

Doktori értekezés tézisei

Szabó Zsuzsa

Gödöllő

2023



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

DOI: 10.54598/003810

Doktori értekezés tézisei

Szabó Zsuzsa

Gödöllő

2023

A doktori iskola

Megnevezése: Biológiatudományi 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

A munka előzményei, célkitűzések

A *F. verticillioides* a kukorica világszerte elterjedt kórokozója, amely a szár- és csőpenészesedéssel hozható összefüggésbe, palántákon gyökérrothadást képes előidézni. 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 jelátviteli utakon át indukált védelmi mechanizmusok révén reagálnak. Élesztőkben a külső ingerekre főleg mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) szignáltranszdukciós útvonalak aktiválódnak, amelyek evolúciósan konzerváltan megtalálhatóak a fonalas gombákban is. A MAPK útvonalakon keresztül aktiválódó transzkripciós faktorok koordinálják a célgének, így az antioxidáns enzimek, valamint a szekunder metabolitok bioszintézisében résztvevő gének expressziójának szintjét, valamint idejét, így szabályozva a metabolikus folyamatokat és a sejtszintű 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).

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).

Kutatásunk a Sty1 MAPK által aktivált *S. pombe* Atf1 ortológ FvAtfA bZIP típusú transzkripciós faktort kódoló *FvatfA*, továbbá a mitokondriális mangán-szuperoxid dizmutáz (MnSOD) enzimet kódoló *FvmnSOD* gének megismerésére irányult; vizsgáltuk, milyen szerepet játszanak ezek a gének a

gomba növekedésében, stressz-érzékenységében és a szekunder metabolitok termelésében.

Célkitűzéseink 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 módszerrel, valamint a nullmutáns komplementálása a vad típusú *FvatfA* génnel.
3. Az *FvatfA* gén szerepének tisztázása
 - a vegetatív növekedésben és sporulációban, továbbá a spórák életképességében és méretében;
 - az invazív növekedésben és a szexuális szaporodásban;
 - az 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 módszerrel, valamint a nullmutáns komplementálása a vad típusú *FvmnSOD* génnel.
6. Az *FvmnSOD* gén szerepének tisztázása
 - a vegetatív növekedésben;
 - az invazív növekedésben és a szexuális szaporodásban;
 - az abiotikus (ozmotikus, oxidatív, nehézfém, sejtfal) stresszérzékenységben, valamint a PAF által kiváltott apoptózisban;
 - a fumonizinek termelésében;
 - a mitokondriumok morfológiájában és működésében.

Anyagok és módszerek

A felhasznált törzsek származása, fenntartása és tenyésztése

A $\Delta FvatfA$ és $\Delta FvmnSOD$ deléciós mutánsok létrehozásához a *F. verticillioides* FGSC 7600 (Fungal Genetics Stock Center Kansas City, MO,

USA) szekvenált genomú vad típusú referencia törzsét használtuk fel. A deléciós mutánsokból ektopikus komplementált törzseket hoztunk létre. A törzseket konídium szuszpenzió formájában, 50%-os glicerinben tároltuk, -70 °C-on.

A géndeléciós és komplementáló konstrukciók készítése

A géndeléciós kazettákat double-joint PCR módszerrel hoztuk létre (Sagaram és munkatársai, 2007; Yu és munkatársai, 2004). Az első lépésben a gének előtt található 5', valamint a gén után található 3' határoló szakaszokat amplifikáltuk a vad típusú *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsből izolált genomi DNS-ből, amelyhez az ExpandTM Long Polimerase-t (Roche) használtuk fel. A markerként szolgáló higromicin foszfortranszferáz gént (*hph*) a pBP15 (Sagaram és munkatársai, 2007) plazmidből szaporítottuk fel. Ezt követően, a második lépésben (joint PCR) a három kitisztított PCR terméket kevertük össze egy csőben 1:3:1 arányban, s az átfedő régiók segítségével kapcsoltuk össze a három terméket. Az utolsó, nested PCR során szaporítottuk fel a marker gént is tartalmazó géndeléciós kazettákat. A keletkezett PCR termékeket kitisztítottuk.

A $\Delta FvatfA$, valamint a $\Delta FvmnSOD$ törzseket a vad típusú *FvatfA*, illetve *FvmnSOD* génekkel komplementáltuk, amelyhez a geneticin rezisztenciáért felelős aminoglikozid 3'-foszfortranszferáz (*gen*) gént fuzionáltattunk single-joint PCR segítségével (Sagaram és munkatársai, 2007).

A *F. verticillioides* protoplasztok transzformálása

A PEG-mediált transzformáláshoz a *F. verticillioides* protoplasztokat Sagaram és munkatársai (2007) alapján hoztuk létre. A protoplasztokat regeneráló tápagar (amely 100 µg/ml koncentrációban higromicin B-t tartalmazott) felületére rétegeztük, s a tenyészeteket 28 °C-on 7-15 napig inkubáltuk, a transzformáns telepek megjelenéséig.

Southern blot analízis

A deléciós kazetta egyszeres, jó helyre történő beépülését Southern-blot analízissel igazoltuk, amelynek során a vad típusú és transzformáns telepekből izolált genomi DNS-t restriktációs endonukleázzal 37 °C-on emésztettük, majd 0,7%-os agaróz gélen futtattuk a mintákat. A DNS-t a gélből Immobilon NY⁺ (Millipore) membránra vittük át vákuum transzfer segítségével. A membránt

DIG DNA detection and Labeling Kit (Roche) gyártói utasításai szerint hívtuk elő.

Kópiaszám meghatározás

A komplementált törzsekben a kópiaszám meghatározást Herrera és munkatársai (2009) munkája alapján végeztük el. A törzsekből genomi DNS-t izoláltunk, majd qPCR elegyet mértünk össze Fast SYBR[®] Green Master Mix felhasználásával. A kópiaszámot az abszolút kvantifikáció módszerével határoztuk meg.

A törzsek növekedésének vizsgálata

A törzsek növekedésének vizsgálatához 2×10^7 /ml koncentrációjú spóraszuszpenzióból 5 μ l-t inokuláltunk pontszerűen Czapek-Dox vagy PDA tápagarokra, ezt követően a Petri-csészéket 6 napig inkubáltuk 25 °C-on. Az inkubálást követően a telepátmérőt lemértük, és fényképet készítettünk a csészékről.

A spórák méretének, termelésének és életképességének meghatározása

Czapek-Dox agaron nőtt hétnapos tenyészetekről lemosott spórákról mikroszkópi felvételeket készítettünk 400-szoros nagyítás mellett. A spórák hosszát és átmérőjét az ImageJ program segítségével határoztuk meg.

A spóratermelő-képesség vizsgálatát Shim és munkatársai (2006) szerint végeztük, a sejtszámlálás Bürker-kamra segítségével történt.

A spórák életképességének vizsgálatát Choi és Xu (2010) leírása alapján végeztük el. Hétnapos, Czapek-Dox tenyészetekről a spórákat steril desztillált vízzel lemostuk, majd a spóraszuszpenzió koncentrációját beállítottuk 1×10^3 db/ml-re. A spóraszuszpenziókat 25, 42 és 45 °C-on, vagy 4 °C-on inkubáltuk, ezt követően 100 μ l-t szuszpenziót szélesztettünk Czapek-Dox lemezekre, majd a kinőtt telepeket leszámoltuk.

A törzsek stresszérzékenységének vizsgálata

A stresszkísérleteinkben ozmotikus, oxidatív, nehézfém és sejtfalstresszt kiváltó stresszorokkal egészítettük ki a Czapek-Dox táptalajt meghatározott végkoncentrációt elérve. 2×10^7 sejt/ml koncentrációjú spóraszuszpenzióból 5 μ l-t pontinokuláltunk a tápagarra. Az inkubálást követően a telepátmérőt lemértük, és fényképet készítettünk a csészékről.

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. Frissen lemosott mikrokonídiumokból 1×10^5 db/ml koncentrációjú spóraszuszpenziót készítettünk, amelyből 5 µl-t pontinokuláltunk az egyes vájatokba. Az inokulációt követően 72 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk a lemezeket, majd lemértük a telepek átmérőjét és fényképet készítettünk az egyes telepekről.

Szekunder metabolitok termelésének vizsgálata

Fumonizin B1 és B2 termelés mérése

A módosított Myro táptalajból (Han és munkatársai, 2014) sterilizést követően hatlyukú lemez lyukaiba 5 ml-t mértük ki, ezután a vizsgált törzsek 1×10^8 db/ml koncentrációjú spóraszuszpenziójából 50 µl-t adtunk hozzá minden lyukba. A tenyészeteket megvilágítás nélküli termosztátban 25 °C-on két hétig inkubáltuk felületi kultúrát létrehozva. A felületi kultúrákból származó micéliumot az inkubálási idő végén összegyűjtöttük, ismert tömegű 1,5 ml centrifugacsövekbe mértük át, majd a biomassza mennyiségét liofilizálást követően meghatároztuk. A liofilizált micéliumokból a fumonizineket kvarchomok, valamint valamint acetonitril:víz 50:50 + 1% hangyasav keverékével extraháltuk, majd a minták fumonizin tartalmát kapilláris elektroforézis-tömegspektrométer segítségével határoztuk meg (Kecskeméti és munkatársai, 2020). A kapott mérési eredményeket a biomasszára normalizáltuk, majd ezt követően átlagoltuk.

Bikaverin termelés mérése

100 ml bikaverin termeltető tápoldatot (Bell és munkatársai, 2003) 10^8 db spórával oltottunk be. Rázógépben 28 °C-on, 200 rpm-en 5-7-9 napig inkubáltuk a tenyészeteket. Az 5-7-9 napig történő inkubálást követően a micéliumot szűrővel összegyűjtöttük, majd súlyállandóságig történő szárítást követően tömegüket megmértük. A bikaverin koncentrációját a felülúszóból Bell és munkatársai (2003) által ismertetett módon spektrofotometriásan 500 nm-en határoztuk meg.

Karotinoidok termelésének mérése

100 ml DG minimál tápoldatot (Avalos és munkatársai, 1985; Davis és munkatársai, 1970; Hornero-Méndez és munkatársai, 2018) 10^8 db spórával oltottunk be. Rázógépben $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 150 rpm-en 7 napig inkubáltuk a tenyészeteket fehér fényű fénycsöveket tartalmazó fénypanel alatt ($80\text{ }\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ fényáram mellett). Hét napig történő inkubálást követően a tenyészetek biomasszáját a bikaverinnél már ismertetett módon meghatároztuk, majd a maradék micéliumot összegyűjtöttük 15 ml-es centrifugacsövekbe, ezt követően pedig liofilizáltuk őket. A liofilizált micéliumokból acetonos extrahálást követően a karotinoidok mennyiségét spektrofotométer segítségével határoztuk meg

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. A liofilizált micéliumokból izolált RNS minták mennyiségét NanoDrop segítségével lemértük és minőségüket agaróz gélelektroforézissel 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. Minden RNS mintában mértük a referenciagénként használt *tef1* (FVEG_02381) expressziós szintjét is. A relatív expressziós szintek kiszámításához a “delta módszer” használtuk.

Inváziós növekedés vizsgálata paradicsombogyón

Az inváziós növekedést paradicsombogyókon mértük (Di Pietro és munkatársai, 2001). A bogyókra Czapek-Dox agaron növesztett tenyészetekből kivágott agarkorongokat helyeztünk. 72 és 96 órával az inokuláció után lemértük a kinőtt telepek átmérőjét.

A törzsek ivaros szaporodásának vizsgálata

A deléciós és komplementált törzsek vad típusú törzssel való szexuális párosodási képességét sárgarépás tápagon vizsgáltuk (Klittich és Leslie, 1988). A keresztezés után a törzseket $20/24\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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.

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 mértük. A 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 KCN és SHAM felhasználásával gátoltuk (Leiter és munkatársai, 2016; Medentsev és munkatársai, 2002).

A mitokondriumok morfológiájának vizsgálata

A mitokondriumok morfológiáját konfokális lézer szkennig mikroszkóppal vizsgáltuk. A háromcsatornás Z-stack felvételeken a zöld csatornán a MitoTracker Green festékkel festett mitokondriumokat, a piros csatornán a DHE festett szuperoxid felhalmozódást, míg a kék csatornán a CFW segítségével vizualizált hifák szerkezetét, valamint a szegmensek határait lehet megfigyelni. A mitokondriumok térfogatfoglalása, a relatív szuperoxid mennyisége (szuperoxid térfogata {a képződő etídiium szignállal arányos} a mitokondriumok százalékos térfogatára normálva), továbbá a második hifaszegmens átmérője a Leiter és munkatársai (2016) által közölt módszerek szerint volt meghatározva.

Promoter analízis

A fumonizinek, a bikaverin és a karotinoidok bioszintézisében résztvevő, általunk vizsgált gének szekvenciáiban a lehetséges ATF/CREB 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) a PROMO version 3.0.2. programmal.

Eredmények és azok megbeszélése

A *F. verticillioides FvatfA* génje

Az *FvatfA* szerepe a vegetatív és invazív növekedésben

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.

A törzsek invazív növekedését paradicsombogyón vizsgáltuk. 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 annál, amit a Czapek-Dox és PDA táptalajokon tapasztaltunk.

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

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 spórárt termelt egy négyzetcentiméterre vonatkoztatva, addig a $\Delta FvatfA$ mutáns $3,98 \pm 0,36 \times 10^7$ (35,9%-kal kevesebb) spórárt hozott létre azonos körülmények között.

A deléciós mutáns szignifikánsan, közel 2 μm -rel rövidebb ($8,07 \pm 0,13 \mu\text{m}$) spórákat termelt, mint a vad típusú törzs ($10,43 \pm 0,23 \mu\text{m}$). Ezzel szemben a spórák átmérőjében nem tapasztaltunk jelentős különbségeket a két törzs között: a vad típusú szülő törzs spóráinak átmérője $4,85 \pm 0,66 \mu\text{m}$, míg a $\Delta FvatfA$ mutáns spóráié $4,94 \pm 0,18 \mu\text{m}$ volt.

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 megszámloltuk. Az *FvatfA* deléciója nem befolyásolta a spórák életképességét sem meleg-, sem hidegstressz alatt.

Az *FvatfA* gén deléciója női sterilitást eredményez. A vad típusú szülő törzset (FGSC 7600, MATA-1), a $\Delta FvatfA$ mutánst, valamint az *FvatfA* 'C H7 és H9 komplementált törzseket női partnerként, az FGSC 7603

(MATA-2) törzset hímként használtuk. Répás agaron, 40 napos inkubálást követően azt tapasztaltuk, hogy az *FvatfA* deléciós mutáns nem termelt peritéciumokat, míg a vad típus átlagosan 30, a *FvatfA* 'C H7 26, *FvatfA* 'C H9 törzs 22 peritéciumot termelt.

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

Az Atf1 (*S. pombe*) – AtfA (*A. nidulans*) bZIP típusú transzkripciós faktorok ortológjai részt vesznek a különféle környezeti stresszekre adott válaszban (Balázs és munkatársai, 2010; Hagiwara és munkatársai, 2008; Nguyen és munkatársai, 2013; Qi és munkatársai, 2013). A $\Delta FvatfA$ deléciós mutáns is megnövekedett érzékenységet mutatott az oxidatív stresszt kiváltó vegyületekkel, így hidrogén-peroxiddal, *t*BOOH-val (peroxidstresszt generálnak) és mendionnal (szuperoxidstresszt vált ki) szemben, valamint a sejtfal-stresszt okozó Kongóvízzel szemben is.

Az *FvatfA* szerepe a fumonizinek termelésében

Az *FvatfA* gén deléciója drasztikus csökkenést okozott a fumonizinek termelésében, az FB1 és az FB2 mennyisége 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 transzkripciós faktort kódoló *fum21* gén expressziós szintjében nem tapasztaltunk változást.

Az *FvatfA* szerepe a bikaverin termelésében

A $\Delta FvatfA$ deléciós mutáns 5 nap inkubálás után körülbelül tízszerre több bikaverint termelt, mint a vad típusú és a komplementált törzsek, ez a különbség azonban nem növekedett tovább 7 és 9 nap inkubálást követően. A bikaverin bioszintézisben résztvevő, poliketid szintáz enzimet kódoló *bik1* gén expresszióját 3 és 5 nappal a leoltást követően vizsgáltuk. A $\Delta FvatfA$ mutáns esetében nem tapasztaltunk növekedést a génexpressziós szintekben a vad típusúhoz képest, ami arra enged következtetni, hogy a bikaverin túltermeléséért nem a *bik1* gén fokozott expressziója felel.

Az *FvatfA* szerepe a karotinoidok termelésében

A deléciós mutáns csak nyomokban termelt karotinoidokat, míg a vad típusú és komplementált törzsek normális mennyiségben termelték ezeket a metabolitokat.

A karotinoidok bioszintézisét irányító gének közül a *carRA* és *carB* relatív expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a $\Delta FvatfA$ mutánsban, mint a vad típusú és komplementált törzsekben, míg a *carT* gén expressziójára az *FvatfA* gén deléciója nem volt hatással.

Az *in silico* promoter analízis eredménye

Az ATF/CREB bZIP típusú transzkripciós faktorok a TGACGTCA konszenzus szekvenciához képesek kötődni (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 várható volt, 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 *F. verticillioides FvmnSOD* génje

Az *FvmnSOD* szerepe a *F. verticillioides* stresszérzékenységében

Az *FvmnSOD* gén deléciója fokozott érzékenységet eredményezett a szuperoxid stresszt kiváltó menadionnal szemben. Annak ellenére, hogy a törzsek relatív növekedésében nem volt számottevő különbség NaCl-dal, KCl-dal, és *tBOOH*-lal kiegészített táptalajon, a $\Delta FvmnSOD$ telepek morfológiája kissé eltért a vad típusától.

Annak eldöntésére, részt vesz-e az *FvmnSOD* gén a PAF-fal (*Penicillium chrysogenum* antifungális fehérjével) szembeni védelemben, a törzseket 100 $\mu\text{g/ml}$ PAF-fal kiegészített Czapek-Dox táptalajra oltottuk le. A

deléció mutáns érzékenynek bizonyult a PAF által kiváltott apoptotikus sejthalállal szemben.

Az *FvnmSOD* szerepe a fumonizinek termelésében

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 menadionnal szemben.

Az *FvnmSOD* 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. Azt tapasztaltuk továbbá, hogy az *FvnmSOD* gén hiánya nincs hatással az intracelluláris relatív szuperoxid gyökök szintjére a hifákban. Azt is megállapítottuk, hogy a deléció mutánsban a hifák átmérője szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusban.

Mivel a légzés színtere a mitokondriumokban van, így exponenciálisan növekvő süllyesztett tenyészetekből származó micélium mintákban vizsgáltuk a teljes, a KCN-érzékeny citokróm c-függő, a SHAM-érzékeny alternatív oxidáz, valamint a KCN+SHAM-rezisztens reziduális légzés szintjét. A teljes, a KCN-érzékeny és a reziduális légzések szintje szignifikánsan magasabb volt a deléció mutánsban. Az *FvnmSOD* 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 $\Delta FvnmSOD$ deléció mutáns között.

Az *FvnmSOD* hatása az invazív növekedésre és a szexuális szaporodásra

A $\Delta FvnmSOD$ női fertilitása nem volt gyengébb a vad típusú szülő törzs és a komplementált törzsek fertilitásánál, s a paradicsomon mért invazió növekedésben sem tapasztaltunk különbségeket a vizsgált törzsek között. Mindez arra utal, hogy az *FvnmSOD* nem játszik szerepet sem az ivaros szaporodásban, sem az invazív növekedésben.

Következtetések és javaslatok

Az *Fv*atfA génnel kapcsolatos eredmények megvitatása

Amint azt a fenti összeállításban láttuk, az Atf1/AtfA transzkripciós faktorok elengedhetetlenek a különféle stresszre adott válasz kialakításában, szerepet játszanak a szekunder metabolitok termelésében és az ivaros szaporodásban is.

A mi kísérleteink szerint az ΔFv atfA mutáns vegetatív növekedése ugyanúgy retardált volt, mint ahogy azt a korábban leírt *atf1/atfA* ortológ gének hiánymutánsai esetében tapasztalták. A mutáns paradicsombogyón mért gyenge invazív növekedése pedig arra enged következtetni, hogy az FvAtfA transzkripciós faktor szerepet játszik a *F. verticillioides* virulenciájában, ahogyan azt más gombákon is megfigyelték (Nathues és munkatársai, 2004; Guo és munkatársai, 2010; Qi és munkatársai, 2013; Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015). Ugyancsak a korábbi közlésekkel összhangban az *atfA* inaktiválása a *F. verticillioides*ben is zavarokat okozott mind az aszexuális, mind a szexuális sporulációban (Nathues és munkatársai, 2004; Guo és munkatársai, 2010; Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015; Temme és munkatársai, 2012; Jiang és munkatársai, 2015; Qi és munkatársai 2013).

Az szakirodalomban fellelhető *atf1/atfA* ortológok deléziós mutánsai érzékenyek voltak a különféle környezeti stresszekkel szemben. A *M. oryzae* ΔMo atf1, valamint a *F. graminearum* ΔF gatf1 deléziós mutánsa fokozott érzékenységet mutatott az oxidatív stresszt kiváltó hidrogén-peroxiddal szemben (Guo és munkatársai, 2010; Jiang és munkatársai, 2015). A *B. cinerea* Δbc atf1 mutánsa érzékenynek bizonyult a sejtfalstresszt okozó Kongóvízre és calcofluor white-ra (Temme és munkatársai, 2012). A *F. graminearum* ΔF gatf1 mutáns NaCl-dal kiváltott ozmotikus stresszre is érzékeny volt (Nguyen és munkatársai, 2013; Jiang és munkatársai, 2015), amit nem tapasztaltunk a *F. verticillioides* ΔF vatfA mutáns esetében.

Több tanulmány rávilágított arra, hogy a szekunder metabolitok termelése összefügg a fonalas gombák oxidatív stresszre adott válaszával. Általánosan elfogadott az az elmélet, mely szerint 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). Ez az állítás azonban gombafajtól, a szekunder metabolit típusától és környezeti tényezőktől függően változhat. *F. graminearum*ban a $\Delta Fgatf1$ deléciós mutáns több dezoxinivalenolt (DONt) termelt egy, illetve három nap inkubációt követően, mint a vad típusú szülő törzs. A megemelkedett DON termeléssel párhuzamosan a trichotecén bioszintézis kulcsenzimeit kódoló *tri4*, *tri5*, *tri6*, és *tri10* gének transzkripciója megnövekedett a mutánsban a vad törzshöz képest. Ugyanakkor, a deléciós mutáns és a vad típus egyforma mennyiségű zearalenont (ZEA) termelt, s a ZEA bioszintézisében résztvevő gének (*zea1*, *zeb1*, *zeb2*) transzkripció szintje is közel azonos volt (Nguyen és munkatársai, 2013). *Botrytis cinerea*ban a $\Delta Bcatf1$ mutáns szignifikánsan több botridiolt, botriéndiolt és botcinin A-t termelt, s e fitotoxinok bioszintézisében résztvevő kulcsgeének is felül-regulálódtak (Temme és munkatársai, 2012).

A mi munkánkban is születtek ellentétes eredmények, amikor többféle metabolit termelését vizsgáltuk ugyanazon $\Delta atfA$ nullmutánsban. Az *FvatfA* deléciója a fumonizin (FB1 és FB2) termelés teljes elmaradásával, továbbá a karotinoidok termelésének drasztikus csökkenésével járt, miközben egy másik szekunder metabolitból, a bikaverinből csaknem tízszer nagyobb mennyiséget produkált a mutáns, mint a vad típusú szülő törzs. A fumonizin és a karotenoid bioszintézis legfontosabb kulcsgénjei alul-reguláltak voltak a mutánsban, a bikeverin bioszintézis egyik kulcsgénje, a *bik1* azonban nem mutatott megnövekedett expressziót ugyanezen mutánsban a metabolit tízszeres túltermelése esetén sem. Azt, hogy bizonyos másodlagos anyagcseretermékek szintézisének megindulása része a stresszre adott válasznak, egyértelművé teszik az *in silico* promoter elemzés során kapott eredményeink, hogy ti. ATF/CREB kötőhelyeket találtunk a *fum1*, *fum8*, illetve a *carRA* és *carB* gének promoterén. Ez ugyanis világosan bizonyítja, hogy a fumonizin, illetve a karotenoid bioszintézis géneket nemcsak a saját, szekvenencia-specifikus transzkripció faktorok hozták működésbe (sőt, ezek önmagukban nem is elégségesek ehhez), hanem az indukcióban, különösen az erélyes indukcióban, globális (általános) transzkripció faktorok is részt vesznek. Az *FvAtfA* egy ilyen transzkripció faktor! S mivel magyarázható az, hogy a *bik1* gén aktivitása nem növekedett a $\Delta Fvatf1$ mutánsban, miközben ez a mutáns tízszer annyi bikaverint termelt, mint a vad típusú szülő törzs? Úgy gondoljuk,

hogy az egyéb metabolitok (fumonizinek, karotinoidok) termelésének visszaesésével fölös mennyiségben halmozódtak fel prekursor molekulák a $\Delta Fvatf1$ mutáns sejtekben, s ezeket a sejt átcsatornázta a bikaverin, vagy egyéb, most nem vizsgált metabolitok szintéziséhez. Az pedig, hogy a karotinoidok termelése lényegesen visszaesett a $\Delta Fvatf1$ mutánsban, ugyancsak fontos eredmény, hiszen látványosan támogatja azt az elméletet, mely szerint a szekunder metabolitok termelése válasz az oxidatív stresszre. Ez az eredményünk ugyanis erős (közvetett) bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az oxidatív stresszválasz kialakításában résztvevő Atf1/AtfA ortológ FvAtfA transzkripció faktor elengedhetetlen az antioxidáns hatású karotinoidok termeléséhez.

Vannak a gyakorlatban hasznosítható elemei is ennek, az eredetileg felfedező kutatásnak induló munkának. (1) Eredményeink a mikotoxin termelés bonyolult szabályozásának jobb megértéséhez járultak hozzá, s ez felhasználható a toxintermelés visszaszorítására irányuló növénynemesítői munkában vagy a terménykezelő technológiákban. (2) Mikotoxint nem termelő törzseket lehet előállítani úgy, hogy nem közvetlenül a toxin bioszintézist irányító géneket rontjuk el; ezzel új típusú, ún. lefegyverzett törzseket szerkeszthetünk, amelyek használhatók lehetnek (postharvest) biológiai védekezési célokra. (3) Iparilag jelentős szekunder metabolitokat (esetünkben bikaverint) túltermelő törzseket lehet előállítani oly módon, hogy transzkripció faktorok kiiktatásával (vagy túltermelésével) célzottan átrendezzük az így nemesített törzs másodlagos anyagcseretermék profilját; ez nyilván más gombák és más értékes metabolitok esetében is járható út lesz. (4) Mikotoxin-mentes, fehérjetömeg (mycoprotein) előállítására alkalmas törzsek nemesítésében is hasznosíthatók az eredményeink.

Az *FvmnSOD* génnel kapcsolatos eredmények megvitatása

A *F. verticillioides* $\Delta FvmnSOD$ mutánsa fokozott érzékenységet mutatott a szuperoxid stresszt kiváltó menadionnal (MBS), valamint a *P. chrysogenum* antifungális fehérje (PAF) által indukáló apoptózissal szemben, tehát a gén (putatív) terméke, a mangán-szuperoxid dizmutáz ebben a gombafajban is részt vesz. Bár az *FvmnSOD* és az általa kódolt enzim hiánya nem nélkülözhetetlen a gomba számára, a hiányt valahogy kompenzálni kellett. Ez a *F. verticillioides*ben a mitokondriumok százalékos

térfogatfoglalásának megnövekedésével történt; mindez azonban nagyobb energia-felhasználással párosult, s ennek köszönhetően vékonyabb hifákat fejlesztett a gomba. Természetes körülmények között ez nyilván a versenyképesség romlásával jár. A hiánymutáns fokozott MBS- és PAF-érzékenysége is azt mutatja, hogy ez a kompenzációs stratégia nem működött tökéletesen. Méréseink szerint a relatív szuperoxid arány a mutánsban nem változott meg a vad típushoz képest, s valószínűleg ennek tulajdonítható az, hogy az *FvnmSOD* deléciónja – szemben más gombákban, más metabolitok esetében tapasztaltakkal - nem volt hatással a fumonizin termelésre.

A SOD enzimek termelés több növénypatogén gombában virulenciafaktornak számít. Ha a gomba sikeresen tudja kezelni a növényi védekezés első lépéseként keletkező reaktív oxigénformákat, az elősegíti a megtelepedését és az invázióját. A *F. verticillioides* $\Delta FvnmSOD$ mutánsa viszont nem bizonyult gyengébbnek a paradicsomon mért kolonizációs aktivitás tekintetében, mint a vad típusú szülő törzs, ami arra utal, hogy ennek a fajnak (amely hónapokon át képes endofiton módon megélni kukorica szövetekben!) nagyon hatékony és összetett ROS-kezelő mechanizmusa van, amelynek az MnSOD enzim csupán egy, s úgy tűnik nem túl jelentős eleme. Ez a megfigyelés egyben az MnSOD kísérleteink egyik fontos gyakorlati oldala, mert arra figyelmezteti a növénynevelőket, hogy a nemesítéssel leküzdeni kívánt kórokozó ROS-védelmi stratégiáját alaposan elemezni kell, amikor megtervezik a szelekciós stratégiát és kiválasztják a szelektálás módszerét.

Új tudományos eredmények

1. A funkcionális genomika eszköztárát használva igazoltuk, hogy a *Fusarium verticillioides* *FvatfA* génje (amely levezetés alapján Atf1/AtfA bZIP típusú transzkripciós faktort kódol) jelentős szerepet játszik az oxidatív és sejtfal-stresszválaszban.
2. Az *FvatfA* gén nem nélkülözhetetlen a gomba számára, de a $\Delta FvatfA$ mutáns szintetikus táptalajokon mért vegetatív növekedése gyengébb volt, mint a vad típusú szülő törzsé. A deléciós mutáns női sterillé vált, ivartalan spórái pedig kisebbek voltak, mint a vad típus spórái, tehát az *FvatfA* gén az ivaros és az ivartalan szaporodásra is hatással van.
3. A $\Delta FvatfA$ mutáns paradicsombogyókon mért inváziós növekedése gyengébb volt, mint a vad típusé, tehát az *FvatfA* gén virulencia-faktornak tekinthető.
4. Az *FvatfA* gén deléciója átrendezte a gomba másodlagos anyagcsere profilját: a deléciós mutáns nem termelt fumonizineket, drasztikusan csökkent a karotinoid produkciója és szignifikánsan több bikaverint termelt.
5. *In silico promoter* elemzéssel bizonyítottuk, hogy a fumonizin-, illetve a karotinoid bioszintézist irányító kulcs-enzim gének promoterein ATF/CREB kötőhelyek vannak, ami azt bizonyítja, hogy az FvAtfA általános transzkripciós faktorként támogatja e gének transzkripcióját (s ezen keresztül a fumonizin- és karotinoid-termelést).
6. Ugyancsak funkcionális genomikai eszközökkel igazoltuk, hogy az *FvmnSOD* gén (amely levezetés alapján mangán szuperoxid dizmutáz enzimet kódol) szerepet játszik az oxidatív stressz elleni védelemben és a mitokondrium integritás megőrzésében, de hiánya sem avirulenciát, sem női sterilitást nem okoz, és nem gátolja meg a fumonizin termelést.
7. Az *FvmnSOD* gén hiányát a sejtek a mitokondriumok százalékos térfogatfoglalásának megnövekedésével kompenzálják, ez a kompenzáció azonban korlátozott hatékonyságú.

Irodalomjegyzék

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chen, D. et al.** (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14:214-229.
- 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.
- 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.
- Davis, R. H. és de Serres F.** (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol* 17:79-143.
- 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.
- 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.
- 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.

- Herrera, M. L. et al.** (2009) Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 47:1325-1332.
- 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.
- 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.
- Kecskeméti, A. et al.** (2020) Analysis of fumonisin mycotoxins with capillary electrophoresis – mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 37(9):1553-1563.
- Klittich, C. J. R. és J. F. Leslie.** (1988) Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118:417-423.
- 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.
- Logrieco, A. et al.** (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108:597-609.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Reverberi, M., et al.** (2006) Oxidant/antioxidant balance in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxin biosynthesis. *Mycotoxin Res.* 22:39-47.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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*. *Mol Microbiol.* 83(5):1024-34.
- 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.

Publikációk jegyzéke

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) *FvmsSOD* 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 transzkripciós faktort kódoló *FvatzfA* 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 *FvatzfA* 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 segítségéért és értékes szakmai tanácsaiért.

Szeretném megköszönni Prof. Won-Bo Shimnek (Texas A&M University), hogy a transzformáláshoz szükséges plazmidokat. Szeretném továbbá megköszönni Dr. Oláh Viktor egyetemi adjunktusnak (Debreceni Egyetem, Növénytani Tanszék) a légzésvizsgálatokban 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.