butyri</i> 11-513	-/-	-
<i>Pichia chibodasensis</i> 11-477	-/-	-/-
<i>Pichia chibodasensis</i> 11-478	-/-	-/-
<i>Candida citri</i> 11-469	-/-	-/+
<i>Saturnispora diversa</i> 11-470	-/-	+/-
<i>Candida ethanolica</i> 11-473	-/-	-/-
<i>Candida glabrata</i> 11-523	-/-	+/-
<i>Candida intermedia</i> 11-504	-/-	-/+
<i>Candida jaroonii</i> 11-506	-/-	-/+
<i>Candida jaroonii</i> 11-512	-/-	-/+
<i>Candida jaroonii</i> 11-514	-/-	-/+
<i>Candida parapsilosis</i> 11-519	-/-	-/-
<i>Candida pseudointermedia</i> 11-488	-/-	-/+
<i>Wickerhamiella sergipiensis</i> 11-517	-/-	+/-
<i>Candida suratensis</i> 11-507	-/-	-/+
<i>Candida suratensis</i> 11-509	-/-	-/+
<i>Candida suratensis</i> 11-510	-/-	-/+
<i>Candida tropicalis</i> 11-471	-/-	-/-
<i>Candida tropicalis</i> 11-521	-/-	-/+
<i>Starmerella bacillaris</i> 11-479	-/-	-/-
<i>Papiliotrema flavescens</i> 11-489	-/-	+/-
<i>Papiliotrema flavescens</i> 11-518	-/-	-/-
<i>Hanseniaspora thailandica</i> 11-491	-/-	-/-

<i>Hanseniaspora thailandica</i> 11-495	-/-	-/-
<i>Hanseniaspora thailandica</i> 11-499	-/-	-/-
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 11-494	-/-	-/-
<i>Pichia terricola</i> 11-475	-/-	-/-
<i>Kodamaea ohmeri</i> 11-466	-/-	-/+
<i>Kodamaea ohmeri</i> 11-490	-/-	-/+
<i>Kodamaea ohmeri</i> 11-500	-/-	-/+
<i>Metahyphopichia laotica</i> 11-511	-/-	-/-
<i>Metahyphopichia laotica</i> 11-516	-/-	-/+
<i>Metschnikowia koreensis</i> 11-464	-/-	-/-
<i>Metschnikowia koreensis</i> 11-482	-/-	-/+
<i>Metschnikowia laotica</i> 11-524	-/-	-/+
<i>Metschnikowia</i> sp. 11-1062	-/-	-/+
<i>Pichia anomala</i> 11-502	-/-	-/+
<i>Pichia anomala</i> 11-520	-/-	-/+
<i>Pichia anomala</i> 11-522	-/-	-/+
<i>Pichia bruneiensis</i> 11-485	-/-	-/+
<i>Pichia manshurica</i> 11-480	-/-	+/-
<i>Saccharomycopsis</i> <i>crataegensis</i> 11-496	-/-	-/-
<i>Starmerella caucasica</i> 11-1071	-/-	+/-
<i>Starmerella meliponinorum</i> 11-467	-/-	+/-
<i>Torulaspora delbrueckii</i> 11-474	-/-	+/-
<i>Wickerhamomyces orientalis</i> 11-461	-/-	-/-

5.4.4 Az antagonizmus kifejeződése fajspecifikus lehet

Vizsgálatunk során kiderült, hogy a tesztelt élesztőgombák antagonista hatása nagymértékben függ a partner törzstől. Például a *Pichia kudriavzevii* (11-460) gátolhatja a *Candida citri*-t (11-469) vagy *Saccharomycopsis crataegensis*-t (11-463), miközben nem képez gátló zónát a *Starmerella meliponinorum* (11-467) vagy *Candida stigmatis* (11-465) (7. táblázat) izolátumokkal szemben. Ha az eredményeket megvizsgáljuk olyan szempontból is, hogy a tesztelt fajokat felosztjuk gombás humán megbetegedést okozó és humán betegséget nem okozó csoportokba, akkor ugyanezt megfigyelhetjük ebben az esetben is. Például a *K. ohmeri* (11-466) (17. ábra B) és a *C. tropicalis* (11-471) szaporodását a *M. andauensis* (11-1120) képes gátolni, míg a *N. albida*-t a *W. anomalus* (11-502) és *C. tropicalis* gátolta (11-476) (7. táblázat). Más tesztelt fajok, mint például a *Pichia guilliermondii* (11-505) nem voltak képesek gátló zónát képezni a betegséggel összefüggő fajokkal szemben (7. táblázat, viszont hatásosak voltak több, a betegséghez nem kapcsolódó fajhoz tartozó törzs ellen (7. táblázat).

6 Eredmények megbeszélése

6.1 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 *H. thailandica* és a *W. 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. zizipicola*, *M. shanxiensis* törzsek, valamint további három pigmentet termelő *Metschnikowia* nemzetséghez tartozó izolátum is alkalmas lehet biokontrollra e fonalas gombával szemben.

6.2 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 típustörzsek közötti túl nagy hasonlóság miatt. Sipiczki és munkatársai 2013-as cikkükben pedig kimutatták, hogy a *M. andauensis* és *M. fructicola* típustörzsek 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 taxonómiai bélyeg alapján igencsak nehézkes. Figyelmünk így az ITS (Internal Transcribed Spacer) régió tanulmányozására irányult, mely DNS szakaszt a riboszomális 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

elszórta helyezkednek el a klónokban. A *M. fructicola* típustörzséből 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 szétszórta 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 szétszórta helyezkedik el, így az elkülönült rövidebb ismétlődések és különálló kópiák fizikailag lehetetlenné teszik a homogenizációt. Ez a feltételezés összhangban van négy *Nicotiana* faj egy újabb tanulmányának eredményeivel, amelyben összefüggést találtak az ITS1 ribotípusok száma és a riboszómális RNS-t

kódoló DNS egységek helyeinek száma között a genomban (Matyasek és mtsai 2012). A kutatók szerint a homogenizáció nagyobb a sorozatokon belül, mint a sorozatok között, és az alacsony szintű kromoszóma lókuszok közötti homogenizáció lehetővé teszi a különböző ribotípusok felhalmozódását. Habár a mi esetünkben a *M. andauensis* és *M. fructicola* ITS2 szekvenciái nem alkotnak különálló csoportokat.

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. A gombáknál a születés-halál evolúciós mechanizmust eddig csak az 5S gének esetében tanulmányozták (Rooney és Ward 2005), habár ez a régió taxonómiai szempontból nem jelentős.

Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a *pulcherrima* termelő fajok közötti izolációs határ nem teljes és a fajok képesek hibridizálni egymással. Ezt támasztotta alá az is, hogy például a *M. fructicola* és *M. andauensis* kromoszóma mintázata nagyon hasonlónak bizonyult, és 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.

Érdekes, hogy bár kaptunk fajon belül és fajok között is hibrideket, számos fajon belüli párosításban nem tudtunk prototróf telepeket azonosítani, amely felveti azt a lehetőséget, hogy a vizsgált *Metschnikowia* fajoknál is kialakulhattak párosodási típusok, mely jelenség megfigyelhető a

Metschnikowia nemzetségen belül több fajnál is, így például a *M. fucticola* esetében is (Wolfe és Butler 2017). Azaz elképzelhető, hogy ahol nem kaptunk prototróf telepeket, ott a mutánsoknak azonos párosodási típusa volt.

A genomon belüli magas diverzitásuknak köszönhetően a D1/D2 domén és az ITS régió alkalmatlan e fajok diagnosztizálására, ennél fogva a csoportba tartozó fajok/izolátumok taxonómiai helyzete felülvizsgálatra szorul.

A vizsgált *pulcherrimin* termelő fajok taxonómiai szempontból mozaikosságot mutatnak, melyről teljes képet akkor kaphatunk, ha minél több és minél több helyről származó izolátumot vonunk be a vizsgálatokba.

Itt meg kell említeni, hogy a törzsgyűjteményben megtalálható izolátumok azonosításakor két új faj leírására is sor került egy tanulmányban (*Diutina bernali*, *Diutina sipiczii*), melyek közül a *D. bernalii* esetében is megfigyelhetők a heterozigóta helyek az aszkomikóta élesztőgombák azonosítására használt riboszómális RNS-t kódoló DNS régiókban (Hyde és mtsai 2020). A *Diutina* nemzetséget nem sorolták be egyik családba sem a *Saccharomycetales* renden belül, de igen közeli rokonságban áll a *Debaryomycetaceae*/ *Metschnikowiaceae* kláddal (Hyde és mtsai 2020, Wijayawardene és mtsai 2020).

6.3 *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 fonalgombák 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.

A különböző környezeti tényezők közül vizsgáltuk többek között a tápközeget, a pH, a hőmérséklet, különböző szénforrások, valamint a Cu^{2+} -ion hatását is.

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 *Metschnikowia* izolátumok által képzett gátló zóna a leoltást követően gyorsan kialakul, határa egybeesik a pigmentált udvar határával, mérete nem növekszik, sőt a napok előrehaladtával csökken (Sipiczki 2006). Ezért amennyiben az élesztőgombák antagonista hatását fokozni szeretnénk valamilyen tápanyag hozzáadásával olyat kell választanunk, mely serkenti az élesztőgomba szaporodását és ezáltal már a kezdeti fázisban kialakul a

pigmentált zóna. Ezt a feltevést erősíti meg Sinigaglia és munkatársai (1998), akik úgy találták a *M. pulcherrima* esetében, hogy az élesztőgomba antagonista hatása magasabb sejtkoncentrációnál jobban kifejeződik *Penicillium glabrum*mal szemben.

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. Ezek az eredményeink egybevágóak Sipiczki (2006) és Melvydas (2016) megfigyeléseivel, akik szintén úgy észlelték a *M. pulcherrima* esetében, hogy a komplett táptalaj jobban kedvez a pigment képződésének a minimális tápanyag tartalmú táptalajokkal szemben. 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 tápközegben 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 biomassza, 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 alapanyagnak 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 gombaölőszereket már évszázadok óta használnak a gyümölcsök és zöldségek védelmében (Grangeteau és mtsai 2017). A réz-szulfát a fő összetevője a Bordói lének, mely Magyarországon is engedélyezett gombaölő szer az ökológiai gazdálkodásban (EU jogszabály, 889/2008/EK, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=CELEX:32008R0889>).

A réz-szulfát élesztőgombák szaporodására gyakorolt hatását már több kutatócsoport is vizsgálta (pl. Vadkertiova és Sláviková 2006, Comitini és Ciani 2008, Grangeteau 2015, Grangeteau és mtsai 2017, Barbosa és mtsai 2018). Például egyik kutatócsoport megállapította, hogy a szervesetlen gombaölő szerekkel (réz és kén alapú vegyszerek) kezelt területekről származó mintákban a *H. uvarum* és a *M. pulcherrima* jelenléte mutatható ki a legnagyobb számban (Grangeteau és mtsai 2017). Vadkertiova és Sláviková (2006) számos gomba izolátum réz, cink, nikkel és kadmium toleranciáját vizsgálta. Habár a tesztbe bevont 8 aszkomikóta faj közül (*Candida krusei*, *Candida maltosa*, *Candida lambica*, *W. anomalus*, *Pichia americana*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, *Williopsis saturnus*) egyik sem volt képes 10 mM-nál nagyobb töménységű réz jelenlétében szaporodni, de egy falevélről izolált *M. pulcherrima* izolátum jól tűrte ezt a koncentrációt. Hasonlót tapasztalt Grangeteau (2015), aki kifejezetten a *Candida* és *Metschnikowia* nemzetség réz tűrésére koncentrált. Ő úgy találta, hogy e két nemzetség tagjai más élesztőgombákhoz képest nagyobb réz toleranciával rendelkeznek, hiszen minden általa vizsgált izolátum képes volt szaporodni 2mM-nál nagyobb réz koncentráció mellett is. Azonban ahogy Vadkertiova és Sláviková (2006), úgy ez a kutatócsoport is kijelenti, hogy a réz tolerancia erősen törzsfüggő. A fent említett kutatócsoportok mindegyike a gombaölő szerek biodiverzitásra gyakorolt hatására fókuszálnak és megállapítják, hogy a *Metschnikowia* nemzetség tagjai viszonylag jól tűrik a réz jelenlétét a többi

élesztőgombával összehasonlítva. Ez önmagában pozitív eredmény, azonban bioprotekciós szempontból fontos azt is tudni, hogy a réz hatással van-e a biokontroll ágens gátló mechanizmusára. 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 antagonista hatását.

A nehézfém vegyületek, ha a túlzottan nagy koncentrációban vannak jelen, morfológiai változásokat idézhetnek elő (Fomina és mtsi. 2000), a fiziológiai tulajdonságokra is hatással lehetnek, például gátolják *Geotrichum candidum* amiláz-termelését (Falih 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.

6.4 Élesztőgombák egymásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Korábbi tanulmányokban megfigyelték, hogy antagonista kölcsönhatás léphet fel az élesztőgomba fajok között, és szabályozhatják egymás szaporodását (Wilson és Chalutz 1989, Wilson és mtsai 1991, Chan és Tian 2005, Heydari és Pessarakli 2010, Liu és mtsai 2013, Kunyeit és mtsai 2019, Zhimo és mtsai 2017).

A kísérleteink során különböző növények felszínéről gyűjtött élesztőgombák egymásra gyakorolt hatását is teszteltük. A tesztelt törzsek egy részének *postharvest* patogénnel szembeni antagonista hatása már ismert, mint például a *P. kudriavzevii* (Bleve és mtsai 2006, Korres és mtsai 2011), *C. tropicalis* (Zhimo és mtsai 2017), *W. anomalus* (Petersson és mtsai 1999) és *Metschnikowia pulcherrima* (Sipiczki 2006, Türkel és Ener 2009, Türkel és mtsai 2014, Raspor és mtsai 2010), míg más fajok gombaellenes kapacitása, mint pl. *Candida stigmatis* vagy *Candida verbasci* kevésbé tanulmányozott.

Megfigyeléseink szerint az élesztőgombák között fellépő antagonista 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 előállítására 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 antagonista 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 *N. 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 antagonista 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. *S. crataegensis* és *W. orientalis*). Az egyik *P. kudriavzevii* izolátum különösen toleráns volt a tesztelt élesztőgombákkal szemben, mivel 50 különböző (35 fajhoz tartozó) tesztörzs alkalmazása során sem találtunk olyan izolátumot, mely visszaszorította volna a szaporodását. Ellenállásának okai még nem ismertek, és további tanulmányozást igényelnek. Adatainkból az is kiderült, hogy a *K. ohmeri* és a *C. tropicalis* szaporodását a *Metschnikowia andauensis* képes gátolni, míg a *N. albida* a *W. anomalus* és a *C. 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

mefigyelhető 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 *N. 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.

7 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 találhatóak meg a fajcsoport típusörzseiben is. A jelenséget a csoporton belül a *Metschnikowia fructicola* és *Metschnikowia 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 találhatóak, amikor a szakaszt közvetlenül a genomokból szekvenáltuk. A probléma feloldása érdekében véletlenszerűen klónoztunk az

amplifikált DNS-készítményből, és meghatároztuk az egyes klónok szekvenciáját. Az összes *M. andauensis* és a legtöbb *M. fruticola* klón egyedi szekvenciákkal rendelkezett. A feltárt polimorfizmus nem tulajdonítható szekvenálási hibának, mivel a variábilis helyek nem véletlenszerűen szétszórtan 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. fruticola* 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 antagonist 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* fajtából létrehozott auxotróf mutánsok keresztezésével sikeresen tudtunk prototróf telepeket izolálni. A pulzáló gélelektroforézis vizsgálatok a *M. andauensis* és *M. fructicola* kariogramjának hasonlóságát mutatják, mely további bizonyíték a fajcsoport egyes tagjainak nagyfokú hasonlóságára.

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 *Pichia kudriavzevii* nehezen gátolható fajok közé tartozik.

Az opportunista 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 ferőzésekkel 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 jövőbeli trendjeit, és új gombaellenes szerek forrásai lehetnek.

8 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 *Metschnikowia fructicola* and *Metschnikowia 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. Pulsed gel electrophoresis studies show high similarity of the chromosome kariogram of *M. andauensis* and *M. fructicola*, this is further evidence of a high degree similarity between individual members of the species group.

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 *Pichia 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 *C. 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.

9 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.

10 Referenciák

- 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>
- Arevalo-Villena, M., Briones-Perez, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2017). Biotechnological application of yeasts in food science: Starter cultures, probiotics and enzyme production. *J Appl Microbiol.*, 123(6):1360-1372. doi: 10.1111/jam.13548
- Arneborg, N., H. Siegmundfeldt, Andersen, G. H., Nissen P., Daria V. R., Rodrigo P. J. and Gluckstad J. (2005). Interactive optical trapping shows that confinement is a determinant of growth in a mixed yeast culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 155–159.
- Banani, H., Spadaro, D., Zhang, D., Matic, S., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2015). Postharvest application of a novel chitinase cloned from *Metschnikowia fructicola* and overexpressed in *Pichia pastoris* to control brown rot of peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.002>
- 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>
- Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2018). Molecular and phenotypic characterization of *Metschnikowia pulcherrima* strains from Douro Wine Region. *Fermentation*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>
- Barnett, J. A. (2004). A history of research on yeasts 8: Taxonomy. *Yeast*, 21(14), 1141–1193. <https://doi.org/10.1002/yea.1154>
- Besançon, X., Smet, C., Chabalier, C., Rivemale, M., Reverbel, J. P., Ratomahenina, R., Galzy, P. (1992). Study of yeast flora of Roquefort cheese. *Int J Food Microbiol.* 17:9–18.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., & Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus*

- carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 204–209.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.004>
- Breuer, U., and Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23, 415–437.
doi: 10.1002/yea.1374
- Bruen, T. C., Philippe, H., & Bryant, D. (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics*, 172(4), 2665–2681. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.048975>
- 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>
- Carreras, E., Vázquez, L., Rodríguez Tudela, J. L., Pahisa, A., Azanza, J. R., Rovira, M., & De La Cámara, R. (2011). Update on fungemia in oncology and hematology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(SUPPL. 4), 42–47. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70035-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70035-0)
- 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>

- Coleman, A. W. (2015). Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genet.* 31, 157–163. doi: 10.1016/j.tig.2015.01.002
- Comitini, F., Ciani, M. (2008). Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Annals of Microbiology*, 58 (3) 489-493.
- 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
- Conway, W. S., Leverentz, B., Janisiewicz, W. J., Saftner, R. A., & Camp, M. J. (2005). Improving biocontrol using antagonist mixtures with heat and/or sodium bicarbonate to control *postharvest* decay of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 36(3), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.01.006>
- Cook, B. A. H., Slater C. A. (1954). Metabolism of “wild” yeasts i. the chemical nature of *pulcherrimin*. *Journal of the Institute Brewing, Volume60, Issue3*, 213-217. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1954.tb06226.x>
- Cook, B. A. H., Slater, C. A. (1956). The structure of *pulcherrimin*. *J. Chem. Soc.*, 4133-4135 <https://doi.org/10.1039/JR9560004133>
- 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>
- Csoma, H., Sipiczki, M. (2008). Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Res.*, 8(2):328-36. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00339.x
- 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.
- De Aguiar Cordeiro, R., De Oliveira, J. S., De Souza Collares Maia Castelo-

- Branco, D., Teixeira, C. E. C., De Farias Marques, F. J., Bittencourt, P. V., Carvalho, V. L., De Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, T., Brilhante, R. S. N., Moreira, J. L. B., De Aquino Pereira-Neto, W., Sidrim, J. J. C., & Rocha, M. F. G. (2015). *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. *Medical Mycology*, 53(2), 145–152. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu081>
- De Curtis, F., de Felice, D. V., Ianiri, G., De Cicco, V., & Castoria, R. (2012). Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. *International Journal of Food Microbiology*, 159(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.023>
- 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>
- de Paiva, E., Serradilla, M. J., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M. G., Villalobos, M. C., Casquete, R., & Hernández, A. (2017). Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunés. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.033>
- Diouf, P. N., Delbarre, N., Perrin, D., Gérardin, P., Rapin, C., Jacquot, J. P., & Gelhaye, E. (2002). Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4377–4382. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4377-4382.2002>
- do Carmo-Sousa, L. (1969). Distribution of yeasts in nature. In: A.H. Rose and J.S. Harrison (Eds), *The Yeasts*. Vol. 1. Academic Press, London, pp. 79–105
- 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>

- Elder, J. F., & Turner, B. J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology*, 70(3), 297–320. <https://doi.org/10.1086/419073>
- 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)
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1351–1371. doi: 10.1099/00207713-50-3-1351
- Fleet, G. H. (1998). The microbiology of alcoholic beverages. In: B.J. Wood (Ed.), *The Microbiology of Fermented Foods*, 2nd edn. Vol. 1. *Blackie Academic and Professional*, London, 217–262.
- 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.
- Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr Opin Biotechnol.*, 18(2):170-5. doi: 10.1016/j.copbio.2007.01.010
- Fokkema, N. J., J. G. den Houwer, Y. J. C. Kosterman and A. L. Nelis. (1979). Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72, 19–29.
- 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*

- 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>
- Gore-Lloyd, D., Sumann, I., Brachmann, A. O., Schneeberger, K., Ortiz-Merino, R. A., Moreno-Beltrán, M., Schläfli, M., Kirner, P., Kron, A. S., Wolfe, K. H., Piel, J., Ahrens, C. H., Henk, D., & Freimoser, F. M. (2018). Snf2 controls *pulcherriminic* acid biosynthesis and connects pigmentation and antifungal activity of the yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/494922>
- Grangeteau, C. (2015). Copper and sulfur in vitro tolerance of wine relevant strains: a focus on the genera *Candida* and *Metschnikowia*. *August*, 22–25. Conference: 10th International Symposium of Enology of Bordeaux
- 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>
- Grootjen, D. R. J., Meijlink, L. H. H. M., Vleesenbeek, R., van der Lans, R. G. J. M., Luyben, K. C. A. M. (1991). Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* in combination with *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* 13:530–536.

- Harrison, D. E. F. (1978). Mixed Cultures in Industrial Fermentation Processes. *Advances in Applied Microbiology*, 24, 129–164. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70638-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70638-5)
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. aki. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2), 160–174. <https://doi.org/10.1007/BF02101694>
- 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 fructicola* 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>
- Hillis, D. M., and Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66, 411–453. doi: 10.1086/417338
- Hoffman, C. S., Winston F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.*, 57(2-3), 267-72. doi: 10.1016/0378-1119(87)90131-4
- 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., Tworkoski, T. J., & Kurtzman, C. P. (2001). Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology*, 91(11), 1098–1108. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.11.1098>
- 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>
- Jarl, K. (1969). Production of microbial food from low-cost starch materials and purification of industry's waste starch effluents through the Symba yeast process. *Food Technol.* 23:23–26.
- Jarl, K. (1971). Utilization of waste material by fermentation. Communications from the Sweddish sugar corporation. *Socker Handl.* 25:4–11.
- 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
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. (2013). Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *Int. J. Modern Plant & Anim. Sci*, 1(12), 39–57.
- Kamienski, T. (1899). Notice préliminaire sur l'espe`ce de *Metschnikowia* (Monospora Metschn.). *Trav Soc Imp Nat St Pe'tersbourg* 30, 363–364.
- Kang, Y. M., Choi, J. E., Komakech, R., Park, J. H., Kim, D. W., Cho, K. M., Kang, S. M., Choi, S. H., Song, K. C., Ryu, C. M., Lee, K. C., & Lee, J. S. (2017). Characterization of a novel yeast species *Metschnikowia persimmonesis* KCTC 12991BP (KIOM G15050 type strain) isolated

- from a medicinal plant, *Korean persimmon* calyx (*Diospyros kaki* Thumb). *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0503-1>
- 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>
- Karabulut, O. A., Smilanick, J. L., Gabler, F. M., Mansour, M., & Droby, S. (2003). Near-Harvest Applications of *Metschnikowia fructicola*, Ethanol, and Sodium Bicarbonate to Control *Postharvest* Diseases of Grape in Central California. *Plant Disease*, 87(11), 1384–1389. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.11.1384>
- Kinay, P., & Yildiz, M. (2008). The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control *postharvest* decay of citrus fruit. *Biological Control*, 45(3), 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.001>
- Kluyver, A. J., van der Walt, J. P., van Triet, A. J. (1953). *Pulcherrimin*, The Pigment of *Candida Pulcherrima*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 39(7), 583-93. doi: 10.1073/pnas.39.7.583
- 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>
- Korres, A. M. N., Buss, D. S., Ventura, J. A., & Fernandes, P. M. B. (2011). *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. *Fungal Biology*, 115(12), 1251–1258. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.001>
- 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>
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front Plant Sci.*, 19;10:845. doi: 10.3389/fpls.2019.00845
- Krause, D. J., Kominek, J., Opulente, D. A., Shen, X. X., Zhou, X., Langdon, Q. K., DeVirgilio, J., Hulfachor, A. B., Kurtzman, C. P., Rokas, A., & Hittinger, C. T. (2018). Functional and evolutionary characterization of

- a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(43), 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806268115>
- 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. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Kunyeit, L., Kurrey, N. K., Anu-Appaiah K. A., Rao, R. P. (2019). Probiotic Yeasts Inhibit Virulence of Non-albicans *Candida* Species. *mBio.*, 10(5), 02307–19. doi: 10.1128/mBio.02307-19
- Kurtzman, C. P. (1993). Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63(2), 165–174. <https://doi.org/10.1007/BF00872391>
- Kurtzman, C. P. (2014). Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 325–332. doi: 10.1099/ijs.0.054197-0
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 73(4), 331-71. doi: 10.1023/a:1001761008817
- Kurtzman, C. P., & Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascospore 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>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The Yeasts* (Vol. 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., Basehoar, E., & Ward, T. J. (2018). Four new species of *Metschnikowia* and the transfer of seven *Candida* species to *Metschnikowia* and *Clavispora* as new combinations. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(11), 2017–2035. <https://doi.org/10.1007/s10482-018->

- Lachance, M. A. (2011). *Metschnikowia* Kamienski (1899). In *The Yeasts* (Vol. 2, Issue 1899). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00046-X>
- Lachance, M. A. (2016). *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. *Yeast*, 33(11), 563–574. <https://doi.org/10.1002/yea.3208>
- Lachance, M. A. (2018). C. P. Kurtzman's evolving concepts of species, genus and higher categories. *FEMS Yeast Res.*, 1;18(8). doi: 10.1093/femsyr/foy103. PMID: 30247671.
- Lee, D. K., Hsiang, T., & Lachance, M. A. (2018). *Metschnikowia* mating genomics. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(10), 1935–1953. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1084-y>
- 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
- Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C. P., & Camp, M. J. (2006). Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1135–1140. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1135-1140>
- Levis, C., Fortini, D., Brygoo, Y. (1997). Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Curr Genet.*, 32:157–162. doi: 10.1007/s002940050261
- Lindner, P. (1901) *Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben*, Berlin, 3te Aufl., p. 387.

- Liu, Y., Yi, L., Ruan, C., Yao, S., Deng, L., Zeng, K. (2019). Proline Increases Pigment Production to Improve Oxidative Stress Tolerance and Biocontrol Ability of *Metschnikowia citriensis*. *Front Microbiol.*, *11*, 10:1273. doi: 10.3389/fmicb.2019.01273
- 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>
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Tian, S., HersHKovitz, V., & Tworkoski, T. (2011). Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, *76*(1), 145–155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01037.x>
- 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
- Lorenzini, M., Simonato, B., & Zapparoli, G. (2018). Yeast species diversity in apple juice for cider production evidenced by culture-based method. *Folia Microbiologica*, *63*(6), 677–684. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0609-0>
- MacDonald, J. C. (1965). Biosynthesis of *pulcherriminic* acid. *The Biochemical Journal*, *96*(2), 533–538. <https://doi.org/10.1042/bj0960533>
- 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>
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., & Bertolini, P. (2012). Biocontrol of apple *postharvest* decay of *Aureobsidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, *73*, 56–62.
- Marth, E. H. (1978). Dairy products. In: Beuchat, L. R. (ed) Food and beverage mycology. AVI, Westport, CT, 145–172.

- Martins, N., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Silva, S., & Henriques, M. (2014). Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*, 177(5–6), 223–240. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9749-1>
- Matyasek, R., Renny-Byfield, S., Fulnecek, J., Macas, J., Grandbastien, M. A., Nichols, R., et al. (2012). Next generation sequencing analysis reveals a relationship between rDNA unit diversity and locus number in *Nicotiana* diploids. *BMC Genomics* 13, 722. doi: 10.1186/1471-2164-13-722
- Melvydas, 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>
- Molnár, O., & Prillinger, H. (2005). Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; Description of *Metschnikowia andauensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.009>
- 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>
- Němcová, A., Gonová, D., Samek, O., Sipiczki, M., Breierová, E., & Márová, I. (2021). The use of raman spectroscopy to monitor metabolic changes in stressed *Metschnikowia* sp. Yeasts. *Microorganisms*, 9(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020277>
- Ohta, T. (1989). The mutational load of a multigene family with uniform members. *Genet. Res.* 53, 141–145. doi: 10.1017/S0016672300028020
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014) (a). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., & Comitini, F. (2014) (b). Biocontrol of *postharvest* brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces*

- cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. *Postharvest Biology and Technology*, 96, 64–68.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.05.011>
- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., & Comitini, F. (2018). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 265, 18–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.027>
- Osei Sekyere, J. (2018). *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *MicrobiologyOpen*, 7(4), 1–29. <https://doi.org/10.1002/mbo3.578>
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2016). The effect of locust bean gum (LBG)-based edible coatings carrying biocontrol yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. *Food Microbiology*, 58, 87–94.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.014>
- 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>
- Péter, G., Takashima, M., Čadež, N. (2017). Yeast Habitats: Different but Global. In: Buzzini, P., Lachance, M. A., & Yurkov, A. (eds) *Yeasts in natural ecosystems: Diversity*. Springer, Berlin, Heidelberg. 39-71.

<https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-61575-2>

- Peterson, S. W., Kurtzman, C. P. (1991). Ribosomal RNA sequences divergence among sibling species of yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 14: 124–129. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80289-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80289-4)
- Petersson, S., Jonsson, N., & Schnürer, J. (1999). *Pichia anomala* as a biocontrol agent during storage of high-moisture feed grain under airtight conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 15(2), 175–184. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00081-7)
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E., Dobiasova, S., Rinaldi, M., Barton, R., Veselov, A., Finkelievich, J., Tiraboschi, N., Ellis, D., Fameree, D., van den Abele, 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>
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., & Gullino, M. L. (1997). Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis postharvest* rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 11(3), 131–140. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00022-7)
- 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 fructicola* strains used as biocontrol agents of postharvest diseases. *Front. Microbiol.* 9(593). doi: 10.3389/fmicb.2018.00593
- Pitt, J. I. and Miller, M. W. (1968). Sporulation in *Candida pulcherrima*, *Candida reukaufii* and *Chlamydozoma* species: their relationships with *Metschnikowia*. - *Mycologia* 60, 663–685.
- Prendes, L. P., Merín, M. G., Fontana, A. R., Bottini, R. A., Ramirez, M. L. (2018). Morata de Ambrosini VI. Isolation, identification and selection

- of antagonistic yeast against *Alternaria alternata* infection and tenuazonic acid production in wine grapes from Argentina. *Int J Food Microbiol.*, 2; 266, 14-20. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.033
- Punkari, L., Henrici, A. T. (1933). A Study of Variation in a Chromogenic Asporogenous Yeast. *J Bacteriol.*, 26(1):125-38. doi: 10.1128/JB.26.1.125-138.1933
- 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., Sangorrín, M. P., González, G. M., Ramos-Alfano, G., Adame-Rodriguez, J. M., Alcocer-Gonzalez, J. M., Arechiga-Carvajal, E. T., & Rodriguez-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
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M. C., Calle, A., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G., & Hernández, A. (2016). Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of *postharvest* fruit diseases. *Food Microbiology*, 57, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.003>
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., & Marquina, D. (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast

- Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, 155, 624-634.
- Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 121-128.
- Schisler, D. A., Janisiewicz, W. J., Boekhout T. and Kurtzman C. P. (2011). Agriculturally Important Yeasts: Biological Control of Field and Postharvest Diseases Using Yeast Antagonists, and Yeasts as Pathogens of Plants. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (eds) *The Yeasts taxonomic study* (Vol. 1). Elsevier B.V. 45-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Schlotterer, C., Hauser, M.-T., von Haeseler, A., and Tautz, D. (1994). Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, 11, 513–522. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040131
- Schmitt, M. J., and Breinig F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self protection. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 212–221. doi: 10.1038/nrmicro1347
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Scorzetti, G., Fell, J. W., Fonseca, A., Statzell-Tallman, A. (2002). Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.*, 2(4), 495-517. doi: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00117.x
- 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>
- Shen, X. X., Zhou, X., Kominek, J., Kurtzman, C. P., Hittinger, C. T., Rokas, A. (2016). Reconstructing the Backbone of the Saccharomycotina Yeast Phylogeny Using Genome-Scale Data. *G3 (Bethesda)*, 6(12):3927-3939.

doi: 10.1534/g3.116.034744

- Siewert, R. (1986). Zur Bedeutung der Hefen bei der Reifung von Camembert und Brie. *Dtsch Molk-Zeit*, 35:1134–1138.
- Sinigaglia, M., Corbo, M. R., & Ciccarone, C. (1998). Influence of temperature, pH and water activity on “in vitro” inhibition of *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling by yeasts. *Microbiological Research*, 153(2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(98\)80031-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(98)80031-1)
- 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. (2020). *Metschnikowia pulcherrima* and related *pulcherrimin*-producing yeasts: Fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms*, 8(7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071029>
- 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>
- Sláviková, E., Vadkertiová, R., & Vránová, D. (2007). Yeasts colonizing the leaf surfaces. *Journal of Basic Microbiology*, 47(4), 344–350. <https://doi.org/10.1002/jobm.200710310>
- Spadaro, D., Ciavarella, 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., Ciavarella, 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., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2004) (a). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology*, 33(2), 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.002>
- Spadaro, D., & Gullino, M. L. (2004) (b). 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)
- Spadaro, D., Lorè, A., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2013). A new strain of *Metschnikowia fructicola* for *postharvest* control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.08.001>
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., Gullino, M. L., (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against *postharvest* pathogens on apples, *Postharvest Biology and Technology*, Volume 24, Issue 2, 2002, 123-134, ISSN 0925-5214, [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00172-7).
- Steinkraus, K. H. (1979). Nutritionally significant indigenous foods involving an alcoholic fermentation. In: Gastineau, C. F., Darby, W. J., Turner, T. B. (eds) *Fermented foods beverages in nutrition*. Academic, London, 35–59.
- Stratford, M. (2006). Food and beverage spoilage yeasts. In: A. Querol and G.H. Fleet (Eds), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag,

Berlin, 335–380.

- 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.
- Sugihara, T. F. (1985). Microbiology of breadmaking. In: Wood, B. J. B. (ed) Microbiology of fermented foods, vol 1. *Elsevier, London*, 249–261.
- Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T., Shinoda, T. (2002). Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1826–1830. doi: 10.1128/JCM.40.5.1826-1830.2002
- Sugiyama, S. (1984). Selection of micro-organisms for use in the fermentation of soy sauce, *Food Microbiology*, Volume 1, Issue 4, 339–347. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(84\)90067-4](https://doi.org/10.1016/0740-0020(84)90067-4)
- Suh, S. O., Gibson, C. M., & Blackwell, M. (2004). *Metschnikowia chrysoperlae* sp. nov., *Candida picachoensis* sp. nov. and *Candida pimensis* sp. nov., isolated from the green lacewings *Chrysoperla comanche* and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1883–1890. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63152-0>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., Holzapfel, W. H., (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front Microbiol.*, 24;7:377. doi: 10.3389/fmicb.2016.00377
- 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->

- Torres-Machorro, A. L., Hernández, R., Cevallos, A. M., López-Villaseñor, I. (2010). Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiol Rev.*, 34(1), 59-86. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00196.x
- 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>
- Türkel, S., Korukluoğlu, M., & Yavuz, M. (2014). Biocontrol Activity of the Local Strain of *Metschnikowia pulcherrima* on Different Postharvest Pathogens. *Biotechnology Research International*, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2014/397167>
- Vadkertiová, R., & Sláviková, E. (2006). Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *Journal of Basic Microbiology*, 46(2), 145-152. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510609>
- Vaezi, A., Fakhim, H., Khodavaisy, 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 Médicale*, 27(2), 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.02.007>
- van Loon, L. C. (2000). "Helping plants to defend themselves: biocontrol by disease-suppressing rhizobacteria," In: Developments in Plant Genetics and Breeding, eds de Vries G. E. and Metzlauff K. *Amsterdam: Elsevier*, 203-213. doi: 10.1016/s0168-7972(00)80123-1
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, 33, 261-311. doi: 10.1146/annurev.genet.33.1.261
- 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>

- Vu, D., Groenewald, M., Szöke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., de Vries, M., Verkley, G. J., Crous, P. W., Boekhout, T., Robert, V. (2016). DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Stud Mycol.*, 85:91-105. doi: 10.1016/j.simyco.2016.11.007.
- Wachowska, U., Irzykowski, W., & Jędryczka, M. (2018). Agrochemicals: Effect on genetic resistance in yeasts colonizing winter wheat kernels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162(June), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.042>
- Wheeler, D. Q., Meier, R. (eds.) (2000). Species concepts and phylogenetic theory: a debate. *Columbia University Press*.
- 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>
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Al-Ani, L. K. T., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K. C., Zhao, R. L., Aptroot, A., Leontyev, D. V., Saxena, R. K., Tokarev, Y. S., Dai, D. Q., Letcher, P. M., Stephenson, S. L., Ertz, D., Lumbsch, H. T., Kukwa, M., Issi, I. V., Madrid, H., ... Thines, M. (2020). Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, 11(1), 1060–1456. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wilson, C. L., & Chalutz, E. (1989). *Postharvest* biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae*, 40(2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90092-7](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90092-7)
- 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)

- Wolfe, K. H., & Butler, G. (2017). Evolution of Mating in the *Saccharomycotina*. *Annual Review of Microbiology*, 71(June), 197–214. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093403>
- 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>
- Xue, M. L., Zhang, L. Q., Wang, Q. M., Zhang, J. S., & Bai, F. Y. (2006). *Metschnikowia sinensis* sp. nov., *Metschnikowia zizyphicola* sp. nov. and *Metschnikowia shanxiensis* sp. nov., novel yeast species from jujube fruit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), 2245–2250. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.64391-0>
- 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>
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010). Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against *postharvest* brown rot of peaches. *Postharvest Biology and Technology*, 55(3), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.09.007>
- 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>
- Zimmer, E. A., Martin, S. L., Beverley, S. M., Kan, Y. W., and Wilson, A. C. (1980). Rapid duplication and loss of genes coding for the chains of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 2158–2162. doi: 10.1073/pnas.77.4.2158
- 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>

11 Mellékletek

1. melléklet. *Metschnikowia* fajok típustörzseivel végzett asszimilációs és szaporodási tesztek (saját szerkesztés). p: piros, r: rózsaszínű, k: háttérből kinövő apró telepek, -: nincs szaporodás +: gyenge szaporodás, ++: erős szaporodás, +++: nagyon erős szaporodás

	<i>M. pu.</i> 11-578	<i>M. fr.</i> 11-579	<i>M. si.</i> 11-1088	<i>M. zi.</i> 11-1089	<i>M. sh.</i> 11-1090	<i>M. an.</i> 11-1120	<i>M. ch.</i> 11-1158
Glükóz	+++	+++	+++	+++ r	+++	+++ r	+++
Galaktóz	+++	+++	+++ p	+++ r	+++	+++ p	+++
Szorbóz	+++	+++	+++ r	+++ p	+++	+++	+++
Glükózamin PR	+++	++	++	++	++	++	++
Ribóz	+	(+) k	-	-	-	-	+
Xilóz	+++	+ k	++	+	++	++	-
L-arabinóz	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinóz	(+)	-	-	-	-	-	-
Ramnóz	-	-	-	-	-	-	-
Szacharóz	+++	+++ r	+++ p	+++ r	+++ r	+++ p	+++
Maltóz	+++	+++ r	+++ p	+++ r	+++	+++ p	+++ r
Trehalóz	+++	+ k	+++ r	+++ r	+++	++	(+) k
Mea-D-glükozid	+++	+++	+++ r	+++ r	+++ r	+++ p	+++ r
Cellobióz	+++ p	+++	+++ r	+++ r	+++	+++ r	+++
Szalicin	+++	++	++	++	++	++	++
Arbutin	+++	++	++ r	++ r	++	++ r	++
Melibióz	-	-	-	-	-	-	-
Laktóz	-	-	-	-	-	-	-
Raffinóz	+	-	-	-	-	-	-

Melezitóz	+++	+++ r	+++ p	+++ r	+++	+++ p	+++
Inulin	-	-	-	-	-	-	-
Keményítő	-	-	-	-	-	-	-
Glicerín	+++ r	+++	+++	+++ r	+++	+++	+++
Eritrit	-	-	-	-	-	-	-
Ribit	+++	+++	+++	+++ r	+++	+++ p	
Xilit	+++	+++ r	+++ p	+++ p	+++	+++ p	+++
DL-arabinít	-	-	-	-	-	-	-
Szorbit	+++	+++	+++ r	+++ p	+++	+++ p	+++ p
D-mannít	+++	+++	+++ r	+++ r	+++	+++ p	+++ r
Galaktitol	-	-	-	-	-	-	-
Mio-inozitol	-	-	-	-	-	-	-
1,5 lakton	+++ r	+++ p	+++ p	+++ p	+++ p	+++ p	+++ r
2-keto-D-glükonát	++	++	++	++	++	++	++
D-glükonát	++(+)	+	++	++ r	++	++	++
D-glükuronát	-	-	-	-	-	-	-
D-galakturonát	-	-	-	-	-	-	-
Laktát	(+)	-	+(+)	+	+	+	-
Szukcinát	+++	++	++ r	++ p	++ p	++ p	++
Citrát	(+)	(+) k	- k	+ k	+ k	+ k	-
Propán-1,2-diol	-	-	+	-	+	+	-
Bután-1,2-diol	-	-	-	-	-	-	-
Kínasav	++	+	++	++	++	++	-
DL-glükarát	-	-	-	-	-	-	-
2-deoxi-D	-	-	-	-	-	-	-

Fruktóz	+++	++	++	++ r	++	++ r	++
Mannóz	+++	++	+++	+++ p	+++	+++ p	+++
Etanol	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
Nitrát	-	-	-	-	-	-	-
Ninrit	-	-	-	-	-	-	-
Etilamin	-	-	-	-	-	-	-
L-lizin	+++ p	++	++ p	++ p	++ p	++ p	++
Kadaverin	++	++	++	++	++	++	++
Kreatin	+	+	+	+	+	+	+
Kreatinin	++	+	++	++	++	++	++
Imidazol	-	-	-	-	-	-	-
D-triptofán	++	+	++	++	++	++	++
Cikloheximid	-	-	-	-	-	-	-
Ecetcav	-	-	-	-	-	-	-
Glükózamin	++	++	++	++	++	++	++
vitamin nélkül	++	++	++ r	++ p	++	++ r	++
50% Glükóz	++	++	++	++	++	++	++
60% Glükóz	+	+	+	+	++	+	
37 °C	-	++	-	-	++	++	++
Sav termelés	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs
SMA	++	++	++ r	++ r	++ r	++ r	++ r

2. melléklet. Élesztőgomba izolátumok antagonista hatásának vizsgálata *Botrytis cinerea* (T4) fonalas gombával szemben PDA táptalajon, 23°C-on, 4. napon (saját szerkesztés). Kategóriák: 1.: Tiszta áttetsző gátló zóna 2.: Opálos, majdnem áttetsző gátló zóna 3.: Kevésbé nő a *B. cinerea* az élesztőgomba törzs környezetében, de nincs feltisztult gátló zóna 4.: Nincs gátló zóna, a telepet szorosan körülnövi a *B. cinerea* 5.: A telepet benövi a *B. cinerea*.

1. kategória
<i>Metschnikowia andauensis</i> (11-1120=HA 1657), <i>Metschnikowia fructicola</i> (11-579=CBS 8853), <i>Metschnikowia</i> sp. (9/2/18), <i>Metschnikowia</i> sp. (62/1/3), <i>Metschnikowia pulcherrima</i> (11-578 (CBS 5833)), <i>Metschnikowia shanxiensis</i> (11-1090=CBS 10359), <i>Metschnikowia sinensis</i> (11-1088=CBS 10357), <i>Metschnikowia ziziphicola</i> (11-1089=CBS 10358), <i>Metschnikowia</i> sp. (11-1062)
2. kategória
<i>Candida jarrowii</i> (11-506, 11-512), <i>Candida orthopsilosis</i> (11-493), <i>Candida stigmatis</i> (11-465), <i>Candida tropicalis</i> (11-521, 11-1188), <i>Hanseniaspora thailandica</i> ((11-472, 11-492, 11-499), <i>Hanseniaspora uvarum</i> (11-494), <i>Kodamaea ohmeri</i> (11-466), <i>Metschnikowia koreensis</i> (11-464, 11-482), <i>Ogataea minuta</i> (11-483), <i>Pichia bruneiensis</i> (11-485), <i>Pichia kluyveri</i> (11-1135), <i>Pichia kudriavzevii</i> (11-460, 11-462), <i>Saccharomycopsis crataegensis</i> (11-463), <i>Saturnispora diversa</i> (11-470), <i>Starmerella bacillaris</i> (11-479), <i>Wickerhamomyces anomalus</i> (11-502, 11-503, 11-520, 11-522), <i>Wickerhamiella sergiensis</i> (11-517)
3. kategória
<i>Candida suratensis</i> (11-510), <i>Kodamaea ohmeri</i> (11-500), <i>Metahyphopichia laotica</i> (11-511), <i>Pichia manshurica</i> (11-480), <i>Pichia terricola</i> (11-475), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (11-481), <i>Starmerella meliponinorum</i> (11-467), <i>Torulaspora delbrueckii</i> (11-468, 11-474)
4. kategória
<i>Candida butyri</i> (11-513), <i>Candida boidinii</i> (11-484), <i>Candida citri</i> (11-469), <i>Candida ethanolica</i> , (11-473), <i>Candida glabrata</i> (11-523), <i>Candida tropicalis</i> (11-471), <i>Hanseniaspora thailandica</i> (11-495), <i>Metschnikowia reukaufii</i> (11-496), <i>Pichia chibodasensis</i> (11-478), <i>Saccharomycopsis crataegensis</i> (11-1069), <i>Trichosporon asahii</i> (11-1127)

5. kategória

Aureobasidium pullulans (11-501), *Candida pseudointermedia* (11-488), *Candida intermedia* (11-504), *Candida jaroonii* (11-514), *Candida parapsilosis* (11-519, 11-525), *Candida suratensis* (11-507, 11-509), *Candida tropicalis* (11-476), *Candida verbasci* (11-1055), *Diutina bernali* (DEBM179), *Diutina sipiczki* (DEBM180, DEBM180), *Hanseniaspora thailandica* (11-491, 11-497), *Pichia kudriavzevii* (11-498), *Kodamaea ohmeri* (11-490), *Kuraishia borneana* (11-487), *Kwoniella heveanensis* (11-515, 11-518), *Metahyphopichia laotica* (11-516), *Metschnikowia chrysoperlae* (11-1158=CBS 9803), *Metschnikowia laotica* (11-524), *Meyerozyma caribbica* (11-505), *Ogataea dorogensis* (11-486), *Papiliotrema flavescens* (11-489), *Pichia chibodasensis* (11-477), *Starmerella caucascia* (11-1071), *Wickerhamomyces orientalis* (11-461)

3. melléklet. A dolgozatban felhasznált szekvenciák.

ITS

>Metschnikowia_andauensis_clone_Ian10_from_type_KM243748_1

ATTTGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAA
AAATATTGGATACACACTTTTAGGCATAAAACACTTACCATTGAATTCTTCAATAACACAAT
TAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTG
CGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG
GGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCC
TGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTATAGCCCCAGCCTTTTCTCACCCT
CGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAAAAGCCGGAGGAA

>Metschnikowia_andauensis_clone_Ian6_from_type_KM243747_1

ATTTGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAATTTGA
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATATTG
AAATTACACCCTTTTAGGCACAAACTCTAAATCTTAACCGTCAATAATCTTTAAAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTA
ATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCC
CCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGCG
CTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTATAGCCCCAGCCTTTTCTCACCCTCGTAAGAC
TACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAAAAGCCGGAGGAA

>Metschnikowia_andauensis_clone_Ian5_from_type_KM243746_1

ATTTGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAA
ATATTGTTTTTACACCCTTTTAGGCACAAACTCTAAATCTTAACCGTCAATAACACAATTA
AAAAAATTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCG
ATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGG
GTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTG
CTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTATAGCCCCATCTTCTTCTCACCCTCG
TAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAAAAGCCGGAGGAA

>Metschnikowia_andauensis_clone_Ian51_from_type_KM243745_1

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAA
ACTCTAAATCTTAACCGTCAATAATTTTTTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGA
TATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATA
AGTTTTAGCCCCATTCTTTTCTCACCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAA

>Metschnikowia_andauensis_clone_Ian43_from_type_KM243744_1

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATATTGTTTTTACACCCTTTTAGGCACAA
ACTCTAAATCTTAACCGTCAATAATCTTTTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATC
ATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGC
GATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAA
TAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTTCTCACCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_andauensis_clone_Ian42_from_type_KM243743_1

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGTTTTACACCCTTTTAGGCACAA
ACTCTAAATCTTAACCGTCAATAACTTTATCAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATC
ATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGC
GATATTTACTCTCAAACCTCTGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAA
TAAGTTTTAGCCCCATTCTTTTTCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_clone_Ifrc27_from_type_KM213984_1

CTTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAATTTATTATACACTTTTAGGCACA
AACTCTAAATCTTAACCGTCAATAACTTTATCAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAAT
CATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGC
GATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAA
TAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_clone_Ifrc26_from_type_KM213983_1

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAATATTATTACACACTTTTAGGAGAA
ACAACCTGAACCTTTTTTTTCAATAACACAATTCAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAAT
CATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGC
GATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAA
TAAGTTTTAGCCCCAGCCTTTTTCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_clone_Ifrb17_from_type_KM213982_1

TTCCGTAGGTGGACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAAA
CTCTAAATCTTAACCTCAATAACTTTATCAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAA
GTTTTAGCCCCATCCTTTTTCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA
TAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_clone_Ifrb15_from_type_KM213981_1

TTTCCGTAGGATGACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAAA
ACTCTAAATCTTAACCTCAATAACTTTATCAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATC
ATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCG
ATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAAT
AAGTTTTAGCCCCATCCTTTTTCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATC
ATAA

>Metschnikowia_fruticola_clone_Ifrb13_from_type_KM213980_1

GACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAAACTCTAAATCTT
AACCTCAATAACTTTATCAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCTCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTC
AAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCC
CATCCTTTTTCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATA

>Metschnikowia_fruticola_clone_Ifr9_from_type_KM213979_1

TTCCGTAGGATACCTGCGGAAGGATCATTATAATTGTTTTACACCCTTTTAGGCACAAAC
TCTAAATCTTAACCCTCAATAACTTTATCAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATT
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAA
GTTTTAGCCCCAGCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAGCCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_clone_Ifr6_from_type_KM213978_1

TTCCGTAGGGTGACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAA
CTCTAAATCTTAACCCTCAATAACTTTATCAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAA
GTTTTAGCCCCATCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_clone_Ifr4_from_type_KM213977_1_

TTCCGTAGGGTGACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAA
CTCTAAATCTTAACCCTCAATAACTTTATCAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAA
GTTTTAGCCCCATCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAGCCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_277_unitig_32_ANFW02000025_1

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAAAAACACTTATACACTTTTAGGCATAA
ACACTTACCATTGAATTCTTCAAATACACAATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAA
TCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAG
CGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGA
ATAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_277_unitig_83_ANFW02000048_1

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAATATTATTACACCCTTTTAGGCACAA
CTCTAAATCTTAACCCTCAATAACTTTATCAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGA
TATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATA
AGTTTTAGCCCCAGCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_277_unitig_150_ANFW02000055_1

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAA
CTCTAAATCTTAACCCTCAATAACTTTATCAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAA
GTTTTAGCCCCATCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fruticola_277_unitig_187a_ANFW02000058_1

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAATATTATTACACCCTTTTAGGCACAAA
CTCTAAATCTTAACCGTCAATAATTCTTTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATT
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAA
GTTTTAGCCCCAGCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fructicola_277_unitig_187b_ANFW02000058_1

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAATATTATTACACCCTTTTAGGCACAAA
CTCTAAATCTTAACCGTCAATAATTCTTTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATT
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAA
GTTTTAGCCCCAGCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fructicola_277_unitig_199a_ANFW02000078_1

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATATTTTTACACCCTTTTAGGCACAAACT
CTAAATCTTAACCTCAATAACTTTATCAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATA
TTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAG
TTTTAGCCCCAGCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
AAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fructicola_277_unitig_199b_ANFW02000078_1

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATATTGATTTACACCCTTTTAGGCACAAAC
TCTAAATCTTAACCTCAATAACTTTATCAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATT
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAA
GTTTTAGCCCCAGCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAA

>Metschnikowia_fructicola_277_unitig_213_ANFW02000056_1

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAATTGTTTTTACACCCTTTTAGGCACAAA
CTCTAAATCTTAACCGTCAATAATTTCTTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGA
TATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATA
AGTTTTAGCCCCAGCCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGAA

>KY104196_1_Metschnikowia_chrysoperlae_culture_CBS_9803

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAAACACTTATACACTT
TTAGGCATAAACACTTACCATTGAATTCTTCAAATACACAATTAAAAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGC
AGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGC
GTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAAC
GGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCA

>MG050888_1_Metschnikowia_rubicola_strain_NRRL_Y_6064

GATCATTAATAAAAAACACTTATACACTTTTAGGCACAAACTCTAAATCTTAACCGTCAATAA
TTCTTTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCG
CCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTT
GGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTA

>MF446617_1_Metschnikowia_persimmonesis_voucher_KCTC_12991BP

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAATATTGGATACACCCTTTTAGGAAAAACA
CTCTAAATCTTAAACCTCAATTATTTTTTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGA
TATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATA
AGTTTTAGCCCCCTTCCTTCTCCTCACCCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGA

>NR_158857_1_Metschnikowia_leonuri_NRRL_Y_6546_ITS_region_from_TYPE_material

GATCATTAATAAATATTATTACACACTTTTAGGAAAAACAACCTGAACCTTTTTTTTCAATA
ACACAATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTG
CGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGT
TTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTA

>NR_077075_1_Metschnikowia_drosophilae_CBS_8809from_TYPE_material

AGTAGAAGGTGCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAACA
TTAAACACTTGGGTGAAAACACACACACCAATTTTTTTCTCTTTTCTTTGAAAAACAA
AAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATCGCG
ATACGTGGTATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTGGAG
GCATTCCTCCAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTTTCCTCCACCAGCAATGGTGCGGTGA
TGCGGCCCAAAAAACACGGTTGACGATTGACGACTTCGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAAACCAACC

>NR_077083_1_Metschnikowia_viticola_CBS_9950from_TYPE_material

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAATAATTACACAACACTTTTAGGCATA
AACACTAAATCTTACCTTTCAAAAAGTTTAAAAATAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGA
ATCATTGAATTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCAAGGCATGCGTGAATGA
GCGATATTTACTCTCAAACCTAGGGTTTGGTCCTGGCCCTACAGCCTAAACATCAACTGA
TTTTAAATAAGTTTAAATCTCATCCCCCTTATTTCTCATTTTTCG

TAAGACTACCCGCTGAACCTTAAG

>NR_111252_1_Metschnikowia_reukaufii_CBS_5834_from_TYPE_material

GATCATTAATAAATAATTTATACAACACTTTTAGGAATAACAAACCAAAACATTAATTTCA
ATAAAAAGTTTAAAAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATTTTGAACGC
ACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCAAGGCATGCGTGGATGAGCGATATTTACTCTCAAACC
TATGGTTTGGTTTGTAAATCCTAAATATCAACGGTATCTAGAATAAGTTTTAGAACCACCT
TTTTACTTCCTCATCTTCGTAAGACTACCCGCTGACTTAA

>NR_111376_1_Metschnikowia_chrysoperlae_ATCC_MYA_4304_from_TYPE_material

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAATAACACTTATACACTTTTAGGCATAA
ACACTTACCATTGAATTTCTTCAAATACACAATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAA

TCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAG
CGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGA
ATAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTAAGCATA
TCAATAAGCGGAGGA

>NR_111377_1_Metschnikowia_pimensis_ATCC_MYA_4306from_TYPE_material

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATATTATACACACTTTTAGGAACA
AACTCTAAATCTTAACCTTCAAAAAAACACAAAAAATACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTG
AATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTG
AGCGATATTTACTCTCAAACCTTCGGTTTGGTTTTGCCCGGCTAAATATCAACGGCGCTA
GAATAAGTTTTAGCCCCCTTCTTTTTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGA

>NR_111396_1_Metschnikowia_chrysolimidarum_ATCC_MYA_4344from_TYPE_material

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAATAATTTATACACACTTTTAGGCATA
AAAACCTAACTTTTATTCTCAAGAAATCTAAAGAAAAAATACTTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAA
TCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCAAGGCATGCGTGAATGAG
CGATATTTACCCTCAAACCTTTGGTTTGGTTTTGGCCCTGGCCTCAATATCAACTGGCTCTA
GAATAAGTTTTAGACCCACTCCCTTCATCTCATTTTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGA

>NR_119735_1_Metschnikowia_agaves_CBS_7744from_TYPE_material

GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACAAAAAATAATTCT
TTCACACATGAATTCTATTCTATAAATTACACAAAACATAATTTTTTTTTGAAAAAATTGA
AAACAACCTCAAGTTTTTAACAATAAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATTG
AATTTTTGAACGCACATTGCGCCTTTAGGTATTCTCAAGGCAGGCCTGTTTGAGCGTCGT
TTCTTCTCAAGCCCTATATTTTCGGCTTGGTGTGGCTCGGCCCAAAATCAAGGAACCTTTT
TCAAAATAAGATTTTGAAAGGCACTTTAGTCCTTTTTATTTTGGACCTCAAATCAGGCCAG
ACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACC

>NR_138172_1_Metschnikowia_cibodasensis_UICC_Y_335from_TYPE_material

AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATATTATACAACACTTTTAA
GGAGAAAAAACAATACTTAATTTCAATATAAAGTTAAATAAAAAAATACTTTCAACAACG
GATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGC
AGACGTGAATCATTGAATTTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCTCAAGGCATGC
GTGGATGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCTTGGTTTGGTTTTGTAATCTAAATATCAAC
GGTATCTAGAATAAGTTTTAGAACCACCAACTACTTCCTCATCTTCGTAAGACTACCCGC
TGAACCTAAGCATATCAATAAGCGG

>NR_138245_1_Metschnikowia_bicuspidata_var__chathamia_CBS_5980from_TYPE_material

CGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCTGGATTAAAGTTTAAAGCTGGGGCAACCCGGGTTAAT
GCTGAGAACTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTTTCCG
TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAAAACAATACACTCTTTTAGGAAAAACAA
CAAAACATTTTATTTCACAACAATAAAAAAATACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCAT
TGAATTTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCTCAAGGCATGCGTGGATGAGCGAT
ATTTACTCTCAAACCTCTTGGTTTGGTCTTGACTCCAGGTCTAAATATCAAATGTCTCTAGA
ATAAGTTTTAGATTCTCCAATCTTCCTCATCTTCGTAAGAATACCCGCTGAACCTTAGCA
TATCAATTAGCGGAAG

>NR_138246_1_Metschnikowia_zobellii_CBS_4821from_TYPE_material

TTTAATGACCTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATATTATAC
AATCTTTCTAGGAACAAAATCAATAACATTTAATTAACCTCAACAAGTTTAAAAA
AATAAAAAAATTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAT
TGCGATACGTAATATGACTTGACAGCTGAATCATTGAATTTTGAACGCACATTGCGCCT
TAAGGTATTCTCAAGGCATGCGTGATGAGCGATTTACTCTCAAACCACCTGGTTTGG
TCTTGGCCCCCTTTTTTTTCATAGGGCCTAAATATCAAATGGTCTCTAGAATAAGTTTTAG
AAACTCAAAACCTTTAACTTCCTCATCTTCGTAAGACTACCCGCTGACTAAGCATATCAAT
AAGC

>NR_155362_1_Metschnikowia_noctiluminum_NRRL_Y_27753from_TYPE_material

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATATTATACATCTCTTAGG
ATTAAACACTAAATGTTATATATTTCAACAAGTTTAAAAAATAAAAAAACTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTT
GCAGACGTGAATCATTGAATTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCAAGGCAT
GCGTGAATGAGCGATATTTACTCTCAAACCCCTAGGGTTTGGTCTTGGCCCCCTACAGCCT
AAACATCAACTGATTTTAAAAATAAGTTTAAATCTCATCCCCCTTATTTCTCATTTTCGTAA
GACTACCCGCTGAACCTAAG

>NR_155369_1_Metschnikowia_rancensis_CBS_8174Tfrom_TYPE_material

TAATGATCCTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATATAATATTTACACACTCTT
AGGAACAAACTCTAAATCTTAAATCTCAACAAAGTTTAAAAAATAAAAAAACTTTCAACACGG
ATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCA
GACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCAAGGCATGCG
TGAATGAGCGATATTTACCCTCAAACCCCTTGGTTTGGTCTTGGCCCTAAATATCAACCGGT
ACTAGAATAAGTTTTAGAACCCTACTCCTTCTCATTTTCGTAAGACTACCCGCTGAACT
TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAGGG

>NR_155402_1_Metschnikowia_orientalis_CBS_10331from_TYPE_material

AAAAGTTGGAACAAGTTTCCGTAGGGGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAATAAATTTGA
TACACTGATTAAGAAGAACGAAAATAAATATATTTTTTAAAAAAGAGATACTTAAAAAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATTGCGATAC
GTAATATGACTTGACAGCGTGAATCATTGAATTTTGAACGCACATTGCGCCTTTTGGTAT
TCCAAAAGGCATGACTGTTTGAGCGTCGTTACCCTCAATCCTATGGATTGGCCCTGCCTT
CGGGCCAAAATTCAATTTAAAGAGATTCTAAGAACCTCTTTTCTCGACCTCAAATCAATC
AAGACTACCCGCTGAACCTTAGGCATATCAA

>NR_155403_1_Metschnikowia_shanxiensis_CBS_10359from_TYPE_material

TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAATATTATTACACACT
TTTAGGAAAAAACAACCTGAACCTTTTTTTTCAATAACACAATTCAAAAACCTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGC
AGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGC
GTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTTGGCCTAATATCAAC
GGCGCTAGAATAAGTTTGTAGCCCCAGCCTTTTCTCACCCTCGTAAGACTACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCAATAAGCGGA

>NR_155404_1_Metschnikowia_sinensis_CBS_10357from_TYPE_material

AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAATATTATTACAC
ACTTTTAGGAAAAAACAACCTGAACCTTTTTTTTCAATAACACAATTCAAAAACCTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACT
TGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCA
TGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTTGGCCTAATATC
AACGGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCCCAGCCTTTTCTCACCCTCGTAAGACTACCCGCT
GAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA

>NR_155405_1_Metschnikowia_vanudenii_CBS_9134from_TYPE_material

TGAATGGCTTAGTGAGGCCTCTGGATTAAGATTTAGGGCGGGGCAACCTGCTTTGGGTCTG
AGAAACTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG
TGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATATAATTTATTCACACTCTTAGGAACAAACTCTAAATC
TTAAATCTCAACAAAGTTTAAAAAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATC
TTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCCTCAAGGCATGCGTGAATGAGCGATATTTAC
CCTCAAACCCTTGGTTTGGTTTTGGCCCTAAATATCAAATGGCTCTAGAATAAGTTTTAGA
ACCACTACTTCTTCCTCATTCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGC
GGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAA

>NR_156313_1_Metschnikowia_kofuensis_CBS_8058from_TYPE_material

TTCCCGTTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAACAATACATCTCTTCTAGGATTA
AACACTAAATCTTACCTTTCAATAAGTTTAAAATAAAAAAATTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGA
ATCATTGAATTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCCTCAAGGCATGCGTGAATGA
GCGATATTTACTCTCAAACCCTAGGGTTTGGTCTGCGCCCTACAGCCTAAACATCAACTGA
TTTTAAAATAAGTTTAAATCTCATCCCCCTTATTCCTCATTTTCGTAAGACTACCCGCTGA
ACTTAAGCATATCAATAAGCGGGAGGAAA

>NR_158796_1_Metschnikowia_henanensis_CICC_1982from_TYPE_material

AAGGATCATTAAACAATACATTACAACACTTTTAGGCACAAACGCTAAATCTGAACCTTTCAA
GTACCAAAGAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATTTTGAACGCACAT
TGCGCCTTAAGGTATTCCTCAAGGCATGCGTGAATGAGCGATATTTACTCTCAAACCTTTG
GTTTGGTCTTGCCCCCGGCTAAATATCAAATGGCTCTAAAATAAGTTTTAGACCAACCCCT
AATTCCTCATTTTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTA

>NR_158855_1_Metschnikowia_citriensis_CICC_33213from_TYPE_material

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGTAAGGATCATTAGAATATTGGATACACCCTTTTAGGAAAAC
ACTCTAAATCTTAAACCTCAATTATTTTTTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCA
TTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCG
ATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAAT
AAGTTTTAGCCCCATCCTTCTTCCTCACCCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGG

>NR_158857_1_Metschnikowia_leonuri_NRRL_Y_6546from_TYPE_material

GATCATTAAAAATATTATTACACACTTTTAGGAAAAAACAACCTGAACCTTTTTTTTCAATA
ACACAATTAAAAAAATTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTG
CGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGT
TTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCACGGCGCTA

>NR_158858_1_Metschnikowia_anglica_NRRL_Y_7298from_TYPE_material

GATCATTACAAAAAACAATTGACACCCTTCTAGGAAAAAACAACACACACAATAACTT
TACTTTATTTAAATTATAACATAAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGA
ATTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCCTCAAGGCATGCGTGGATGAGCGATATT
TCCCCCTCAAACCTCTCGGTTTGGTTTTGGTTTTGGCCCCCTTTGGCCCCAAATATCAAC
TGGCTTCTA

>NR_160313_1_Metschnikowia_cubensis_MUCL_45753from_TYPE_material

GCGACTCTTTTTAAATTTCTGAAGTTATTCAAACCTGGTGATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGT
AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTAATCAAATCTTTA
GGATTGAAGTACCCAAACCTTTTTAAACAATATTCAACCAAGTTTCTTTAAACCTTTC
AACAACGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACGATAAGTATCAT
GAGTTGCAGACGTGAATCATTAATTTTTGAACGCACATTGCACCTTGATCCAGCATCAAGTA
TGGGGGAGTGAGAGAGTATTTCTCGGCCACCTTCTGAGGTGCCGGCTTATAACTCAAATA
AATATCAAATTTTTCTCTCACTGTCCCAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAG
CGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTACCTCAGTAACGGCGAGTGAA

>NR_160607_1_Metschnikowia_maroccana_CBS_15053from_TYPE_material

TTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATAGTACCAAACACTTTTAGGAAAACAACT
TAGAATATTATATCTCAATCACCCAAAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTG
AATTTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCAAGGCATGCGTGAATGAGCGATGT
TTATTCTCAAACCTTCGGTTTGGTCTTGGCCCTAAATATCAAATGTTTGTAGAATATGTTTT
ACAACCATCCATCTTCTCATTTTCGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAA
GCGGAGGAAAAGA

>NR_160985_1_Metschnikowia_mauinuiana_CBS_10060from_TYPE_material

GAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAAATTACATTACATTCTTTAGGATTTAGAACTACCA
AAAAACATTTTTTATAATTATTCAACCAAGTTTTCTTTAAACCTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTCGTATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACGATAAGTATTATGAGTTGCAGACGTG
AATCATTAATTTTTGAACGCACATTGCACCTGATCTAGCATCAAGTATGGGGGAGTGAGAG
AGTATTTCTTCGGCCACCTCGTTTGGTGCCGGCTTTATACCTCAAATAAAATAAACCATTTT
TTCCTCACTGCCCCAAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGA
AACCAACAGGGATTACCTTAGTAACGGCGAGTGAA

>NR_164084_1_Metschnikowia_laotica_CBS_12961from_TYPE_material

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACAAAACACAATTACACATGATTGAAGAAC
AACAACTAAACTTTTTTTTTTTTTTTTATTTTTTTTCGAAAAAACCAAACTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATCGCGATACGTGGTATGACTTGCAG
ACGTGAATCATTGAATTTTTGAACGCACATTGCGCCTTGAGTTTTCAAGGCATGCCTGGTT
GAGCGTCGGTTTTTCTCCATCAACTTTGATGGGTACTGACATTTTAAACATCACAAACGAC
GATTTGATATTTTATGACCTCAACTCAGGTAGGATACAA

>NR_164373_1_Metschnikowia_arizonensis_CBS_9064from_TYPE_material

TATATCCTTTTAGGTTTGTAAACTAATATTTTATTTTTTTAAATTTTTTATAAATCTTT
AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACGAT
AAGTTGTATGAGTTGCAGACGTGAATCATTAATTTTTGAACGCACATTGCACCTGATCTTT
AGCATCAAGTATAGGGGAGTGAGAGAGTTTTTCTTCGGAATCTATAATTATATTATATTAT
ATTCCGGCTTAAACTACAATTAATTTCTTATTTTCTCCTCAC

>NR_164374_1_Metschnikowia_lachancei_CBS_9131from_TYPE_material

TCTATTCTTTTAGGATTGATAACAAAACCACATTAATAATTTATTCAACCCAAGTTTTCTTC
AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACGAT
AAGTATCATGAGTTGCAGACGTGAATCATTAATTTTTGAACGCACATTGCACCTGATCCAG
CATCAAGTATGGGGGAGTGAGAGAGTATTTCTTCGGCCACCTTCTTTGGGTACCGGCTTA
TATCTCAAATAAATTTACATATTTTTTCTCCTCAC

>NR_164375_1_Candida_ipomoeae_CBS_8466from_TYPE_material

TATATTCTTTAGGATTGAAACTACCCAAAACCACATTTTATTTTATTCAACCCAAGTTTTCT
TTAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACG
ATAAGTATCATGAGTTGCAGACGTGAATCATTAATTTTTGAACGCACATTGCACCTGATCC

AGCATCAAGTATGGGGGAGTGAGAGAGTATTTCTTCGGCCACCTCCTTTTGGTTTGGGTGC
CGGCTTATACCTCAAATAAATTTACTTTTTTTCCT

CAC

>NR_164376_1_Metschnikowia_hawaiiensis_CBS_7432from_TYPE_material

TACATTCTTTAGGATTTAGAACTACCAAAAAACATTTTTTATAATTATTCAACCAAGTTTTCT
TTTAAACTTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGTAGCGAATTAC
GATAAGTATTATGAGTTGCAGACGTGAATCATTATTTTGAACGCACATTGCACTTGATC
TAGCATCAAGTATGGGGGAGTGAGAGAGTATTTCTTCGGCCACCTCGTTTGGTGCCGGCTT
TTATACCTCAAATAAATAAACCATTTTTTCTCAC

>NR_164379_1_Metschnikowia_pulcherrima_NRRL_Y_7111from_TYPE_material

AAGTTGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATATTGTTTTTACAC
CCTTTTAGGCACAACTCTAAATCTTAAACCCTCAATAACACAATTAACCAAACTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTT
GCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCAT
GCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCA
ACGGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTTCTCACCCTCGTAAGACAACCCGCTG
AACTTAAGCATATCATTAAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGC
GAGTGAAG

>NR_164382_1_Metschnikowia_drakensbergensis_CBS_13649from_TYPE_material

GTAACCTTTTGGAGATACAGAAGCTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCG
TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAATAAAAAATACCAAAATAACACTT
TAGGGAGAAAAACAAAAACAAAAATAACAGACTTCAATATAATTTTAAACACAAAACCTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATTGCGATACGTAAT
ATGACTTGCAGACGTGAAACATTAATTTTTTGAACGCACATTGCACTCATTGGTAGGCCATT
GAGTCTAGGGGGGTGAGAGGAGTATTTCTCGGTTTTTTATCCGGCTTAGTCTCAACTAA
ATACTTCATTCCCTCATCCTTCTAAGATTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGA
GGAAAAG

>NR_164506_1_Metschnikowia_borealis_CBS_8431from_TYPE_material

TTCTATTCTTTAGGACTGAACTAGCAAAAAACATTATTTATTATTCAACCAAGTTTTTCTT
TAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACGA
TAAGTATCATGAGTTGCAGACGTGAATCATTAAATTTTTTGAACGCACATTGCACTTGATCCA
GCATCAAGTATGGGGGAGTGAGAGAGTATTTCTTCGGCCACCTCTTTTGGTACCGGCTTTT
ATACCTCAAATAAAAAAACCATTTTTTCTCCTCACTGTCCCAA

>NR_164507_1_Metschnikowia_lochheadii_CBS_8807from_TYPE_material

TTCTATTCTTTAGGATTGATAACAAAACACATTAAAATTTATTCAACCCAAGTTTTTCTT
TAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACGA
TAAGTATCATGAGTTGCAGACGTGAATCATTATTTTGAACGCACATTGCACTTGATCCA
GCATCAAGTATGGGGGAGTGAGAGAGTATTTCTTCGGCCACCTTTCTTGGGTACCGGCTTA
TATCTCAAATAAATTTACATATTTTTTCTCCTCACTGTCCCAA

>NR_164508_1_Metschnikowia_continentalis_UFMG_96_173from_TYPE_material

GCGACTCTTTTTAAATTTTGAAGTTATTCAAACCTTGGTGATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGT
AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTAATTTATATTCTTT
TAGGATTGAAATTAACATAAAACCATTAATTTTATTCAACCAAGTTTTTCTTTAAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACGATAAGTATC
ATGAGTTGCAGACGTGAATCATTATTTTGAACGCACATTGCACTTGATCCAGCATCAAG
TATGGGGGAGTGAGAGAGTATTTCTTCGGCCACCTCTTTTGGTGCCGGCTTTTACCTCAAA

TAAATTTACAATTTTTCTCTACTGTCCCAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
AGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTACCTCAGTAACGGCGAGTGAA

>NR_164510_1_Metschnikowia_gelsemii_CBS_10509from_TYPE_material

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATACATACACACTTCTTAGGAACAAAAA
ACAAAATGTTTAACTTATCAAGAAACACAAAGAAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTG
AATCATTGAATTTTTGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCTCAAGGCATGCGCGGATG
AGCGATATTTACTCTCAAACCTCTGGTTTGGTCTTGCCCTCGGGGCTAAATATCAACTGGT
GCTAAAATAAGTTTTAGAACCAACACCCCAAAATCCTCATCCCCGTAAGACTACCCGCTG
AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGG
CGAGTGAA

>NR_164512_1_Metschnikowia_hibisci_CBS_8433from_TYPE_material

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAGATTAAACCAGCATTAGGAAAGAACCACCTT
TTATATTTTATTATTTCTTTAAAACCTTTTGACAACGGATCTCTTGGCTCTCGTATCGATGAA
GAACGCAGCAAAATGCGATATGTAATTAACCTTGCGAGACGTGAACATTAATTTTTGAAC
GCACATTGCGCTATTTGGCATGAAATATTGAGAGGATTTTAATTCGAATCTTCGGCTTTTTT
AAAAACTATATATTTAATTCTCCCTCAGTATTTCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTACCTTAGTAACGGCGAGTGAAG

>NR_164525_1_Metschnikowia_dekorum_CBS_9063from_TYPE_material

CAACTCTTTTTTGTAGTCCGAAGATATTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTA
ACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTCAGAAATATTATTATATCCATTAG
GAGCACAACAAACCAAAATTTTATATCAAAATTTATTATAATCTTAAAACCTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATTACGATAAGTTGTATGAGTTGC
AGACGTGAATCATTAAATTTTTGAACGCACATTGCACCTTGATCTAGCATCAAGTATAGGGGA
GTGAGAGAGTTTTTCTTCGGAATCATTAAATTCATTTGATTAATACCTCCGGCTTAACTCACA
ATTAAATTCCTTTATTTTCTCCTCACTGCCCTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
AAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTACCTTAGTAACGGCGAGTGAAG

>NR_165863_1_Metschnikowia_miensis_NBRC_112445from_TYPE_material

CTGCGGAAGGATCATTAAAAAATACTTATACACTATTTTATACAACAACAACAAAACAT
GGCATGAATTTCAATAAAGTTAATAAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGA
ATTTTTGAACGCACATTGCGCCTTTTGGTATTTCCAAAAGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTT
TCTCTACACTTTGGTATGGTTTGGCCCTCAAAAAAATTTGAGGGGGCCCAATTGTCAA
ACAAAATTATCTACGATTCTTTTTGTCCCCCTACGACCTCAGATCAAGCAAGACTACCCGC
TGAACCTTAAGCATATCA

>NR_166218_1_Metschnikowia_ziziphicola_CBS_10358from_TYPE_material

TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAATTGTTTTTACACCCT
TTTAGGCACAACTCTAAATCTTAACCGTCAATAACTCTATAAAAAAACTTTCAACAACGG
ATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCA
GACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTTCCCAAGGCATGCG
TGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACG
GCGCTAGAATAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTCCTCACCTCGTAAGACTACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATAAGCGGA

>NR_130677_1_Clavispora_lusitaniae_CBS_6936from_TYPE_material

GATCATTAAAAAAATTATACACACTGTTTTTGGAACAAAAAAATAAATCTTTTTATTTCGA
ATTTCTTAATATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAATTGCGATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA

TTGCGCCTCGAGGCATTCTCGAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGCATCCCCTCTAACCCCC
GGTTAGGCGTTGCTCCGAAATATCAACCGCGCTGTCAAACACGTTTACAGCACGACATTTT
GCCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA
GGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAG

26S

>62/1/3

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTACGGCGAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCC
CCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCAGGGGTAAAGTCCACTGGAA
AGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCNTYAACGCCYTATCCCANATCTC
CAAGAGTCGAGTTGTTTGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTA
AATACGGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTT
GAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACAC
TTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGNANCAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTTCGAG
GATTATAACCCCGGNCNNWANTNCTTNNNNCCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGG
CGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGG

>9/2/18

ATAAGCNGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA
AAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCN
GGGGTTAAGTCCACTGGAAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCNTCAA
CGCCNTCATCCCANATCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
AAATTCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAG
GGCTTGCAAGCAGACACTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGAANCAAAACCACCG
NGGAATGTACCTTTTCGAGGATTATAACCCCGGNCNNWANTYCCNNGNNNNCCCCGAGGCCT
GCAATCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAAC

>11_1062

ACTCAGGGGTTGGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCC
CCGGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCAGGGGTAAAGTTCACTGGAAA
GTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTTYAACGCCCTCATCCAGRTCTCC
AAGAGTCGAGTTGTTTGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAA
ATACCGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTG
AAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACT
TAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGAACAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTTCGAG
GATTATAACCCCGGTCTCWAYTYCCATRYCRCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGG
CGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAMMAMMSGGACCC

>KM350712.1:31-531 Metschnikowia sp. 11-1090 clone c 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

CAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCCG
GAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAAGTG
CGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTTCAACGCCCTCATCCAGATCTCCAAGA
GTCGAGTTGTTTGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACC
GGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAG
AGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACTTAACT
GGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGAACAAAACCACCGGGGAATGTACCTCTCGAGGATTA
TAACCCCGGTCTCAATTTCTTTGCCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGGCGTAAT
GGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGA

>KM350709.1:19-519 Metschnikowia sp. 11-1090 clone d3 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

CAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGG
 GAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGG
 CGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTTCAACGCCCTCATCCCAGATCTCCAAGA
 GTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACC
 GGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGGAAGCACTTTGAAAAAG
 AGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACTTAACT
 GGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGAACAAAACCACCGGGGAATGTACCTCTCGAGGATTA
 TAACCCCGGTCTCAATTTCTTGTGCCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGGCGTAAT
 GGTGCAAGTCGCCCCGTCTGA

>KM275365.1:6-498 *Metschnikowia* sp. 11-1088 clone 21-5 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

GCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGGAATTGTA
 ATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGGCGCCACAG
 AGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTTCAACGCCCTCATCCCAGATCTCCAAGAGTCGAGTT
 GTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGA
 GACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGTA
 AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACTTAACTGGGCCAGC
 ATCGGGGCGGCGGGAACAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTTCGAGGATTATAACCCCGG
 TCTCAATTTCTTGTGCCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAG
 TCGCCCGTCTTGA

>KM275366.1:24-524 *Metschnikowia* sp. 11-1089 clone d7g6 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

CAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGG
 GAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGG
 CGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTTCAACGCCCTCATCCCAGATCTCCAAGA
 GTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACC
 GGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAAG
 AGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACTTAACT
 GGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGAACAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTTCGAGGATTAT
 AACCCCGGCCCTTACTCCCATACCACCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGGCGTAATG
 GTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGA

>KC411970.1:8-499 *Metschnikowia* sp. MS-2013 clone 11-579-fc21 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

CAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGG
 GAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGG
 CGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTTCAACGCCCTCATCCCAGATCTCCAAGA
 GTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACC
 GGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAG
 AGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACTTAACT
 GGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGAACAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTTCGAGGATTAT
 AACCCCGGTCTCAATTTCTTGTGCCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGGCGTAATG
 GTTGCAAGTCGC

>KY108497.1:98-612 *Metschnikowia pulcherrima* culture CBS:5833 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAAT
 CCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGG
 AAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTTAAAGCCCTCATCCCAGATC
 TCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCT
 AAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTT
 TGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACA

CTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTTCGA
GGATTATAACCCCGGCCCTTACTCCCATAACCACCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGG
CGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGG

>MW543448.1:28-542 *Metschnikowia sinensis* strain CBS 10357 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
CCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGG
AAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCYTCAACGCCTTCATCCCAGATC
TCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCT
AAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTT
TGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACA
CTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACYGGGGGAATGTACCTTTTCGA
GGATTATAACCCCGGTCTYAMTYCCTYAYYRTCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTG
GCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGG

>MK394155.1:1829-2343 *Metschnikowia pulcherrima* strain CBS 5833 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
CCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGG
AAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGARCCCCYTYAAMGCCCTTCATCCCAGATC
TCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCT
AAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTT
TGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACA
CTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTTCGA
GGATTATAACCCCGGCCCTTACTCCAYACCACCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTG
GCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGG

>MW544452.1:25-539 *Metschnikowia shanxiensis* strain CBS 10359 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
CCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTGGGTCCGGCCGGCNGGGGGTTAAGTCCACTGG
AAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCYTCAACGCCTTCATCCCAGATC
TCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCT
AAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTT
TGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACA
CTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACYGGGGGAATGTACCTTTTCGA
GGATTATAACCCCGGTCTTACTCCCTCRCCRTCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGG
CGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGG

>NG_058344.1:25-539 *Metschnikowia shanxiensis* CBS 10359 28S rRNA gene, partial sequence; from TYPE material

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
CCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGG
AAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTCAACGCCTTCATCCCAGGTC
TCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCT
AAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTT
TGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACA
CTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACTGGGGGAATGTACCTTTTCGA
GGATTATAACCCCGGTCTTACTCCCTCACCATCCCGAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGG
CGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGG

>KY108503.1:25-539 *Metschnikowia shanxiensis* culture CBS:10359 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
CCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGG
AAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTCAACGCCTTCATCCCAGGTC
TCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCT
AAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGCACTT
TGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACA
CTTAAC TGGGCCAGCATCGGGCGGCGGGAGCAAAACCACTGGGGAATGTACCTTTCTGA
GGATTATAACCCCGGTCTTACTCCCTCACCATCCCAGGCCTGCAATCTAAGGATGCTGG
CGTAATGGTTGCAAGTCGCCGTCTTGAAACACGG

>MK394155.1:1813-2339 *Metschnikowia pulcherrima* strain CBS 5833 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA
AAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCG
GGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGARCCCCYTYAA
MGCCCTCATCCCAGATCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTG
TAAATTCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG
AAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
GGGCTTGCAAGCAGACACTTAAC TGGGCCAGCATCGGGCGGCGGGAGCAAAACCACT
GGGGAATGTACCTTTCTGAGGATTATAACCCCGGCCCTTACTCCCACTACCCCGAGGCCT
GCAATCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCGTCTTGAAAC

> KY108497.1:82-608 *Metschnikowia pulcherrima* culture CBS:5833 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA
AAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCG
GGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTTTAA
AGCCCTCATCCCAGATCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
AAATTCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
GGCTTGCAAGCAGACACTTAAC TGGGCCAGCATCGGGCGGCGGGAGCAAAACCACTG
GGGAATGTACCTTTCTGAGGATTATAACCCCGGCCCTTACTCCCATACCACTCCCGAGGCCTG
CAATCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCGTCTTGAAAC

>MW543448.1:13-538 *Metschnikowia sinensis* strain CBS 10357 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

TAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAA
AGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCRG
GGGTAAAGTCCACTGGAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCYTCAAC
GCCTTCATCCCAGATCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTA
AATTCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAA
AGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGG
GCTTGCAAGCAGACACTTAAC TGGGCCAGCATCGGGCGGCGGGAGCAAAACCACTGG
GGAATGTACCTTTCTGAGGATTATAACCCCGGTCTYAMTYCCTYAYYRTCCCGAGGCCTG
CAATCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCGTCTTGAAAC

>MW544452.1:9-535 *Metschnikowia shanxiensis* strain CBS 10359 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA
AAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCN

GGGGTTAAGTCCACTGGAAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCYTCAA
CGCCTTYATCCCAGRTCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
AAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
GGCTTGCAAGCAGACACTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACYG
GGGAATGTACCTTTTCGAGGATTATAACCCCGGTCCTTACTCCCTCRCCRTCCCGAGGCCTG
CAATCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAAC

>NG_058344.1:9-535 *Metschnikowia shanxiensis* CBS 10359 28S rRNA gene, partial sequence; from
TYPE material

ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA
AAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCG
GGGGTTAAGTCCACTGGAAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTCAA
CGCCTTCATCCCAGGTCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
AAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
GGCTTGCAAGCAGACACTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACTG
GGGAATGTACCTTTTCGAGGATTATAACCCCGGTCCTTACTCCCTCACCATCCCGAGGCCTG
CAATCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAAC

>KY108503.1:9-535 *Metschnikowia shanxiensis* culture CBS:10359 large subunit ribosomal RNA
gene, partial sequence

ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA
AAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCG
GGGGTTAAGTCCACTGGAAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCTCAA
CGCCTTCATCCCAGGTCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
AAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
GGCTTGCAAGCAGACACTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACTG
GGGAATGTACCTTTTCGAGGATTATAACCCCGGTCCTTACTCCCTCACCATCCCGAGGCCTG
CAATCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAAC

>MW543706.1:9-535 *Metschnikowia ziziphicola* strain CBS 10358 large subunit ribosomal RNA
gene, partial sequence

ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA
AAGCTCAAATTTGAAATCCCCCGGAATTGTAATTTGAAGAGATTTGGGTCCGGCCGGCG
GGGGTTAAGTCCACTGGAAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAACCCCYTYAA
CGCCYTATCCCAGATCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
AAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG
GGCTTGCAAGCAGACACTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAAACAAAACACCG
GGGAATGTMCTTTTCGAGGATWATAYCCCTGGTYWMTWYTYCCWTGTYGCCCCGAGGC
CTGCATTCTAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCCGTCTTGAAAC

4. melléklet. Többszörös szekvencia illesztés (saját szerkesztés). Az elemzésbe a pigmenttermelő *Metschnikowia* fajcsoport tagjainak, valamint a *M. fructicola* és *M. andauensis* ITS1-5.8S-ITS2 szakaszának klónozott szekvenciáit vontuk be. Az illesztést a MEGA X 10.0.2. szoftver beépített Clustal W (Thompson és mtsai 1994) algoritmusával végeztünk el. A mellékletben a trimmelést követő többszörös illesztés informatív, eltéréseket mutató részletei láthatóak. (A) ITS1 szakasz részlet (B) 5.8S szakasz részlet (C) ITS2 szakasz részlet.

A

[illegible]

B

[illegible]

C

[illegible]