



Az oxidatív stresszválaszban résztvevő *FvatfA* és *FvmnSOD* gének funkcionális elemzése *Fusarium verticillioides*ben

DOI: 10.54598/003810

Doktori (Ph.D.) értekezés

Szabó Zsuzsa

Gödöllő

2023

A doktori iskola

Megnevezése: Biológiai Tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia tudomány

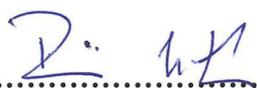
Vezetője: Dr. Nagy Zoltán
intézetvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Növénytermesztési Tudományok Intézet

Témavezető (1): Prof. Dr. Hornok László
Professor emeritus, az MTA rendes tagja
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Témavezető (2): Prof. Dr. Pócsi István
tanszékvezető egyetemi tanár, DSc
Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar
Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék


.....
Az iskolavezető jóváhagyása


.....
Témavezető (1) jóváhagyása


.....
Témavezető (2) jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	7
1. Bevezetés és célkitűzés	11
2. Irodalmi áttekintés	14
2.1. A <i>Fusarium verticillioides</i> bemutatása	14
2.1.1. A <i>F. verticillioides</i> által termelt szekunder metabolitok	16
2.1.1.1. A fumonizinek jellemzői – bioszintézisük	16
2.1.1.2. A bikaverin jellemzői – bioszintézise	19
2.1.1.3. A karotinoidek jellemzői – bioszintézisük	22
2.2 A környezeti stressz hatása gombákra	25
2.2.1. Az oxidatív stressz általános jellemzése	26
2.3 A gombák oxidatív stresszválasza.....	27
2.3.1. A gombák enzimikus oxidatív stresszválasza	27
2.3.2. A gombák nem enzimikus antioxidánsainak szerepe az oxidatív stresszválaszban	29
2.4. Az oxidatív stresszválasz szabályozása gomba modellorganizmusokban	30
2.4.1. A <i>S. cerevisiae</i> élesztő oxidatív stresszválaszának szabályozása	30
2.4.2. A <i>S. pombe</i> oxidatív stresszválaszának szabályozása	31
2.4.3. A <i>S.pombe</i> Atf1 ortológ bZIP transzkripciós faktorok szerepe fonális gombafajokban	33
2.4.3.1. Az <i>A. nidulans</i> AtfA transzkripciós faktor szerepe	33
2.4.3.2. A <i>F. graminearum</i> FgAtf1 transzkripciós faktor szerepe	34
2.4.3.3. A <i>F. oxysporum</i> FoAtf1 transzkripciós faktor szerepe	35
2.4.3.4. A <i>M. oryzae</i> MoAtf1 transzkripciós faktor szerepe	35
2.4.3.5. A <i>B. cinerea</i> BcAtf1 transzkripciós faktor szerepe	35
2.4.3.6. A <i>C. purpurea</i> CpTf1 transzkripciós faktor szerepe	37
3. Anyagok és módszerek.....	38
3.1. A felhasznált törzsek származása, fenntartása és tenyésztése	38
3.2. Nukleinsav izolálási technikák és agaróz gélelektroforézis	38
3.2.1. DNS izolálás.....	38
3.2.2. RNS izolálás	39
3.2.3. Plazmid izolálás kompetens <i>E. coli</i> tenyészetekből	39
3.2.4. Agaróz gélelektroforézis	39
3.3. A gendelációs és komplementáló konstrukciók készítése.....	40
3.3.1. Az <i>FvatfA</i> gendelációs kazetta létrehozása	40
3.3.2. Az <i>FvatfA</i> komplementáló kazetta létrehozása	40

3.3.3. Az <i>FvnmSOD</i> géndeléciós kazetta létrehozása	41
3.3.4. Az <i>FvnmSOD</i> komplementáló kazetta létrehozása	41
3.4. A <i>F. verticillioides</i> protoplasztok transzformálása	41
3.5. A géndeléciós és komplementált törzsek azonosítása	42
3.5.1. A deléciós mutánsok azonosítása	42
3.5.2. A komplementált törzsek azonosítása	43
3.6. Southern blot analízis	44
3.7. Kópiaszám meghatározás	45
3.8. A törzsek növekedésének vizsgálata	47
3.9. A spórák méretének, termelésének és életképességének meghatározása	47
3.10. A törzsek stresszérzékenységének vizsgálata	48
3.11. A törzsek PAF érzékenységének vizsgálata	48
3.12. Szekunder metabolitok termelése	49
3.12.1. Fumonizin B1 és B2 termelés mérése	49
3.12.2. Bikaverin termelés mérése	50
3.12.3. Karotinoidek termelésének mérése	50
3.13. Gének relatív expressziójának meghatározása qRT-PCR segítségével	52
3.14. Inváziós növekedés vizsgálata paradicsombogyón	53
3.15. A törzsek szexuális szaporodásának vizsgálata	53
3.16. A törzsek légzésének vizsgálata	53
3.17. A mitokondriumok morfológiájának vizsgálata	54
3.18. Bioinformatikai vizsgálatok	54
3.18.1. Páronkénti szekvencia illesztés és filogenetikai fa készítése	54
3.18.2. Promoter analízis	55
3.19. Az adatok statisztikai kiértékelése	56
3.20. Felhasznált vegyszerek	56
4. Eredmények és megvitátásuk	57
4.1. A <i>F. verticillioides</i> <i>FvatfA</i> génje	57
4.1.1. Az <i>FvatfA</i> gén molekuláris jellemzése	57
4.1.2. Az <i>FvatfA</i> gén inaktiválása	59
4.1.2.1. Az <i>FvatfA</i> deléciós konstrukció létrehozása és transzformálása a <i>F. verticillioides</i> FGSC 7600 törzsbe	59
4.1.2.2. A transzformánsok ellenőrzése	59
4.1.2.3. Az <i>FvatfA</i> gén hiányának komplementálása	60
4.1.3. A $\Delta FvatfA$ törzs fenotípusos jellemzése	62
4.1.3.1. Az <i>FvatfA</i> gén szerepe a vegetatív és invazív növekedésben	62

4.1.3.3. Az <i>FvatfA</i> gén szerepe a <i>F. verticillioides</i> stresszérzékenységében	68
4.1.3.4. Az <i>FvatfA</i> gén szerepe a fumonizinek termelésében	70
4.1.3.5. Az <i>FvatfA</i> gén szerepe a bikaverin termelésében.....	71
4.1.3.6. Az <i>FvatfA</i> gén szerepe a karotinoidok termelésében	72
4.1.3.7. Az <i>in silico</i> promoter analízis eredménye	75
4.1.3.8. A törzsek átfogó jellemzése	75
4.1.4. Az <i>FvatfA</i> génnel kapcsolatos eredmények megvitatása	76
4.2 Az <i>FvmnSOD</i> gén jellemzése <i>F. verticillioides</i> ben	83
4.2.1. Az <i>FvmnSOD</i> gén inaktiválása	83
4.2.1.1. Az <i>FvmnSOD</i> deléciós konstrukció létrehozása és transzformálása a <i>F. verticillioides</i> FGSC 7600 törzsbe	83
4.2.1.2. A transzformánsok ellenőrzése	83
4.2.1.3. Az <i>FvmnSOD</i> gén hiányának komplementálása	84
4.2.2. A $\Delta FvmnSOD$ törzs fenotípusos jellemzése.....	86
4.2.2.1. Az <i>FvmnSOD</i> gén szerepe a <i>F. verticillioides</i> stresszérzékenységében	86
4.2.2.2. Az <i>FvmnSOD</i> gén szerepe a fumonizinek termelésében	87
4.2.2.3. Az <i>FvmnSOD</i> gén szerepe a <i>F. verticillioides</i> légzésében és a mitokondriumok morfológiájában	88
4.2.2.4 Az <i>FvmnSOD</i> gén hatása az invazív növekedésre és a szexuális szaporodásra.....	89
4.2.3. Az <i>FvmnSOD</i> génnel kapcsolatos eredmények megvitatása	92
4.3. Új tudományos eredmények.....	95
5. Összefoglalás	97
6. Summary	99
Mellékletek	101
M1. Irodalomjegyzék	101
M2. Táptalajok és oldatok.....	117
M2.1. Felhasznált táptalajok összetétele	117
M2.2. Felhasznált oldatok összetétele.....	120
M3. A disszertációban felhasznált primerek listája	124
M4. Az egyutas ANOVA statisztikai elemzés eredményei	126
M4.1. Az <i>FvatfA</i> egyutas ANOVA eredményeit összefoglaló táblázat.....	126
M4.2. Az <i>FvmnSOD</i> egyutas ANOVA eredményeit összefoglaló táblázat.....	127
M5. A kétutas ANOVA statisztikai elemzés eredményei	128
M5.1. Az <i>FvatfA</i> kétutas ANOVA eredményeit összefoglaló táblázat.....	128
M5.2. Az <i>FvmnSOD</i> kétutas ANOVA eredményeit összefoglaló táblázat.....	129
M6. A promóter analízis eredményei	130

M7. A főkomponens-analízis eredményeit összefoglaló táblázat.....	136
M8. Publikációk jegyzéke	138
Köszönetnyilvánítás	141

Rövidítések jegyzéke

3-ADON	3- <u>a</u> ccetil- <u>d</u> e <u>z</u> oxinivalenol
ABA	abszicizinsav („ <u>a</u> bsciscic <u>a</u> cid”)
ACP	„ <u>a</u> cyl <u>c</u> arrier <u>p</u> rotein” domén
AOX	<u>a</u> lternatív <u>o</u> xidáz
ATG	Start kodon
ATP	adenozin-trifoszfát („ <u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate”)
a_w	vízaktivitás („water activity”)
b	metszéspont
<i>BIK</i>	bikaverin termeléséért felelős génklaszter
bp	bázispár
bZIP	bázikus leucin zipzár („ <u>b</u> asic leucin <u>z</u> ipper”)
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát („ <u>c</u> yclic <u>a</u> denosine <u>m</u> onophosphate”)
CAT	kataláz („ <u>c</u> atalase”)
CE-MS	kapilláris elektroforézis-tömegspektrometria („ <u>c</u> apillary <u>e</u> lectrophoresis - <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry”)
CFW	kalkofluor fehér („ <u>c</u> alcofluor <u>w</u> hite”)
CM	komplett táptalaj („ <u>c</u> omplete <u>m</u> edium”)
CMC	karboxi-metil-cellulóz („ <u>c</u> arboxymethyl <u>c</u> ellulose”)
CR	Kongóvörös („ <u>C</u> ongo <u>R</u> ed”)
CRE	cAMP válasz elem („ <u>c</u> AMP <u>r</u> esponse <u>e</u> lement”)
C_T	qRT-PCR vizsgálatoknál mért küszöbérték
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bomid („ <u>c</u> etyltrimethylammonium <u>b</u> romide”)
DBD	DNS kötő domén („ <u>D</u> NA <u>b</u> indig <u>d</u> omain”)
DEPC	dietil-pirokarbonát („ <u>d</u> iethyl pyro <u>c</u> arbonate”)
DHE	dihidroetídium („ <u>d</u> i <u>h</u> ydro <u>e</u> thidium”)
DIG	<u>d</u> igoxigenin
DMSO	dimetil-szulfoxid („ <u>d</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> ide”)
DNS	<u>d</u> e <u>z</u> oxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleozid-trifoszfát („ <u>d</u> eoxynucleotide <u>t</u> riphosphate”)
DON	<u>d</u> e <u>z</u> oxinivalenol
DTT	ditriotreitól („ <u>d</u> i <u>t</u> hio <u>t</u> hreitól”)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav („ <u>e</u> thylenediaminetetracetic <u>a</u> cid”)

ELEM	lovak agylágyulása („ <u>e</u> quine <u>l</u> eucoencephaloma <u>l</u> atia”)
ELISA	enzimhez kötött immunszorbiens próba („ <u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay”)
FAD	<u>f</u> lavin- <u>a</u> denin- <u>d</u> inukleotid
FB1	<u>f</u> umonizin <u>B</u> 1
FB2	<u>f</u> umonizin <u>B</u> 2
FB3	<u>f</u> umonizin <u>B</u> 3
FB4	<u>f</u> umonizin <u>B</u> 4
FFSC	<i>Fusarium fujikuroi</i> fajkomplex („ <u>F</u> usarium <u>f</u> ujikuroi <u>s</u> pecies <u>c</u> omplex”)
FGSC	genetikailag karakterizált gombák törzsgyűjteménye, Kansas Állami Egyetem („ <u>F</u> ungal <u>G</u> enetics <u>S</u> tock <u>C</u> entre”)
FPP	farnezil-difoszfát („ <u>f</u> arnesyl <u>p</u> yro <u>p</u> hosphate”)
<i>FUB</i>	fuzarinsav bioszintéziséért felelős génklaszter
<i>FUM</i>	fumonizinek termeléséért felelős génklaszter
<i>FUS</i>	fuzarin C bioszintéziséért felelős génklaszter
G6PDH	glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz („ <u>g</u> lucose- <u>6</u> - <u>p</u> hosphate <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase”)
GATA	GATA szekvenciát felismerő cink-ujj domén
<i>gen</i>	neomycin foszfortranszferázt kódoló gén
GGDP	geranil-geranil-difoszfát („ <u>g</u> eranylgeranyl <u>d</u> iphosphate”)
GPx	<u>g</u> lutation <u>p</u> eroxi <u>d</u> áz
GR	<u>g</u> lutation <u>r</u> eduktáz
GSH	glutation redukált formája
GSSG	glutation oxidált formája
HMG-CoA	<u>h</u> idroxi- <u>m</u> etil- <u>g</u> lutaril CoA
HOG	MAPK jelátviteli útvonal („ <u>H</u> igh <u>O</u> smolarity <u>G</u> lycerol”)
<i>hph</i>	higromicin foszfortranszferázt kódoló gén
hpi	inokulálás óta eltelt órák száma („ <u>h</u> ours <u>p</u> ost <u>i</u> nculation”)
IPP	izopentenil-difoszfát („ <u>i</u> sopentenyl <u>p</u> yro <u>p</u> hosphate”)
KCN	kálium-cianid
kb	kilobázis
LB	Luria-Bertani táptalaj
LC-MS	folyadékkromatográfia- tömegspektrometria („ <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography- <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry”)
LOV	fény-oxigén-feszültség érzékeny domén („ <u>l</u> ight- <u>o</u> xygen- <u>v</u> oltage”)

m	<u>merede</u> kség
MAPK	<u>mitogén-aktivált</u> <u>protein</u> <u>kináz</u>
MAPKK	<u>mitogén-aktivált</u> <u>protein</u> <u>kináz</u> <u>kináz</u>
MAPKKK	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz
MAT	párosodási típus („ <u>M</u> ating <u>T</u> ype Allele”)
MEA	maláta kivonatos tápagar („ <u>M</u> alt <u>E</u> xtract <u>A</u> gar”)
MFS	fehérjék fő facilitátor szupercsalád típusú doménje („ <u>M</u> ajor <u>F</u> acilitator <u>S</u> uperfamily”)
MM	minimál tápagar („ <u>m</u> inimal <u>m</u> edium”)
MOPS	3-morfolinopropán-1-szulfonsav („3-(<u>N</u> - <u>m</u> orpholino)- <u>p</u> ropane <u>s</u> ulfonic acid”)
MSB	menadion-nátrium-biszulfit („ <u>m</u> enadione <u>s</u> odium <u>b</u> isulfite”)
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát („ <u>n</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide <u>p</u> hosphate”)
NCBI	Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (Egyesült Államok) („ <u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation”)
NIV	<u>nivalenol</u>
NX	<u>neurospora</u> xanthin
OE	túlexpresszázó („ <u>o</u> ver <u>e</u> xpressing”)
O/N	egy éjszakán keresztül („ <u>o</u> ver <u>n</u> ight”)
ORF	nyitott leolvasási keret („ <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame”)
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> <u>antifungális</u> fehérje
PAS	<u>per-ARNT-sim</u> fehérje domén, ahol a per a „ <u>p</u> eriodikus cirkadián”, az ARNT az „ <u>a</u> ril hidrokarbon <u>r</u> eceptor <u>n</u> ukleáris <u>t</u> ranszlokátor”, míg a sim a „ <u>s</u> ingle- <u>m</u> inded” fehérjéket jelöli, amelyekben először felfedezték a domént
PCR	polimeráz láncreakció („ <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction”)
PDA	burgonya dextróz agar („ <u>P</u> otato <u>D</u> extrose <u>A</u> gar”)
PEG	<u>polietilén-glikol</u>
PKS	<u>poliketid</u> <u>szintáz</u>
PolA	<u>Poly A</u> farok
qPCR	kvantitatív PCR („ <u>q</u> uantitative <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction”)
RNS	<u>ribonukleinsav</u>
ROS	reaktív oxigénformák („ <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies”)
rcf	relatív centrifugális erő („ <u>r</u> elative <u>c</u> entrifugal <u>f</u> orce”)
rpm	percenkénti fordulatszám („ <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute”)

RT-qPCR	real-time kvantitatív PCR („real-time quantitative polymerase chain reaction”)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
SHAM	szalicil-hidroxámsav („salicylhydroxamic acid”)
SOD	szuperoxid dizmutáz („superoxide dismutase”)
SSC	nátrium-sós-citrát puffer („Saline-Sodium Citrate”)
TAE	Tris acetát EDTA puffer
tBOOH	terc-butyl-hidroperoxid
TE	Tris-EDTA puffer
TSS	transzkripció start helye
U	unit
WC	white collar fehérje
WCC	white collar fehérje komplex („white collar protein complex”)
Yap	élesztő aktiváló fehérje („yeast activator protein”)
YPD	élesztőkivonat-pepton-dextróz táptalaj („Yeast Extract Peptone Dextrose”)
YPG	élesztőkivonat-pepton-glükóz táptalaj („Yeast Extract Peptone Glucose”)
YRE	Yap1-válaszelem (Yap1-response-element)
ZEA	zearalenon

1. Bevezetés és célkitűzés

A *F. verticillioides* a kukorica világszerte elterjedt kórokozója, amely a szár- és cső penészedéssel hozható összefüggésbe, palántákon gyökérrothadást képes előidézni. Laboratóriumi körülmények között könnyen tenyészthető fonalas gomba, amely alkalmas modellorganizmus a molekuláris genetikai, gomba fiziológiai és gomba-növény kapcsolatok vizsgálatára is. A *F. verticillioides* számos szekunder metabolitot termel, amelyek közül a legjelentősebbek a fumonizinek, amelyek közül a fumonizin B1 (FB1) és fumonizin B2 (FB2) fordul elő a legnagyobb mennyiségben (Blacutt és munkatársai, 2018). A fumonizinek szennyezhetik mind az állati takarmányokat, mind az emberi fogyasztásra szánt élelmiszereket (Logrieco és munkatársai, 2002; Covarelli és munkatársai, 2012).

A gombák az őket érő oxidatív stresszre különböző védelmi mechanizmusok révén reagálnak, amelyeket különböző jelátviteli útvonalak mediálnak. Élesztőkben a külső ingerekre főleg mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) szignáltranszdukciós útvonalak aktiválódnak, amelyek evolúciósan konzerváltan megtalálhatóak a fonalas gombákban is. A stresszt specifikus receptorok érzékelik, amik közvetve más fehérjéken keresztül, vagy közvetlenül aktiválják a foszforilációs kaszkádot. A kaszkád utolsó elemeként a transzkripciós faktorokon keresztül alakul ki a stresszválasz génszintű szabályozása (Alonso-Monge és munkatársai, 2009; Hong és munkatársai, 2013a). A MAPK szignáltranszdukciós útvonalakat már számos gombafajban leírták, legismertebb képviselőjük a *Schizosaccharomyces pombe* stresszérzékeny MAPK Sty1, amelyet többféle stressz aktivál, így többek között a hősokk, oxidatív és ozmotikus stressz, sugárzás, DNS károsodás, nehézfémek által kiváltott stressz, valamint az éhezés (Degols és munkatársai, 1996; Degols és Russell, 1997; Soto és munkatársai, 2002; Toone és munkatársai, 1998). A foszforilációt követően a Sty1 a sejtmagba transzlokálódik, ahol foszforilálja a bZIP típusú Atf1-et és más transzkripciós faktorokat, amelyek végül a génexpressziós változásokat szabályozzák (Gaits és munkatársai, 1998; Gaits és Russell, 1999; Lawrence és munkatársai, 2007).

A CREB/ATF fehérjecsaldába tartozó bZIP típusú transzkripciós faktorok szerkezete (bázikus motívum a DNS kötő régióban, illetve leucin zipzár a dimerizációhoz), valamint szabályozó mechanizmusai nagymértékben konzerváltak az élesztőkben és fonalas gombákban. Az egyik legjobban jellemzett bZIP transzkripciós faktor a *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 fehérje, amely a humán ATF2 homológja. Az Atf1 célgénjei között számos környezeti stresszválasz gén is megtalálható (Chen és munkatársai, 2003; Yaakoub és munkatársai, 2022). Az Atf1 bZIP típusú transzkripciós faktor számos ortológjának funkcióját tanulmányozták már különböző fonalas gombafajokban (Leiter és munkatársai, 2021).

A globális felmelegedés eredményeként a megemelkedett hőmérséklet, megváltozott csapadékeloszlás, az aszályok időszakos abiotikus stresszt váltanak ki a mezőgazdasági haszonnövényekben, így a kukoricában is. Ezek a körülmények kedveznek a mikotoxinogén gombák, így a *F. verticillioides* előretörésének, amelynek következtében várhatóan a következő években jelentős mezőgazdasági veszteségeket fog okozni Kelet- és Észak-Európában, így hazánkban is (Medina és munkatársai, 2017; Gagkaeva és Yli-Mattila, 2020). A *F. verticillioides* abiotikus és biotikus stresszre adott válaszána, valamint a szekunder metabolitok, így a fuminizinek bioszintézisének mélyebb megértése segítséget nyújthat a jövőben a *F. verticillioides* elleni védekezésben.

A MAPK útvonalakon keresztül aktiválódó transzkripciós faktorok koordinálják a célgéne, így az antioxidáns enzimek, valamint a szekunder metabolitok bioszintézisében résztvevő gének expressziójának szintjét, valamint idejét, így szabályozva a metabolikus folyamatokat és a sejszintű stresszválaszt. *Aspergillus*okban az antioxidáns enzimek jelentik az oxidatív stressz elleni elsődleges védelmi vonalat, míg a szekunder metabolitok a másodlagos védelmi vonalba tartoznak (Reverberi és munkatársai, 2006; Hong és munkatársai, 2013b).

Kutatómunkánk során szerettük volna jobban megérteni a Sty1 MAPK által aktivált *S. pombe* Atf1 ortológ *F. verticillioides* FvAtfA bZIP típusú transzkripciós faktort kódoló *FvatfA*, továbbá a mitokondriális mangán-szuperoxid dizmutáz (MnSOD) enzimet kódoló *FvMnSOD* gének szerepét a gomba növekedésében, stressz érzékenységében és szekunder metabolitok termelésében.

Kutatómunkánk célkitűzései a következők voltak:

1. Az *FvatfA* gén azonosítása *in silico* módszerek segítségével *F. verticillioides*ben.
2. A $\Delta FvatfA$ deléciós mutáns létrehozása double joint PCR és protoplaszálós transzformálás segítségével, valamint a nullmutáns komplementálása a vad típusú *FvatfA* génnel.
3. Az *FvatfA* gén szerepének megállapítása különös tekintettel:
 - vegetatív növekedésben és sporulációban, továbbá a spórák életképességében és méretében;
 - az invazív növekedésben és aszexuális szaporodásban;
 - abiotikus (ozmotikus, oxidatív, nehézfém, sejtfal) stresszérzékenységben;

- szekunder metabolitok, így a fumonizinek, bikaverin és karotinoidok termelésében;
4. Az *FvmnSOD* gén azonosítása *in silico* módszerek segítségével *F. verticillioides*ben.
 5. A $\Delta FvmnSOD$ deléciós mutáns létrehozása double joint PCR és protoplaszálós transzformálás segítségével, valamint a nullmutáns komplementálása a vad típusú *FvmnSOD* génnel.
 6. Az *FvmnSOD* gén szerepének megállapítása különös tekintettel:
 - vegetatív növekedésben;
 - az invazív növekedésben és a szexuális szaporodásban;
 - abiotikus (ozmotikus, oxidatív, nehézfém, sejtfal) stresszérzékenységben, valamint a PAF által kiváltott apoptózisban;
 - a fumonizinek termelésében;
 - a mitokondriális morfológiájában és légzésben.

2. Irodalmi áttekintés

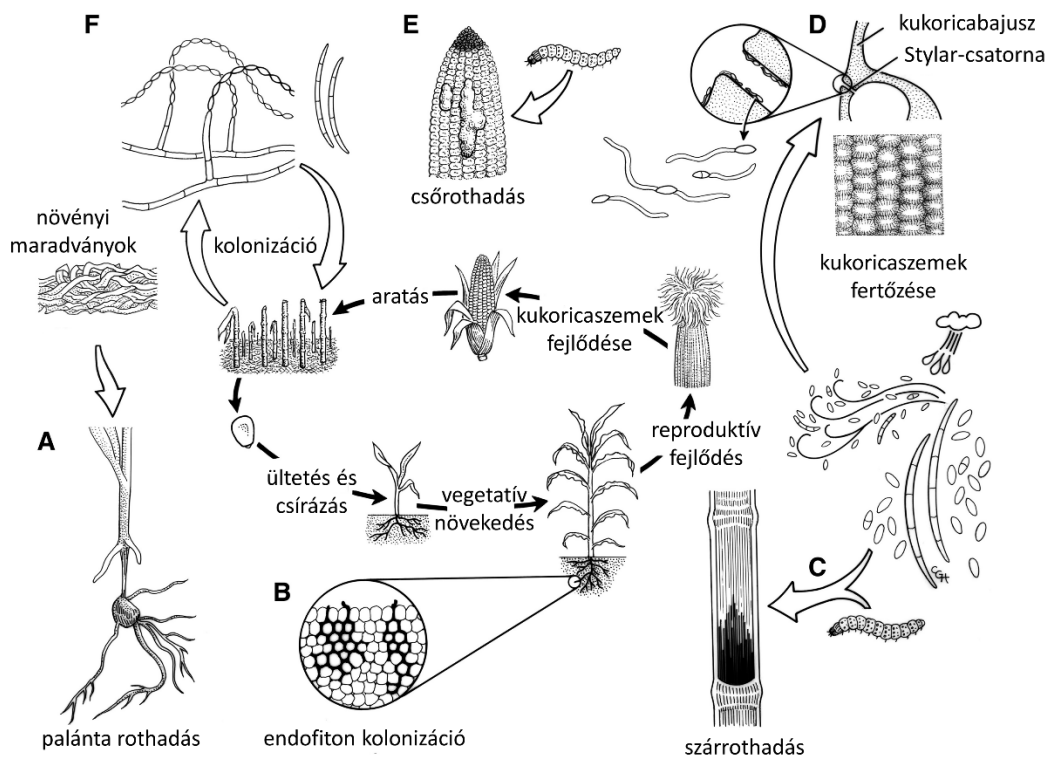
2.1. A *Fusarium verticillioides* bemutatása

A *Fusarium* nemzetség az *Ascomycota* törzs *Sordariomycetes* osztályába, azon belül a *Hypocreales* rend *Nectriaceae* gombacsaládba tartozik; a teleomorf alakok leg többjét a *Gibberella* nemzetségbe sorolják, a fajok kisebb csoportja a *Hemanectria* és *Albonectria* nemzetségbe sorolható (Moretti, 2009). A *Fusarium* nemzetséget legkevesebb 300, filogenetikailag elkülönült faj, 20 faj-komplexum és kilenc monotípusos vonal (lineage) alkotja (O'Donnell és munkatársai, 2015).

A *F. verticillioides* (teleomorf *Gibberella moniliformis*) a *Fusarium fujikuroi* fajkomplexum (FFSC) tagja. Az FFSC monofiletikus csoport, amelybe közel 40 morfológiailag eltérő fajt sorolnak (O'Donnell és munkatársai, 2000). Az FFSC amerikai, afrikai és ázsiai kládokra osztható, a *F. verticillioides* az afrikai klád része (Kvas és munkatársai, 2009).

A *F. verticillioides* a kukorica világszerte elterjedt kórokozója, amely szár- és cső penészedéssel hozható összefüggésbe, palántákon gyökérrothadást képes előidézni. A *F. verticillioides* képes a talajt kolonizálni, azonban a talajban található *Fusarium* közösség kevesebb, mint 10%-át alkotja, így elmondható, hogy nem kompetitív más fajokhoz képest (Skoglund és Brown, 1988). A megmaradó növényi részeket gyakrabban kolonizálja: Cotten és Munkvold (1998) kimutatták, hogy az aratás után a talaj felett hagyott, vagy elásott szármaradványokon 630 napig életképes marad. Így elmondható, hogy a talaj felszínén hátramaradó növényi részek nem csak az inokulum képződése szempontjából fontosak, hanem a gomba hosszútávú életben maradását is szolgálják (1. ábra F rész).

A *F. verticillioides* leg többször két módon kolonizálja a gazdaszervezetet, szisztémásan a magból vagy a növényen keletkezett sebekon keresztül (Oren és munkatársai, 2003). A *Fusarium*mal fertőzött talajban csírázó magvakon erőteljes gyökér és palántarothadás figyelhető meg (1. ábra A rész), habár egyes esetekben tünetmentes endofiton fertőzés is kialakulhat (1. ábra B rész). Az európai kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis*) és az amerikai kukoricabogár (*Diabrotica virgifera virgifera*) táplálkozása során sebeket ejt a kukorica szárán és a csöveken, amelyek lehetőséget biztosítanak a fertőzésre. Száraz körülmények között a kukoricabajusz megjelenése előtt a száron keletkező mechanikus sérülések vagy rovarrágás nyomán szárrothadás alakul ki (1. ábra C rész), ennek következtében további inokulum keletkezik, amelyet a rovarok tovább terjeszhetnek. A kifejlődött kukoricamoly petéit a kukorica levelének fonákára helyezi le, a kikelő



1. ábra A kukorica életciklusához kötött, lehetséges fertőzési módok és betegségek (Az ábra részletes leírása a törzsszövegben található; Blacutt és munkatársai, 2018)

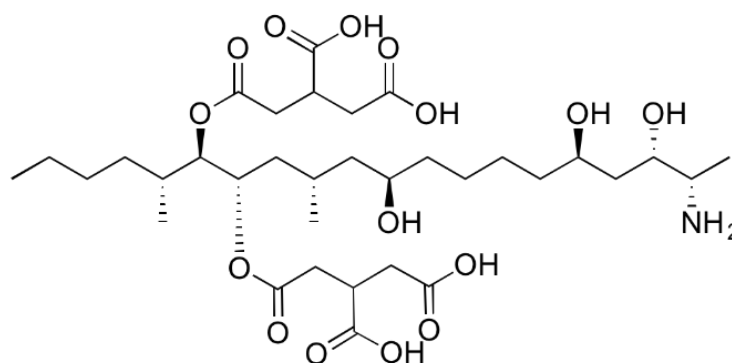
lárva pedig a levél és szár szövetein táplálkoznak, mielőtt bebábozódnak, párosodnak, s az újabb generáció petéit helyezik le. A kikelő második generáció a szár, cső és a levél szöveteiből táplálkozik (1. ábra E rész), átvihet gomba-képleteket, s ezzel szár és csőrothadást idéz elő (Gilbertson és munkatársai, 1986; Munkvold és munkatársai, 1997; Sobek és Munkvold, 1999). A kukoricabajusz megjelenése után a gomba a fejlődő szemeket a pollencsőn keresztül fertőzi meg. Amennyiben a pollencső átmérője minimális, fizikális akadályt hoz létre a gombával szemben; ezzel magyarázható egyes fajták részleges rezisztenciája. A csapadékban dús időjárás kedvez a csőrothadás kialakulásának, azonban a száraz, meleg időszakok okozta aszály által kiváltott stressz hatására a fertőzés mértéke, valamint a toxintermelés is nő (Duncan és Howard, 2009; Munkvold, 2003).

Az FFSC tagjai számos szekunder metabolitot termelnek: gibberellint (Tudzynski, 2005), a vörös pigment bikaverint és annak prekursorát, a norbikaverint (Balan és munkatársai, 1970; Kjær és munkatársai, 1971; Linnemannstöns és munkatársai, 2002a; Bell és munkatársai, 2003), valamint számos mikotoxint, így moniliformint, beauvericint (Fotso és munkatársai, 2002), fumonizint (Proctor és munkatársai, 2004), fuzarinsavat (Bacon és munkatársai, 1996), valamint fuzarin C-t (Song és munkatársai, 2004).

2.1.1. A *F. verticillioides* által termelt szekunder metabolitok

2.1.1.1. A fumonizinek jellemzői – bioszintézisük

A fumonizinek az élelmiszereket és állati takarmányokat szennyező mikotoxinok, amelyeket az 1980-as években fedeztek fel dél-afrikai kutatók (Bezuidenhout és munkatársai, 1988; Marasas és munkatársai, 1988). A fumonizin B1 kémiai szerkezetét (2. ábra) Laurent és munkatársai publikálták (1989 és 1990). A fumonizinek a poliketidek közé tartozó toxinok, a molekulák alapváza 19 vagy 20 szénatomból áll, amikhez amin, hidroxil, metil és trikarboxilinsav oldalláncok kapcsolódhatnak. Ezidáig 15 fumonizin homológ molekulát írtak le, amelyek a fumonizin A, B, C és P csoportokba sorolhatóak be (Braun és Wink, 2018; Musser és Plattner, 1997). A legnagyobb mennyiségben a fumonizin B1 fordul elő (Nelson és munkatársai, 1993, Rheeder és munkatársai, 2002).



2. ábra A fumonizin B1 kémiai szerkezete

A fumonizinek lovakban agylágyuláshoz hasonló tünetegyüttest okoznak: étvágytalanság, izgatottság, ataxia, depresszió, végül elhullás. A betegséget Butler már 1902-ben leírta, aki a leucoencephalomalacia (ELEM) nevet adta a tünetegyüttesnek. Későbbi kísérletek során más állatfajokban is megfigyelték a fumonizinek hatását, így rágcsálókban májrákot, míg disznókban tüdőödémát okozott (Gelderblom és munkatársai, 1991; Osweiler és munkatársai, 1992). Ezen kívül aggodalomra adhat okot Kína és Dél-Afrika egyes területein megfigyelt nyelvcsőrákos esetek számának emelkedése. A FB1 szintje ezeken a területeken a szennyezett kukoricában elérte a 155,000 µg/kg értéket (Chu és Li, 1994; Yoshizawa és munkatársai, 1994; Isaacson, 2005). Sadler és munkatársai (2002) megállapították, hogy a FB1 képes gátolni az embrionális szfingolipid szintézisét, a folsav transzportját, valamint összefüggésbe hozható a velőcsőzáródási rendellenességekkel is. A fumonizinek kiválasztódhatnak az anyatejbe is (Magotha és munkatársai, 2014), valamint fogyasztásuk növekedési zavarokat okoz gyermekekben (Kimanya és munkatársai, 2010; Chen és munkatársai, 2018).

A fumonizinek kémiai szerkezete nagyon hasonló a szfingolipidek alapvázául szolgáló szfingozinhez és szfinganinhoz. Ebből kifolyólag a FB1 kompetitíven gátolja a szfingolipidek metabolizmusában szerepet játszó kulcsenzimet, a ceramid szintázt. A ceramid szintáz gátlásával a ceramid és szfingolipidek *de novo* bioszintézise lecsökken, továbbá a szfingozin újrahasznosítása is gátoltta válik, a felborult szfingolipid metabolizmussal magyarázható az FB1 neurotoxicitása (Domijan, 2012).

A fumonizinek bioszintéziséért felelős gének klaszterbe csoportosulnak, amelynek mérete körülbelül 42,5 kb (Proctor és munkatársai, 2003, Proctor és munkatársai, 2013). A génklaszteren belül 17 gén különül el (3. ábra). A génklaszter első azonosított génje, a *fum1*¹ egy I. típusú iteratív poliketid szintázt kódol (ketoacil szintáz, malonil-CoA:ACP transzacyláz, dehidratáz, C-metiltranszferáz, enoil reduktáz, ketoreduktáz, „acil carrier” doméneket tartalmaz). A *fum1* gén deléciója esetén a deléciós mutáns nem termelt kimutatható mennyiségű fumonizint, ezzel is igazolva a Fum1p szerepét a fumonizinek bioszintézisében (Proctor és munkatársai, 1999). A *FUM* klaszteren található további géneket és az általuk kódolt fehérjék funkcióit az 1. táblázat tartalmazza.



3. ábra A fumonizinek termeléséért felelős *FUM* génklaszter felépítése. A nyilak az átírási irányt jelzik (Wiemann és munkatársai, 2013)

A bioszintézis első lépésében egy acetyl-CoA és nyolc malonil-CoA molekulából a Fum1p poliketid szintáz létrehozza a molekula lineáris alapvázát, amely terminális karboxil-csoportjához két metil-csoport kapcsolódik (Proctor és munkatársai, 1999). Ezt követően a Fum8p α -oxoamin szintáz katalizálja a poliketid váz és egy alanin kondenzációját, létrehozva ezzel a 20 szénatomból álló fumonizín alapvázát (Proctor és munkatársai, 2008). A bioszintézis harmadik lépésében a Fum6p citokróm P450 monooxygenáz katalizálja a C-14 és C-15 szénatomok hidroxilációját (Seo és munkatársai, 2001). A bioszintézis következő lépésében a Fum13p dehidrogenáz redukálja a C-3 karbonil-csoportját hidroxil-csoporttá (Butchko és munkatársai, 2003a). Ezt követően a Fum2p citokróm P450 monooxygenáz hidroxilálja az alapváz C-10 szénatomját (Proctor és munkatársai, 2006). A C-14 és C-15 hidroxilcsoportok észterifikációját 2 molekula trikarboxilinsavval a Fum14p fehérje katalizálja (Zaleta-Rivera és munkatársai, 2006). A bioszintézis utolsó lépésében

¹ Disszertációmban a gének és fehérjék elnevezéséhez az *Aspergillus nidulans* esetében használt nomenklatúrát alkalmaztam.

a Fum3p dioxigenáz hidroxilálja a C-5 szénatomot, ezzel létrehozva a fumonizin B1-et és B2-t (Butchko és munkatársai, 2003b).

A fumonizinek bioszintézise transzkripciós szinten több útvonalon keresztül szabályozott, azonban ezen útvonalak átfedése még nem teljesen tisztázott (Woloshuk és Shim, 2013). A *FUM*

1. táblázat A *FUM* génklaszteren található gének és azok funkciója (Alexander és munkatársai, 2009)

Gén	Funkció	Deléciós mutáns fumonizin profilja
<i>fum21</i>	Zn(II)2Cys6 cinkujj transzkripciós faktor	nincs fumonizin termelés
<i>fum1</i>	poliketid szintáz	nincs fumonizin termelés
<i>fum6</i>	citokróm P450 monooxigenáz és reduktáz	nincs fumonizin termelés
<i>fum7</i>	dehidrogenáz	tetradehidro-FB
<i>fum8</i>	α -oxoamin szintáz	nincs fumonizin termelés
<i>fum3</i>	dioxigenáz	csak FB3 és FB4
<i>fum10</i>	acyl-CoA szintetáz	hidrolizált FB3 és hidrolizált FB4
<i>fum11</i>	trikarboxilinsav transzporter	FB1, FB2, FB3, FB4, részben hidrolizált fumonizin B1-4
<i>fum2</i>	citokróm P450 monooxigenáz	csak FB2 és FB4
<i>fum20</i>	ismeretlen	ismeretlen
<i>fum13</i>	dehidrogenáz	3-keto FB3 és 3-keto FB4
<i>fum14</i>	nonriboszómális peptid szintetáz (peptidil és kondenzációs domén)	hidrolizált FB3 és FB4
<i>fum15</i>	citokróm P450 monooxigenáz	nincs hatás
<i>fum16</i>	acyl-CoA szintetáz	nincs hatás
<i>fum17</i>	ceramid szintáz	nincs hatás
<i>fum18</i>	ceramid szintáz	nincs hatás
<i>fum19</i>	ABC transzporter	emelkedett FB1:FB3 arány

klaszteren kódolt Zn(II)2Cys6 cinkujj transzkripciós faktor részt vesz a génklaszter expressziójának szabályozásában (Brown és munkatársai, 2007). A *Δfum21* deléciós törzsben a

fum1 és *fum8* gének transzkripció szintjét vizsgálva, a fumonizinek termelését indukáló GYAM² táptalajból származó kettő-, négy- és hatnapos tenyészetek RNS mintáit vizsgálva Brown és munkatársai (2007) azt az eredményt kapták, hogy a kétnapos tenyészetekben a *fum1* és *fum8* gének expressziója alacsony szinten detektálható volt, azonban négy- és hatnapos tenyészetekben nem volt kimutatható ezeknek a géneknek az átíródása. Ezen eredményekből arra lehet következtetni, hogy a növekedés korai szakaszában más transzkripció faktorok is részt vesznek a *FUM* gének aktiválásában.

A fumonizinek termelését számos biotikus és abiotikus környezeti tényező befolyásolja, így többek között a gazdanövény típusa, a kukoricaszemek állapota, vízáktivitás, hőmérséklet, pH, tápanyag elérhetősége (Fanelli és munkatársai, 2013; Wu és munkatársai, 2019; Warfield és Gilchrist, 1999; Shim és munkatársai, 2003; Bluhm és Woloshuk, 2005). A hőmérséklet és a vízáktivitás a legfőbb abiotikus tényezők, amelyek a fumonizinek termelődését befolyásolják. Samapundo és munkatársai (2005) vizsgálták az a_w és a hőmérséklet hatását a fumonizinek termelésére 15-30 °C, valamint a_w 0,922-0,969 tartományokat alkalmazva. Eredményeik azt mutatták, hogy a növekedés optimuma 30 °C-on, a_w 0,969 mellett volt megfigyelhető. A fumonizinek bioszintézisét a vízáktivitás jelentős mértékben befolyásolta, az optimum alatti 15 °C-on, a_w 0,969 mellett inkubált tenyészetek közel azonos mennyiségű fumonizint termeltek, mint a 30 °C-on, azonos vízáktivitás mellett növekedett telepek.

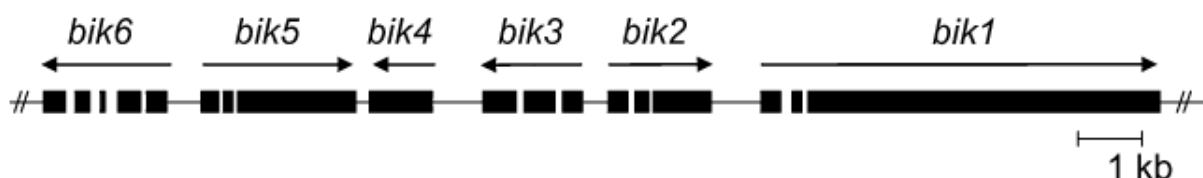
2.1.1.2. A bikaverin jellemzői – bioszintézise

A bikaverin a nemredukáló poliketidek közé tartozó vöröses színű pigment, amelyet Kreitman és Nord izoláltak először (1949) *Fusarium lycopersici* és *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* tenyészetekből, amit lycopersinnek neveztek el. Ezt követően Park és Robinson *F. oxysporum* öregedő tenyészetéből gomba vakuolizációs faktort fedezett fel (1964), majd pedig Balan és munkatársai *F. fujikuroi* tenyészetből állati egysejtűek növekedését gátló vegyületet izoláltak, 1970-ben. Kémiai analízissel sikerült megállapítani, hogy mindhárom esetben a felfedezett vegyületek megegyeznek, amelyet végül bikaverinnek neveztek el (Cornforth és munkatársai, 1971; De Boer és munkatársai, 1971; Kjær és munkatársai, 1971). Több *Fusarium*-faj képes bikaverint termelni, más gombákra azonban nem jellemző ez a képesség (Chelkowski és munkatársai, 1992; Giordano és munkatársai, 1999; Schumacher és munkatársai, 2013). Kémiailag a bikaverin egy kilenc acetil egységből felépülő, tetraciklusos benzoxanton szerkezetű poliketid, melynek kémiai neve 6, 11-dihidroxi-3, 8-dimetoxi-1-metil-benzo-xanthein-7, 10, 12-

² A fumonizinek termelését indukáló GYAM táptalaj összetétele a következő: 0,24 M glükóz, 0,05% élesztő kivonat, 8 mM L-aszparagin, 5 mM almasav, 1,7 mM NaCl, 4,4 mM K₂HPO₄, 2 mM MgSO₄, és 8,8 mM CaCl₂; pH 3,0

trion (Barton és munkatársai, 1975; Cornforth és munkatársai, 1971; De Boer és munkatársai, 1971; Kjær és munkatársai, 1971; Wiemann és munkatársai, 2009).

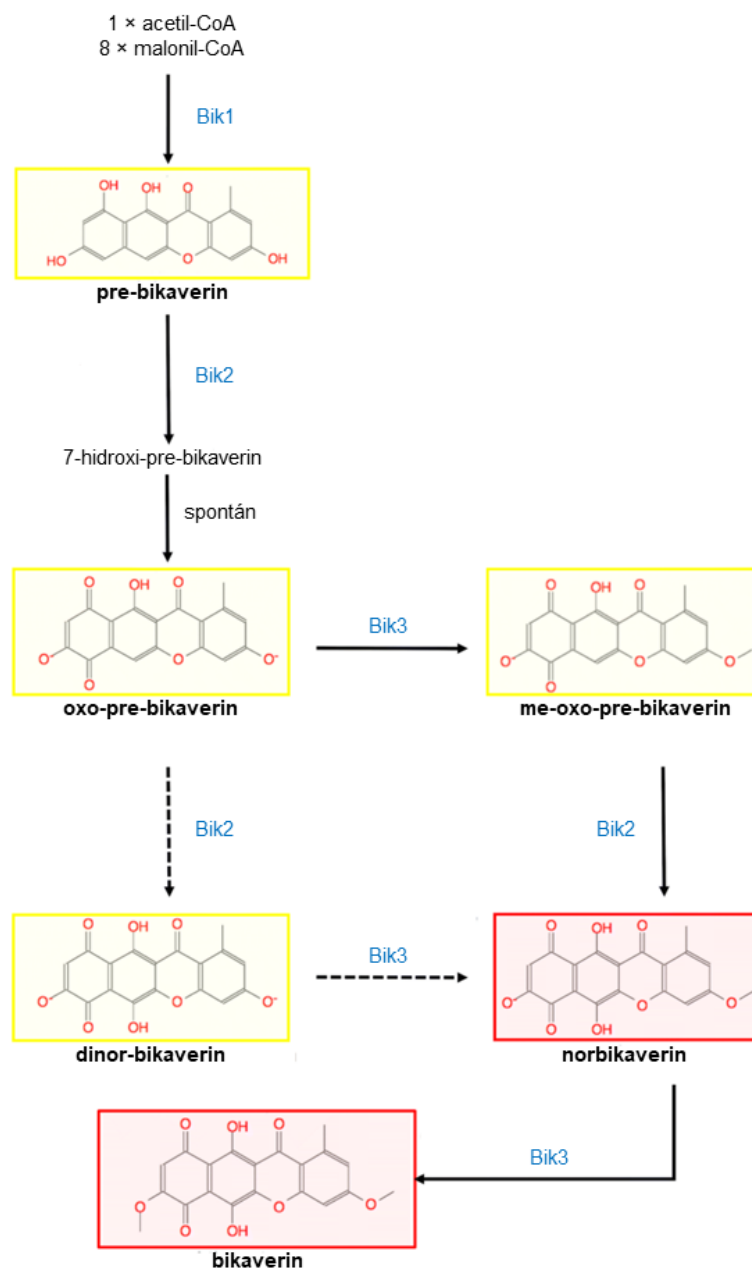
A bikaverin szintézis kulcsemzime egy poliketid szintáz (PKS), az ezt kódoló gént (*pkS4*, amelyet később *bik1*-nek neveztek át) Linnemannstöns és munkatársai azonosították (2002a) *F. fujikuroi*ban. A *pkS4* gén deléciója esetén nem termelődött bikaverin a deléciós mutánsban, amelyet *E. coli* sejtekben történő heterológ expressziós kísérletek is alátámasztottak (Linnemannstöns és munkatársai, 2002a; Ma és munkatársai, 2007). A Bik1 enzim I. típusú poliketid szintáz (Cox és Simpson, 2009), amely β -ketoacil szintáz, aciltranszferáz, „acil carrier”, foszforpantein-kötő és tioészteráz domént tartalmaz. A *bik1* gén előtt elhelyezkedő körülbelül 15 kb hosszúságú szakasz szekvencia analízisével öt további, a bikaverin bioszintézisében résztvevő új gént azonosítottak. Ezek a következők: FAD-dependens monooxygenáz (*bik2*), O-metil transzferáz (*bik3*), NmrA-szerű szabályozó fehérje (*bik4*), Gal4 bZIP típusú transzkripció faktor, amely $Zn(II)_2Cys_6$ DNS kötő domént tartalmaz (*bik5*) és egy MFS („major facilitator superfamily”) típusú transzporter (*bik6*) (4. ábra). Az öt gén célzott génmegszakítása megerősítette a bikaverin szintézisében játszott szerepüket. A $\Delta bik1$, $\Delta bik2$ és $\Delta bik3$ géndeléciós mutánsok elveszítették a pigmenttermelő képességüket, míg a $\Delta bik4$ és $\Delta bik5$ deléciós mutánsok 5 \times , illetve 100 \times kevesebb bikaverint termeltek, mint a vad típusú törzs. A $\Delta bik6$ deléciós mutáns szignifikánsan kisebb mennyiségben termelt bikaverint (Wiemann és munkatársai, 2009).



4. ábra A bikaverin bioszintéziséért felelős *BIK* génklaszter *F. fujikuroi*ban. A nyilak a transzkripció irányát mutatják, a fehér sávok pedig az intronokat jelölik (Wiemann és munkatársai, 2009).

A bikaverin bioszintézisének első lépésében *F. fujikuroi*ban egy egység acetyl-CoA és nyolc egység malonyl-CoA-ból pre-bikaverin keletkezik, melyet a Bik1 poliketid szintáz kondenzál (5. ábra). A Bik2 a pre-bikaverin molekula oxidációjával oxo-pre-bikaverint hoz létre, amelyet a Bik3 metiltranszferáz metilál, így me-oxo-pre-bikaverin keletkezik. Ezt az intermediert a Bik2 enzim hidroxilálja, így norbikaverint hozva létre, amelyet metilálva (Bik3) bikaverin képződik (Arndt és munkatársai, 2015). A köztitermék oxo-pre-bikaverin hidroxilációjával dinorbikaverin jöhet létre (Bik2), amely metilálódásával norbikaverin keletkezhet (Bik3) (Lebeau és munkatársai, 2019).

A bikaverin termelésének génszintű szabályozásában a *BIK* klaszteren található *bik4* és *bik5* gének is részt vesznek. A Bik4 fehérje hasonlóságot mutat az *A. nidulans* NmrA szabályozó fehérjéjéhez, amely az AreA transzkripciós faktorral együtt részt vesz a nitrogén éhezés szabályozásában (Schönig és munkatársai, 2008). A *bik4* gén deléciója drasztikus csökkenést okozott a *bik1*, *bik2* és *bik3* gének expressziós szintjeiben, míg a Δ *bik5* mutánsban a *bik1*, *bik4* és *bik6* gének expressziós szintje csökkent. Ebből arra lehet következtetni, hogy a Bik5 transzkripciós faktor a *bik1* gén aktiválásán keresztül szabályozza a bikaverin bioszintézisét, míg a Bik4 fehérje hatását más szabályozó fehérjékkel kölcsönhatásba lépve fejezi ki (Wiemann és munkatársai, 2009).



5. ábra A bikaverin bioszintézisének feltételezett útvonala *F. fujikuroi*ban és *F. oxysporum*ban (Arndt és munkatársai, 2015; Lebeau és munkatársai, 2019).

A bikaverin termelése erősen függ a tenyésztési körülményektől. A termelés szabályozását részletesen *F. fujikuroi*-ban írták le. A bikaverin termelését a nitrogén éhezés serkenti, a bioszintézis mértéke nőtt alacsony N/C hányadosú táptalajok esetében (Bell és munkatársai, 2003; Giordano és munkatársai, 1999), amelyet alátámasztott azon megfigyelés, hogy magas nitrogéntartalmú táptalajban a termelés represszálódott (Giordano és munkatársai, 1999, Wiemann és munkatársai, 2009). Aktívan növekvő *F. fujikuroi* tenyészeteket nitrogénmentes indukáló tápvelesbe átmosva Rodríguez-Ortiz és munkatársai (2010) a különféle táptalajkomponensek bikaverin termelésére gyakorolt hatását vizsgálták. A táptalaj szénforrása erősen befolyásolta a termelés mennyiségét, a bikaverin szacharóz jelenlétében termelődött a legnagyobb mennyiségben. A bikaverin bioszintézisét szintén erősen befolyásolja a tápközeg pH-ja (Balan és munkatársai, 1970; Bell és munkatársai, 2003; Giordano és munkatársai, 1999). Legnagyobb mértékben kezdeti savas kémhatás mellett termelődött bikaverin, amelynek mértéke a semleges kiindulási kémhatás mellett csökkent annak ellenére, hogy az idő előrehaladtával a táptalaj pH-ja csökkent (Giordano és munkatársai, 1999).

A bikaverint toxinnak tekintik (Kitagawa és munkatársai, 1997), azonban hatása nagyban eltér a különböző organizmusok között. Annak ellenére, hogy a bikaverint termelő *Fusarium* fajok elterjedt növénykórokozó, toxinogén fonalas gombák, a bikaverinnel szennyezett ételek fogyasztása az egészségre nem ártalmas. Norred és munkatársai (1992) kísérleteikben nem találták a bikaverint genotoxikusnak. Azoban a bikaverin hatásosnak bizonyult leishmaniasist okozó egysejtű *Leishmania braziliensis*-sel szemben (Balan és munkatársai, 1970), valamint a fenyőkárttevő *Bursaphelenchus xylophilus* fonálféreg ellen (Kwon és munkatársai, 2007).

A bikaverin számos fonalas gomba növekedését is gátolja. Osman és Valadon (1984) bikaverinnel, vagy norbikaverinnel átitatott papírkorongot helyeztek a táptalaj felszínére és azt találták, hogy a *Helminthosporium oryzae*, *Penicillium notatum*, *Alternaria humicola* és *Aspergillus flavus* ellen hatásosnak bizonyult, míg az *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans* és *Fusarium* fajok növekedése bikaverin jelenlétében nem csökkent.

2.1.1.3. A karotinoidok jellemzői – bioszintézisük

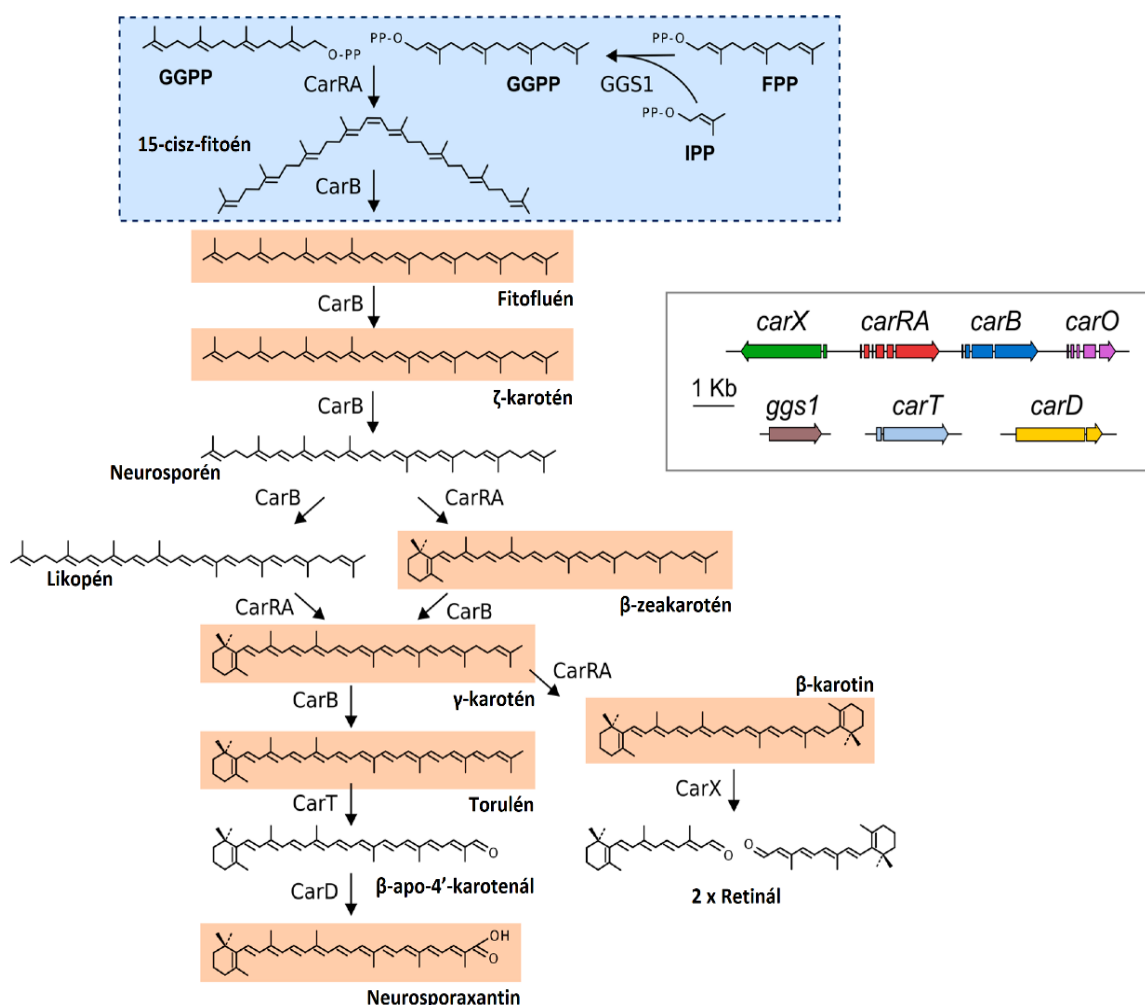
A karotinoidok olyan zsírolédkony pigmentek, amelyek a fotoszintetizáló élőlények mindegyikében fellelhetők a cianobaktériumoktól kezdve a magasabbrendű növényekig, azonban számos heterotróf mikroorganizmus, így a gombák (Sandmann és Misawa, 2002; Avalos és munkatársai, 2014) és nem fotoszintetizáló baktériumok (Phadwal, 2005; Boronat és Rodríguez-Concepción; 2015) egy része is képes karotinoidokat előállítani. Egy alifás polién láncuk van, amely általában 8 alegység, konjugált kettős kötésekkel tartalmazó izoprénből áll. Ez a molekula-

szerkezet fényelnyelő, így ad jellemzően vöröses, sárgás, vagy narancssárgás színt számos növényi szervnek, mikroorganizmusoknak és állatoknak egyaránt. A fotoszintetizáló fajokban a karotinoidok nélkülözhetetlenek a fényenergia gyűjtésében, valamint védik a klorofillt a fotooxidációtól is (Domonkos és munkatársai, 2013); állatokban a retinoidok, így a retinál és a retinsav forrását képezik (Blomhoff és Blomhoff, 2006). Ezzel szemben a gombákban a karotinoidok nem játszanak jelentős szerepet, hiányuk nem életfontosságú (Avalos és Limón, 2015).

*Fusarium*okban a karotinoidok első, részletes biokémiai elemzését Rau és Zehender (1959) végezte *Fusarium aquaeductum*on: az analízis nem poláris karotinoidok és egy savas karotinoid frakció jelenlétét mutatta ki. A savas frakció nagy mértékben hasonlított a *Neurospora crassa* xantofill neurosporaxantinjára (NX) (Zalokar, 1957). A NX egy C₃₅ apokarotinoid, amelynek kémiai elnevezése β -apo-4'-karotinsav. A NX-t ezidáig csak a *Neurospora*, *Fusarium*, *Verticillium* és *Podospora* nemzetség tagjaiban mutatták ki (Aasen és Jensen; 1965; Valadon és munkatársai, 1982; Strobel és munkatársai, 2009). A későbbi évek folyamán a *F. aquaeductum* további vizsgálatával az NX mellett számos más karotinoidot is sikerült azonosítani, így a ζ -karotint, neurosporént, likopént, γ -karotint és torulént (Bindl és munkatársai, 1970).

A karotinoidok bioszintézise *F. fujikuroi*ban jól tanulmányozott (6. ábra). A karotinoidok és gibberellinek bioszintézisének első lépései közösek *F. fujikuroi*ban: hidroximetil-glutaril CoA-ból mevalonát képződik, amit a HMG-CoA redukáz enzim katalizál (Woitek és munkatársai, 1997). Ezt a lépést az izopentenil-difoszfát szintézise követi, majd számos kondenzációs lépésen keresztül a prenil transzferáz enzim farnezil-difoszfátot hoz létre (Homann és munkatársai, 1996). A geranil-geranil-difoszfát szintáz GGDP-t hoz létre, amely lépés már elkülönül a gibberellinek bioszintézisétől (Mende és munkatársai, 1997; Domenech és munkatársai, 1996). Két GGDP molekula kondenzációjából, amelyet a fitoén szintáz és karotén cikláz aktivitással rendelkező enzim (CarRA) katalizál fitoén keletkezik, ami az első C₄₀ karotinoid struktúrával rendelkező molekula a bioszintézisben. A fitoénból a dehidrogenáz enzim (CarB; Linnemannstöns és munkatársai, 2002b) öt deszaturációs és egy ciklizációs (CarRA) lépésen keresztül torulént hoz létre. Ez a vöröses színű karotén szubsztrátként szolgál a *carT* gén által kódolt karotinoid-hasító oxigenáznak (CarT; Prado-Cabrero és munkatársai, 2007a), amely a C₃₅ β -apo-4'-karotenált hozza létre. Az aldehid csoportot egy dehidrogenáz (CarD) savvá oxidálja, s így neurosporaxantin keletkezik. A bioszintetikus útvonalból kiágazva γ -karoténból β -karotén jön létre egy második ciklizációs lépést követően, majd retinál keletkezik két β -karoténból, amelyet egy oxigenáz katalizál (CarX; Prado-Cabrero és munkatársai, 2007b; Tudzynski és Holter, 1998).

*F. oxysporum*on végzett korai megfigyelések megállapították, hogy a micéliumban a karotinoidok felhalmozódását a megvilágítás elősegíti (Carlile, 1956). A fotoindukciót *F. aquaeductum*ban vizsgálva azt találták, hogy a termelődött karotinoidok mennyisége függ a beeső



6. ábra A karotinoidok bioszintézise és a részt vevő gének *F. fujikuroi*ban (A részletes leírás az ábra alatt a törzsszövegben található; Avalos és munkatársai, 2017).

fény mennyiségétől (Rau, 1967). *N. crassa*ban a fotoindukció a WC fehérjekomplextől függ (De Fabo és munkatársai, 1976). Ezen fehérjekomplex a fotoreceptor WC-1-ből és WC-2-ből áll (Ballario és munkatársai, 1996). A *N. crassa* WC-1 fehérjéje egy kék fény receptor, amely három PAS domént tartalmaz; ezekből az első a LOV („light-oxygen-voltage”) szenzitív domén. A LOV domének olyan speciális domének, amely a PAS szupercsaládba tartoznak, és kék fényt érzékelnek a gombákban, valamint növényekben (He és munkatársai, 2002). A másik két PAS domén fehérje-fehérje interakciókban vesz részt (Taylor és Zhulin, 1999). Ezek a fotoreceptorok tartalmaznak még egy GATA cinkujj DNS-kötő domént, sejtmagi lokalizációs szignált és aktiváló domént számos esetben (Corrochano, 2007). A *N. crassa* WC-1 fehérje dimert képez a WC-2 fehérjével,

amely szintén tartalmaz PAS, GATA cinkujj DNS-kötő domént, valamint egy aktiváló domént, amellyel a WC komplex jön létre (WCC). Chip-Seq kísérletekben Smith és munkatársai (2010) azt állapították meg, hogy a WCC transzkripciós faktorként viselkedik, közvetlen módon befolyásolva ezzel egyes gének transzkripcióját. A *N. crassa wc-1* gén ortológjaiból létrehozott deléciós mutánsok *F. fujikuroi*ban (*wcoA*) és *F. oxysporum*ban (*wc1*) eltérő mértékű fotoindukciót mutattak folyamatos megvilágítás mellett (Estrada és munkatársai, 2008; Ruiz-Roldán és munkatársai, 2008).

A fényen kívül a karotenogenezist számos más tényező is befolyásolja. A nitrogén hozzáférhetőség számos *Fusarium* fajban befolyásolja a szekunder metabolitok termelését, így a gibberellinek, bikaverin és fusarubin termelése is komplex szabályozó hálózaton keresztül függ a nitrogénéhezéstől (Studt és Tudzynski, 2014). *F. fujikuroi* immobilizált micéliummal végzett kísérletek azt mutatták, hogy nitrogénéhezés alatt a karotinoidok termelése nőtt (Garbayo és munkatársai, 2003; Rodríguez-Ortiz és munkatársai, 2009). A nitrogén hozzáférhetőség karotenogenezisre gyakorolt hatását *N. crassa*ban is megfigyelték, ahol a *carRA* és *carB* ortológ *al-1* és *al-2* gének expressziós szintjei jelentősen megnöttek nitrogén limitáció alatt mind a vad típusú, mind a „vak” *wc* deléciós mutánsban (Sokolovsky és munkatársai, 1992). A karotenogenezisnek szerepe van a szexuális reprodukcióban, ahogyan azt Ádám és munkatársai (2011) a *MATI-2-1* hiánymutánsban megfigyelték, ahol a karotinoidok termelése és a génklaszteren kódolt gének fényindukciója is csökkent a deléciós mutánsban.

2.2 A környezeti stressz hatása gombákra

Az *Ascomycota* törzs a gombák legnagyobb és legváltozatosabb csoportját alkotja, amelynek tagjai különféle niche-t foglalnak el szerte a világon szimbiótaként, szaprofitaként, vagy parazitaként. Szinte minden niche esetében a gombák interakcióban állnak más mikrobákkal összetett közösséget alkotva, ahol a fennmaradáshoz szükséges erőforrások elérhetősége folyamatosan és hirtelen változik, stresszt okozva ezzel az őt elfoglaló lakóknak. A gombák leggyakrabban a tápanyag limitációval, a hőmérséklet, ozmolaritás, pH, páratartalom változásával, a gazdaszervezet védekező mechanizmusaival, valamint toxikus anyagok és más mikrobák által okozott stresszel szembesülnek életük folyamán. A külső viszonyok hirtelen változásával a sejtek belső homeosztázisa felborulhat, így az evolúció folyamán a gombák a külső ingerek érzékelésére és a bekövetkező intracelluláris hatások kivédésére védekező mechanizmusokat fejlesztettek ki (Gasch, 2000).

A gombák a külső ingerekre főleg mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) szignáltranszdukciós útvonalakon keresztül válaszolnak, amelyeknek három fő összetevője van:

MAPK, MAPK kináz, MAPKK kináz, amelyek foszforilációval aktiválják egymást. A stresszt specifikus receptorok érzékelik, amik közvetve más fehérjéken keresztül, vagy közvetlenül aktiválják a foszforilációs kaszkádot. A kaszkád utolsó elemeként a transzkripciós faktorokon keresztül alakul ki a stresszválasz génszintű szabályozása. A környezeti stressz, valamint vegetatív növekedés mellett a patogén gombák virulenciája is MAPK szignáltranszdukciós útvonalon keresztül szabályozott (Alonso-Monge és munkatársai, 2009).

2.2.1. Az oxidatív stressz általános jellemzése

A reaktív oxigénformák számos anyagcsere útvonal és sejtszinten szabályozott rendszer melléktermékeként folyamatosan képződnek, ezzel egy időben specifikus és nem specifikus mechanizmusok révén le is bomlanak. Ezen két folyamat, a ROS keletkezése és eliminálása finoman hangolt, melynek eredményeként a sejten belül alacsony ($<10^{-8}$ M) „steady-state” ROS koncentrációt tartanak fenn (Halliwell és Gutteridge, 1989).

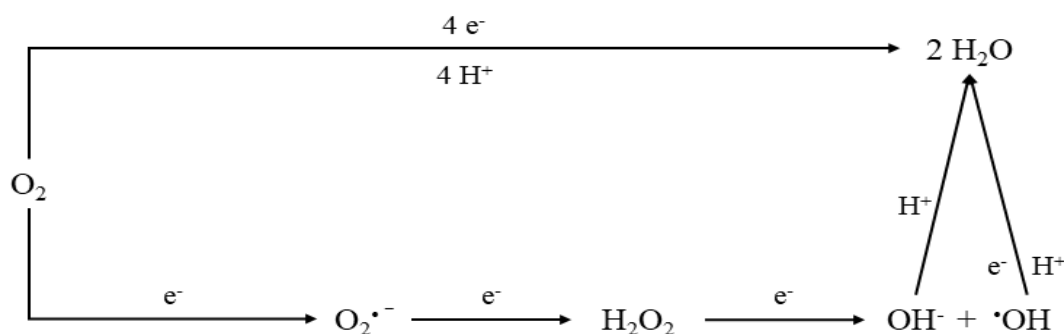
Az oxigén közel 90%-a az élőlényekben az oxidatív foszforiláció során négy elektron átadásával az elektrontranszportláncon keresztül energiatermelésben vesz részt, amelyet a sejt ATP formájában raktároz, miközben víz keletkezik (7. ábra felső ága). Egy-egy elektron egymást követő hozzáadásával az oxigénmolekulából köztes reaktív oxigénformák képződésével szintén víz jön létre, miközben a keletkező energia nem raktározódik ATP formájában (7. ábra alsó ága). Ezen reaktív oxigénformák többek között a szuperoxid gyök ($O_2^{\cdot-}$), a hidroxilgyök ($\cdot OH$), hidrogén-peroxid (H_2O_2) és szinglet oxigén (1O_2).

A ROS több, mint 90%-a a különféle elektrontranszport láncokon keresztül keletkezik a mitokondriumban, endoplazmatikus retikulumban, magi membránokon és a fotoszintetikus láncon keresztül (Starkov, 2008). Ezen kívül kis mennyiségben ROS keletkezik számos enzim működése során (például oxidázok), valamint különböző molekulák autooxidációján keresztül. A ROS termelésében résztvevő oxidázok a NADPH oxidáz, lipoxigenáz, ciklooxygenáz, xantin-oxidáz (Puddu és munkatársai, 2008).

A keletkező ROS számos sejtalkotóval és molekulával képes interakcióba lépni, így a DNS-sel, lipidekkel és fehérjékkel (Bayir, 2005; Cadet és munkatársai, 1994; Dizdaroglu, 1994). Mivel a ROS folyamatosan keletkezik és eliminálódik, így a sejten belüli szintje dinamikusan változik. Azt az állapotot, amikor a ROS koncentrációja hirtelen, vagy tartósan megnő és a sejtalkotók oxidatív módosulásával a sejt működésében zavarok keletkeznek, oxidatív stressznek nevezzük (Lushchak, 2011).

2.3 A gombák oxidatív stresszválasza

A gombák az őket érő oxidatív stresszre különböző védelmi mechanizmusok révén reagálnak, amelyeket különböző jelátviteli útvonalak kapcsolnak be, így ennek következményeként különféle, az oxidatív stresszre adott válasz kialakításában résztvevő gének



7. ábra Az oxigén redukciója biológiai rendszerekben (Lushchak, 2011)

expressziója megnő, amelynek eredményeként képesek a keletkezett ROS-t eliminálni (7. ábra). Ilyen oxidatív stresszválasz gének például az enzimatisz védekezésben szerepet játszó katalázokat és szuperoxid dizmutázokat kódoló gének (Toledano és munkatársai, 2003). A gombákat többféle módon érheti oxidatív stressz, így interakciójuk más mikroorganizmusokkal vagy gazdaszervezetükkel (szimbióta és patogén gombák esetében), valamint a lignocellulóz lebontásában résztvevő extra-és intracelluláris ROS-t felszabadító enzimek működésekor (Breitenbach és munkatársai, 2015).

2.3.1. A gombák enzimatisz oxidatív stresszválasza

A molekuláris oxigénből egy elektron felvételével keletkező szuperoxid gyököt a **szuperoxid dizmutáz (SOD)** enzimek alakítják tovább hidrogén-peroxiddá:



A szuperoxid dizmutázok olyan metalloproteinek, amelyeknek jelenleg négy izoformáját ismerjük: réz-cink-szuperoxid dizmutázok (Cu/ZnSOD), mangán-szuperoxid dizmutázok (MnSOD), vas-szuperoxid dizmutázok (FeSOD) és nikkél-szuperoxid dizmutázok (NiSOD) (Fridovich, 1995). Lokalizációját tekintve az ősbibb típusú MnSOD a prokariótákban és az eukarióták kloroplasztisz- és mitokondriális mátrixában, valamint glioxiszómákban található. Az eukarióta sejtek citoszoljában, a növényi peroxiszómákban és a lizoszómákban Cu/ZnSOD

aktivitás figyelhető meg (Baum és Scandalios, 1979; Henry és munkatársai, 1980; Sandalio és Río, 1987; Britton és Fridovich; 1977).

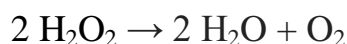
A *S. cerevisiae* élesztő genomjában két SOD-ot kódoló gén található: a citoszólikus Cu/ZnSOD-ot kódoló *sod1*, valamint a mitokondriális mátrixban lokalizálódó MnSOD enzimet kódoló *sod2* gén (Jamieson és munkatársai, 1994). A *sod1* és *sod2* gének deléciója számos fenotípusos változást okozott az élesztősejtekben, így többek között aerob körülmények között a növekedési ráta lecsökkent, a sejtek fokozott érzékenységet mutattak oxidatív és nehézfém által kiváltott stresszel szemben (Chang és Kosman, 1989; Jamieson és munkatársai, 1994; Wiśnicka és munkatársai, 1998).

Az *A. nidulans* fonalas gomba genomjában három SOD enzimet kódoló gén található, amelyek a következők: *sodA*, amely a Cu/ZnSOD-ot kódolja, *sodB*, amely a MnSOD enzimet kódolja, valamint a *sodM*, amelynek funkciója még nem ismert (Oberegger és munkatársai, 2000, 2001; Sato és munkatársai, 2009). Az MnSOD-ot kódoló *sodB* gén funkcióját Leiter és munkatársai (2016) vizsgálták. A $\Delta mnSOD$ törzs fokozott érzékenységet mutatott a szuperoxid stresszt kiváltó menadion-nátrium-biszulfittal (MSB), valamint a *Penicillium chrysogenum* antifungális fehérje (PAF) által kiváltott apoptózissal szemben is. Süllyesztett kultúrán végzett vizsgálatok során a glükózt tartalmazó táptalajon a $\Delta mnSOD$ törzs megnövekedett glutation-reduktáz és kataláz aktivitást, míg az *OE::mnSOD* csökkent kataláz, valamint megnövekedett szuperoxid dizmutáz aktivitást mutatott, a vad típusú törzshöz viszonyítva. A deléciós és túltermelő törzsek esetében végzett légzésvizsgálatok során csökkent reziduális légzés volt mérhető, míg öregedő tenyészetekben ugyanezen légzéstípus magasabb maradt, mint a vad típusban; ugyanakkor a teljes és KCN-szenzitív citokrom-c-függő légzés kisebb volt mindkét törzs esetében, továbbá a $\Delta mnSOD$ törzsben az alternatív oxidáz-függő légzés szintén alacsonyabb volt. Az *mnSOD* gén deléciója hatással volt a konídiumok életképességére is: mind az 50 °C-on 10 percig történő inkubálás, mind a 4 °C-on történő rövid- illetve hosszútávú tárolás kedvezőtlenül hatott a kicsírázó spórák számára. Az *OE::mnSOD* törzs kevesebb kleisztotéciumot termelt, mint a vad típus.

Az intracelluláris szuperoxid koncentráció hatással van a *F. graminearum* mikotoxin termelésének szabályozási mechanizmusára. Furukawa és munkatársai (2017) az intracelluláris szuperoxid szint és a trichotecén termelés közötti kapcsolatot vizsgálták. Két deléciós mutánst hoztak létre, a mitokondriális MnSOD enzimet kódoló gén hiánymutánsát, az $\Delta FgSOD2$ -t, valamint az citoszólikus Cu/ZnSOD enzimet kódoló $\Delta FgSOD3$ törzset. Immunoblott technikával igazolták, hogy az FgSOD2 enzim a mitokondriumban lokalizálódik, míg az FgSOD3 a citoszólban található. Mindkét deléciós mutáns érzékenyebb volt menadion jelenlétére a vad

típushoz képest, a $\Delta FgSOD2$ törzs növekedését 10 μM MSB teljesen gátolta, míg a $\Delta FgSOD3$ törzs növekedésének mértéke 20%-kal volt kisebb a vad típushoz képest 20 μM menadion jelenlétében. A SOD gének delécioja következtében csökkent a mutáns trichotecén termelése, és mérséklődött a *Tri5* és a *Tri6* gének expressziós szintje.

A szuperoxid dizmutázok aktivitása során keletkező hidrogén-peroxid két úton alakulhat vízzé: katalázok, vagy glutationfüggő peroxidázok által. A **katalázok (CAT)** olyan hem-tartalmú enzimek, amelyek a hidrogén-peroxidot vízzé és oxigénné alakítják át (Chelikani és munkatársai, 2003):



A **glutation** (γ -glutamil-cisztein-glicin) milimoláris (10-30 mM) mennyiségben minden prokarióta és eukarióta sejtben megtalálható (Deponte, 2013; Schafer és Buettner, 2001, Pócsi és munkatársai, 2004). A glutation részt vesz a ROS és nehézfémek detoxifikációjában, valamint a Fe-S-klaszterek kialakításában (Kumar és munkatársai, 2011). Két glutation molekula kovalensen képes összekapcsolódni egy diszulfid hidat kialakítva, ezzel létrehozva az oxidált formát (GSSG). A $\text{GSSG} \rightarrow \text{GSH}$ átalakulást a **glutation reduktáz (GR)** NADPH ellenében végzi, amelyet a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PDH) enzim biztosít (Grant és munkatársai, 1996).

2.3.2. A gombák nem enzimes antioxidánsainak szerepe az oxidatív stresszválaszban

Az oxidatív stressz kivédésében nem enzimes, kis molekulatömegű molekulák, így a vitaminok, β -karotin, valamint az előző alfejezetben már részletesen ismertetett glutation is részt vesz.

A **C-vitamin** vízben oldódik, így a sejten kívül és belül a vizes fázisban antioxidáns kapacitással rendelkezik, részt vesz a reaktív oxigénformák detoxifikálásában. Képes az E-vitamin gyökökkel alkotott formáját visszaalakítani. Az **E-vitamin** egy lipofil vitamin, amelynek a lipidek védelmében van fontos szerepe oxidatív stressz alatt, a reaktív oxigénformákkal elreagálva megelőzi azok peroxidációját (Birben és munkatársai, 2012).

A **karotinoidok**, amelyeket a 2.1.1.3. alfejezetben már ismertetésre kerültek, szintén részt vehetnek az oxidatív stressz kivédésében. A β -karotin elsődlegesen a peroxil (ROO^{\bullet}), hidroxil és szuperoxid gyökökkel reagál, s így gátolja a lipidek peroxidációját (El-Agamey és munkatársai, 2004).

A **metallotioneinek (MT)** intracelluláris, ciszteinben gazdag, fémmegkötő fehérjék, amelyek részt vesznek a nehézfémek detoxifikálásában, valamint az esszenciális fémek

homeosztázisának fenntartásában (Vasák, 2005; Coyle és munkatársai, 2002; Klaassen és munkatársai, 2009; Templeton és Cherian, 1991).

2.4. Az oxidatív stresszválasz szabályozása gomba modellorganizmusokban

A reaktív oxigénformák megemelkedett szintje miatt fellépő redox egyensúly felbomlásakor a védekezőmechanizmusok bekapcsolása elengedhetetlen lépése a sejthalál megelőzésének. A kialakuló válasz szabályozásának fő kulcsa a gének expressziójának megváltozása, amellyel így lehetőség nyílik a redox egyensúly visszaállításában résztvevő fehérjék sejten belüli szintjének növekedésére. Az antioxidáns proteinek kódoló gének expresszióját transzkripciós regulátorok szabályozzák.

2.4.1. A *S. cerevisiae* élesztő oxidatív stresszválaszának szabályozása

A *S. cerevisiae* oxidatív stresszválaszában résztvevő legfontosabb transzkripciós faktorok a Yap1, Skn7, valamint az Msn2/4 (He és munkatársai, 2009; Martinez-Pastor és munkatársai, 1996).

Az antioxidáns válaszáért elsődlegesen a **Yap1** transzkripciós faktor felelős (Harshman és munkatársai, 1988). Ez a transzkripciós faktor a Gcn4 után a második bZIP típusú transzkripciós faktor, amelyet *S. cerevisiae*-ben felfedeztek (Harshman és munkatársai, 1988; Jones és munkatársai, 1988). A Yap1 felfedezése óta számos más, a Yap családba tartozó transzkripciós faktort is leírtak (Rodrigues-Pousada és munkatársai, 2010). Már a korai kísérletek kimutatták, hogy a Yap1 pozitív regulátorként működik és elengedhetetlen a nehézfémek, így a kadmium, valamint a diamid és hidrogén-peroxid által kiváltott stresszválaszhoz (Schnell és Entian, 1991; Kuge és Jones, 1994; Wu és Moye-Rowley, 1994).

Az **Skn7** az SLN1 kétkomponensű ozmotikus stressz szignáltranszdukciós útvonal válaszregulátora. Ebben az útvonalban az Sln1 szenzor kináz szabályozza az intermedier Ypd1 és két „downstream” válaszregulátor, így az Ssk1 és Skn7 foszforilációját. Az Skn7 részt vesz az oxidatív stresszre adott válasz kialakításában is, amely nem Sln1 függő (Krems és munkatársai, 1996; Ohmiya és munkatársai, 1999; Singh és munkatársai, 2004; Wormley és munkatársai, 2005). Az Skn7 a Yap1 transzkripciós faktoral együttműködve részt vesz az oxidatív stresszválasz kulcsgénjeinek aktiválásában, így például a *trx2* (tioredoxin 2), *trr1* (tioredoxin reduktáz 1), *tsa1* (peroxiredoxin 1), *gpx2* (glutation peroxidáz), *ahp1* (peroxiredoxi 1), *ccp1* (citokró-m-c preoxidáz) és *ctl1* (citoszólíkus kataláz T) (He és Fassler, 2005; Morgan és munkatársai, 1997; Tsuzi és munkatársai, 2004). A Yap1 és az Skn7 is képes bekötődni a gének promóterében található Skn7 és Yap1 reszponzív elemekhez (He és Fassler, 2005).

A *S. cerevisiae* **Msn2/4** Cys₂His₂ cinkujj transzkripció faktorai részt vesznek a hősoikk, ozmotikus és oxidatív stressz elleni védekezésben is egyfajta „általános” stresszválasz regulátor szerepet betöltve. Az *msn2* és *msn4* kettős deléciós mutáns érzékenynek bizonyult számos stresszel, így a szénéhezéssel, hősoikkal, ozmotikus és oxidatív stresszel szemben is. (Martinez-Pastor és munkatársai, 1996).

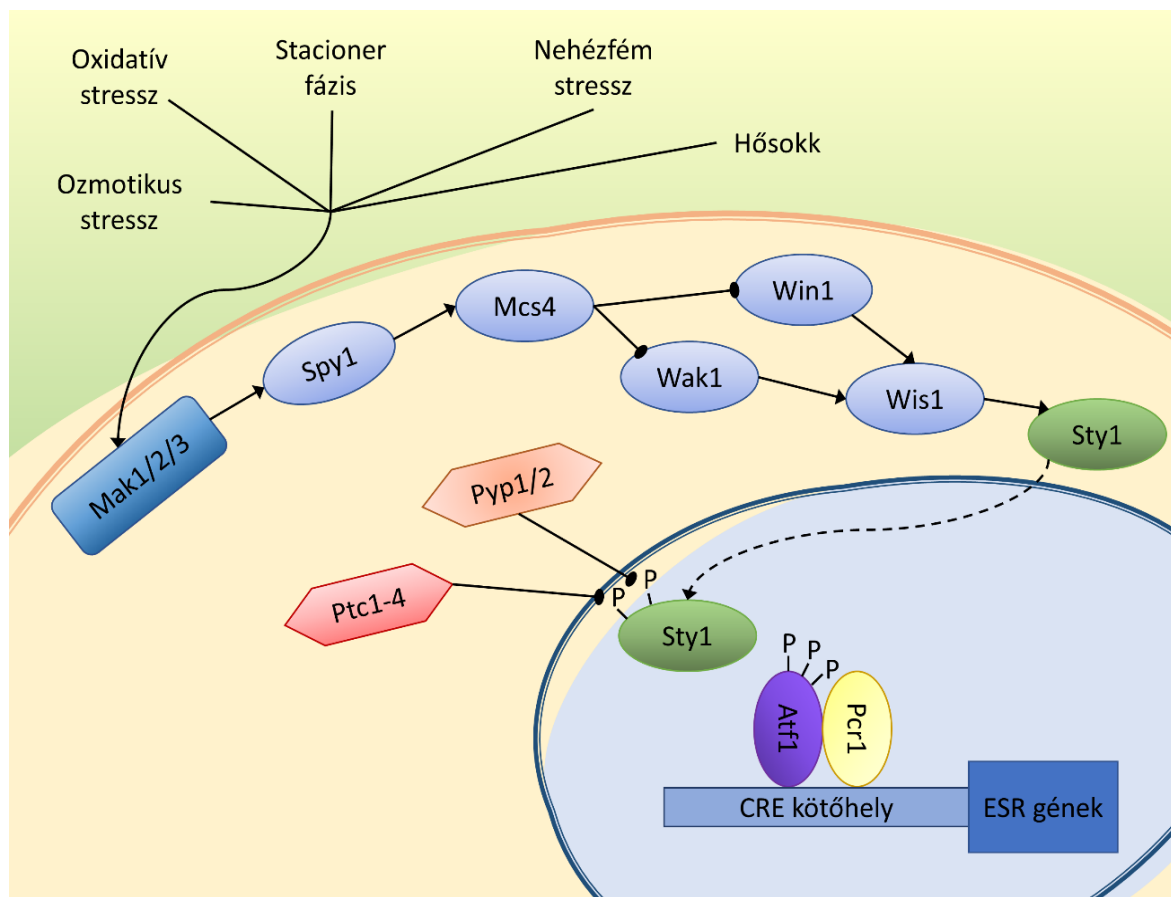
S. cerevisiae élesztőben a *S. pombe* Atf1 fehérje ortológja az Sko1 transzkripció faktor, amely azonban csak ozmotikus stressz alatt aktiválódik (Nehlin és munkatársai, 1992, Proft és munkatársai, 2005). Az Atf1 szerepét az Msn2 és az Msn4 transzkripció faktorok töltik be *S. cerevisiae*ben (Estruck és Carlson, 1993; Martinez-Pastor és munkatársai, 1996; Schmitt és McEntee, 1996). A Sty1 ortológ Hog1 *S. cerevisiae*ben szintén kétkomponensű szabályozó rendszeren keresztül aktiválódik a Pbs2 MAPKK foszforilációjával, amelyet követően a sejtmagba kerül, ahol interakcióba lép a transzkripció faktorokkal (Brewster és munkatársai, 1993; Alepuz és munkatársai, 2001)

2.4.2. A *S. pombe* oxidatív stresszválaszának szabályozása

Wang és munkatársai (2009) által készített 82 teljes gomba genomon alapuló filogenetikai elemzése bebizonyította, hogy a fonalas gombák, így többek között a *Fusarium* nemzetség tagjai közelebb állnak a *S. pombe* hasadó élesztőhöz, mint a *S. cerevisiae*hez.

*S. pombe*ban három MAPK kaszkádot írtak le ezidáig: a sejtintegritás (Pmk1/Spm1; Toda és munkatársai, 1996), feromon (Spk1; Toda és munkatársai, 1991), valamint a SAPK (**Sty1**, 8. ábra) útvonalakat (Millar és munkatársai, 1995; Shiozaki és Russell, 1995a). A Sty1 SAPK útvonal aktiválása nélkülözhetetlen a sejtek túléléséhez ozmotikus, oxidatív és ozmotikus stressz, sugárzás, DNS károsodás, hősoikk, nehézfémek által kiváltott stressz, valamint éhezés esetén (Degols és munkatársai, 1996; Degols és Russell, 1997; Nguyen és munkatársai, 2002; Samejima és munkatársai, 1997, Shieh és munkatársai, 1997; Shiozaki és Russell, 1995b; Soto és munkatársai, 2002; Toone és munkatársai, 1998). A foszforilációt követően a Sty1 a sejtmagba transzlokálódik, ahol az Atf1 transzkripció faktort foszforilálja (Wilkinson és munkatársai, 1996). A sejtmagban az Atf1 heterodimert képezhet a szintén bZIP típusú Pcr1 transzkripció faktoral (Watanabe és Yamamoto, 1996). Az Atf1-nek és Pcr1-nek átfedő kötőhelyeik vannak (például CRE kötőhely: 5'-ATGACGT-3') és mint foszforproteinek gyakran megtalálhatók stresszmentes körülmények között is a környezeti stresszválasz gének promoter régióihoz bekötődve. Oxidatív stressz alatt az Atf1 hiperfoszforilációjával párhuzamosan megfigyelhető a Pcr1 Sty1-függő defoszforilációja is (Eshaghi és munkatársai, 2010; Kanoh és munkatársai, 1996; Lawrence és munkatársai, 2007; Reiter és munkatársai, 2008; Sansó és munkatársai, 2008; Wahls és Smith,

1994). Az Atf1 és Pcr1 homo- és heterodimerként is szabályozhatják a génexpressziót. Oxidatív stressz alatt az Atf1/Pcr1 heterodimer elsődlegesen a Sty1-függő gének indukciójában vesz részt, míg a génekre gyakorolt repressziós hatása elhanyagolható (Eshaghi és munkatársai, 2010, Sansó és munkatársai, 2008). Habár a heterodimer nagyobb affinitással kötődik a CRE kötőhelyhez, vannak olyan gének, amelyek kizárólag Atf1-, ritkább esetben Pcr1-függőek (Kon és munkatársai, 1997; Eshaghi és munkatársai, 2010; Reiter és munkatársai, 2008; Sansó és munkatársai, 2008). Az Atf1 transzkripciós faktor az oxidatív sztrezváláson kívül részt vesz a stacioner sejtek életképességének fenntartásában, a szexuális szaporodásban (Takeda és munkatársai, 1995). Az *atf1* gén deléciója fokozott érzékenységet okozott a NaCl, illetve szorbit által kiváltott ozmotikus stresszel (Wilkinson és munkatársai, 1996), valamint a nitrogénéhezéssel szemben (Shiozaki és Russell, 1996).



8. ábra A Sty1 MAPK útvonal aktiválása. (Sansó és munkatársai, 2011) Abiotikus környezeti stressz esetén a Sty1 MAP kinázt a Wis1 MAPKK foszforilálja, miután az upstream elhelyezkedő MAPKKK Wak1/Win1 aktiválják. Ezen MAP kinázokat egy kétkomponensű rendszer (Mak1/2/3; Spy1 és Mcs4) szabályoz. Ez a kaszkád leginkább az oxidatív stressz szignál közvetítésében vesz részt. Stressz hiányában a Ptc1-4 és Pyp1/2 foszfatázok defoszforilálják a Sty1-et.

2.4.3. A *S.pombe* Atf1 ortológ bZIP transzkripciós faktorok szerepe fonalas gombafajokban

2.4.3.1. Az *A. nidulans* AtfA transzkripciós faktor szerepe

Az *atfA* gén szerepét *A. nidulans*ban Hagiwara és munkatársai (2008) vizsgálták elsőként. A deléciós mutáns stresszérzékenységét először 2% glükózt tartalmazó szilárd minimál táptalajon vizsgálták, amelyet 60 μ M CdSO₄-tal (nehézfém stressz), 0,8 M KCl-dal (ozmotikus stressz) vagy 1 M szorbittal (ozmotikus stressz) egészítettek ki. A Δ *atfA* mutáns növekedése nem maradt el a vad típushoz képest egyik stresszor jelenlétében sem. A tápagarokat magas hőmérsékleten (42 °C) inkubálva a deléciós mutáns növekedése hasonló volt a vad típushoz. Különböző oxidatív stresszágensekkel, így hidrogén-peroxiddal, *tert*-butil-hidroperoxiddal vagy menadionnal kiegészített agarlemezekre oltva a vad típusú és a Δ *atfA* deléciós törzset azt tapasztalták, hogy a deléciónak nem volt hatással a gomba oxidatív stressz érzékenysége a vizsgált körülmények között.

Öt nap inkubációt követően a Δ *atfA* törzs konídium termelésében nem volt különbség a vad típushoz képest. A konídiumokat H₂O₂-dal (50 mM 15 percig és 30 percig) kiegészített nátrium-foszfát-pufferben (10 mM, pH 7,0) 15 vagy 30 percig kezelték, majd a spóraszuszpenziót tápagar felületére szélesztve vizsgálták a konídiumok túlélését. A Δ *atfA* törzs konídiumai nagyon érzékenyek voltak a H₂O₂ kezelésre. Az *atfA* mutáns spórái érzékenyek bizonyultak a hőkezelésre is (50 °C 10 percig vagy 20 percig) (Hagiwara és munkatársai, 2008).

Balázs és munkatársai (2010) hasonló eredményeket kaptak, mint Hagiwara és munkatársai (2008), amikor a Δ *atfA* spóráiból készített szuszpenziót pontinokulálták KCl-dal (1,5 M), NaCl-dal (1,5 M) vagy szorbittal (2 M) kiegészített tápagarok felületére: a deléciós törzs nem volt érzékenyebb, mint a vad típus. A deléciós törzs spóráinak életképessége egy hétig tartó 4 °C-os tárolás után szignifikánsan lecsökkent (84%) a kontroll törzsből származó spórákéhoz (10%) képest. Az *atfA* mutáns és a vad típusú törzs hasonló számban termelt konidiospórákat. Az *atfA* gén deléciója sem a PAF indukált (Leiter és munkatársai, 2005; Marx és munkatársai, 2008; Binder és munkatársai, 2010), sem az *A. nidulans* szénéhezés által kiváltott (Pócsi és munkatársai, 2009) apoptózist nem befolyásolta. A Hagiwara és munkatársai (2008) által közölt eredményekkel szemben Balázs és munkatársai (2010) azt tapasztalták, hogy a Δ *atfA* törzs érzékenyebb volt a 0,8 mM *t*BOOH jelenlétében, mint a kontroll törzs. Az oxidatív stressz érzékenysége a deléciós mutánsnak szintén magasabb volt, mint a kontroll törzsé 6,0 mM H₂O₂ és 0,12 mM MSB kezelés esetén. Ezzel szemben a kontroll és a mutáns törzsek diamid (2,0 mM) érzékenységében nem volt számottevő különbség.

Lara-Rojas és munkatársai (2011) Δ *atfA* és Δ *sakA* deléciós törzseket vizsgálva azt tapasztalták, hogy az *atfA* és *sakA* gén deléciója derepresszált szexuális fejlődést és nagyobb

kleisztotécium-termelődést eredményezett, ami arra utal, hogy a SakA és az AtfA ugyanazon az útvonalon keresztül represszálják a szexuális szaporodást (Kawasaki és munkatársai, 2002; Lara-Ortiz és munkatársai, 2003).

2.4.3.2. A *F. graminearum* FgAtf1 transzkripció faktor szerepe

A *F. graminearum* egy nekrotróf növénypatogén, amely leginkább a gabonaféléket támadja meg. Izolatumai többféle mikotoxint termelhetnek, közülük a zearalenon (ZEA), a nivalenol (NIV) és a dezoxinivalenol (DON) a legfontosabb (Leslie és Summerell, 2006).

Az FgAtf1 transzkripció faktor kódoló *Fgatf1* gén deléciója számos elváltozást idézett elő. A $\Delta Fgatf1$ mutáns növekedése enyhén elmaradt CM tápagon a vad típusú törzshöz képest (Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015). CMC-vel kiegészített táptalajon a deléciós törzs körülbelül háromszor kevesebb konídiumot termelt a vad típushoz képest, azonban a konídiumok morfológiája nem változott (Jiang és munkatársai, 2015).

A különféle ozmotikus stresszorokkal (szorbit, KCl, NaCl, LiCl, ZnCl₂ változó koncentrációban alkalmazva) kiegészített tápagaron a deléciós törzs növekedése jobban elmaradt a vad típushoz képest, legérzékenyebbek a szorbittal, LiCl-dal és ZnCl₂-dal szemben bizonyult. Ezen megfigyeléssel éles kontrasztban a deléciós mutáns gyorsabban növekedett hidrogén-peroxiddal kiegészített tápagaron, mint a vad típus (Nguyen és munkatársai, 2013). Jiang és munkatársai (2015) kísérleteikben azt tapasztalták, hogy a deléció hatására a $\Delta Fgatf1$ mutáns érzékennyé vált a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív, illetve Kongóvörös által okozott sejtfalstresszre.

A gomba szexuális szaporodását vizsgálva megfigyelhető volt, hogy a deléció hatására a peritéciumok megjelenése késleltetett, hosszú inkubációs idő elteltével is a peritéciumok közel 50%-a éretlen maradt (Nguyen és munkatársai, 2013).

A DON virulenciafaktorként aktívan részt vesz a gazdanövények kolonizációjában (Maier és munkatársai, 2006). Fertőzött búzakalászból származó szemek, illetve a toxin termelését indukáló táptalajból származó minták dezoxinivalenol tartalmát ELISA segítségével határozták meg. A $\Delta Fgatf1$ törzs *in planta* háromszor kevesebb toxint, míg *in vitro* körülmények között 1,7-3,5× több DON-t termelt az idő függvényében, mind a vad típus. Az *Fgatf1* gén deléciója hatással volt továbbá az aurofuzarin pigment termelésére is: a $\Delta Fgatf1$ törzs telepei nagyobb mértékű vöröses pigmentáltságot mutattak (Nguyen és munkatársai, 2013).

2.4.3.3. A *F. oxysporum* FoAtf1 transzkripciós faktor szerepe

A *F. oxysporum* a banán világszerte elterjedt patogénje, az ún. Panama betegség okozója (Stover, 1972). Az *Foatf1* gén deléciója hatására a $\Delta Foatf1$ törzs kisebb konídiumokat termelt, és a konídiumok csírázása szignifikánsan lassabb volt 9 és 18 óra elteltével, mint a vad típus konídiumaié. A törzsek oxidatív stressz-érzékenységét hidrogén-peroxiddal (5, 10 és 20 mM) kiegészített tápagon vizsgálva a $\Delta Foatf1$ telepek átmérője 8, 11, illetve 18%-kal maradt el a vad típushoz képest. A virulenciát banánpalántákon vizsgálva azt tapasztalták, hogy 35 nappal a fertőzést követően a deléciós törzs kevésbé tudta kolonizálni a növényeket, mint a vad típusú törzs. Banánleveleken, *in vitro* körülmények között a $\Delta Foatf1$ deléciós mutáns gyengébb kolonizációs aktivitást mutatott, mint a vad típus (Qi és munkatársai, 2013).

2.4.3.4. A *M. oryzae* MoAtf1 transzkripciós faktor szerepe

Az *Moatf1* gén szerepét a *M. oryzae* (a rizs pirikuláriás barnulásának kórokozója) oxidatív stresszérzékenységében és virulenciájában Guo és munkatársai (2010) vizsgálták. A *Moatf1* gén relatív expressziójának szintje az invazív növekedés kezdeti szakaszában, valamint a konídiumok csírázásakor emelkedett. Komplex (CM) és minimál (MM) tápagon vizsgálva a vegetatív növekedést tapasztalható volt, hogy a $\Delta Moatf1$ törzs lassabban növekedett és a légmicéliumai vékonyabbak voltak komplett táptalajon (CM), míg minimál tápagon (MM) a mutáns telepek növekedése gyengébb volt, a légmicélium mennyisége és morfológiája azonban nem változott a vad típushoz képest. A konídiumok alakjára és csírázására nem volt hatással a *Moatf1* gén deléciója. A 0,5 M NaCl-dal, vagy 1 M szorbittal kiegészített CM tápagon a deléciós mutáns növekedése nem maradt el a vad típusétól. A különféle sejtfalstresszt kiváltó (sejtfalbontó enzim, calcofluor white) vegyületekkel kiegészített CM tápagon a $\Delta Moatf1$ törzs hasonlóan növekedett, mint a vad típus. Ezen megfigyelésekkel szemben az oxidatív stresszt kiváltó hidrogén-peroxid jelenlétében közel 11%-os növekedésgátlás volt megfigyelhető a deléciós mutáns telepátmérőiben. Ezzel összhangban a spórák körülbelül 88%-a nem csírázott ki 1 órás inkubációs időt követően sem 5 mM H₂O₂ jelenlétében.

2.4.3.5. A *B. cinerea* BcAtf1 transzkripciós faktor szerepe

A *B. cinerea* egy nektrotrof fitopatogén, amely számos növényfajt képes megfertőzni (Choquer és munkatársai, 2007).

A *bcatf1* gén szerepét a *B. cinerea* differenciálódásában és szekunder metabolit termelésében Temme és munkatársai vizsgálták (2012). A *bcatf1* gén deléciójának hatására a

Δbcatfl törzs CM tápagon több légmicéliumot képzett három nap fény-sötét periódust is tartalmazó inkubálást követően, mint a vad típus, bolyhos fenotípust mutatva ezzel. Folyamatos megvilágítás mellett a vad típusú törzs 6 nap elteltével konídiumokat képzett, míg a deléciós mutáns továbbra is csak hifákat növesztett. Két hét sötétben inkubálást követően a vad típus szkleróciumokat termelt, míg ezzel szemben a deléciós mutáns ugyan konídiumokat képes volt termelni, de szkleróciumokat már nem. Ezen eredményekből arra lehetett következtetni, hogy a *bcatfl* gén deléciója zavart okozott a fényfüggő fejlődési folyamatokban. Standardizált körülmények között a deléciós törzs a vad típus által termelt konídiumok 2,5%-át volt képes termelni, a spórák csírázásában nem volt különbség megfigyelhető.

A *Δbcatfl* törzs ozmotikus, oxidatív, fungicid és sejtfal stresszérzékenységét különböző vegyületekkel változó koncentrációban kiegészített CM táptalajon vizsgálva elmondható, hogy a xilózzal, szorbittal, szacharózzal, fruktózzal vagy NaCl-dal kiegészített táptalajokon a vad típus és a deléciós törzs növekedése között nem volt különbség megfigyelhető, míg glükózzal vagy KCl-dal kiegészített tápagon a *Δbcatfl* törzs növekedése enyhén elmaradt a vad típuséhoz képest. A vad típus és deléciós mutáns hasonló érzékenységet mutatott oxidatív stressz, valamint a fungicid hatással bíró fludioxonil és iprodion jelenlétében. A sejtfalstresszt kiváltó CR és calcofluor white a *Δbcatfl* törzs növekedését jelentősen gátolta, így megállapítható, hogy a *bcatfl* gén deléciója hatással volt a sejtfal bioszintézisére, törékeny sejtfalat létrehozva ezzel (Temme és munkatársai, 2012).

A *B. cinerea* különféle fitotoxikus vegyületeket termel, közülük tartozik a szeszkviterpén botridiál és a poliketid botcininsav is. A botridiál fényfüggő módon számos gazdanövénynél nekrotikus elváltozásokat okoz, és *in vitro* és *in vivo* is kimutatható (Collado és munkatársai, 2007; Colmenares és munkatársai, 2002). A botridiál és a botcininsav bioszintézis génjei is klaszterekbe csoportosulnak (Dalmais és munkatársai, 2011; Siewers és munkatársai, 2005), a microarray vizsgálatokban ezen gének erősen felül-regulálódtak (Temme és munkatársai, 2012). A *B. cinerea* axenikus körülmények között képes a növényi hormonhatású abszcizinsavat (ABA) termelni (Siewers és munkatársai, 2004). Az ABA termelésében résztvevő eddig azonosított négy gén közül három (*bcaba1*, *bcaba2* és *bcaba4*) expressziós szintje a *Δbcatfl* törzsben erősen megemelkedett. Az axenikus tenyészetekben termelt fitotoxinok kémiai elemzése kimutatta, hogy a termelt mennyiségek korrelálnak az expressziós adatokkal: a botridiál, botriéndiál, amelyek növényekben erőteljes fitotoxikus hatásúak (Collado és munkatársai, 2007; Colmenares és munkatársai, 2002), és a botcinin A mennyisége szignifikánsan megnőtt a deléciós törzsben. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a BcAtf1 a *B. cinerea* másodlagos anyagcseréjében résztvevő gének egyik fő regulátora (Temme és munkatársai, 2012).

2.4.3.6. A *C. purpurea* CpTf1 transzkripció faktor szerepe

A *C. purpurea* *cptf1* génjének funkcióját Nathues és munkatársai (2004) vizsgálták. A *cptf1* gén deléciója nem volt hatással a vegetatív növekedésre és a sporulációra. *C. purpurea* genomjában a ROS-kal összefüggésben álló gének promótereinek *in silico* analízise CRE-kötőhelyet (Garre és munkatársai 1998) fedezett fel a *cpcat1* kataláz gén 5'-upstream szekvenciájában. A *cpcat1* gén alap expressziós szintje alacsony volt a Δ *cptf1* törzsben, ami H₂O₂ kezelés hatására csak kis mértékben indukálódott, amely megfigyelés erősen utal arra, hogy a *cpcat1* expresszióját a CpTf1 szabályozza (Nathues és munkatársai, 2004). A vad típusú törzssel fertőzött rozskalászokon hét nap után, míg a deléciós mutánsal fertőzötteken 2-4 nappal később jelentek meg a mézharmat cseppek, amelyek mennyisége a Δ *cptf1* törzs esetében kevesebbnek bizonyult. A szkleróciumok megjelenését 45 nap elteltével vizsgálva tapasztalható volt, hogy a deléciós mutáns kevesebb szkleróciumot termelt, s ezek nagy része nem is fejlődött ki teljesen. Ezekből az eredményekből következtetni lehetett arra, hogy a CpTf1 részt vesz a *C. purpurea* virulenciájában.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A felhasznált törzsek származása, fenntartása és tenyésztése

A $\Delta FvatfA$ deléciós mutáns létrehozásához a *F. verticillioides* FGSC 7600 (Fungal Genetics Stock Center Kansas City, MO, USA) szekvenált genomú vad típusú referencia törzset használtuk fel. A deléciós mutánsból ($\Delta FvatfA::hph$) két ektopikus komplementált törzset hoztunk létre { $FvatfA$ 'C (H7) és $FvatfA$ 'C (H9)}. A $\Delta FvmnSOD$ deléciós mutáns létrehozásához szintén a *F. verticillioides* FGSC 7600 vad típusú törzset használtuk fel. A deléciós mutánsból ($\Delta FvmnSOD::hph$) egy ektopikus komplementált törzset ($FvmnSOD$ 'C) hoztunk létre. A törzseket konídium szuszpenzió formájában, 50%-os glicerinben tároltuk, -70 °C-on.

Minden kísérlethez friss inokulumot készítettünk, amelyhez a törzseket Czapek-Dox táptalajra³ oltottuk le, majd 7 napos, 25 °C-on történő inkubálást követően steril spóramosó oldattal mostuk le a konídiumokat, végül átszűrtük két réteg Miracloth-on (Merck-Millipore). A spórákat Bürker-kamra segítségével számoltuk le és állítottuk be a konídium szuszpenzió megfelelő végkoncentrációját.

Genomi DNS izolálásához (kópiaszám meghatározáshoz és Southern analízishez) a gombákat 100 ml YPG tápvelesbe oltottuk, 18 óráig történő (28 °C-on, 200 rpm) rázatást követően a tenyészeteket leszűrtük 2 réteg Miracloth-on, majd mostuk steril desztillált vízzel, végül pedig az összegyűjtött micéliumokat -70 °C-on tároltuk felhasználásig.

A plazmidok felszaporítására a DH5 α kompetens *Escherichia coli* törzset használtuk, amelyet LB táptalajra oltottunk le és 37 °C-on tenyésztettünk.

3.2. Nukleinsav izolálási technikák és agaróz gélelektroforézis

3.2.1. DNS izolálás

A Southern analízishez és a kópiaszám meghatározáshoz liofilizált micéliumból CTAB lízis puffer felhasználásával „Maxi prep” genomi DNS izolálást végeztünk Kerényi és munkatársai (1999) leírása alapján kisebb módosításokkal. A nukleázmentes vízbe visszavett genomi DNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg.

A transzformánsok gyors ellenőrzéséhez fenolmentes DNS izolálást végeztünk, amely során az előzetesen félkémcsövekben YPG tápvelesben felnövesztett tenyészeteket centrifugáltuk,

³ A táptalajok és oldatok összetétele minden esetben az M2. mellékletben található.

majd a felülúszó eltávolítása után a micéliumokat lízis puffer és steril üvegyöngy segítségével feltártuk. A mintákhoz RNase-t (Sigma) adtunk, majd vortexelést követően 65 °C-on, 15 percig inkubáltuk a csöveket, minden ötödik percben vortexeltünk. Ezt követően a mintákat jégen inkubáltuk 5 percig. 8 M kálium-acetát oldat hozzáadását követően a csöveket centrifugáltuk (4 °C, 15 perc, 13200 rpm). A felülúszókat új csövekbe mértük át, majd izopropanol segítségével kicsaptuk a DNS-t, amelyet centrifugálással gyűjtöttünk össze (4 °C, 15 perc, 13200 rpm). Ezután a pelleteket jéghideg 70%-os etanollal mostuk, végül a felülúszó eltávolítása után nukleázmentes vízben vettük vissza őket.

3.2.2. RNS izolálás

A génexpressziós vizsgálatokhoz szükséges RNS-t porított liofilizált micéliumból TRIzol reagens (Invitrogen) (Chomczynski, 1993) felhasználásával nyertük ki, majd ezt követően az RNS minták mennyiségét és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (Thermo Scientific) segítségével meghatároztuk. Az RNS minták minőségét agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztük.

3.2.3. Plazmid izolálás kompetens *E. coli* tenyészetekből

A pB15 valamint a pBS-G plazmidokat (Sagaram és munkatársai, 2007) DH5 α kompetens *E. coli* sejtekbe juttattuk be, transzformációval.

A felnőtt egyedi telepekből 2 ml LB táptalajba oltottunk át, majd 37 °C-on, 250 rpm, 18 órán át történő tenyésztést követően a plazmidokat a NucleoSpin[®] Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel) gyártói utasításai szerint izoláltuk, illetve spóraszuszpenziót tettünk el 50 v/v%-os glicerinben a tenyészetekből -70 °C-ra.

3.2.4. Agaróz gélelektroforézis

DNS minták futtatása és a PCR termékek visszaizolálása

A disszertációban szereplő DNS minták agaróz gélelektroforézisét 0,6–0,8% agaróztartalmú 1 \times TAE pufferből készült gélen végeztük, a géleket 1 \times TAE pufferben futtattuk 80 V-on. A PCR termékeket a NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) gyártói utasításai szerint izoláltuk vissza a gélből.

RNS minták futtatása

Az RNS minták minőségének ellenőrzését denaturáló agaróz gélelektroforézis segítségével végeztük 1 \times MOPS-EDTA pufferben 80 V-on.

3.3. A géndelégiós és komplementáló konstrukciók készítése

3.3.1. Az *FvatfA* géndelégiós kazetta létrehozása

A delégiós kazettát double-joint PCR módszerrel hoztuk létre (Sagaram és munkatársai, 2007; Yu és munkatársai, 2004). Az első lépésben a gén előtt található 5' 1524 bp, valamint a gén után található 3' 1557 bp hosszúságú határoló szakaszokat amplifikáltuk az *FvatfAupfwd* és *FvatfAupkimrev* (5' régió), valamint *FvatfAdownkimfwd* és *FvatfAdownrev* (3' régió) primer párok** segítségével a vad típusú *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsből izolált genomi DNS-ből, amelyhez az Expand™ Long Polimerase-t (Roche) használtuk fel. A markerként szolgáló higromicin foszfotransferáz gént (*hph*) a pBP15 (Sagaram és munkatársai, 2007) plazmidból az *M13F* és *M13R* primerek felhasználásával szaporítottuk fel. Ezt követően a második lépésben (joint PCR) a három kitisztított PCR terméket kevertük össze egy csőben 1:3:1 arányban (5' határoló régió : marker gén : 3' határoló régió), majd primerek nélkül, az átfedő régiók segítségével kapcsoltuk össze a három terméket. Az utolsó, nested PCR során szaporítottuk fel a marker gént is tartalmazó 4,1 kb hosszúságú géndelégiós kazettát az *FvatfAnestedfwd* és *FvatfAnestedrev* primer pár segítségével. A keletkezett PCR terméket kitisztítottuk, majd a protoplasztálás során használt STC oldatban vettük vissza.

** A disszertációban felhasznált primerek szekvenciája a M3. mellékletben található táblázatban került felsorolásra.

3.3.2. Az *FvatfA* komplementáló kazetta létrehozása

Az $\Delta FvatfA$ delégiós törzset ($\Delta FvatfA::hph$) a vad típusú *FvatfA* génnel komplementáltuk, amelyhez a geneticin rezisztenciáért felelős aminoglikozid 3'-foszfotransferáz (*gen*) gént fuzionáltattunk single-joint PCR segítségével (Sagaram és munkatársai, 2007). Az első kör PCR-ben az *FvatfA* gént a vad típusú törzs genomi DNS-éből a *FvatfAcompkimfwd* és *FvatfAcomprev* primerpárral, míg a *gen* markergént a pBS-G plazmidból (Sagaram és munkatársai, 2007) az *M13F* és *M13R* primerekkel amplifikáltuk, amelyhez az Expand™ Long Polimerase-t (Roche) használtuk fel. A kitisztított PCR termékekből a második, joint PCR-ben az átfedő kiméra szakaszok segítségével a darabokat összekapcsoltuk primerek felhasználása nélkül, végül az utolsó lépésben a joint PCR terméket felhasználva az *M13F* és *FvatfAcomprev* primerekkel a 6,9 kb nagyságú komplementáló kazettát szaporítottuk fel. A PCR terméket kitisztítottuk, majd a protoplasztálás során használt STC oldatban vettük vissza.

3.3.3. Az *FvnmSOD* géndeléciós kazetta létrehozása

A deléciós kazettát double-joint PCR módszerrel hoztuk létre (Sagaram és munkatársai, 2007; Yu és munkatársai, 2004, Leiter és munkatársai, 2016). Az első lépésben a gén előtt található 5' 1657 bp, valamint a gén után található 3' 1375 bp hosszúságú határoló szakaszokat amplifikáltuk az *FvnmSODupfwd* és *FvnmSODupkimrev* (5' régió), valamint *FvnmSODdownkimfwd* és *FvnmSODdownrev* (3' régió) primer párok segítségével a vad típusú *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsből izolált genomi DNS-ből, amelyhez az Expand™ Long Polimerase-t (Roche) használtuk fel. A markerként szolgáló higromicin foszfotransferáz gént (*hph*) a pBP15 (Sagaram és munkatársai, 2007) plazmidből az *M13F* és *M13R* primerek segítségével szaporítottuk fel. Ezt követően a második, joint PCR-ben a 3 kitisztított PCR terméket kevertük össze egy csőben 1:3:1 arányban (5' határoló régió : marker gén : 3' határoló régió), majd primerek nélkül, az átfedő régiók segítségével kapcsoltuk össze a három terméket a reakció során. Az utolsó, nested PCR-ben szaporítottuk fel a marker gént is tartalmazó 4,1 kb hosszúságú géndeléciós kazettát az *FvnmSODnestedfwd* és *FvnmSODnestedrev* primer pár segítségével. A keletkezett PCR terméket kitisztítottuk, majd a protoplasztálás során használt STC oldatban vettük vissza.

3.3.4. Az *FvnmSOD* komplementáló kazetta létrehozása

Az $\Delta FvnmSOD$ deléciós törzset ($\Delta FvnmSOD::hph$) a vad típusú *FvnmSOD* génnel komplementáltuk, amelyhez a geneticin rezisztenciáért felelős aminoglikozid 3'-foszfotransferáz (*gen*) gént fuzionáltattunk single-joint PCR segítségével (Sagaram és munkatársai, 2007). Az első körben az *FvnmSOD* gént a vad típusú törzs genomi DNS-éből a *FvnmSODcompkimfwd* és *FvnmSODrev* primerpár segítségével szaporítottuk fel, míg a *gen* markergént a pBS-G plazmidből (Sagaram és munkatársai, 2007) az *M13F* és *M13R* primerekkel amplifikáltuk, amelyhez az Expand™ Long Polimerase-t (Roche) használtuk fel. A kitisztított PCR termékekből a második, joint PCR-ben az átfedő kiméra szakaszok segítségével a darabokat összekapcsoltuk primerek felhasználása nélkül, végül az utolsó lépésben a joint PCR terméket felhasználva az *M13F* és *FvnmSODrev* primerekkel a 3,8 kb nagyságú komplementáló kazettát szaporítottuk fel. A PCR terméket kitisztítottuk, majd a protoplasztálás során használt STC oldatban vettük vissza.

3.4. A *F. verticillioides* protoplasztok transzformálása

A PEG-mediált transzformáláshoz a *F. verticillioides* protoplasztokat Sagaram és munkatársai (2007) által közölt cikk alapján hoztuk létre kisebb módosításokat alkalmazva. A

transzformálás menete röviden a következő volt: a nedves micéliumot Driselase és β -glükuronidáz (Sigma) segítségével protoplasztáltak protoplasztáló oldatba visszavéve (3 óra, 75 rpm, 28 °C-on), majd a keletkezett protoplasztokat centrifugálással összegyűjtöttük (1500 rcf-n, 0 fékezés mellett, 22 °C-on, 5 perc). A pelletet 0,7 M NaCl oldattal, ezt követően STC oldattal mostuk. A kitisztított nested PCR terméket a protoplasztokhoz adtuk, majd PEG oldat hozzáadását követően inkubáltuk (szobahőmérséklet, 40 perc). Az inkubálást követően folyékony regeneráló táptalajban regeneráltattuk a protoplasztokat egy éjszakán át. A regenerálódott protoplasztokat regeneráló tápagar (amely 100 μ g/ml koncentrációban higromicin B-t tartalmazott) felületére rétegeztük topagarral elkeverve, végül a regeneráló csészéket 28 °C-on 7-15 napig inkubáltuk, amíg a transzformáns telepek megjelentek.

3.5. A géndeléción és komplementált törzsek azonosítása

3.5.1. A deléción mutánsok azonosítása

A regeneráló csészéken megjelenő transzformánsokat 100 μ g/ml higromicint tartalmazó Czapek-Dox táptalajra oltottuk át, majd ezt követően a kinőtt telepekből egyedi telepeket hoztunk létre, hogy biztosítsuk a genetikai homogenitást a genomi DNS izolálást megelőzően. Az egyedi telepekből agardugókat vágunk ki, amelyekkel 100 μ g/ml higromicint tartalmazó YPG táplevest inokuláltunk, hogy a már ismertetett módon genomi DNS-t izoláljunk.

A transzformánsok genetikai vizsgálatához Emerald PCR-t (Takara) mértünk össze, majd a PCR termékeket 0,6% agaróz gélen ellenőriztük vissza, ezt követően a $\Delta FvatfA$ esetében *EcoRV* és *NdeI* (Thermo Fisher Scientific), míg a $\Delta FvmnSOD$ esetében *HindIII* és *NdeI* restriktációs endonukleázokkal emésztettük. A vad típusú gén, valamint a géndeléción kazetták emésztési mintázata eltérő volt, amelyet 0,6% agaróz gélelektroforézissel ellenőriztünk (2. és 3. táblázat).

2. táblázat A vad típus és az *FvatfA* deléción mutáns emésztési mintázata

Vad típus (4683 bp)		Deléción mutáns (4518 bp)
2578 bp; 2105 bp	<i>EcoRV</i>	Ø
Ø	<i>NdeI</i>	2119 bp; 2399 bp

3. táblázat A vad típusú és az *FvmnSOD* deléción mutáns emésztési mintázata

Vad típus (3711 bp)		Deléción mutáns (4166 bp)
1430 bp; 598 bp; 601 bp; 1082 bp	<i>HindIII</i>	1430 bp; 1654 bp; 1082 bp
Ø	<i>NdeI</i>	2098 bp; 2068 bp

A jó emésztési mintázatot adó transzformánsokból spóraszuszpenziót vettünk fel glicerinben, amelyet -70 °C-on tároltunk tovább.

Azon transzformánsokban, amelyek jó mintázatot adtak, a deléciós kazetta egyszeres, jó helyre történő beépülését Southern-blot analízissel igazoltuk.

3.5.2. A komplementált törzsek azonosítása

A regeneráltató csészéken megjelenő transzformánsokat 100 µg/ml higromicint vagy 100 µg/ml geneticint tartalmazó Czapek-Dox táptalajra oltottuk át, majd ezt követően azokból a telepekből, amelyek mind geneticin, mind higromicin jelenlétében kinőttek, egyedi telepet hoztunk létre, hogy biztosítsuk a genetikai homogenitást a többlépcsős ellenőrzést megelőzően.

A genomi DNS izolálás előtt a komplementált telepek fenotípusos helyreállítását több stresszágenssel vizsgáltuk meg, így olyanokkal, amelyek stresszérzékenységet váltottak ki a deléciós mutánsnál, illetve olyanokkal is, amelyek nem okoztak fenotípusos változást. Célunk ezzel annak bizonyítása volt, hogy a komplementáló kazetta integrációja a genomba nem okozott változást a komplementált törzsek stresszérzékenységében a vad típushoz, illetve a deléciós mutánshoz képest.

A felhasznált stresszt generáló ágensek a következők voltak:

- NaCl	0,5 M
- KCl	0,5 M
- Szorbit	0,5 M
- CdCl ₂	0,2 mM
- Kongóvörös	10 µM
- <i>t</i> BOOH	0,6 mM
- MSB	0,8 mM
- H ₂ O ₂	20 mM
- Diamid	0,4 mM

15 cm átmérőjű steril üveg Petri-csészékbe 100 ml Czapek-Dox tápagart öntöttünk, amelyhez előzőleg már hozzáadtuk a felsorolásban szereplő stresszorok valamelyikét olyan mennyiségben, amellyel a megadott végkoncentrációt elértük. A Petri-csészéket 4 részre osztottuk, majd mindegyik csészére 1×10^5 db spóráat inokuláltunk pontszerűen az alábbi törzsekből: FGSC 7600, deléciós mutáns, komplementált törzsek. A csészéket 25 °C-on, 6 napig inkubáltuk, majd lemértük a telepek átmérőjét és fényképet készítettünk minden Petri-csészéről.

Azon komplementált törzsekből, amelyek fenotípusos helyreállást mutattak, a már ismertetett módon genomi DNS-t izoláltunk.

A komplementáltak genetikai vizsgálatához Emerald PCR-t (Takara) mértünk össze a genecin kazettára (1. reakció), illetve az *FvatfA* vagy *FvnmSOD* génre (2. reakció).

A PCR termékeket 0,6% agaróz gélen ellenőriztük vissza, majd ezt követően a második PCR-ből származó termékeket az *FvatfA* gén esetében *EcoRI*, *XhoI*, *SspI* (Thermo Fisher Scientific), míg az *FvnmSOD* gén esetében *BamHI* és *PstI* (Thermo Fisher Scientific) restrikciós endonukleázokkal emésztettük. A vad típusú gén és a komplementáló kazetta emésztési mintázata azonos volt, amelyet 0,6% agaróz gélelektroforézissel ellenőriztünk vissza (4. és 5. táblázat).

4. táblázat A vad típus és az *FvatfA* komplementált törzsek emésztési mintázata

Vad típus (4375 bp)			Komplementált (4375 bp)	
3252 bp; 1123 bp		<i>EcoRI</i>	3252 bp; 1123 bp	
579 bp; 3796 bp		<i>XhoI</i>	579 bp; 3796 bp	
∅		<i>SspI</i>	∅	

5. táblázat A vad típus és az *FvnmSOD* komplementált törzs emésztési mintázata

Vad típus (2468 bp)			Komplementált (2468 bp)	
∅		<i>BamHI</i>	∅	
730 bp; 1738 bp		<i>PstI</i>	730 bp; 1738 bp	

A jó emésztési mintázatot adó transzformánsokból glicerol stockot készítettünk, amelyet -70 °C-on tároltunk tovább.

Azon komplementáltakban, amelyek mind fenotípusos helyreállást, mind a megfelelő emésztési mintázatot mutatták, kópiaszám meghatározást végeztünk qPCR segítségével.

3.6. Southern blot analízis

Azon transzformánsokban, amelyek jó mintázatot adtak, a deléciós kazetta egyszeres, jó helyre történő beépülését Southern-blot analízissel igazoltuk, amelynek során a vad típusú és transzformáns telepekből izolált genomi DNS-t *ScaI* (Thermo Fisher Scientific) restrikciós endonukleázzal 37 °C-on emésztettük, majd 0,7%-os agaróz gélen futtattuk a mintákat. A DNS-t ezt követően etídium-bromid oldattal tettük láthatóvá, majd UV transzilluminátoron a gélről egy vonalzó segítségével fényképet készítettünk. A gélt 20-20-20 percen keresztül depurináló, denaturáló, majd neutralizáló oldatban inkubáltuk. A DNS-t a gélből Immobilon NY⁺ (Millipore) membránra vittük át vákuum transzfer segítségével, 10× SSC oldattal nedvesen tartva a gélt 65 percen keresztül. A membránra a DNS-t hővel (80 °C, 20 perc), valamint UV-crosslinkerrel (3×245 nm; 1200 μJ/cm²) fixáltuk. A membránt ezt követően 3 órán keresztül prehibridizáltuk

hibridizáló kamrában 50 °C-on heringsperma DNS-sel kiegészített prehibridizáló oldatban. Az előzőleg elkészített és kitisztított DIG-jelölt próbát 10 percen keresztül forraltuk, majd a prehibridizáló oldatot tartalmazó hibridizáló csövekhez adtuk. A membránt egy éjszakán át 50 °C-on hibridizáltuk. A hibridizálást követően a membránt 60 °C-ra temperált Southern-mosó oldattal átöblítettük, majd mostuk 2×20 percen keresztül 55 °C-on. A mosást követően a membránt előhívtuk a DIG DNA detection and Labeling Kit (Roche) gyártói utasításai szerint.

3.7. Kópiaszám meghatározás

A komplementált törzsekben a kópiaszám meghatározást Herrera és munkatársai (2009) munkája alapján végeztük el kisebb módosításokat alkalmazva.

Az *FvatfA* 'C (H7) és (H9) komplementált törzsekben az *FvatfA* gén kópiaszámának meghatározásához egykópiás referenciagénként az FVEG_11192 gént választottunk, ami a mitokondriális mangán szuperoxid dizmutáz (FvMnSOD) enzimet kódolja a *F. verticillioides* genomjában.

Az *FvmnSOD* gén kópiaszámának meghatározásához az *FvmnSOD* 'C törzsben egykópiás referenciagénként az FVEG_02866 gént választottunk, amely az FvAtfA transzkripció faktor kódolja a *F. verticillioides* genomjában.

A törzsekből a 3.2.1. alfejezetben ismertetett módon genomi DNS-t izoláltunk, amelynek mennyiségét NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg. Az ismert koncentrációjú DNS mintákból felező hígítást készítettünk oly módon, hogy 320, 160, 80, 40, 20 ng/ 7 µl koncentrációjú hígítást kapjunk.

A 96 lyukú PCR-lemez egy-egy furatába a következő reakciót mértük össze:

- Templát DNS	7 µl
- Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies)	10 µl
- forward primer	0,4 µl
- reverse primer	0,4 µl
- dH ₂ O	2,2 µl

Minden koncentráció és primer pár esetén három ismétlést végeztünk a Lightcycler® 480 készüléken (Roche).

A qPCR lépései a következők voltak:

95 °C	2 perc	
95 °C	5 másodperc	} 40×
51 °C	10 másodperc	
65 °C	20 másodperc	
95 °C	15 másodperc	
51 °C	15 másodperc	
95 °C	folyamatos	
37 °C	1 másodperc	

A kópiaszám meghatározásához felhasznált primerpárok és azok szekvenciái az M3. mellékletben találhatóak.

A kópiaszám meghatározásához a genomi DNS-ek koncentrációinak tízes alapú logaritmusát ábráztuk a C_T értékek függvényében Microsoft Excel programot használva, majd a kapott pontdiagramon az adatpontokra lineáris trendvonalat illesztettünk, így megkapva a lineáris regressziós egyenes egyenletét és determinációs együtthatóját (R^2):

$$C_T = m (\log_{10} \text{koncentráció}) + b$$
$$y = mx + b$$

Abban az esetben, ha a determinációs együttható értéke $R^2 > 0,98$ volt, a kópiaszámot az abszolút kvantifikáció módszerével meghatároztuk:

$$\text{vizsgált gén teljes kópiaszáma} = 10^{((C_T - b)/m)}$$

Ahol,

- C_T jelöli azt a ciklusszámot, ahol az egyes furatokban mért fluoreszcencia mértéke átlépte a küszöbértéket,
- b a hígítási sor C_T értékei alapján kapott kétismeretlenes egyenlet y tengelyének metszéspontja,
- m a meredeksége.

Az *FvatfA* gén kópiáját a genomban a következő egyenlet alapján számoltuk ki:

$$\text{FvatfA kópiája a genomban} = (\text{FvatfA teljes kópiaszám}) / (\text{FvmnSOD teljes kópiaszám}).$$

Az *FvmnSOD* gén kópiáját a genomban a következő egyenlet alapján számoltuk ki:

$$\text{FvmnSOD kópiája a genomban} = (\text{FvmnSOD teljes kópiaszám}) / (\text{FvatfA teljes kópiaszám}).$$

3.8. A törzsek növekedésének vizsgálata

A törzsek növekedésének vizsgálatához a 7 napos Czapek-Dox agarlemezekre leoltott telepeket steril spóramosó oldat segítségével lemostuk, a spóraszuszpenziót átszűrtük 2 réteg Miracloth-on, majd a spóraszuszpenziók koncentrációját Bürker-kamra segítségével beállítottuk 2×10^7 /ml-re. 5 μ l spóraszuszpenziót inokuláltunk pontszerűen Czapek-Dox vagy PDA tápagarokra, ezt követően a Petri-csészéket 6 napig inkubáltuk 25 °C-on. A telepek átmérőjét vonalzó segítségével lemértük, majd pedig fényképet készítettünk minden csészéről. Három biológiai ismétlést készítettünk, egyenként 4 párhuzamossal, az egyes ismétlésekből származó átlagokkal számoltunk tovább a statisztikai elemzésnél.

3.9. A spórák méretének, termelésének és életképességének meghatározása

A spórák méretét a következőképpen határoztuk meg:

Czapek-Dox agarlemezekre leoltott 7 napos tenyészetekről a spórákat steril desztillált vízzel lemostuk, majd a spóraszuszpenziót átszűrtük 2 réteg Miracloth-on. Thoma sejtszámláló kamra segítségével mikroszkópi felvételeket készítettünk 400 \times nagyítás mellett. A spórák hosszát és átmérőjét az ImageJ program segítségével határoztuk meg. 3 biológiai ismétlést készítettünk, egyenként 100 spórárt lemérve; az egyes ismétlésekből származó átlagokkal számoltunk tovább a statisztikai elemzésnél.

A spóra termelőképeség vizsgálatát Shim és munkatársai (2006) cikke alapján készítettük el a következő módon:

Czapek-Dox agarlemezekre leoltott 7 napos tenyészetekből etanollal sterilizált dugófűrő segítségével 8 mm átmérőjű agardugót készítettünk, amit steril oltótű segítségével 1,5 ml-es centrifugacsőbe helyeztünk át, amelybe előzőleg 1 ml steril desztillált vizet pipettáztunk. Vortexelést követően Bürker-kamra segítségével leszámoltuk a keletkezett spóraszuszpenzió koncentrációját.

A spórák életképességének vizsgálatát Choi és Xu (2010) cikke alapján végeztük el:

Czapek-Dox agarlemezekre leoltott 7 napos tenyészetekről a spórákat steril desztillált vízzel lemostuk, majd a spóraszuszpenziót átszűrtük 2 réteg Miracloth-on, ezt követően a spóraszuszpenzió koncentrációját Bürker-kamra segítségével beállítottuk 1×10^3 db/ml-re. A spóraszuszpenziókat 25, 42 és 45 °C-on inkubáltuk 60 percig, vagy 4 °C-on 7 napig, ezt követően 100 μ l-t szélesztettünk steril üvegbot segítségével Czapek-Dox agarlemezekre. 2 nap, 25 °C-on történő inkubálást követően a kinőtt telepeket leszámoltuk. Három biológiai ismétlést végeztünk,

egyenként három párhuzamossal; az egyes ismétlésekből származó átlagokkal számoltunk tovább a statisztikai elemzésnél.

3.10. A törzsek stresszérzékenységének vizsgálata

A stresszkísérleteinkben az alábbi stresszágenset adtuk hozzá a táptalajhoz a megadott tartományon belüli végkoncentrációkat elérve (100 ml-ben):

- NaCl	0,1 M – 1,5 M
- KCl	0,1 M – 1,5 M
- Szorbit	0,1 M – 2 M
- CdCl ₂	0,1 mM – 0,4 mM
- Kongóvörös	5 μM – 25 μM
- tBOOH	0,2 mM – 0,8 mM
- MSB	0,2 mM – 1,4 mM
- H ₂ O ₂	10 mM – 50 mM
- Diamid	0,1 mM – 1 mM

A stresszorokat 100 ml Czapek-Dox táptalajba mértük be, amelyet előzőleg 55 °C-ra temperáltunk, majd 8,5 cm átmérőjű Petri-csészébe öntöttük. A tápagar dermedése után a lemosott és leszámolt spórákból 2×10^7 db/ml spórakoncentrációjú spóraszuszpenzióból 5 μl-t pontinokuláltunk a tápagarra. A mintákat 25 °C-on, 6 napon át inkubáltuk, majd ezt követően a növekedés mértékét vonalzó segítségével lemértük, továbbá fényképet készítettünk a csészékről.

3.11. A törzsek PAF érzékenységének vizsgálata

A *Penicillium chrysogenum* antifungális fehérje (PAF) hatását az alábbi módon vizsgáltuk: Czapek-Dox táptalajhoz annyi PAF-ot adtunk hozzá, amellyel 100, illetve 200 μg/ml végkoncentrációt értünk el, majd a táptalajt 12 lyukú lemez egyes lyukaiba pipettáztuk. A 7 napos telepekről spóramosó oldattal lemosott friss mikrokonídiumokból 1×10^5 db/ml koncentrációjú spóraszuszpenziót készítettünk, amelyből 5 μl-t pontinokuláltunk az egyes vályatokba. Az inokulációt követően 72 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk a lemezeket, majd vonalzó segítségével lemértük a telepek átmérőjét és fényképet készítettünk az egyes telepekről.

3.12. Szekunder metabolitok termelése

3.12.1. Fumonizin B1 és B2 termelés mérése

Tenyésztési körülmények:

Az általunk vizsgálni kívánt törzseket 7 napos tenyészetekről steril desztillált vízzel lemostuk, a spóraszuszpenzió koncentrációját Bürker–kamra segítségével meghatároztuk, majd beállítottuk 1×10^8 db/ml-re. A módosított Myro táptalajból (Han és munkatársai, 2014) sterilizést követően hatlyukú lemez lyukaiba 5 ml-t mértük ki osztott pipetta és pipettor segítségével, ezután a vizsgált törzsek spóraszuszpenziójából 50 μ l-t adtunk hozzá minden wellhez. A tenyészeteket megvilágítás nélküli termosztátban 25 °C-on két hétig inkubáltuk felületi kultúrát létrehozva.

Mintavételezés:

A felületi kultúrákból származó micéliumot az inkubálási idő végén centrifugálással összegyűjtöttük (4200 rpm, 10 perc, 4 °C), a fermentlevet pipettával leszívtuk, térfogatát feljegyeztük, az összegyűjtött micéliumot ismert tömegű 1,5 ml centrifugacsövekbe mértük át, majd ezt követően a biomassza mennyiségét liofilizálást követően meghatároztuk. A fermentleveket és a liofilizált micéliumot felhasználásig fagyasztóban -20 °C-on tároltuk.

Mintaelőkészítés:

A liofilizált micéliumokból a fumonizineket a következőképpen extraháltuk: minden mintához 100 mg mennyiségű előkészített, sterilizált kvarchomokot (0,2-0,8 mm átmérőjű), valamint 500 μ l acetonitril:víz 50:50 + 1% hangyasav keverékét adtunk a mintákhoz, amelyeket Roche MagNA Lyser készülék segítségével (30 mp, 5000 rpm) feltártunk. Centrifugálást (5 perc, 13200 rpm, 4 °C) követően a felülúszókat új csövekbe mértük.

A fermentlevekből 600-600 μ l-t 1,5 ml centrifugacsövekbe pipettáztunk, majd 5 perc, 13200 rpm-en, 4 °C-on történő centrifugálást követően 500 μ l-t új csövekbe mértünk át.

CE-MS meghatározás:

A minták fumonizin tartalmának meghatározását a Debreceni Egyetem TTK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén Dr. Kecskeméti Ádám és Prof. Dr. Gáspár Attila végezte el kapilláris elektroforézis-tömegspektrométer segítségével (Kecskeméti és munkatársai, 2020). A kapott mérési eredményeket a biomasszára normalizáltuk, majd ezt követően átlagoltuk.

3.12.2. Bikaverin termelés mérése

Tenyésztési körülmények:

Az általunk vizsgálni kívánt törzseket 7 napos tenyészetekről steril desztillált vízzel lemostuk, a spóraszuszpenzió koncentrációját Bürker-kamra segítségével meghatároztuk. A bikaverin termeltető táptalajba (Bell és munkatársai, 2003) 100 ml-ként minden törzs esetében 1×10^8 db spórát oltottunk le a lombikokba. Rázógépben 28 °C-on, 200 rpm-en 5-7-9 napig inkubáltuk a rázatott tenyészeteket.

Mintavételezés:

Az 5-7-9 napig történő inkubálást követően a tenyészetek biomasszájának meghatározásához a tenyészetekből 5 ml-t zsugorított üvegszűrőre helyezett ismert tömegű szűrőpapíron vákuum segítségével átszűrtünk, majd 3 napon keresztül súlyállandóságig történő szárítást követően tömegüket visszamértük, a biomassa mennyiségét kiszámítottuk.

A biomassa meghatározáshoz történő mintavételezést követően a maradék tenyészet térfogatát mérőhenger segítségével lemértük és feljegyeztük, majd 50 ml-es centrifugacsőben jelre (50 ml) töltöttük, ezt követően lecentrifugáltuk 4 °C-on, 4200 rpm-en 10 percen keresztül. A felülúszót új csőbe, a micéliumot 15 ml-es centrifugacsőbe mértük át, a mintákat felhasználásig - 20 °C-on tároltuk.

Bikaverin koncentráció meghatározása:

A bikaverin koncentrációját Bell és munkatársai (2003) által ismertetett módon spektrofotometriásan 500 nm-en határoztuk meg. A bikaverin standardot DMSO-ban oldottuk fel, majd ismert koncentrációjú kalibráló sorból kalibráló egyenest (0.488–125 µg/ml) készítettünk, amelyhez viszonyítva a minták koncentrációját kiszámítottuk.

A kapott mérési eredményeket a biomasszára normáltuk, majd ezt követően átlagot és szórást számítottunk.

3.12.3. Karotinoidok termelésének mérése

Tenyésztési körülmények:

Az általunk vizsgálni kívánt törzseket 7 napos tenyészetekről steril desztillált vízzel lemostuk, a spóraszuszpenzió koncentrációját Bürker-kamra segítségével meghatároztuk. A DG minimál táptalajba (Avalos és munkatársai, 1985; Davis és munkatársai, 1970; Hornero-Méndez és munkatársai, 2018) 100 ml-ként 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban minden törzs esetében

1×10^8 db spórát oltottunk le. Rázógépben 25 °C-on, 150 rpm-en 7 napig inkubáltuk a tenyészeteket fehér fényű fénycsöveket tartalmazó fénypanel alatt ($80 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényáram mellett).

Mintavételezés:

Az 7 napig történő inkubálást követően a tenyészetek biomasszájának meghatározásához a tenyészetekből 5 ml-t zsugorított üvegszűrőre helyezett ismert tömegű szűrőpapíron vákuum segítségével átszűrtünk, majd 3 napon keresztül súlyállandóságig történő szárítást követően tömegüket visszamértük, a biomassza mennyiségét kiszámítottuk.

A biomassza meghatározáshoz történő mintavételezést követően a maradék tenyészet térfogatát mérőhenger segítségével lemértük és feljegyeztük, majd a micéliumot 2 réteg Miracloth segítségével összegyűjtöttük 15 ml-es centrifugacsövekbe, ezt követően pedig liofilizáltuk őket.

Karotinoid koncentráció meghatározása

A liofilizált micéliumokból a karotinoidok meghatározását a következőképpen végeztük: 100 mg elporított micéliumot 100 mg steril kvarchomokot tartalmazó sejtfeltárási csövekbe mértünk, majd ezt követően 1 ml acetont adtunk minden mintához. A mintákat Beadbeater készülék segítségével feltártuk. Centrifugálást (13000 rpm, 5 perc) követően a felülúszókat csiszolatos gömblombikokba mértük át, amelyeket bepárolásig sötétben tároltunk. A procedúrát addig ismételtük, amíg a micélium elfehéredett. Az így kapott acetonos mintákat 40 °C-on bepároltuk majd a mintákat visszavettük 2 ml petroléterben (40/70). Izzított Al_2O_2 -ből üveg fecskendőben oszlopot készítettünk, majd a petroléterben visszavett mintát a megnedvesített oszlopra felvittük, ezt követően a karotinoidokat 10 ml petroléterrel eluáltuk. Az eluátum abszorbanciáját spektrofotométer segítségével üveg küvettában 450 nm-en meghatároztuk.

A karotintartalmat (x_1) a következő összefüggéssel számítottuk ki és $\mu\text{g}/\text{mg}$ -ban kaptuk meg:

$$x_1 = \frac{A \times V_1 \times V_2 \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times V_3 \times m}$$

Ahol,

A	az eluátum abszorbanciája;
$A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$	(a β -karotin extinkciós koefficiense petroléterben)
V_1	az eluátum térfogata;
V_2	az extraktum teljes térfogata;
V_3	az oszlopra vitt alikvot rész térfogata;
m	a meghatározott bemért minta tömege.

A kapott mérési eredményeket a biomasszára normalizáltuk, majd ezt követően átlagot és szórást számítottunk.

3.13. Gének relatív expressziójának meghatározása qRT-PCR segítségével

A szekunder metabolitok, így a fumonizinek, karotinoidok és a bikaverin bioszintézisében részt vevő gének expresszióját RT-qPCR segítségével mértük meg.

Az RNS izoláláshoz szükséges micéliumot a 3.12. alfejezetben már ismertetett különféle táptalajokon növesztettük fel, felhasználásig -70 °C-on tároltuk őket:

- A *fum1*, *fum8* és *fum21* gének expressziós szintjeinek méréséhez módosított Myro táptalajra oltott 14 napos felületi kultúrából gyűjtöttük össze.
- A *carRA*, *carB* és *carT* gének expressziós szintjeinek méréséhez a törzseket DG táplevesbe oltottuk be, majd 4 napon keresztül sötétben rázattuk a tenyészeteket, majd a biomasszát 2 óra megvilágítás után gyűjtöttük össze (Ádám és munkatársai, 2011).
- A *bik1* gén expressziós szintjének méréséhez a törzseket bikaverin termelést indukáló táptalajba oltottuk be, majd a rázatott tenyészetek biomasszáját 3 illetve 5 nap inkubálást követően gyűjtöttük össze.

A liofilizált micéliumokból az RNS-t a 3.2.2. alfejezetben ismertetett módon izoláltuk, majd az RNS minták mennyiségét NanoDrop segítségével lemértük és agaróz gélelektroforézissel minőségüket ellenőriztük.

Az RT-qPCR előtt a mintákat DNS mentesítettük, amelyhez DNase I Amplification Grade Kitet (Sigma) használtunk. Az RT-qPCR reakcióhoz a Xceed qPCR SG 1-step Kit-et (IAB) használtuk, minden reakció 500 ng RNS-t tartalmazott.

A 96 lyukú PCR-lemez egy-egy furatába a következő reakciót mértük össze:

- | | |
|---------------|-------|
| - Templát RNS | 5 µl |
| - Master Mix | 10 µl |
| - primer mix | 4 µl |
| - enzim | 1 µl |

Minden vizsgált gén esetén három ismétlést végeztünk a Lightcycler® 480 készüléken (Roche).

Az RT-qPCR lépései a következők voltak:

45 °C	10 perc	
95 °C	2 perc	
95 °C	5 másodperc	} 40×
51 °C	10 másodperc	
65 °C	30 másodperc	
95 °C	15 másodperc	
51 °C	15 másodperc	
95 °C	folyamatos	
37 °C	1 másodperc	

Minden RNS mintában mértük a *tef1* (FVEG_02381) gén expressziós szintjeit is, amelyet referenciagénként használtunk fel. A relatív expressziós szintek kiszámításához a “delta módszert” használtuk:

$$\Delta C_T = C_T \text{referencia gén} - C_T \text{vizsgált gén}$$

Ahol C_T jelöli azt a ciklusszámot, ahol az egyes furatokban mért fluoreszcencia mértéke átlépte a küszöbértéket.

A relatív expressziós szinteket a *tub2* (FVEG_04081), *cyp2* (FVEG_00403) referenciagénekkel is kiszámítottuk, hasonló eredménnyel.

3.14. Inváziós növekedés vizsgálata paradicsombogyón

Az inváziós növekedés vizsgálatát paradicsombogyókon vizsgálatuk (Di Pietro és munkatársai, 2001) felületi sterilizálást követően, amelyeket Czapek-Dox agaron növekvő tenyészetekből származó 6 mm agarkorongokkal inokuláltunk. 25 °C-on, 100% relatív páratartalom mellett inkubáltuk a fertőzött terméseket. 72 és 96 órával az inokuláció után lemértük a kinőtt telepek átmérőjét.

3.15. A törzsek szexuális szaporodásának vizsgálata

A deléciós és komplementált törzsek vad típusú törzssel való szexuális párosodási képességét sárgarépás tápagon vizsgáltuk (Klittich és Leslie, 1988). A vizsgálni kívánt törzseket répás tápagon tartalmazó Veg-Boxokba oltottuk le (100 x 70 x 65). Hím partnerként Czapek-Dox agarról lemosott konídiumszuszpenziót használtunk, amit összekevertünk a sárgarépás táptalajon kinőtt micéliummal. A keresztezés után a törzseket 20/24 °C-on inkubáltuk 5-6 héten át, 12 órás sötét periódust, 12 órás megvilágítottal váltogatva, amelyet fehér fénycső és sötétkék fluoreszcens lámpával biztosítottunk. Teszter törzsként a *F. verticillioides* FGSC 7603 törzset használtuk.

3.16. A törzsek légzésének vizsgálata

A törzsek légzését exponenciális növekedési fázisban lévő süllyesztett kultúrából származó micéliumokban Oxigraph O₂ elektródot felhasználva (Oxylab 2, Hansatech Instruments Ltd, UK) 25 °C-on Dr. Oláh Viktor egyetemi adjunktus (Debreceni Egyetem TTK Növénytan Tanszék) és Dr. Leiter Éva egyetemi docens (Debreceni Egyetem TTK Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék) vezetésével mértük le. Az teljes, citokróm c-függő KCN-szenzitív, alternatív oxidáz-függő (KCN-rezisztens, SHAM-érzékeny) és reziduális (KCN+SHAM-rezisztens) légzéseket határoztunk meg. A citokróm c-függő útvonal, valamint az alternatív oxidáz

légzéseket 1,0 mM KCN és 5,0 mM SHAM koncentrációkat felhasználva gátoltuk (Leiter és munkatársai, 2016; Medentsev és munkatársai, 2002). A KCN-érzékeny és alternatív-oxidáz-függő légzéseket a következőképpen számoltuk ki: az összes légzésből kivontuk a KCN-rezisztens, vagy a KCN+SHAM-rezisztens reziduális légzések értékeit (Leiter és munkatársai, 2016).

3.17. A mitokondriumok morfológiájának vizsgálata

A mitokondriumok morfológiáját Dr. Leiter Éva egyetemi docens (Debreceni Egyetem TTK Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék), valamint Dr. Dienes Beatrix tudományos főmunkatárs (Debreceni Egyetem ÁOK Élettani Intézet) határozták meg. A Czapek-Dox táptalajba leoltott (10^3 - 10^4 spóra/ml) konídiumokat fedőlemezekon történő 20–24 h inkubálás után festették 30 nM MitoTracker Green festékkel 30 percig, 2.5 nM dihidroetídiummal 20 percig, valamint 2.5 nM Calcofluor White festékkel 5 percig láthatóvá téve a mitokondriumokat, az intracelluláris szuperoxid gyököket és a sejtfalban található kitint. Ezt követően a fedőlemezekon található megfestett micéliumokról mikroszkópi felvételeket készítettek egy konfokális lézer szkennig LSM 880 mikroszkópot (Zeiss, Jena, Germany) felhasználva (Leiter és munkatársai, 2016). A háromcsatornás Z-stack felvételeken a zöld csatorna a MitoTracker Green festékkel festett mitokondriumokat, a piros csatorna a DHE festett szuperoxid gyököket, míg a kék csatornán a CFW segítségével láthatóvá tett hifák szerkezete, valamint a szegmensek határai voltak megfigyelhetőek. A mitokondriumok térfogatfoglalása, a relatív szuperoxid mennyisége (szuperoxid térfogata {a képződő etídium szignállal arányos} a mitokondriumok százalékos térfogatára normálva), továbbá a második hifaszegmens átmérője a Leiter és munkatársai (2016) által közölt módszerek szerint volt meghatározva.

3.18. Bioinformatikai vizsgálatok

3.18.1. Páronkénti szekvencia illesztés és filogenetikai fa készítése

Az FvAtfA fehérje szekvenciáját az NCBI *F. verticillioiges* FGSC 7600 online adatbázisából töltöttük le. A más fajokban található ortológ szekvenciákat az NCBI adatbázisából BLAST homológia kereséssel kerestük meg, a blastp algoritmust használva (McGinnis és Madden, 2004). Az aminosavszekvenciák többszörös szekvencia illesztését a MEGA MUSCLE algoritmussal (Kumar és munkatársai, 2018) végeztük a MEGA X programot használva (<https://www.megasoftware.net/>), ahol a gap open penalty értékét -10-re állítottuk. Az így kapott illesztett szekvenciákat a TrimAI program segítségével trimmeltük, ahol módszerként a program

által felkínált automated1-t alkalmaztuk (<http://phylemon2.bioinfo.cipf.es/utilities.html>). Az evolúciós távolságokat Maximum Likelihood módszerrel és a JTT mátrix alapú modell (Jones és munkatársai, 1992) segítségével határoztuk meg az IQ-TREE szervert (Trifinopoulos és munkatársai, 2016) használva (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>). A kapott filogenetikai fát az iTOL segítségével ábrázoltuk és szerkesztettük (<http://itol.embl.de/>).

Az FvAtfA fehérje molekulatömegét és izoelektromos pontját az Isoelectric Point Calculator (Kozlowski, 2016; <http://isoelectric.org/calculate.php>) segítségével határoztuk meg.

Az uniprot.org InterPro annotation által a vizsgált fehérjeszekvenciákban megadott bZIP domének szekvenciáit az NCBI Constraint-based Multiple Alignment Tool-lal illesztettük, majd a hasonló tulajdonságokkal rendelkező aminosavakat a RasMol Amino Acid Colors beállítás segítségével vizualizáltuk (Ray, 2005).

3.18.2. Promoter analízis

A fumonizinek, a bikaverin és a karotinoidok bioszintézisében résztvevő vizsgált gének szekvenciáit a 2 kb 5'-upstream régiók szekvenciáival együtt az NCBI *F. verticillioides* FGSC 7600 adatbázisából töltöttük le. A gének transzkripciós start helyét, poliadenilációs szignálját és a translációs start helyét az FGENESH pipeline segítségével határoztuk meg, paraméterként a „generic *Fusarium*-specific gene finding”-ot állítottuk be (Solovyev és munkatársai, 2006). (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>).

Az ATF/CREB fehérjecsaldába tartozó transzkripciós faktorok képesek felismerni és bekötődni a CRE (TGACGTCA) konszenzus szekvenciát is tartalmazó DNS szakaszokhoz (Loeken, 1993; Kvietikova és munkatársai, 1995; Sakamoto és munkatársai, 2008; Hong és munkatársai, 2013a). A promóter régiókat Wolf és munkatársai (2016) cikkében meghatározott paraméterek szerint definiáltuk:

- A transzkripciós start helytől számított 5'-upstream –1000 bp, downstream +50 bp-t,
- Amennyiben az intergenikus régió kisebb volt, mint 1000 bp, úgy a transzkripciós starthelytől az 5'-upstream szakasz végét, valamint downstream +50 -t tekintettük promóter régiónak.

A lehetséges transzkripciós faktor kötőhelyeket a promóter régiókban, valamint a transzkripciós start hely és a translációs starthely közötti át nem íródó 5' szakaszokban kerestük (Roze és munkatársai, 2011; Hong és munkatársai, 2013a). Az ATF/CREB promóter kötőhelyeket az online elérhető PROMO version 3.0.2. programmal (Messeguer és munkatársai, 2002; Farré és munkatársai, 2003) kerestük, amely a kötőhelyeket a TRANSFAC 8.3 adatbázisát alapul véve keresi meg (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3). A

maximum matrix különbség értékét a PROMO-ban 15%-ra állítottuk, valamint a keresésnél az „all factors” and „all species” beállítást használtuk.

3.19. Az adatok statisztikai kiértékelése

A disszertációban minden kísérlet esetén 3-5 független mérés átlagát és annak szórását tüntettem fel.

A törzsek átlagértékei közötti eltérések kimutatására a vegetatív növekedés, spóratermelés, spóra életképesség, spórák mérete, szekunder metabolitok termelése, génexpressziós vizsgálatok esetében egyutas ANOVA-t valamint Tukey’s post-hoc tesztet végeztünk az R statisztikai programcsomag “anova” and „tukeyHSD” funkcióit felhasználva (<http://www.R-project.org/>).

A törzsek stressz, valamint PAF érzékenységének vizsgálatokor a relatív növekedések közötti eltérések kimutatására egyutas ANOVA-t (amely után Tukey’s post-hoc tesztet végeztünk), vagy a törzsek kezelt és kezeletlen telepátmérőinek esetében kétutas ANOVA-t alkalmaztunk (amely után Tukey’s post-hoc tesztet végeztünk).

A törzsek közötti teljes eltérést főkomponens analízissel vizsgáltuk, amelyet az R statisztikai programcsomag “prcomp” funkciójával számítottunk ki.

3.20. Felhasznált vegyszerek

A kísérletek során felhasznált vegyszerek, – amennyiben az a disszertációban másképpen nincs jelölve – a Sigma-Aldrich Kft. és a WVR Kft. analitikai tisztaságú termékei voltak.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. A *F. verticillioides* *FvatfA* génje

4.1.1. Az *FvatfA* gén molekuláris jellemzése

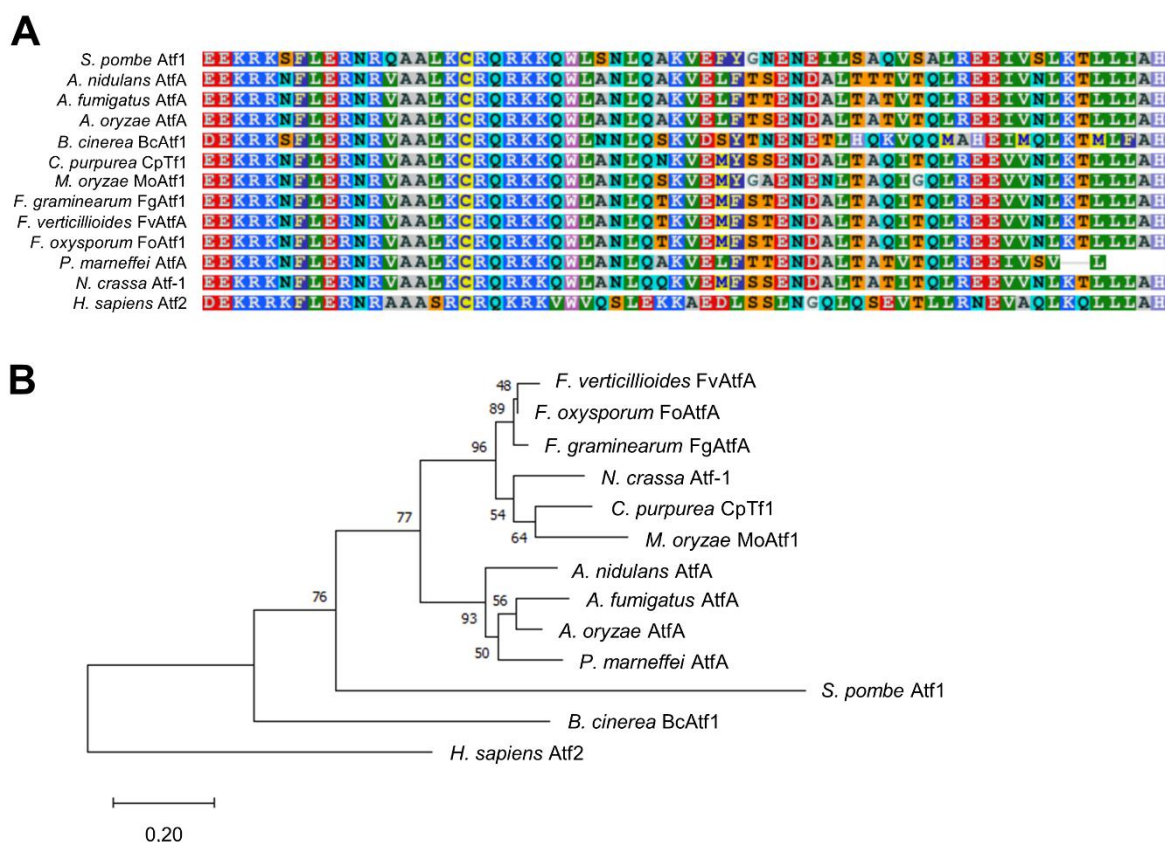
Az *A. nidulans* AtfA (lókusz ID: AN2911) bZIP típusú transzkripciós faktor ortológját *F. verticillioides*-ben az NCBI blastp algoritmus segítségével kerestük meg. A beazonosított *FvatfA* fehérjét kódoló gén a szekvenált *F. verticillioides* FGSC 7600 törzs genomjában az FVEG_02866 lókuszban található. A gén hossza 5384 bp, és egy 384 aminosavból álló fehérjét kódol. Az FvAtfA transzkripciós faktor *in silico* megállapított molekulatömege 41 kDa, míg izoelektromos pontja pH 8,7.

6. táblázat A *F. verticillioides* FvAtfA ortológ fehérjék különféle fajokban

Fajok	Az FVEG_02866-hoz viszonyított blastp E értéke	A fehérje neve	Az NCBI hozzáférési kódja
<i>Fusarium verticillioides</i>	0.0	FVEG_02866 hipotetikus fehérje (FvAtfA)	XP_018746682.1
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	0.0	FoAtf1 (Qi és munkatársai, 2013)	TVY66251.1
<i>Fusarium graminearum</i>	0.0	FgAtf1 (Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015)	XP_011319081.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	3e-96	AtfA (Hagiwara és munkatársai, 2008; Balázs és munkatársai, 2010)	ACJ61780.1
<i>Aspergillus oryzae</i>	3e-96	AtfA (Sakamoto és munkatársai, 2009)	XP_001819834.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2e-102	AtfA (Hagiwara és munkatársai, 2014)	XP_754486.2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1e-33	Atf1 (Takeda és munkatársai, 1995)	BAA12194.1
<i>Homo sapiens</i>	4e-21	ATF-2 (Venter és munkatársai, 2001)	EAX11109.1
<i>Claviceps purpurea</i>	4e-149	CPTF1 (Nathues és munkatársai, 2004)	CCE33955.1
<i>Magnaporthe oryzae</i>	8e-122	Moatf1 (Guo és munkatársai, 2010)	XP_003715195.1
<i>Botrytis cinerea</i>	6e-32	BcAtf1 (Temme és munkatársai, 2012)	CCD34747.1
<i>Penicillium marneffei</i>	6e-87	AtfA (Nimmanee és munkatársai, 2014)	XP_002143956.1
<i>Neurospora crassa</i>	9e-147	ATF-1 (Colot és munkatársai, 2006)	XP_011394512.1

A 6. táblázatban számos más fajból származó, a szakirodalomban fellelhető homológ fehérjék FvAtfA-hoz viszonyított homológia értékeit, valamint NCBI hozzáférési kódjait tüntettem fel. A

fehérjék elnevezései a funkciójukat leíró, zárójelben hivatkozott dolgozatokból származnak. A *F. verticillioides* FvAtfA 98,7, 91,7, illetve 52,6%-os hasonlóságot mutat a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* FoAtf1, a *F. graminearum* FgAtf1, illetve az *A. nidulans* AtfA fehérjével.



9. ábra Többszörös szekvenciaillesztés és filogenetikai fa a különféle AtfA/Atf1 bZIP típusú transzkripciós faktorokból származó aminosav szekvenciák alapján. A rész: a bZIP domének szekvenciaillesztése és vizualizálása a Rasmol Amino Acid Colors segítségével. B rész: a teljes aminosavszekvenciák alapján elkészített filogenetikai fa.

Az FvAtfA fehérjében is megtalálható a bZIP domén, amelyet a fehérjeszekvencia 269-332 aminosavai alkotnak. A 9. ábra A részében a 6. táblázatban már felsorolt fajokban megtalálható FvAtfA ortológ fehérjék bZIP doménjeinek szekvenciáit többszörösen illesztve, a hasonló tulajdonságú aminosavakat a RasMol Amino Acid Colors beállítás segítségével vizualizáltam. A bZIP domén jól jellemzett motívum az eukarióta proteinekben (Landschulz és munkatársai, 1988; Pabo és Sauer, 1992). A bZIP domén bázikus régiója lizinben és argininben gazdag; ez a domén lép interakcióba a DNS kettős spirál nagy árkával. A cipzár régió 30-40 aminosavból álló amfipatikus hélix, amelyben megközelítőleg minden hetedik aminosav lizin. Az ábrán jól látható, hogy az FvAtfA bZIP doménje nagy hasonlóságot mutat a már korábban vizsgált, ismert funkciójú FvAtfA homológ fehérjék doménjeivel. A fehérjék teljes aminosav szekvenciái alapján az evolúciós távolságokat Maximum Likelihood módszerrel és a JTT mátrix alapú modell

segítségével határoztuk meg, az így létrehozott filogenetikai fát a 9. ábra B része tünteti fel. Amint az a nagyfokú hasonlóság alapján várható volt, a *F. verticillioides* FvAtfA fehérjéje közel azonos pozíciót foglal el a *F. oxysporum* FoAtf1 és a *F. graminearum* FgAtf1 fehérjékkel.

4.1.2. Az *FvatfA* gén inaktiválása

Az előzőekben azonosított *FvatfA* gén funkciójának azonosításához elindítottuk a deléciós törzs létrehozását.

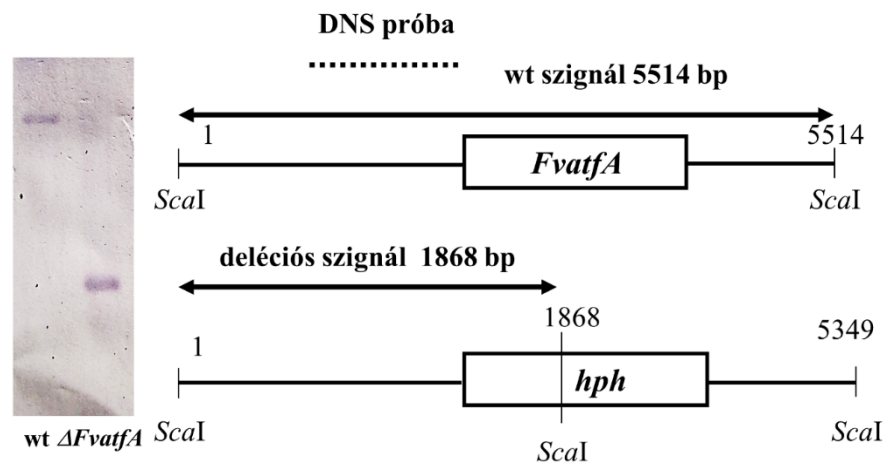
4.1.2.1. Az *FvatfA* deléciós konstrukció létrehozása és transzformálása a *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsbe

Az *FvatfA* gént specifikusan elrontottuk. Ehhez a géndeléciós kazettát double-joint PCR (Yu és munkatársai, 2004) segítségével hoztuk létre, amelyben az *FvatfA* ORF-t a higromicin foszfortranszferáz enzimet kódoló *hph* génre cseréltük. Az első kör PCR során külön csövekben a gén előtti upstream és a gén utáni downstream szakaszokat, valamint a *hph* kazettát szaporítottuk fel, amelyeket a második, úgynevezett joint PCR során egy csőben összemérve az átfedő régiók segítségével szereltünk össze. A PCR harmadik körében a nested primerpár segítségével szaporítottuk fel a géndeléciós kazettát, amellyel a protoplasztokat transzformáltuk. A higromicinre rezisztens transzformáns telepek 7-15 nap elteltével jelentek meg a regeneráló csészéken, ekkor átoltottuk őket 100 µg/ml higromicin B-t tartalmazó Czapek-Dox táptalajra. Összesen 65 db transzformánst kaptunk.

4.1.2.2. A transzformánsok ellenőrzése

Az átoltást követően a transzformáns telepekből genomi DNS-t izoláltunk, majd PCR segítségével az *FvatfAupfwd* és *FvatfAdownrev* primerpár felhasználásával próbáltuk a kettős homológ rekombinációt kiszűrni. Az így kapott PCR terméket *EcoRV* és *NdeI* restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd a vad típusú gén és a géndeléciós kazetta eltérő emésztési mintázatát 0,6% agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A géndeléciós kazetta emésztési mintázatát mutató telepből származó genomi DNS felhasználásával Southern blot analízist végeztünk, amellyel igazoltuk a géndeléciós kazetta megfelelő helyre történő egyszeres beépülését (10. ábra). A potenciális deléciós mutáns, valamint a vad típusú törzsből származó genomi DNS-t a *ScaI* restrikciós endonukleázzal emésztettük, próbaként a gén előtti 5' szakaszt használtuk fel, amelyet az *FvatfAupfdw* és az *FvatfAupkimrev* primerpár segítségével szaporítottunk fel, majd DIG-gel jelöltünk és tettük láthatóvá. Az *FvatfA* próbával a vad típusnak egy hosszabb, 5514 bp hosszúságú fragmentumot kellett adnia, míg a deléciós mutáns egy rövidebb, 1868 bp hosszúságú

fragmentumot adott, amelyet a *hph* kazetta beépülésével a lókuszon létrejövő új *ScaI* hasítóhely okozott.



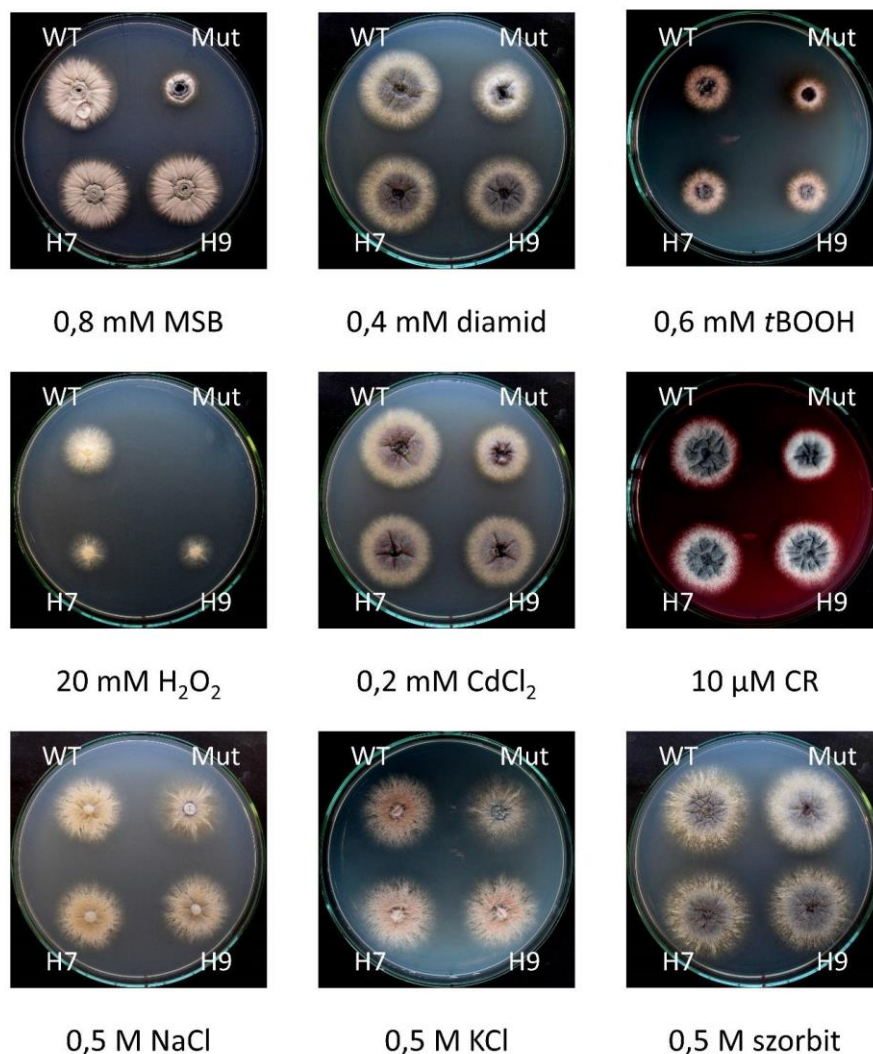
10. ábra Az *FvatfA* gén inaktiválása. Az ábrán a körülbelül 5,5 kb hosszúságú *FvatfA* gént tartalmazó genomi régió látható a *ScaI* restriktív endonukleáz hasítóhelyeivel a vad típusú FGSC 7600 és $\Delta FvatfA$ deléciós mutánsban. A szaggatott vonal a DNS próbát jelöli, amely hibridizálódva a vad típusú törzsből egy 5514 bp hosszúságú, míg a deléciós mutánsban egy 1868 bp hosszúságú jelet adott. Jelölések:
wt: vad típus, *hph*: higromicin foszfotransferáz gén

A Southern blot hibridizáció igazolta, hogy (1) a $\Delta FvatfA$ törzs a molekuláris technikával elrontott *FvatfA* gént hordozza és (2) a géndeléciós kazetta a kettős homológ rekombináció során jó helyre, egyszerűen épült be. Mindez lehetővé teszi a kísérletek során a vad típusú törzssel összehasonlítva az *FvatfA* gén funkcionális jellemzését.

4.1.2.3. Az *FvatfA* gén hiányának komplementálása

Annak érdekében, hogy a továbbiakban igazolni tudjuk, hogy a kísérletek során kapott fenotípusok az *FvatfA* gén hiányából erednek, szükség volt a helyreállításra, azaz az ép *FvatfA* gént tartalmazó komplementált törzsek létrehozására. A komplementáló kazettát single-joint PCR segítségével hoztuk létre, amelynek során az *FvatfA* ORF-t a promotor és terminátor régióikkal együtt amplifikáltuk az *FvatfAcompkimfwd* és *FvatfAcomprev* primerpár segítségével, majd a genecin foszfotransferáz enzimet kódoló *gen* génhez fúzionáltattunk az átfedő szakasz segítségével. Az így létrehozott komplementáló kazettával a $\Delta FvatfA$ törzsből létrehozott

protoplasztokat transzformáltuk, majd geneticint és higromicint is tartalmazó regeneráltató csészékre szélesztettük. A megjelenő transzformánsokat több lépcsős ellenőrzésnek vetettük alá.



11. ábra Az *FvAtfA* komplementált törzsek fenotípusos helyreállításának vizsgálata különféle stresszágensek jelenlétében. A WT a vad típust, a Mut az *FvatfA* deléciós mutánst, míg a H7 és H9 a komplementált törzseket jelöli.

Az *FvatfA* kópiaszámának meghatározását megelőzően a potenciálisan komplementálódott törzseket stresszkísérleteknek vetettük alá, hogy igazoljuk, a komplementáló kazetta integrációja a genomba nem okozott fenotípusos változást a vad típusú törzshöz képest. A Petri-csészéken végzett stresszkísérletek alapján látható, hogy az *FvatfA* 'C (H7) és *FvatfA* 'C (H9) komplementált törzsek a vad típussal nagymértékű hasonlóságot mutattak, a törzsek fenotípusos helyreállása közel maradéktalan volt a vad típushoz képest (11.ábra).

A különféle stresszek alatti fenotípusos helyreállítás vizsgálatát követően a vad típushoz leginkább hasonlító komplementált törzsekből genomi DNS-t izoláltunk, majd PCR elegyet mértünk össze a geneticin kazettára, illetve az *FvatfA* génre. Az *FvatfA* gént tartalmazó PCR

termékeket *EcoRI*, *XhoI*, *SspI* restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd 0,6%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az így kapott emésztési mintázatokat.

A stresszkísérletek, valamint a PCR-es ellenőrzést követően feltételezhető volt, hogy a H7 illetve a H9 komplementált törzsekben állt helyre leginkább a vad típusra jellemző fenotípus, ezért ezekben a törzsekben határoztuk meg az *FvatfA* gén kópiaszámát.

A törzsek kópiaszámát a 3.8. alfejezetben ismertetett módon számítottuk ki. Az eredményeinkből kiderült, hogy mindkét komplementált törzsből az *FvatfA* gén egy kópiában van jelen. A kísérletek során kapott egyenesek egyenletét, a reprodukálhatóságot, valamint a kópiaszámokat a 7. táblázatban tüntettem fel.

7. táblázat A H7 és H9 komplementált törzsek kópiaszáma

Törzsek	<i>FvatfA</i> (FVEG_02866)	R ²	<i>FvmsOD</i> (FVEG_11192)	R ²	Kópiaszám
<i>FvatfA</i> 'C(H7)	$y=-3.31x+26.74$	0.99	$y=-2.93x+26.62$	0.98	1.00±0.02
<i>FvatfA</i> 'C(H9)	$y=-3.49x+26.17$	0.97	$y=-3.32x+26.33$	0.98	1.00±0.01

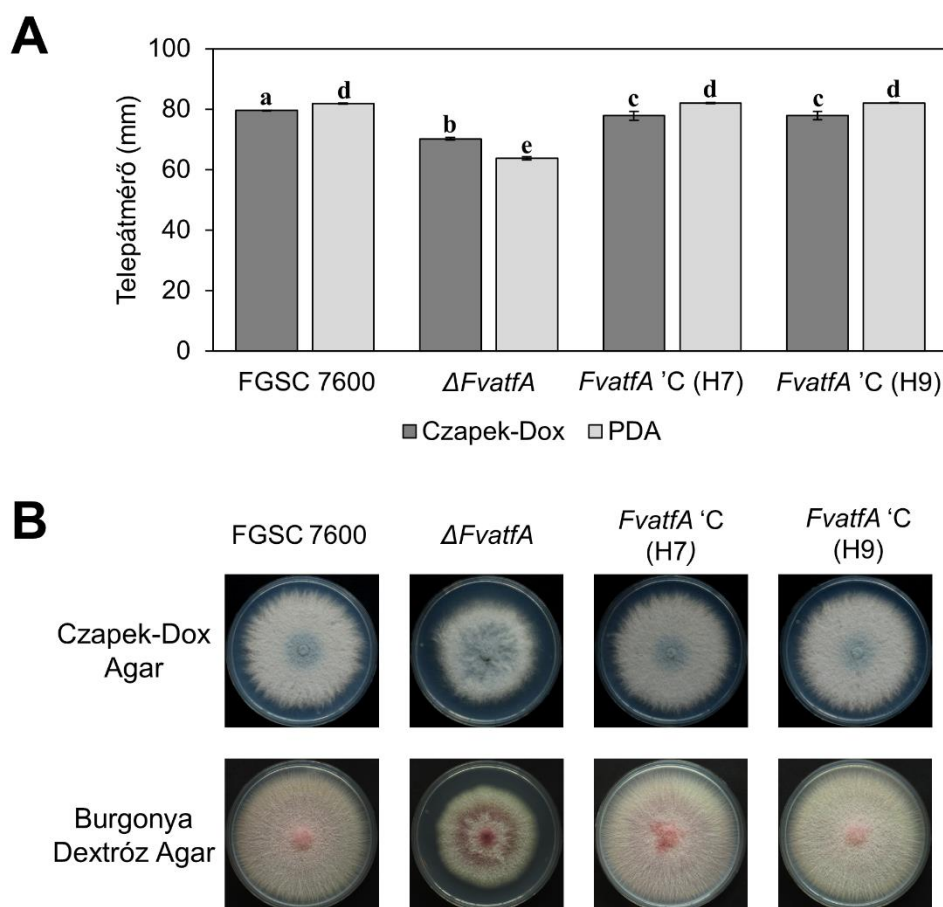
4.1.3. A $\Delta FvatfA$ törzs fenotípusos jellemzése

4.1.3.1. Az *FvatfA* gén szerepe a vegetatív és invazív növekedésben

A kísérleteket megelőző tenyésztések során azt tapasztaltuk, hogy a mutáns növekedése Czapek-Dox táptalajon a vad típusú törzshöz képest elmaradt, így az invazív növekedés mellett a vegetatív növekedést is vizsgáltuk kísérleteinkben.

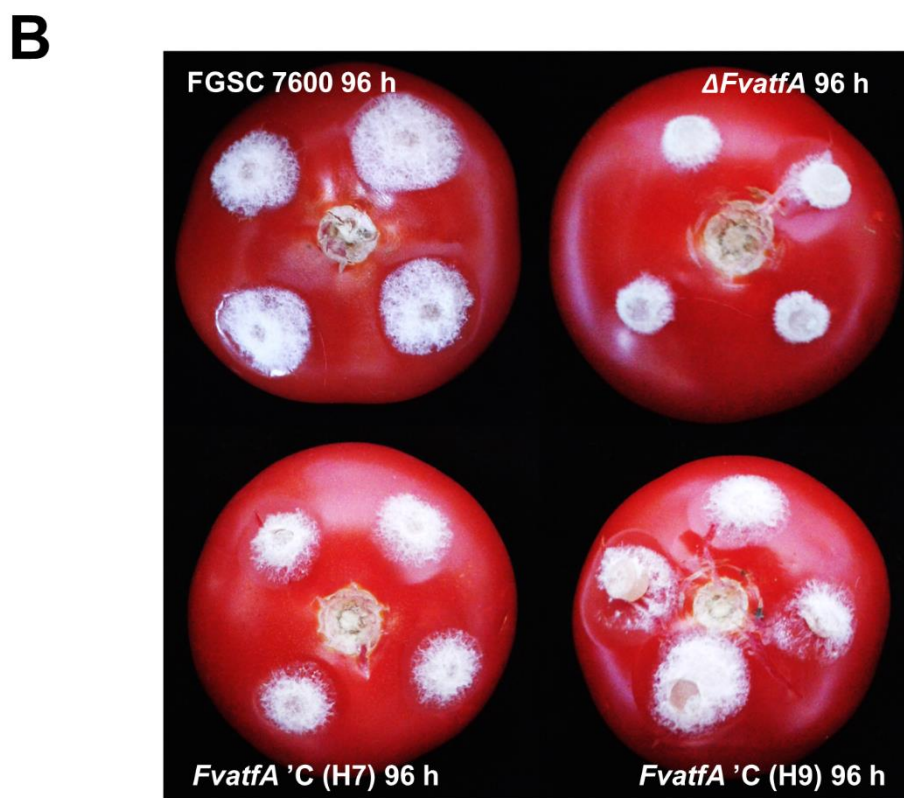
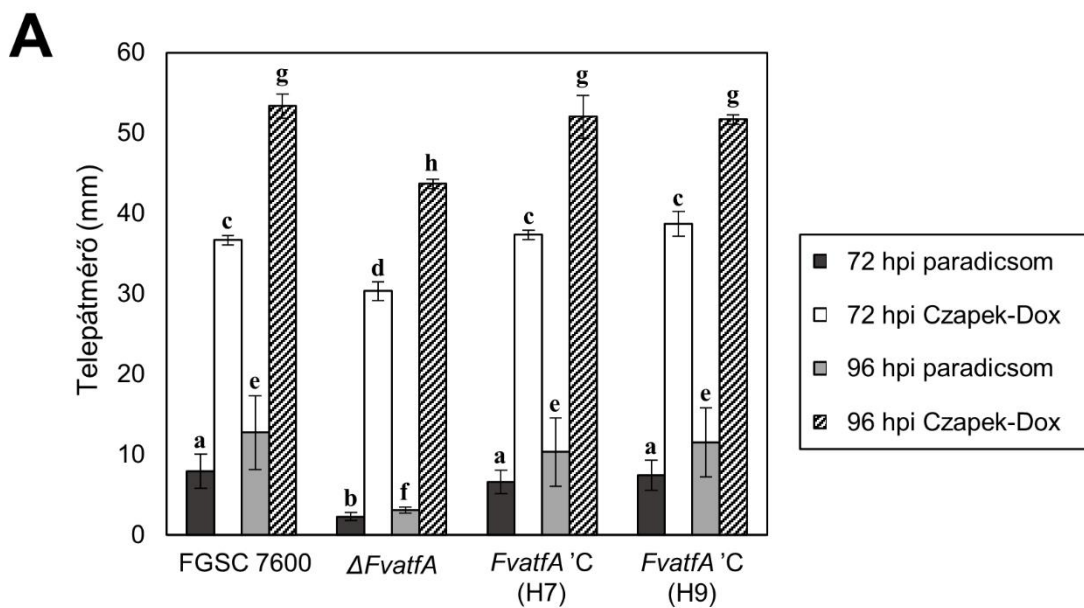
A vegetatív növekedést Czapek-Dox, illetve burgonya dextróz agar (PDA) táptalajokon vizsgáltuk, 5 µL spóraszuszpenziót (amely 1×10^5 spórát tartalmazott) inokuláltunk pontszerűen a táptalajok felszínére, majd 25 °C-on 6 napig inkubáltuk a csészéket, ezt követően a telepeket lefényképeztük, a telepátmérőket lemértük, majd a három független kísérletből származó adatokból egyutas ANOVA statisztikai elemzést végeztünk, amit Tukey's post-hoc teszt követett. A statisztikai elemzés (az elemzés eredményét az M4.1. mellékletben található táblázat összesíti) szerint a $\Delta FvatfA$ deléciós törzs növekedése elmaradt a vad típusú törzsetől mind Czapek-Dox

(-11,79%), mind PDA (-22,16%) táptalajokon, s ez a fenotípus a komplementált törzsekben helyreállt (12. ábra).



12. ábra A törzsek vegetatív növekedésének összehasonlítása Czapek-Dox és PDA táptalajokon. Az A rész a telepátmérők statisztikai elemzését, míg a B rész a törzsek növekedéséről készült reprezentatív képeket mutatja be. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.

A vad típusú, deléciós mutáns és komplementált törzsek invazív növekedését paradicsombogyón vizsgáltuk (13. ábra, M4.1. táblázat). Aktívan növekvő tenyészetekből kivágott agarkorongokat helyeztünk a felületsterilizált paradicsomok felszínére, majd az inokulálást követően 72, illetve 96 órával (hpi) lemértük a telepek átmérőjét, valamint fényképet készítettünk a paradicsombogyókról. A vad típus esetében a telepek átmérőjének átlaga 7,92 és 12,75 mm volt (72, illetve 96 óra elteltével), míg a deléciós mutáns szignifikánsan kisebb növekedést mutatott: 2,25 és 3,08 mm átmérőjű telepeket képzett. A növekedés mértékében bekövetkező százalékos csökkenés (-71,6 és -75,8%, 72 és 96 órát követően) sokkal nagyobb mértékű volt, mint ahogyan azt a Czapek-Dox és PDA táptalajok esetében tapasztaltuk. Annak igazolására, hogy a telepátmérőkben tapasztalt szignifikáns különbség nem a deléciós mutáns eleve kisebb mértékű



13. ábra A törzsek invazív növekedésének összehasonlítása. Az A rész a telepátmérők statisztikai elemzését, míg a B rész egy reprezentatív kísérletet mutat be. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között

növekedéséből adódik, Czapek-Dox táptalajra az aktívan növekvő tenyészetekből kivágott agarkorongokat helyeztünk, majd 72 és 96 óra elteltével szintén lemértük a kinőtt telepek átmérőjét. Ezen körülmények között a $\Delta FvatfA$ törzs növekedésében tapasztalható csökkenés

kisebb mértékű volt, mint ahogyan azt a paradicsomon megfigyeltük (-17,3 és -18,1%, 72 és 96 órával az inokulációt követően).

4.1.3.2. Az *FvatfA* gén deléciójának hatása a mikrokonídiumokra és a szexuális szaporodásra

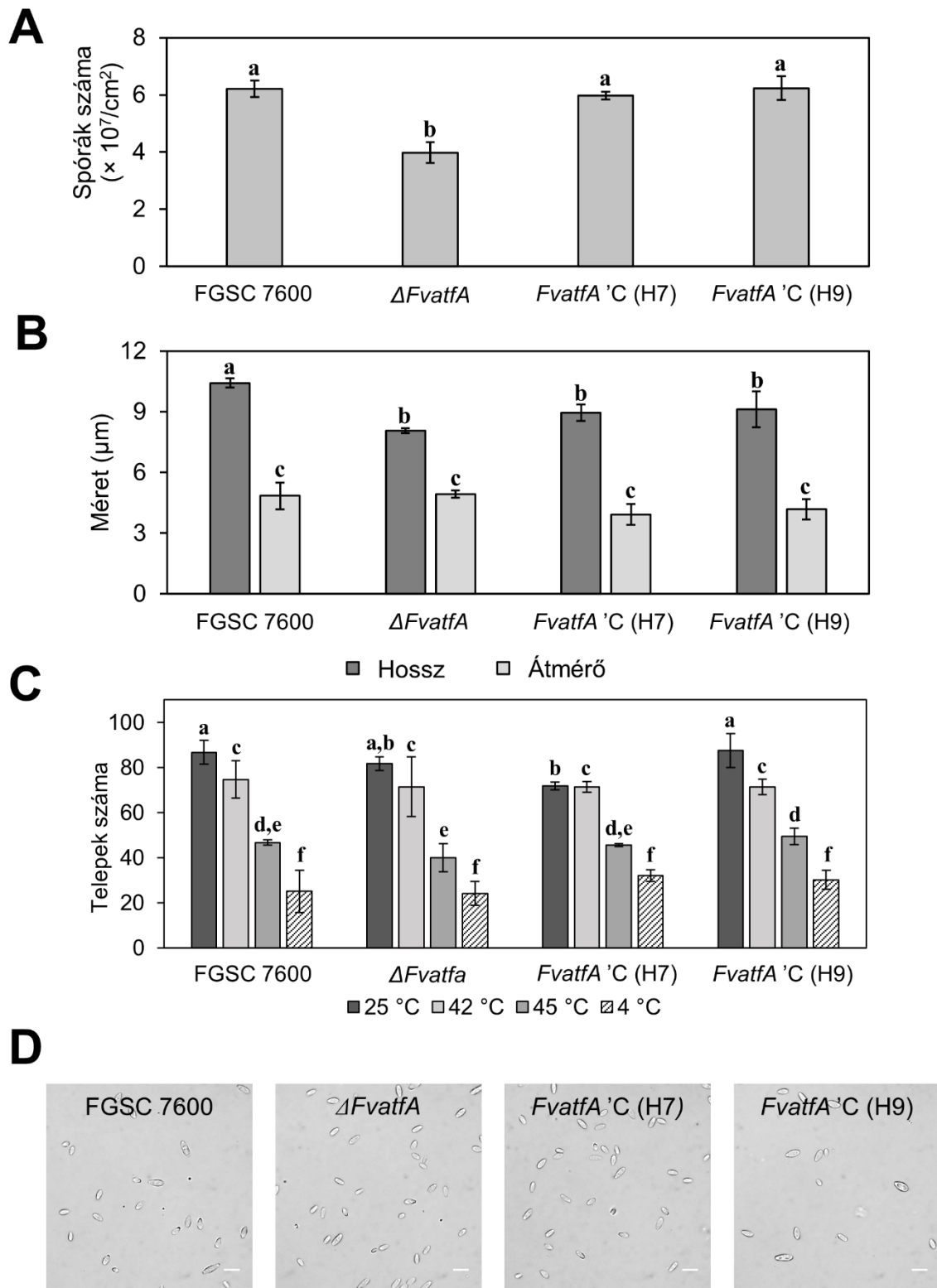
Előzetes kísérletek során megfigyelhető volt, hogy a $\Delta FvatfA$ deléciós mutáns kisebb spórákat képez, mint a vad típus, ezért méréseket végeztünk annak megállapítására, milyen mértékben befolyásolja az *FvatfA* gén deléciója a spóratermelést, valamint a spórák méretét és életképességét.

A spórák termelését (14. ábra A rész, M4.1. táblázat) Czapek-Dox táptalajon vizsgáltuk, a spóraszuszpenziók koncentrációját Bürker-kamra segítségével határoztuk meg. A $\Delta FvatfA$ törzs spóratermelő képessége szignifikánsan csökkent a vad típusú törzshöz képest: amíg az FGSC 7600 törzs $6,21 \pm 0,29 \times 10^7$ db spórát termelt egy négyzetcentiméterre vonatkoztatva, addig a $\Delta FvatfA$ mutáns $3,98 \pm 0,36 \times 10^7$ (35,9% kevesebb) spórát hozott létre azonos körülmények között.

Előzetes megfigyeléseinkkel összhangban a deléciós mutáns szignifikánsan, közel 2 μm -rel rövidebb ($8,07 \pm 0,13 \mu\text{m}$) spórákat termelt, mint a vad típusú törzs ($10,43 \pm 0,23 \mu\text{m}$), amelyet az ImageJ szoftver segítségével határoztunk meg. Ezzel szemben a spórák átmérőjében nem tapasztaltunk jelentős különbségeket a két törzs között: az FGSC 7600 esetében $4,85 \pm 0,66 \mu\text{m}$ volt a spórák átmérője, míg a $\Delta FvatfA$ mutáns spóráinak átmérője $4,94 \pm 0,18 \mu\text{m}$ volt. Az egyutas ANOVA-val végzett elemzés azt mutatta, hogy az *FvatfA* 'C H7 és H9 komplementált törzsekben a spórák hosszának fenotípusa csak részlegesen állt helyre (az elemzés eredményét az M4.1. mellékletben található táblázat összesíti, míg a 14. ábra B, illetve D része a spórák hosszát és átmérőjét, valamint reprezentatív mikroszkópi felvételt mutat be).

A konidiospórák életképességét 42, illetve 45 °C-on 60 percig történő, valamint 4 °C-on 7 napig tartó tárolással vizsgáltuk, a spóraszuszpenziókat Czapek-Dox tápagar felszínére szélesztettük, majd 2 nap inkubálást követően a kinőtt telepeket megszámoztuk. Eredményeink azt mutatták, hogy az *FvatfA* nem befolyásolja a spórák életképességét sem hő, sem hideg stressz alatt (14. ábra C rész, M4.1. táblázat).

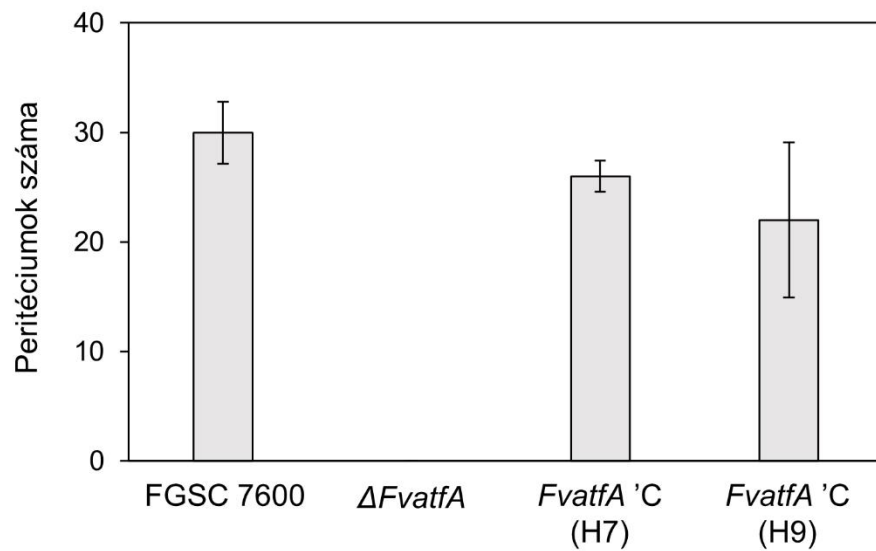
Megvizsgáltuk, milyen hatással van az *FvatfA* gén deléciója az ivaros szaporodásra. A keresztezési kísérlethez a vad típusú FGSC 7600 (MATA-1), FGSC 7603 (MATA-2), $\Delta FvatfA$ mutánst, valamint az *FvatfA* 'C H7 és H9 komplementált törzseket használtuk fel. A törzseket női partnerként alkalmazva répás agaron azt tapasztaltuk, hogy az *FvatfA* deléciós mutáns nem termelt peritéciumokat 40 nap inkubálást követően, míg a vad típus átlagosan 30, a *FvatfA* 'C H7 26, *FvatfA* 'C H9 törzs 22 peritéciumot termelt, ami azt mutatja, hogy a vad típusú szülő törzs fertilitása alapvetően gyenge volt (15. ábra). A nagyobb (~ 3 mm) peritéciumokat bonctűvel szétnyomkodva



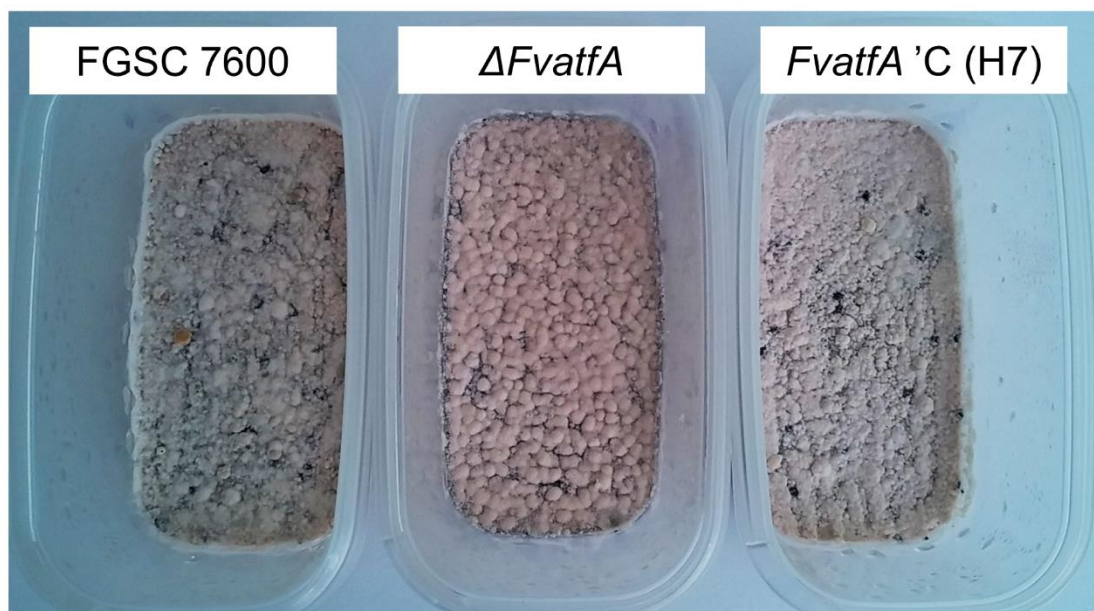
14. ábra A törzsek spóratermelő képességének, a spórák méretének, valamint életképességének összehasonlítása. Az A rész a vad típusú, mutáns és komplementált törzsek spóratermelő képességét; a B rész a spórák hosszának, valamint átmérőjének összehasonlítását; a C rész a spórák életképességét; míg a D rész egy reprezentatív mikroszkópi felvételt mutat be a törzsek mikrokonídiumairól. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.

az FGSC 7600 vad típusú törzsben három, az *FvatfA*'C (H7) komplementáltban kettő érett, aszkuszt is adó peritéciumot találtunk. Eredményeinkből elmondható, hogy az *FvatfA* gén deléciója teljes női sterilitást okoz, amely fenotípus a komplementált törzsekben helyreállt.

A



B



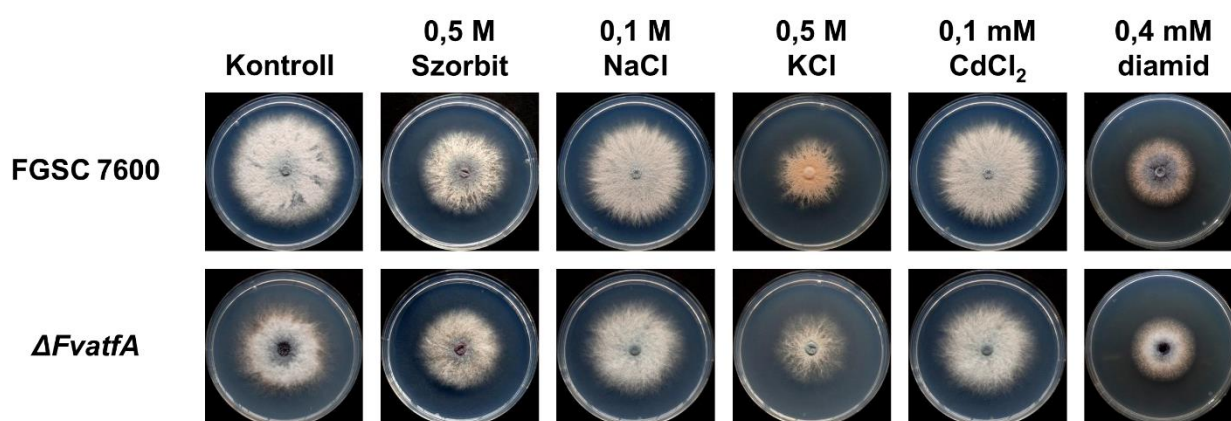
15. ábra A törzsek szexuális szaporodásának összehasonlítása. Az A rész a két ismétlésből származó peritéciumok számát, míg a B rész egy reprezentatív kísérletet mutat be.

4.1.3.3. Az *FvatfA* gén szerepe a *F. verticillioides* stresszérzékenységében

Az Atf1 (*S. pombe*) – AtfA (*A. nidulans*) bZIP típusú transzkripciósfaktorok ortológjai számos gombafajban részt vesznek a különféle környezeti stresszekre adott válaszban (Balázs és munkatársai, 2010; Hagiwara és munkatársai, 2008; Lara-Rojas és munkatársai, 2011; Nguyen és munkatársai, 2013; Qi és munkatársai, 2013; Rodrigues-Pousada és munkatársai, 2010). Ahogyan az a korábbi irodalmi adatok alapján várható volt, az *FvatfA* deléciós mutáns megnövekedett érzékenységet mutatott az oxidatív stresszt kiváltó vegyületekkel, így hidrogén-peroxiddal, *t*BOOH-val (peroxidstresszt generálnak) és MSB-vel (szuperoxidstresszt vált ki) szemben, valamint a sejtfal-stresszt okozó Kongóvízzel szemben is (17. ábra).

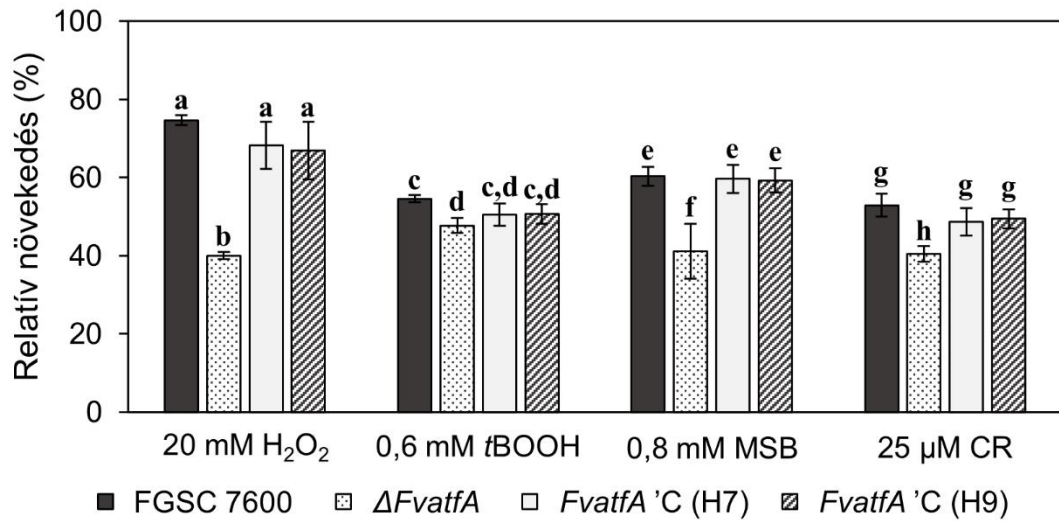
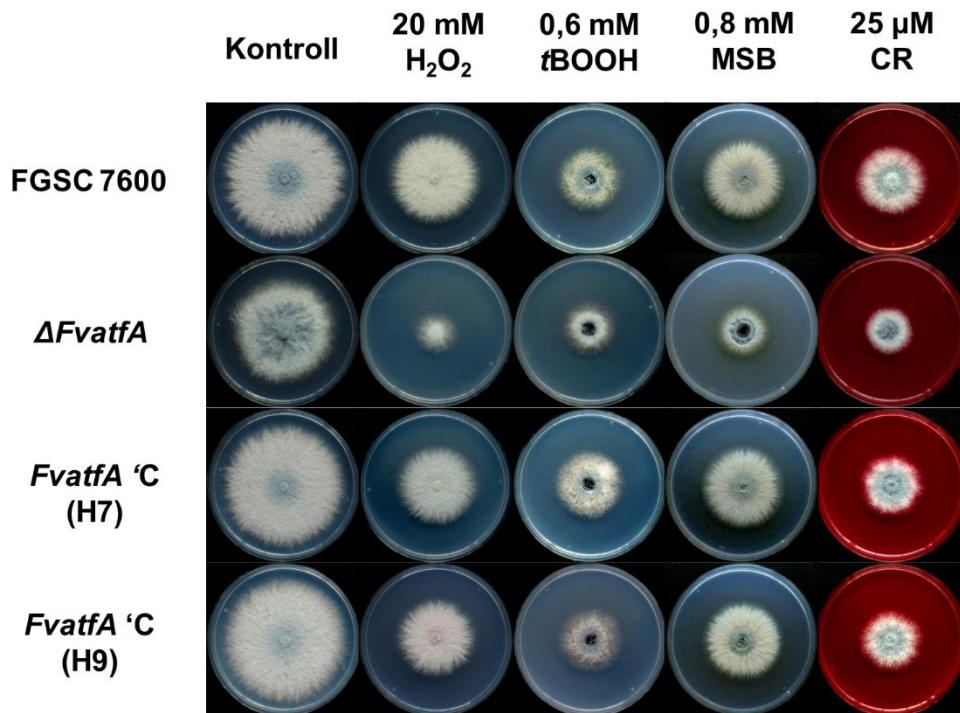
Az egyutas ANOVA statisztikai elemzéshez a törzsek százalékban megadott relatív növekedését használtuk fel, a statisztikai elemzés eredményét az M4.1. mellékletben található táblázatban tüntettem fel. A deléciós mutáns növekedése a vad típusú törzshöz viszonyítva 25 mM H₂O₂ esetén -46,5%; 0,6 mM *t*BOOH jelenlétében -12,5%; 0,8 mM MSB esetében -32,0%; míg 25 µM Kongóvíz jelenlétében -23,6%-al maradt el.

A törzsek abszolút növekedését elemző kétutas ANOVA analízis szintén alátámasztotta a $\Delta FvatfA$ törzs esetében tapasztalt fokozott érzékenységet H₂O₂-vel, MSB-vel és Kongóvízzel szemben, a *t*BOOH esetén tapasztalt érzékenység azonban nem volt szignifikáns ($p > 5\%$). A kétutas statisztikai elemzés eredményét az M5.1. mellékletben található táblázatban tüntettem fel.



16. ábra A deléciós mutáns és vad típusú törzs növekedésének összehasonlítása szorbit, NaCl, KCl, CdCl₂ és diamid jelenlétében

A $\Delta FvatfA$ törzs az ozmotikus stresszt kiváltó NaCl, KCl és szorbit, a nehéz-fémstresszt okozó CdCl₂, továbbá a glutation metabolizmust felborító diamid jelenlétében a vad típusú FGSC 7600 törzshöz hasonlóan viselkedett (16. ábra).

A**B**

17. ábra A törzsek növekedésének összehasonlítása hidrogén-peroxid, tBOOH, MSB és Kongóvír jelenlétében. Az A rész a törzsek százalékban megadott relatív növekedésének átlagát és szórását mutatja be három független kísérletből, míg a B rész esetén egy kísérletről készült reprezentatív fényképek láthatóak. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között

4.1.3.4. Az *FvatfA* gén szerepe a fumonizinek termelésében

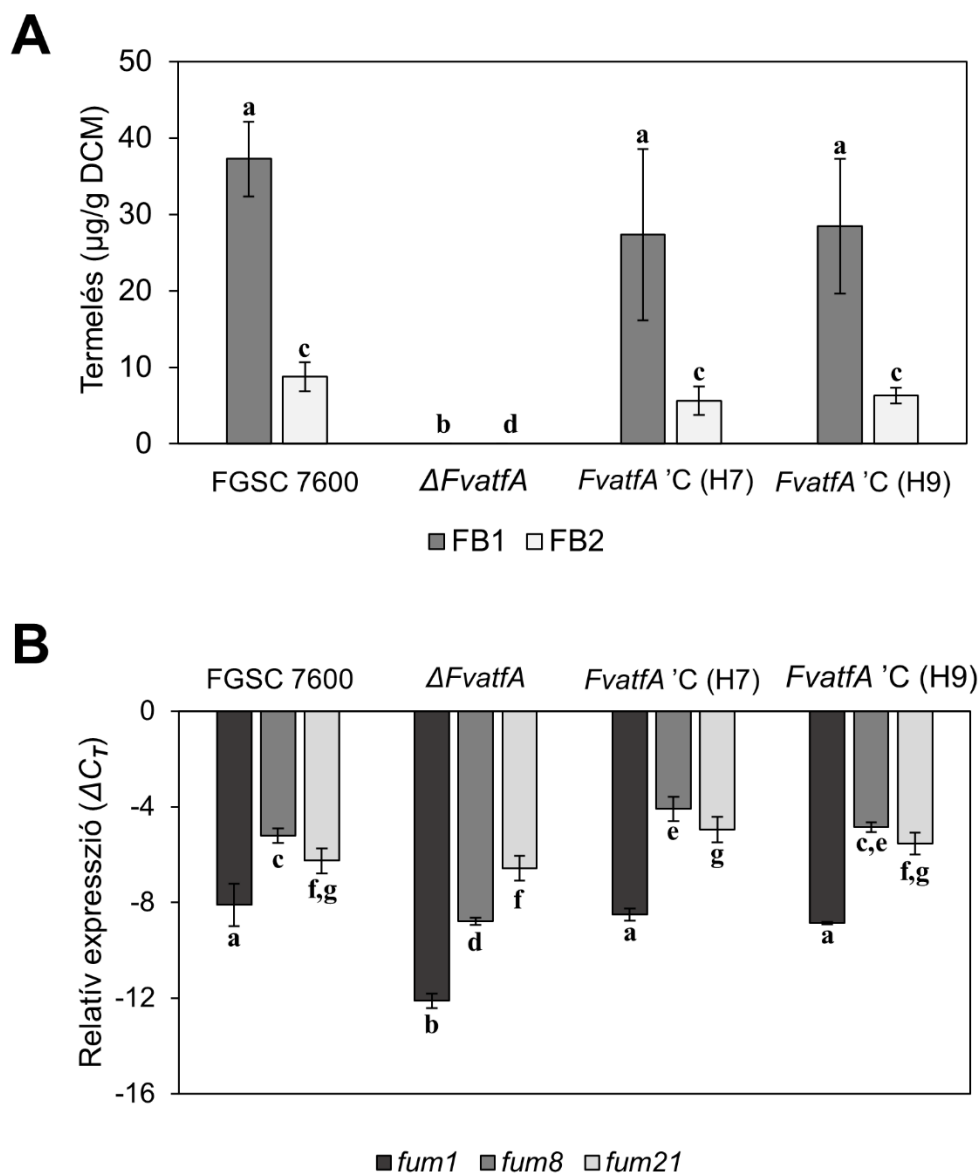
A *F. verticillioides* többféle mikotoxint képest termelni, köztük a fumonizineket is, amelyek közül a fumonizin B1 (FB1) és fumonizin B2 (FB2) fordul elő a legnagyobb mennyiségben (Blacutt és munkatársai, 2018). A fumonizinek szennyezhetik mind az állati takarmányokat, mind az emberi fogyasztásra szánt élelmiszereket (Logrieco és munkatársai, 2002; Covarelli és munkatársai, 2012). Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az *FvatfA* gén hiánya a *F. verticillioides* fumonizintermelését. Folyékony módosított Myro táptalajra oltottuk le a törzseket, majd 14 napon keresztül inkubáltuk őket sötétben, statikus körülmények között. Előzetes kísérleteinkben CE-MS segítségével meghatároztuk a micéliumban, valamint a felülúszóban található fumonizin B1 és B2 mennyiségét, és azt kaptuk, hogy a FB1 és FB2 80-90%-a felülúszóban található; ezért a továbbiakban a felülúszókból meghatározott mennyiségeket mutatom be (a felülúszó és a micélium közötti FB1 és FB2 eloszlást a 8. táblázat mutatja be).

8. táblázat A FB1 és FB2 eloszlása a micéliumok és a felülúszók között.

Törzsek	FB1		FB2	
	Felülúszó ($\mu\text{g/g DCM}$)	Micélium ($\mu\text{g/g DCM}$)	Felülúszó ($\mu\text{g/g DCM}$)	Micélium ($\mu\text{g/g DCM}$)
FGSC 7600	31,02 \pm 4,71 (80,44 \pm 2,44%)	7,68 \pm 2,36 (19,56 \pm 2,44%)	5,26 \pm 0,95 (83,78 \pm 2,04%)	1,03 \pm 0,31 (16,22 \pm 2,04%)
$\Delta FvatfA$	nem detektálható	nem detektálható	nem detektálható	nem detektálható
<i>FvatfA</i> 'C (H7)	26,17 \pm 5,76 (83,98 \pm 6,25%)	4,85 \pm 1,62 (16,02 \pm 6,25%)	3,63 \pm 1,76 (80,06 \pm 10,09%)	0,79 \pm 0,20 (19,94 \pm 10,09%)
<i>FvatfA</i> 'C (H9)	37,16 \pm 11,75 (90,78 \pm 3,62%)	3,56 \pm 1,28 (9,22 \pm 3,62%)	3,94 \pm 0,24 (84,54 \pm 3,78%)	0,72 \pm 0,18 (15,46 \pm 3,78%)

Ahogy az a 18. ábra A részén is látható, az *FvatfA* gén deléciója drasztikus csökkenést okozott a fumonizinek termelésében, mennyiségük a CE-MS kimutathatósági határ alá esett. Ezen megfigyeléssel párhuzamosan megmértük három, a *FUM* génklaszterbe tartozó gén, a *fum1*, *fum8* és *fum21* relatív expresszióját is, és azt találtuk, hogy a fumonizin bioszintézis kulcsenzimének minősülő poliketid szintáz kódoló *fum1*, valamint az α -oxoamin szintáz enzimet kódoló *fum8* gén expressziós szintjei a mutánsban szignifikánsan csökkentek a vad típusú, valamint a komplementált törzsekhez képest. A Zn(II)2Cys6 DNS kötőhelyet tartalmazó transzkripció faktort kódoló *fum21* gén expressziós szintjében nem tapasztaltunk változást (18. ábra B része). Az egyutas statisztikai elemzés eredményét az M4.1. mellékletben található táblázatban tüntettem fel.

A vizsgált gének promoter analízise összhangban volt az előzetes génexpressziós vizsgálatok eredményével: a *fum1* és *fum8* gének promoter szakaszain CRE szekvenciát azonosítottunk, míg a *fum21* gén szekvenciáján nem találtunk CRE kötőhelyet (a promoter analízist összefoglaló táblázat az M6. mellékletben található).



18. ábra A törzsek FB1 és FB2 termelő képességének összehasonlítása. Az A rész az 5 független mérés átlagát és szórását, míg a B rész a *FUM* génklaszter három tagjának, a *fum1*, *fum8* és *fum21* relatív expresszióját mutatja be. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.

4.1.3.5. Az *FvatfA* gén szerepe a bikaverin termelésében

A törzsfenntartás során megfigyeltük, hogy a $\Delta FvatfA$ törzs intenzív vöröseslila színanyagot halmozott fel hét nap inkubálás után Czapek-Dox táptalajon, ami azonos körülmények

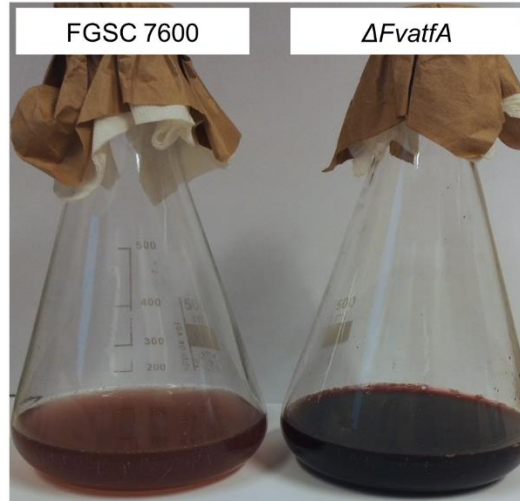
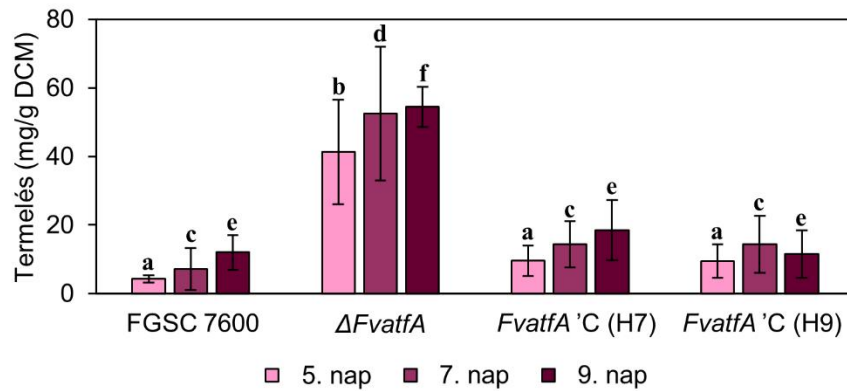
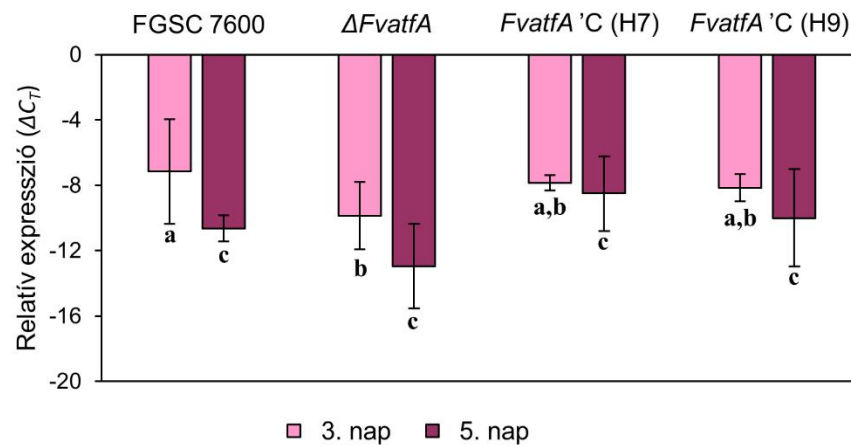
között nem volt megfigyelhető a vad típus tenyészetében. Mivel a bikaverin a legnagyobb mennyiségben termelődő vöröses pigment *Fusarium* fajokban (Linnemannstöns és munkatársai, 2002a), feltételeztük, hogy ez a szekunder metabolit felelős a deléciós mutáns pigment-túltermelésért, így megmértük a törzsek bikaverin termelését Bell és munkatársai (2003) módszere alapján.

A $\Delta FvatfA$ deléciós mutáns 5 nap inkubálás után körülbelül tízszerre több bikaverint termelt, mint a vad típusú és komplementált törzsek, ez a különbség azonban nem növekedett tovább 7 és 9 nap inkubálást követően (19. ábra B része, illetve M4.1. mellékletben található táblázat). A bikaverin bioszintézisben résztvevő, poliketid szintáz enzimet kódoló *bik1* gén (megelőzően *pks4*) expresszióját 3 és 5 nappal a leoltást követően vizsgáltuk. A $\Delta FvatfA$ mutáns esetében nem tapasztaltunk növekedést a génexpressziós szintekben (sőt, enyhe mértékű expresszió csökkenést figyeltünk meg 3 nap inkubálást követően) a vad típushoz képest, ami arra enged következtetni, hogy a bikaverin túltermeléséért nem a *bik1* gén fokozott expressziója felel (19. ábra C része).

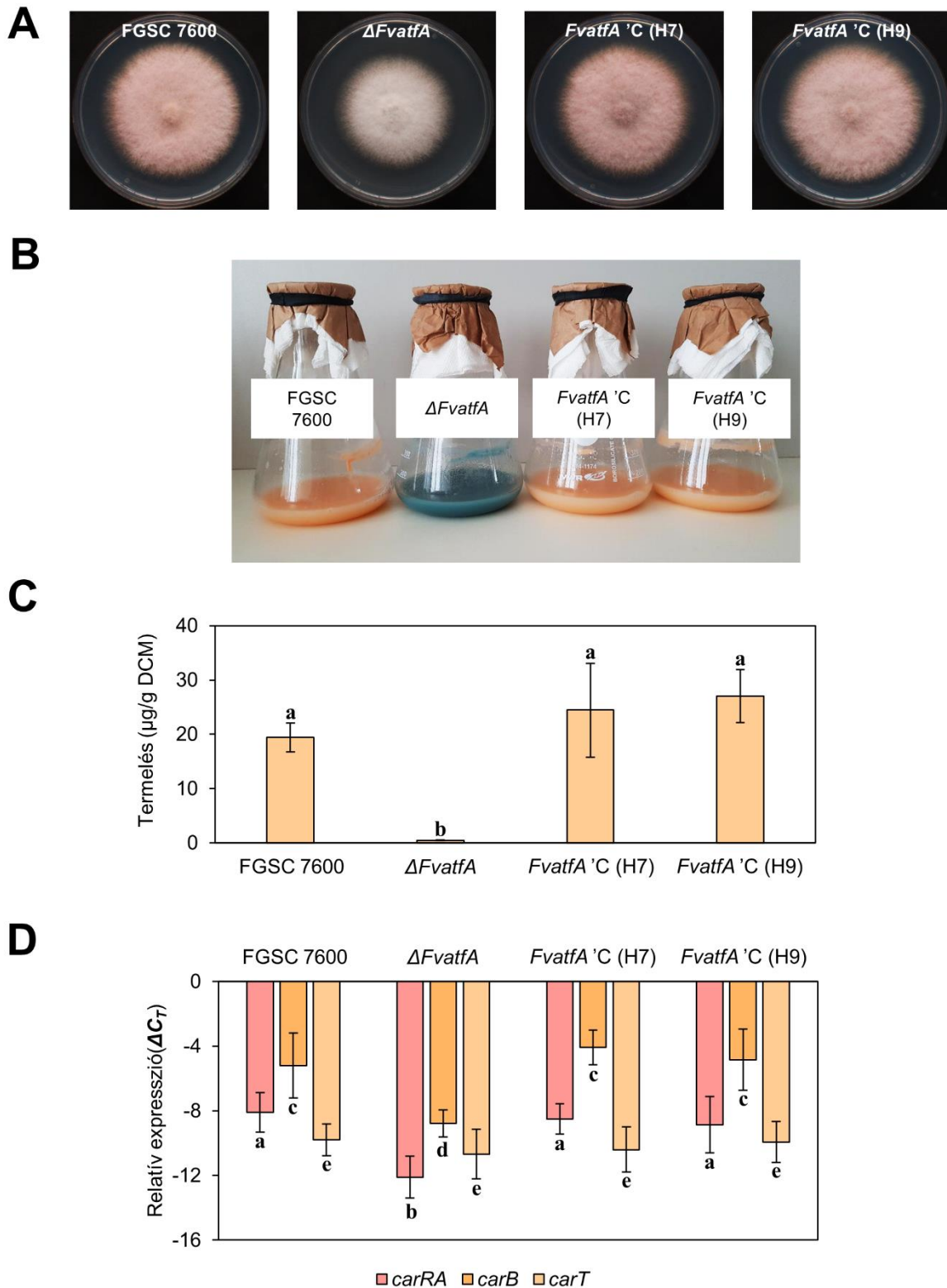
4.1.3.6. Az *FvatfA* gén szerepe a karotinoidok termelésében

A $\Delta FvatfA$ mutáns tenyészetete nem mutatta azt az erős sárgás-narancs színt CM táptalajon folyamatos megvilágítás mellett, mint a vad típusú törzs, azt sugallva, hogy a karotinoid bioszintézist is érinthette az *FvatfA* gén deléciója (20. ábra, A rész). Ezért a karotinoidok termelését vizsgáltuk DG folyékony táptalajban rázatott kultúrákban folyamatos megvilágítás mellett, majd a karotinoidokat a liofilizált micéliumból extraháltuk és spektrofotometriásan mértük a mennyiségüket.

Ahogy az várható volt, a deléciós mutáns csak nyomokban termelt karotinoidokat, míg a vad típusú és komplementált törzsek normális mennyiségben termelték ezeket a metabolitokat. Azt is tapasztaltuk, hogy a deléciós törzs egy eddig ismeretlen, kékeslila színű pigmentet termelt (20. ábra, B és C rész). A *Fusarium* fajokban több enzim játszik fontos szerepet a karotinoidok biogenezisében, amelyeket részletesen a 2.1.1.3. alfejezetben már ismertettem. Három ilyen enzimet kódoló gén, a *carRA*, *carB* és *carT* expressziós szintjeit hasonlítottuk össze a vizsgált törzsekben qRT-PCR segítségével. Az RNS-t 4 napig sötétben, majd 2 órán keresztül fény alatt inkubált tenyészetekből származó micéliumokból izoláltuk (20. ábra D rész).

A**B****C**

19. ábra A bikaverin termelésének összehasonlítása. Az A rész a törzsek összehasonlítása 9 nap inkubációt követően; B rész a vad típusú, mutáns és komplementált törzsek termelőképességének összehasonlítása 5, 7 és 9 nap inkubálást követően; C rész a *bik1* gén expressziójának összehasonlítása 3 és 5 nap tenyésztés után. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.



20. ábra A karotinoidok termelésének összehasonlítása. A rész a törzsek pigmentáltságának összehasonlítása CM tápagon; B rész a törzsek összehasonlítása 7 nap, folyamatos megvilágítást követően; C rész a vad típusú, mutáns és komplementált törzsek termelőképességének összehasonlítása; D rész a *carRA*, *carB* és *carT* gének expressziójának összehasonlítása. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.

A *carRA* és *carB* relatív expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a $\Delta FvatfA$ mutánsban, mint a vad típusú és komplementált törzsekben, ami azt bizonyítja, hogy e két gén alul-reguláltsága a

felelős a deléciós törzsben a csökkent karotinoid termelésért. Ezzel szemben a *carT* gén expressziójára az *FvatfA* gén deléciója nem volt hatással (20. ábra D része, illetve M4.1. mellékletben található összefoglaló táblázat).

4.1.3.7. Az *in silico* promoter analízis eredménye

Az ATF/CREB bZIP típusú transzkripciós faktorok a TGACGTCA konszenzus szekvenciához képesek kötődni (Loeken 1993; Kvietikova és munkatársai, 1995; Sakamoto és munkatársai, 2008; Hong és munkatársai, 2013a), így a különféle általunk vizsgált szekunder metabolitok termelésében résztvevő gének esetében *in silico* promoter analízist végeztünk, hogy megállapítsuk, vajon megtalálható-e ez a szekvencia a gének promoter szakaszaiban. A vizsgálat során kilenc, a PROMO programban szereplő különféle fajokban előforduló ATF/CREB transzkripciós faktorok által felismert kötőhelyek szekvenciáit kerestük. Ahogyan az a M6. melléklet táblázatában látható, minden olyan gén, amely az *FvatfA* gén deléciójának következtében alul-regulálódott (*fum1*, *fum8*, *carRA* és *carB*), tartalmazott a promoterén feltételezhető ATF/CREB kötőhelyeket. Ezzel szemben azon gének promoter régiójában, amelyeknek expressziója (*fum21*, *carT*, *bik1*) nem gyengült a mutánsban, nem találtunk potenciális kötőhelyeket (a kötőhelyek pontos elhelyezkedését az M.6 mellékletben található ábra és táblázat mutatja be, míg a vizsgált gének promótereivel átfedő szomszédos géneket a 9. táblázat foglalja össze).

9. táblázat A vizsgált gének promótereivel átfedő szomszédos gének és funkciójuk

Gén	Átfedő gén	Funkció	DNS szál
<i>carRA</i>	<i>carX</i> (FVEG_10719)	karotinoid oxigenáz	+
<i>carB</i>	<i>carRA</i> (FVEG_10718)	carotén cikláz	-
<i>carT</i>	FVEG_09250	ismeretlen	-
<i>fum1</i>	<i>fum21</i> (FVEG_14633)	Zn(II)2Cys6 transzkripciós faktor	+
<i>fum8</i>	<i>fum3</i> (FVEG_00320)	dioxigenáz	-
<i>fum21</i>	<i>zbd1</i> (FVEG_00314)	cink-kötő dehidrogenáz	+
<i>bik1</i>	<i>bik2</i> (FVEG_03380)	monooxigenáz	-

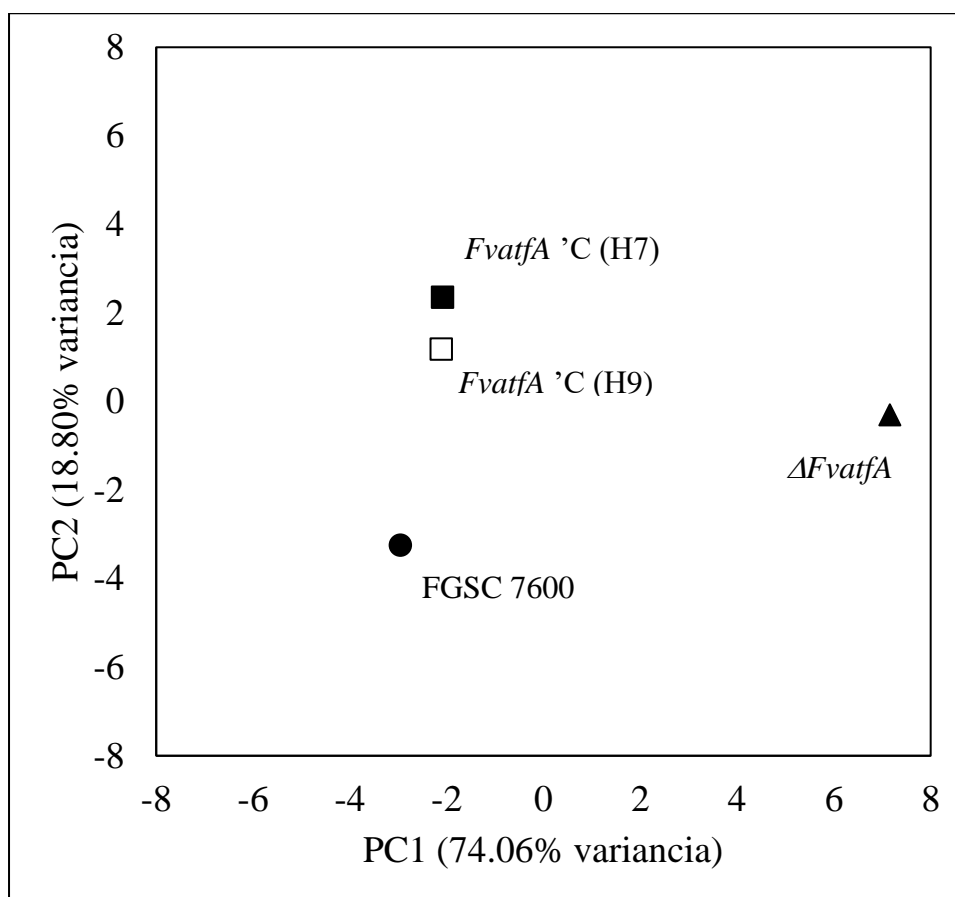
4.1.3.8. A törzsek átfogó jellemzése

A vad típusú, deléciós és komplementált törzsek összehasonlítására főkomponens analízist végeztünk; ennek eredményeként jól látható, hogy a $\Delta FvatfA$ mutáns jól elkülönül a vad típusú

FGSC 7600 és a komplementált (*FvatfA* 'C H7, H9) törzsektől (21. ábra és M7. melléklet táblázata). A $\Delta FvatfA$ mutáns másik három törzstől való látványos elkülönülését számos fenotípusos tulajdonság markáns megváltozása okozza: különbséget találtunk a vegetatív növekedésben, az invazív növekedésben, a spórák termelésében, az abiotikus stressztoleranciában és a szekunder metabolitok termelésében (a PCA analízis részletes eredményét az M7. melléklet tartalmazza). Ezen megfigyelések is megerősítik az *FvatfA* gén deléciójának pleiotróp hatását, amit más, eddig funkcionálisan jellemzett *FvatfA* ortológok esetében is megfigyeltek (Takeda és munkatársai, 1995; Hagiwara és munkatársai, 2009, 2016; Balázs és munkatársai, 2010; Guo és munkatársai, 2010; Sansó és munkatársai, 2011, Lara-Rojas és munkatársai, 2011; Roze és munkatársai, 2011; Temme és munkatársai, 2012; Hong és munkatársai, 2013a; Qi és munkatársai, 2013; Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015; Wee és munkatársai, 2017). Érdekes módon, bizonyos mértékű elkülönülést szintén megfigyeltünk a vad típusú és a két komplementált törzs között, amit a spórák morfológiájában és életképességében lévő kisebb különbségek okoztak. A főkomponens analízis alapján azonban az *FvatfA* 'C H7 és H9 így is közel helyezkedik el a vad típusú FGSC 7600 törzshöz, ezzel is igazolva, hogy a működőképes *FvatfA* gén beépülése a gomba genomjába helyreállította a deléciós mutánsnál tapasztalt fenotípusos elváltozásokat. Az általunk megfigyelt kisebb fenotípusos különbségek a vad típusú és a két komplementált törzs között normálisak. Ezeket a piciny eltéréseket két tényező okozhatta: (i) az *FvatfA* gén a komplementáló kazetta véletlenszerű beépülése miatt más környezetbe került a genomon belül; (ii) különböző mikroevolúciós folyamatoknak is lehetett szerepe, amelyeket a protoplasztálás és transzformálás hatására kialakult szelekciós nyomás váltott ki (Ballard és munkatársai, 2018; 2019).

4.1.4. Az *FvatfA* génnel kapcsolatos eredmények megvitatása

Az Atf1/AtfA bZIP típusú transzkripciós faktorok számos mikroorganizmusban, így többek között *S. pombe*-ben, *A. nidulans*-ban, *F. graminearum*-ban elengedhetetlenek a különféle stresszre adott válasz kialakításában, szerepet játszanak a szekunder metabolitok termelésében és a szexuális szaporodásban is (Takeda és munkatársai, 1995; Sansó és munkatársai, 2008; Chen és munkatársai, 2003; Balázs és munkatársai, 2010, Hagiwara és munkatársai, 2008; Lara-Royas és munkatársai, 2011; Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015).



21. ábra A törzsek főkomponens analízise

Az *A. nidulans* AtfA bZIP típusú transzkripció faktor ortológját *F. verticillioides*ben az NCBI blastp algoritmus segítségével kerestük meg. Ezt követően double-joint PCR technika segítségével deléciós kazettát készítettünk, amelyben markerként a higromicin foszfotransferázt kódoló *hph* gént használtuk fel. A deléciós kazettát PEG mediált transzformálással vittük be a vad típusú FGSC 7600 törzs fiatal tenyészetéből létrehozott protoplastokba. A géndeléciós kazetta egyszeres és jó helyre történő beépülését Southern blot módszerrel ellenőriztük. Végül single-joint PCR segítségével komplementáló kazettát készítettünk a vad típusú *FvatfA* génből, amelyhez markerként a neomicin foszfotransferáz enzimet kódoló *gen* gént használtuk. A $\Delta FvatfA$ törzsbe végül a komplementáló kazettát transzformálva komplementált törzseket hoztunk létre.

A $\Delta FvatfA$ törzs növekedésében általunk tapasztalt csökkenés összhangban van a szakirodalomban már korábban leírt *atf1/atfA* ortológ gének hiánymutásai esetében megfigyeltekkel: a *M. oryzae* $\Delta Moatf1$ mutáns (Guo és munkatársai, 2010) és a *F. graminearum* $\Delta Fgatf1$ törzs (Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015) is csökkent növekedést mutatott a vad típusú törzshöz képest. Ahogyan azt már korábban *B. cinerea* (Temme és munkatársai, 2012) és *A. nidulans* (Emri és munkatársai, 2015, Orosz és munkatársai, 2017) esetében kimutatták, az AtfA ortológok szerepet játszanak a sejtfal biogenezis és az elsődleges

anyagcsere szabályozásában, így feltételezhető, hogy az *FvatfA* gén deléciója zavart okozott az alapvető metabolikus és fiziológiai folyamatokban, amely végül megfigyelhető mértékű csökkenést váltott ki a deléciós mutáns növekedésében.

A deléciós törzs esetében paradicsombogyón megfigyelt csökkenés az invazív növekedésben arra enged következtetni, hogy az *FvAtfA* transzkripciós faktor szerepet játszik *F. verticillioides* virulenciájában, ahogyan azt már *C. purpurea* esetében rozson (Nathues és munkatársai, 2004), *M. oryzae* kapcsán rizsen (Guo és munkatársai, 2010), *F. oxysporum* tekintetében Cavendish banánon (Qi és munkatársai, 2013), *F. graminearum* vonatkozásában búzán, kukoricán és szálkaperjén (*Brachypodium distachyon*; Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015) korábban bizonyították.

Számos növénypatogén gombában az *Atf1/AtfA* transzkripciós faktorok eliminációja zavarokat okozott mind az aszexuális, mind a szexuális sporulációban, amely megfigyelések alátámasztják az *FvAtfA* szerepét a mikrokónídiumok méretének és termelésének szabályozásában, illetve a peritéciumok képzésében. A *B. cinerea* Δ *bcatf1* mutánsa esetében csökkent konídium- és szklerócium-termelés volt megfigyelhető (Temme és munkatársai, 2012). *F. graminearum*ban az *Fgatf1* gén deléciója csökkent spóratermelést, valamint késleltetett szexuális szaporodást eredményezett (Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015). A *F. oxysporum* *Foatf1* deléciós mutánsát vizsgálva Qi és munkatársai (2013) szintén megfigyelték a spórák hosszának csökkenését. A kísérleteinkben jelentős mértékben csökkent női fertilitást tapasztaltunk a vad típusú FGSC 7600 törzs esetében. Saleh és munkatársai (2012) *M. oryzae*ban vizsgálták a szexuális szaporodási ciklus hiányának szelekciós hatását a női fertilitásra. Kísérleteinkben 10-20 alkalommal oltották át a vad típusú kezdetben női fertilis törzseket heti rendszerességgel új rizsliszt tápagra. Eredményül azt kapták, hogy az egyes izolátumok női fertilitása 10-19 egymást követő átoltást követően jelentős mértékben lecsökkent. A *F. verticillioides* FGSC 7600 törzset már évtizedek óta használják, mint teszter törzset és modellorganizmust laboratóriumi körülmények között, az egyik első publikáció, amelyben ezt a törzset Xu és munkatársai vizsgálták 1994-ben jelent meg. Ezt figyelembe véve elmondható, hogy a hosszú ideje történető laboratóriumi törzsfenntartás okozhatta az általunk tapasztalt női fertilitás ilyen drasztikus mértékű csökkenését.

A szakirodalomban fellelhető *Atf1/AtfA* ortológok deléciós mutánsai érzékenyek voltak a különféle környezeti stresszekkel szemben. A *M. oryzae* *Moatf1*, valamint a *F. graminearum* *Fgatf1* deléciós mutánsa fokozott érzékenységet mutatott az oxidatív stresszt kiváltó hidrogén-peroxiddal szemben (Guo és munkatársai, 2010; Jiang és munkatársai, 2015). A *B. cinerea* Δ *bcatf1* mutánsa hasonlóan az *FvatfA* deléciós mutánshoz érzékenynek bizonyult a sejtfalstresszt okozó

Kongóvörös és calcofluor white jelenlétében (Temme és munkatársai, 2012), amely fenotípus szintén megfigyelhető volt Kongóvörös jelenlétében *F. graminearum*ban is (Jiang és munkatársai, 2015). A *F. verticillioides FvatfA* mutánsával szemben a *F. graminearum Fgatf1* mutánsa csökkent ellenállóképességet mutatott az ozmotikus stresszt kiváltó NaCl-dal szemben (Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015). A megemelkedett oxidatív stresszel (H₂O₂, tBOOH, MSB, diamid) szembeni érzékenység szintén nem párosult ozmotikus stressz (NaCl) elleni érzékenységgel az *A. nidulans ΔatfA* mutánsában (Balázs és munkatársai, 2010; Emri és munkatársai, 2015), azonban a NaCl jelenlétében végzett transzkriptomikai vizsgálatok azt mutatták, hogy az *atfA* gén deléciója globális változásokat okozott a gomba transzkriptomjában (Emri és munkatársai, 2015).

Számos kutatás rávilágított arra, hogy a szekunder metabolitok termelése összefügg a fonalas gombák oxidatív stresszre adott válaszával. Az AtfB, amely szintén egy bZIP típusú transzkripciós faktor számos más transzkripciós faktoral, így az AP-1-gyel, MsnA-val, SrrA-val és nagy valószínűséggel az AtfA-val közösen szabályozza az aflatoxin bioszintézisében résztvevő, valamint az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó géneket egyaránt *A. parasiticus*ban (Hong és munkatársai, 2013a). Az oxidatív stresszválasz, továbbá a szekunder metabolitok termelésében szerepet játszó gének koregulációja számos gombafajban arra enged következtetni, hogy a ROS által kiváltott oxidatív stresszre adott válasz első védelmi vonalát az antioxidáns molekulák, míg második védelmi vonalát a szekunder metabolitok alkotják (Roze és munkatársai, 2011; Yin és munkatársai, 2012; Hong és munkatársai, 2013b). Az Atf1/AtfA transzkripciós faktorok kiemelkedő szerepét az oxidatív stresszválasz kialakításában számos kutatás bizonyította különféle gombafajokban, amely arra enged következtetni, hogy kísérleteinkkel összhangban ezen transzkripciós faktorok fontosak lehetnek a szekunder metabolitok bioszintézisének szabályozásában is. *F. graminearum*ban az $\Delta Fgatf1$ géndeléciós mutáns fokozott rezisztanciát mutatott hidrogén-peroxiddal szemben 10, 15, illetve 20 mM-al kiegészített tápagarokon tesztelve a vad típushoz képest. Ezen megfigyeléssel párhuzamosan a deléciós törzs 3.5-1,7× több dezoxinivalenolt termelt 1, illetve 3 nap inkubációt követően, mint a vad típusú PH-1 törzs. A megemelkedett DON termeléssel összhangban a bioszintézisben résztvevő kulcsenzimeket kódoló *tri4*, *tri5*, *tri6*, és *tri10* gének szignifikáns upregulációja volt megfigyelhető. A zearalenon termelésében ugyanakkor nem volt különbség a deléciós mutáns és a vad típus esetében in vitro körülmények között, amelyet alátámasztott a ZEA bioszintézisében résztvevő gének (*zeal*, *zeb1*, *zeb2*) közel azonos transzkripciós szintje is (Nguyen és munkatársai, 2013).

A $\Delta Bcatf1$ mutáns szignifikánsan több botridiált, botriéndiált és botcinin A fitotoxinokat termelt, amelyek bioszintézisében résztvevő kulcsének upregulációja volt megfigyelhető. A

stresszmentes körülmények között növekvő vad típusú, illetve *bcatf1* deléciós mutánsból származó totál mRNS minták szekvenálása rávilágított arra, hogy az Atf1/AtfA ortológ BcAtf1 transzkripciós faktornak mekkora szerepe van a szekunder metabolitok bioszintézisében résztvevő gének szabályozásában: 511 gén, köztük 34 feltehetően szekunder metabolitok szintézisében résztvevő gén expressziója tért el a deléciós mutánsban a vad típusú törzshöz képest, amelyek közül 26 upregulálódott, míg 8 downregulálódott (Temme és munkatársai, 2012).

A Lara-Rojas és munkatársai (2011) megállapították, hogy a SakA/HogA MAPK-ok fizikálisan interakcióba lépnek az AtfA transzkripciós faktoralal *A. nidulans*ban, azonban jövőbeni kísérletek szükségesek, hiszen még nem áll elegendő információ rendelkezésre az Atf1/AtfA homológok upstream szabályozásában résztvevő MAP kinázokról. Kohut és munkatársai (2009) vizsgálták a nitrogénéhezés hatását a fumonizinek termelésére *F. proliferatum* *Fphog1* deléciós mutánsában. Kísérleteikben a *fum1* és *fum8* gének expressziójában bekövetkező átmeneti emelkedést követően a fumonizinek rövid időn belüli termelését figyelték meg. A korai emelkedést a génexpressziós szintekben a $\Delta Fphog1$ törzs nitrogénéhezéssel szembeni érzékenységevel magyarázták a Hog1 MAPK útvonal elvesztése miatt. Ezzel szemben *F. verticillioides*ben a Fus3/Kss1 MAPK-t kódoló *Fvfmk1* gén deléciójakor csökkent *fum1* és *fum8* expressziós, valamint alacsonyabb fumonizin szinteket mértek, hasonlóan az általunk tapasztalt megfigyelésekhez (Zhang és munkatársai, 2011). Segorbe és munkatársai (2017) *F. oxysporum*ban leírták, hogy mind pozitív, mind negatív “crosstalk” figyelhető meg az *Fvfmk1*, *Mpk1* és Hog1 MAPK-ok között a stresszhez való adaptáció során. Ebből arra következtethetünk, hogy a stresszválaszt szabályozó transzkripciós faktorok, mint amilyen az *FvAtfA* is, különféle szignáltranszdukciós útvonalakon keresztül is aktiválódhatnak, amely azonban függ mind a gombafajtól, mint a környezeti körülményektől.

Hasonlóan az *FvatfA* deléciós törzshöz fokozott vöröses elszíneződést figyeltek meg Nguyen és munkatársai (2013). A *F. graminearum* *Fgatf1* gén deléciója a vörös színű aurofusarin túltermelését idézte elő. A bioszintézisben résztvevő kiválasztott gének (*gip1*, *gip2*, és *pks12*) upregulálódtak. A szintén kukoricára is patogén *F. proliferatum* *Fpacy1* génjének deléciója hasonlóan a megfigyeléseinkhez a bikaverin túltermelését okozta nitrogén limitáció alatt (Kohut és munkatársai, 2010), míg a *F. verticillioides* *gac1* GTPáz-aktiváló fehérjéjét kódoló gén deléciós mutánsában szintén megnövekedett bikaverin kihozataalt figyeltek meg (Choi és munkatársai, 2008).

Osman és Valadon (1984) kísérleteikben azt találták, hogy a bikaverin hatásosnak bizonyult *Helminthosporium oryzae*, *Penicillium notatum*, *Alternaria humicola* és *Aspergillus*

flavus ellen, míg az *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans* és *Fusarium* fajok növekedését nem gátolta.

Számos gombafaj használható fel biokontroll ágensként patogén mikroorganizmusok, így növénykárosító gombafajok ellen is. Néhány, kereskedelmi forgalomban már kapható példa a teljesség igénye nélkül: *Trichoderma harzianum*, amely hatásos a *Botrytis cinerea*, *Fusarium*, *Pythium* és *Rhizoctonia* fajok ellen (Khetan, 2001); *Chaetomium globosum* és *C. cupreum*, amelyek hatásosnak bizonyultak *Fusarium*, *Phytophthora* és *Pythium* fajok okozta gyökérrothadással szemben (Soytong és munkatársai, 2001); továbbá nem patogén *Fusarium oxysporum* izolátumok biokontrollként használhatóak fel patogén *F. oxysporum* ellen (Fravel, 2003). A jövőben érdemes lenne a $\Delta FvatfA$ törzs, mint lehetséges mikofungicid alkalmazását is megvizsgálni különféle növénypatogén fonalas gombák ellen.

Hasonló alul-regulációt figyeltek meg a karotinoidok bioszintézisében Ádám és munkatársai (2011) a *F. verticillioides* $\Delta FvMAT1-2-1$ deléciós törzsében, amely arra enged következtetni, hogy az *FvAtfA* és *MAT* gének szerepet játszanak a karotenogenezis szabályozásában. *F. graminearum*ban a *MAT* gének expressziója a white-collar komplex szabályozása alatt áll. Kim és munkatársai (2014) kísérleteikben a WC komplex fehérjéit kódoló gének hiánymutánsait állították elő *F. graminearum*ban. Kísérleteikben azt tapasztalták, hogy a *MAT* gének expressziója a white-collar komplex szabályozása alatt áll: a *MAT* gének expressziós szintje közel háromszor magasabb volt a $\Delta FgWc-1$, $\Delta FgWc-2$ mutánsokban, mint a vad típusú törzsben, a deléció azonban nem volt hatással a gomba növekedésére és pigmenttermelésére. *N. crassaban* számos transzkripciós faktor expressziója fény, illetve cirkadián függő, amelyet a WC komplex szabályoz. Munoz-Guzmán és munkatársai (2021) kísérleteikben cirkadián ritmusra ható transzkripciós faktorokat kerestek *N. crassaban*. 23 olyan transzkripciós faktort találtak, amelyek hiányában a cirkadián ritmus sérült, ezen transzkripciós faktorok szerepe még nem teljesen tisztázott, annyi azonban kiderült, hogy részt vesznek többek között a vegetatív növekedésben, sporulációban, a különféle szénforrások hasznosításában, az oxidatív stressz elleni védelemben, továbbá a sejtfalintegritás fenntartásában. Ezen megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az *FvatfA* deléciós mutáns esetében tapasztalt szignifikáns különbség a karotinoidok termelésében összefüggésben állhat a WC komplex karotenogenezisben résztvevő génjeinek *FvAtfA* transzkripciós faktoron keresztüli szabályozásával, amely hipotézist a jövőben kísérletesen is alá kell támasztani.

A *F. verticillioides* az általunk vizsgált szekunder metabolitokon kívül fuzarinsavat, fuzarin C-t, valamint nyomnyi mennyiségben beauvericint is képes termelni (Leslie és Summerell, 2006). A legnagyobb mennyiségben előforduló FB1 és FB2 mellett, kisebb mennyiségben

előfordulhatnak a fumonizin A, B, C és P csoportba tartozó molekulák, valamint ezek maszkolt, illetve részlegesen hidrolizált formái is (Lazzaro és munkatársai, 2012). Kísérletesen érdemes volna vizsgálni az *FvAtfA* gén deléciójának hatását ezen kisebb mennyiségben termelődő molekulák bioszintézisére laboratóriumi körülmények között indukáló (pl. az általunk is használt Myro táptalajon), illetve kukorica alapú (pl. kukoricadarából készült) táptalajokon vizsgálva (Han és munkatársai, 2014, Lazzaro és munkatársai, 2012). Az extrahált szekunder metabolitok egyidejű vizsgálatára legegyszerűbb módszerként a LC/MS-MS használható fel, amely segítségével a vad típusú és deléciós törzsek szekunder metabolit profilját térképezhetjük fel (Dall’Asta és munkatársai, 2008, Rubert és munkatársai, 2015).

Eredményeink alapján összességében elmondható, hogy (i) az *FvatfA* gén deléciójának hatására megszűnt a fumonizinek termelése; (ii) az *FvAtfA* transzkripciós faktor számos gén szabályozásában részt vesz, az *FvatfA* gén kiesése teljesen átrendezi a szekunder-metabolit profilt, amely így prekursor molekulák felhalmozódásához és más anyagcsere utakban való felhasználásához vezet; (iii) a szekunder metabolitok termelése a fonalas gombákban az oxidatív stresszel szembeni másodlagos védelmi vonalat alkot, amely elméletet alátámasztja a tény, hogy az oxidatív stresszválasz kialakításában résztvevő Atf1/AtfA ortológ *FvAtfA* transzkripciós faktor szükséges a 2.3.2 fejezetben már ismertetett antioxidáns hatással bíró karotinoidek termeléséhez.

4.2 Az *FvnmSOD* gén jellemzése *F. verticillioides*ben

4.2.1. Az *FvnmSOD* gén inaktiválása

4.2.1.1. Az *FvnmSOD* deléciós konstrukció létrehozása és transzformálása a *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsbe

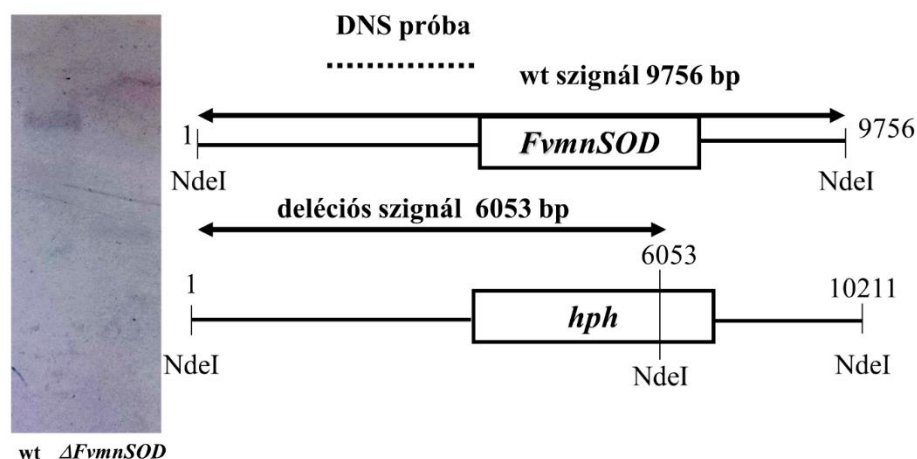
Az *FvnmSOD* gén funkciójának megállapításához a gént specifikusan elrontottuk. A géndeléciós kazettát double-joint PCR (Yu és munkatársai, 2004) segítségével hoztuk létre; a kazettában az *FvnmSOD* ORF-t a higromicin foszfortranszferáz enzimet kódoló *hph* génre cseréltük. Az első kör PCR során külön csövekben a gén előtti és a gén utáni határoló szakaszokat, valamint a *hph* kazettát szaporítottuk fel, majd a második, úgynevezett joint PCR során egy csőbe összeszerve az átfedő régiók segítségével a darabok összekapcsolódtak. A PCR harmadik körében a nested primerpár segítségével szaporítottuk fel a géndeléciós kazettát, amellyel a protoplasztokat transzformáltuk. A higromicinre rezisztens transzformáns telepek 7-15 nap elteltével jelentek meg a regeneráltató csészéken, ekkor átoltottuk őket 100 µg/ml higromicin B-t tartalmazó Czapek-Dox táptalajra. Összesen 20 db transzformánst kaptunk.

4.2.1.2. A transzformánsok ellenőrzése

Az átoltást követően a transzformáns telepekből genomi DNS-t izoláltunk, majd PCR segítségével az *FvnmSODupfwd* és *FvnmSODdownrev* primerek segítségével próbáltuk a kettős homológ rekombinációt kiszűrni. Az így kapott PCR terméket *HindIII* és *NdeI* restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd a vad típusú gén és a géndeléciós kazetta eltérő emésztési mintázatát 0,5% agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük vissza. A géndeléciós kazetta emésztési mintázatát mutató telepből származó genomi DNS felhasználásával Southern blot analízist végeztünk el, amellyel igazoltuk a géndeléciós kazetta egyszeres, megfelelő helyre történő beépülését (22. ábra). A potenciális deléciós mutáns, valamint a vad típusú törzsből származó genomi DNS-t az *NdeI* restrikciós endonukleázzal emésztettük, próbaként a gén előtti 5' szakaszt használtuk fel, amelyet az *FvnmSODupfwd* és az *FvnmSODupkimrev* primerpár segítségével szaporítottunk fel, majd DIG-gel jelöltünk és tettük láthatóvá. Az *FvnmSOD* próbával a vad típusnak egy hosszabb, 9756 bp hosszúságú fragmentumot kellett adnia, míg a deléciós mutáns egy rövidebb, 6053 bp hosszúságú fragmentumot adott, amelyet a *hph* kazetta beépülésével a lókuszon létrejövő új *NdeI* hasítóhely okozott.

A Southern blot hibridizáció igazolta, hogy a $\Delta FvnmSOD$ törzsben az általunk molekulárisan elrontott *FvnmSOD* gén található, továbbá, hogy a géndeléciós kazetta a kettős

homológ rekombináció során jó helyre, egyszerűen épült be, ami lehetővé teszi a vad típusú törzzsel való összehasonlítást, ezáltal az *FvmnSOD* gén funkcionális jellemzését.

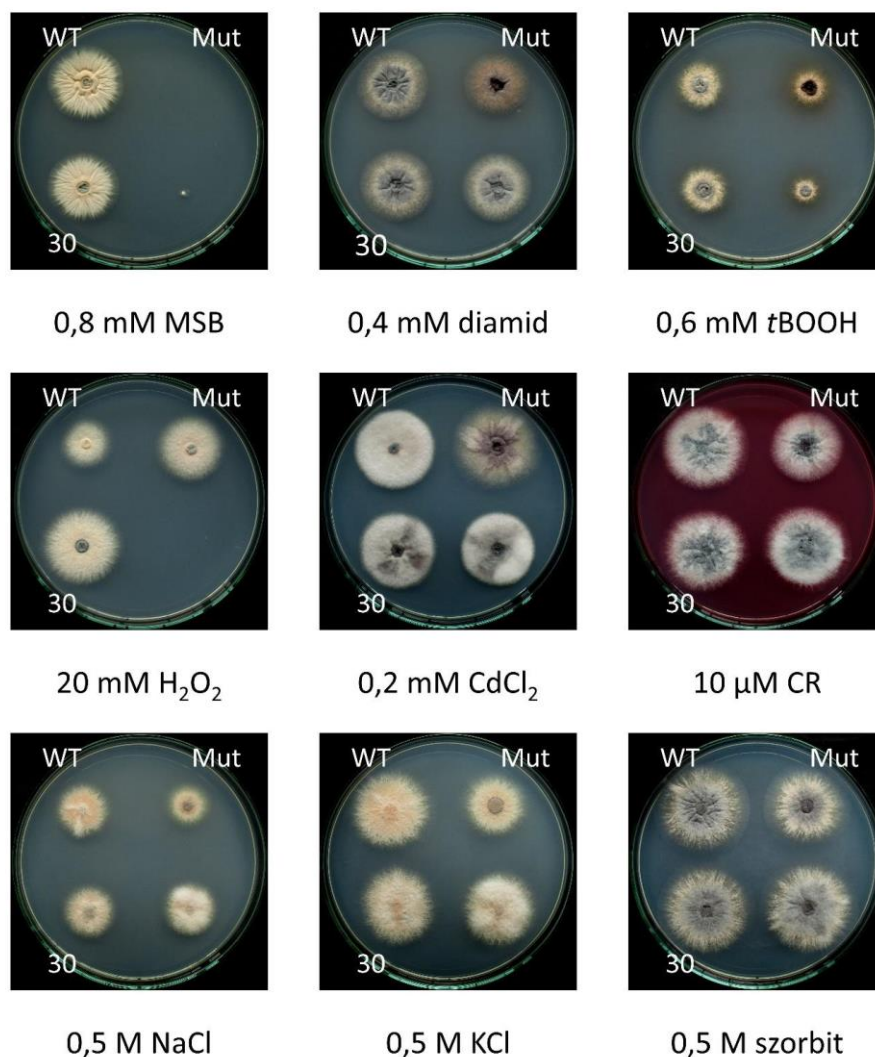


22. ábra Az *FvmnSOD* gén inaktiválása. Az ábrán a körülbelül 10 kb hosszúságú *FvmnSOD* gént tartalmazó genomi régió látható az *NdeI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyeivel a vad típusú FGSC 7600 és $\Delta FvmnSOD$ deléciós mutánsban. A szaggatott vonal a DNS próbát jelöli, amely hibridizálódva a vad típusú törzsből egy 9756 bp hosszúságú, míg a deléciós mutánsban egy 6053 bp hosszúságú jelet adott. Jelölések: wt: vad típus

4.1.2.3. Az *FvmnSOD* gén hiányának komplementálása

Azért, hogy a továbbiakban igazolni tudjuk, hogy a kísérleteink során kapott fenotípusos különbségek az *FvmnSOD* gén hiányából erednek, szükség volt a mutáció helyreállítására, azaz működőképes *FvmnSOD* gén bevitelével komplementált törzs létrehozására. A komplementáló kazettát single-joint PCR segítségével hoztuk létre, amelynek során az *FvmnSOD* ORF-t a promóter és terminátor régióikkal együtt amplifikáltuk az *FvmnSODcompkimfwd* és *FvmnSODrev* primerpárokkal, majd a geneticin foszfortranszferáz enzimet kódoló *gen* génhez fuzionáltattuk az átfedő szakasz segítségével. Az így létrehozott komplementáló kazettával a $\Delta FvmnSOD$ törzsből létrehozott protoplasztokat transzformáltuk, majd geneticint és higromicint is tartalmazó regeneráló csészékre szélesztettük. A megjelenő transzformánsokat több lépcsős ellenőrzésnek vetettük alá.

Az *FvmnSOD* kópiaszámának meghatározását megelőzően a potenciálisan komplementálódott törzseket stresszkísérleteknek vetettük alá, hogy igazoljuk, a komplementáló kazetta integrációja a genomba nem okozott fenotípusos változást a vad típusú törzshöz képest. A Petri-csészéken végzett stressz-kísérletek alapján láthatjuk, hogy az *FvmnSOD* 'C (30-as számmal jelzett) komplementált törzse a vad típusúhoz hasonlóan viselkedett, tehát a törzs fenotípusos helyreállása közel maradéktalan volt (23. ábra).



23. ábra Az FvMnSOD komplementált törzsek fenotípusos helyreállításának vizsgálata különféle stresszágensek jelenlétében. A WT a vad típust, a Mut az *FvmnSOD* deléciós mutánst, míg a 30 az *FvmnSOD* 'C komplementált törzset jelöli.

A stressz-kísérletek eredményei alapján kiválasztottuk a vad típushoz leginkább hasonlító komplementált törzseket; ezekből genom DNS-t izoláltunk, majd PCR elegyet mértünk össze a geneticin kazettára, illetve az *FvmnSOD* génre. Az *FvmnSOD* gént tartalmazó PCR termékeket *Bam*HI és *Pts*I restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd 0,6%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az így kapott emésztési mintázatokat.

A stressz-kísérletek, valamint a PCR-es ellenőrzést követően nagy valószínűséggel feltételezhető volt, hogy a 30-as jelzésű törzsben állt helyre leginkább a vad típusra jellemző fenotípus, ezért ebben a komplementált törzsben határoztuk meg az *FvmnSOD* gén kópiaszámát.

A törzsek kópiaszámát a 3.8. alfejezetben ismertetett módon számítottuk ki. Az eredményeinkből kiderült, hogy a komplementált törzsben az *FvmnSOD* gén egy kópiában van

jelen. A kísérletek során kapott egyenesek egyenletét, a reprodukálhatóságot, valamint a kópiaszámokat a 10. táblázatban tüntettem fel.

10. táblázat Az *FvnmSOD* 'C komplementált törzs kópiaszáma

Törzs	<i>FvnmSOD</i> (FVEG_11192)	R ²	<i>FvatfA</i> (FVEG_02866)	R ²	Kópiaszám
<i>FvnmSOD</i> 'C	$y = -4,99x + 27,29$	0.99	$y = -4,57x + 30,60$	1,00	1.00±0.01

4.2.2. A $\Delta FvnmSOD$ törzs fenotípusos jellemzése

4.2.2.1. Az *FvnmSOD* gén szerepe a *F. verticillioides* stresszérzékenységében

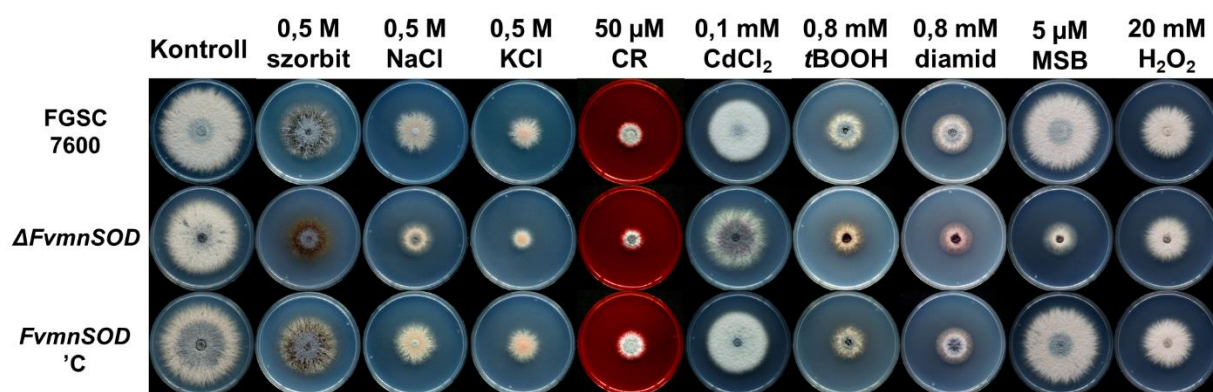
Megvizsgáltuk, milyen hatással volt az *FvnmSOD* gén deléciója a *F. verticillioides* stresszérzékenységére. Az előzetes kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a mutáns a vad típusú törzssel azonosan növekedett Czapek-Dox táptalajon, és a növekedés ütemében vagy a konídiumok termelésében sem volt a deléciós mutáns és szülői törzs között különbség.

Az ozmotikus, oxidatív, sejtfal és nehézfém stressz hatását Czapek-Dox táptalaj-sorozaton vizsgáltuk, a 3.11. alfejezetben felsorolt vegyületek valamelyikével kiegészített agarlemezekon. A felnőtt telepek átmérőit 6 nap elteltével lemértük és fényképet készítettünk. Az egyutas ANOVA analízishez a relatív növekedés százalékban megadott értékeit használtuk fel.

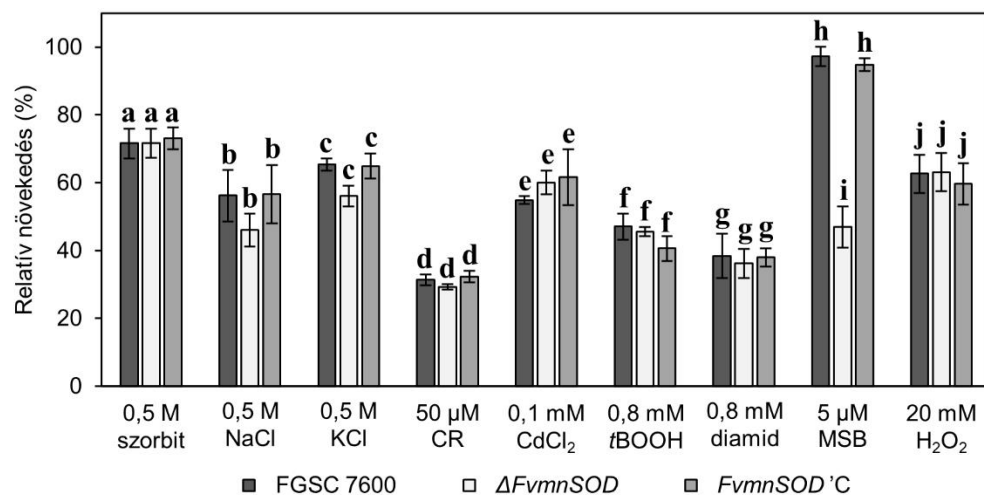
Az *FvnmSOD* gén deléciója fokozott érzékenységet okozott a szuperoxid stresszt kiváltó menadionnal szemben a deléciós mutánsban a vad típusú FGSC 7600 törzshöz képest. Annak ellenére, hogy a törzsek relatív növekedésében nem volt számottevő különbség NaCl, KCl, és *tBOOH* esetén, a $\Delta FvnmSOD$ telepek morfológiája kissé eltért a vad típusétól (24. ábra A része, az egyutas ANOVA analízis eredményeit az M4.2. mellékletben található táblázat, míg a kétutas ANOVA analízis eredményeit az M5.2. táblázat foglalja össze).

A *P. crhysogenum* antifungális fehérjéje (PAF) az érzékeny gombákban apoptózist vált ki (Leiter és munkatársai, 2005). Annak eldöntésére, részt vesz-e az *FvnmSOD* gén a PAF-fal szembeni védelemben, a törzseket 100 µg/ml PAF-fal kiegészített Czapek-Dox táptalajra oltottuk le. A deléciós mutáns érzékenynek bizonyult a PAF által kiváltott apoptotikus sejthalállal szemben (25. ábra, az egyutas ANOVA analízis eredményeit az M4.2. mellékletben található táblázat, míg a kétutas ANOVA analízis eredményeit az M5.2. táblázat foglalja össze).

A



B

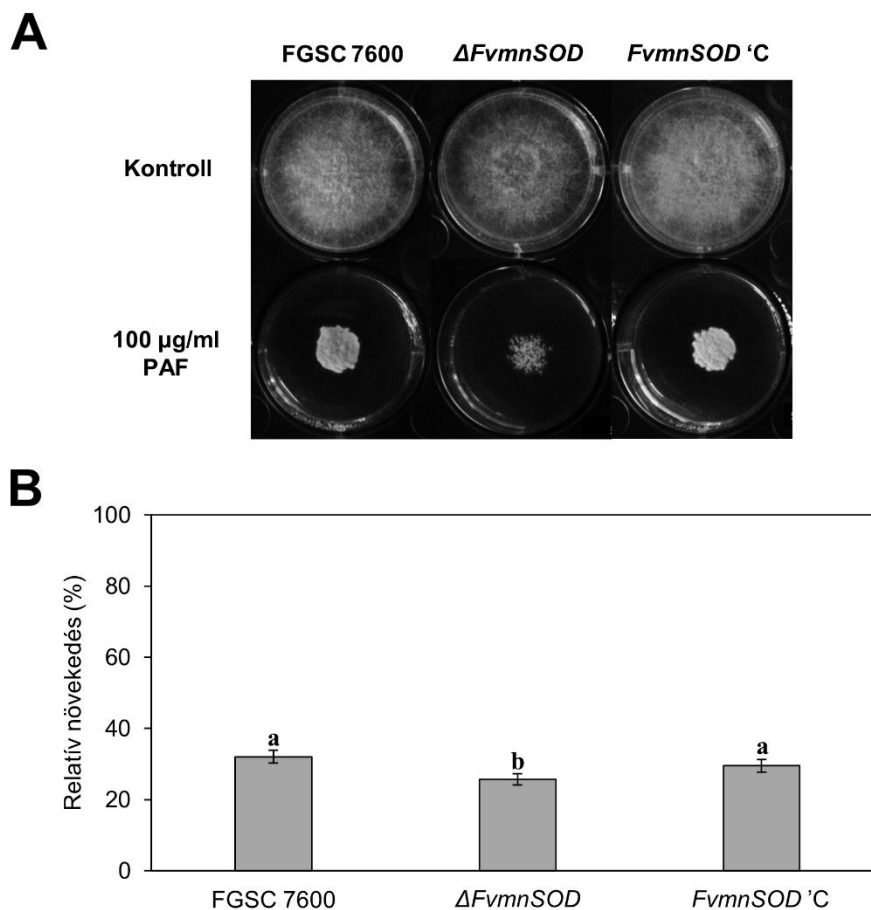


24. ábra A törzsek növekedésének összehasonlítása ozmotikus, oxidatív, nehézfém és sejtfal-stressz jelenlétében. Az A rész esetén egy kísérletről készült reprezentatív fényképek láthatóak, míg a B rész a törzsek százalékosan megadott relatív növekedésének átlagát és szórását mutatja be. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.

4.2.2.2. Az *FvmnSOD* gén szerepe a fumonizinek termelésében

Az oxidatív stressz és a mikotoxinok termelése között összefüggés található. Ponts és munkatársai (2009) kísérleteikben *F. graminearum* tenyészetekhez oxidatív stresszt kiváltó vegyületeket, így hidrogén-peroxidot, illetve diamidot adtak, majd vizsgálták a B típusú trichothecének termelését. Eredményeik azt mutatták, hogy a megnövekedett ROS szintek a táptalajban indukálták a dezoxinivalenol és a 15-acetil-dezoxinivalenol bioszintézisét, ezért mi is megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az *FvmnSOD* gén deléciója a *F. verticillioides* FB1 és FB2 termelését.

Amint az a 26. ábrán látható, az *FvnmSOD* gén deléciója nem befolyásolta a FB1 és FB2 termelését annak ellenére, hogy a $\Delta FvnmSOD$ törzs fokozott érzékenységet mutatott a szuperoxid stresszt kiváltó MSB-vel szemben (az egyutas ANOVA analízis eredménye megtekinthető az M4.2. melléklet táblázatában).

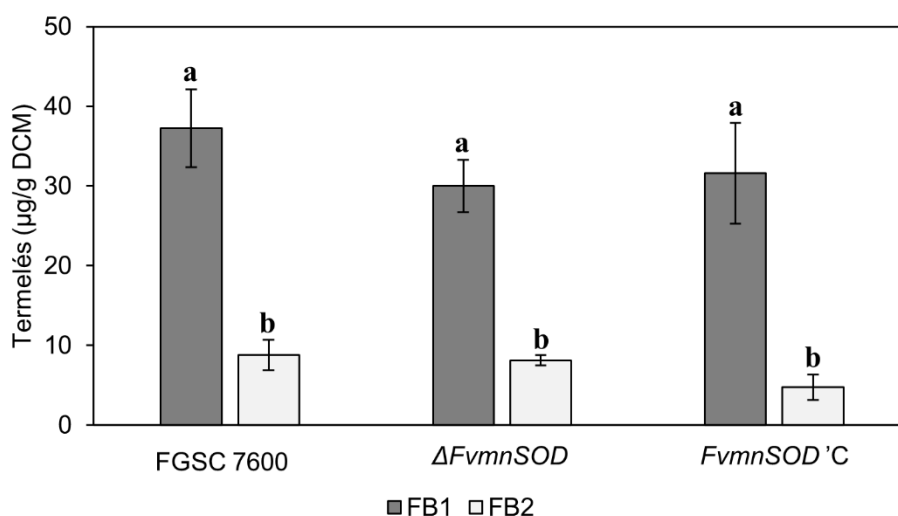


25. ábra A törzsek PAF érzékenységének összehasonlítása. Az rész esetén egy kísérletről készült reprezentatív fényképek láthatóak, míg a B rész a törzsek százalékban megadott relatív növekedésének átlagát és szórását mutatja be. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.

4.2.2.3. Az *FvnmSOD* gén szerepe a *F. verticillioides* légzésében és a mitokondriumok morfológiájában

A mitokondriumok térfogatfoglalását lézer konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg az apikális második hifaszegmensekben. Az *FvnmSOD* gén deléciójának hatására a mitokondriumok százalékos térfogatfoglalása megnőtt az általunk vizsgált régiókban. Érdekes módon ezen megfigyeléssel párhuzamosan azt tapasztaltuk, hogy az *FvnmSOD* gén hiánya nincs hatással az intracelluláris relatív szuperoxid gyökök szintjére a hifákban. Továbbá, azt is

megállapítottuk, hogy a deléciós mutánsban a hifák átmérője szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusban (27. ábra és M4.2. melléklet).

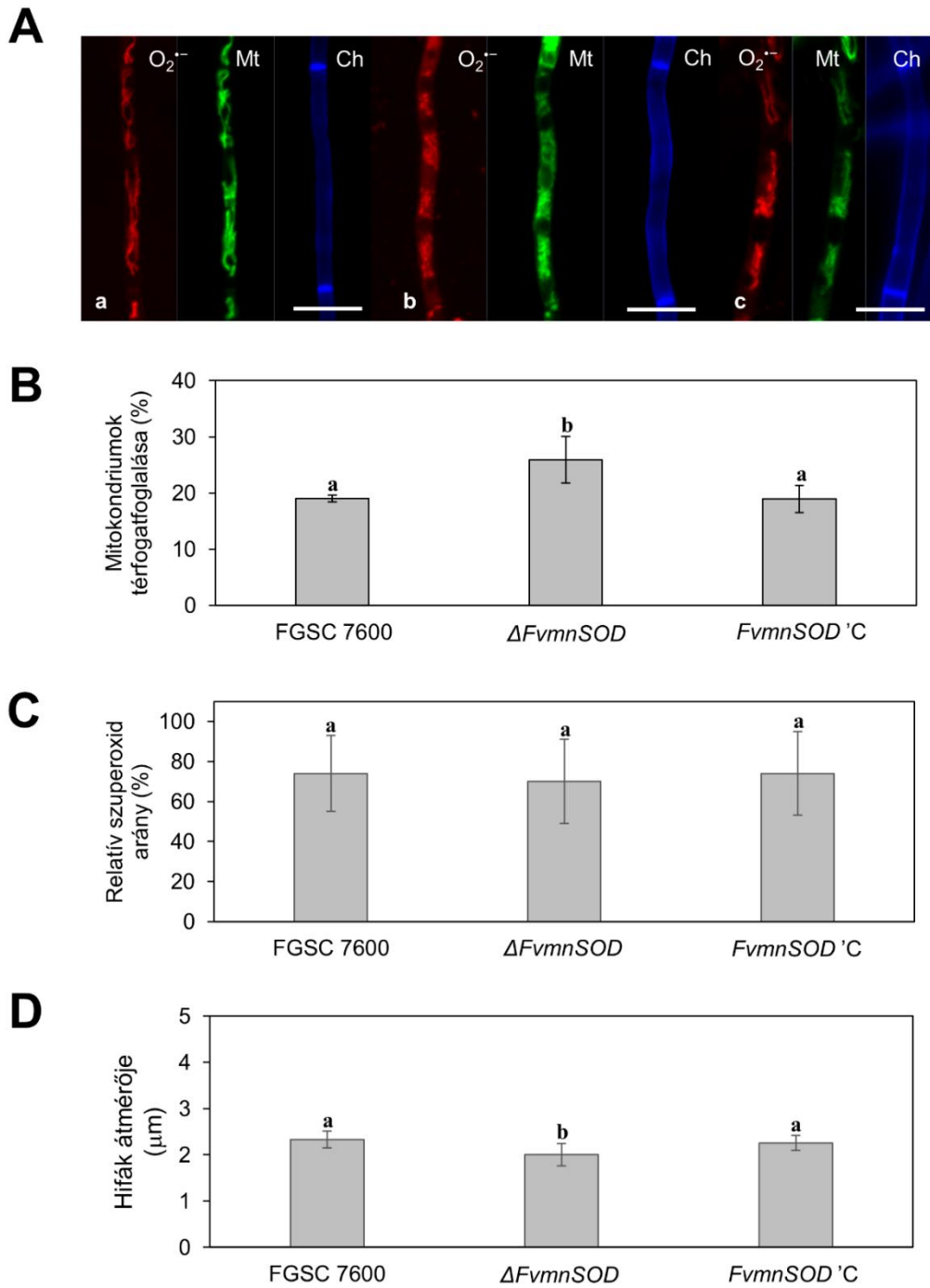


26. ábra A törzsek FB1 és FB2 termelő képességének összehasonlítása. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.

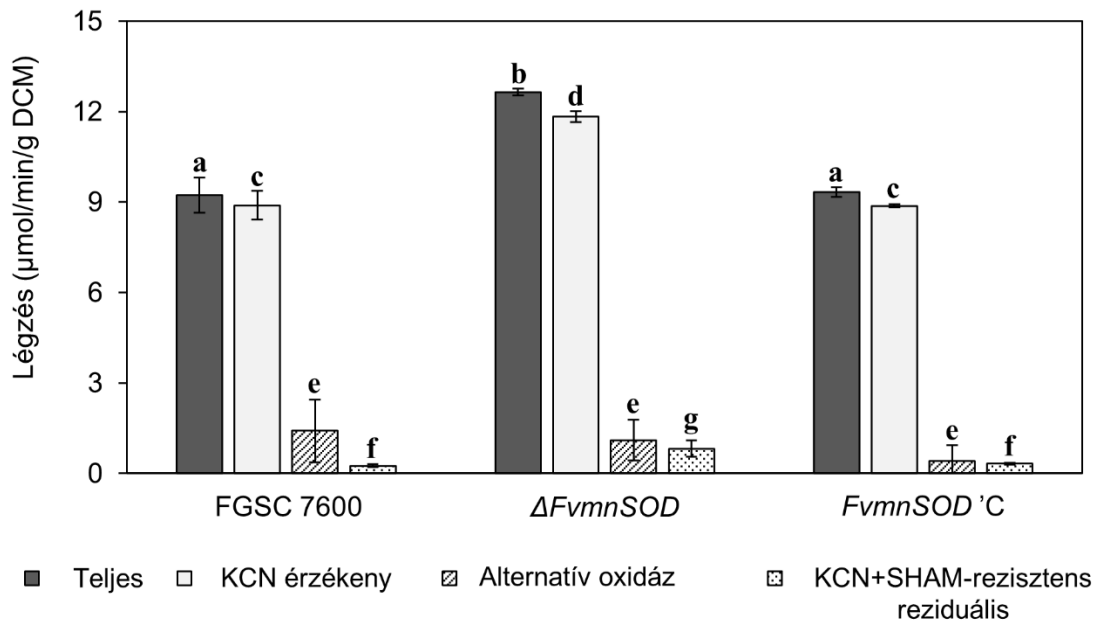
Mivel a légzés színtere a mitokondriumokban van, így a teljes, KCN-érzékeny citokróm c-függő, SHAM-érzékeny alternatív oxidáz, valamint KCN+SHAM-rezisztens reziduális légzéseket vizsgáltuk exponenciálisan növekvő süllyesztett kultúrákból származó micéliumok esetében (28. ábra és M4.2. melléklet). A teljes, KCN-érzékeny és reziduális légzések szintje szignifikánsan magasabb volt a deléciós mutánsban. Az *FvmnSOD* gén deléciója nem volt hatással a *F. verticillioides* alternatív oxidáz-függő légzésére. Amikor a légzési rátákat elosztottuk a mitokondriumok térfoglalásával azt tapasztaltuk, hogy nincs szignifikáns különbség a normalizált légzési rátákban a vad típusú és a $\Delta FvmnSOD$ deléciós mutáns között.

4.2.2.4 Az *FvmnSOD* gén hatása az invazív növekedésre és a szexuális szaporodásra

Célkitűzéseinknek megfelelően tesztelni szeretnénk volna, hogy az *FvmnSOD* gén deléciója okoz-e változást a szexuális szaporodás terén. A keresztezési kísérlethez a vad típusú FGSC 7600 (MATA-1), FGSC 7603 (MATA-2), $\Delta FvmnSOD$ mutánst, valamint az *FvmnSOD* 'C komplementált törzset használtuk fel. A törzseket női partnerként alkalmazva répás agaron azt tapasztaltuk, hogy az *FvmnSOD* gén deléciója nem okozott női sterilitást; a vad típus átlagosan 30, a $\Delta FvmnSOD$ 38, *FvmnSOD* 'C törzs 18 peritéciumot termelt, amely arra enged következtetni,



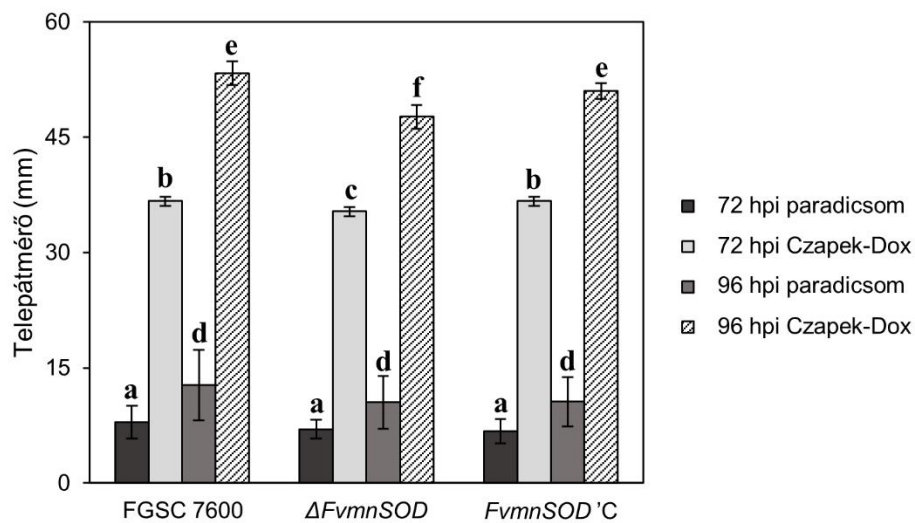
27. ábra A mitokondriumok morfológiájának vizsgálata. Az A rész a lézer konfokális mikroszkóppal készített felvételeket mutatja, ahol a piros csatorna az intracelluláris szuperoxid gyököket, míg a zöld csatorna a mitokondriumokat, a kék pedig a megfestett kitint jelöli. A B rész a mitokondriumok százalékos térfogatfoglalását, a C rész a relatív szuperoxid szinteket, míg a D rész a hifák átmérőjét mutatja be. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között.



28. ábra A vad típusú, *FvnmSOD* géndeléciós és komplementált törzsek légzésének vizsgálata. Az teljes, KCN-érzékeny, alternatív oxidáz (AOX) és KCN+SHAM-rezisztens reziduális légzési ráták ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g DCM}$) exponenciálisan növekvő micéliumokban. A KCN-érzékeny és AOX-függő légzéseket a mért KCN-rezisztens, valamint KCN+SHAM-rezisztens légzési ráták teljes légzésből való kivonásával kaptuk meg. A vad típusúhoz képest statisztikailag szignifikáns különbségeket ANOVA analízissel számítottuk ki, amelyet az eltérő betűk jelölnek.

hogy a női fertilitása mindegyik törzsnek erősen redukált volt (30. ábra). A nagyobb (~ 3 mm) peritéciumokat bonctűvel szétnyomkodva az FGSC 7600 vad típusú törzsben három, a $\Delta FvnmSOD$ törzsben négy érett, aszkuszt is adó peritéciumot találtunk.

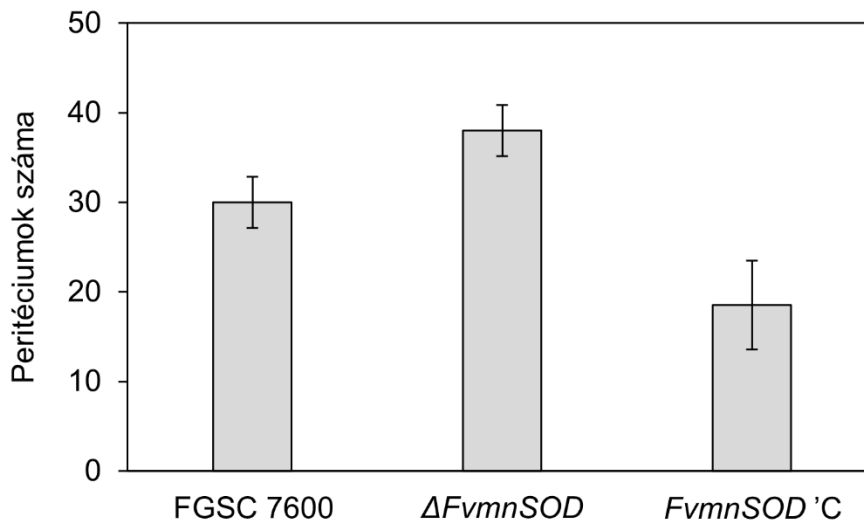
A vad típusú, deléciós mutáns és komplementált törzsek invazív növekedését paradicsombogyón vizsgáltuk (29. ábra, M4.2. táblázat). Aktívan növekvő tenyészetekből kivágott agarkorongokat helyeztünk a felületsterilizált paradicsomok felszínére, majd az inokulálást követően 72, illetve 96 órával (hpi) lemértük a telepek átmérőjét, valamint fényképet készítettünk a paradicsombogyókról. A vad típus esetében a telepek átmérőjének átlaga 7,92 és 12,75 mm volt (72, illetve 96 óra elteltével), míg a deléciós mutáns esetében 7,00 és 10,50 mm átmérőjű telepeket figyeltünk meg. Nem tapasztaltunk különbséget a növekedésben agarkorongokat Czapek-Dox tápagar felszínére helyezve sem. Eredményeinkből arra lehet következtetni, hogy az *FvnmSOD* gén nem játszik szerepet sem a szexuális szaporodásban, sem az invazív növekedésben sem.

A**B**

29. ábra A törzsek invazív növekedésének összehasonlítása. Az A rész egy reprezentatív kísérletet, míg a B rész a telepátmérők statisztikai elemzését mutatja be. A különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes törzsek között

4.2.3. Az *FvnmSOD* génnel kapcsolatos eredmények megvitatása

A molekuláris oxigénből egy elektron felvételével keletkező szuperoxid gyököt a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek alakítják tovább hidrogén-peroxiddá. A szuperoxid dizmutázok olyan metalloproteinek, amelyeknek jelenleg négy izoformáját ismerjük: réz-cink-szuperoxid dizmutázok (Cu/ZnSOD), mangán-szuperoxid dizmutázok (MnSOD), vas-szuperoxid dizmutázok (FeSOD) és nikkell-szuperoxid dizmutázok (NiSOD), amelyek közül a legősibb forma a MnSOD, amely prokariótákban és az eukarióták kloroplasztisz- és mitokondriális mátrixában, valamint glioxiszómákban található (Fridovich, 1995; Baum és Scandalios, 1979; Henry és munkatársai, 1980; Sandalio és Río, 1987; Britton és Fridovich; 1977).



30. ábra A törzsek szexuális szaporodásának összehasonlítása.

Az *A. nidulans* mitokondriális MnSOD enzim ortológját *F. verticillioides*ben az NCBI blastp algoritmus segítségével kerestük meg. Ezt követően double-joint PCR technika segítségével deléciós kazettát készítettünk, amelyben markerként a higromicin foszfotransferáz kódoló *hph* gént használtuk fel. A deléciós kazettát PEG mediált transzformálással vittük be a vad típusú FGSC 7600 törzs fiatal tenyészetéből létrehozott protoplastokba. A géndeléciós kazetta egyszeres és jó helyre történő beépülését Southern blot módszerrel ellenőriztük. Végül single-joint PCR segítségével komplementáló kazettát készítettünk a vad típusú *FvnmSOD* génből, amelyhez markerként a neomicin foszfotransferáz enzimet kódoló *gen* gént használtuk. A $\Delta FvnmSOD$ törzsbe végül a komplementáló kazettát transzformálva komplementált törzseket hoztunk létre.

A szakirodalomban fellelhető *FvnmSOD* ortológok deléciós mutánsai érzékenyek voltak a különféle környezeti stresszekkel szemben. Hasonlóan az általunk tapasztaltakhoz az *A. nidulans* $\Delta mnSOD$ törzs fokozott érzékenységet mutatott a szuperoxid stresszt kiváltó MSB-vel, valamint a *P. chrysogenum* antifungális fehérje (PAF) által kiváltott apoptózissal szemben is (Leiter és munkatársai, 2016), míg a *F. graminearum*ban elkészített $\Delta FgSOD2$ törzs növekedését 10 μ M MSB teljesen gátolta (Furukawa és munkatársai, 2017).

Az *A. nidulans* $\Delta mnSOD$ és az *OE::mnSOD* törzsek szénéhező süllyesztett tenyészetei szignifikánsabban több szterigmatocisztint termeltek, mint a vad típusú törzs (Leiter és munkatársai, 2016). *F. graminearum*ban az MnSOD enzimet kódoló *Fgsod2* gén deléciójának hatására a trichotecén 3-ADON termelésének szintje csökkent a vad típusúhoz képest, valamint mérhetően kevesebb volt a toxin termeléséért felelős génklaszter két tagjának, a *Tri5* és a *Tri6* génekről átvitt mRNS-eknek a mennyisége (Furukawa és munkatársai, 2017). Ezzel szemben

eredményeink azt mutatták, hogy az *FvMnSOD* gén nem játszik szerepet a szekunder metabolitok, így a fumonizinek bioszintézisében.

Az *A. nidulans mnSOD* gén inaktivációjának hatására az öregedő tenyészetekben csökkent összes és KCN+SHAM-reszisztens reziduális légzési értékeket mért – hasonlóan a $\Delta FvMnSOD$ fiatal tenyészeiben tapasztaltakhoz – Leiter és munkatársai (2016), azonban a mitokondriális morfológia nem változott. A *C. albicans SOD2/SOD2* deléciós mutánsában az alternatív oxidáz-függő légzés drasztikusan megnövekedett, amely megfigyelés azzal volt magyarázható, hogy a mitokondriális mangán-szuperoxid dizmutáz enzim a szuperoxid gyökök eliminálását nem csak a ROS neutralizálásán, hanem az alternatív oxidáz modulációján keresztül is érte el. (Hwang és munkatársai, 2003).

Leiter és munkatársai (2016) azt tapasztalták, hogy *A. nidulans*-ban az *mnSOD* gén túltermelése csökkent kleisztotécium képződést eredményezett: az *mnSOD::OE* törzs nem termelt kleisztotéciumokat 5 nap inkubálást követően, míg 8 nap elteltével a vad típushoz képest szignifikáns mértékben csökkent mennyiségű kleisztotécium termelődött.

A SOD enzimek számos növényi patogén fonalas gombában a virulencia részét képezik (Heller és Tudzynski, 2011). A *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* gyapotnövényeket fertőzve annak hervadásáért felelős. Wang és munkatársai (2021) az extracelluláris FoSod5 enzim szerepét vizsgálták a *F. oxysporum* virulenciájában. Kísérleteikben gyapot palántákat fertőztek a vad típusú, $\Delta FoSOD5$ és komplementált törzsekkel. Azt tapasztalták, hogy a vad típusú törzs a gyökerek xilém szöveteit kolonizálta és nektrózist idézett elő, ezzel szemben a *FoSOD5* deléciós mutáns esetében csökkent nektrózist a gyökerek xilém elemeiben, kisebb mértékű hervadást és a levélbarnulást figyeltek meg. Eredményeikkel ellentétben a megfigyeléseink azt mutatták, hogy a FvMnSOD enzim nem vesz részt jelentős mértékben a *F. verticillioides* virulenciájának kialakításában.

4.3. Új tudományos eredmények

1. Különbféle fonalas gombafajok AtfA bZIP transzkripciós faktorok homológiái alapján azonosítottuk az FvAtfA-t kódoló gént, az *FvatfA*-t *F. verticillioides*ben.
2. Az *FvatfA* transzkripciós faktort kódoló gén funkciójának felderítésére $\Delta FvatfA$ null-mutáns törzset hoztunk létre. A mutánst a vad típusú *FvatfA* génnel (saját promóterét alkalmazva) komplementáltuk.
3. Megállapítottuk, hogy az *FvatfA* gén nem nélkülözhetetlen a gomba számára, és nem játszik szerepet a mikrokonídiumok életképességében hő- és hidegstressz alatt..
4. A $\Delta FvatfA$ deléciós mutáns szignifikánsan kisebb telepeket hoz létre Czapek-Dox és PDA tápagarak felületén növekedve.
5. Az *FvatfA* gén részt vesz a *F. verticillioides* invazív növekedésében, a $\Delta FvatfA$ törzs nem kolonizálta a paradicsombogyók felszínét 96 órával az inokulálást követően sem.
6. Az *FvAtfA* gén deléciója teljes női sterilitást okoz.
7. Az *FvatfA* részt vesz mind a mikrokonídiumok termelésében, valamint azok méretének kialakításában: a deléciós törzs szignifikánsan kisebb méretű és mennyiségű spórát képez.
8. Igazoltuk az *FvatfA* gén oxidatív és sejtfal-stresszválaszban betöltött szerepét: a $\Delta FvatfA$ mutáns törzs fokozottan érzékeny volt a menadion, hidrogén-peroxid, valamint a *tBOOH* által kiváltott oxidatív, továbbá a Kongóvörös által kiváltott sejtfal-stresszre.
9. Az *FvatfA* gén deléciójának hatására megszűnt a fumonizinek termelése: *in vitro* a deléciós mutáns nem termelt kimutatható mennyiségben FB1-t és FB2-t. A fumonizin bioszintézis két kulcsenzimét kódoló *fum1* és *fum8* gének relatív expressziós szintje szignifikánsan kisebb volt a géndeléciós mutánsban, mint a vad típusú törzsben.
10. Az *FvatfA* gén deléciója hatással van a bikaverin termelésére, a $\Delta FvatfA$ mutáns szignifikánsan több bikaverint termelt, mint a vad típusú FGSC 7600 törzs.
11. Az *FvatfA* gén szerepet játszik a karotinoidok bioszintézisében. A $\Delta FvatfA$ null-mutáns törzs nyomnyi mennyiségben kimutatható karotinoidokat termelt, valamint kettő, a karotinoidok bioszintézisében szerepet játszó enzimet kódoló gén, a *carRA* és *carT* relatív expressziós szintje szignifikánsan kisebb volt a mutánsban.

12. Különbféle fonalas gombafajok mangán-szuperoxid dizmutáz enzimeinek homológiai alapján azonosítottuk az FvMnSOD-ot kódoló gént, az *FvmnSOD*-ot *F. verticillioides*ben.
13. Az *FvmnSOD* enzimet kódoló gén funkciójának felderítésére $\Delta FvmnSOD$ null-mutáns törzset hoztunk létre. A mutánst a vad típusú *FvmnSOD* génnel (saját promóterét alkalmazva) komplementáltuk.
14. Megállapítottuk, hogy az *FvmnSOD* gén nem nélkülözhetetlen a gomba számára, és nem játszik szerepet a vegetatív és invazív növekedésben, a szexuális szaporodásban, valamint a fumonizinek termelésében.
15. Az *FvmnSOD* gén részt vesz a PAF által kiváltott apoptózisban.
16. Az *FvmnSOD* gén deléciója fokozott érzékenységet okozott a szuperoxid stresszt kiváltó menadionnal szemben.
17. Az *FvmnSOD* gén deléciójának hatására a mitokondriumok százalékos térfogatfoglalása megnőtt az általunk vizsgált régiókban. A deléciós mutánsban a hifák átmérője szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusban.
18. Az teljes, KCN-érzékeny és reziduális légzések szintje szignifikánsan magasabb a deléciós mutánsban. Az *FvmnSOD* gén deléciója nincs hatással a *F. verticillioides* alternatív oxidáz-függő légzésére.

5. Összefoglalás

Doktori munkám célja a gombák oxidatív stresszválaszában résztvevő (i) transzkripciós faktort kódoló *atfA* gén és (ii) az MnSOD (szuperoxid-diszmutáz) enzimet kódoló *mnSOD* gén szerepének vizsgálata volt a nagy gazdasági jelentőséggel bíró *Fusarium verticillioides*ben (*Gibberella moniliformis*). Ez a világszerte elterjedt gomba a kukorica egyik leggyakrabban előforduló kórokozója, amely számos másodlagos metabolitot termel, köztük a fumonizineket, a mikotoxinok egy jól ismert csoportját, amelyek komoly egészségügyi veszélyt jelentenek az emberekre és az állatokra egyaránt.

Az *FvatfA* feltételezhetően az *Aspergillus nidulans* AtfA ortológ bZIP típusú transzkripciós faktorát, az FvAtfA-t kódolja. Az $\Delta FvatfA$ deléciós mutánt double joint PCR segítségével, ezt követően az ép *FvatfA* gén integrációjával a nullmutánsban komplementált törzseket hoztunk létre. A vad típusú szülői törzs, $\Delta FvatfA$ mutáns és a komplementált törzsek fenotípusos összehasonlítása kimutatta az FvAtfA komplex szabályozó szerepét. A géndeléciós mutáns mind Czapek-Dox, mind PDA agarlemezekeken csökkent növekedést mutatott, valamint paradicsom bogyókon vizsgálva az invazív növekedése is visszamaradott volt. A mutáns valamivel kevesebb és kisebb konídiumot termelt, és női sterilitást tapasztaltunk, amikor női partnerként alkalmaztuk sárgarépás agaron; továbbá a deléciós mutáns mikrokonídiumai megőrizték életképességüket hő-, és hidegstressz alatt. Az *FvatfA* deléciója az abiotikus stressz toleranciára is hatással volt. A $\Delta FvatfA$ mutáns fokozott érzékenységet mutatott az oxidatív stresszt előidéző ágensekkel, így a hidrogén-peroxiddal, a *t*BOOH-dal (peroxid stresszt indukál) és a menadionnal (ami szuperoxid stresszt okoz) szemben. Továbbá a deléciós mutáns fokozott érzékenységet mutatott a kongóvörös által kiváltott sejtfal integritási stresszre is. Ezzel szemben a géndeléciós mutáns nem mutatott fokozott érzékenységet a NaCl és KCl (ozmotikus stressz), a CdCl₂ (nehézfém stressz) és a diamid (a glutation/glutation-diszulfid redox egyensúly felborulását váltja ki) jelenlétében. Az *FvatfA* jelentősen befolyásolja a másodlagos metabolitok bioszintézisét *F. verticillioides*ben. A gén a deléciója a fumonizin (FB1 és FB2) termelés drasztikus csökkenését eredményezte: ezen mikotoxinok mennyisége a kimutatási határ alatt volt a 14 napos Myro táptalajban növesztett tenyészetekből származó mintákban. A poliketid szintázt, valamint α -oxoamin szintázt kódoló *fum1* és *fum8* fumonizinek bioszintézisében résztvevő gének transzkripciós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a $\Delta FvatfA$ mutánsban, mint a vad típusú és a komplementált törzsekben. Az *FvatfA* a karotinoidek termelését is befolyásolja. Nyomnyi mennyiségű karotinoidot mértünk a $\Delta FvatfA$ mutáns folyékony DG tápközegben hét nap folyamatos megvilágítás mellett növesztett tenészeiben, míg ezzel szemben a vad típusú és a

két helyreállított törzs normál mennyiségben termelte ezeket a metabolitokat. A *carRA* (karotincikláz aktivitással rendelkező fitoén-szintáz) és a *carB* (karotin-deszaturáz), két kulcsfontosságú karotinoid bioszintézisben résztvevő enzimeket kódoló gének expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a $\Delta FvatfA$ mutánsban a vad típusú és a helyreállított törzsekhez képest. Továbbá a géndeléciós mutáns körülbelül tízszer több bikaverint termelt, mint a vad típus és a komplementált törzsek. A bikaverin szintézisben részt vevő kulcsfontosságú poliketid szintáz kódoló gén, a *bik1* expressziója változatlan maradt a mutánsban a vad típushoz képest, ami azt jelzi, hogy ezen metabolit túltermelésének oka nem a *bik1* túlzott expressziója. Az *in silico* promoter analízis kimutatta, hogy az összes gén, amely az $\Delta FvatfA$ mutánsban alulregulálódott, legalább egy feltételezett ATF/CREB kötőhelyet tartalmazott a promóterén, ami azt jelzi, hogy az FvAtfA fehérje globális transzkripciós faktorként működhet, amely összekapcsolja a stressz szignálokat, valamint a *F. verticillioides* fumonizin és karotinoid bioszintézisben résztvevő génjeit.

A mitokondriális mangán-szuperoxid-diszmutáz (MnSOD) a ROS (reaktív oxigénfajták) eliminálásában résztvevő arzenál fontos összetevője. $\Delta FvmnSOD$ géndeléciós mutánst állítottunk elő, hogy megvizsgáljuk az *FvmnSOD* szerepét a különféle stresszekre adott válaszban. A gén nem esszenciális a gomba számára, továbbá nem játszik szerepet a vegetatív vagy invazív növekedésben, a sporulációban, az ivaros szaporodásban és a fumonizin termelésben. Az *FvmnSOD* deléciója azonban megnövekedett érzékenységet okozott a menadionnal, valamint a *Penicillium chrysogenum* antifungális fehérje (PAF) által kiváltott apoptotikus sejthalállal szemben, ami a MnSOD hiánya miatti mitokondriális funkció változását jelzi. Annak megállapítására, hogy a gomba hogyan kompenzálja ezt a funkcióvesztést, a mutáns mitokondriális morfológiáját és fiziológiáját összehasonlítottuk a vad típusú szülői, továbbá egy *FvmnSOD* génnel kiegészített, komplementált törzsekével. A második hifaszegmensben lévő mitokondriumok térfogatfoglalása, valamint a teljes, a KCN-érzékeny (citokróm C-függő) és a KCN+SHAM (szalicilhidroxámsav) rezisztens reziduális légzési ráták magasabbak voltak a mutánsban, mint a vad típusú és a komplementált törzsek esetében mértek. Az *FvmnSOD* deléciója azonban nem volt hatással az alternatív oxidáz-függő légzésre *F. verticillioides*ben. Ezek az eredmények új információkat szolgáltatnak az *mnSOD* gének sokoldalúságáról a gombák életmódjától függően.

6. Summary

Fungi react to oxidative stress through several defense mechanisms mediated *via* signal transduction pathways. As a result, transcription factors involved in oxidative stress response activate genes working in ROS elimination, e.g. genes coding catalases or superoxide dismutases which are part of enzymatic defense against ROS. bZIP transcription factors also play a role in oxidative stress response. In yeast within bZIP transcription factors a Yap family comprising eight proteins is distinguishable. Yap proteins often mediate stress responses and can be associated with resistance towards ROS and also to osmotic and heavy metal stress. Since the discovery of the first Yap protein several functional orthologues have been characterised in other fungi. These proteins are also involved in resistance to ROS and antifungal compounds. In our research we characterised two protein encoding genes involved in oxidative stress response, namely *FvatfA* coding the bZIP type transcription factor FvAtfA and *FvmnSOD* encoding the mitochondrial manganese superoxide dismutase enzyme.

We generated the *A. nidulans* AtfA orthologous bZIP transcription factor coding *FvatfA* deletion mutant in *F. verticillioides* with double-joint PCR method. The vegetative growth of the deletion mutant was significantly slower on Czapek-Dox and PDA agar plates compared to the wild-type strain. Deletion of *FvatfA* also affected the production and size of microconidia and reduced the invasive growth on tomato fruits. The $\Delta FvatfA$ strain showed complete female sterility on carrot agar. At the same time the *FvatfA* gene has no role in the viability of conidia during heat or cold stresses. Characterisation of the wild-type, its deletion mutant and the complemented strains pointed out that deletion of *FvatfA* caused increased sensitivity to menadione, hydrogen peroxide, *t*BOOH and Congo Red, phenotypes that were successfully restored in complemented strains, *FvatfA* 'C (H7) and (H9).

Deletion of the *FvatfA* gene had an impact on the production of secondary metabolites: the $\Delta FvatfA$ strain did not produce FB1 and FB2 *in vitro* in our experiments. The production of the red coloured polyketide pigment called bikaverin was significantly higher in the deletion mutant compared to the wild-type strain. In contrast with this observation the production of carotenoids was significantly decreased – the $\Delta FvatfA$ strain produced only trace amounts of carotenoids. Gene expression experiments with RT-PCR also supported our results: expression of *fum1* and *fum8*, encoding two key enzymes of fumonisin biosynthesis was decreased while the expression of *fum21* which codes a transcription factor within the *FUM* cluster showed no change. Furthermore, expression of *carRA* and *carB*, encoding enzymes involved in carotenoid biosynthesis was significantly lower in the gene deletion mutant, while the deletion had no effect on the expression

of *carT*. After 3 or 5 days of incubation the expression of *bik1* encoding the key enzyme of bikaverin biosynthesis did not change in our experiments. Our results suggest that deletion of the *FvatfA* gene changed the secondary metabolite profile of the fungus which led the utilization of precursor molecules in other metabolic pathways. In addition the decreased carotenoid production by the *FvatfA* deletion mutant indicate that there is a direct relationship between the production of secondary metabolites and oxidative stress response as carotenoids are molecules proven to be included in the elimination of ROS.

We also generated the *A. nidulans* MnSOD orthologous enzyme coding *FmnSOD* deletion mutant with double-joint PCR in *F. verticillioides*. The *FvmnSOD* gene is dispensable to the fungus and plays no role in vegetative and invasive growth, sporulation, sexual reproduction and the production of fumonisins.

However the $\Delta FvmnSOD$ strain was sensitive to the PAF elicited apoptosis, and to the superoxide stress generating menadione.

As a result of deletion of *FvmnSOD* gene the volumetric ratio of the mitochondria in the second hyphal segment was increased. In the deletion mutant the diameter of the hyphae was also significantly smaller than in the wild-type. The total, the KCN-sensitive and the KCN+SHAM-resistant respirations of the deletion mutant were significantly higher in the $\Delta FvmnSOD$ strain. Deletion of *FvmnSOD* had no effect on the alternative oxidase dependent respiration of *F. verticillioides*.

Mellékletek

M1. Irodalomjegyzék

- Aasen**, A.J.; Jensen, S.L. (1965) Fungal carotenoids II. The structure of the carotenoid acid neurosporaxanthin. *Acta Chem Scand* 19:1843-1853.
- Ádám**, A.L. *et al.* (2011) The *MAT1-2-1* mating-type gene upregulates photo-inducible carotenoid biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *FEMS Microbiol Lett* 318:76-83.
- Alepu**, P.M. *et al.* (2001) Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* 7:767-777.
- Alexander**, N. J., Proctor, R. H. és McCormick, S. P. (2009) Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* 28(2-3):198–215.
- Alonso-Monge**, R. *et al.* (2009) Fungi sensing environmental stress. *Clin Microbiol Infect* 15 (1):17-19.
- Arndt**, B. *et al.* (2015) Genetic engineering, high resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy elucidate the bikaverin biosynthetic pathway in *Fusarium fujikuroi*. *Fungal Genet Biol* 84:26-36.
- Arthur**, J. R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell. Mol Life Sci* 57:1825-1835.
- Avalos**, J., Casadesús J., Cerdá-Olmedo E. (1985) *Gibberella fujikuroi* mutants obtained with UV radiation and N-methyl- N'-nitro-N- nitrosoguanidine. *Appl Environ Microbiol* 49:187-191.
- Avalos**, J. *et al.* (Szerk.) (2014) Carotenoids. s.l. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*, p. 149–185.
- Avalos**, J. és Limón, M.C. (2015) Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet* 61:309-324.
- Bacon**, C.W. *et al.* (1996) Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 62:4039-4043.
- Balan**, J. *et al.* (1970) Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi* effective against *Leishmania brasiliensis*. *Folia Microbiol* 15: 479-483.
- Balázs**, A. *et al.* (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* 283:289-303.
- Ballard**, E. *et al.* (2018) In-host microevolution of *Aspergillus fumigatus*: A phenotypic and genotypic analysis. *Fungal Genet Biol* 113:1-13.
- Ballard**, E. *et al.* (2019) Raw genome sequence data for 13 isogenic *Aspergillus fumigatus* strains isolated over a 2 year period from a patient with chronic granulomatous disease. *Data Brief* 25:104021.
- Ballario**, P. *et al.* (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* 15:1650-1657.
- Barton**, D.H.R. *et al.* (1975). Synthesis of bikaverin. *J. C. S. Chem. Commun.* 646.
- Baum**, J. A. és Scandalios J. G. (1979) Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize. *Differentiation* 13(2):133-140.
- Bayir**, H. (2005) Reactive oxygen species. *Crit Care Med* 33(12):S498-S501.

- Bell, A. A. et al.** (2003) United States Department of Agriculture — Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*: potential targets for disease control. *Pest Manag Sci* 59:736-747.
- Bezuidenhout, S.C. et al.** (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 743-745.
- Binder, U. et al.** (2010) The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 75:294–307.
- Bindl, E.; Lang, W.; Rau, W.** (1970) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoïdsynthese. VI. Zeitlicher Verlauf der Synthese der einzelnen Carotinoide bei *Fusarium aquaeductuum* unter verschiedenen Induktionsbedingungen. *Planta* 94:156-174.
- Birben, E. et al.** (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5(1):9-19.
- Blacutt, A. A. et al.** (2018) *Fusarium verticillioides*: advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. *Phytopathology* 108(3):312-326.
- Blomhoff, R. és Blomhoff, H.K.** (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol* 66:606-630.
- Bluhm, B. H. és Woloshuk, C. P.** (2005) Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:1333-1339.
- Boronat, A. és Rodríguez-Concepción, M.** (2015) Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 148:3-18.
- Braun, M.S. és Wink M.** (2018) Exposure, occurrence, and chemistry of fumonisins and their cryptic derivatives. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17:769-791.
- Breitenbach, M, et al.** (2015) Oxidative stress in fungi: its function in signal transduction, interaction with plant hosts, and lignocellulose degradation. *Biomolecules.* 5(2):318-342.
- Brewster, J. L. et al.** (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259:1760-1763.
- Britton, L. és Fridovich I.** (1977) Intracellular localization of the superoxide dismutases of *Escherichia coli*: a reevaluation. *J Bacteriol* 131(3):815-820.
- Brown, D. W. et al.** (2007) The *Fusarium verticillioides* *FUM* gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects *FUM* gene expression and fumonisin production. *Eukaryot Cell* 6:1210-1218.
- Butchko, R. A. E., Plattner, R. D., Proctor, R. H.** (2003a) *FUM13* encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3000-3006.
- Butchko, R. A. E., Plattner, R. D., Proctor, R. H.** (2003b) *FUM9* is required for C-5 hydroxylation of fumonisins and complements themeitotically defined Fum3 locus in *Gibberella moniliformis*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6935-6937.
- Butler, T.** (1902) Notes on a feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horse with positive result. *Am Vet Rev* 26:748-751.
- Cadet, J, et al** (1994) Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods Enzymol* 234:79-88.
- Carlile, M. J.** (1956) A study of the factors influencing non-genetic variation in a strain of *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Microbiol.* 14:643-654.

- Chang, E. C. és Kosman D. J.** (1989) Intracellular Mn(II)-associated superoxide scavenging activity protects Cu,Zn superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. *J Biol Chem* 264(21):12172-12178.
- Chelikani, P., Fitab I., Loewena P. C.** (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 61:192-208.
- Chelkowski, J., Zajkowski P., Visconti A.** (1992) Bikaverin production of *Fusarium* species. *Mycotoxin Res* 8:73-76.
- Chen, D. et al.** (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14:214-229.
- Chen, C. et al.** (2018) Exposure to aflatoxin and fumonisin in children at risk for growth impairment in rural Tanzania. *Environ. Int* 115:29-37.
- Choi, Y. E. et al.** (2008) *GAC1*, a gene encoding a putative GTPase-activating protein, regulates bikaverin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Mycologia* 100:701-709.
- Choi, Y. E. és Xu J. R.** (2010) The cAMP signaling pathway in *Fusarium verticillioides* is important for conidiation, plant infection, and stress responses but not fumonisin production. *MPMI* 23(4):522-533.
- Chomczynski, P.** (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15:532-536.
- Choquer, M. et al.** (2007) *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen. *FEMS Microbiol. Lett* 277:1-10.
- Chu, F.S. és Li, G.Y.** (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 60:847-852.
- Collado, I. G., Sánchez, A.J., Hanson, J.R.** (2007) Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Nat. Prod. Rep.* 24:674-686.
- Colmenares, A.J. et al.** (2002) The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Ecol* 28:997-1005.
- Colot, H. V. et al.** (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103:10352-10357.
- Cornforth, J. W. et al.** (1971) Isolation and characterization of a fungal vacuolation factor (bikaverin). *J Chem Soc* 16:2786-2788.
- Corrochano, L. M.** (2007) Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem Photobiol Sci* 6:725-736.
- Cotten, T. és Munkvold, G.** (1998) Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology* 88:550-555.
- Covarelli, L. et al.** (2012) Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiol* 31:17-24.
- Cox, R. J. és Simpson, T. J.** (2009) Fungal type I polyketide synthases. *Methods Enzymol* 459:49-78.
- Coyle, P. et al.** (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 59(4):627-647.

- Dall'Asta, C. et al.** (2008) A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products. *World Mycotoxin Journal* 1(3):237-246.
- Dalmaís, B. et al.** (2011) The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol Plant Pathol* 12:564-579.
- Davis, R. H. és de Serres, F.** (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol* 17:79-143.
- De Boer, J. J. et al.** (1971) Crystal and molecular structure of the chloroform solvate of bikaverin. *J Chem Soc* 16:2788-2791.
- De Fabo, E. C., Harding, R. W., Shropshire, W., Jr.** (1976) Action spectrum between 260 and 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* 57:440-445.
- Degols, G, Shiozaki, K., Russell, P.** (1996) Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16:2870-2877.
- Degols, G. és Russell, P.** (1997) Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 17:3356-3363.
- Deponte, M.** (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3217-3266.
- Di Pietro, A. et al.** (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology* 39(5):1140-1152.
- Dizdaroglu, M.** (1994) Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol* 234:3-16.
- Domenech, C. E. et al.** (1996) Separate compartments for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Eur. J. Biochem* 239:720-725.
- Domijan, A. M.** (2012) Fumonisin B₁: a neurotoxic mycotoxin. *Arh Hig Rada Toksikol* 63:531-544.
- Domonkos, I. et al.** (2013) Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Prog. Lipid Res* 52:539-561.
- Duncan, K. E. és Howard, R. J.** (2010) Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol Plant-Microbe Interact* 23:6-16.
- El-Agamey, A. et al.** (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 430:37-48.
- Emri, T. et al.** (2015) Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics* 16:478-497.
- Eshaghi, M. et al.** (2010). Genomic binding profiling of the fission yeast stress-activated MAPK Sty1 and the bZIP transcriptional activator Atf1 in response to H₂O₂. *PLoS one* 5:e11620.
- Estrada, A. F. és Avalos, J.** (2008) The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis, but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation. *Fungal Genet Biol* 45:705-718.
- Estruch, F. és Carlson, M.** (1993) Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a *SNF1* protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13:3872-3881.

- Fanelli, F. et al.** (2013) Relationship between fumonisin production and *FUM* gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 30(2):365-371.
- Farré, D. et al.** (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31(13):3651-3653.
- Fotso, J., Leslie, J.F., Smith, J.S.** (2002) Production of beauvericin, moniliformin, fusa-proliferin, and fumonisins b(1), b(2), and b(3) by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 68:5195-5197.
- Fravel, D., Olivain, C. és Alabouvette, C.** (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157:493-502.
- Fridovich, I.** (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64:97
- Furukawa, T., Yoshinari T., Sakuda S.** (2017) Intracellular superoxide level controlled by manganese superoxide dismutases affects trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol Lett.* 364(21).
- Gagkaeva, T.Y. és Yli-Mattila, T.** (2020) Emergence of *Fusarium verticillioides* in Finland. *Eur J Plant Pathol* 158:1051-1057.
- Gaits, F. et al.** (1998) Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev* 12:1464-1473.
- Gaits, F. és Russell, P.** (1999) Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/StyI in fission yeast. *Mol Biol Cell* 10:1395-1407.
- Garbayo, I. et al.** (2003) Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme Microb. Technol.* 33:629-634.
- Garre, V., Müller, U., Tudzynski, P.** (1998) Cloning, characterization and targeted disruption of *cpcat1*, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:772-783.
- Gasch, A. P. et al.** (2000) Genomic expression programmes in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11:4241-4257.
- Gelderblom, W.C. et al.** (1991) Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis* 12:1247-1251.
- Gilbertson, R. et al.** (1986) Association of corn stalk rot *Fusarium* spp. and Western corn rootworm beetles in Colorado. *Phytopathology* 76:1309-1314.
- Giordano, W. et al.** (1999) Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol Lett* 173:389-393.
- Grant, C. M. et al.** (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for YAP-1 transcriptional regulation. *Molecular microbiology* 21(1):171-179.
- Guo, M. et al.** (2010) The basic leucine zipper transcription factor Moatf1 mediates oxidative stress responses and is necessary for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *MPMI* 23:1053-1068.
- Hagiwara, D. et al.** (2008) Characterization of bZIP-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:2756-2760.

- Hagiwara, D. et al.** (2009) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet Biol* 46(11):868-878.
- Hagiwara, D. et al.** (2014) The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 73:138-149.
- Hagiwara, D. et al.** (2016) Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genomics* 17:358.
- Han, Z. et al.** (2014) Screening survey of co-production of fusaric acid, fusarin C, and fumonisin B1, B2 and B3 by *Fusarium* strains grown in maize grains. *Mycotoxin Res* 30(4):231-240.
- Halliwell, B. és Gutteridge, J. M. C.** (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Harshman, K. D., Moye-Rowley W. S., Parker C. S.** (1988) Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell* 53:321-330.
- He, X. J. és Fassler, J. S.** (2005) Identification of novel Yap1 and Skn7 binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 58:1454-1467.
- He, X. J., Mulford K. E., Fassler J. S.** (2009) Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot Cell* 8(5):768-78.
- He, Q. et al.** (2002) White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297:840-843.
- Heller, J. és Tudzynski P.** (2011) Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu Rev Phytopathol* 49:369-390.
- Henry, L. E. et al.** (1980) Intracellular localization, isolation and characterization of two distinct varieties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. *Biochem J.* 187(2):321-328.
- Herrera, M. L. et al.** (2009) Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 47:1325-1332.
- Homann, V. et al.** (1996) The isoprenoid pathway: cloning and characterization of fungal FPPS genes. *Curr Genet* 30:232-239.
- Hong, S.Y. et al.** (2013a) Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins (Basel)*. 18;5(4):683-702.
- Hong, S. Y. et al.** (2013b) Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *MicrobiologyOpen* 2:144-160.
- Hornero-Mendez, D., Limón, M. C., Avalos, J. (Szerk)** (2018) HPLC analysis of carotenoids in neurosporaxanthin-producing fungi. s.l. *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols* vol. 1852:269-281.
- Hwang, C. S. et al.** (2003) Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* 20:929-41.
- Isaacson, C.** (2005) The change of the staple diet of black South Africans from sorghum to maize (corn) is the cause of the epidemic of squamous carcinoma of the oesophagus. *Medical Hypotheses* 64:658-660.

- Jamieson, D. J., Rivers, S. L., Stephen, D. W.** (1994) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology (Reading)*. 140(12):3277-3283.
- Jiang, C. et al.** (2015) *FgSKN7* and *FgATF1* have overlapping functions in ascosporeogenesis, pathogenesis and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environ Microbiol* 17:1245-1260.
- Jones, D. T., Taylor, W.R., Thornton, J. M.** (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp Appl Biosci* 8:275-282.
- Jones, R. H. et al.** (1988) Expression of the SV40 promoter in fission yeast: identification and characterization of an AP-1-like factor. *Cell* 53:659-667.
- Kanoh, J. et al.** (1996) *Schizosaccharomyces pombe gad7+* encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes to cells* 1:391-408.
- Kawasaki, L. et al.** (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 45:1153-1163.
- Kecskeméti, A. et al.** (2020) Analysis of fumonisin mycotoxins with capillary electrophoresis – mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 37(9):1553-1563.
- Kerényi, Z. et al.** (1999) Standardization of mating-type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4071-4076.
- Khetan, S. K.** (2001). Microbial pest control. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc: 300.
- Kim, H., Son, H., Lee, Y. W.** (2014) Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*. *J. Appl. Microbiol.* 116:380-389.
- Kimanya, M.E. et al.** (2010) Fumonisin exposure through maize in complementary foods is inversely associated with linear growth of infants in Tanzania. *Mol Nutr Food Res.* 54:1659-1667.
- Kitagawa, A. et al.** (1997) Reexamination of respiration-impairing effect of bikaverin on isolated mitochondria. *Cereal Res Commun* 25:451-452.
- Kjær, D. et al.** (1971) Bikaverin and nor-bikaverin, benzoxanthetrione pigments of *Gibberella fujikuroi*. *J Che Soc* 2792-2797.
- Klaassen, C. D., Liu, J., Diwan, B. A.** (2009) Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 238(3):215-220.
- Klittich, C. J. R. és J. F. Leslie.** (1988) Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118:417-423.
- Kohut, G. et al.** (2009) N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *Int J Food Microbiol.* 130(1):65-69.
- Kohut, G. et al.** (2010) Adenylyl cyclase regulates heavy metal sensitivity, bikaverin production and plant tissue colonization in *Fusarium proliferatum*. *J Basic Microbiol.* 50(1):59-71.
- Kon, N. et al.** (1997). Transcription factor Mts1/Mts2 (Atf1/Pcr1, Gad7/Pcr1) activates the M26 meiotic recombination hotspot in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13765–70.
- Kozlowski, L. P.** (2016) IPC–Isoelectric Point Calculator. *Biol Direct* 11:55.
- Kreitman, G. és Nord, F. F.** (1949) Lycopersin, pigment of *Fusarium lycopersici*. *Arch Biochem* 21:457-458.

- Krems, B., Charizanis, C., Entian, K. D.** (1996) The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet.* 29:327-334.
- Kuge, S. és Jones N.** (1994) *YAP1* dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 13:655-664.
- Kumar, C. et al.** (2011) Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J* 30(10):2044-2056.
- Kumar, S. et al.** (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549.
- Kvas, M. et al.** (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Divers* 34:1-21.
- Kvietikova, I. et al.** (1995) The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res* 23(22):4542-4550.
- Kwon, H. R. et al.** (2007) Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant Pathol J* 23:318-321.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L.** (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240(4860):1759-64.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., Aguirre, J.** (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 50:1241-1255.
- Lara-Rojas, F. et al.** (2011) *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol Microbiol* 80:436-454.
- Laurent, D. et al.** (1989) Macrofusin I and micromonilin: two new mycotoxins isolated from corn infested by *Fusarium moniliforme*. *Microbiol Aliment Nutr* 7:9-16.
- Laurent, D. et al.** (1990) Etude en RHN1H et 13C de la macrofusine, toxine isolée des maïs infestés par *Fusarium moniliforme* Sheld. *Analysis* 18:172-179.
- Lawrence, C. L. et al.** (2007) Regulation of *Sz. pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerisation with Pcr1. *J Biol Chem* 282:5160-5170.
- Lazzaro, I. et al.** (2012) Fumonisin B, A and C profile and masking in *Fusarium verticillioides* strains on fumonisin-inducing and maize-based media. *Int J Food Microbiol.* 159(2):93-100.
- Lebeau, J. et al.** (2019) Putative metabolic pathway for the bioproduction of bikaverin and intermediates thereof in the wild *Fusarium oxysporum* LCP531 strain. *AMB Expr* 9:186.
- Leiter, E. et al.** (2005) Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 49(6):2445-53.
- Leiter, É. et al.** (2016) Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports* doi: 10.1038/srep20523.
- Leiter, É. et al.** (2021) The impact of bZIP Atf1 ortholog global regulators in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 105(14-15):5769-5783.
- Leslie, J. F. és Summerell, B. A.** (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. pp: 176-179; 274-278.

- Linnemannstöns, P. et al.** (2002a) The polyketide synthase gene *pkS4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. *Fungal Genet Biol* 37:134-148.
- Linnemannstöns, P. et al.** (2002b) A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*. *Mol. Genet. Genomics* 267:593-602.
- Loeken, M. R.** (1993) Effects of mutation of the CREB binding site of the somatostatin promoter on cyclic AMP responsiveness in CV-1 cells. *Gene Expr* 3:253-264.
- Logrieco, A. et al.** (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108:597-609.
- Lushchak, V. I.** (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 153(2):175-190.
- Ma, S. M. et al.** (2007) Enzymatic synthesis of aromatic polyketides using PKS4 from *Gibberella fujikuroi*. *J Am Chem Soc* 129:10642-10643.
- Magoha, H. et al.** (2014) Association between aflatoxin M1 exposure through breast milk and growth impairment in infants from Northern Tanzania. *Matern. World Mycotoxin J.* 7:277-284.
- Maier, F. J. et al.** (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Mol. Plant Pathol.* 7:449-461.
- Marasas, W.F. et al.** (1988) Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res.* 55(4):197-203.
- Martinez-Pastor, M. T. et al.** (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15:2227-2235.
- Marx, F. et al.** (2008) The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell Mol Life Sci* 65:445-454.
- McGinnis, S. és Madden, T. L.** (2014) BLAST: At the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 32:W20-W25
- Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y., Akimenko, V. K.** (2002) Respiratory activity and naphthoquinone synthesis in the fungus *Fusarium decemcellulare* exposed to oxidative stress. *Microbiol.* 71:148-53.
- Medina, Á., González-Jartín, J. M., Sainz, M. J.** (2017) Impact of global warming on mycotoxins. *Current Opinion in Food Science* 18:76-81.
- Mende, K., Homann, V., Tudzynski, B.** (1997) The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and expression. *Mol. Gen. Genet.* 255:96-105.
- Messeguer, X. et al.** (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18(2):333-334.
- Millar, J. B., Buck, V., Wilkinson, M. G.** (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* 9:2117-2130.
- Moretti, A.** (2009) Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 117:7-13.
- Morgan, B.A. et al.** (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16:1035-1044.

- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L., Showers, W. B. (1997)** Reduced fusarium ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology* 87:1071-1077.
- Munkvold, G. P. (2003)** Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:705-713.
- Munoz-Guzmán, F., Caballero, V., Larrondo, L. F. (2021)** A global search for novel transcription factors impacting the *Neurospora crassa* circadian clock. *G3 (Bethesda)* 11(6):jkab100.
- Musser, S. M., Plattner, R. D. (1997)** Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:1169-1173.
- Nathues, E. et al. (2004)** CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *MPMI*:383-393.
- Nehlin, J. O., Carlberg, M., Ronne, H. (1992)** Yeast *SKO1* gene encodes a bZIP protein that binds to the CRE motif and acts as a repressor of transcription. *Nucleic Acids Res* 20:5271-5278.
- Nelson, P. E., Desjardins, A. E., Plattner, R. D. (1993)** Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu Rev Phytopathol.* 31:233-252.
- Nguyen, A. N. et al. (2002).** Cytoplasmic localization of Wis1 MAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spc1/Sty1 MAPK in fission yeast. *Mol Biol Cell* 13:2651-63.
- Nguyen, T. V. et al. (2013)** The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production, and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *MPMI* 26:1378-1394.
- Nimmanee, P. et al. (2014)** Functional analysis of atfA gene to stress response in pathogenic thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. *PLoS One* 9(11): e111200.
- Norred, W. P. et al. (1992)** Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 30:233-237.
- Oberegger, H. et al. (2000)** Iron starvation leads to increased expression of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Aspergillus*. *FEBS Lett.* 485(2-3):113-116.
- Oberegger, H. et al. (2001)** SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 41(5):1077-1089.
- O'Donnell, K. et al. (2000)** A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.
- Ohmiya, R. et al. (1999)** A fission yeast gene (*prr1⁺*) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *J. Biochem. (Tokyo)* 125:1061-1066.
- Oren, L. et al. (2003)** Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1695-1701.
- Orosz, E. et al. (2017)** Transcriptome-based modeling reveals that oxidative stress induces modulation of the AtfA-dependent signaling networks in *Aspergillus nidulans*. *Int J Genomics* 2017:6923849.
- Osman, M., és Valadon, L. R. G. (1984)** Fungistatic naphthoquinones of *Verticillium agaricinum*. *Trans Br Mycol Soc* 82:713-714.

- Osweiler, G. D. et al.** (1992) Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4:53-59.
- Pabo, C. O. és Sauer, R. T.** (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem.* 61:1053-95.
- Park, D. és Robinson, P. M.** (1964) Isolation and bioassay of a fungal morphogen. *Nature* 203:988-989.
- Phadwal, K.** (2005) Carotenoid biosynthetic pathway: Molecular phylogenies and evolutionary behavior of *crt* genes in eubacteria. *Gene* 345:35-43.
- Pócsi, I. et al.** (2009) Asexual sporulation signaling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. *J Appl Microbiol* 107:514-523.
- Pócsi, I., Prade, R. A., Penninckx, M. J.** (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol.* 49:1-76.
- Ponts, N. et al.** (2009) *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent. *FEMS Microbiol Lett* 293:255-62.
- Prado-Cabrero, A. et al.** (2007a) Identification and biochemical characterization of a novel carotenoid oxygenase: elucidation of the cleavage step in the *Fusarium* carotenoid pathway. *Mol. Microbiol.* 64:448-460.
- Prado-Cabrero, A. et al.** (2007b) Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot. Cell* 6:650-657.
- Proft, M. et al.** (2005) Genome-wide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4:1343-1352.
- Proctor, R. H., et al.** (1999) A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology* 27:100-112.
- Proctor, R. H. et al.** (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 38:237-249.
- Proctor, R. H. et al.** (2004) Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycol Res* 108:815-822.
- Proctor, R. H. et al.** (2006) Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:2424-2430.
- Proctor, R. H. et al.** (2008) A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genetics and Biology* 45:1016-1026.
- Proctor, R. H. et al.** (2013) Birth, death and horizontal gene transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Mol. Microbiol* 90:290-306.
- Puddu, P. et al.** (2008). The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press.* 17:70-77.
- Qi, X. et al.** (2013) Foatf1, a bZIP transcription factor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* is involved in pathogenesis by regulating the oxidative stress responses of Cavendish banana (*Musa* spp.) *Physiol Mol Plant P* 84:76-85.
- Rau, W. és Zehender, C.** (1959) Die Carotinoide von *Fusarium aquaeductuum*. *Lagh. Arch. Mikrobiol.* 32:423-428.

- Rau, W.** (1967) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. I. Das Wirkungsspektrum von *Fusarium aquaeductuum*. *Planta* 72:14-28.
- Ray, W. C.** (2005) MAVL/StickWRLD for protein: visualizing protein sequence families to detect non-consensus features. *Nucleic Acids Res* 33:W315-W319.
- Reiter, W. et al.** (2008). Fission Yeast MAP Kinase Sty1 Is Recruited to Stress-induced Genes. *J Biol Chem* 283:9945-56.
- Reverberi, M., et al.** (2006) Oxidant/antioxidant balance in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxin biosynthesis. *Mycotoxin Res.* 22:39-47.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Vismer, H. F.** (2002) Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 68:2101-2105.
- Rodríguez-Ortiz, R., Limón, M.C., Avalos, J.** (2009) Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wild-type *Fusarium fujikuroi* and carotenoid-overproducing mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:405-413.
- Rodríguez-Ortiz, R. et al.** (2010) Stimulation of bikaverin production by sucrose and by salt starvation in *Fusarium fujikuroi*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1991-2000.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R. A., Pimentel, C.** (2010) The Yap family and its role in stress response. *Yeast* 27 245-258.
- Roze, L. V. et al.** (2011) Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in aspergilli. *J Biol Chem* 286(40):35137-35148.
- Rubert, J., Zachariasova, M., Hajslova, J.** (2015) Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food—a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32:1685-1708.
- Ruiz-Roldán, M.C. et al.** (2008) Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* 7:1227-1230.
- Sadler, T. et al.** (2002) Prevention of fumonisin B1-induced neural tube defects by folic acid. *Teratology* 66:169-176.
- Sagaram, U., Shaw, B. D., Shim, W. B.** (2007) *Fusarium verticillioides* GAP1, a gene encoding a putative glycolipid-anchored surface protein, participates in conidiation and cell wall structure but not virulence. *Microbiology* 153:2850-2861.
- Sakamoto, K. et al.** (2008) *Aspergillus oryzae* atfB encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genet Biol* 45(6):922-932.
- Sakamoto, K. et al.** (2009) *Aspergillus oryzae* atfA controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genet Biol* 46:887-897.
- Saleh, D. et al.** (2012) Asexual reproduction induces a rapid and permanent loss of sexual reproduction capacity in the rice fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*: results of *in vitro* experimental evolution assays. *BMC Evol Biol.* 12:42.
- Samapundo, S. et al.** (2005) Effect of water activity and temperature on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *J Food Prot.* 68(5):1054-1059.
- Samejima, I., Mackie, S., Fantes, P. A.** (1997). Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J* 16:6162-70.

- Sandalio**, L. M. és R o L.A (1987) Localization of Superoxide Dismutase in Glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional Implications in Cellular Metabolism. *Journal of Plant Physiology* 127(5):395-409.
- Sandmann**, G.  s Misawa, N. (Szerk.) (2002) Fungal carotenoids. In *The Mycota X. Industrial Applications*; Springer: Berlin, Germany, pp. 247-262.
- Sans o**, M. *et al.* (2008). Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryotic Cell* 7:826-35.
- Sans o**, M. *et al.* (2011) Nuclear roles and regulation of chromatin structure by the stress-dependent MAP kinase Sty1 of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 82(3):542-554.
- Sato**, I. *et al.* (2009) The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungus-specific glutathione S-transferase. *J Biol Chem.* 284(12):8042-8053.
- Schafer**, F. Q.  s Buettner, G. R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30(11):1191-1212.
- Schmitt**, A. P.  s McEntee, K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5777-5782.
- Schnell**, N.  s Entian, K. D. (1991) Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (*PAR1*) conferring resistance to iron chelators. *Eur. J. Biochem.* 200:487-493.
- Sch onig**, B. *et al.* (2008) Cross-species hybridization with *Fusarium verticillioides* microarrays reveals new insights into *Fusarium fujikuroi* nitrogen regulation and the role of AreA and NMR. *Eukaryot Cell* 7:1831-1846.
- Schumacher**, J. *et al.* (2013) A Functional Bikaverin Biosynthesis Gene Cluster in Rare Strains of *Botrytis cinerea* Is Positively Controlled by *VELVET*. *PLoS ONE* 8(1): e53729.
- Segorbe**, D. *et al.* (2017) Three *Fusarium oxysporum* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have distinct and complementary roles in stress adaptation and cross-kingdom pathogenicity. *Mol Plant Pathol* 18(7):912-924.
- Seo**, J. A., Proctor, R. H., Plattner, R. D. (2001) Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology* 34:155-165.
- Shieh**, J. C. *et al.* (1997). The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev* 11:1008-22.
- Shim**, W. B., Flaherty, J. E., Woloshuk, C. P. (2003) Comparison of fumonisin B-1 biosynthesis in maize germ and degermed kernels by *Fusarium verticillioides* *J. Food Prot.* 66:2116-2122.
- Shim**, W. B. *et al.* (2006) FSR1 is essential for virulence and female fertility in *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 19:725-733.
- Shiozaki**, K.  s Russell, P. (1995a). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378:739-43.
- Shiozaki**, K.  s Russell P. (1995b). Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J* 14:492-502.
- Shiozaki**, K.  s Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* 10:2276-88.

- Siewers, V., Smedsgaard, J., Tudzynski, P.** (2004) The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3868-3876.
- Siewers, V. et al.** (2005) Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:602-612.
- Singh, P. et al.** (2004) SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect. Immun.* 72:2390-2394.
- Skoglund, L. és Brown, W.** (1988) Effects of tillage regimes and herbicides on *Fusarium* species associated with corn stalk rot. *Can. J. Plant Pathol.* 10:332-338.
- Smith, K. M. et al.** (2010) Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genome-wide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. *Eukaryot Cell* 9:1549-1556.
- Sobek, E. A. és Munkvold, G. P.** (1999) European Corn Borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *J. Econ. Entomol.* 92:503-509.
- Sokolovsky, V. Y. et al.** (1992) Nitrogen regulation of blue light-inducible genes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 138:2045-2049.
- Solovyev, V. et al.** (2006) Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biol* 7(1):S10.
- Song, Z. et al.** (2004) Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *Chembiochem* 5:1196-1203.
- Soto, T. et al.** (2002) Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem* 269:5056-5065.
- Soytong, K., et al.** (2001). Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article. *Fungal Diversity* 7:1-15.
- Starkov, A. A.** (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* 1147:37-52.
- Strobel, I. et al.** (2009) Carotenoids and carotenogenic genes in *Podospora anserina*: Engineering of the carotenoid composition extends the life span of the mycelium. *Curr. Genet.* 55:175-184.
- Stover, R. H.** (1972) Banana, plantain and abaca diseases. *Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute*; 316 pp.
- Studt, L. és Tudzynski, B. (Szerk.)** (2014) Gibberellins and the red pigments bikaverin and fusarubin. In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites* Springer: New York, NY, USA, pp. 209-238.
- Takeda, T. et al.** (1995) *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J* 14(24):6193-6208.
- Taylor, B. L. és Zhulin I. B.** (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(2):479-506.
- Temme, N. et al.** (2012) BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol* 13:704-718.

- Templeton, D. M. és Cherian, M. G.** (1991) Toxicological significance of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205:11-24.
- Toda, T. et al.** (1996). The fission yeast *pmk1+* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol* 16:6752-64.
- Toda, T., Shimanuki, M., Yanagida, M.** (1991). Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* 5:60-73.
- Toledano, M. B. et al.** (2003) Oxidative stress responses in yeast. *Topics in current genetics.* 1. kötet pp. 241-303.
- Toone, W. M. et al.** (1998) Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev* 12:1453-1463.
- Trifinopoulos, J. et al.** (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis, *Nucleic Acids Research* 44(W1):W232-W235.
- Tsuzi, D. et al.** (2004) Distinct regulatory mechanism of yeast GPX2 encoding phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase by oxidative stress and a calcineurin/Crz1-mediated Ca²⁺ signaling pathway. *FEBS Lett.* 569:301-306.
- Tudzynski, B.** (2005) Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 597-611.
- Tudzynski, B., és K. Holter.** (1998) Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal. Genet. Biol.* 25:157-170.
- Valadon, L. R. G. et al.** (1982) The effect of monochromatic radiation in the range 350 to 750 nm on the carotenogenesis in *Verticillium agaricinum*. *Physiol. Plant* 56:199-203.
- Vasák M.** (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol.* 19(1):13-17
- Venter, J. C. et al.** (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-1351.
- Wahls, W. P. és Smith, G. R.** (1994). A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes Dev* 8:1693-702.
- Wang, H. et al.** (2009). A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evolutionary Biology* 9(1):195.
- Wang, Q., Pokhrel, A., Coleman, J. J.** (2021) The Extracellular Superoxide Dismutase Sod5 From *Fusarium oxysporum* Is Localized in Response to External Stimuli and Contributes to Fungal Pathogenicity. *Front Plant Sci.* 12:608861.
- Warfield, C. Y és Gilchrist, D. G.** (1999) Influence on kernel age on fumonisin B1 production in maize by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2853-2856.
- Watanabe, Y. és Yamamoto, M.** (1996). *Schizosaccharomyces pombe pcr1+* encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol Cell Biol* 16:704-11.
- Wee, J. et al.** (2017) The fungal bZIP transcription factor AtfB controls virulence-associated processes in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins (Basel)* 9(9):287.

- Wiemann, P. et al.** (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol* 72:931-946
- Wilkinson, M. G. et al.** (1996) The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* 10(18):2289-301.
- Wiśnicka, R. et al.** (1998) Protective role of superoxide dismutase in iron toxicity in yeast. *Biochem Mol Biol Int.* 44(3):635-641.
- Woitek, S. et al.** (1997) 3-Hydroxy3-methylglutaryl-CoA reductase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and characterization. *Curr. Genet.* 31:38-47
- Wolf, T. et al.** (2016) CASSIS and SMIPS: promoter-based prediction of secondary metabolite gene clusters in eukaryotic genomes. *Bioinformatics* 32(8):1138-1143.
- Woloshuk, C.P. és Shim W.B.** (2013) Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. *FEMS Microbiol Rev.* 37(1):94-109.
- Wormley, F. L., Jr. et al.** (2005) Identification and characterization of an SKN7 homologue in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 73:5022-5030.
- Wu, A. és Moye-Rowley W. S.** (1994) *GSH1*, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5832-5839.
- Wu, Y. et al.** (2019) Effects of Different Carbon Sources on Fumonisin Production and *FUM* Gene Expression by *Fusarium proliferatum*. *Toxins (Basel)* 11(5):289.
- Xu, J. R. et al.** (1995) Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *MPMI* 8:74-84.
- Yaakoub, H. et al.** (2022) Oxidative stress response pathways in fungi. *Cell Mol Life Sci.* 79(6):333.
- Yin, W. B. et al.** (2012). An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Molecular microbiology* 83(5):1024-1034.
- Yoshizawa, T., Yamashita, A., Luo, Y.** (1994) Fumonisin occurrence in corn from high-and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1626-1629.
- Yu, J. H. et al.** (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 41:973-981.
- Zaleta-Rivera, K. et al.** (2006) Bidomain nonribosomal peptide synthetase encoded by *FUM14* catalyzes the formation of tricarballic esters in the biosynthesis of fumonisins. *Biochemistry* 45:2561-2569.
- Zalokar, M.** (1957) Isolation of an acidic pigment in *Neurospora*. *Arch. Biochem. Biophys.* 70:568-571.
- Zhang, Y. et al.** (2011) The *FvMK1* mitogen-activated protein kinase gene regulates conidiation, pathogenesis, and fumonisin production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 48(2):71-79.

M2. Táptalajok és oldatok

M2.1. Felhasznált táptalajok összetétele

A *F. verticillioides* törzsfenntartáshoz felhasznált táptalaj

Czapek-Dox táptalaj összetétele

1 literre vonatkoztatva:

KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
(Agar	20 g)
Vogel's Mikroelem oldat	0.2 ml
Szacharóz	20 g
NaNO ₃	2 g

Vogel's Mikroelem oldat 100 ml-re vonatkoztatva:

Citromsav	5 g
ZnSO ₄ • 6 H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ • 6 H ₂ O	1 g
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	250 mg
MnSO ₄	50 mg
H ₃ BO ₃	50 mg
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	50 mg

DNS izoláláshoz felhasznált táptalaj

YPG táptalaj

1 literre vonatkoztatva:

Élesztőkivonat	3 g
Pepton	10 g
Glükóz	20 g

E. coli DH5a kompetens sejtek tenyésztéséhez és transzformálásához felhasznált táptalajok

LB táptalaj összetétele

1 literre vonatkoztatva:

Tripton	10 g
Élesztőkivonat	5 g
NaCl	10 g
(Agar	1,8 g)
Ampicillin	50 µg/ml

SOC (regeneráltató táptalaj) összetétele

1 literre vonatkoztatva:

Élesztőkivonat	5 g
Tripton	20 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,18 g
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	2,03 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	2,46 g
Glükóz	3,6 g

***F. verticillioides* transzformálásához felhasznált táptalajok**

YPD táptalaj összetétele

1 literre vonatkoztatva:

Pepton	20 g
Élesztőkivonat	10 g
Glükóz	20 g

Regeneráltató tápagar összetétele

Szacharóz	1 M
Élesztőkivonat	0,02%

Összesen 175 ml-t készítünk, ebből 140 ml-t veszünk ki, és ehhez 1,4 g agart (1%) adunk, majd a maradék 35 ml-hez pedig 0,21 g agart (0,6%, ez lesz a topagar) mérünk hozzá.

Regeneráltató tápleves összetétele

Szacharóz	1 M
Élesztőkivonat	0,02%

A törzsek növekedésének vizsgálatához felhasznált táptalaj

PDA (VWR) táptalaj összetétele

1 literre vonatkoztatva:

Dehidratált táptalaj	39 g
----------------------	------

A táptalaj összetevőit a desztillált vízzel összekevertük, majd 121 °C-on 15 percig sterilizáltuk.

Szekunder metabolitok termelésének vizsgálatához felhasznált táptalajok

Módosított Myro táptalaj összetétele (Han és munkatársai, 2014)

1 literre vonatkoztatva:

Szacharóz	40 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	2 g
NaCl	5 g
Glicerol	<u>10 g</u>
	pH 5,9

Bikaverin termeltető táptalaj (Bell és munkatársai, 2003)

1 literre vonatkoztatva:

Szacharóz	20 g
Urea	140 mg
CaCO ₃	500 mg
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MES	<u>1 mL</u>
	pH 5,0

Minor Elements Solution (MES) 1 literre vonatkoztatva:

FeSO ₄ • 7 H ₂ O	10 g
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	50 g
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	2,5 g
MnSO ₄ • H ₂ O	0,5 g
NaB ₄ O ₇	0,5 g
NaMoO ₄ • 2 H ₂ O	0,5 g
Citromsav	50 g

DG minimál táptalaj összetétele (Avalos és munkatársai, 1985)

1 literre vonatkoztatva:

Glükóz	30 g
NaNO ₃	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
Mikroelem törzsoldat	2 ml

Mikroelem törzsoldat 100 ml-re vonatkoztatva (Davis és munkatársai, 1970):

HBO ₄	0,5 mg
CuSO ₄	5 mg
FeCl ₃	10 mg
MnCl ₂	1 mg
NaMoO ₄	1 mg
ZnSO ₄	100 mg

CM táptalaj (Leslie és Summerell, 2006)

1 literre vonatkoztatva:

KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
NaNO ₃	2 g
Szacharóz	20 g
N-Z Amine	2,5 g
Élesztő kivonat	1 g
Vogel's Mikroelem oldat	200 µl
Vitamin törzsoldat	10 ml
Agar	20 g

Vitamin törzsoldat 1 literre vonatkoztatva:

Tiamin (B1 vitamin)	100 mg
Riboflavin (B2 vitamin)	30 mg
Piridoxin (B6 vitamin)	75 mg
Kalcium-pantotenát (B5 vitamin)	200 mg
Nikotin-amid (B3 vitamin)	75 mg
Aszkorbinsav (C vitamin)	50 mg
p-amino-benzoésav	5 mg
Kolin-klorid	200 mg
Folsav	5 mg
Biotin	5 mg
Inozitol	4 g
50% etanol	1000 ml
Kloroform	1 ml

Répás agar (Klittich és Leslie, 1988)

Friss, hámozott répa feldarabolva	400 g
Desztillált víz	900 ml
Agar	20 g

A felkockázott friss répát 400 ml desztillált vízzel egy zárható üvegedénybe tettük, majd 20 percen keresztül autoklávoztuk. Ezt követően egy turmixgép segítségével pürésítettük, végül hozzáadtunk 500 ml desztillált vizet és az agart, ezt követően újabb 30 percen keresztül sterilizáltuk 121 °C-on.

M2.2. Felhasznált oldatok összetétele

Spóramosó oldat összetétele

100 ml-re vonatkoztatva:

Tween-80	10 µl
NaCl	0,9 g

DNS izoláláshoz használt oldatok összetétele

CTAB puffer összetétele

500 ml-re vonatkoztatva

2% CTAB	10 g
1 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
0,5 M EDTA pH 8.0	20 ml
1,4 M NaCl	40,9 g
1% DTT	5 g

50× TE puffer (pH 8.0) összetétele

1 literre vonatkoztatva

5 M Tris	60,6 g
0,5 M Na ₂ EDTA	18,6 g

Lízis puffer összetétele

100 ml-re vonatkoztatva

1 M Tris-HCl pH 7,5	5 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	10 ml
10% SDS	3,3 ml

8 M K-acetát oldat összetétele

100 ml-re vonatkoztatva

KCH ₃ COO	78,53 g
----------------------	---------

RNS izoláláshoz felhasznált oldatok összetétele

DEPC-es víz készítése

1 liter desztillált vízbe 1 ml DEPC-et (Sigma) mérünk be, alaposan összerázzuk, majd elszívófülke alatt egy éjszakán keresztül állni hagyjuk. Másnap a DEPC-es vizet lesterilezzük autoklávban.

20× SSC oldat összetétele

1 literre vonatkoztatva:

NaCl	175,3 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ • 2 H ₂ O	<u>88,2 g</u>
	pH 7,0

Agaróz gélelektroforézishez használt oldatok összetétele

DNS agaróz gélelektroforézishez használt oldatok

50× TAE oldat összetétele

1 literre vonatkoztatva:

Tris	242 g
Na ₂ EDTA	18,61 g
Jégecet	57,1 ml

RNS denaturáló agaróz gélelektroforézishez használt oldatok

10× MOPS-EDTA összetétele

MOPS	41,9 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ • 2 H ₂ O	4,1 g
Na ₂ EDTA	<u>3,7 g</u>
	pH 7,0

EDTA-SDS oldat minta futtatáshoz

Na ₂ EDTA	25 mM
SDS	1%

2× Loading Buffer összetétele

Formamid	1000 µl
37% formaldehid	300 µl
10× MOPS-EDTA	200 µl
DEPC-es víz	460 µl
Etídium-bromid (10 µg/ µl)	10 µl
6× Loading Dye	300 µl

***F. verticillioides* transzformáláshoz felhasznált oldatok összetétele**

Protoplasztáló oldat összetétele

NaH ₂ PO ₄ pH 5,8	10 mM
CaCl ₂	20mM
KCl	1,2 M

0,7 M NaCl oldat összetétele

100 ml ultraszűrt vízben:

NaCl	4,0908 g
------	----------

STC oldat összetétele

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
Szorbitol	1,2 M
CaCl ₂	10 mM

PEG 4000 oldat összetétele

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
CaCl ₂	10 mM
PEG 4000	60 w/v%

Southern blot analízishez felhasznált oldatok összetétele

Etídium-bromid oldat összetétele

100 ml desztillált vízbe 10 µl 10 mg/ml etídium-bromid törzsoldatot pipettáztunk.

Denaturáló oldat összetétele

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Neutralizáló oldat összetétele

Tris	1 M
EDTA	0,1 M
NaCl	<u>1,5 M</u>
	pH 8,0

Depurináló oldat összetétele

HCl	250 mM
-----	--------

10× SSC összetétele

Na-citrát	0,15 M
NaCl	<u>1,5 M</u>
	pH 7

Prehibridizáló oldat összetétele

20 ml-re vonatkoztatva

dH ₂ O	3 ml
1M Na ₂ HPO ₄	10 ml
20% SDS	7 ml
0,5 M EDTA	40 µl
BSA	0,2 g

Southern-mosó folyadék összetétele

100 ml-re vonatkoztatva

1M Na ₂ HPO ₄	4 ml
20% SDS	5 ml
0,5 M EDTA	0,2 ml

Maleinsavas puffer összetétele

250 ml-re vonatkoztatva

NaCl	0,15 M
Maleinsav	<u>0,1 M</u>
	pH 7,5

10× blokkoló oldat összetétele

Blocking Reagent	1g
Maleinsavas puffer	10 ml

Blokkoló oldat összetétele

10× blokkoló	4 ml
Maleinsavas puffer	40 ml

Antitest oldat összetétele

Blokkoló oldat	40 ml
Antitest felülúszó	8 µl

Az antitestet tartalmazó csövet a kitből 4 C-on, °5 percig, 10000 rpm-n lecentrifugáltuk.

Mosó puffer összetétele

Maleinsavas puffer	80 ml
TWEEN 80	240 µl

Detektáló puffer összetétele

Tris-HCl	0,1M
NaCl	<u>0,1 M</u>
	pH: 9,5

Előhívó oldat összetétele

Detektáló puffer	2 ml
NBT/BCIP	40 µl

M3. A disszertációban felhasznált primerek listája

Név	Szekvencia (5' – 3')	Cél
A géndeléciós és komplementált törzsek létrehozásához felhasznált primerek listája		
<i>FvatfAupfwd</i>	TTCATTCTGGGTTTCCTTCTATGGC	<i>FvatfA</i> 5' – határoló régió
<i>FvatfAdownrev</i>	TCCTCCTTGTGCGATGTTCTTTTAG	<i>FvatfA</i> 3' – határoló régió
<i>FvatfAupkimrev</i>	<u>TC</u> ACTGGCCGTCGTTTTACAAAGATCCGCCGGCCTGAACCGCGAA	5' <i>FvatfA</i> régió <i>hph</i> szakasszal
<i>FvatfAdownkimfwd</i>	<u>CATGGTCATAGCTGTTTCCTGACTTCATTTCGCGTTTGAGCTGTA</u>	3' <i>FvatfA</i> régió <i>hph</i> szakasszal
<i>FvatfAnestedfwd</i>	ACAGTGCCTACAGTGTGAAGCAGG	<i>FvatfA</i> 5' nested
<i>FvatfAnestedrev</i>	GGTTCCATTTGTTGTCGGTGCCTT	<i>FvatfA</i> 3' nested
<i>M13F</i>	TTGTA AACGACGGCCAGTGA	5' <i>hph/gen</i> marker gének
<i>M13R</i>	CAGGAAACAGCTATGACCATG	3' <i>hph/gen</i> marker gének
<i>FvatfAcompkimfwd</i>	<u>CATGGTCATAGCTGTTTCCTGACAGTGCCTACAGTGTGAAGCAGG</u>	5' <i>FvatfA</i> régió <i>gen</i> szakasszal
<i>FvatfAcomprev</i>	TCTCAATCGCAGCTTGTGTTGCTT	3' <i>FvatfA</i> flanking régió a terminator szakaszon túl
<i>FvmnSODupfwd</i>	GTCTTCTTAACTTTATCAGTCCACTCCTTCG	<i>FvmnSOD</i> 5' – határoló régió
<i>FvmnSODdownrev</i>	GCACTGATTGAATGCGTAGCTCCTCTGCCAGA	<i>FvmnSOD</i> 3' – határoló régió
<i>FvmnSODupkimrev</i>	<u>TC</u> ACTGGCCGTCGTTTTACAAGTTTGACTACAGTATGCTGATAATG	5' <i>FvmnSOD</i> régió <i>hph</i> szakasszal
<i>FvmnSODdownkimfwd</i>	<u>CATGGTCATAGCTGTTTCCTGAAGAGA</u> ACTTGAAAAGAGTCGATA	3' <i>FvmnSOD</i> régió <i>hph</i> szakasszal
<i>FvmnSODnestedfwd</i>	CACCCGCCCTCACGACAAACGTCT	<i>FvmnSOD</i> 5' nested
<i>FvmnSODnestedrev</i>	CATCTCCAATGCTGGAATGGTCCAGC	<i>FvmnSOD</i> 3' nested
<i>FvmnSODcompkimfwd</i>	<u>CATGGTCATAGCTGTTTCCTGATTAGTACCGTTTGCCTACGGATA</u>	5' <i>FvmnSOD</i> régió <i>gen</i> szakasszal
A kópiaszám meghatározáshoz felhasznált primerek listája		
<i>FVEG2866shortfwd</i>	CTTGAGGACGGGTTTGACAC	<i>FvatfA</i> gén forward primer
<i>FVEG2866shortrev</i>	CGCTTCGGACTTATTGGTTG	<i>FvatfA</i> gén reverse primer
<i>FVEG11192shortfwd</i>	CAAGCACCACCAGACCTATGT	<i>FvmnSOD</i> gén forward primer
<i>FVEG11192shortrev</i>	CTCCCAAGCGTCAATACCG	<i>FvmnSOD</i> gén reverse primer

A qRT-PCR kísérletekben felhasznált primerek listája

<i>carRAF</i>	AGCAAACCGACCTTTCAC	<i>carRA</i> gén forward primer
<i>carRAR</i>	CCATCCCACAAGACAATG	<i>carRA</i> gén reverse primer
<i>carBF</i>	CTTCTCCTCCCTCGCTTCTTC	<i>carB</i> gén forward primer
<i>carBR</i>	CTCGCCAGACTCAAAAATGCTAG	<i>carB</i> gén reverse primer
<i>carTF</i>	ATGAGTGGATTGCTGATGTG	<i>carT</i> gén forward primer
<i>carTR</i>	GGGGTTGAAGAGTTGAAGG	<i>carT</i> gén reverse primer
<i>fum1F</i>	ACAGCCCAAGCAGTAAGC	<i>fum1</i> gén forward primer
<i>fum1R</i>	CACCCGACACACGATATG	<i>fum1</i> gén reverse primer
<i>fum8F</i>	AGCATCCAACAGAAATACGC	<i>fum8</i> gén forward primer
<i>fum8R</i>	GCCTCTCTCATTGAAACGAC	<i>fum8</i> gén reverse primer
<i>fum21F</i>	CCATTACAAGCCATTCCAC	<i>fum21</i> gén forward primer
<i>fum21R</i>	ACAAGCCACGATTTAGACG	<i>fum21</i> gén reverse primer
<i>bik1F</i>	GAGCACACACCAACCATTC	<i>bik1</i> gén forward primer
<i>bik1R</i>	GACTGAGCCGAGATACAAGC	<i>bik1</i> gén reverse primer
<i>tef1F</i>	GAGCGTGAGCGTGGTATC	<i>tef1</i> referencia gén forward primer
<i>tef1R</i>	CGAGGGTGTAGGCAAGAAG	<i>tef1</i> referencia gén reverse primer
<i>tub2F</i>	CGGTCAGTGCGGTAACCAA	<i>tub2</i> referencia gén forward primer
<i>tub2R</i>	GGCTCGGGGAACATACTTGT	<i>tub2</i> referencia gén reverse primer
<i>cyp2F</i>	CTACCCCGCCATAACTGCTT	<i>cyp2</i> referencia gén forward primer
<i>cyp2R</i>	AGAGCACGGAAGTTCTCAGC	<i>cyp2</i> referencia gén reverse primer

M4. Az egyutas ANOVA statisztikai elemzés eredményei

M4.1. Az *FvatfA* egyutas ANOVA eredményeit összefoglaló táblázat

Vizsgált tulajdonság		Törzsek				Egyutas ANOVA	Tukey's post hoc teszt			Biológiai ismétlések száma törzsenként
		FGSC 7600 (A)	$\Delta FvatfA$ (B)	<i>FvatfA</i> 'C (H7) (C)	<i>FvatfA</i> 'C (H9) (D)	p - érték (p <)	adj. p-érték			
							B vs. A	B vs. C	B vs. D	
Vegetatív növekedés (telepátmérő;mm)	Czapek-Dox agar	79.50±0.60	70.13±1.15	77.75±1.39	77.92±1.51	2.20E-16	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3
	PDA agar	81.83±0.39	63.71±1.12	82.00±0.43	82.08±0.29	2.20E-16	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3
Invazív növekedés (telepátmérő; mm)	72 h paradicsom	7.92±2.07	2.25±0.87	6.58±1.38	7.42±1.98	1.19E-10	0.00E+00	4.00E-07	0.00E+00	3
	72 h Czapek-Dox agar	36.67±0.58	30.33±1.15	37.33±0.58	38.67±1.53	4.42E-05	3.32E-04	1.63E-04	4.57E-05	3
	96 h paradicsom	12.75±4.16	3.08±0.79	10.33±3.73	11.50±3.80	3.42E-08	1.00E-07	2.68E-05	1.60E-06	3
	96 h Czapek-Dox agar	53.33±1.53	43.67±0.58	52.00±2.65	51.67±0.58	2.68E-04	3.22E-04	8.94E-04	1.17E-03	3
Spóratermelés ($\times 10^7/\text{cm}^2$)		6.21±0.29	3.98±0.36	5.97±0.14	6.24±0.41	5.85E-05	1.18E-04	2.65E-04	1.08E-04	3
Spóra méret (μm)	Hosszúság	10.43±0.23	8.07±0.13	8.95±0.41	9.02±0.90	3.25E-03	2.07E-03	2.22E-01	1.78E-01	3
	Átmérő	4.85±0.66	4.94±0.18	3.93±0.51	4.19±0.51	9.64E-02	9.96E-01	1.36E-01	3.16E-01	3
Spóra életképesség (telepek száma)	25 °C	86.67±10.67	81.67±7.42	71.78±11.72	87.44±11.63	1.25E-02	7.45E-01	2.10E-01	6.52E-01	3
	42 °C	74.67±11.62	71.44±11.96	68.33±7.38	71.33±8.36	6.16E-01	9.02E-01	9.11E-01	1.00E+00	3
	45 °C	46.67±6.63	39.89±5.75	45.56±7.38	49.33±5.00	2.30E-02	1.20E-01	2.40E-01	1.55E-02	3
	4 °C	25.00±8.83	24.11±6.60	32.00±4.61	30.11±6.11	4.70E-02	9.92E-01	8.02E-02	2.50E-01	3
Abiotikus stresszérzékenység (relatív növekedés)	H ₂ O ₂	74.59±1.23	40.04±0.94	68.23±5.96	66.87±7.34	9.84E-05	9.88E-05	4.21E-04	5.93E-04	3
	tBOOH	54.58±0.69	47.83±1.75	50.55±2.83	50.67±2.55	2.87E-02	1.93E-02	4.46E-01	4.13E-01	3
	MSB	6.39±2.70	39.76±7.22	59.14±4.02	58.57±3.45	1.80E-03	2.87E-03	4.22E-03	5.07E-03	3
	CR	52.91±2.90	40.22±2.27	48.51±3.27	49.60±2.57	3.02E-03	2.31E-03	2.69E-02	1.40E-02	3
Fumonizin termelés ($\mu\text{g/g DCM}$)	FB1	37.27±4.89	0.00±0.00	37.34±11.17	28.44±8.81	4.83E-06	4.00E-06	1.60E-04	1.04E-04	5
	FB2	8.78±1.92	0.00±0.00	5.62±1.86	6.32±1.01	3.58E-07	2.00E-07	6.37E-05	1.65E-05	5
Karotenoid termelés ($\mu\text{g/g DCM}$)		19.44±2.68	0.47±0.03	24.46±8.69	27.05±4.87	9.08E-04	8.60E-03	2.02E-03	1.04E-03	3
Bikaverin termelés (mg/g DCM)	5. nap	4.26±1.12	41.37±13.32	9.57±4.06	9.50±4.24	4.87E-12	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3
	7. nap	7.18±5.36	52.50±17.45	14.31±5.90	14.44±7.24	2.13E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3
	9. nap	9.79±2.56	54.50±5.67	15.60±7.03	11.53±6.09	2.20E-16	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3

Relatív géneexpresszió (- ΔC_T)	<i>fum1</i>	8.10±0.88	12.10±0.31	8.50±0.26	8.86±0.05	2.93E-05	3.81E-05	8.31E-05	1.76E-04	3
	<i>fum8</i>	5.19±0.30	8.78±0.16	4.08±0.50	4.84±0.20	4.13E-07	3.60E-06	4.00E-07	1.70E-06	3
	<i>fum21</i>	6.25±0.52	6.57±0.52	4.95±0.54	5.54±0.45	1.84E-02	8.64E-01	1.93E-02	1.36E-01	3
	<i>bik1</i> (3. nap)	6.93±2.93	11.46±0.69	7.85±0.48	8.15±0.83	3.55E-02	3.23E-02	8.85E-02	1.23E-01	3
	<i>bik1</i> (5. nap)	10.65±0.80	12.94±2.59	8.51±2.28	10.00±2.98	2.07E-01	6.36E-01	1.66E-01	4.51E-01	3
	<i>carRA</i>	7.19±1.22	17.12±1.29	6.33±0.94	5.50±1.73	1.54E-05	7.46E-05	4.06E-05	2.32E-05	3
	<i>carB</i>	4.68±2.00	13.94±0.83	4.56±1.08	3.22±1.90	9.35E-05	3.54E-04	3.23E-04	1.25E-04	3
	<i>carT</i>	9.79±0.99	10.67±1.54	10.40±1.40	9.93±1.26	8.31E-01	8.43E-01	9.94E-01	8.97E-01	3

M4.2. Az *FvnmSOD* egyutas ANOVA eredményeit összefoglaló táblázat

Vizsgált tulajdonság		Törzsek			egyutas ANOVA	Tukey's post hoc teszt			Biológiai ismétlések száma törzsenként
		FGSC 7600 (A)	<i>ΔFvnmSOD</i> (B)	<i>FvnmSOD</i> °C (C)	p - érték (p<)	adj. p-érték			
						B vs. A	B vs. C	A vs. C	
Abiotikus stresszérzékenység (relatív növekedés)	MSB	97.27±1.83	46.93±6.11	94.84±1.95	7,55E-06	1,16E-05	1,55E-05	1,55E-05	3
	KCl	65.39±1.76	56.00±3.17	64.90±3.74	1,39E-02	1,94E-02	2,44E-02	2,44E-02	3
PAF érzékenység (relatív növekedés)	100 µg/mL	32.05±2.22	25.64±2.22	29.49±2.22	3,32E-02	2,85E-02	1,65E-01	3,92E-01	3
Mitokondriális morfológia	Térfogatfoglalás (%)	19.01±0.59	25.91±4.10	18.95±2.43	1,84E-05	7,18E-05	9,55E-05	9,99E-01	9
	Hifaátmérő (mm)	2.33±0.18	2.00±0.24	2.26±0.16	5,11E-03	5,37E-03	3,87E-02	7,44E-01	9
Légzés	Teljes	9.22±0.58	12.65±0.11	9.34±0.16	3,35E-05	5,48E-05	6,66E-05	9,20E-01	3
	KCN-szenzitív	8.90±0.48	11.84±0.18	8.87±0.05	7,34E-05	1,34E-04	1,29E-04	9,97E-01	3
	Alternatív oxidáz-függő	1.41±1.04	1.10±0.68	0.41±0.53	1,35E-01	1,43E-01	2,35E-01	9,21E-01	3
	KCN+SHAM rezisztén reziduális	0.25±0.04	0.81±0.27	0.32±0.03	1,03E-02	1,25E-02	2,28E-02	8,56E-01	3

Fumonizin termelés (µg/g DCM)	FB1	35.37±2.81	29.98±3.28	31.61±4.01	1,06E-01	9,47E-02	7,46E-01	2,77E-01	5
	FB2	8.78±1.92	8.14±0.61	6.35±1.61	5,75E-02	7,67E-01	1,78E-01	5,50E-02	5

M5. A kétutas ANOVA statisztikai elemzés eredményei

M5.1. Az *FvatfA* kétutas ANOVA eredményeit összefoglaló táblázat

Vizsgált tulajdonság		Törzsek								Kétutas ANOVA		
		FGSC 7600 (A)		$\Delta FvatfA$ (B)		<i>FvatfA</i> 'C (H7) (C)		<i>FvatfA</i> 'C (H9) (D)		p-érték (törzs)	p-érték (kezelés)	p-érték (törzs és kezelés közötti interakció)
		kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt			
Abiotikus stresszérzékenység (telepátmérő, mm)	H ₂ O ₂	79.21±0.5 2	59.08±1.0 1	70.04±1.4 5	28.04±1.6 4	78.17±1.9 4	53.29±4.0 8	78.17±1.9 4	52.25±5.5 2	2.20E-16	2.20E-16	2.20E-16
	tBOO H	79.46±1.1 3	43.38±1.0 9	69.75±1.4 4	33.38±1.8 9	78.17±1.9 4	39.54±3.0 7	78.17±1.9 4	39.63±2.7 0	2.00E-16	2.00E-16	8.87E-02
	MSB	78.33±1.5 0	47.29±1.9 1	70.92±1.5 4	28.17±4.8 2	77.46±1.6 6	45.79±2.7 7	77.71±1.5 5	45.50±2.3 8	2.20E-16	2.20E-16	4.10E-15
	CR	79.38±1.0 0	42.00±2.4 6	69.88±1.2 3	28.13±2.0 7	78.17±1.9 4	37.88±1.6 9	78.17±1.9 4	38.79±2.7 7	2.20E-16	2.20E-16	1.20E-03

Vizsgált tulajdonság		Tukey post hoc teszt (adj. p-érték)					
		B vs. A (kontroll)	B vs. C (kontroll)	B vs. D (kontroll)	B vs. A (kezelt)	B vs. C (kezelt)	B vs. D (kezelt)
Abiotikus stresszérzékenység (telepátmérő, mm)	H ₂ O ₂	2.00E-07	5.30E-06	5.30E-06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	tBOO H	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	MSB	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	CR	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

M5.2. Az *FvnmSOD* kétutas ANOVA eredményeit összefoglaló táblázat

Vizsgált tulajdonság		Törzsek						Kétutas ANOVA		
		FGSC 7600 (A)		$\Delta FvnmSOD$ (B)		<i>FvnmSOD</i> 'C (C)		p-érték (törzs)	p-érték (kezelés)	p-érték (törzs és kezelés közötti interakció)
		kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt			
Abiotikus stresszérzékenység (telepátmérő, mm)	KCl	75.79±1.58	49.54±0.31	69.58±2.57	38.92±0.88	77.29±0.26	50.17±2.91	1,17E-06	2,82E-13	1,11E-01
	MSB	76.67±2.01	74.54±1.39	70.75±4.27	33.13±3.92	78.08±1.12	74.13±0.33	1,69E-09	5,65E-08	6,82E-08
PAF érzékenység (telepátmérő, mm)	100 µg/mL	26.00±0.00	8.33±0.58	26.00±0.00	6.67±0.58	26.00±0.00	7.67±0.58	1,33E-02	2,00E-16	1,33E-02

Vizsgált tulajdonság		Tukey's post hoc teszt					
		adj. p-érték					
		B vs. A (kontroll)	B vs. C (kontroll)	A vs. C (kontroll)	B vs. A (kezelt)	B vs. C (kezelt)	A vs. C (kezelt)
Abiotikus stresszérzékenység (telepátmérő, mm)	KCl	9,73E-03	1,78E-03	8,93E-01	9,28E-05	5,26E-05	9,97E-01
	MSB	1,30E-01	4,37E-02	9,83E-01	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+00
PAF érzékenység (telepátmérő, mm)	100 µg/mL	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	3,24E-03	9,06E-02	3,95E-01

M6. A promóter analízis eredményei

FVEG_10718 *carRA*

GTATGTCA AAGCATACGATACTCCATGAAGCTATACATACAGGATACACCCATCCACAGCCAGCAGACCAC
CAGTAACTTAAC TATATAGCCAAACCCTCATCAGATCGAGATGATCAGGAAGGACGTAGGTCGCATCA
ATCGCTGGATAACACGGCACGCGATGGGAATATCCATCCATCAAAACCACTAGCACA ATTTGTCACGC
CTCA TAATCAAGACCCATCTCCATCACGGTAACGG CAATGTCA AAAAGACCGAGTAACCCGAAAAAAA
AGGGTCTCGAGTTAATTGATGACAAGTACACTCGATACCCAAAAGAGTCGAACAAAAAAGT CTTGAC
CTCAA GAGTCCCTGAGATGTAACA TGACAGAA AACGCCTCTCCCCACTCACACTCAACAATGGTGAG
CAGAAGCTAGCGGTGGGGGAGCATTATTGTCACCCAAGAAATAACGGACAGGGGTAAAGGGCTGTGT
TAGTATCTGAAAAACAACTGTGGACACAAGCACCCTCACACTCCGACTTCTTCTCAACAACCTTT
TCCTCACAATCTTT TCACTCTG GCTTTATTTGAAGCCCATATCGT ATCCCTCACC ATCTGCTTTTTGT
TGTGTTACGTACACGAAATAAATAAACCTCTGTCAAA ATG

FVEG_10717 *carB*

ATAAACCACCAACCAATCATTCAACACGCATCACACCGCCAAGTCC CTTAAAGACCCTCCAAACCA
ACCCGTCAAT GATCGTCA ACGCATCAACGACTTCAATTCTCCTGTAATCTTCAATGAATCACTAAAATC
CCTCAAAAAACAACTGCGCCTCGCTAAGCACAGGGTAATCTGGCCTTTCACATGTACGCCAAGTGGT
CTCATTAGACGAGTGC AAGGAAAAAGTGGATCAAAACAAAATG CAAGACCTCATTGACTCTATTGCT
TTGGCTATCAAAACCGTTGGCTTCGGGTGAGTCGGTTAC TGACTGAG CATCTTCACTTTTTACAGCAA
AA ATG

FVEG_09251 *carT*

AGCTTGATG TTCCGTCA GATGTTTTTCATGGAAGCAATTAATGAAACCATGAAAGTAACTATTGTTGCCAAG
A GATAAAAACCGCCAAGAAAA TCGAGTCA GCCATGAAGCAAACATCCAATACCCCGTACCTGAGAG
CCATCTGACCATTATACATGATTTCGCTTGGTTGCTAAGACGAAAGGCTGGTATTATAATATCTGCAT
CGGAGTAACAGTGATACTATAGAATCTTTTGTTC AAGAGAGAATA ACTCGTC TGATTATGTTCTCAT
CACGTTCAA TGGTTC ATGTCTTGATTATATCGACCAGGATATGTAATCATCAAGACCAACTTCACT
TACCGACATCGATATCCTCATCGCCAATAAACCACCACCGCCTGATAGATAGTATGTACCACTTCGGA
ATCTAATAGCCTACTCTAAATCCAGCTCAACAAGCAATAAACGCCAGGATCCAGCC TAGACTCA CACA
CCGGAATCTCG AGTCGTCA ATCCCCCGCCTGCCGTACGCCGCAAATCCACGATGCTCATGCCAACG
AAGCACAT CTGCTCA AGCCACACTCGCTTTCGCTAACACAGTATCGCAAGTACACGCAAGATGCATC
CATCATCCCTTAAACGCCAACGTCCAAACTAACCATC TTGCTGTCAGCTTTTGATAGGCCCCCCCAAG
CGACGAGCGGAACAATACCGCACACGCGAAGGCGCACGAAGTATTGAGCCACTAGTGAGTAGGTAGA
GTAAATCAAATCGAATCAACAACCTCAGCTTTCGGGTGCCGACATGAGTTGTTTTTGTGGTGATTCT
TTCATGCGGAAGTGTGCGGGCTTGGTATTTTCGTTTTATGGTGCGGAATCCGGTTTGGTTTACTGATG
G TAGCTCA T TGACTTTA CACAACCATGCGGGAATACAACGAAGCGGGTTTGCCTACTTAATAAGTA
TGAGATCCATATTTAAAAATACCCTATTATCATGATGCGTTTTGTAAGAGTTGTGTTTTATTGTTTT
AAAGTTGA TGACGAC GTGAAGCTTTAAAGTGTTATCTTCACTTGCAGGTTTCATCGTCGGTGCCAA
CACTGCATTGCGTTGCAAACGTACACAGACATAGACAACAGGGTGC ACTGTGTTGTGATTGTATAGAG
CCAATGCTATGTTTCTCACTTGGCAGATGAGCTGAACTTCATTTACGCTTGTTTTATAGATATATCTT

TAGAGCATGCCTCTTGTCTTGTCATCTTTGTTTCCCAGACCCCAAACGATATTGTCGCAAACGAAACG
AAAGCAACTTTTTCTCTCCTATTATTAGCCAATTTTCGCAAATAAACTTTACTATG

FVEG_00316 *fum1*

CACCTCTATGCCAGCCCTGACTCAAATGGCACAGCACGCACACCATCACTAACGGTAAACTCAAAACGACA
GCCGCTTGCAATTGAGGCTAAAGCACGGTTCCGGCTTATACGAACAGAAGTCTGACATCTTTCATGATAAGAA
GAAGAAGAAGAAGCTGTCCGAATGATACAGACCCAAATCAGATATCCGACCGGCTCCTGGTCCCATTCCAT
TATGAGCCAATGGGGCAATTGCCCCCTTTCCCTACCCGAGTGTTCGACGTTACTGTCCCTCACCCGGGA
ACTCTAGCAAACCTATTGGGATGTAGGATAATAATAGTAACCTTCCTACTGGTTGCCGAATTTCCGGGTCTCTT
ACTCGTCTTTGAGGATACTGACAATTGCGCTTCGGAGTATTGCGTGTCTCTCGGATGGGAGACTAAATCGT
ATACAACAACCGGAATTCGATGCTGATTGCAATGATAGAGACGAGACAGATATATAACCATGAAATACA
GTGTTATTGGAGACTCTGTATTTGATCCATCGCAACCTTATTATCGTTTTAAACGCTACTGATATCATC
AACGTTTCGACATG

FVEG_14635 *fum8*

ATTAACAGTTTTTAAACTTGAAATCAAGATAAACTTACCAAGCTAGCACTGACTTGTGTGTGAAAGT
GAATTACTCTGTAAACCGAGAAATCCAATATCATGCATTGGCGTTGGCAAAAACAATCCTCTGCTTTTTTGC
ATGAACAATATAACGGAATCTAAATACTCGATGGACCACACGAGTACGTAAAGGTAGCAGCAATGAAGGC
ATATAATGAACAAGACGCTCAACTCAATGTATCTCTACTCTCCAAGGAACAGATCTCAAAATGGCTT
CCTTCTCCTGTGCCAAGCTGGGCTGGTACGAGGAATGTGACTACTTACCGAATGTGACATCAGAA
AACTGTTGTATGTACAACTTCAATTATATGCTACAGGTTGAGCTGAGCTACTAGGTAGGTAGCAATG
ATTTATCTGCACTCACAGAAACAGTGCCCGGAAGCATCTTTCAAACATCCGACAGATGCCACACGG
GGTATCCGAACCTCCGAATAACCCCCAGTACAACGTTGGCCTTTTGGATTCTTGGTAGCAGAGTCTAC
CGATCAGCTACCTTACCTAGTCAGTCCATCAGTTTCCAGTCGTTGACTCGAAATGAGGAACAGATACA
AAATCATCCCGGTTACATTTAAACTGAGGTTTTCATACAGTCAAAGTCACTAACTCTGAACAACCTC
ATTTTACCCTCTGTCAGCCCTTGCAATGCCATCATG

FVEG_14633 *fum21*

AAAAATATAGAAGAATAATAGATCAAATATGCCTAAAAGAAATGCTCCCAGACACGATCCTAGGCAAGC
ATAAAAGCTCATATAACTCCATCCACAAGCTCCTCACCAGTGAACGCTGAATACTGTCTATTACTCA
ATTGGCTCCAGAAACCACGCCCTTCTTCCAAGTAAAGTGCCATAACCACTGGATAAGCAAGCAGAT
GGAAAATAGGAATAGACCCTATTACCGAGTAAGTCTTATCGGTAGCTGAGTGTGATGCATCTGGTAA
TCCCTTAGTTCAGCCATTATCCATCCAGGTAATCCATATCAAAACGTGTTTCTTCCACTTGCTGGGTTG
TATCTTGAAGTAACAGCGGGACTAGCCTAGGGGTCGGGCCGTCTGCCGTGATAAGCGCTGTGATGTT
ACGTTATGTCGACTAAAGTACCGTGCAGGGCATGTTGATGATTGCATGCATTAGTCTACCTAACAGAA
ACTGCCGTGTTATCCGAACAAAACATTGAACTTTGCTGTGTCCTTGGCCATCATGTTAAATCATAAAG
CTGCCTTAATTCTAGGACCCTTCGTAGACCTTGTTTTATATCTTATTCTACTTGATCATCTGTGATTT
ATTTATCATCAACTTTTGGGATGGCGGGGTCATTGTGTTTGTACAGATAATCAGATTAGCGCAAA
TTCGAGACACAAGCCACGATTTAGACGACGTCGTGGCGCGTGTGAGTCGTGTAAGCGTCGTAAGTC
CGGTGTAAGTTGCTTGGCCTCCTCCACTGCTTTGTAAGTGTACCTAGCTTATGGTTCTTATGACTACTAG
GTAATGGCACAACCCCTTGCAATCAATGCCAAGTCAGATTCCTCCAGATGGTAACTAGTCACTCTCA

GCCCGAGCTAACCAGAAGAGCAGAAATCGTCGATAGAATGCTTATATAGCAGCTCAAGCTGGAAAGC
TAACGACGGAGATACAGAGCGTGGACCATCAGGATCGCCGGTGCAACATACAAGGGGGAGTTTGACCG
CCCTCTCAAACGAGCCCATATGGTGGAAATGGCTTGTAATGGATCAGCGGAAGAGTCTTCGAGATTTGA
TGGCTCGGATGCACACAGCCTTTTGATGAGCCTCAGCAATACGACTCTACGACTAATACTGAGGCAA
CAGAGATGTCGCAGTGGCAGAATTGGTTCGTTAGCGACCTACCTCTAGGGAGCGATGTGCAACTTAC
AGGGACATCTGATGAGTCTTTGACCGACTGGTTGGACCCCCAGCTTGTCAACCCAGCAGATACCGCG
GCCATTATG

FVEG_03379 *bik1*

CTAAAGCCAACGTCAAGGAGAGTCTATTCAAGTGCCGAGATTCGAATCACCATCCAGGGACAGAG
CCTCACGTAGTTGGTATTACACATTAGCGCATCGCGTCCGTGGCTCTTCTCTTGACTCGATTTCGTCTC
GGTTCACGGCACATACTACGCCACCCTGCCCGTTTCAGCTTCCCCTGCAAGATAAGAATTCGGACCTC
TTCGGAGCTTCATCTCTGATCTGATCCTGCGTGCGTAAGTACTAGCCGCTATACTGACTCTGGCCC
ACCCATGCAAGCCACTACGGACATTTTCGCAAAAAGCGCGGAACCAACACTAGCCAGACCCTTAC
GAATTACAAAAGGCTACGTATGTTGAACCTCTACAGTATAAGCCAGATACATCTTGGCGA
GAAAATAGCCAAGACAAACGAATATTGCACCTTTGTTACAGCTTTCAACAGCGATTCTTTTTGCC
ATCTTACATTTCAAGATG

25. ábra Az ATF/CREB kötőhelyek elhelyezkedése a vizsgált génekben. Ábramagyarázat: AAAAAAAAAAAA – Az azonos génklaszterbe tartozó génnel átfelő régió; ■ – A transzkripció starthely (TSS); ■ – Poly-A farok; AAAAAAAAAA – A TSS és ATG között található szakasz; ■ – -150 TSS +50 bázispárok között található kötőhelyek; ■ – TSS +50 < található kötőhelyek; ■ – < -150 TSS található kötőhelyek; **ATG** – Start kodon

Transzkripciós faktor	ID	Fajok
ATF	[T00049]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATF	[T00051]	<i>Homo sapiens</i>
ATF-1	[T00968]	<i>Homo sapiens</i>
ATF-2	[T00167]	<i>Homo sapiens</i>
ATF3	[T01313]	<i>Homo sapiens</i>
CREB	[T00163]	<i>Homo sapiens</i>
CREB	[T00164]	<i>Rattus norvegicus</i>
CREB	[T00989]	<i>Mus musculus</i>
CRE-BP2	[T01017]	<i>Mus musculus</i>

Gén	Transzkripciós faktor	ID	Szekvencia	Pozíció** *	Különbözőség (%)
<i>carRA</i>	ATF	[T00049]	CGTGACGTCA	254-263	0.48
			TGACGTCAAC	256-265	0.24
	ATF	[T00051]	GTGACGTCA	255-263	0.31
			TGACGTCAA	256-264	0.54
	ATF-2	[T00167]	GTGACGTCA	255-263	0.00
			TGACGTCAA	256-264	0.05
	ATF-1	[T00968]	CGTGACGTCAA	254-264	4.58
			GTGACGTCAAC	255-265	2.83
	ATF3	[T01313]	GTATGTCA	-76 - -83	8.66
			ATTTGTCA	114-121	14.91
			ACGCGTCA	121-128	4.93
			CAATGTCA	160-167	9.86
			TGACGTCA	256-263	0.00
			TGACAGAA	285-292	14.91
	CREB	[T00163]	TGACTCTG	477-484	9.86
			GTGACGTCA	255-263	0.02
			TGACGTCAA	256-264	0.02
	CREB	[T00164]	GTGACGTCA	255-263	0.00
			TGACGTCAA	256-264	0.02
	CRE-BP2	[T01017]	GTGACGTCA	255-263	0.00
			TGACGTCAA	256-264	0.47
			ATGCCGTCA	508-516	13.99
			TGCCGTAC	509-517	13.52
CREB	[T00989]	CGTGACGTCA	254-263	0.00	
		TGACGTCAAC	256-265	0.48	
		TGCCGTACG	509-518	14.72	

<i>carB</i>	ATF	[T00049]	GAAGACGTCA	204-213	2.28
	ATF	[T00051]	AAGACGTCA	205-213	1.29
	ATF-1	[T00968]	GAAGACGTCAT	204-214	3.49
	ATF-2	[T00167]	AAGACGTCA	205-213	1.85
	ATF3	[T01313]	ACCCGTCA	23-30	8.66
			GATCGTCA	33-40	9.86
			AGACGTCA	206-213	0.00
			TGACTCTA	215-222	8.66
			TGACTGAG	267-274	12.39
	CREB	[T00989]	GAAGACGTCA	204-213	6.12
	CREB	[T00163]	AAGACGTCA	205-213	0.86
CREB	[T00164]	AAGACGTCA	205-213	3.17	
CRE-BP2	[T01017]	AAGACGTCA	205-213	13.99	
		AGACGTCAT	206-214	13.99	
<i>carT</i>	ATF3	[T01313]	TTCCGTCA	-56 - -63	7.45
			TCGAGTCA	22-29	8.66
			ACTCGTCA	180-187	8.66
			TAGGGTCA	212-219	12.39
			AAGAGTCA	395-402	8.66
			AGTCGTCA	418-425	7.45
			TCTCGTCA	482-489	8.66
			TGTCGTCA	580-587	7.45
			TAGCGTCA	814-821	4.93
			TGACTTTA	823-830	4.93
	TGACGACA	959-966	7.45		
	CRE-BP2	[T01017]	TTGTTCGTCA	579-587	13.99
			TGTCGTCAG	580-588	13.99
			ATGACGACA	958-966	13.99
			TGACGACAG	959-967	13.99
<i>fum1</i>	ATF3	[T01313]	TGACTCAA	-464 - -457	7.45
			TGACATCT	-360 - -353	7.45
<i>fum8</i>	ATF3	[T01313]	TGACTTGT	-162 - -155	4.93
			TGACTACC	107-114	12.39
			TGACATCC	125-132	8.66
			ATCCGTCA	209-216	7.45
			CCTAGTCA	359-369	13.59
			TGACTCGA	384-391	8.66
			GAAAGTCA	452-459	6.14
TTGTGTCA	486-493	11.18			

<i>fum21</i>	ATF3	[T01313]	ATTAGTCA	63-70	11.18
			TATCGTCA	205-212	8.66
			TGACAGAT	591-598	14.91
			TGACTACT	742-749	11.18
			CCAAGTCA	780-787	6.14
			TCCCGTCA	791-798	8.66
			CATAGTCA	807-814	13.59
			TGACGCCT	949-956	3.73
			TGACTGTA	1064-1071	12.39
<i>bik1</i>	ATF3	[T01313]	TGACTCGA	-67 - -60	8.66
			TGACCCTG	71-78	13.59
			AAGGGTCA	158-165	12.39
	CREB	[T00164]	CAAGGAGAG	-172 - -164	10.36
			CTGACCCTG	70-78	14.90

*** - A pozíciókat a promoter analízisre kiválasztott gének DNS szekvenciáiban található transzkripció starthelyétől számítottuk, amelyeket a 25. ábra mutat be részletesen.

M7. A főkomponens-analízis eredményeit összefoglaló táblázat

A törzsek koordinátái:

Törzsek	Koordináták			
	PC1	PC2	PC3	PC4
FGSC 7600	-2.96274	-3.23396	-0.40362	3.00E-16
<i>ΔFvatfA</i>	7.161313	-0.30343	-0.03184	1.84E-15
<i>FvatfA</i> 'C (H9)	-2.08427	2.352623	-1.5677	-1.34E-14
<i>FvatfA</i> 'C (H9)	-2.11431	1.184762	2.003158	1.90E-14

A komponensek jelentősége:

	PC1	PC2	PC3	PC4
Standard deviáció	4.7915	2.4145	1.48708	2.335E-15
Variancia eloszlás	0.7406	0.1880	0.07134	0
Kumulatív eloszlás	0.7406	0.9287	1	1

Vizsgált tulajdonság		PC1 ¹	PC2 ¹	PC3	PC4
Vegetatív növekedés (telepátmérő;mm)	Czapek-Dox agar	-0.20758	-0.04279	-0.00465	0.434012
	PDA agar	-0.20774	0.038742	0.013478	0.055648
Invazív növekedés (telepátmérő; mm)	72 h paradicsom	-0.20622	-0.04442	0.073948	-0.09748
	72 h Czapek-Dox agar	-0.20608	-0.05582	0.055358	-0.04607
	96 h paradicsom	-0.19971	0.090416	0.128655	-0.14456
	96 h Czapek-Dox agar	-0.20797	-0.02835	-0.03227	0.328134
Spóra méret (μm)	Hosszúság	-0.16154	-0.259	-0.06652	0.13909
	Átmérő	0.116462	-0.34304	0.034062	0.222351
Spóra életképesség (telepek száma)	25 °C	-0.01292	-0.25843	0.523838	-0.41231
	42 °C	-0.01587	-0.39504	0.19545	0.023971
	45 °C	-0.18929	0.037402	0.27661	0.223427
	4 °C	-0.11983	0.338667	-0.0277	0.217727
Spóratermelés (x ×10 ⁷ /cm ²)		-0.20756	0.007685	0.069213	-0.03962
Abiotikus stresszérzékenység (relatív növekedés)	H ₂ O ₂	-0.09997	-0.30782	-0.31408	-0.06236
	<i>t</i> BOOH	0.207575	-0.04091	0.021349	-0.14876
	MSB	-0.10626	-0.24973	-0.413	-0.31792
	CR	-0.11249	-0.2497	-0.39555	-0.0449
Fumonizin termelés (μg/g DCM)	FB1	-0.20478	-0.07977	-0.0087	0.01921
	FB2	-0.19993	-0.11855	0.012671	-0.04186
Bikaverin termelés (mg/g DCM)	5. nap	0.2083	0.025066	0.00881	0.009269
	7. nap	0.208015	0.032401	0.014124	0.090683
	9. nap	0.208101	0.005846	-0.05006	0.03274
Karotenoid termelés (μg/g DCM)		-0.19628	0.126594	0.099979	-0.10448
Relatív génexpresszió (-ΔC _T)	<i>fum1</i>	-0.20757	-0.01958	-0.06238	0.021576
	<i>fum8</i>	-0.19977	0.112684	-0.06622	-0.00509
	<i>fum21</i>	-0.13033	0.314506	-0.12283	-0.4052
	<i>bik1</i> (3. nap)	-0.20512	-0.06493	-0.06522	-0.03442
	<i>bik1</i> (5. nap)	-0.17524	0.201537	-0.16213	-0.057
	<i>carRA</i>	-0.20433	0.073964	0.065656	-0.06968
	<i>carB</i>	-0.2048	0.055817	0.092464	-0.06653
	<i>carT</i>	-0.16848	-0.18475	0.259818	-0.01311

¹ – A kézzel, pirossal vagy zölddel kiemelt tulajdonságok fontos komponensei a PC1-nek, PC2-nek, vagy mindkettőnek. A PC1 (pl. a mutáns és a többi törzs közötti különbség) nagyban függött a növekedéstől, invazív növekedéstől, stresszérzékenységtől, a spórák morfológiájától,

spóratermeléstől és a szekunder metabolitok termelésétől. A PC2 (pl. a különbség a vad típusú és a mutáns, valamint komplementált törzsek között) nagyban függött a spórák életképességétől 4, 25 és 41 °C-on, a spórák morfológiájától, a stressztoleranciától (a *tBOOH*-t és a 45 °C hőstresszt kivéve) valamint a *bik1* (5. nap) és a *fum21* gének expressziójától.

M8. Publikációk jegyzéke

Szabó Zsuzsa – Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló idegen nyelvű lektorált tudományos közlemények

Szabó, Z., Pákozdi, K., Murvai, K., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Logrieco, A. F., Emri, T., Ádám, A. L., Leiter, É., Hornok, L., Pócsi, I. (2020) *FvatfA* regulates growth, stress tolerance as well as mycotoxin and pigment productions in *Fusarium verticillioides*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(18):7879-7899.

Szabó, Z., Pákozdi, K., Murvai, K., Kecskeméti, Á., Oláh, V., Logrieco, A. F., Madar, A., Dienes, B., Csernoch, L., Emri, T., Hornok, L., Pócsi, I., Leiter, É. (2020) *FvmmSOD* is involved in oxidative stress defence, mitochondrial stability and apoptosis prevention in *Fusarium verticillioides*. *J Basic Microbiol.* 60(11-12):994-1003.

Más témában megjelent idegen nyelvű lektorált tudományos közlemények

Kecskeméti, Á., Nagy, C., Biró, P., **Szabó, Z.**, Pócsi, I., Bartók, T., Gáspár, A. (2020) Analysis of fumonisin mycotoxins with capillary electrophoresis - mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 37(9):1553-1563.

Potor, L.; Sikura, K. É.; Hegedűs, H.; Pethő, D.; **Szabó, Z.**; Szigeti, Z. M.; Pócsi, I.; Trencsényi, G.; Szikra, D.; Garai, I.; Gáll, T.; Combi, Z.; Kappelmayer, J.; Balla, G.; Balla, J. (2020) The fungal iron chelator desferricoprogen inhibits atherosclerotic plaque formation. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4746.

Farkas, E., Szabó, O., Gyémánt, G., Szaniszló, S., **Szabó, Z.**, Pócsi, I. (2018) Complexation of hydroxamate-based siderophores with cobalt(II/III): growth inhibitory effect of cobalt(III)-desferricoprogen complex on fungi. *Transit. Met. Chem.* 43 (4), 355-365.

Orosz, E., Antal, K., Gazdag, Z., **Szabó, Z.**, Han, K. H., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T. (2017) Transcriptome-based modeling reveals that oxidative stress induces modulation of the AtfA-dependent signaling networks in *Aspergillus nidulans*. *Int J Genomics.* 2017:6923849. doi: 10.1155/2017/6923849.

Pusztahelyi, T., Radócs, L., Gellért, Cs., Kovács, S., **Szabó, Z.**, Pócsi, I., Vad, A. (2017) Effect of preventive and curative fungicide treatment on *Fusarium proliferatum* infected maize - a field trial. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 52(1), pp.29–38.

Leiter, É., Bálint, M., Miskei, M., Orosz, E., **Szabó, Z.**, Pócsi, I. (2016) Stress tolerances of nullmutants of function-unknown genes encoding menadione stress-responsive proteins in *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.* 56 (7), 827-833, 2016.

Kovács, B., Hegedűs, N., Bálint, M., **Szabó, Z.**, Emri, T., Kiss, G., Antal, M., Pócsi, I., Leiter, É. (2014) *Penicillium* antifungal protein (PAF) is involved in the apoptotic and autophagic processes of the producer *Penicillium chrysogenum*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 61 (3), 379-388, 2014.

Konferencia kiadványok

Szabó, Z., Pákozdi, K., Szabó, K., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Hornok, L., Ádám, A. L., Leiter, É., Pócsi, I. (2019) The bZIP-type transcription factor, FvAtfA affects secondary metabolite production and invasive growth in *Fusarium verticillioides*. In *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Volume 66 Supplement 1*. p. 195.

Szabó, Z., Pákozdi, K., Szabó, K., Murvai, K., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Hornok, L. *et al.* (2019) Manganese superoxide dismutase is involved in oxidative stress defense, respiration and apoptosis prevention in *Fusarium verticillioides*. In *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Volume 66 Supplement 1*. p. 194.

Pócsi, I., **Szabó, Z.**, Leiter, É., Hornok, L. (2019) Involvement of AtfA and MnSOD homologues from *Fusarium verticillioides* in oxidative stress responses, sexual reproduction, and secondary metabolite production. In *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Volume 66 Supplement 1*. p. 180.

Pákozdi, K., **Szabó, Z.**, Nagy-Köteles, C. A., Gila, B. C., Murvai, K., Pusztahelyi, T., Á. Kecskeméti, Á., *et al.* (2019) A mangán szuperoxid dizmutáz gén szerepe az oxidatív stresszel szembeni védekezésben, valamint a légzésben és az apoptotikus folyamatokban, *Fusarium verticillioides*ben. In *Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos Szimpózium*. p. 39.

Szabó, Z., Pákozdi, K., Murvai, K., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Hornok, L., *et al.* (2019) A bZIP típusú transzkripciósfaktort kódoló *FvatfA* gén szerepe a *Fusarium verticillioides* szekunder metabolit-termelésében és virulenciájában. In *Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos Szimpózium*. p. 24.

Szabó, Z., Pákozdi, K., Szabó, K., Perge, D., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., *et al.* (2019) Characterization of *FvatfA* encoding a bZIP-type transcription factor in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*. In *30th Fungal Genetics Conference Abstract Book*. p. 142.

Szabó, Z., Pákozdi, K., Szabó, K., Murvai, K., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Logrieco, F. A., *et al.* (2019) Manganese superoxide dismutase is involved in oxidative stress defense and apoptosis prevention in *Fusarium verticillioides*. In *30th Fungal Genetics Conference Abstract Book*. p. 68.

Szabó, Z., Leiter, É. and Pócsi, I. (2018) Stress sensitivity of an *atfA* deletion mutant of *Fusarium verticillioides*. In *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018": Abstract Book*. p. 58.

Szabó, Z., Pákozdi, K., Szunyog, B., Leiter, É., Pócsi, I. (2018) Stress sensitivity of a *MnSOD* deletion mutant of *Fusarium verticillioides*. In *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018": Abstract Book*. p. 105.

Orosz, E., Antal, K., Gazdag, Z., **Szabó, Z.**, Han, K.H., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T. (2017) AtfA-controlled transcriptional changes in *Aspergillus nidulans* caused by oxidative stress. In *Mikológiai Közlemények Clusiana: VI. Magyar Mikológiai Konferencia*. pp. 124–126.

Leiter, É., Bálint, M., Miskei, M., Orosz, E., **Szabó, Z.**, Emri, T., Pócsi, I. (2017) Characterization of stress sensitivities of deletion mutants of *FUN* genes encoding menadione stress responsive

proteins in *Aspergillus nidulans*. In *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 64(S1). pp. 53–53.

Köszönetnyilvánítás

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Hornok László professor emeritus, az MTA rendes tagjának (MATE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar) és Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tették, és szakmailag támogatták a doktori munkám elkészítését.

Ezúton is nagyon köszönöm Dr. Leiter Éva egyetemi docensnek (Debreceni Egyetem, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék) a genetikai munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét, továbbá hasznos szakmai tanácsait.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Emri Tamás egyetemi tanárnak (Debreceni Egyetem, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék) az RT-qPCR kísérletek kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségével és értékes szakmai tanácsaiért.

Szeretném megköszönni Prof. Won-Bo Shimnek (Texas A&M University), hogy a transzformáláshoz szükséges plazmidokat. Hálásan köszönöm Dr. Oláh Viktor (Debreceni Egyetem, Növénytani Tanszék) egyetemi adjunktusnak a légzésvizsgálatban nyújtott segítségét, valamint Prof. Dr. Vasas Gábor tanszékvezető egyetemi tanárnak (Debreceni Egyetem, Növénytani Tanszék), a karotinoidok vizsgálatához szükséges fényforrást a rendelkezésünkre bocsátották. Továbbá szeretném köszönetemet kifejezni Gálné Dr. Miklós Ida tanszékvezető egyetemi docensnek (Debreceni Egyetem, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék) a mikroszkópi felvételek elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Gáspár Attila tanszékvezető egyetemi tanárnak és munkatársainak (Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) a CE-MS mérésekben nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Pusztahelyi Tünde központvezető egyetemi tanárnak és munkatársainak (Debreceni Egyetem, Agrárműszerközpont) a karotinoidok és bikaverin mérésében nyújtott segítségüket.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Ádám L. Attila tudományos főmunkatársnak (Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Osztály) az invazív növekedés vizsgálatában nyújtott segítségéért.

Szeretném megköszönni Dr. Antonio F. Logrieco intézetigazgatónak és munkatársainak (ISPA-CNR, Bari), hogy lehetővé tették a Campus Mundi program (EFOP-3.4.2-VEKOP-15-2015-0001)

keretein belül kísérleteim elvégzését és az alapvető toxinmérési technikák elsajátítását látogatásom alatt.

Nagyon köszönöm Tóth Gáborné laboratóriumi asszisztensnek és Pákozdi Klaudia doktorandusz hallgatónak, valamint Dr. Vassné Dr. Orosz Erzsébetnek a kísérletekben nyújtott odaadó segítségét.

Ezúton is köszönöm Dr. Jakab Ágnes egyetemi adjunktus, Dr. Pfliegler Walter egyetemi adjunktus és Dr. Fodor Tamás tudományos munkatársnak a hasznos szakmai tanácsait, valamint Dr. Gonda-Király Anita tudományos munkatársnak az élettani kísérletekben nyújtott segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Szabó Dóra, Tóth Erzsébet, Mancsiczky Sára, Szabó Katalin, Murvai Katalin, Szunyog Bálint szakdolgozóknak kitartó és lelkes munkájukért.

Köszönöm továbbá a Magyar Agrártudományi Egyetem Genetika, Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék, valamint a Debreceni Egyetem Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának a szakmai segítséget és támogatást.

Hálásan köszönöm szüleimnek, testvéremnek és barátaimnak a végtelen türelmet és támogatást, amellyel munkámat segítették.

A doktori munkám elkészítését az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával, illetve a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K119494 és K127931 számú pályázatainak anyagi támogatásával valósult meg.