Szent István Egyetem
Gödöllõ

A MAT1-2-1 TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR CÉLGÉNJEINEK AZONOSÍTÁSA *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*BEN

Doktori (Ph.D.) értekezés

Keszthelyi Anita

Gödöllõ
2007.

A doktori iskola neve: Biológiai Doktori Iskola

Tudományága: Biológia

Vezetõje: Prof. Tuba Zoltán
tanszékvezetõ egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezõgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Növénytani és Növényélettani Tanszék

Témavezetõk: Prof. Hornok László
az MTA levelezõ tagja,
tanszékvezetõ egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezõgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Mezõgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék
és
Dr. Kerényi Zoltán
tudományos munkatárs
Mezõgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllõ

……..	…….	…….
Dr. Tuba Zoltán	Dr. Hornok László	Dr. Kerényi Zoltán
a doktori iskola vezetõje	témavezetõ	témavezetõ

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke ***7***

1. BEVEZETÉS ***9***

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ***13***

2.1. A Fusarium fajok jelentõsége ***13***

2.2. A Fusarium verticillioides ***15***

2.3. A fonalas gombák reprodukciós stratégiái és párosodási típusai ***16***

2.3.1. A fonalas aszkomicéták ivaros ciklusa ***17***

2.3.2. Az aszkomicéták párosodási típusai ***18***

2.3.3. A Fusarium fajok MAT lókuszainak szervezõdése ***22***

2.3.4. A MAT gének által kódolt fehérjék és funkcióik ***24***

3. ANYAG ÉS MÓDSZER ***27***

3.1. A gombatörzsek származása ***27***

3.2. A törzsek fenntartása ***27***

3.3. A törzsek tenyésztése ***27***

3.4. Szekvencia analízis ***27***

3.5. A FvMAT1-2-1 gén megszakítása ***28***

3.5.1. A kiütõ konstrukció létrehozása és a transzformáció ***28***

3.5.2. A homológ kettõs rekombináció megvalósulásának igazolása ***30***

3.5.2.1. Polimeráz láncreakció ***30***

3.5.2.2. Southern hibridizáció ***30***

3.5.2.3. Northern hibridizáció ***31***

3.6. Ivaros keresztezés ***31***

3.7. A cDNS-AFLP ***31***

3.7.1. A cDNS-AFLP elve és lépései ***31***

3.7.2. A cDNS-AFLP klónok expressziójának vizsgálata ***33***

3.8. cDNS könyvtár-készítés és nukleinsav hibridizálás - HD filter technika ***33***

3.9. A nitriláz fehérjét kódoló gén megszakítása ***36***

3.9.1. A kiütõ konstrukció és nitriláz mutánsok létrehozása SON-PCR-rel ***36***

3.9.2. A kiütés sikerének és a kettõs rekombináció megtörténtének igazolása ***37***

3.10. A nitriláz mutáns törzs vizsgálata különbözõ nitrogén forrásokat tartalmazó táptalajon ***37***

4. EREDMÉNYEK ***39***

4.1. A ΔFvMAT1-2-1 mutáns törzsek vizsgálata ***39***

4.1.1. A ΔFvMAT1-2-1 mutáns törzsek létrehozása ***39***

4.1.2. A homológ kettõs rekombináció megtörténtének igazolása ***40***

4.1.3. A ΔFvMAT1-2-1 mutáns törzsek morfológiai és párosodási jellemzõi ***42***

4.2. A vad típusú és a ΔFvMAT1-2-1 mutáns törzsekkel végzett cDNS-AFLP kísérletek ***42***
4.2.1. A FvMAT1-2-1 génexpressziós szintjének összehasonlítása sárgarépás és komplett tápközegben ***42***
4.2.2. A cDNS-AFLP ***43***
4.2.3. A cDNS-AFLP klónok expressziójának vizsgálata Northern hibridizációval ***44***
4.3. Génexpressziós analízis differenciál hibridizációval ***47***
4.4. A nitriláz fehérjét kódoló gén inaktiválása ***50***
4.4.1. A nitriláz mutáns törzsek létrehozása ***51***
4.4.2. A helyspecifikus rekombináció megtörténtének bizonyítása ***51***
4.4.3. A nitriláz mutáns törzs párosodási és morfológiai jellemzõi ***52***
4.5. Új tudományos eredmények ***54***

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK ***55***

6. ÖSSZEFOGLALÁS ***61***

SUMMARY ***63***

MELLÉKLETEK ***65***
M1. IRODALOMJEGYZÉK ***65***
M2. TÁPTALAJOK ÉS OLDATOK ***79***
M3. 9. TÁBLÁZAT ***84***
M4. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE ***94***

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ***97***

Rövidítések jegyzéke

BG	burgonya-glükóz tápközeg
bp	bázispár
kb	kilobázis
CA	sárgarépa agar (carrot agar)
cDNS-AFLP	cDNS-rõl amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism)
CIAP	borjúbél alkalikus foszfatáz (calf intestine alkaline phosphatase)
CM	komplett tápközeg (complete medium)
CMC	karboxi-metil-cellulóz
CTAB	hexadeciltrimetil-ammónium-bromid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
hph	higromicin-foszfotranszferáz
HMG	high mobility group
IPTG	izopropiltio-ß-D-galaktozid
LB	Luria-Bertrani tápközeg
MAP kináz	mitogén aktivált protein kináz
MAT	párosodási típus (mating type)
MM	minimál tápközeg (minimal medium)
MP	párosodási populáció (mating population)
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
RT-PCR	reverz transzkripciót követõ polimeráz láncreakció
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium-dodecyl-sulfate)
TF	transzkripciós faktor
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propándiol
X-GAL	5-bróm-4-klór-3-indolil-ß-D-galaktozid

1. BEVEZETÉS

A kukorica termesztés és raktározás idõszakában a rovarok után a növénykórokozó gombák (elsõsorban a *Fusarium*, az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok) okozzák a legnagyobb kárt (Ominski et al. 1994). Amennyiben a környezeti tényezõk fejlõdésüknek kedvezõen alakulnak, akár 50-80%-os veszteséget is okozhatnak a betakarított, raktározott terményben (Fandohan et al. 2003). Azokban az években, amikor száraz és meleg idõjárás uralkodik, és számottevõ a rágó szájszervû rovarok kártétele, a *Fusarium* fajok megtelepedése következtében jelentõsen csökken a termés mennyisége és romlik a minõsége. A növény valamennyi részét fertõzhetik a különbözõ fejlõdési szakaszokban.

A *Fusarium*ok talajban élõ mikroorganizmusok, amelyek rendkívüli alkalmazkodó képességüknek köszönhetõen általánosan elterjedtek a mérsékelt övi amerikai, ázsiai és európai országokban termelt gabonaféléken. Ma Magyarországon kétségtelenül ezek a gombák a búzakalász és a -szem legelterjedtebb kórokozói, de fertõznek számos lágy- és fásszárú termesztett- és gyomnövényt, még fenyõféléket is (Britz et al. 1999), és gyakran okoznak komoly kárt. Ráadásul súlyos állat- és humán-egészségügyi kockázatot is jelent elõfordulásuk, ugyanis másodlagos anyagcseretermékként fuzarinsavat és mikotoxinok egész sorát termelik (Nelson et al. 1993; Marasas et al. 1984). Kémiai növényvédõszerekkel nem mindig lehet gazdaságosan védekezni ellenük. A nemzetségbe azonban nemcsak kórokozók tartoznak, hanem növényi maradványokon szaprofiton életmódot folytató fajok is.

A *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, a kukorica egyik legjelentõsebb kórokozója világszerte (Munkvold és Desjardins, 1997). Megbetegíti a csíranövényeket, ugyanakkor gyökér-, szár- és csõrothadást is okoz. Ezek a súlyos gazdasági károkkal járó betegségek szinte mindenütt elõfordulnak, ahol kukorica termesztése folyik, a gomba pedig általánosan kimutatható a növényi maradványokban. A fertõzés erõssége igen különbözõ lehet, a tünetmentes állapottól egészen a teljes rothadásig terjedõen (Oren et al. 2003). Ennek ellenére a *F. verticillioides* mikotoxinok, elsõsorban a fumonizinek termelésével okozza a legnagyobb kárt. A fumonizinek különbözõ betegségek kiváltói. A szennyezett gabonafélék fogyasztásával akut vagy krónikus toxikózis léphet fel emberben és állatokban egyaránt. Ezek a vegyületek rágcsálókban a máj és a vese rákos megbetegedéseit okozzák (Voss et al. 2002), lovakban agyvelõgyulladást (Wilson et al. 1992), sertésekben tüdõödémát (Kriek et al. 1981a), egerekben pedig velõcsõ rendellenességeket (Seefelder et al. 2003) váltanak ki. Az emberi nyelõcsõrák kialakulásáért többek között a fumonizin B1-gyel szennyezett kukorica tartós fogyasztása a felelõs (Marasas 2001; Myburg et al. 2002). A fertõzés következtében felhalmozódott mikotoxinok rontják a termés minõségét, és a fertõzött

szemeket vetõmagként sem lehet felhasználni (Parry et al. 1995). A mikotoxin szennyezõdések csökkentik a gabonafélék tápértékét, valamint C-, E-vitamin- és karotintartalmát. A penészes növényi eredetû élelmiszerekkel (például liszt, kenyér, tésztafélék stb.) a szervezetbe kerülõ toxinok nemcsak rákkeltõ hatásúak lehetnek, hanem fejlõdési és szaporodási rendellenességeket okozhatnak, kedvezõtlenül hatnak az immunrendszerre és károsítják az emésztõcsatorna nyálkahártyáját (Nair 1998). A penészgomba-toxinokat a kenyérsütés és egyéb hõkezelések sem tudják hatástalanítani. A tenyészidõszak idõjárási körülményei nagyban befolyásolják a mikotoxin tartalmat (Hornok et al. 2005). Ugyanakkor, helyes mezõgazdasági gyakorlattal (fémzárolt vetõmaghasználat, növényvédelem, stb.) a kockázati tényezõk minimálisra csökkenthetõk, ezáltal a *Fusarium*ok kártétele mérsékelhetõ. 2003-ban a fumonizin B1, amelyet elsõsorban a *F. verticillioides* termel, felkerült az úgynevezett „California Proposition 65” listára, amely a bizonyítottan rákos megbetegedéseket elõidézõ anyagok egész sorát tartalmazza.

Érthetõ tehát, hogy a fonalas gombák morfológiáját, reprodukcióját és életciklusát hosszú ideje széles körben vizsgálják annak érdekében, hogy minél több ismeretanyagot gyûjtsenek ezekrõl a gazdasági és egészségügyi szempontból is kiemelkedõ jelentõségû kórokozókról.

Mi a *Fusarium*ok ivaros szaporodásával fogalkoztunk. A gombák párosodási típusát meghatározó *MAT* gének szabályozzák a szexuális kompatibilitást és az ivaros reprodukciót. A párosodási típus rendszereknek több, erõsen konzervatív eleme van, így a bonyolult feromon – feromon-receptor jelcsere vagy a *MAT* gének által kódolt transzkripciós faktorok, amelyek révén, a párosodás során megvalósul az ivaros partnerek, illetve az eltérõ párosodási típusba tartozó sejtmagvak közötti saját-idegen felismerés (Turgeon 1998; Nelson 1996). Annak ellenére, hogy sok a hasonlóság az aszkomicéta élesztõk (*Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe*) és a fonalas gombák párosodási típus rendszerei között, jelentõsek a különbségek is, ami a fonalas aszkomicéták meglehetõsen bonyolult ivaros ciklusának köszönhetõ.

A transzkripciós faktorok, amelyek alapvetõen az ivaros szaporodáshoz szükséges gének expresszióját szabályozzák, valószínûleg a sejtciklus egyéb, ivaros reprodukciótól független folyamataiban is lényeges szerepet tölthetnek be (Turgeon 1998). Igen kis mennyiségben termelõdnek, ezért izolálásuk, illetve hatásuk közvetlen biokémiai módszerekkel történõ vizsgálata nehézkes. Ezért mi azt a kísérleti stratégiát követtük, hogy génkiütéssel Δ*MAT1-2-1* null-mutáns törzseket állítottunk elõ *F. verticillioides*ben. A mutánsok expressziós mintázatát a vad típushoz hasonlítottuk azzal a céllal, hogy alaposabban megismerjük a MAT géntermékeknek a párosodásban és/vagy az életciklus más lényeges eseményeinek szabályozásában betöltött szerepét. Ez a munka segítségünkre lehet abban, hogy megértsük azoknak a mechanizmusoknak a lényegét, amelyek lehetõvé teszik a *Fusarium*ok és a velük rokonságban álló más gombák sikeres

alkalmazkodását a folyamatosan változó ökológiai tényezõkhöz. Munkánk hozzájárul továbbá e veszélyes gombák ellen irányuló védekezési stratégiák fejlesztéséhez.

Kutatómunkám célkitûzései az alábbiak voltak:

- a fonalas gombák ivaros szaporodásának alaposabb megismerése molekuláris szinten,
- a MAT1-2-1 transzkripciós faktorok célgénjeinek azonosítása a fonalas aszkomicéta *F. verticillioides*ben és
- olyan biológiai folyamatok megismerése, amelyek a *MAT1-2-1* gén szabályozása alatt állnak nemcsak az ivarosan szaporodó, hanem az aszexuális fajokban is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Fusarium* fajok jelentõsége

A *Fusarium*ok az *Ascomycetes* (tömlõsgombák) osztályba tartozó három nemzetség (*Calonectria, Gibberella és Nectria*) anamorfjai. Maguk a tömlõsgombák a gombák legnagyobb és legösszetettebb csoportját alkotják. Ennek a rendkívül komplex csoportnak a tagjai között megtaláljuk a lisztharmat és a monília kórokozóit, a *Neurospora*, *Taphrina* és *Penicillium* fajokat, valamint az ízletes kucsma- és szarvasgombát. Ide tartoznak még a legkedveltebb genetikai modell organizmusok; az egysejtû hemiaszkomicéta (*S. cerevisiae*) és archaeaszkomicéta (*S. pombe*) élesztõk is. Ugyanakkor számos fajnak egyéb gazdasági jelentõsége is van; pl. a gyógyszer- és vegyiparban, mint antibiotikumtermelõk (Brakhage és Turner, 1995).

A *Fusarium* fajok az egész világon elterjedt, széles gazdanövénykörû fonalas gombák. A kontinentális éghajlaton gyakorta a gabonafélék megbetegedéseivel hozhatók kapcsolatba (pl. kalászfuzáriózis). Gabonaféléken, kukoricán és kölesféléken csõ- és bugapenészedést, rothadást váltanak ki. Számos fajuk fordul elõ a trópusi, szubtrópusi területeken, de néhány képviselõjük õshonos a hideg éghajlatú térségek talajában is.

A *Fusarium*ok *Liseola* szekciójába tartozó fajok számos gazdaságilag jelentõs növényfajt fertõznek világszerte, így a kukoricát, a cirokot és a szójababot (Leslie et al. 1990; Pitt et al. 1994), a búzát, a banánt, az árpát és a spárgát (Leslie 1995; Leslie 1999), a rizst (Sun és Synder, 1981), az ananászt (Rohrbach és Pfeiffer, 1976), a cukornádat (Martin et al. 1989) a mangót (Varma et al. 1974), a fokhagymát (Dugan et al. 2003) és a datolyapálmát (Abdallah et al. 2000).

A makrokonídiumok morfológiája a leggyakrabban használt jellegzetesség a *Fusarium* fajok megkülönböztetésére, ez azonban nem alkalmas a *Liseola* szekció tagjainak vizsgálatára. Számos esetben különbözõ fajokat, törzseket tévesen *Fusarium moniliforme* J. Sheldon-ként azonosítottak.

Nelson és munkatársai (1983) négy fajt különböztettek meg a *Liseola*n belül mono- és polifialidok jelenléte, illetve a mikrokonídiumok csoportosulása alapján. Ezek a következõk: *F. moniliforme* J. Sheldon, *Fusarium subglutinans* (Wollenweber és Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas, *Fusarium proliferatum* (Matsushima és Nirenberg) és *Fusarium nygamai* (Burgess és Trimboli). Ez a fajmeghatározási módszer azonban sok bizonytalanságot hordoz, mert a morfológiai bélyegeket tenyészkörülmények és a tenyészet kora is erõsen befolyásolja. Részben ennek köszönhetõ, hogy hasonló morfológiai jellemzõket alapul véve Nirenberg szerint ez a szekció hattagú (Nirenberg 1989), és az általa azonosított fajok sem minden esetben egyeznek meg a Nelson által leírt fajokkal.

További lehetõséget a *Fusarium* fajok csoportosítására az ivaros fejlõdési szakasz vizsgálata jelentette; teszt törzsek létrehozásával párosodási tesztek elvégzése, amely a *Gibberella fujikuroi* gyûjtõfaj megismeréséhez vezetett.

A *Fusarium* fajok közötti molekuláris szintû eltérések kimutatására RAPD és AFLP technikát, illetve izoenzim polimorfizmus vizsgálatot alkalmaztak (Leslie et al. 2004). A másodlagos anyagcseretermékek termelésében megmutatkozó különbségeket, pedig taxonómiai jellegzetességként használták fel (Thrane 2001). Számos tanulmány foglalkozik a többek között kukoricáról, rizsrõl, és cirokról származó *Fusarium* izolátumok diverzitása és toxintermelése közti összefüggések vizsgálatával (Desjardins et al. 1997; Leslie et al. 1990).

A *Fusarium* fajok párosodási készsége alapján, a morfológiai alapon létrehozott *Liseola* szekción belül napjainkig kilenc párosodási populációt (MP), azaz valódi biológiai fajt különítettek el. Ezeket a párosodási populációkat a *G. fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. Kimura gyûjtõfaj tömöríti (Leslie 1991; Leslie et al. 2004). Az MP-ket *Gibberella* teleomorf névvel, míg ezek aszexuális alakjait *Fusarium* anamorf névvel látták el. A *G. fujikuroi* nevezéktana azonban nem lett egyszerûbb. Egyes biológiai fajoknak ugyanis sokáig több anamorf vonala volt, és különbözõ teleomorfoknak is lehetett ugyanaz az anamorf alakja (Leslie 1995). A nevezéktant még tovább bonyolítja, hogy számos olyan *Fusarium* fajt is e fajkomplexum tagjaiként ismerünk, amelyekben ivaros szaporodást eddig még nem figyeltek meg (O'Donnell et al. 1998; Leslie et al. 2004). A gyûjtõfajon belül található párosodási populációkat az **1. táblázat** mutatja be.

1. táblázat A *G. fujikuroi* párosodási populációi

Párosodási populáció (valódi biológiai faj)	***Fusarium* anamorf**	***Gibberella* teleomorf**
G. fujikuroi MP-A	*Fusarium verticillioides*	*Gibberella moniliformis*
G. fujikuroi MP-B	*Fusarium sacchari*	*Gibberella sacchari*
G. fujikuroi MP-C	*Fusarium fujikuroi*	*Gibberella fujikuroi*
G. fujikuroi MP-D	*Fusarium proliferatum*	*Gibberella intermedia*
G. fujikuroi MP-E	*Fusarium subglutinans*	*Gibberella subglutinans*
G. fujikuroi MP-F	*Fusarium thapsinum*	*Gibberella thapsina*
G. fujikuroi MP-G	*Fusarium nygamai*	*Gibberella nygamai*
G. fujikuroi MP-H	*Fusarium circinatum*	*Gibberella circinata*
G. fujikuroi MP-I	*Fusarium konzum*	*Gibberella konza*

Hsieh nevéhez fûzõdik az elsõ három párosodási populáció (MP-A, MP-B, MP-C) leírása (Hsieh et al. 1977), amelyet 1982-ben Kuhlman az MP-D-vel egészített ki. A fennmaradó öt

párosodási populáció (MP-E – MP-I) azonosítása Britz, Klaasen, Leslie és Zeller munkájának eredménye (Leslie et al. 2004).

Az azonos párosodási populációba tartozó heterotalliás fajok ivaros párosodásra képesek egymással, de nem képesek másik populáció tagjaival. Ez az elkülönítés azért lényeges, mert a különbözõ MP-k általában eltérõ gazdanövényen fordulnak elõ, és patogenitásukban is jelentõs különbségek lehetnek.

Leslie és munkatársai (1990) az általuk vizsgált szántóföldrõl begyûjtött kukorica és cirok mintákban a *Liseola* szekcióba tartozó *Fusarium* fajok izolátumait mutatták ki, amelyek közül a *F. moniliforme* és a *F. proliferatum* voltak a dominánsak. 2004-ben prérifüvekrõl 241 mintát gyûjtöttek, amelybõl 72 *Fusarium*mal fertõzött volt. A 72 izolátumból 40 *G. fujikuroi* (MP-C) vagy *Gibberella intermedia*, míg 9 *Gibberella moniliformis* volt (Leslie et al. 2004). Egy másik tanulmányban az MP-A, az MP-D, és az MP-F párosodási populáció tagjai fordultak elõ legyakrabban a *Liseola* szekció tagjai közül, a kukoricáról ill. cirokról begyûjtött izolátumoknak több mint 50%-át tették ki. MP-B és MP-E populációba tartozó izolátumokat is kimutattak, de jóval kisebb gyakorisággal (Chaisrisook és Leslie, 1990).

2.2. A *Fusarium verticillioides*

A *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (teleomorf: *G. moniliformis*; szinonimái: *F. moniliforme, G. fujikuroi* MP-A), korábban *F. moniliforme* (Seifert et al. 2003), a *F. proliferatum* mellett a kukorica gyökér-, szár- és csõrothadás egyik fõ okozója a mérsékelt égövön. Mindkét fonalas gombafaj veszélyt jelent a raktáron tartott kukoricacsövekre is (Munkvold és Desjardins, 1997). A *F. verticillioides* elsõsorban a fuzáriumos, vagy vörös csõrothadás okozójaként ismert (Munkvold 2003). Számos esetben izoláltak *F. verticillioides*t tünetmentes szövetekbõl; gyökérbõl, szárból, magból egyaránt (Leslie et al. 1990). A környezeti feltételek, így a víz jelenléte, a hõmérséklet, a növény és a gomba genetikai háttere fontos tényezõk a betegség kialakításában, de a tünetmentes fertõzés elõfordulásának oka nem ismert, és azt sem tudjuk, hogy mi váltja ki végül a rothadást, vagy a hervadást, a gomba által kolonizált szövetekben. Egyes feltételezések szerint, a gomba jelenléte serkenti a kukorica növekedését és fejlõdését azáltal, hogy a fertõzött szövet növényi növekedési hormont termel (Munkvold és Desjardins, 1997).

A *F. verticillioides* széles körben fordul elõ különbözõ fûféléken és a talajban (Leslie et al. 2004), mivel a nyári szárazságot és a kemény telet a talajban, illetve a növényi maradványokon vészeli át. Kiemelkedõ gazdasági és egészségügyi kockázata révén a *Fusarium* nemzetség jelentõs tagja. A legtöbb *Fusarium* fajhoz hasonlóan másodlagos anyagcseretermékként mikotoxinokat

termel, ami humán- és állategészségügyi szempontból egyaránt nagy kockázatot rejt magában (Marasas et al. 1984; Nelson et al. 1993; Moretti et al. 1997; Marasas 2001). Elsõsorban fumonizin B1-et, de kis mennyiségben B2-t és B3-at (Desjardins et al. 2002), illetve moniliformint (Leslie et al. 1996) és beauvericint (Leslie et al. 2004) is termel.

A faj 1904-es elsõ leírása óta (Sheldon 1904) jól ismerik emberi és állati betegségeket kiváltó hatását. Az 1900-as évek elején az USA-ban teljes állatállományok betegedtek meg penészes takarmánykukorica elfogyasztását követõen. A *F. moniliforme* (mai nevén *F. verticillioides*) volt az a gomba, amelyet a legnagyobb arányban tudtak kimutatni a fertõzött takarmányból. A lovak és szarvasmarhák patái súlyosan károsodtak, a baromfik elvesztették tollaikat, és a megbetegedett állatok jelentõs hányada a fertõzés következtében elhullott (Peters 1904).

A világ egyes térségeiben a *F. verticillioides* kapcsolatba hozható emberi nyelõcsõrák gyakori elõfordulásával. Dél-Afrikában, Transkei délnyugati körzetében diagnosztizálták a legtöbb nyelõcsõrákos megbetegedést, ahol a kukorica a legfõbb táplálék (Marasas et al. 1981). Ebben a térségben termesztett kukoricáról izolált több *F. moniliforme* (ugyancsak nagy valószínûséggel *F. verticillioides*) törzs heveny mérgezést váltott ki kacsákban (Kriek et al. 1981b). Amikor ezeket az izolátumokat sterilizált kukoricán növesztették, majd a fertõzött takarmánnyal kísérleti állatokat etettek, patkányokban májzsugorodást, a bélfal nyirokcsomóinak megnagyobbodását és szívkamrán kívüli trombózist tapasztaltak. Ugyanez a fertõzés agyvelõgyulladást és mérgezés okozta májbetegséget váltott ki lovakban, tüdõödémát sertésekben, juhokban pedig májkárosodást idézett elõ (Kriek et al. 1981a; Kriek et al. 1981b).

2.3. A fonalas gombák reprodukciós stratégiái és párosodási típusai

A legtöbb fonalas aszkomicéta élete legnagyobb részében haploid, vegetatív úton történõ szaporodását konídiumok (aszexuális spórák) képzésével biztosítja. Ugyanezek a spórák a „hím” partner szerepét tölthetik be a megtermékenyítés során (Alexopoulos és Mims, 1979). A fonalas aszkomicéták ivaros folyamatainak eredményeként termõtestek képzõdnek. Ezek a specializálódott struktúrák helyet és védelmet biztosítanak az aszkuszok számára. Bennük találhatók az aszkospórák, a meiotikus rekombináció végsõ termékei. A heterotalliás gombák ivaros folyamataihoz a párosodó partnerek között molekuláris szintû kommunikáció szükséges, amelyet finoman összehangolt morfogenetikai változások követnek, és számos olyan gén szabályoz, amelyekre belsõ vagy külsõ (környezeti) tényezõk hatnak, mint amilyen a tenyészet kora, a hõmérséklet, a tápanyagellátás vagy a fény. Korábbi tanulmányok (Dyer et al. 1992) szerint a

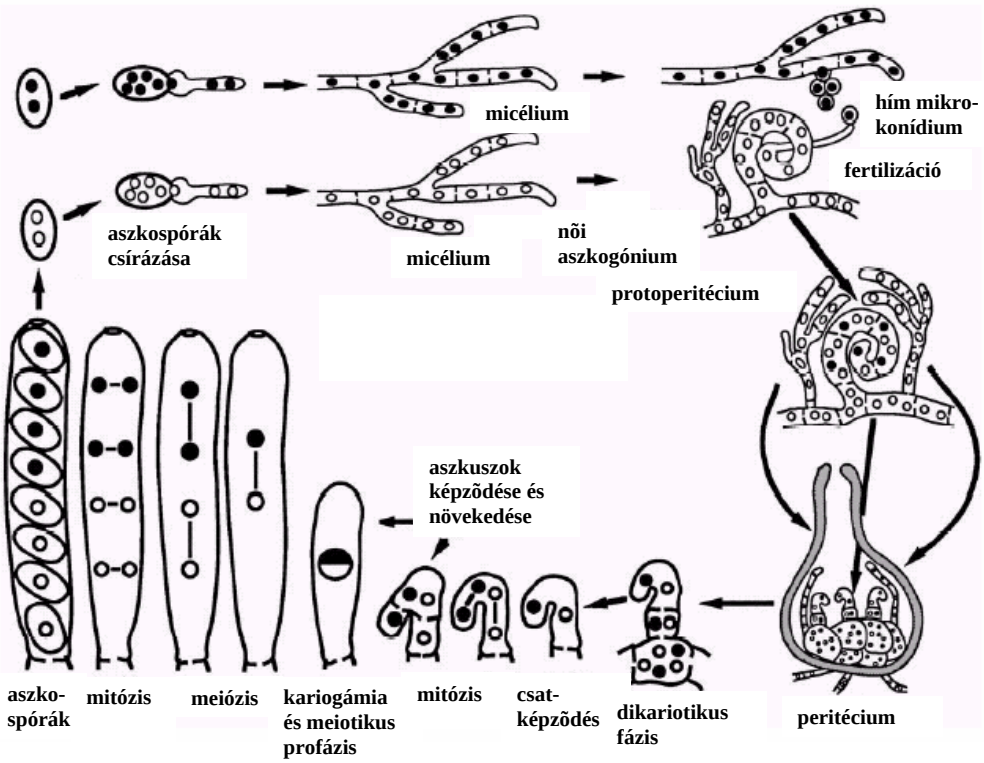
gombák ivaros morfogenetikai változásai poligénes kontroll alatt állnak, és számos, ivaros kommunikációban résztvevõ gént azonosítottak már (Shen et al. 1999; Vallim et al. 2000; Pöggeler és Kück, 2001; Kim et al. 2002; Turina et al. 2003; Kim és Borkovich, 2004). Ezen események molekuláris háttere nem teljesen ismert, de a párosodási típus génekrõl bebizonyosodott, hogy az ivaros kommunikáció legfontosabb szabályozói (Coppin et al. 1997; Turgeon 1998; Kronstad és Staben, 1997; Shiu és Glass, 2000; Trail et al. 2003).

2.3.1. A fonalas aszkomicéták ivaros ciklusa

Az ivaros szaporodás a patogén gombák evolúciójában központi szerepet tölt be. Új patogén törzsek, változatok kialakulásához vezet, s e változatok képesek rezisztens fajtákat is megbetegíteni, vagy megváltozik fungicidekkel szembeni ellenállóságuk. Ennek ellenére több mint tizenötezer gomba kizárólag vegetatív úton szaporodik, vagy legalább is nem ismert az ivaros alakja (Arie et al. 2000).

Vegetatív fázisuk során a fonalas gombák haploid sejtmagvakat tartalmazó, válaszfalakkal részlegesen osztott hifaszövedéket, úgynevezett micéliumot hoznak létre. Az **1. ábrá**n részletesen bemutatott ivaros ciklus megfelelõ környezeti feltételek mellett (fény jelenléte és bizonyos tápanyagok hiánya) a nõi ivaros képletek (aszkogóniumok) differenciálódásával indul meg. Az aszkogóniumok oldalirányban feltekeredett hifák, amelyek csúcsi részén a legtöbb faj esetében párzófonal (trichogin) található. A nõi ivarszervek lehetnek fedetlenek, vagy az õket körülfogó, környezõ hifákkal képezhetnek protoperitéciumot. A heterotalliás fajokban az ellentétes párosodási típusba tartozó partner hím jellegû sejtmagvai a trichoginen keresztül vándorolnak az aszkogóniumba. A hím sejtek lehetnek mikro- vagy makrokonídiumok, illetve micélium darabok. Ezek sejtmagja a megtermékenyítés során belép az elsõdleges aszkogén sejtbe. A plazmogámiát nem követi rögtön kariogámia. Megindul a termõtest képzõdése, amelyben aszkuszok formálódnak. A tömlõsgombák hagyományos, filogenetikai tanulmányokból ismert osztályozási rendszere a termõtestek struktúráján alapszik. Morfológiájuk alapján a termõtestek többféle elnevezése használatos; megkülönböztetünk peritéciumot (felül nyitott, palack alakú), apotéciumot (nyitott, csésze alakú), kleisztotéciumot (zárt, szabályos gömb alakú), és pszeudotéciumot (köcsögszerû, fejletlen). Az aszkomikótákat hat alosztályba (*Hemiascomycetes*, *Plectomycetes*, *Pyrenomycetes*, *Discomycetes*, *Laboulbeniomycetes* és *Loculoascomycetes*) sorolták a termõtestek képzése, az aszkuszok falának struktúrája és az aszkospórák kibocsátásának módja alapján. A termõtestek felépítésétõl függetlenül a bennük lezajló folymatok valamennyi tömlõsgombában hasonlóak. A plazmogámiát követõen a sejtmagvak osztódnak, számos sokmagvú sejtet hozva létre. Ezt követõen

az ellentétes párosodási típusba tartozó sejtmagvak párokba rendezõdve specializált sejtekbe (aszkogén hifák) vándorolnak, és úgynevezett csatokat (horgok) hoznak létre. Ezekben a csatokban a két szülõi sejtmag koordinált mitózison megy keresztül és szeptum képzõdését követõen egymagvú bazális és laterális, illetve egy kétmagvú sejt jön létre, amely aszkusz anyasejtté alakul át, ahol a kariogámia bekövetkezik. Ez a kétmagvú sejt az egyetlen diploid sejt a teljes életciklus alatt. A diploid sejtmag rögtön számfelezõ osztódásba kezd, amelyet fajtól függõen egy, vagy néhány posztmeiotikus mitózis és végül az aszkospórák (aszkuszonként nyolc; négy mindkét párosodási típusból) képzõdése követ. A bazális és laterális sejtek fuzionálhatnak, majd osztódhatnak újabb horgokat hozva létre, így számos aszkusz jöhet létre minden egyes dikariotikus sejtbõl. Valójában egy fertilizációs esemény aszkuszok százait eredményezi (Coppin et al. 1997). A bennük lévõ spórák 30 cm-nél messzebbre is eljuthatnak, hogy megfelelõ körülmények között kicsírázzanak, és a kompatibilis partnert megtalálva újraindítsák az ivaros ciklust.



1. ábra A heterotalliás fonalas aszkomicéták életciklusa Thompson-Coffe et al. (1999) nyomán

2.3.2. Az aszkomicéták párosodási típusai

Mivel a kompatibilis haploid törzsek morfológiailag megkülönböztethetetlenek egymástól és nem mutatnak sem hím, sem nõi nemi jelleget, az ivaros partnerek elkülönítése csupán a párosodási típusaik alapján lehetséges (Bistis 1998).

Az aszkomicéták ivaros szaporodásának tanulmányozása több mint 80 éves múltra tekinthet vissza. Dodge (1920) vizsgálta a heterotalliás aszkomicéta *Ascobolus magnificus* párosodási típusának genetikai hátterét. Megfigyelte, hogy az ivaros szaporodással létrejövõ utódokban a párosodási típusok 1:1 arányban oszlanak meg. Késõbbi vizsgálatok alátámasztották a tömlõsgombák párosodási típusának bipoláris jellegét, azt, hogy ezekben a szervezetekben az ivaros reprodukció egyetlen két alléles lókusz (*MAT*; mating type) szabályozása alatt áll (Coppin et al. 1997; Turgeon 1998), kivéve a *Glomerella cingulata*t, amelyben négy párosodási típust azonosítottak (Cisar és TeBeest, 1999). Ezzel szemben a bazídiumos gombákra két lókuszos, multipoláris rendszer jellemzõ, amelynek következtében többezer párosodási típus alakult ki (Nelson 1996).

A fonalas aszkomicéták párosodási típusainak molekuláris szintû vizsgálata meglehetõsen késõn, 1988-ban indult meg, amikor Glass és munkatársai klónozták a *Neurospora crassa mat A* és *mat a* párosodási típusait kódoló géneket (Glass et al. 1988; Staben és Yanofsky, 1990), néhány évvel a *S. cerevisiae* **a** és α *MAT* szekvenciáinak meghatározását követõen (Astell et al. 1981). Késõbb Herskowitz (1989), Oehlen és Cross (1994) feltárták az élesztõk párosodási típus rendszerét és az azt szabályozó modellek egész sorát készítették el. A napjainkig vizsgált párosodási típus rendszereknek sok a közös tulajdonsága, de szép számmal találhatók eltérések is, pl. az érintett gének számában és az általuk kódolt fehérjék funkciójában.

A bipoláris heterotallia csupán az egyik lehetõség a tömlõsgombák által választható reprodukciós stratégiák közül. Kétségkívül a legelõnyösebb, mivel újabb és újabb genetikai kombinációk kialakulásához vezet. A heterotalliás gombáknál az ellentétes párosodási típusba tartozó törzsek csak egymással képesek ivaros kapcsolatba lépni. A heterotalliás fajok párosodási típusát egyetlen *MAT* lókuszon elhelyezkedõ két eltérõ allél (*MAT1-1* és *MAT1-2*) határozza meg (Yoder et al. 1986; Yun et al. 2000). Ezek elnevezése és a bennük lévõ gének száma fajtól függõen változhat (Staben és Yanofsky, 1990; Glass et al. 1990a). A *N. crassa mat a-1* génje felelõs a *mat a* párosodási típusért. A *mat A* párosodási típus lókuszban lévõ három gén közül csak az egyik, a *mat A-1* expressziója szükséges a „*mat A*-identitás” kifejezéséhez. A másik két gén a párosodást követõ folyamatokban, a peritéciumok érésében nélkülözhetetlen. Ugyanezt figyelhetjük meg a *P. anserina mat-* párosodási típusa esetében is.

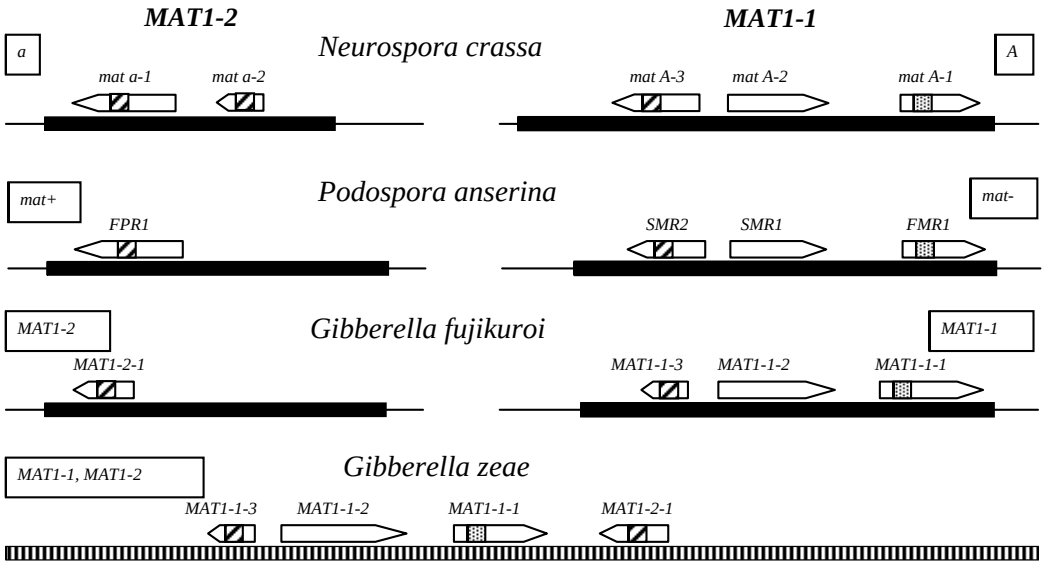
Ezidáig számos heterotalliás tömlõsgomba, pl. a *S. cerevisiae* (Hicks et al. 1979.), a *S. pombe* (Kelly et al. 1988), a *N. crassa* (Glass et al. 1990a; Staben és Yanofsky, 1990), a *Podospora anserina* (Debuchy és Coppin, 1992) és a *Cochliobolus heterostrophus* (Turgeon et al. 1993) párosodás típus génjét klónozták és jellemezték. Ezen fajok *MAT* lókuszai közötti hasonlóságokat és különbségeket Turgeon et al. (1993), Nelson (1996), Coppin et al. (1997) és Wirsel et al. (1998) összegezték.

Sok faj azonban homotalliás – a homokariotikus haploid törzseknek nincs genetikailag definiálható párosodási típusuk, és önmagukban is képesek ivaros szaporítóképletek kialakítására (Glass et al. 1990b). Ez értelemszerûen csökkenti a genetikai diverzitást, de másfelõl elõnyös is (túl azon, hogy az ivaros ciklus megvalósulásához nincs szükség a párosodásra alkalmas partner felkutatására), pl. az ivaros spórák a konídiumokkal szemben sokkal ellenállóbbak a környezeti behatásokra, valószínûleg éppen emiatt lehetnek a szántóföldi fertõzések elsõdleges forrásai (Paulitz 1996). Ezért is vizsgálják a *MAT* mutánsok fertõzési képességét szántóföldi körülmények között. A homotalliás gombák, mint amilyen a *Gibberella zeae* egyazon *MAT* lókuszán valamennyi *MAT* gén megtalálható (Yun et al. 2000). A *MAT* gének evolúciójának iránya a heterotallizmustól a homotallizmus felé mutat. Filogenetikai és molekuláris genetikai bizonyítékok támasztják alá, hogy a homotalliás és aszexuális *Cochliobolus* fajok a heterotalliásoktól származnak (Yun et al. 1999). A legtöbb homotalliás *Neurospora* fajnak csak *mat A* párorodási típusa van. Lehetséges, hogy a *mat a* lókusz is megtalálható a genomon, de az eddig jellemzett párosodási típus gének egyikéhez sem hasonlít (Dempsey et al. 1993).

Mivel az ellentétes párosodási típusba tartozó törzsek *MAT* lókuszában található DNS szakaszok bázissorrendje semmiféle hasonlóságot nem mutat egymással, az idiomorf kifejezés használatos az allél helyett (Glass et al. 1988; Metzenberg és Glass, 1990; Turgeon 1998). Még keresik a magyarázatot arra, hogy hogyan foglalhatják el ezek az eltérõ szekvenciák ugyanazt a genomi pozíciót. Az emlõsök ivari kromoszómáit vizsgálva Marshall (1995) arra a következtetésre jutott, hogy a *MAT* szekvenciák valamikor azonosak lehettek, de az Y kromoszóma evolúciója során bekövetkezõ addíciók, deléciók vagy kromoszóma-átrendezõdések eredményeként alakulhatott ki ez a jelentõs bázissorrendbeli eltérés. A *C. heterostrophus* mindkét *MAT* lókuszában egyetlen gén található. Ezek szekvenciája különbözõ, de a környezõ szekvenciák konzerváltak, amely a közös eredetre utal. A **2. ábra** szemlélteti a *MAT* lókuszok felépítését a hetero- és homotalliás tömlõsgomba fajokban.

A *S. cerevisiae* hemiaszkomicéta gombák alapvetõen heterotalliások, de homotalliás egyedek könnyen létrejöhetnek azáltal, hogy a párosodási típus lókuszában lévõ α vagy **a** szekvenciák egy transzpozíciós esemény során az ellentétes párosodási típus *HMR***a** ill. *HML*α donor lókuszból származó, de ott nem expresszálódó kópiáival kicserélõdnek (Herskowitz et al. 1992; Klar 1992). Ehhez tehát szükség van arra, hogy a két párosodási típus információja aktív és inaktív lókuszokban megtalálhatók legyenek a genomban. A korábban nem expresszálódott kópia aktív lókuszba történõ transzpozíciója teszi lehetõvé a „rejtett” párosodási típus megnyilvánulását. Az élesztõkben (a *S. pombe*nél is hasonló mechanizmus révén) ez a rekombinációs esemény nagy gyakorisággal történik meg. Így a korábban csak egyféle sejttípust (α vagy **a)** tartalmazó kultúra bizonyos idõ elteltével már α és **a** sejteket is tartalmaz, ami lehetõvé teszi diploid sejtek

kialakulását párosodási partner nélkül. Ez a modell azonban nem alkalmas a fonalas aszkomicéták homotallizmusának magyarázatára, náluk ez az esemény rendkívül ritkán történik meg, akkor is kizárólag egy irányban (Perkins 1987).



2. ábra A *MAT* gének szervezõdése aszkomicéta fonalas gombákban

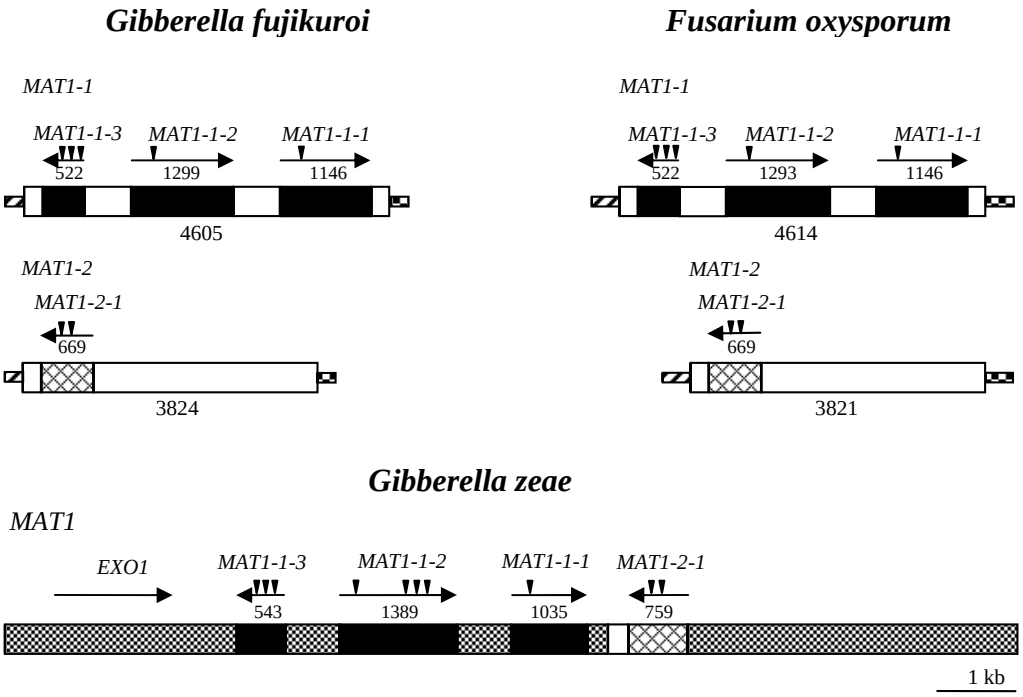
A heterotalliás gombákban (*N. crassa*, *P. anserina*, *G. fujikuroi*) a *MAT1-1*-es és a *MAT1-2*-es géncsoportok azonos lókuszon helyezkednek el. Természetesen egy haploid gombatörzsben csak az egyik allél (idiomorf) fordul elõ. Szerkezetük és a gének száma különbözõ, a *MAT1-2* idiomorfban általában egy gén található, a *MAT1-1*-esben három, de lehet kevesebb is (pl. *C. heterostrophus*). A homotalliás gombákban viszont mind a két idiomorf megtalálható, a *G. zeae* esetében például szorosan kapcsoltan.

A *P. anserina*, a *Neurospora tetrasperma* és a *Gelasinospora tetrasperma* pszeudohomotalliás fajok. Aszkospóráikban általában mind a két ellentétes párosodási típus sejtmagjai megtalálhatók. A homotalliás fajokkal ellentétben az ilyen spórákból létrejövõ micélium haploid sejtmagjai a két párosodási típusnak csak az egyikét tartalmazzák.

Végül, de nem utolsó sorban a fonalas aszkomicéták egy csoportja aszexuális (pl. *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*), szaporodásuk „kizárólag” vegetatív úton történik. A *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Arie és munkatársai által 2000-ben gyûjtött valamennyi szántóföldi izolátuma *MAT1-1* párosodási típussal rendelkezik. Ez a tény aszexualitásuk két lehetséges okát veti fel. A gomba nõsteril, mutáns változata egy eredetileg heterotalliás fajnak, vagy rendelkezik ugyan az ivaros szaporodás képességével, de a párosodáshoz nem talál megfelelõ partnert a populációban.

2.3.3. A *Fusarium* fajok *MAT* lókuszainak szervezõdése

Korábban nehézkes volt annak megállapítása, hogy az aszexuális gombáknak vannak-e *MAT* génjeik, mivel nem keresztezhetõk egymással. A 90-es évek végén azonban Arie és munkatársai (1997) PCR-rel sikeresen szaporították fel több tömlõsgomba párosodási típus génjét, többek között aszexuális fajokét is. Ennek az eljárásnak köszönhetõen megállapították, hogy valamennyi *MAT1-2* idiomorfot tartalmazó heterotalliás tömlõsgomba *MAT* lókuszának megközelítõleg 270 bp nagyságú szakasza egy HMG-box motívumot kódol (Turgeon 1998; Turgeon et al. 1993). Majd a *N. crassa* és a *C. heterostrophus* ezen régióira tervezett degenerált indítószekvenciákkal felsokszorozták egy sor, *Pyrenomycetes* és *Loculoascomycetes* alosztályba tartozó faj *MAT* génjeit (Arie et al. 1997).



3. ábra A *Gibberella*/*Fusarium* fajkomplexum *MAT* lókuszainak szervezõdése Yun et al. (2000) nyomán

Egy heterotalliás (*G. fujikuroi*), egy aszexuális (*F. oxysporum*) és egy homotalliás (*G. zeae*) *Fusarium* faj *MAT* lókuszainak felépítése. A nyilak az ORF-ek helyzetét és irányát jelzik. A nyilak alatt lévõ számok az egyes *MAT* gének nagyságát mutatják bp-ban kifejezve, a rajtuk lévõ jelzések pedig az intronok számára és elhelyezkedésére utalnak. A lókuszok végein található keskenyebb téglalapok a konzervatív, homológ túlnyúló régiókat jelölik.

A *Gibberella*/*Fusarium* fajkomplexum három tagjának (a heterotalliás *G. fujikuroi*, a homotalliás *G. zeae* és az aszexuális *F. oxysporum*) *MAT* génjeit Yun és munkatársai 2000-ben klónozták és jellemezték (**3. ábra**).

A *G. fujikuroi* MP-A (*F. verticillioides*) FGSC 7603 törzsnek *MAT1-2* idiomorfja van, amelynek hossza 3824 bp. Az FGSC 7600 törzs *MAT1-1* szekvenciája 4605 bp nagyságú.

(Kísérleteink során ezzel a két vad típusú törzzsel dolgoztunk). A *MAT1-1* idomorfban három gént azonosítottak (Yun et al. 2000; Turgeon és Yoder, 2000). Az elsõ (1146 bp) egy 46 bp nagyságú intronnal rendelkezik, és egy α-domén fehérjét kódol (Coppin et al. 1997), amely nagyfokú hasonlóságot mutat a *N. crassa* MAT A-1 (Glass et al. 1990a), a *P. anserina* FMR1 (Debuchy és Coppin, 1992), a *C. heterostrophus* MAT1-1-1 (Turgeon et al. 1993) és a *S. cerevisiae* MATα1p (Coppin et al. 1997) fehérjéivel. A *MAT1-1-2* gén (1209 bp) egy 59 bp nagyságú intronnal egy konzervált amfipatikus, α-helikális domén fehérjét kódol, amely többek között a *N. crassa* MAT A-2-höz (Coppin et al. 1997; Debuchy et al. 1993) és a *P. anserina* SMR1-hez (Ferreira et al. 1996) hasonló. A *G. fujikuroi* harmadik *MAT1-1* génje (*MAT1-1-3*) 552 bp hosszúságú 3 intronnal (46 bp, 50 bp és 48 bp), fehérje terméke a *N. crassa* MAT A-3 és a *P. anserina* SMR2 HMG-doménjeivel mutat jelentõs hasonlóságot. A *MAT1-2* idiomorf egyetlen, két intronnal megszakított gént tartalmaz (669 bp; az intronok hossza 56 bp és 47 bp). Ez szintén HMG-motívumot kódol, amely a *N. crassa* MAT a-1 (Staben és Yanofsky, 1990), *P. anserina* FPR1 (Debuchy és Coppin, 1992), *C. heterosrophus* MAT1-2-1 (Turgeon et al. 1993) HMG-doménjének felel meg. A tömlõsgombák *MAT* génjei által kódolt fehérjék típusait a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat Néhány tömlõsgomba *MAT* génje által kódolt fehérjetípusok

Fajok	**HMG-domén fehérjék**	**α-domén fehérjék**	**Homeodomén fehérjék**	**Amfipatikus α-helikális fehérjék**	**Párosodási típus idiomorf**
C.heterostrophus	MAT1-2-1	MAT1-1-1			*MAT1-1* *MAT1-2*
F. oxysporum	MAT1-1-3, MAT1-2-1	MAT1-1-1		MAT1-1-2	*MAT1-1* *MAT1-2*
G. fujikuroi	MAT1-1-3, MAT1-2-1	MAT1-1-1		MAT1-1-2	*MAT1-1* *MAT1-2*
G. zeae	MAT1-1-3, MAT1-2-1	MAT1-1-1		MAT1-1-2	*MAT1*
N. crassa	MAT A-3, MAT a-1	MAT A-1		MAT A-2	*Mat A* *mat a*
P. anserina	SMR2, FPR1	FMR1		SMR1	*mat-* *mat+*
S. cerevisiae		MATα1p	MATα2p, MAT**a**1p		*MATα* *MAT**a***

Az intronok helyét RT-PCR-t követõ szekvenciameghatározással azonosították. A PCR-hez a *F. oxysporum MAT1-1*, *MAT1-2* és a *G. circinatum MAT1-2* lókuszainak 5’ és 3’ túlnyúló régióira (amelyek konzervatívak a két párosodási típusban) terveztek indítószekvenciákat.

A homotalliás *G. zeae* mind a négy, fentebb felsorolt gént tartalmazza, de ezek mérete, a bennük lévõ intronok száma és hosszúsága nem egyezik meg a heterotalliás *G. fujikuroi* párosodási típus génjeivel **(3. ábra)**. Az átíródó fehérjéik csupán 48-64%-os hasonlóságot mutatnak egymással (Yun et al. 2000).

A *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* aszexuális faj, annak ellenére, hogy a szántóföldi mintákban mindkét párosodási típusa megtalálható (Kerényi et al. 1999; Yoshida et al. 1998). Sõt a *G. fujikuroi* és a *F. oxysporum* MAT géntermékei 81-93%-ban azonosak. A *F. oxysporum* párosodási típus génjei átíródnak saját genetikai hátterük mellett is (hiszen szekvenciájukat RT-PCR-rel fel lehetett szaporítani). Ezzel szemben a szintén aszexuális *Bipolaris sacchari MAT* génjei csak a rokon heterotalliás *C. heterostrophus* genomjába bejuttatva expresszálódtak (Sharon et al. 1996). Mivel a *MAT* gének fajon belül homogének, de fajok között már kisebb-nagyobb fokú variabilitás jellemzõ rájuk, jól alkalmazhatók filogenetikai vizsgálatokra a *G. fujikuroi* fajkomplexumban (Turgeon 1998). Arie és munkatársai (2000) a *MAT1-2* HMG-domén szekvenciája alapján készítettek filogenetikai törzsfát, amelynek segítségével számos tömlõsgomba rokonsági foka meghatározható.

2.3.4. A *MAT* gének által kódolt fehérjék és funkcióik

Valamennyi aszkomicéta gomba *MAT* idiomorfja igazoltan vagy feltételezetten DNS-kötõ motívumot tartalmazó fehérjéket kódol (pl. *MAT1-2-1* = HMG-domén; *MAT1-1-1* = α-domén; lásd **2. táblázat**). Ezek a fehérjék valószínûleg olyan transzkripciós faktorok, amelyek sejttípus-specifikus gének expresszióját serkentve vagy gátolva szabályozzák az ivaros fejlõdési szakaszt (Coppin et al. 1997), és állatokból, illetve gombákból ismert transzkripciós regulátorokkal mutatnak rokonságot.

A *S. cerevisiae*ben a párosodási típus gének fehérjetermékei bizonyítottan pozitív és negatív szabályozó hatású TF-ek. Herskowitz (1989) a sarjadzó élesztõk *MAT* génjei által szabályozott jelátviteli útvonalakat kimerítõ részletességgel tanulmányozta. A fonalas gombák *MAT* lókuszai ugyancsak számos gént érintõ komplex genetikai útvonalak szabályozásában vehetnek részt (Leslie és Klein, 1996; Turgeon 1998). A *N. crassa* MAT a-1 polipeptidje HMG-doménje révén specifikus DNS szekvenciákhoz kötõdik.

A fonalas gombák MAT géntermékei az élesztõkhöz hasonlóan, bizonyítottan feromon prekurzor és feromon receptor génekre is hatnak (Coppin et al. 1997; Debuchy 1999; Pöggeler 2000; Pöggeler és Kück, 2001; Kim és Borkovich, 2004). A *S. cerevisiae* **a** ill. α faktorai a receptor sejt sejtciklusát a G1 fázisban leállítják, és egy szignál transzdukciós útvonalon keresztül stimulálják a párosodáshoz szükséges fehérjék termelõdését (Herskowitz 1988). A fonalas gombák által termelt feromonok szerepét a hím és nõi partnerek közötti kommunikációban már korábban megfigyelték (Bistis 1983). A *MAT* gének a fertilizációt követõ eseményekre is hatást gyakorolnak, pl. a termõtestek képzõdésére és sejtmagi felismerésre (Bistis és Raper, 1963; Zickler et al. 1995;

Arnaise et al. 1997; Debuchy 1999). Feromonok hiányában is képzõdnek protoperitéciumok, ha nincs elegendõ nitrogénforrás, a párosodásra alkalmas partner felismeréséhez azonban nélkülözhetetlenek ezek az anyagok (Bistis 1983). A *P. anserina* fonalas gomba olyan párosodási típus mutánsai, amelyek bár megõrizték párosodási képességüket (a négy *MAT* gént mutagén kezelést követõen *MAT* null-mutáns törzsekben expresszáltatták, majd egymással és a vad típussal keresztezték), a fertilizációt követõ funkciókban sérültek. A mutáns sejtmagok könnyen haploid meiózison mentek keresztül vagy egymással fuzionáltak, elutasítva az ellentétes párosodási típusba tartozó sejtmagvakat, melynek következtében uniparentális utódok jöttek létre (Nelson 1996). A párosodási típus gének fehérjetermékeibõl képzõdõ heterodimerek a saját-idegen megkülönböztetés alapját képezik bazídiumos és tömlõsgombákban (Metzenberg 1990). Ezzel szemben az élesztõkben, ahol a megtermékenyítés során a plazmogámiát azonnal kariogámia követi, nincs szükség a párosodási típus gének ilyen jellegû funkciójára; a sejtmagvak „*MAT*-identitás”-ának fenntartására. A fonalas gombák *MAT* génjeinek túlexpresszáltatása vagy szabályozásuk hiánya az aszkospórák pusztulásához vezet, ami azt jelzi, hogy az „ivaros gépezet” megfelelõ mûködéséhez elengedhetetlen a párosodási típus gének precíz szabályozása (Coppin és Debuchy, 2000).

Azokban a gombafajokban is mûködõképes, folyamatosan átíródó párosodási típus gének találhatók, amelyekben ivaros szaporodást még nem figyeltek meg (Sharon et al. 1996; Wirsel et al. 1998; Arie et al. 2000; Yun et al. 2000; Kerényi et al. 2004), tehát a párosodásra való képesség hiánya nem a *MAT* génekben bekövetkezett mutáció eredménye, de oka lehet például a mostanáig azonosítatlan, ivaros reprodukcióban résztvevõ gének funkcionális rendezetlensége (Arie et al. 2000).

Leslie és Klein (1996) megállapítása szerint az idealizált gomba individuum egy haploid, önsteril hermafrodita (heterotalliás) szervezet. Normális körülmények között egy heterotalliás törzsbõl nõsteril mutáns alakulhat ki az ivaros szaporodásra irányuló negatív szelekcióval. A nõsterilitásnak feltehetõen van valamilyen, a vegetatív fázisban megnyilvánuló elõnye, mivel ezek a mutánsok olyan mértékben el tudnak terjedni, hogy egy teljes gombapopuláció elveszítheti ivaros reprodukcióra való képességét. Taylor és munkatársai (1999) szerint minden „aszexuális” gomba erdeteileg heterotalliás volt, és a legtöbbjük megfelelõ körülmények között képes az ivaros reprodukcióra. Ezzel összhangban áll Turgeon (1998) megállapítása, miszerint az aszexuálisnak tartott fajoknak lehet egyfajta rejtett ivaros ciklusuk, de teleomorf alakjaikat a rendkívül ritkán lezajló párosodási folyamatok következtében még nem sikerült azonosítani. Egy másik hipotézis szerint a MAT TF-ek hatást gyakorolhatnak az életciklus egyéb eseményeire is, és olyan géneket szabályozhatnak, amelyek közvetlenül nem vesznek részt a párosodási folyamatokban (Turgeon 1998). Bizonyos párosodási típus lókuszok szerepet játszanak a vegetatív inkompatibilitásban, az ivaros dimorfizmusban és a virulenciában (Kronstad és Staben, 1997).

Sharon és munkatársai (1996) igazolták, hogy a *B. sacchari*nak (a heterotalliás aszkomicéta *C. heterostrophus* aszexuális rokona) vannak intakt *MAT* génjei. Heterológ expresszióval a *B. sacchari MAT1-2* génje funkcióképesnek bizonyult *C. heterostrophus*ban. Ezzel szemben, amikor a *C. heterostrophus MAT1-1* génjével transzformáltak egy *B. sacchari MAT1-2* törzset, nem képzõdtek pszeudotéciumok, amikor a transzfománsokat egymással keresztezték. Tehát a *B. sacchari* nem képes az ivaros reprodukcióra még abban az esetben sem, ha a genomjában mindkét, *C. heterostophus*ban mûködõ *MAT* gén megtalálható, amelyek között korábban 98%-os hasonlóságot állapítottak meg. Ennek alapján vetette fel Turgeon (1998) a kérdést, hogy az aszexuális fajok miért tartják meg *MAT* génjeiket változatlan, funkcióképes állapotban, ha a párosodás során nem veszik hasznát? Talán olyan funkciójuk is van, amely nem áll kapcsolatban az ivaros fejlõdési szakasszal?

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A gombatörzsek származása

A keresztezésekben használt *F. verticillioides* FGSC 7603 (genotípusa: *MAT1-1*) és FGSC 7600 (*MAT1-2*) teszt törzseket a Fungal Genetics Stock Center-bõl kaptuk (University of Kansas Medical Center, Kansas City, USA).

3.2. A törzsek fenntartása

Valamennyi gombatörzset burgonya-glükóz táptalajra oltottuk, törzsenként 2-2 csõre. A csövek egyikét 4°C-on tároltuk, ezek felszínére steril paraffin olajat rétegeztünk, a másikat munkacsõként használtuk. Üvegszûrõn átszûrt konídium szuszpenziót -70°C-on tartottuk 20%-os steril glicerinben.

3.3. A törzsek tenyésztése

A micéliumból egy kis agarkockányi mennyiséget CMC tápoldatba oltottunk és négy napig rázattunk (23-24°C, 180 rpm). Az inkubációs idõ letelte után az oldatot steril G0-ás üvegszûrõn keresztül leszûrtük, a konídiumokat centrifugáltuk (10 perc, 4°C, 3000 rpm), mostuk és steril desztillált vízben visszavettük. A spórákat Bürker-kamra segítségével megszámoltuk és 4°C-on tároltuk (Cappellini és Peterson, 1965). 10^8 db konídiummal inokuláltunk 100 ml komplett tápoldatot (CM) (Correll et al. 1987), amelyet 3 napig 24°C-on rázatva inkubáltunk. A képzõdött micéliumot porcelánszûrõn, steril szûrõpapíron keresztül leszûrtük, és steril desztillált vízzel kétszer mostuk. A genomi DNS izolálásához a micéliumot liofilizáltuk.

3.4. Szekvencia analízis

A nukleotidsorrend meghatározásához plazmid-specifikus, kereskedelmi forgalomban kapható T3 - T7, illetve T7 - SP6 indítószekvencia-párokat, valamint általunk szintetizáltatott specifikus indítószekvenciákat használtunk. A szekvencia analízishez elsõsorban a Mezõgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban mûködõ Gene Analyzer 3100 (Applied Biosystems) berendezést

használtuk, illetve ABI 3000 szekvenátorban (Plant Research International, Wageningen, The Netherlands) a DNS fragmentumok 5' végeinek nukleotidsorrendjét T7 indítószekvenciával „DYEnamic ET Terminator Kit"-tel határoztuk meg. A kapott szekvenciákat a Lasergene (DNAStar Inc., Madison, Wis.), az FGENESH (http://www.softberry.com), valamint a BLAST programmal (Altschul et al. 1997) hasonlítottuk össze. Három különbözõ BLAST keresést végeztünk: BlastN-t és BlastX-et a GenBank EST-, illetve nr-adatbázisban és BlastN-t a *F. verticillioides*/*G. moniliformis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusariumverticillioides/) ill. *F. graminearum*/*G. zeae* (http://www.mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/) genom szekvencián.

3.5. A *FvMAT1-2-1* gén megszakítása

3.5.1. A kiütõ konstrukció létrehozása és a transzformáció

A higromicin rezisztenciát hordozó pAN7-1 vektorból (Punt et al. 1987) az *Escherichia coli* higromicin B foszfotranszferáz (*hygB*) génjét tartalmazó *hph* kazettát hph_ *Eco*RV_for és hph_*Eco*RV_rev oligonukleotid indítószekvenciákkal (**3. táblázat**) felsokszorosítottuk (95ºC, 2 perc – 1 ciklus; 94ºC, 15 másodperc, 64ºC, 30 másodperc, 68ºC, 4 perc – 9 ciklus; 94ºC, 15 másodperc, 64ºC, 30 másodperc, 68ºC, 4 perc (+10 másodperc ciklusonként) – 24 ciklus; 68ºC, 10 perc – 1 ciklus). Az indítószekvenciákat a *hygB* gén megnyilvánulásához szükséges *Aspergillus nidulans gpd* génjének transzlációs start kodonját és *trpC* génjének terminációs régióját tartalmazó higromicin kazetta 5' és 3'végére terveztük. A PCR-hez „Long PCR Enzyme Mix"-et (MBI Fermentas) használtunk, a gyártó utasításai szerint. A PCR terméket agaróz gélen elválasztottuk, majd „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit"-tel (Amersham Biosciences) izoláltuk és *Eco*RV (Fermentas) restrikciós enzimmel linearizált pBluescript II KS+ (Stratagene) vektorba ligáltuk. Az így kapott plazmidot pHPH-nak neveztük el.

A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzs *MAT1-2* lókuszának 4002 bp nagyságú darabját FMATp1 – FMATp2 indítószekvenciákkal (**3. táblázat**) szaporítottuk fel (95ºC, 3 perc – 1 ciklus; 94ºC, 1 perc, 60ºC, 1 perc, 68ºC, 4 perc – 9 ciklus; 94ºC, 1 perc, 60ºC, 1 perc, 68ºC, 4 perc (+5 másodperc ciklusonként) – 24 ciklus; 68ºC, 10 perc – 1 ciklus). A polimeráz láncreakciókat 20 µl, illetve 25 µl térfogatban, Biometra T3 Thermocycler készülékben hajtottuk végre, és a következõ elegyet mértük össze: 20 ng templát DNS, 1×PCR puffer, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP, 0,2 µM primer, 1 U *Taq* polimeráz, steril desztillált víz.

A PCR terméket szintén pBluescript II KS+ vektorba ligáltuk és *Nde*I restrikciós enzimmel hasítottuk, majd feltöltöttük és CIAP-pal (Fermentas) kezeltük, a gyártó utasításai szerint. A

FvMAT1-2 szekvencia 1973 bp nagyságú *Nde*I fragmentjét a pHPH plazmidból származó 3,8 kb nagyságú *hph* kazettával helyettesítettük. Ennek eredményeként kaptuk a pMAT7603/hph plazmidot, amelynek felépítését szekvenálással ellenõriztük.

A transzformációhoz a *F. verticillioides* FGSC 7603 törzsének konídiumait 9,5 órán keresztül YEPD-2G tápoldatban rázatva inkubáltuk (28oC, 180 rpm, 5 x 10^6 db konídium/ml). A gomba még fiatal, vékony falú micéliumából Proctor és munkatársai (1997) által kidolgozott módszer szerint lízis enzim, drizeláz és kitináz (Sigma) elegyével emésztve protoplasztokat hoztunk létre, amelyeket polietilén-glikol (PEG8000) és Ca^{2+}-ionok jelenlétében *Nde*I (Fermentas) enzimmel linearizált pMAT7603/hph plazmiddal transzformáltuk (10µg/transzformáció). A transzformánsokat 200 µg/ml higromicint tartalmazó regenerációs tápközegen szelektáltuk. A rezisztens transzformánsokat 4-5 nap inkubációs idõ elteltével szintén 200 µg/ml higromicinnel kiegészített komplett táptalajra oltottuk át és monospóráztuk 0,1 % Triton-X 100-at tartalmazó CM táptalajon. Higromicint nem tartalmazó CM csészékre történt többszöri átoltással, majd a szelektív táptalajra való visszaoltással gyõzõdtünk meg az integráció stabilitásáról.

3. táblázat A *FvMAT1-2* és *hph* szekvenciák felszaporításához használt indítószekvenciák

A hph_*Eco*RV_for és hph_*Eco*RV_rev indítószekvenciák esetében az (ATC) szekvencia nem található meg a pAN7-1 vektoron (Z32698.1). Az indítószekvenciák tervezésekor a klónozás megkönnyítése érdekében bõvítettük az indítószekvenciák nukleotidsorrendjét az *Eco*RV restrikciós endonukleáz felismerõ helyének egy-egy részletével (GAT-ATC). A pKS plazmidot *Eco*RV enzimmel emésztve a ligálást követõen az enzim felismerõ helye megmarad.

Primerek	Szekvencia (5'-3')	Meghatározás	Amplifikált tremékek mérete
FMATp1 FMATp2	ACCTAGTGCAACAAGAAACAAAGCGAGTG AACCCTGTGTCCTTTAACC(GC)TGAGCAT	*F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) for *F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) rev	4002 bp
GfMAT2-f GfMAT2-r	ACCGTAAGGAACGTCACCATT GGGGTACTGTCGGCGATGTT	*F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) rev *F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) for	214 bp
GfMAT2-r FMATp2	GGGGTACTGTCGGCGATGTT AACCCTGTGTCCTTTAACC(GC)TGAGCAT	*F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) for *F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) rev	3612 bp
TMAT_for TMAT_rev	CTTCCAGCCCCATCGTCTTC TAGGCGGTCATCTGCTGTGTAAC	*F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) rev *F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) for	743 bp
FMATp1 hph_check2	ACCTAGTGCAACAAGAAACAAAGCGAGTG CACGGCGGGAGATGCAATAGGTC	*F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) for *E.coli hph* (Z32698.1) rev	2681 bp
FMATp2 hph_check1	AACCCTGTGTCCTTTAACC(GC)TGAGCAT GGCGCAGACCGGGAACACA	*F.verticillioides MAT1-2* (AF100926.1) rev *E.coli hph* (Z32698.1) for	3816 bp
hph_*Eco*RV_for hph_*Eco*RV_rev*	(ATC)CTTGGAAGCGGCGAGGAG (ATC)TATTGGGTGTTACGGAGCATTCA	*E.coli hph* (Z32698.1) for *E.coli hph* (Z32698.1) rev	3806 bp

3.5.2. A homológ kettõs rekombináció megvalósulásának igazolása

A vad típusú törzs és az ötven monospórázott transzformáns három napon keresztül (26oC, 180 rpm) CM tápoldatban rázatott tenyészetébõl genomi DNS-t izoláltunk a Murray és Thompson (1980) által kidolgozott CTAB-os eljárás Kerényi és munkatársai által 1999-ben módosított változata szerint. A *hph* kazetta helyspecifikus beépülését PCR-rel, Southern és Northern hibridizációval bizonyítottuk.

3.*5.2.1. Polimeráz láncreakció*

A PCR-rel történõ vizsgálatokhoz a kiütött *FvMAT1-2-1* génre tervezett GfMAT2-r – GfMAT2-f (94oC, 2 perc – 1 ciklus; 94oC, 15 másodperc, 60oC, 30 másodperc, 72oC, 30 másodperc – 34 ciklus; 72oC, 5 perc – 1 ciklus), valamint a higromicin kazettára és a *FvMAT1-2* lókuszra tervezett FMATp1 – hph_check2 és hph_check1 – FMATp2 (95oC, 3 perc – 1 ciklus; 94oC, 1 perc, 60oC, 1 perc, 68oC, 4 perc – 9 ciklus; 94oC, 1 perc, 60oC, 1 perc, 68oC, 4 perc (+5 másodperc ciklusonként) – 24 ciklus; 68oC, 10 perc – 1 ciklus) indítószekvenciákat használtunk (**3. táblázat**).

3.5.2.2. Southern hibridizáció

A Southern hibridizációhoz *hph* próbaként a hph_check1 – hph_*Eco*RV_rev, *FvMAT1-2* próbaként pedig a GfMAT2-r – FMATp2, és GfMAT2-r – GfMAT2-f indítószekvenciákkal felsokszorozott PCR terméket használtuk. A polimeráz láncreakciók termékeit 1,5%-os, illetve 0,8%-os agaróz gélen választottuk el. A megfelelõ fragmentumokat gélbõl GFX (Amersham) oszloppal izoláltuk a gyártó leírása alapján, majd Sambrook és Russel (2001) módszere szerint random priming módszerrel [$^{32}\alpha$P]dCTP-vel radioaktívan jelöltük („Hexalabel DNA kit”, Fermentas). A Δ*FvMAT1-2-1* transzformánsok és a vad típusú törzs genomi DNS-ét *Nde*I és *Hind*III (Fermentas) restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd 0,8 %-os gélen elektroforézissel elválasztottuk. Vákuum-blott technika segítségével Hybond N+ membránra (Amersham Pharmacia, UK) szívattuk. A hibridizálás során Sambrook és Russel (2001) utasításait követtük. A DNS molekulákat hordozó membránt 65oC-on 1 órán át prehibidizációs elegyben inkubáltuk, majd hozzáadtuk a radioaktívan jelölt próbát. A hibridizálást UniEquip hibridizációs kemencében végeztük 14-16 órán keresztül. Ezt követõen a membránt 3 x 20 percig mostuk 65oC-on I., II. és III. mosópufferrel. A mosott filtert folpackba csomagoltuk, „Storage phosphor screen”-nel (Amersham) kazettába tettük. Az eredményt a próba aktivitásától függõen 2-24 óra elteltével STORM 840 scannerrel (Amersham) értékeltük.

3.5.2.3. Northern hibridizáció

A Northern analízisben a Southern blottnál említett *hph* próbát, és a *FvMAT1-2-1* génre tervezett TMAT_for és TMAT_rev indítószekvenciákkal (**3. táblázat**) felszaporított és radioaktívan jelölt génrészletet használtuk. Az RNS membránok készítéséhez össz-RNS-t vontunk ki a *F. verticillioides* FGSC 7603 és 7600 törzsekbõl, valamint a Δ*FvMAT1-2-1* transzformánsokból TRI REAGENT™ (Sigma) segítségével, denaturáló agaróz gélen elválasztottuk és kapilláris blottal Hybond N+ membránra vittük át. A hibridizációt a Southern blottnál leírtak alapján végeztük, és a próbákat is ennek megfelelõen készítettük el.

3.6. Ivaros keresztezés

A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzset (*MAT1-2*) és az abból létrehozott Δ*FvMAT1-2-1* mutánsokat (Δ*FvMAT1-2-1/6*, Δ*FvMAT1-2-1/7*, Δ*FvMAT1-2-1/15*) sárgarépát tartalmazó táptalajon (CA) (Klittich és Leslie, 1988) kereszteztük a *F. verticillioides* FGSC 7600 (*MAT1-1*) törzzsel. A nõi partnerként használt törzs sárgarépa agaron növõ micélium szövedékét kevertük össze a hím partner vizes agar csészéirõl származó konídium szuszpenziójával. A csészéket 4 hétig 25°C-on inkubáltuk, 12 órás sötét és 12 órás világos periódusok váltakoztatásával. A változásokat sztereo mikroszkópban vizsgálva, rendszeres idõközönként feljegyeztük.

3.7. A cDNS-AFLP

3.7.1. A cDNS-AFLP elve és lépései

Össz-RNS-t vontunk ki a *F. verticillioides* FGSC 7603 vad típusú és két Δ*FvMAT1-2-1* mutáns törzsbõl (Δ*FvMAT1-2-1/7* és Δ*FvMAT1-2-1/15*) TRI REAGENT™ segítségével, majd a mennyiségileg és minõségileg is megfelelõ RNS mintákból mRNS-t izoláltunk „Oligotex mRNA Midi Kit”-tel (QIAGEN). 2 µg mRNS-bõl kiindulva az „Universal RiboClone® cDNA Synthesis System” (Promega) elnevezésû kittel kétszálú cDNS-t hoztunk létre.

A cDNS-t *Eco*RI és *Mse*I restrikciós enzimekkel emésztettük. Az *Eco*RI ritkábban hasít, a GAATTC hat bázispár hosszúságú szekvenciát ismeri fel, ezzel szemben az *Mse*I gyakrabban vág, az általa felismert szakasz négy bázispár hosszúságú (TTAA). A létrejött cDNS fragmentumok

végeire helyspecifikus, kettõs fonalú adaptereket (*Eco*RI-, *Mse*I-adapterek) ligáltunk (**5. táblázat**), amelyekhez a nem szelektív *Eco*RI és *Mse*I indítószekvenciák kötõdtek a felsokszorosítás során.

4. táblázat A cDNS-AFLP során használt indítószekvenciák

*Eco*RI Primer	Szekvencia (5’ - 3’)	*Mse*I Primer	Szekvencia (5’ - 3’)
*Eco*RI-AA	GACTGCGTACCAATTCAA	*Mse*I-AA	GATGAGTCCTGAGTAAAA
*Eco*RI-AC	GACTGCGTACCAATTCAC	*Mse*I-AC	GATGAGTCCTGAGTAAAC
*Eco*RI-AG	GACTGCGTACCAATTCAG	*Mse*I-AG	GATGAGTCCTGAGTAAAG
*Eco*RI-AT	GACTGCGTACCAATTCAT	*Mse*I-AT	GATGAGTCCTGAGTAAAT
*Eco*RI-CA	GACTGCGTACCAATTCCA	*Mse*I-A	GATGAGTCCTGAGTAAA
*Eco*RI-CC	GACTGCGTACCAATTCCC	*Mse*I-TA	GATGAGTCCTGAGTAATA
*Eco*RI-CG	GACTGCGTACCAATTCCG	*Mse*I-TC	GATGAGTCCTGAGTAATC
*Eco*RI-CT	GACTGCGTACCAATTCCT	*Mse*I-TG	GATGAGTCCTGAGTAATG
*Eco*RI-GA	GACTGCGTACCAATTCGA	*Mse*I-TT	GATGAGTCCTGAGTAATT
*Eco*RI-GC	GACTGCGTACCAATTCGC	*Mse*I-T	GATGAGTCCTGAGTAAT
*Eco*RI-GG	GACTGCGTACCAATTCGG	*Mse*I-CA	GATGAGTCCTGAGTAACA
*Eco*RI-GT	GACTGCGTACCAATTCGT	*Mse*I-CG	GATGAGTCCTGAGTAACG
*Eco*RI-TA	GACTGCGTACCAATTCTA	*Mse*I-CC	GATGAGTCCTGAGTAACC
*Eco*RI-TC	GACTGCGTACCAATTCTC	*Mse*I-CT	GATGAGTCCTGAGTAACT
*Eco*RI-TG	GACTGCGTACCAATTCTG	*Mse*I-C	GATGAGTCCTGAGTAAC
*Eco*RI-TT	GACTGCGTACCAATTCTT	*Mse*I-GA	GATGAGTCCTGAGTAAGA
		*Mse*I-GC	GATGAGTCCTGAGTAAGC
		*Mse*I-GT	GATGAGTCCTGAGTAAGT
		*Mse*I-GG	GATGAGTCCTGAGTAAGG
		*Mse*I-G	GATGAGTCCTGAGTAAG

5. táblázat A cDNS-AFLP során használt adapterek

Adapter	Szekvencia (5’ - 3’)
*Eco*RI-adapter	5’-CTCGTAGACTGCGTACC-3’ 3’-CATCTGACGCATGGTTAA-5’
*Mse*I-adapter	5’-GACGATGAGTCCTGAG-3’ 3’-TACTCAGGACTCAT-5’

Egy elõzetes PCR-t, úgynevezett preamplifikálást (94°C, 1 perc – 1 ciklus; 56°C, 1 perc, 72°C, 1 perc 94°C, 30 másodperc – 19 ciklus; 72°C, 5perc – 1 ciklus) szelektív felszaporítás követett (94°C, 30 másodperc, 65°C, 30 másodperc, 72°C, 1 perc – 1 ciklus; 94°C, 30 másodperc, 65°C, 30 másodperc, 71,3°C, 1 perc – 13 ciklus; 94°C, 30 másodperc, 56°C, 30 másodperc, 72°C, 1 perc – 23 ciklus; 72°C, 5 perc – 1 ciklus), amelyhez az elsõ körben kapott PCR terméket 25-

szörösére hígítottuk. A szelektív felsokszorozásban alkalmazott indítószekvenciák 3' végükön egy vagy két szelektív bázist hordoznak, ezért csak azok a restrikciós fragmentumok szaporíthatók fel, amelyekre jellemzõ, hogy az adapterek szekvenciája és a csatlakozó hasított vég szekvenciája megfelel a szelektív nukleotidok bázissorrendjének (Vos et al. 1995).

A cDNS-AFLP során 16 *Eco*RI és 20 *Mse*I indítószekvencia kombinációját használtuk (**4. táblázat**). Azokat a cDNS-fragmentumokat tudtuk detektálni akrilamid gélen, amelyeknek legalább egy *Eco*RI végük volt, mivel az *Eco*RI indítószekvenciák 5' végét [γ-^{33}P]dATP-vel radioaktívan jelöltük. A gélt Whatman szûrõpapírra szárítottuk, majd a differenciáló fragmentumokat kivágtuk és 50 µl vízben, 4°C-on 10-12 órán át áztattuk. Ezekbõl a mintákból a szelektív amplifikáció során alkalmazott indítószekvencia-kombinációval újra felsokszoroztuk az ígéretesnek tartott fragmentumokat (94°C, 1 perc – 1 ciklus; 94°C, 30 másodperc, 56°C, 30 másodperc, 72°C, 1 perc – 22 ciklus; 72°C, 5 perc). A PCR termékeket agaróz gélen elektroforézissel ellenõriztük és a megfelelõ fragmentumokat pGEM®-T Easy (Promega) vektorba ligáltuk. Az így létrehozott, különbözõ cDNS fragmentumokat tartalmazó plazmidokkal Sambrook és Russel (2001) útmutatása alapján transzformáltuk az *E. coli* DH5α (Stratagene) törzsét. A megfelelõ rekombináns plazmidot hordozó telepeket α-komplementációval, illetve kolónia PCR segítségével választottuk ki. Ehhez a fehér telepeket fogpiszkálóval 30 µl steril desztillált vízbe oltottuk és kétszer 1 percig forraltuk. Ezt követõen a mintákat jégbe helyeztük, majd centrifugálással 3-5 másodpercig ülepítettük. A felülúszóból 10 µl-t adtunk minden egyes PCR-hez, amelyet a reamplifikációnál leírtaknak megfelelõen végeztünk el.

3.7.2. A cDNS-AFLP klónok expressziójának vizsgálata

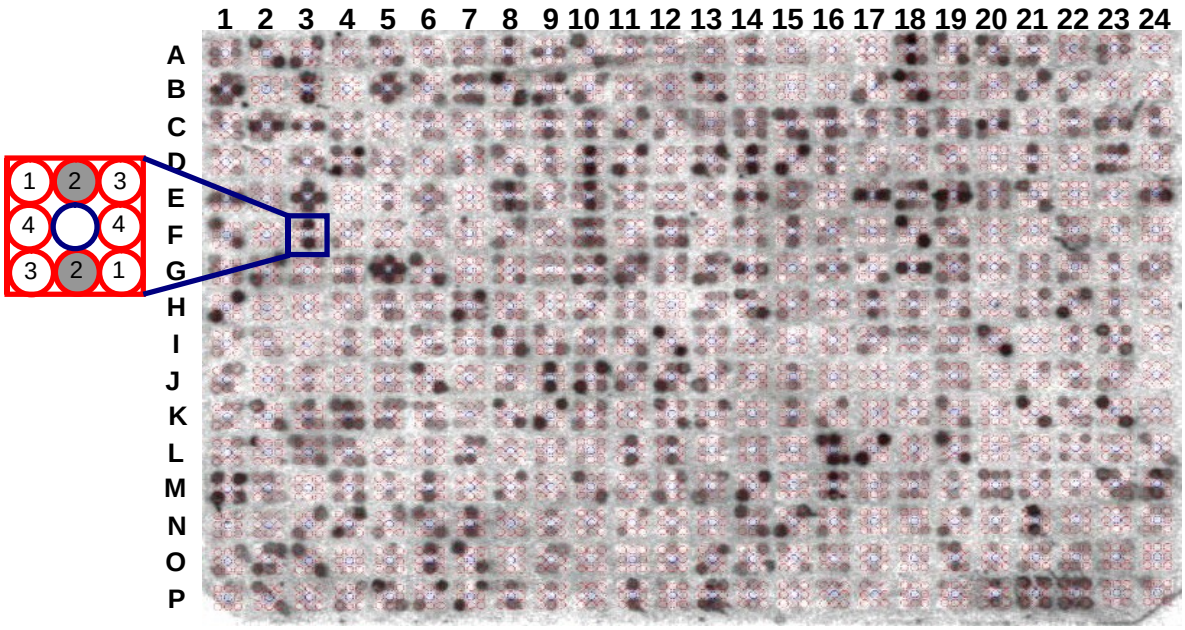
A mutáns és a vad típusú törzsek közötti expressziós különbségek bizonyítására Northern hibridizációs kísérleteket végeztünk a **3.5.3**-as fejezetben leírtak alapján. Próbaként a kolónia PCR-t követõen gélbõl izolált, random priming módszerrel [α-^{32}P]dCTP-vel radioaktívan jelölt cDNS fragmentumokat használtuk.

3.8. cDNS könyvtár-készítés és nukleinsav hibridizálás - HD filter technika

A vad típusú és Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns törzsek öt napon keresztül sárgarépa agaron növesztett (20°C/22°C; 12 h sötét/12 h világos fotoperiódus) micéliumából „Qiagen RNA Isolation Kit" (Qiagen) segítségével össz-RNS-t vontunk ki, majd „Oligotex mRNA Kit"-tel (Qiagen) mRNS-t

izoláltunk és [α-^{32}P]dCTP-vel radioaktívan jelölt kettõs szálú cDNS-t szintetizáltunk. A másodszál szintézist és az adapter (*Sal*I) ligálást követõen, a cDNS egy részét *Not*I (Fermentas) restrikciós enzimmel emésztve könyvtárkészítéshez használtuk fel. Annak érdekében, hogy a könyvtárak a lehetõ legnagyobb méretû cDNS fragmentumokat tartalmazzák, oszlopkromatográfiával osztályoztuk az emésztett cDNS fragmentumokat. A különbözõ frakciók cDNS mennyiségét, illetve koncentrációját szcintillációs detektorban határoztuk meg. Az emésztéssel kapott cDNS fragmentumokat *Sal*I-*Not*I enzimekkel hasított (szelekciós markerként ampicillin rezisztenciagént hordozó) pSPORT vektorba ligáltuk. Az így létrehozott plazmidokkal elektrokompetens *E. coli* DH10B (ElectroMAX™) sejteket transzformáltunk elektroporációval. A könyvtárkészítés valamennyi lépését a „SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning Kit" (Invitrogen) leírásának megfelelõen hajtottuk végre.

A sikeres transzformációt követõen mindkét törzsbõl könyvtáranként 7680 db klónt válogattunk ki α-komplementációval. Az *E. coli* sejteket 20 db 384-es lemezbe oltottuk, és egy éjszakán át 70µl, 100 mg/ml koncentrációban ampicillint tartalmazó LB tápoldatban 37oC-on inkubáltuk. A könyvtárak minõségének ellenõrzését kolónia PCR-rel végeztük (94°C, 10 perc – 1 ciklus; 94°C, 30 másodperc, 55°C, 30 másodperc, 72°C, 1 perc 30 másodperc – 30 ciklus; 72°C, 5 perc), amelyhez minden esetben a következõ elegyet mértünk össze: 1×PCR puffer, 1,5 mM $MgCl_2$, 60 µM dNTP, 0,3 µM T7/SP6 primerek, 1 U *Taq* polimeráz, steril desztillált víz. (A cDNS könyvtárakat LB freeze tápoldatban -80oC-on tároljuk.) Ezt követõen szintén ampicillinnel kiegészített LB tápoldatot tartalmazó 8 × 12 cm méretû csészéket készítettünk, amelyek felszínére, méretre vágott Hybond N+ membránt helyeztünk. Könyvtáranként 5 db nagy sûrûségû filtert (HD filter) készítettünk egy 384 tüskés feltéttel kiegészített robot segítségével. Egy membrán 4 db 384-es lemeznek megfelelõ számú telepet tartalmazott két példányban (2 × 4 × 384 = 3072 db telep/membrán). A robot úgy készítette el a filter egy-egy kilenc telepbõl álló egységét, hogy pl. a négy elsõ, mutáns cDNS klónokat tartalmazó lemez (amelyek számozása pontosan a filternek felel meg: A-tól P-ig és 1-tõl 24-ig) A1-es klónjai alkották az elsõ filter A1-es egységét, A2-es klónjai az A2-es egységet, és így tovább. A **4. ábra** felnagyított részlete szemlélteti egy HD filter F3-as blokkjának beosztását. A nagyításban szereplõ 1-es az elsõ 384-es lemez F3-as klónja, a kettes a másodiké, stb. Az átellenes pozícióban lévõ klónok megegyeznek. Minden egyes blokk közepén egy cDNS fragmentumot nem tartalmazó kék telep szerepel kontrollként a hibridizációhoz.



4. ábra A klónok elhelyezkedése és a hibridizáció mintázata egy HD filteren

Az ábra kinagyított részlete szemlélteti a filter F3-as blokkjának felépítését. Az azonos számok azonos klónokat jelölnek.

Annak érdekében, hogy közel egyforma feltételeket biztosíthassunk a baktérium telepek növekedéséhez, a csészéket mûanyag dobozba helyezve inkubáltuk 37oC-on 18 órán keresztül. Az inkubációs idõ letelte után a telepátmérõ meghatározásával ellenõriztük az egyenletes növekedést. (Valamennyi kolónia méretének az 1-2 mm-es határon belül kellett lennie.) Ezt követõen a filtereket 0,5 M NaOH és 1,5M NaCl elegyében áztattuk fejjel lefelé egy percen keresztül, majd az azonos pufferbe merített Whatmann szûrõpapírokra helyeztük négy percre. A mûveletet 0,2 M Tris/HCl-t (pH 8,0) és 1,5 M NaCl-t tartalmazó oldatban megismételtük. A mosás utolsó lépéseként a filtereket a fent leírt módon 2 × SSC-ben áztattuk és szobahõmérsékleten 30 percig szárítottuk, majd 30 másodpercig tartó UV kezeléssel a baktériumból szabaddá váló nukleinsavat a membránra kötöttük.

A cDNS fragmentumok másik részét a nukleinsav hibridizáláshoz próbaként használtuk fel. A mutánsból és a vad típusból származó, jelölt cDNS próbát hibridizáltattuk a mutáns és a vad típusú filterrel. A filtereket 1-2 órán keresztül 65oC-on inkubáltuk, filterenként 2 ml, illetve csövenként ezen felül 5 ml prehibridizációs elegyben. (Az elegy minden 10 ml-e 100 µl 5mg/ml-es hal DNS-t tartalmazott, amelyet 10 percig 96oC-on denaturáltunk, majd 10 percre jég közé helyeztük.)

A jelölést [α-^{32}P]dATP-t és random, hattagú indítószekvenciákat használva „Random Primed DNA Labeling Kit” (Boehringer) segítségével végeztük. A próbákat „QIAquick Nucleotide Removal Kit”-tel (Qiagen) tisztítottuk, majd a hal DNS kezeléséhez hasonló módon denaturáltuk és a prehibridizációs elegyhez adtuk. Egy éjszakán át tartó hibridizációt követõen a filterek mosását és

az „elõhívást” a **3.5.2.2**-es fejezetben leírtak alapján végeztük. A hibridizációs mintázatok tif fájlként való megjelenítésére a TINA szoftvert használtuk.

Mivel egyazon filter két példányát hibridizáltattuk mindkét törzs cDNS fragmentumaiból készült radioaktív próbákkal, a számítógéppel végzett képanalízis és egy, az adott jel helyzetébõl adódó értékmódosító hatás felmérésére is képes program (AIS 4.0; Imaging Research Inc., Ontario, Canada) segítségével a jelintenzitásbeli eltérésekbõl következtetni tudunk a vad típusú és a Δ*FvMAT1-2-1* törzs közötti génexpressziós különbségekre.

3.9. A nitriláz fehérjét kódoló gén megszakítása

3.9.1. A kiütõ konstrukció és nitriláz mutánsok létrehozása SON-PCR-rel

Antal és munkatársai (2004) útmutatásai alapján az 1143 bp nagyságú nitriláz szekvencia 5’ és 3’ végére kifelé író oligonukleotid indítószekvenciákat terveztünk (**6. táblázat**). A második kör végére egy 1403 bp és egy 1877 bp nagyságú terméket kaptunk, amelyek szekvenciáját több lépésben, a már ismert szakaszokra tervezett indítószekvenciák segítségével meghatároztuk.

6. táblázat A SON-PCR során használt indítószekvenciák

Primer	Szekvencia (5’-3’)	Pozíció
1upper880	ATGATCTTCTCGCCTTTCGGA	973-993 (DQ534528) for
2upper1057	AAGCCTGTCTTCTTCGCCAAC	1150-1170 (DQ534528) for
3upper1101	TTCCTTGGCATAGGGTTCTTG	1194-1214 (DQ534528) for
1lower145	GACTTCAGGGTAGCCAATGAC	238-258 (DQ534528) rev
2lower193	GCCCATGTTTCGTAAGTCTCC	286-306 (DQ534528) rev
3lower263	TCATTGATCCATGGTGCGTTC	356-376 (DQ534528) rev

Az így megismert 4168 bp nagyságú szakasznak (nitSON) a nitriláz gént teljes egészében tartalmazó darabját (2519 bp), nitSON_for – nitSON_rev indítószekvenciákkal (**7. táblázat**) felszaporítottuk (95°C, 3 perc – 1 ciklus; 94°C, 30 másodperc, 58°C, 30 másodperc, 72°C, 1 perc – 40 ciklus; 72°C, 5 perc). A PCR-hez templátként a *F. verticillioides* FGSC 7603 törzs genomi DNS-ét használtuk. A tisztított PCR terméket pKS-T vektorba ligáltuk, majd a plazmiddal *E. coli* DH5α sejteket transzformáltunk.

7. táblázat A nitriláz gén szekvenciájára tervezett indítószekvenciák

Primer	Szekvencia (5'-3')	Pozíció
nitSON_for	GGCTTTCCATGAGGGCACAGA	(DQ534528) szekv. kívül
nitSON_rev	CGCGGTTTCGGTTATGACTCCA	(DQ534528) szekv. kívül
nitközép_for	TGGGCAGATCAGCTTATTCATTTC	302-325 (DQ534528) for
nitközép_rev	GGCCTTGCAGCATTCGGGAGTG	819-840 (DQ534528) rev
nit_for	CCACAACCCCAACAACAATCTATCAAG	94-120 (DQ534528) for
nit_rev	TCCCCCGAACTGCGACCTGTAAGC	1214-1237 (DQ534528) rev

A kiütõ konstrukciót a **3.5.1**-es fejezetben leírtak alapján hoztuk létre, és a transzformációt is annak megfelelõen végeztük el. Azzal a különbséggel, hogy a nitriláz szekvencia 583 bp nagyságú *Nco*I fragmentumát cseréltük a pHPH plazmidból származó 3,8 kb nagyságú *hph* kazettára, és a transzformációhoz a plazmidot *Sma*I restrikciós enzimmel linearizáltuk.

3.9.2. A kiütés sikerének és a kettõs rekombináció megtörténtének igazolása

A higromicin rezisztens, monospórázott transzformánsokból genomi DNS-t izoláltunk (**3.5.2.**). A kiütött génrészletre tervezett indítószekvenciákkal (nitközép_for – nitközép_rev) PCR-t hajtottunk végre (95°C, 2 perc – 1 ciklus; 94°C, 15 másodperc, 58°C, 30 másodperc, 72°C, 45 másodperc – 29 ciklus; 72°C, 5 perc). A nitriláz gén két végére tervezett nit_for – nit_rev indítószekvenciákkal (**7. táblázat**) végzett PCR-hez, a gyártó utasításait követve „Long PCR Enzyme Mix"-et használtunk.

3.10. A nitriláz mutáns törzs vizsgálata különbözõ nitrogén forrásokat tartalmazó táptalajon

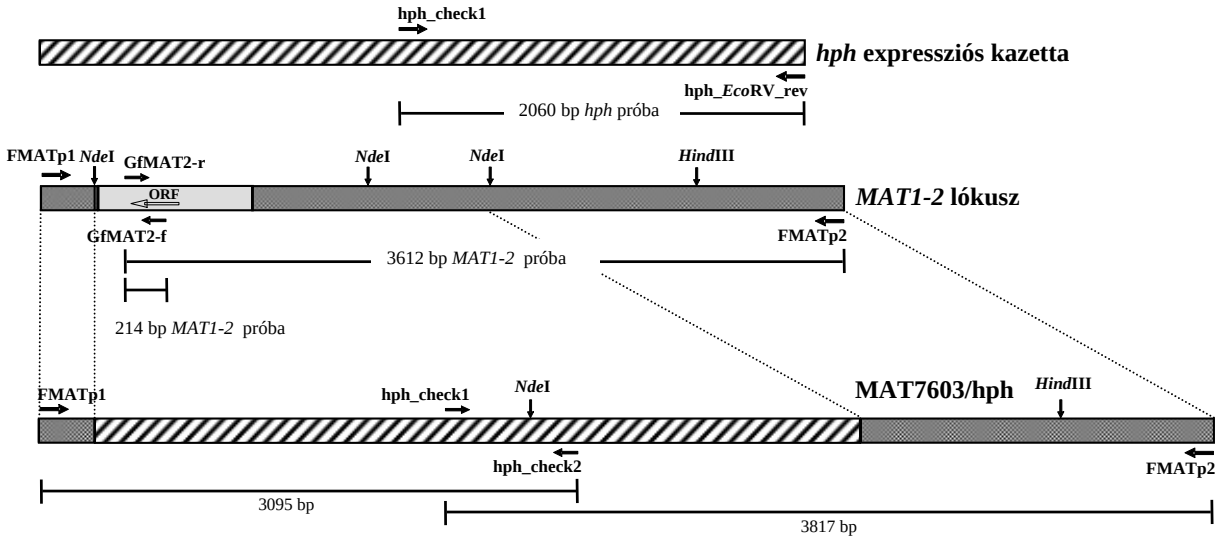
A *F. verticillioides* FGSC 7603 vad típusú és a Δ*nit29* nitriláz mutáns törzsek vizsgálatára öt különbözõ minimál táptalajt készítettünk, amelyek nitrogénforrásként 1 liter táptalajra nézve 1 g ammónium-tartarátot, 0,5 g nátrium-nitritet, 0,2 g adenint, 2 g nátrium-nitrátot, illetve 20 g kálium-klorátot tartalmaztak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A Δ*FvMAT1-2-1* mutáns törzsek vizsgálata

4.1.1. A Δ*FvMAT1-2-1* mutáns törzsek létrehozása

A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzs *MAT1-2* lókuszát génbanki adatok alapján (*G. fujikuroi MAT1-2* – AF100926) tervezett FMATp1 – FMATp2 indítószekvenciákkal felszaporítottuk, klónoztuk és szekvenáltuk. A *FvMAT1-2* szekvencia 1973 bp nagyságú *Nde*I restrikciós enzim felismerõ helyekkel határolt szakaszát a **5. ábrá**n látható módon helyettesítettük az *E. coli* higromicin foszfotanszferáz génjét (*hygB*) tartalmazó *hph* expressziós kazettával.



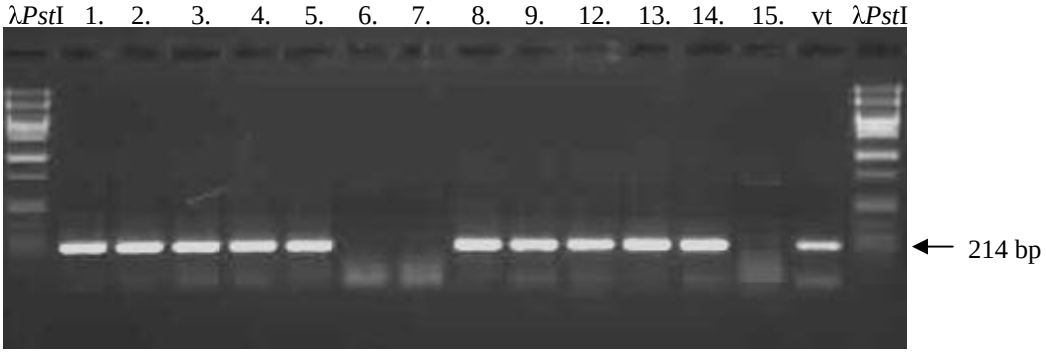
5. ábra A kiütõ konstrukció létrehozása

A *FvMAT1-2* szekvencia *Nde*I restrikciós enzimmel történõ emésztését követõen az 1973 bp hosszúságú *FvMAT1-2* szakasz helyére a 3805 bp hosszúságú *hph* kazetta került.

Az így létrehozott és *Not*I restrikciós endonukleázzal linearizált pMAT7603/hph transzformáló vektor 10 µg-jával *F. verticillioides* FGSC 7603 törzsbõl létrehozott protoplasztokat transzformáltunk. Négy-öt nap elteltével megjelenõ higromicin rezisztens kolóniákat 200 µg/ml higromicin B-t tartalmazó CM csészékre oltottuk át, majd monospóráztuk és antibiotikum-mentes CM táptalajra történõ átoltással teszteltük a higromicin rezisztencia stabilitását.

4.1.2. A homológ kettõs rekombináció megtörténtének igazolása

Ötven stabil fenotípusú, monospórázott transzformáns esetében vizsgáltuk a *hph* kazetta gomba genomba történõ helyspecifikus beépülését PCR-rel, Southern és Northern hibridizációs kísérletekkel. Elsõ lépésben a *FvMAT1-2-1* génre tervezett GfMAT2-f – GfMAT2-r indítószekvencia-párokkal végeztünk PCR-t. Négy transzformáns esetében nem kaptuk meg a vad típusban várt 214 bp hosszúságú fragmentumot (**6. ábra**). Ugyanakkor a feltételezett négy mutáns törzs genomi DNS-érõl sikeresen szaporítottunk fel egy 2681 bp, illetve egy 3816 bp hosszúságú szakaszt FMATp1 – hph_check2 és FMATp2 – hph_check1 indítószekvencia-párokkal, amelyeket a *FvMAT1-2* lókusz és a *hph* kazetta szekvenciája alapján terveztünk.



6. ábra A *hph* kazetta helyspecifikus integrációjának vizsgálata PCR-rel (részlet)

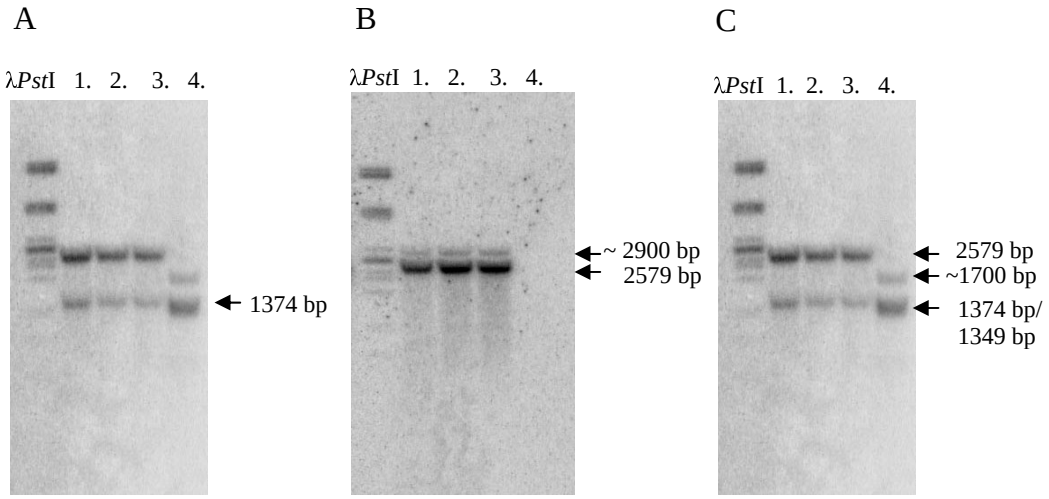
A *FvMAT1-2-1* génre tervezett GfMAT2-f – GfMAT2-r indítószekvenciákkal egy 214 bp hosszúságú *FvMAT1-2-1* fragmentumot szaporítottunk fel a vad típusú törzs (vt) és a legtöbb transzformáns (1-5. és 8-14.) esetében. A 6-os, 7-es és 15-ös transzformánsokban törlõdött ez a szekvencia.

Három kiválasztott transzformánssal Southern hibridizációt végeztünk (Δ*FvMAT1-2-1/6*, Δ*FvMAT1-2-1/7*, Δ*FvMAT1-2-1/15*). A *MAT1-2-1* gén és környezetének szekvenciáját ismerve, a három Δ*FvMAT1-2-1* mutáns és a vad típusú törzs genomi DNS-ét *Nde*I és *Hind*III restrikciós endonukleázokkal hasítottuk.

Próbaként a *hph* kazettára és a *FvMAT1-2* lókuszra tervezett indítószekvencia párokkal felsokszorozott PCR terméket használtunk (**5. ábra**). A *hph* próba a kazetta hph_check1 – hph_*Eco*RV_rev indítószekvenciákkal felsokszorosított 2060 bp hosszúságú darabja. Ezzel a próbával végzett hibridizálás során a mutánsokban két fragmentumot vártunk (**7. ábra B része**). Ezek közül az egyik 2579 bp nagyságú, a másik nem ismert (> 2866 bp).

A két *FvMAT1-2* próba a lókusz 214 bp nagyságú GfMAT2-f – GfMAT2-r indítószekvenciákkal, illetve 3612 bp nagyságú GfMAT2-r – FMATp2 indítószekvenciákkal generált részlete. Az elsõ esetben csak a vad típusban vártunk egy 1374 bp méretû jelet (**7. ábra A része**). A másik *FvMAT1-2* próbával (**7. ábra C része**) két fragmentumot kellett kapnunk a mutáns

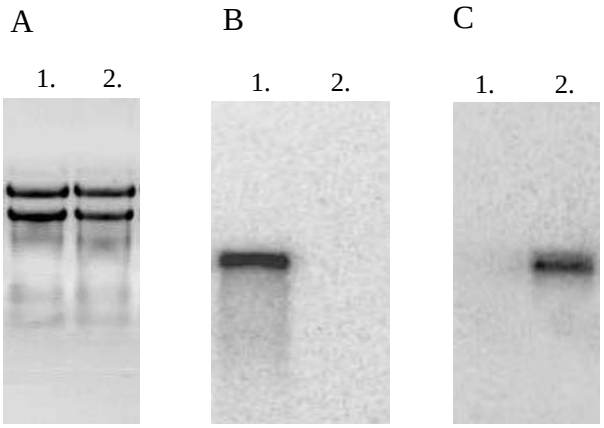
törzsekben (egy 2579 bp és egy ismeretlen nagyságút) és négy fragmentumot a vad típusban (ezek közül három elõre ismert volt: 599 bp, 1374 bp és 1349 bp, a harmadik ismeretlen, de 408 bp-nál nagyobb). (Az 599 bp nagyságú szakasz nem látható a **7. ábrá**n).



7. ábra A kettõs rekombináció megtörténtének igazolása Southern analízissel

A mutáns (1. Δ*FvMAT1-2-1/6; 2.* Δ*FvMAT1-2-1/7;* 3. Δ*FvMAT1-2-1/15*) és vad típusú (4.) törzsek genomi DNS-ét *Nde*I és *Hind*III restrikciós enzimekkel emésztettük. A Southern hibridizációhoz kétféle *FvMAT1-2* (A, C) és egy *hph* próbát (B) használtunk. (Az ábra C részében, a vad típusnál az 1349 bp és az 1374 bp nagyságú fragmentumok nem választhatók el, a mutánsokban kapott jelhez (~1370 bp) képest dupla vastagságban jelennek meg.)

A kiütés sikerességét, a kettõs rekombináció megtörténtét erõsítette meg a Northern hibridizáció eredménye is (**8. ábra**).



9. ábra A kettõs rekombináció megtörténtének igazolása Northern hibridizációval

A Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns (A/1.) és a vad típusú törzs (A/2.) RNS mintáival végzett hibridizációs kísérletben radioaktív próbaként *hph* szekvenciát (B), és TMAT_for és TMAT_rev indítószekvenciákkal felszaporított *FvMAT1-2-1* szekvenciát (C) használtunk.

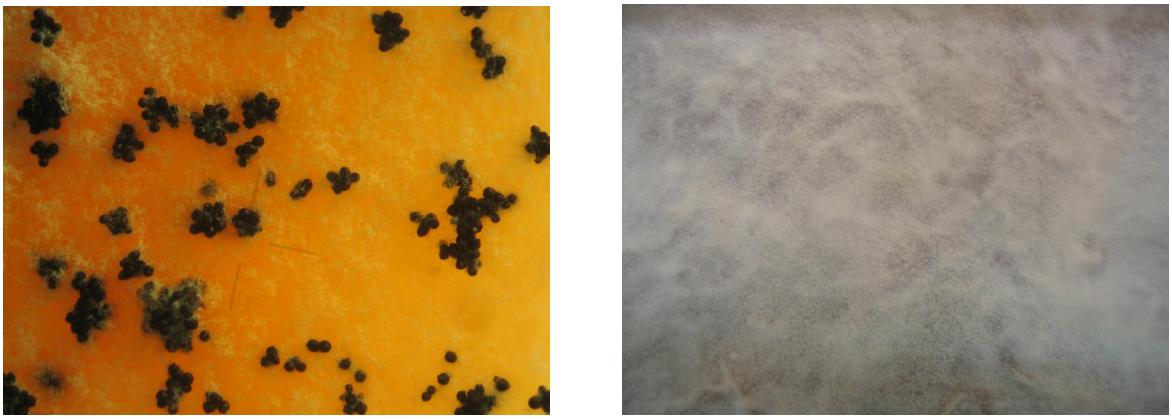
A Southern analízis során is használt *hph* próbával végzett hibridizálással csak a mutánsban kaptunk jelet (**8. ábra B része**). Próbaként a TMAT_for és TMAT_rev indítószekvenciákkal

felszaporított *FvMAT1-2-1* szekvenciát használva kizárólag a vad típusban kaptunk jelet, ami azt bizonyítja, hogy a *FvMAT1-2-1* gén nem íródik át a Δ*FvMAT1-2-1/15* törzsben (**8. ábra C része**).

4.1.3. A Δ*FvMAT1-2-1* mutáns törzsek morfológiai és párosodási jellemzõi

Valamennyi Δ*FvMAT1-2-1* mutáns vad típusra jellemzõ növekedést mutatott komplett táptalajon és sárgarépás csészéken, továbbá a vad típushoz hasonlóan fehér, pelyhes micéliumot növesztett BG táptalajon. A spóraképzõdésben és a spórák csírázásában sem tapasztaltunk eltérést a vad típushoz képest. Ugyanakkor nem voltak képesek a párosodásra a *F. verticillioides* FGSC 7600 (*MAT1-1*) teszt törzzsel függetlenül attól, hogy nõi (**9. ábra**) vagy hím partnerként szerepeltek az ivaros keresztezési kísérletekben.

A **B**



9. ábra A Δ*FvMAT1-2-1* null- mutánsok párosodási képességének vizsgálata

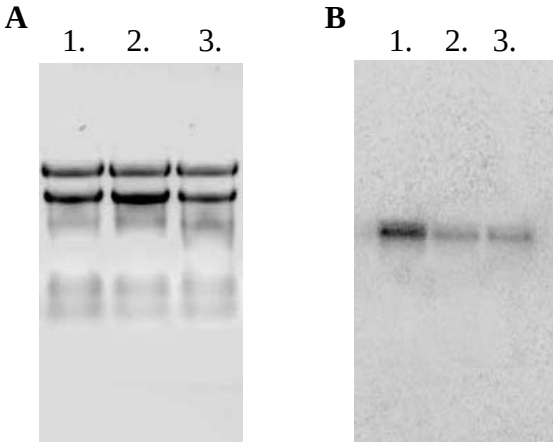
(A) +: FGSC 7603 (MAT1-2); >: FGSC 7600 (MAT1-1). (B) +: ΔFvMAT1-2-1/15; >: FGSC 7600 (MAT1-1). A Δ*FvMAT1-2-1* mutáns törzsek párosodási képességének vizsgálata során érett peritéciumokat kizárólag a kontroll (A) keresztezésben kaptunk.

4.2. A vad típusú és a Δ*FvMAT1-2-1* mutáns törzsekkel végzett cDNS-AFLP kísérletek

4.2.1. A *FvMAT1-2-1* génexpressziós szintjének összehasonlítása sárgarépás és komplett tápközegben

Klittich és Leslie (1988) megfigyelése szerint, a korábban keresztezéseknél használt táptalajokkal szemben a sárgarépa agar jobban fokozza a gombatörzsek fertilitását.

A cDNS-AFLP kísérleteket megelõzõen Northern hibridizációs vizsgálattal igazoltuk, hogy a CA csészéken való növesztés valóban elõsegíti a *MAT1-2-1* gén erõsebb expresszióját (**10. ábra**)



10. ábra A *FvMAT1-2-1* gén különbözõ tápközegben vizsgált expressziós szintjének összehasonlítása Northern hibridizációval

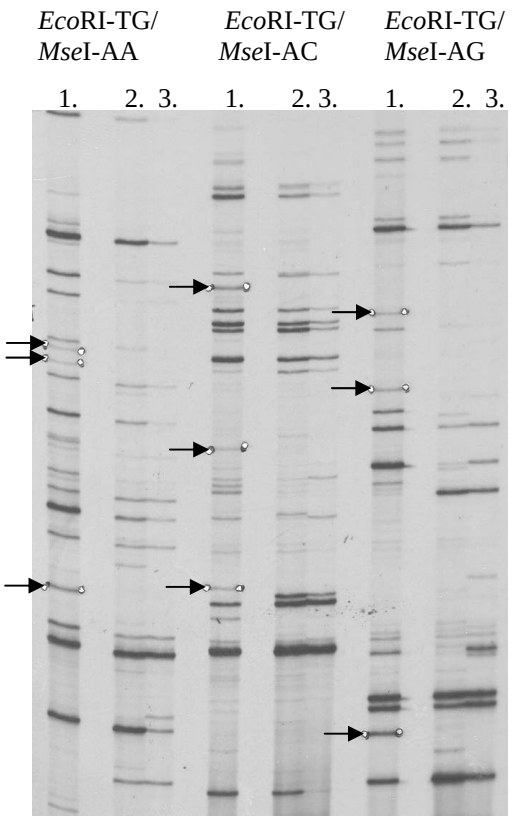
A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzset CA (A, B/1.) és CM (A, B/2.) csészéken, illetve CM oldatban (A, B/3.) tenyésztettük. Próbaként a Southern hibridizációnál is használt 214 bp nagyságú *FvMAT1-2-1* fragmentumot használtuk. A Northern analízis során a legerõsebb jelet a CA csészérõl származó micéliumból izolált RNS mintával kaptuk (A, B/1.).

4.2.2. A cDNS-AFLP

A hibridizáció eredményét figyelembe véve a cDNS-AFLP kísérletekhez a vad típusú és a mutáns (Δ*FvMAT1-2-1/7*, Δ*FvMAT1-2-1/15*) törzsek sárgarépás csészén tenyésztett micéliumából össz-RNS-t, majd mRNS-t izoláltunk. Ezt követõen a *MAT1-2-1* gén mûködésével vagy hiányával összefüggésbe hozható expressziós különbségek kimutatására duplaszálú cDNS-t szintetizáltunk.

Háromszázhúsz indítószekvencia-kombinációt használtunk (16 radioaktívan jelölt *Eco*RI és 20 *Mse*I indítószekvencia kombinációját). A cDNS fragmentumok akrilamid gélen történõ detektálását követõen azokat a nagyobb mérettartományba tartozó fragmentumokat választottuk ki, amelyek vizuális becslés alapján a vad típusú és mutáns törzsek között szignifikáns jelintenzitásbeli különbséget mutattak (**11. ábra**).

A szelektív felsokszorosítás során 737 olyan 250 – 1000 bp nagyságú szekvenciát választottunk ki további vizsgálatra, amelyek minõsége elektroforézissel történõ elválasztással megfelelõnek bizonyult (amennyiben kizárólag egy, a cDNS-AFLP radiogrammal összehasonlítva megfelelõ méretû és kellõ intenzitású fargmentumot kaptunk).



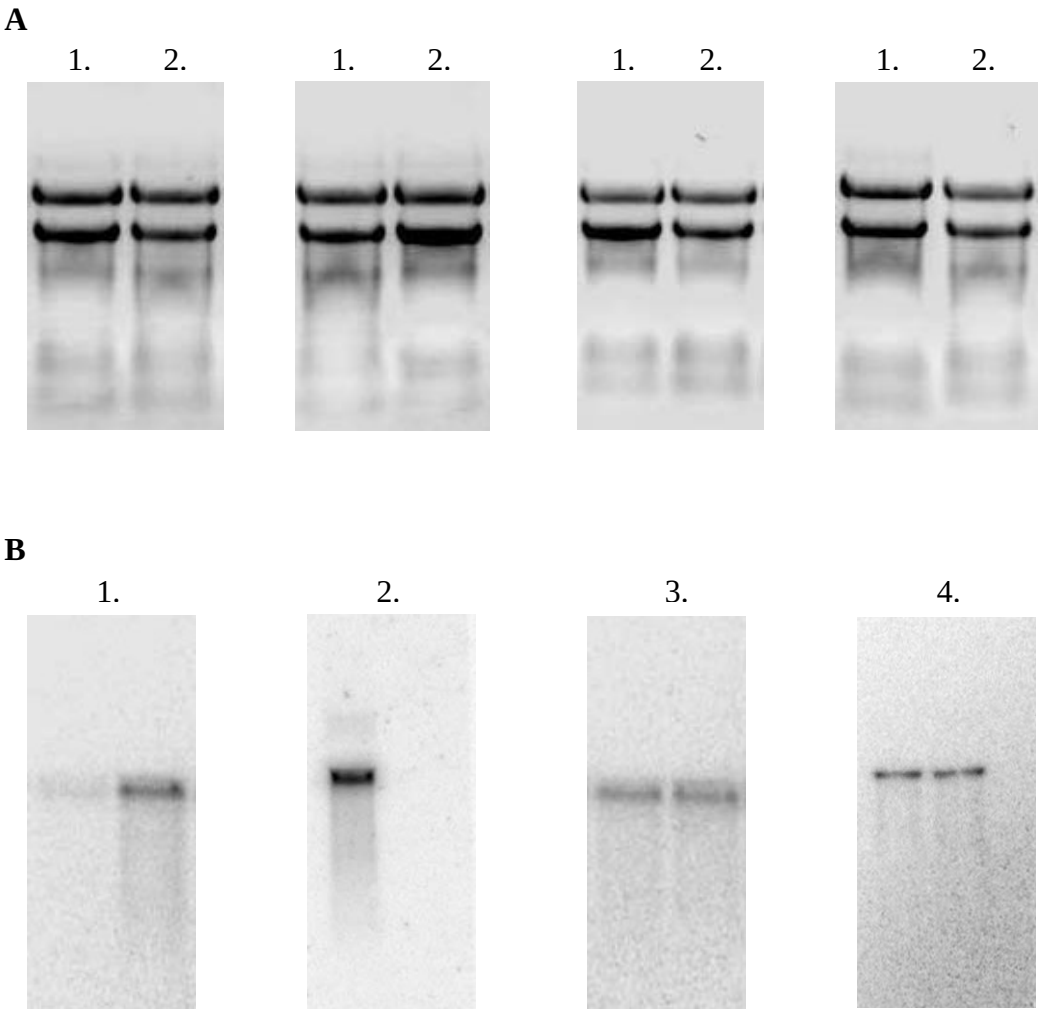
11. ábra cDNS-AFLP radiogram

A *F. verticillioides* FGSC 7603 vad típusú törzs (1.), valamint a Δ*FvMAT1-2-1/15* (2.) és a Δ*FvMAT1-2-1/7* (3.) mutáns cDNS-AFLP mintázata. A nyilak jelzik azokat a visszaizolálandó differenciáló fragmentumokat, amelyek ebben az esetben csak a vad típusban voltak jelen.

4.2.3. A cDNS-AFLP klónok expressziójának vizsgálata Northern hibridizációval

A kísérletek kezdetén a cDNS-AFLP-vel párhuzamosan végzett Northern analízissel próbáltuk igazolni, hogy a cDNS-AFLP-vel kapott jelintenzitásbeli különbségek tényleges expressziós eltérést jelentenek a vad típusú és a mutáns törzsek között.

Tizenöt fragmentum Northern hibridizációval történt vizsgálata során a különbségek általában nem voltak visszaigazolhatók (**12. ábra B/3., 4.**). A Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns és a vad típus esetében is közel egyforma jelintenzitást kaptunk, annak ellenére, hogy a cDNS-AFLP radiogram csak az egyik, jelen esetben a vad típusú törzsben adott jelet. A hibridizáció mindössze hat esetben támasztotta alá a cDNS-AFLP-ben kapott eredményeket. A **12. ábra B/2**-es részlete bizonyítja a transzformáns genomjába homológ kettõs rekombinációval beépült higromicin foszfotranszferáz gén átíródását, a génmûködés hiánya a vad típusban egyértelmûen megfigyelhetõ.



12. ábra A cDNS-AFLP fragmentumok Northern analízise

A cDNS-AFLP klónok *FvMAT1-2-1* gén mûködésétõl függõ expressziós különbségeinek kimutatására Northern hibridizációs kísérleteket végeztünk. A Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns (A/1.) és a vad típusú törzs (A/2.) RNS mintáiból a **3.5.2.3.** fejezetben leírtak alapján RNS membránokat készítettük. A Northern hibridizáció eredményét néhány példán keresztül az ábra B része szemlélteti. A minták sorrendje a következõ: B/1. *Eco*RI-CT/*Mse*I-CG1; B/2. *Eco*RI-AG/*Mse*I-GT1; B/3. *Eco*RI-GC/*Mse*I-CC1; B/4. *Eco*RI-AG/*Mse*I-A

A hat visszaigazolt klón szekvenciáját meghatároztuk, és génbanki adatokkal összehasonlítottuk. Az eredményeket a **8. táblázat** foglalja össze.

Az öt, vad típusban erõteljesebb expressziót mutató klón közül az *Eco*RI-GC/*Mse*I-AG1, amelynek szekvenciája a *S. pombe* cullin-1 homológjával mutatott 44%-os hasonlóságot, mindenképpen említést érdemel. A *S. pombe* cullin-1 fehérjéje két „F-box/WD-repeat” fehérjével a POP1-gyel és a POP2-vel komplexet képez, létrehozva az úgynevezett „Skp1-Cullin-1-F-box" (SCF) ubikvitin ligázt. Ez az enzim felel a szükségtelenné vált szabályozó funkciót betöltõ fehérjék lebontása során a szubsztrátum szelektivitásért és a lebomlás idõzítéséért. Az SCF-nek kitüntetett

szerepe van a sejtciklus megfelelõ mûködésében, mivel az õt alkotó fehérjék szabályozzák a ciklin-függõ kináz (CDK) inhibítor és az S fázist szabályozó Cdc18 szintjét (Kominami et al. 1998).

A cisztationin-γ-szintázról (amely a metionin bioszintézis második lépését katalizálja), a nitrogén anyagcsere gátlásáért felelõs fehérjérõl és a feltételezett külsõ membránfehérjérõl nehéz megmondani, hogy csökkent expressziójuk összefüggésbe hozható-e a *FvMAT1-2-1* gén kiütésével.

Munkánk megkönnyítése és felgyorsítása érdekében a klónok további vizsgálatát célzó hibridizációs kísérleteket Wageningenben, a Plant Research International-ben folytattuk egy, az intézetben általánosan használt „microarray" rendszer segítségével. Az együttmûködés feltételeit az NS 37296 NWO-OTKA pályázat biztosította. A klónozott cDNS-AFLP fragmentumokat tartalmazó *E. coli* telepeket 384-es lemezeken felnövesztve, a differenciál hibridizációt a **3.8.** fejezetben leírtaknak megfelelõen, a cDNS könyvtárakkal folytatott munkával párhuzamosan végeztük.

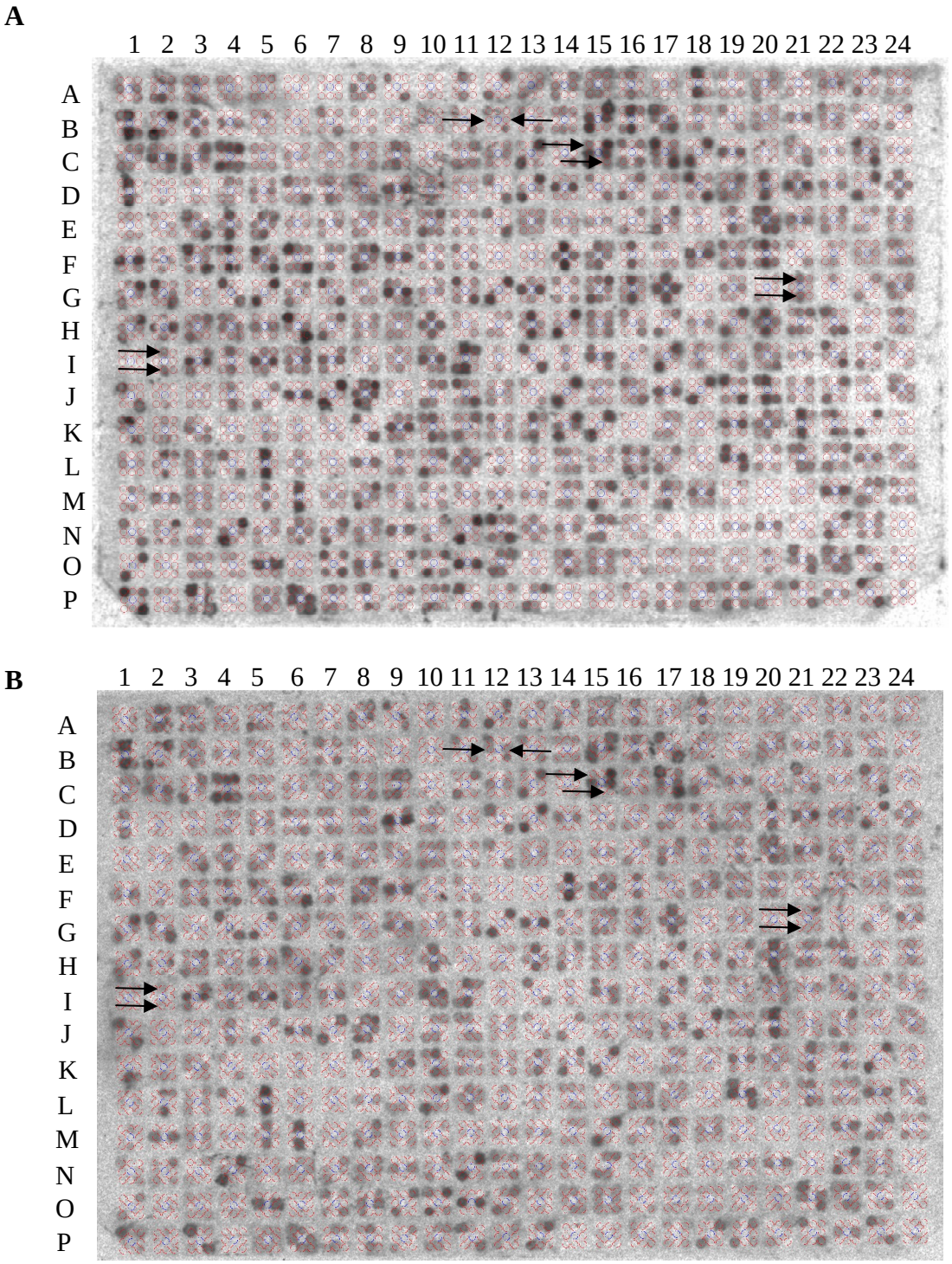
Sajnálatos módon a cDNS-AFLP klónokkal végzett hibridizáció sikertelen volt. Egyik filteren sem kaptunk értékelhetõ eredményt.

8. táblázat Northern analízissel megerõsített cDNS-AFLP klónok szekvencia hasonlóságai

Az *Eco*RI-AG/*Mse*I-GT1 klóntól eltekintve valamennyi szekvencia a vad típusban mutatott erõteljesebb expressziót

cDNS-AFLP klón	Hasonlóság	Faj	Génbanki azonosító	Hasonlóság mértéke (aminosav szinten)
*Eco*RI-GC/ *Mse*I-AG1	Sejtosztódást szabályozó fehérje/cullin-1 homológ	*S. pombe*	T37844	44%
*Eco*RI-GC/ *Mse*I-TG1	Cisztationin-γ-szintáz	*N. crassa*	P38675	68%
*Eco*RI-CT/ *Mse*I-GG3	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	FG01414.1	62%
*Eco*RI-CT/ *Mse*I-CG1	Nitrogén anyagcsere gátlásáért felelõs fehérje	*G. fujikuroi*	CAA75863.1	29%
*Eco*RI-CA/ *Mse*I-T1	Feltételezett külsõ membrán fehérje	*S. typhimurium*	AAL21408.1	34%
*Eco*RI-AG/ *Mse*I-GT1	Higromicin foszfotranszferáz	Szintetikus konstrukció	CAA83647	98%

4.3. Génexpressziós analízis differenciál hibridizációval



13. ábra A mutáns (A) és a vad típus (B) radioaktívan jelölt cDNS fragmentumaival végzett hibridizálás eredménye egyazon klóntáron

Az ábrán feltüntetett nyilak jelölik a mutáns és a vad típusú törzsekben eltérõ mértékben expresszálódott négy klón pozícióját.

A cDNS-AFLP klónok vizsgálatával egy idõben differenciál hibridizációs kísérleteket is indítottunk abból a célból, hogy ezzel is igazoljuk a *MAT* lókusz sejttípus specifikus gének expressziójára gyakorolt hatását.

cDNS könyvtárakat hoztunk létre a Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns és a vad típusú törzsbõl (*F. verticillioides* FGSC 7603). A könyvtárak kialakításához öt napon keresztül CA csészéken növesztett (20/22°C; 12 h sötét/12 h világos fotoperiódus) micéliumból izolált mRNS-t használtunk, a **4.2.1.** fejezetben már említett okból.

A másodszál cDNS szintézisét és az adapter ligálást követõen az emésztett cDNS-t vektorba ligáltuk. A ligálás és a transzformáció részletes leírása a **3.8.** fejezetben olvasható. A 384-es lemezeken növesztett cDNS fragmentumokat hordozó *E. coli* Electromax DH10B sejteket Hybond N+ membránra vittük át egy speciális robot segítségével.

Törzsenként 7680 db klónt gyûjtöttünk össze és hibridizáltattunk radioaktívan jelölt mutáns ill. vad típusú cDNS fragmentumokkal (**13. ábra**).

Egy automata képanalizáló program segítségével kiválogattuk azokat a cDNS klónokat, amelyek eltérõen expresszálódtak a vad típusban és a Δ*FvMAT1-2-1/15* mutánsban. Ezeket további vizsgálatnak vetettük alá.

Megközelítõen négyszeres jelintenzitásbeli különbséget tartottunk elegendõnek ahhoz, hogy nagy biztonsággal állíthassuk: a membránokon látható eltérések oka a két törzs eltérõ expressziós mintázatában keresendõ. Ez alatt az érték alatt nagyobb valószínûséggel fordult elõ, hogy valamely funkcionális fehérjeként azonosított cDNS fragmentum, illetve gén a mutánsban és a vad típusban is egyformán erõsebben vagy gyengébben expresszálódott. Ezt a megállapítást támasztja alá az a tény, hogy a négyszeres jelintenzitásbeli korlát ellenére több alkalommal elõfordult, hogy két átfedõ szekvenciájú klón egyike a vad típusban, a másik pedig a mutánsban mutatott erõteljesebb expressziót (ugyanakkor a köztük lévõ intenzitásbeli különbség egyik esetben sem haladta meg jelentõsen a minimális határértéket). 15 klónt, amelyek egymásnak ellentmondó eredményt adtak, kizártunk a statisztikai analízisbõl.

264 klón szekvenciáját határoztuk meg. 24 esetben (9,1%) nem kaptunk olvasható eredményt. Az értékelhetõ fragmentumok nagysága 262 és 886 bp között volt, a szekvenciák átlagos hossza ~ 698 bp.

Egy alkalommal sikerült azonosítanunk a transzformációs konstrukcióból származó *hygB* gén szekvenciáját, amely egyedül a mutáns törzsben expresszálódott.

138 klón (57,7%) jóval gyengébb expressziót mutatott a mutáns törzsben, mint a vad típusban, ami azt jelzi, hogy átíródásukra a MAT1-2-1 transzkripciós faktor pozitívan hat. Ugyanakkor a *MAT1-2-1* gén termékének negatív szabályozó szerepe is van: 101 (42,3%) szekvencia megnyilvánulása erõteljesebb volt a mutánsban, a vad típushoz viszonyítva.

A BLAST keresések eredményeként 170 olyan szekvenciát azonosítottunk, amely jelentõs hasonlóságot mutatott ismert gomba gének szekvenciáival. 34 klón csak a *F. verticillioides*szel igen távoli rokonságban álló organizmusokból származó génekkel mutatott hasonlóságot, míg 22 szekvencia hipotetikus fehérjékkel adta a legnagyobb homológiát. 13 esetben a program nem talált adatbázisban fellelhetõ hasonlóságot, az adott keresési paraméterek mellett.

A klónok szekvenciáját egymással is összehasonlítottuk a SeqManII program („SeqMan II module of the Lasergene v. 5.0 software”; DNASTAR) segítségével. Ennek köszönhetõen 48 klónt 14 kontigba soroltunk, mivel e klónok részben átfedõ szekvenciákat tartalmaztak.

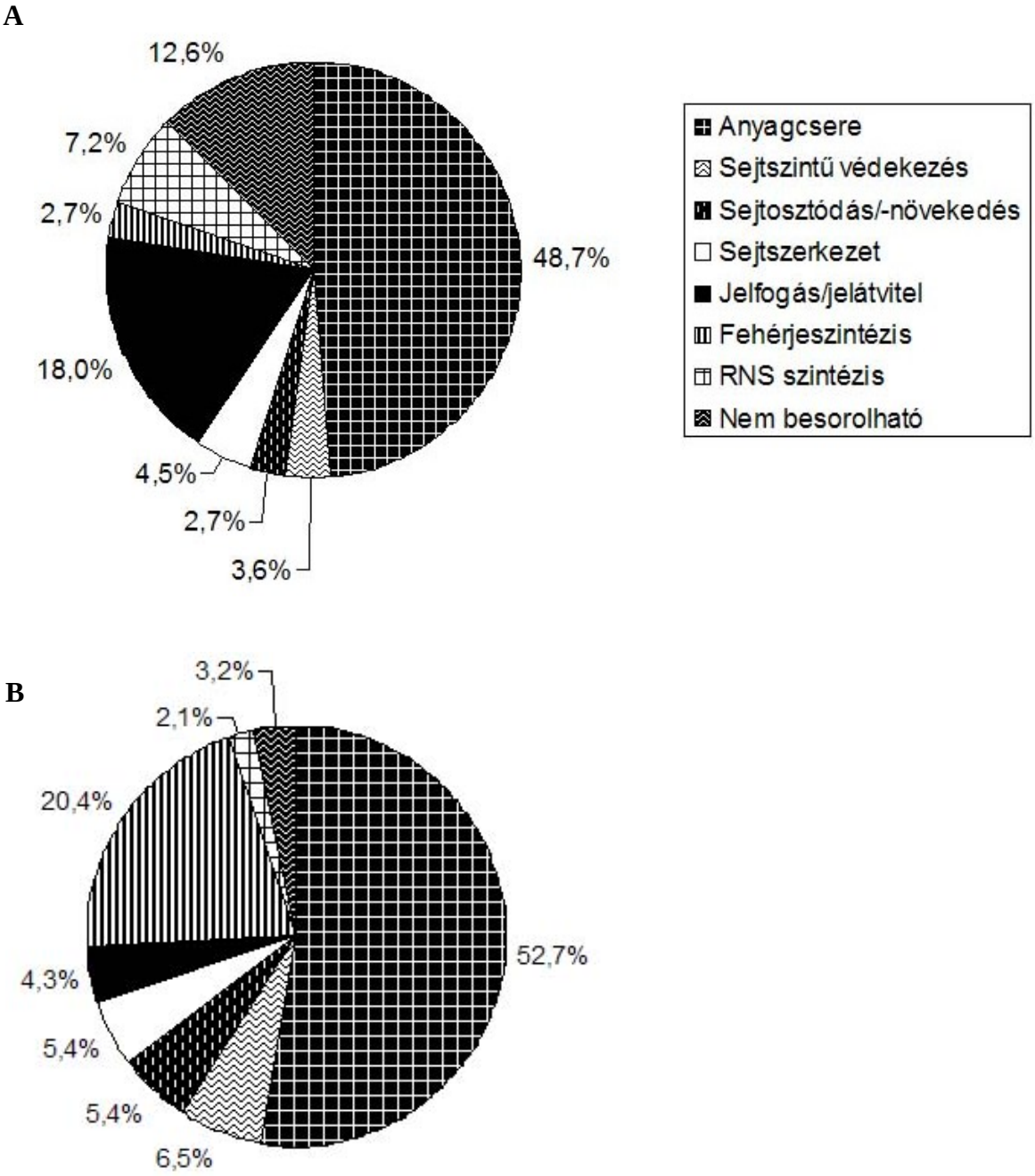
204, ismert fehérjék szekvenciájával hasonlóságot mutató cDNS klónt funkcionális csoportokba soroltuk Sacadura és Saville 2003-ban módosított, eredetileg White és Kerlavage (1996) által kidolgozott osztályozási redszerének megfelelõen. A funkcionális kategóriákat és a szekvenciák csoportok szerinti megoszlását a **14. ábra** szemlélteti. A besorolás elkészítése során a kontigokat a klónokkal egyenértékûnek vettük, pl. a „c” kontigot alkotó 18 feltételezett nitriláz szekvenciát (ld. **9. táblázat**) egyszer szerepeltettük a vad típusban felül-regulálódott klónok között.

Eredményeinket az **M3.** mellékletben található **9. táblázat** foglalja össze, amelyben a szekvenálásra került klónokat funkcionális kategóriák szerint soroltuk be. A táblázat nem tartalmazza azt a klónt, amely származtatott aminosav szekvenciája a higromicin foszfotranszferázzal 96%-os hasonlóságot mutatott és azokat sem, amelyekhez a BLAST program nem talált hasonlóságot az adatbázisban.

A vad típus és a Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns törzs expressziós mintázatában jelentõs különbség figyelhetõ meg. A fehérjeszintézisben részt vevõ gének sokkal nagyobb számban jelennek meg a mutánsban erõsebben megnyilvánuló szekvenciák között. A mutáns törzsben a felül-regulálódott klónok 20,4%-a a fehérjeszintézissel hozható kapcsolatba. Ez az érték a vad típusban csak 2,7%.

Ezzel szemben a Δ*FvMAT1-2-1/15* törzsben alul-regulálódott, jelfogás/jelátvitel kategóriát alkotó klónok száma négyszer több, mint az ugyanebbe a kategóriába sorolt, de a mutánsban erõsebb expressziót mutató klónoké.

A vad típusban erõteljesebben átíródó szekvenciák jelentõs hányadát (12,6%) nem tudtuk besorolni egyik kategóriába sem, amely azt jelzi, hogy a MAT1-2-1 transzkripciós faktor számos, mai tudásunk szerint ismeretlen gén átíródását pozitívan befolyásolja.



14. ábra A mutánsban és a vad típusban eltérõen expresszálódott szekvenciák osztályozása funkcionális csoportok szerint

A vad típusban (A) illetve a Δ*FvMAT1-2-1/15* törzsben (B) erõsebb expressziót mutató klónok százalékos megoszlása az adott kategóriák szerint.

4.4. A nitriláz fehérjét kódoló gén inaktiválása

A Δ*FvMAT1-2-1/15* mutánsban gyengébben expresszálódott klónok közül tizennyolc a „c” kontigot alkotja, mivel egymással részben átfedõ szekvenciákat tartalmaznak. A klónok nukleinsav

sorrendjét felhasználva a SeqManII program egy 1200 bp nagyságú fragmentumot hozott létre, amelynek származtatott aminosav szekvenciája az *A. fumigatus* nitriláz fehérjéjével 43%-os hasonlóságot mutatott (EAL84990.1). Ezen kívül a 18 szekvencia átlagában 7,67-szeres transzkripciós-szint különbséget detektáltunk a két vizsgált törzs között, de nem volt ritka a 10-szeres jelintenzitásbeli eltérés sem.

Annak érdekében, hogy többet megtudjunk a nitrilázként azonosított gén funkciójáról, a klónok szekvenciáit alapul véve *hph* kazettát tartalmazó génkiütõ konstrukciót terveztünk.

4.4.1. A nitriláz mutáns törzsek létrehozása

A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzs egy 1143 bp nagyságú darabját a cDNS klónok szekvenciái alapján tervezett nit_for – nit_rev indítószekvenciákkal felszaporítottuk, klónoztuk és szekvenáltuk. Az így kapott plazmid a nitriláz gént nem tartalmazta teljes egészében, de az *A. fumigatus* nitriláz szekvenciája alapján valószínûsíthetõ volt, hogy a gén nagy részét sikerült izolálnunk. A plazmid *Nco*I restrikciós enzimmel történt hasítását követõen a nitriláz gén középsõ 583 bp nagyságú darabját helyettesítettük az *E. coli hygB* génjét tartalmazó higromicin expressziós kazettával (*hph*). Az így kapott nit/hph plazmiddal a **3.5.** fejezetben leírt módon FGSC 7603 törzsbõl létrehozott protoplasztokat transzformáltunk. A negyvenöt vizsgált transzformánsból PCR vizsgálattal, a *hph* és a nitriláz génekre tervezett indítószekvenciákkal, 12 mintában pozitív eredményt kaptunk. Ugyanakkor valamennyi transzformáns tartalmazta a kivágott, és *hph* kazettára cserélt nitriláz szekvenciát is. Ebbõl arra következtettünk, hogy a homológ rekombinációra lehetõséget nyújtó szekvenciák túlságosan rövidek voltak a helyspecifikus rekombinációhoz, ezért a *hph* kazetta véletlenszerû pozíciókban épült be a gomba genomjába.

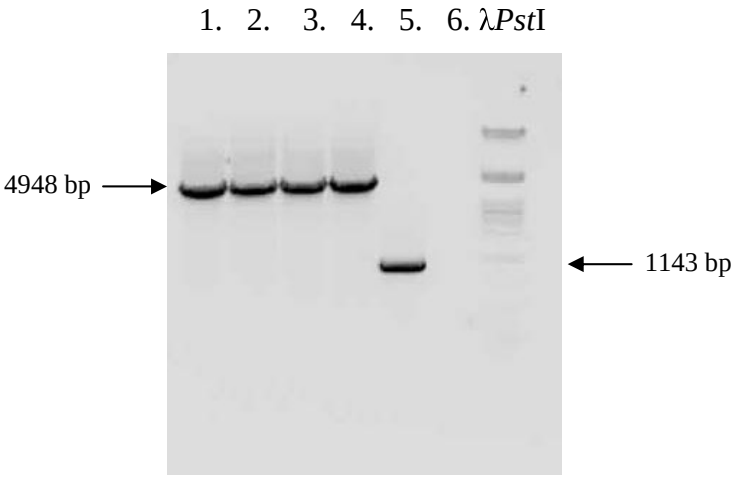
Nitriláz mutáns törzsek létrehozására nem volt más lehetõségünk: meg kellett ismernünk a nitriláz gén teljes szekvenciáját és annak környékét. Így hoztunk létre egy olyan génmegszakító konstrukciót SON-PCR segítségével, amelyben a *hph* kazettát a korábbinál jóval nagyobb nitriláz szekvenciák határolják.

4.4.2. A helyspecifikus rekombináció megtörténtének bizonyítása

A SON-PCR segítségével sikerült azonosítanunk a nitriláz gén elsõ exonjától „upstream” irányban elhelyezkedõ közel 1700 bp hosszúságú és harmadik exonjától „downstream” lévõ több mint 1400 bp nagyságú szakasz nukleotid sorrendjét. A nitriláz gén teljes szekvenciáját az EMBL adatbázisban helyeztük el, génbanki száma: DQ534528.

Az új génmegszakító konstrukció nem sokban különbözik a korábbitól, csak az 1143 bp nagyságú nitriláz szekvencia 2519 bp-ra egészült ki, de a *hph* kazettával helyettesített rész mindkét esetben megegyezik.

A helyspecifikus rekombináció megtörténtét PCR-rel igazoltuk. Elsõként a kiütött génrészletre tervezett indítószekvenciákkal (nitközép_for – nitközép_rev) végeztünk PCR-t. Ebben az esetben egyetlen transzformánst találtunk, amelyben nem kaptuk meg a vad típusban várható 538 bp nagyságú fragmentumot (Δ*nit29*). Ezt követõen nit_for – nit_rev indítószekvenciákkal végzett amplifikációval vizsgáltuk meg, hogy tartalmazza-e a *hph* kazetta szekvenciáját. A mutánssal kapott PCR termék mérete igazolta a 3,8 kb nagyságú expressziós kazetta genomba történt beépülését (**15. ábra**).



15. ábra A *hph* kazetta *F. verticillioides* genomjába történt beépülésének igazolása PCR-rel

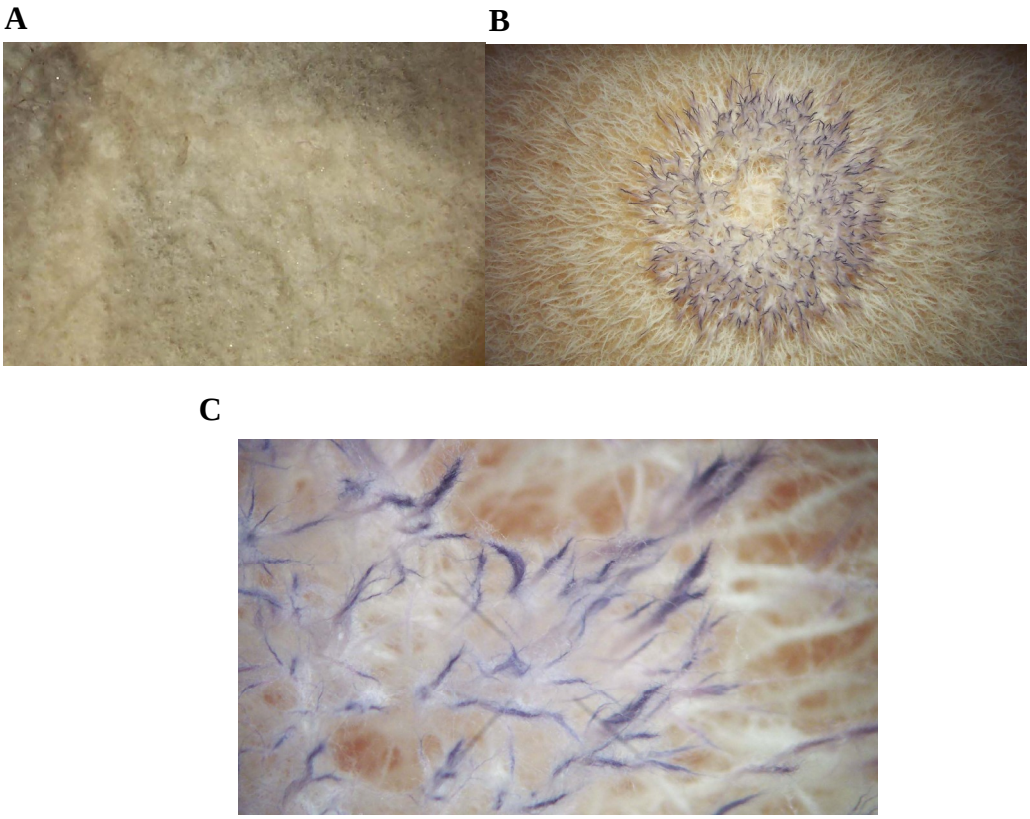
A nitriláz génre tervezett nit_for – nit_rev indítószekvenciákkal egy 1143 bp hosszúságú fragmentumot szaporítottunk fel a vad típusú törzs (5.) esetében. A higromicin rezisztens transzformáns 4 monospórázott változatánál (1-4.: Δ*nit29/1*, Δ*nit29/2*, Δ*nit29/3*, Δ*nit29/4*) a PCR termék tartalmazta a 3805 bp nagyságú *hph* kazettát is. A 6. minta a negatív kontroll.

4.4.3. A nitriláz mutáns törzs párosodási és morfológiai jellemzõi

Annak ellenére, hogy a nitriláz fehérje gombákban betöltött funkciójáról semmilyen információval nem rendelkezünk, csak feltételezhetjük, hogy a feromonérésben lehet szerepe, célszerûnek tartottuk megvizsgálni a mutáns viselkedését párosítási kísérletben az FGSC 7600 (*MAT1-1*) törzzsel.

Sárgarépás csészéken a Δ*nit29*-es mutáns és a vad típus között növekedésbeli különbséget tapasztaltunk. A mutáns törzs CA táptalajon szokatlan, sötétkék színanyagot termelt, és a vad típushoz képest gyengébben növekedett (**16. ábra**).

A két törzs (a vad típus és a Δ*nit29*) teszt törzzsel (FGSC 7600) való keresztezése során azonban nem tapasztaltunk jelentõs eltérést, a mutáns hím és nõi partnerként is funkcióképes volt. Egyetlen különbséget a termõtestek érési idejében tapasztaltunk, és akkor is csak abban az esetben, amikor a nitriláz mutáns hím partnerként szerepelt a párosítási kísérletekben. Ekkor a keresztezést követõ 14. napon már érett peritéciumokat detektáltunk. Ezzel szemben, a kontrollkeresztezésben (FGSC 7600+ – FGSC 7603>) csak a 19. napon figyelhettük meg az elsõ érett termõtesteket és aszkospórákat.



16. ábra A vad típusú (A) és a nitriláz mutáns (B) törzsek növekedésének összehasonlítása CA táptalajon, és a nitriláz mutáns színanyag-termelésének vizsgálata sztereo mikroszkópban (C)

1 g/l koncentrációban ammónium-tartarátot és 0,2 g/l koncentrációban adenint tartalmazó minimál (MM) csészéken növesztve a mutáns törzs színanyagot termelt, amelyet a vad típus esetében nem tapasztaltunk, bár növekedési intenzitásukban nem volt számottevõ különbség. Ezzel szemben, 0,5 g/l koncentrációban nátrium-nitrittel kiegészített MM csészéken a vad típus növekedésében elmaradt a mutánshoz képest, és körvonalai határozottabbak voltak. Nátrium-nitrátos csészéken nem tapasztaltunk eltérést, míg 20 g/l kálium-klorátot tartalmazó táptalajon a vad típushoz képest kiemelkedõ volt a nitriláz mutáns növekedési intenzitása.

4.5. Új tudományos eredmények

1. Higromicin foszfotranszferáz (*hph*) kazettát tartalmazó kiütõ konstrukcióval Δ*FvMAT1-2-1* null-mutáns törzseket hoztunk létre. A mutánsok semmiféle morfológiai eltérést nem mutattak a vad típushoz képest, ugyanakkor nem voltak képesek a párosodásra az FGSC 7600 (*MAT1-1*) teszt törzzsel.
2. A Δ*MAT1-2-1* mutáns és a vad típusú törzsek közötti expressziós különbségek kimutatására differenciál hibridizációt végeztünk, és 226 cDNS klónt azonosítottunk, amelyek a MAT1-2-1 transzkripciós faktor által befolyásolt génekrõl származhattak.
3. A mutánsban, illetve vad típusban felül-regulálódott szekvenciákat funkcionális csoportokba soroltuk, ezáltal körvonalaztuk a *MAT* gén inaktiválásával bekövetkezõ változásokat.
4. A legerõsebb redundanciát mutató klón (a nitriláz) *MAT1-2-1* génnel való kapcsolatának feltárására Δ*nit29* nitriláz null-mutáns törzset hoztunk létre transzformációval. Vizsgálatokat indítottunk a nitriláz gén szabályozásának és az általa kódolt fehérje funkciójának megismerésére.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Munkánk elsõdleges célja az volt, hogy a fonalas aszkomicéták párosodását és a *MAT* gének mûködésének molekuláris hátterét alaposabban megismerjük. Ennek érdekében olyan géneket kerestünk, amelyek átíródását nagymértékben (akár serkentve, akár gátolva) befolyásolják a *MAT* gének által kódolt transzkripciós faktorok.

A MAT transzkripciós faktorok sejttípus specifikus gének expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatára a *F. verticillioides* FGSC 7603 törzsbõl irányított génkiütéssel Δ*FvMAT1-2-1* null-mutánsokat hoztunk létre. A vad típusú és mutáns törzsek expressziós mintázatában megnyilvánuló különbségek kimutatására kezdetben cDNS-AFLP módszert használtunk, és Northern hibridizációval próbáltuk alátámasztani a jelintenzitásbeli különbségek valódiságát. Azonban a kiválasztott 15 differenciáló fragmentummal végzett Northern hibridizációs kísérlet csak hat esetben igazolta a cDNS-AFLP-ben kapott expressziós különbségeket.

A cDNS-AFLP kísérleteink sikertelenségének okát nem ismerjük pontosan. Mao és munkatársai (2004) is arra a következtetésre jutottak, hogy a cDNS-AFLP és a Northern hibridizációs vizsgálatok eredményei nem minden esetben egyeznek meg. Problémát jelentett, hogy akrilamid gélen vizuálisan kellett meghatároznunk, melyik az a fragmentum, amelyik csak a vad típusban vagy csak a mutánsokban jelenik meg. Továbbá, a cDNS-AFLP PCR alapú technika, ezért a mennyiségi korrelációk megõrzése problémás, pedig fontos szerepe van annak, hogy a különbözõ eredetû cDNS mintákból minél inkább kiegyenlített mennyiségeket vigyünk fel a gélre.

A cDNS-AFLP-vel kapott eredmények azonban azt igazolják, hogy jó úton indultunk el. Erre utal a higromicin foszfotranszferáz génnek a mutánsban történt kizárólagos megjelenése is. Továbbá, az általunk azonosított *Eco*RI-GC/*Mse*I-AG1 klón a *S. pombe* cullin-1 homológjával 44%-os hasonlóságot mutatott. A cullin-1 fehérje az SCF ubikvitin ligáz komplex része, amelyet még további két „F-box/WD-repeat” fehérje alkot. A MAT TF-eknek az ubikvitinek közremûködésével zajló fehérje degradációs folyamatokra gyakorolt hatását Lee és munkatársai (2006) is leírták. Az egyik általuk azonosított önsteril *G. zeae* Δ*MAT1-2* törzsben alul-reguláldott gén nukleotidsorrendje nagyfokú hasonlóságot mutatott az *A. nidulans* COP9 szignaloszóma 4-es alegységét kódoló gén szekvenciájával. Ez a fehérje az *A. nidulans* ivaros folyamatainak egyik kulcsfontosságú szabályozója (Busch et al. 2003), *Drosophila*ban pedig a cullin-függõ ubikvitin ligáz mûködésének irányítója, az összetett jelátviteli útvonalak integrátora (Oron et al. 2002). Egy másik, szintén a Δ*MAT1-2* törzsben a vad típushoz képest gyengébb expressziót mutató gén a *S. pombe* „F-box/WD-repeat protein”-jével mutatott hasonlóságot.

Újabb akadályba akkor ütköztünk, amikor a cDNS-AFLP-bõl származó klónokat tartalmazó filtereket elkészítettük, és azokat jelölt, vad típusú és mutáns cDNS fragmentumokhoz próbáltuk

hibridizáltatni. A hollandiai Plant Research International-ben, ahol ezeket a kísérleteket végeztük, részletes módszert dolgoztak ki a HD filterek készítésére és az azt követõ hibridizációs eljárásra. Mi azonban a cDNS-AFLP fragmentumok klónozásához egészen más vektort, illetve gazdasejtet használtunk. Lehetséges, hogy a baktériumban szaporodó plazmidba épített fragmentumok mennyisége nem érte el azt a kritikus szintet, amely ahhoz szükséges, hogy mind vizuálisan, mind számítógép segítségével kiértékelhetõ jelet kaphassunk a hibridizáció során. Talán más konstrukcióval, más gazdasejtben ez nem okozott volna problémát.

A cDNS-AFLP klónok vizsgálatával egy idõben a MAT transzkripciós faktorok célgénjeinek azonosítására differenciál hibridizációs kísérleteket indítottunk, amelyekhez cDNS könyvtárakat hoztunk létre a vad típusú és a Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns törzsbõl, majd hibridizáltattuk mind a mutáns, mind pedig a vad típus cDNS klónjaiból készített radioaktív próbákkal. A differenciál hibridizálással kapott eredményeink azt mutatják, hogy a *MAT1-2-1* gén irányított inaktiválása a sejtbiológia egészen eltérõ területein mûködõ gének transzkripciójára gyakorol hatást. A klónok 57,7%-a a vad típusban, 42,3%-uk pedig a mutánsban mutatott erõteljesebb expressziót, ami arra utal, hogy a célgén funkciójától függõen a *MAT1-2-1* génnek pozitív és negatív szabályozó szerepe is lehet. Hasonló expressziós mintázatot kaptak Güldener és munkatársai (2006) különbözõ tenyésztési körülményeket használva *F. graminearum* „microarray” kísérletben. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy a klónok funkcionális csoportokba történõ besorolását kizárólag a Sacadura és Saville (2003) által kidolgozott kategorizálásnak megfelelõen végeztük.

Annak ellenére, hogy a génfunkciókat még nem vizsgáltuk, néhány klón, amelyeknek transzkripciós szintje a *FvMAT1-2-1* gén kiiktatását követõen nagymértékben csökkent, mindenképpen említést érdemel.

A *F. verticillioides* feltételezett nitriláz génjére a MAT1-2-1 TF kétségtelenül hatást gyakorol. Ennek bizonyítéka, hogy a „c” kontigot alkotó (**9. táblázat**), nitriláz fehérjét kódoló fragmentumokat kivételesen nagy számban azonosítottuk a Δ*FvMAT1-2-1/15* mutánsban gyengébben expresszálódott klónok között, továbbá a mutáns és a vad típus között igen jelentõs transzkripcióbeli eltérést tapasztaltunk. A nitrilázok csoportját összesen 12 enzimcsalád alkotja; amidázok, N-acetiltranszferázok, karbamilázok és nitrilázok. A meglehetõsen heterogén csoport egyik alcsaládjába tartozó fehérjéknek fordított amidáz aktivitásuk van. Ezekrõl a fehérjékrõl ismeretes, hogy jelmolekulák bioszintézisében vesznek részt (Brenner 2002). Arról azonban nem rendelkezünk információval, hogy mi lehet a nitrilázok ezen típusának gombákban betöltött szerepe. N-acetiltranszferáz aktivitásuknak köszönhetõen elvben részt vehetnek olyan lipofil addícióban, ami az érett feromon elõállításához szükséges a gombákban.

A 148. klón szekvenciája alapján a MAT1-2-1 TF egy másik lehetséges célgénjét sikerült azonosítanunk. Ez a klón egy hosszabb részletét tartalmazza a *carO* génnek, amelyet a közelmúltban írtak le a *F. verticillioides* rokonában, a *Fusarium fujikuroi*ban (Prado et al. 2004). A CarO fehérje az opszinok családjába tartozik, és jelentõs hasonlóságot mutat az *Leptospheria maculans* ops és a *N. crassa* nop-1 fehérjéivel. Az opszinok membrán fotoreceptorok, amelyek nélkülözhetetlenek az algák (Ridge 2002) és az állatok (Menon et al. 2001) fényérzékelésében. Ezeknek a fehérjéknek a gombák biológiai folyamataiban betöltött szerepének megismerése további vizsgálatokat igényel. A *carO* gén inaktiválása nem okozott semmiféle fenotípusbeli változást, és a karotinoid bioszintézis fotoindukciójára sem volt hatással (Prado et al. 2004). A fonalas gombák igénylik a fényt a párosodáshoz és az ivaros morfogenezishez, ezen kívül az ivartalan spórák képzõdése is fényfüggõ a legtöbb gomba esetében. Mind az ivarosan, mind az ivartalanul szaporodó *Fusarium* fajokban folyamatosan termelõdõ MAT1-2-1 transzkripciós faktor (Kerényi et al. 2004) fokozhatja a fényindukciót az opszinhoz hasonló fehérjéket kódoló gének expressziójának serkentésével. Ez a stimuláló hatás igen elõnyös lehet nem kielégítõ fényviszonyok között, aminek a gombák természetes élõhelyeiken gyakran ki vannak téve.

Más géneket is azonosítottunk a Δ*FvMAT1-2-1* mutánsban alul-regulálódott klónok között, amelyek feltehetõen szintén fény által szabályozott folyamatokban résztvevõ fehérjéket kódolnak. A 155. klón a *Magnaporthe grisea* WC-2 fehérjéjével mutatott nagyfokú hasonlóságot. A WC-2 fehérje a WC-1-gyel részt vesz az úgynevezett „white collar complex” (WCC) képzésében. A WCC a MAT1-2-1-hez hasonlóan szintén egy transzkripciós faktor, amely kék fény-függõ folyamatokat közvetít *N. crassa*ban, mint amilyen a karotenogenezis, a konídiumképzõdés vagy az ivaros struktúrák fototropizmusa (Linden et al. 1997). A 132. klón a calcium/calmodulin-függõ protein kinázzal (CAMK-1) mutatott jelentõs hasonlóságot. A WCC és a CAMK-1 között egy bonyolult, sokrétû kölcsönhatás áll fenn. A WCC aktiválja az *frq* transzkripcióját, amely a „FERQUENCY” (FRQ), 24 órás biológiai ritmusért felelõs fehérjét kódolja. Ez a fehérje szükségszerûen gátolja az *frq* átíródását, pozitív visszacsatolást valósítva meg a WC fehérjék szintjén (Lee et al. 2000). A 24 órás biológiai ritmus fenntartását transzlációt követõ mechanizmusok is segítik, a már említett fehérjék foszforilálásán keresztül. Az FRQ foszforilálását elsõsorban a CAMK-1 végzi, amelynek expresszióját pedig (eredményeink szerint) a MAT1-2-1 TF szabályozza.

Egyéb, a mutánsban kisebb mértékben megnyilvánuló szekvenciák (143. és 133. klón) egy sejtciklust gátló, illetve egy endogén biológiai óra által szabályozott fehérjével (CCG-6) mutattak hasonlóságot. A *Cryptococcus neoformans* egyik sejtciklust gátló fehérjéjérõl ismeretes, hogy egy feromonokkal összefüggésben lévõ fehérje hatása alatt áll, míg a *N. crassa*ból ismert CCG-6 a biológiai ritmus 24 órás szabályozásában tölt be fontos szerepet (Bell-Pedersen et al. 1996).

A mutáns törzsben szintén gyengébben expresszálódott két esdC („essential for sexual development C”) homológ (134. és 135. klón), amelyrõl tudjuk, hogy az *A. nidulans* ivaros szaporodásához nélkülözhetetlen (Nowrousian et al. 2005).

Korábbi tanulmányok (Verna és Ballester, 1999) rávilágítottak arra, hogy a *S. cerevisiae*ben a párosodási típus gének szerepet játszanak a sejtfal épségének fenntartásában is. A 122. klón egy feltételezett ß-1,3-glükán kötõ fehérjével adta a legmagasabb homológiát, és azonosítottunk egy feltételezett sejtfal adhéziós fehérjét kódoló gént is (124. klón). Ez a fehérje a *C. albicans* sejtfal integritásának fenntartásához és a hatékony párosodáshoz szükséges. Mindkét klón (122. és 124. klón) a Δ*FvMAT1-2-1* mutáns törzsben a vad típushoz képest gyengébb expressziót mutatott.

A közelmúltban két cikk jelent meg hasonló témakörben. Az egyikben Nowrousian és munkatársai (2005) *Sordaria macrospora* fejlõdésbeli mutánsainak génexpressziós mintázatát hasonlították össze a vad típussal. A kísérletben *N. crassa* cDNS „microarray”-hez három „pro” mutánsból és a vad típusú törzsbõl készített RNS próbát hibridizáltattak. Annak ellenére, hogy ezek a „pro” mutánsok eltérõ génjeikben hordozták a mutációt, fejlõdésük egyöntetûen a protoperitécium képzõdésének stádiumában állt meg. Ezért a mutánsok vizsgálata az ivaros szaporodásban résztvevõ gének azonosítását tette lehetõvé. Egy másik tanulmányban (Lee et al. 2006) a *G. zeae* (*F. graminearum*) egyik *MAT1-2* deléciós mutánsában alul-regulálódott géneket határoztak meg a növekedési stádium azon részében, amikor a vad típusban bõséges peritécium-képzõdés zajlott.

A három munka (beleértve a miénket is) részben átfedõ eredményeket tartalmaz, amely nem meglepõ, hiszen a változások minden esetben a gombák ivaros fejlõdési szakaszát érintették.

A két korábbi tanulmány azt a fiziológiai állapotot vizsgálta, amikor az ivaros fejlõdés motorja éppen beindul. Ezzel szemben mi a *MAT1-2-1* gén szabályozó hatásának alaposabb megismerésére koncentráltunk azáltal, hogy a MAT géntermék vegetatív növekedés során betöltött szerepét próbáltuk nyomon követni a növekedés korai stádiumában. Elképzelésünk szerint a miénkhez hasonló megközelítés segíthet megérteni a konstitutívan átíródó párosodási típus gének szerepét a vegetatív fejlõdés szakaszában, illetve a csak ivartalanul szaporodó gombákban.

A fent említett különbségek ellenére néhány gént érdemes kiemelnünk, mivel egyaránt elõfordultak a mi munkánkban és egyik vagy másik, elõbb említett kísérletben is. Az opszin-szerû fehérje és egy feltételezett MAP kináz szekvenciáját hozzánk hasonlóan Lee és munkatársai (2006) is azonosították a *G. zeae* Δ*MAT1-2* deléciós mutáns törzsében. Az esdC homológ a *S. macrospora* „pro” mutánsában (Nowrousian et al. 2005) és a *F. verticillioides* Δ*FvMAT1-2-1* mutánsában is gyengébben expresszálódott. Hasonló egybeesést tapasztaltunk több más klón, mint például az alkohol dehidrogenáz (8. klón), egy metiltranszferáz (86. klón), az EFB-szerû transzkripciós faktor („i” kontig), egy feltételezett elongációs faktor (174. klón), egy GTP-t kötõ fehérje (145. klón), egy feltételezett α-glükozidáz („b” kontig) és a rasp f7 allergén („k” kontig) esetében is. Ezen klónok

közül néhányan feltehetõen részesei az ivaros folyamatoknak (pl. opszin, MAP kináz, esdC), de a többi szekvenciával kapcsolatban nem ismerünk olyan irodalmi adatot, ami alátámasztaná hasonló funkciójukat. Ugyanakkor néhány gén, mint a mitokondriális ATP szintázt, a WC-2-t, egy metiltranszferázt és néhány riboszóma fehérjét kódoló szekvencia eltérõen expresszálódott egyik vagy másik tanulmányban azt jelezve, hogy a MAT1-2-1 TF számos gént befolyásol növekedési, illetve fejlõdési állapottól függõ módon.

Mivel a feromon prekurzor és a feromon receptor gének a MAT1-2-1 TF igazolt célpontjai, kísérleteink kezdetén mi magunk is feltételeztük, hogy e gének fragmentumait megtaláljuk majd a mutánsban alul-reguláldott klónok között. Ilyen jellegû szekvenciákat azonban nem sikerült azonosítanunk, mint ahogyan Leenek és munkatársainak (2006) sem a *G. zeae* Δ*MAT1-2* null-mutánssal végzett kísérletükben. Ezzel szemben a *S. macrospora* feromon prekurzor génjei (*ppg1* és *ppg2*) eltérõen expresszálódtak a vad típusban és a „pro” mutánsban, de meglepõ módon erõsebben nyilvánultak meg a termõtest képzésére nem képes törzsekben (Nowrousain et al. 2005).

A feromon prekurzor és a feromon receptor gének hiánya a vad típusban szignifikánsan erõsebb intenzitást mutató klónok között azzal magyarázható, hogy ezek a gének a növekedés kezdeti stádiumában még nem mûködnek olyan intenzitással, hogy transzkriptumaik jól észlelhetõk legyenek (az RNS izoláláshoz 5 napon keresztül növesztett gombamicéliumot használtunk), illetve oka lehet még a párosodáshoz szükséges partner hiánya is.

A legígéretesebb cDNS klónok, amelyek redundánsan fordultak elõ és/vagy erõs expressziót mutatnak a vad típusban, a feromon – feromon-receptor bioszintézissel vagy akár a fény által indukált sejtbiológiai változásokkal hozhatók kapcsolatba, mindenképpen megérik a kitüntetõ figyelmet. Ezek a gének minden valószínûség szerint közvetve vagy közvetlenül részt vesznek az ivaros folyamatokban. Megjelenésük a legfõbb bizonyíték arra nézve, hogy az általunk azonosított gének többsége, amelyek szerepe mai ismereteink szerint nehezen határozható meg, szintén reális eséllyel tekinthetõk a MAT1-2-1 transzkripciós faktor célgénjeinek. Érdemes lenne megvizsgálni (mint ahogy elkezdtük a nitriláz esetében): milyen következményekkel járhat ezen gének kiiktatása a gomba ivaros szaporodására, morfogenetikai változásaira nézve. Vagy akár olyan funkciók is felderíthetõk, amelyek választ adnának arra a kérdésre, hogy miért nem tûnt el a *MAT* gén azokból a gombákból, amelyek a legjobb tudomásunk szerint nem élnek az ivaros reprodukció lehetõségével.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fonalas aszkomicétákban a párosodási típus egyetlen lókusz két idiomorfjának (*MAT1-1* és *MAT1-2*) ellenõrzése alatt áll. A *MAT* gének által kódolt transzkripciós faktorok sejttípus-specifikus gének expresszióját serkentve vagy gátolva szabályozzák az ivaros fejlõdési szakaszt azáltal, hogy a párosodáshoz szükséges jelcserében és a morfogenetikai módosulások irányításában vesznek részt. Ezen kívül, szerepük lehet az ivaros szaporodástól független folyamatokban is, mivel azokban a *Fusarium* fajokban is mûködõképes, konstitutívan átíródó párosodási típus gének találhatók, amelyekben ivaros szaporodást még nem figyeltek meg.

A *MAT* gének által kódolt transzkripciós faktorok feltételezett célgénjeinek azonosítására a *Fusarium verticillioides* FGSC 7603 törzsbõl Δ*FvMAT1-2-1* null-mutánsokat állítottunk elõ higromicin foszfotranszferáz gént tartalmazó kiütõ konstrukcióval történt transzformációval. Négy transzformáns esetében bizonyítottuk a kettõs rekombináció megtörténtét, amely 8%-os rekombinációs gyakoriságnak felelt meg. A kiütés sikerét PCR vizsgálatokkal, Southern és Northern hibridizációval vizsgáltuk, majd génexpressziós különbségek kimutatására szolgáló cDNS-AFLP kísérleteket indítottunk. A cDNS-AFLP-ben kapott jelintenzitásbeli különbségek valódiságát Northern hibridizációval ellenõriztük, de a legtöbb esetben nem sikerült megerõsítenünk az eltéréseket. Ugyanakkor a módszerválasztás helyességét igazolta egy értékesnek tûnõ klón megjelenése, amelynek aminosav szekvenciája a *Schizosaccharomyces pombe* cullin-1 homológjával mutatott 44%-os hasonlóságot. Ez a fehérje részt vesz egy ubikvitin ligáz komplex felépítésében, amely kulcsfontosságú szerepet tölt be ubikvitinek közremûködésével zajló fehérje degradációs folyamatokban, amelyekben a MAT transzkripciós faktorok is közremûködnek.

Annak érdekében, hogy a *MAT* gén kiütésével elõidézett, génexpressziós szinten megnyilvánuló változásokat differenciál hibridizációval detektálni tudjuk, a vad típusú és a mutáns törzsekbõl cDNS könyvtárakat hoztunk létre, majd a klónokat tartalmazó nagy sûrûségû filtereket radioaktívan jelölt mutáns és vad típusú cDNS próbákkal hibridizáltattuk.

Összesen 264 klónt találtunk, amelyek a Δ*FvMAT1-2-1/15* mutánsban és a vad típusban szignifikáns jelintenzitásbeli eltérést mutattak. E klónok nukleotid szekvenciáit adatbázisokban tárolt szekvenciákkal hasonlítottuk össze az NCBI Blast Service segítségével és a SeqManII programmal 14 kontigot határoztunk meg. A klónok 57,7%-a vad típusban, 42,3%-uk a mutáns törzsben regulálódott felül, igazolva a MAT TF-ek pozitív és negatív szabályozó szerepét. 227 gént azonosítottunk, amelyek közül 204, ismert fehérjékkel hasonlóságot mutató klónt funkcionális csoportokba soroltunk Sacadura és Saville 2003-ban módosított, eredetileg White és Kerlavage által kidolgozott osztályozásnak megfelelõen.

A vad típus és a Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns törzs expressziós mintázatában jelentõs különbséget tapasztaltunk. A fehérjeszintézisben részt vevõ gének sokkal nagyobb számban jelentek meg a mutánsban erõsebben megnyilvánuló szekvenciák között. A mutáns törzsben a felül-regulálódott klónok 20,4%-a a fehérjeszintézissel volt kapcsolatba hozható. Ez az érték a vad típusban csak 2,7%. Ezzel szemben a Δ*FvMAT1-2-1/15* törzsben alul-regulálódott, jelfogás/jelátvitel kategóriát alkotó klónok száma négyszer több volt, mint az ugyanebbe a kategóriába sorolt, de a mutánsban erõsebb expressziót mutató klónoké.

A vad típusban erõteljesebben átíródó szekvenciák jelentõs hányadát (12,6%) nem tudtuk besorolni egyik kategóriába sem, amely azt jelzi, hogy a MAT1-2-1 transzkripciós faktor számos, mai tudásunk szerint ismeretlen gén átíródását pozitívan befolyásolja. A nem osztályozott klónok aránya a vad típusban alul-regulálódott klónok között 3,2%.

Számos redundánsan elõforduló klónt azonosítottunk. Szekvencia hasonlóságokat alapul véve több génrõl nagy valószínûséggel állíthatjuk, hogy részt vesznek az ivaros szaporodásban, mások szerepe azonban tisztázatlan maradt. Semmi esetre sem szeretnénk kijelenteni, hogy valamennyi általunk, az expressziós analízist követõen kapott klón minden kétséget kizáróan a MAT1-2-1 TF szabályozása alatt áll. Óvatosságunk legfõbb oka az, hogy az RNS tisztításhoz felhasznált gombaszövedéket különbözõ sejtek alkották: differenciálódott micéliumsejtek, konídiumok, fialidok és konídiumtartók, amelyek belsõ genetikai programjában jelentõs eltérések lehettek, ezáltal befolyásolhatták a mutáns és a vad típusú törzs expressziós mintázatát.

Több, ismert génnel nagyfokú hasonlóságot mutató szekvenciát érdemes további vizsgálatnak alávetni. A redundánsan elõforduló klónok közül a nitrilázt választottuk, mivel 18 alkalommal azonosítottuk a vad típusban felül-regulálódott klónok között. A *FvMAT1-2-1* génnel való kapcsolatának feltárására nitriláz null-mutáns törzset hoztunk létre transzformációval, és megkezdtük a transzformáns törzs vizsgálatát. A Δ*nit29* mutáns morfológiai eltérést mutatott a vad típushoz képest, ugyanakkor a teszt törzzsel végzett keresztezés során nem tapasztaltunk jelentõs változást.

Különbözõ *Fusarium* fajokra kifejlesztett transzformációs és géninaktivációs rendszerek közelmúltban mutatott lendületes fejlõdésének köszönhetõen a MAT transzkripciós faktorok célgénjeinek a párosodásban, vagy a gomba életciklusának más területein betöltött szerepe fokozatosan megismerhetõvé válik.

SUMMARY

In filamentous ascomycetes mating type is under the control of a single mating type locus (*MAT*) with two functional idiomorphs, named *MAT1-1* and *MAT1-2*. Transcription factors, encoded by the *MAT* genes regulate the sexual development by activating and repressing the expression of cell type-specific genes involved in cellular communication and morphogenetic changes needed for mating. *Fusarium* species with no known sexual stage also have structurally intact, functional mating type genes, therefore the MAT products may also regulate other types of genes not involved directly in the mating process.

In order to identify putative target genes of the *MAT*-derived transcription factors, Δ*MAT1-2-1* knock out mutants were produced in *Fusarium verticillioides* strain FGSC 7603 by transformation using a *hph* (*hygromycin phosphotransferase*) cassette. Double recombinations were demonstrated in four transformants indicating a recombination frequency of eight per cent. The promising transformants were studied in PCR experiments, Southern and Northern hybridizations.

cDNA-AFLP experiments were started to analyze the differences in transcription profiles of the mutant and the wild type. The differences in signal intensities generated in cDNA-AFLPs were tested by Northern hybridizations, but in most cases these differences could not be confirmed. However, the appearance of an interesting clone in these experiments gave support for the usability of the cDNA-AFLP technique. The sequence of this clone showed 44 % homology to the cullin-1 homologue of *Schizosaccharomyces pombe*. This protein plays a significant role in forming the ubiqutin ligase complex that is involved in protein degradation processes mediated by ubiquitins. The MAT transcription factors also take part in these processes.

In order to detect further differences at transcriptional level by differential display, cDNA libraries were prepared from both strains. Random clones, representing the total genome of the two strains, were transferred to high density filters and hybridized to radioactive probes prepared from cDNAs of the mutant and the wild type. Under such conditions, differences in signal intensities indicate transcriptional differences between the two strains.

Altogether 264 clones gave significantly different signal intensities in the wild type and the Δ*FvMAT1-2-1* mutant. The nucleotide sequences of the clones were compared to database sequences using the NCBI Blast Service and 48 clones were assembled by the SeqMan II program into 14 multiple-sequence contigs. 57.7% of the clones were down-regulated in the mutant, indicating that the MAT1-2-1 transcription factor positively affected these tagged sequences. On the other hand, this gene product also exerted a negative regulatory function on a set of other genes: 42.3% of the sequences were found to be up-regulated in the mutant (down-regulated in the wild

type). 204 clones, which gave hits to known proteins were assigned to functional categories following the classification system developed by White and Kerlavage with modifications proposed by Sacadura and Saville.

Significant differences were observed in expression patterns between the wild type and the Δ*FvMAT1-2-1* mutant. Clones involved in protein synthesis occurred more frequently among the sequences, up-regulated in the mutant (20.4% as compared to 2.7% in the down-regulated category). On the other hand, among the sequences, down-regulated in the mutant, genes belonging to cell signalling and communication were especially frequently tagged. Furthermore, a significant portion (12.6%) of unclassified sequences was found in this set of clones, indicating that the MAT1-2-1 product positively affects a number of genes, which are completely unknown at the present stage of our knowledge. This unclassified category amounted only 3.2% among the down-regulated sequences.

Based on sequence homologies, some of the tagged genes are likely to be involved in sexual development, whereas the role of others remained unclear. In no way we would like to state that all targets of the putative MAT1-2-1 protein were found in these experiments, moreover it may also happened, that some of the sequence tags were not true targets of this transcription factor. Our experiments, although carefully designed, were by necessity not fully satisfactory: the fungal material we used for RNA extraction was a mixture of cells, comprised by differentiated mycelial cells, conidiophores, phialides, conidia, germ tubes and this might cause some discrepancies. The internal genetic program of these different cells is necessarily varied and this variation may contribute to the transcriptional differences we found when compared the wild type and its *ΔFvMAT1-2-1* mutant.

Due to their significant similarities to other known genes, many of these sequences are promising candidates for future investigations. Nitrilase clones were especially redundant, appeared 18 times among the clones upregulated in the wild type; the putative nitrilase encoding gene of *F. verticillioides* was therefore chosen for further experiments. In order to study its relation to the *FvMAT1-2-1* gene nitrilase knock out mutant was prepared by transformation. The Δ*nit29* mutant showed morphological aberrations, but its mating behaviour was not significantly altered.

With the recent development of suitable transformation and gene inactivation systems for a number of *Fusarium* species, the specific roles of the tagged sequences in mating and/or other aspects of the fungal life cycle can be uncovered in the near future.

MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

Abdallah M. Y., Al-Rokibah A., Moretti A. and Mule G. (2000): Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease* 84:321-324.

Alexopoulos C. J. and Mims C. W. (1979): Introductory Mycology. Third Edition. John Wiley & Son, New York

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid. Res.* 25:3389-3402.

Antal Z., Rascle C., Fevre M. and Bruel C. (2004): Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Curr. Genet.* 46:240-246.

Arie T., Christiansen S. K., Yoder O. C. and Turgeon B. G. (1997): Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved *MAT* HMG box. *Fungal Genet. Biol.* 21:118-130.

Arie T., Kaneko I., Yoshida T., Noguchi M., Nomura Y. and Yamaguchi I. (2000): Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:1330-1339.

Arnaise S., Debuchy R. and Picard M. (1997): What is a bona fide mating-type gene? Internuclear complementation of mat mutants in *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 256:169-178.

Astell C. R., Ahlstrom-Jonasson L., Smith M., Tatchell K., Nasmyth K. A. and Hall B. D. (1981): The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 27:15-23.

Bell-Pedersen D., Shinohara M. L., Loros J. J. and Dunlap J.C. (1996): Circadian clock-controlled genes isolated from *Neurospora crassa* are late night-to early morning-specific. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:13096-13101.

Bistis G. N. (1983): Evidence for diffusible, mating-type-specific trichogyne attractants in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* 7:292-295.

Bistis G. N. (1998): Physiological heterothallism and sexuality in Euascomycetes: a partial history. *Fungal Genet. Biol.* 23:213-222.

Bistis G. N. and Raper J. R. (1963): Heterothallism and sexuality in *Ascobolus stercorarius*. *Am. J. Bot.* 50:880-891.

Brakhage A. and Turner G. (1995): Biotechnical genetics of antibiotic biosynthesis. In: Kück U (ed) The Mycota. II. Genetics and biotechnology. Springer, Berlin Heilderberg New York, pp 263-285.

Brenner C. (2002): Catalysis in the nitrilase superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:775-782.

Britz H., Coutinho T. A., Wingfield M. J., Marasas W. F., Gordon T. R. and Leslie J. F. (1999): *Fusarium subglutinans* f. sp. *Pini* represents a distinct mating population in the G*ibberella fujikuroi* species complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1198-1201.

Busch S., Eckert S. E., Krappmann S. and Braus G. H. (2003): The COP9 signalosome is an essential regulator of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 49:717-730.

Cappellini R. and Peterson J. L. (1965): Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57:962-966.

Chaisrisook C. and Leslie J. F. (1990): Genetic diversity within populations of *Fusarium* section *Liseola* from corn and sorghum in Kansas. (Abstr.) *Phytopathology* 80:1042.

Cisar C. R. and TeBeest D. O. (1999): Mating system of the filamentous ascomycete, *Glomerella cingulata*. *Curr. Genet.* 35:127-133.

Coppin E. and Debuchy R. (2000): Co-expression of the mating-type genes involved in intranuclear recognition is lethal in *Podospora anserina*. *Genetics* 155:657-669.

Coppin E., Debuchy R., Arnaise S. and Picard M. (1997): Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:411-428.

Correll J. C., Klittich C. J. R. and Leslie J. F. (1987): Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640-1646.

Debuchy R. (1999): Internuclear recognition: A possible connection between euascomycetes and homobasidiomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 27:218-223.

Debuchy R., Arnaise S. and Lecellier G. (1993): The *mat-* allele of *Podospora anserina* contains three regulatory genes required for the development of fertilized female organs. *Mol. Gen. Genet.* 241: 667-673.

Debuchy R. and Coppin E. (1992): The mating-types of *Podospora anserina*: functional analysis and sequence of fertilization domains. *Mol. Gen. Genet.* 233:133-121.

Dempsey D. A., Wobbe K. K. and Klessig D. F. (1993): Resistance and susceptible responses of *Arabidopsis thaliana* to turnip crinkle virus. *Phytopathology* 83:1021-1029.

Desjardins A. E., Munkvold G. P., Plattner R. D. and Proctor R. H. (2002): FUM1 – a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15:1157-1164.

Desjardins A. E., Plattner R. D. and Nelson P. E. (1997): Production of fumonisin B_1 and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1838-1842.

Dodge B. O. (1920): The life-history of *Ascobolus magnificus*: origin of the ascocarp from two strains. *Mycologia* 12:115-134.

Dugan F. M., Hellier B. C. and Lupien S. L. (2003): First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathol.* 52:426.

Dyer P. S., Ingram D. S. and Johnstone K. (1992): The control of sexual morphogenesis in the ascomycotina. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* 67:421-458.

Fandohan P., Hell K., Marasas W. F. O. and Wingfield M. J. (2003): Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 2:570-579.

Ferreira A. V. B., Saupe S. and Glass N. L. (1996): Transcriptional analysis of the *mt A* idiomorph of *Neurospora crassa* identifies two genes in addition to *mt A-1*. *Mol. Gen. Genet.* 250:767-774.

Glass N. L., Grotelueschen J. and Metzenberg R. L. (1990a): *Neurospora crassa A* mating-type region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4912-4916.

Glass N. L., Metzenberg R. L. and Raju N. B. (1990b): Homothallic *Sordariaceae* from nature: The absence of strains containing only the *a* mating type sequence. *Exp. Mycol.* 14:274-289.

Glass N. L., Vollmer S. J., Staben C., Grotelueschen J., Metzenberg R. L. and Yanofsky C. (1988): DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science* 241:570-573.

Güldener U., Seong K.-Y., Boddu J., Cho S., Trail F., Xu J.-R., Adam G., Mewes H.-W., Muehlbauer G. J. and Kistler H. C. (2006): Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genet. Biol.* 43:316-325.

Herskowitz I. (1988): Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52:536-553.

Herskowitz I. (1989): A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* 342:749-757.

Herskowitz I., Rine J. and Strathern J. (1992): Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, ed. Jones E. W., Pringel J. R. and Broach J. R., 2:583-656. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.

Hicks J., Strahern J. N. and Klar A. J. S. (1979): Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 282:478-483.

Hornok L., Békési P., Giczey G., Jeney A., Nicholson P., Parry D., Ritieni A. and Xiangming X. (2005): Kalászfuzáriózis-kórokozók elõfordulása és a mikotoxin-szennyezõdés mértéke magyarországi õszibúza-állományokban 2001-2004 között. *Növénytermelés* 54: 217-235.

Hsieh W. H., Smith S. N. and Snyder W.C. (1977): Mating groups in *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 67:1041-1043.

Kelly M., Burke J., Smith M., Klar A. and Beach D. 1988: Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J.* 7:1537-1548.

Kerényi Z., Moretti A., Waalwijk C., Oláh B. and Hornok L. (2004): Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4419-4423.

Kerényi Z., Zeller K., Hornok L. and Leslie J. F. (1999): Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4071-4076.

Kim H. and Borkovich K. A. (2004): A pheromone receptor gene, *pre-1*, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 52:1781-1798.

Kim H., Metzenberg R. L. and Nelson M. A. (2002): Multiple function of *mfa-1*, a putative pheromone precursor gene of *Neurospora* crassa. *Eukaryot. Cell* 1:987-999.

Klar A. J. S. (1992): Fission yeast cell type. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, ed. Jones E. W., Pringel J. R. and Broach J. R., 745-777. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.

Klittich C. J. R. and Leslie J. F. (1988): Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118:417-423.

Kominami K., Ochotorena I. and Toda T. (1998): Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo-complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin-1-F-box) ubiquitin ligase. *Genes. Cells* 3:721-735.

Kriek N. P. J., Kellerman T. S. and Marasas W. F. O. (1981a): A comparative-study of the toxicity of *Fusarium-verticillioides* (=*F-moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J. Vet.* 48:129-131

Kriek N. P. J., Marasas W. F. O. and Thiel P. G. (1981b): Hepato- and cardiotoxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) isolates from southern African maize. *Food Cosmet. Toxicol.* 19:447-456.

Kronstad J. W. and Staben C. (1997): Mating type in filamentous fungi. *Annu. Rev. Genet.* 31:245-276.

Kuhlman E. G. (1982): Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* Section *Liseola*. *Mycologia* 74:759-768.

Lee K., Loros J. J. and Dunlap J. C. (2000): Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science* 289:107-110.

Lee S. H., Lee S., Choi D., Lee Y. W. and Yun S.H. (2006): Identification of the down-regulated genes in a mat1-2-deleted strain of *Gibberella zeae*, using cDNA subtraction and microarray analysis. *Fungal Genet. Biol.* 43:295-310.

Leslie J. F. (1991): Mating Populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*). *Phytopathology* 81:1058-1060.

Leslie J. F. (1995): *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Can. J. Bot.* 73:282-291.

Leslie J.F. (1999): Genetic status of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Plant Pathol. J.* 15:259–269.

Leslie J. F. and Klein K. K. (1996): Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics* 144:557-567.

Leslie J. F. Marasas W. F., Shephard G. S., Sydenham E. W., Stockenstrom S. and Thiel P. G. (1996): Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and E mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1182-1187

Leslie J. F., Pearson C. A. S., Nelson P. E. and Toussoun T. A. (1990): *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80:343-350.

Leslie J. F., Zeller K. A., Logrieco A., Mulé G., Moretti A. and Ritieni A. (2004): Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2254-2262.

Linden H., Ballario P. and Macino G. (1997): Blue Light Regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 22:141-150.

Mao C., Yi K., Yang L., Zheng B., Wu Y., Liu F. and Wu P. (2004): Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *J. Exp. Bot.* 55:137-143.

Marasas W. F. O. (2001): Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ. Health Perspect.* 109:239-243.

Marasas W. F. O., Nelson P. E. and Toussoun T. A. (1984): Toxigenic *Fusarium* species: identify and mycotoxicology. Pennsylvania State University Press, University Park.

Marasas W. F. O., Wehner F. C., van Rensburg S. J. and van Schalkwyk D. J. (1981): Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern Africa. *Phytopathology* 71:792-796.

Marshall Graves J. A. (1995): The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser.* B 350:305-312.

Martin J. P., Handojo H. and Wismer C. A. (1989): Pokkah boeng. Pages 157-168 in: Diseases of Sugarcane: Major Diseases. Ricaud C., Egan B. T., Gillaspie, Jr. A. G. and Hughes C. G., eds. Elsevier, New York.

Menon S. T., Han M. and Sakmar T. P. (2001): Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiol. Rev.* 81:1659–1688.

Metzenberg R. L. (1990): The role of similarity and difference in fungal mating. *Genetics* 125:457-462.

Metzenberg R. L. and Glass N. L. (1990): Mating and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays* 12:53-59.

Moretti A., Logrieco A., Bottalico A., Ritieni A., Fogliano A. and Randazzo G. (1997): Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Sydowia* 48:44-56.

Munkvold G. P. (2003): Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:705-713.

Munkvold G. P. and Desjardins A. E. (1997): Fumonisins in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81:556-564.

Murray M. G. and Thompson W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.

Myburg R. B., Dutton M. F. and Chuturgoon A. A. (2002): Cytotoxicity of fumonisin B1, diethylnitrosamine, and catechol on the SNO esophageal cancer cell line. *Environ. Health Perspect.* 110:813-815.

Nair M. G. (1998): Fumonisins and human health. *Ann. Trop. Paediatr.* 18:47-52. Review.

Nelson M. A. (1996): Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends Genet.* 12:69-74.

Nelson P. E., Desjardins A. E. and Plattner R. D. (1993): Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:233-252.

Nelson P. E., Toussoun T. A. and Marasas W. F. O. (1983): *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.

Nirenberg H. I. (1989): Identification of *Fusaria* occuring in Europe on cereals and potatoes. Pages 179-193 in: *Fusarium*: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. J. Chelkowski, ed. Elsevier, New York.

Nowrousian M., Ringelberg C., Dunlap J. C., Loros J. J. and Kück U. (2005): Cross-species microarray hybridization to identify developmentally regulated genes in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *Mol. Genet. Genomics* 273:137-149.

O'Donnell K., Cigelnik E. and Nirenberg H. I. (1998): Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

Oehlen B. and Cross F. R. (1994): Signal transduction in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:836-841.

Ominski K. H., Marquardt R. R., Sinha R. N. and Abramson D. (1994): Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miller J. D., Trenholm H. L. eds. Mycotoxins in Grains. Compounds other than Aflatoxin. Eagen Press, USA 287-305.

Oren L., Ezrati S., Cohen D. and Sharon A. (2003): Early events in the *Fusarium verticillioides* – maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1696-1701.

Oron E., Mannervik M., Rencus S., Harari-Steinberg O., Neuman-Silberberg S., Segal D. and Chamovitz D.A. (2002): COP9 signalosome subunits 4 and 5 regulate multiple pleiotropic pathways in *Drosophila melanogaster*. *Development* 129:4399-4409.

Parry D. W., Jenkinson P. and McLeod L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small - grain cereals – a review. *Plant Pathol.* 44:207-238.

Paulitz T. C. (1996): Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. *Plant Dis.* 80:674-678.

Perkins D. (1987): Mating-type switching in filamentous ascomycetes. *Genetics* 115:215-216.

Peters A. T. (1904): A fungus disease in corn. *Agric. Exp. Stn. Nebr. Annu. Rep.* 17:13-22.

Pitt J. I., Hocking A. D., Bhudhasamai K., Miscamble B. F., Wheeler K. A. and Tanboon-Ek. P. (1994): The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int. J. Food Microbiol.* 23:35-43.

Pöggeler S. (2000): Two pheromone precursor genes are transcriptionally expressed in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora. Curr. Genet.* 37:403-411.

Pöggeler S. and Kück U. (2001): Identification of transcriptionally expressed pheromone receptor genes in filamentous ascomycetes. *Gene* 280:9-17.

Prado M. M., Prado-Cabrero A., Fernandez-Martin R. and Avalos J. (2004): A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr. Genet.* 46:47-58.

Proctor R. H., Hohn T. M. and McCormick S. P. (1997): Restoration of wild-type virulence to Tri5 disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology* 143:2583-2591.

Punt P. J., Oliver R. P., Dingemanse M. A., Pouwels P. H. and van den Hondel C. A. M. J. J. (1987): Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56:117-124.

Ridge K. D. (2002): Algal rhodopsins: phototaxis receptors found at last. *Curr. Biol.* 12:588-590.

Rohrbach K. G. and Pfeiffer J. B. (1976): Susceptibility of pineapple cultivars to fruit diseases incited by *Penicillium funiculosum* and *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 66:1386-1390.

Sacadura N. T. and Saville B. J. (2003): Gene expression and EST analyses of *Ustilago maydis* germinating teliospores. *Fungal Genet. Biol.* 40:47-64.

Sambrook J. and Russell D. W. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Seefelder W., Humpf H.U., Schwerdt G., Freudinger R. and Gekle M. (2003): Induction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192:146-153.

Seifert K. A., Aoki T., Baayen R. P., Brayford D., Burgess L. W., Chulze S., Gams W., Geiser D., de Gruyter J., Leslie J. F., Logrieco A., Marasas W. F. O., Nirenberg H. I., O'Donnell K., Rheeder J., Samuels G. J., Summerell B. A., Thrane U. and Waalwijk C. (2003): The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycol. Res.* 107:643-644.

Sharon A., Yamaguchi K., Christiansen S., Horwitz B. A., Yoder O. C. and Turgeon B. G. (1996): An asexual fungus has the potential for sexual development. *Mol. Gen. Genet.* 251:60-68.

Sheldon J. L. (1904): A corn mold (*Fusarium moniliforme* n. sp.). Agric. Exp. *Stn. Nebr. Annu. Rep.* 17:23-43.

Shen W. C., Bobrowicz P. and Ebbole D. J. (1999): Isolation of pheromone precursor genes of *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet. Biol.* 27:253-263.

Shiu P. K. and Glass N. L. (2000): Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:183-188.

Staben C. and Yanofsky C. (1990): *Neurospora crassa a* mating-type region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4917-4921.

Sun S.-K. and Snyder W. C. (1981): The bakane disease of the rice plant. Pages 104-113 in: *Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy. Nelson P. E., Toussoun T. A. and Cook R. J., eds. Pennsylvania State University Press, University Park. 457 pp.

Taylor J. W., Jacobson D. J. and Fisher M. C. (1999): The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:197-246.

Thompson-Coffe C., Borioli G., Zickler D. and Rosa A. L. (1999): Pyruvate decarboxylase filaments are associated with the cortical cytoskeleton of asci and spores over the sexual cycle of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 26:71-80.

Thrane U. (2001): Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites, p. 29-49. In: Summerell B. A., Leslie J. F., Backhouse D., Bryden W. L., Burgess L. W. (ed.), *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minn.

Trail F., Xu J. R., San Miguel P., Halgren R. G. and Kistler H. C. (2003): Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet. Biol.* 38:187-197.

Turgeon B. G. (1998): Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:115-137.

Turgeon B. G., Bohlmann H., Ciuffetti L. M., Christiansen S. K. and Yang G. (1993): Cloning and analysis of the mating type genes from *Cochliobolus heterostrophus*. *Mol. Gen. Genet.* 238:270-284.

Turgeon B. G. and Yoder O.C. (2000): Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 31:1-5.

Turina M., Prodi A. and Van Alfen N. K. (2003): Role of the Mf1-1 pheromone precursor gene of the filamentous ascomycete *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* 40:242-251.

Vallim M. A., Miller K. Y. and Miller B. L. (2000): *Aspergillus* SteA (sterile12-like) is a homeodomain-C2/H2-Zn+2 finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol. Microbiol.* 36:290-301.

Varma A., Lele V. C., Raychaudhuri S. P., Ram A. and Sang A. (1974): Mango malformation: A fungal disease. *Phytopathol Z.* 79:254-257.

Verna J. and Ballester R. (1999): A novel role for the mating type (MAT) locus in the maintenance of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 261:681-689.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van-de Lee T., Hornos M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. (1995): AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

Voss K. A., Howard P. C., Riley R. T., Sharma R. P., Bucci T. J. and Lorentzen R. J. (2002): Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B-1: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F-verticillioides*). *Cancer detect. prev.* 26:1-9.

White O. and Kerlavage A. R. (1996): TDB: new databases for biological discovery. *Methods Enzymol.* 266:27-40.

Wilson T. M., Ross P. F., Owens D. L., Rice L. G., Green S. A., Jenkins S. J. and Nelson H. A. (1992): Experimental reproduction of elem – a study to determine the minimum toxic dose in ponies. *Mycopathologia* 117:115-120.

Wirsel S., Horwitz B., Yamaguchi K., Yoder O.C. and Turgeon B.G. (1998): Single mating type-specific genes and their 3' UTRs control mating and fertility in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mol. Gen. Genet.* 259:272-281.

Yoder O. C., Valent B. and Chumley F. (1986): Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 76:383-385.

Yoshida Y., Arie T., Noguchi M., Nomura Y., Yoder O. C., Turgeon B. G. and Yamaguchi I. (1998): Cloning mating type genes of asexual ascomycetes, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 64:373.

Yun S. H., Berbee M. L., Yoder O. C. and Turgeon B. G. (1999): Evolution of the fungal self-sterile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5592-5597.

Yun S. H., Arie T., Kaneko I., Yoder O. C. and Turgeon B. G. (2000): Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and sexual *Gibberella*/*Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 31:7-20.

Zickler D., Arnaise S., Coppin E., Debuchy R. and Picard M. (1995): Altered mating-type identity in the fungus *Podospora anserina* leads to selfish nuclei, uniparental progeny, and haploid meiosis. *Genetics* 140:493-503.

M2. TÁPTALAJOK ÉS OLDATOK

2 × regenerációs közeg (1000 ml)

élesztõ kivonat	2,0 g
kazein enzim hidrolizátum	2,0 g
agaróz	20,0 g

10 × CMC törzsoldat (1000 ml)

NH_4NO_3	10,0 g
KH_2PO_4	10,0 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	5,0 g

20 × SSC (1000 ml oldathoz)

NaCl	175,3 g
$C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$	88,2 g
pH: 7,0	

100 × Denhardt's (20 ml oldathoz)

Ficoll	0,1 g
BSA (bovin szérum albumin)	0,1 g
PVP (polivinil-pirrolidon)	0,1 g

Burgonya-glükóz agar (1000 ml)

burgonya kivonat	4,0 g
klorocid	50,0 mg
agar	15,0 g
glükóz	20,0 g
pH: 3,5	

CTAB oldat (hexadeciltrimetil-ammónium-bromid) (1000 ml)

Tris-HCl	15,7 g
EDTA	9,3 g
NaCl	81,8 g
CTAB	20,0 g

Czapek törzsoldat (1000 ml)

$NaNO_3$	15,0	g
KH_2PO_4	5,0	g
KCl	2,5	g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	2,5	g

Enzim mix (200 ml)

lízis enzim	1,0	g
drizeláz	5,0	g
kitináz	10,0	mg
NaCl (0,7 M)	8,2	g

IPTG törzsoldat

0,2 g/ml töménységû oldatot készítünk desztillált vízben, ezt sterilre szûrjük, és -20°C-on tároljuk. A táptalajt tartalmazó Petri-csésze felületére csészénként 4 µl-t szélesztünk.

Karboxi-metil-cellulóz (CMC) tápoldat (1000 ml)

10 × CMC törzsoldat	100,0	ml
élesztõ kivonat	1,0	g
karboxi-metil-cellulóz	5,0	g
klorocid	50,0	mg

Kiegészített minimál táptalaj (MM) (1000 ml)

Czapek törzsoldat ($NaNO_3$ nélkül)	200,0	ml
Vogel-féle mikroelem oldat	0,1	ml
klorocid	50,0	mg
szacharóz	20,0	g
agar	20,0	g
kiegészítõ nitrogénforrások (külön-külön):		
ammónium-tartarát	1,0	g
$NaNO_2$	0,5	g
adenin	0,2	g
$NaNO_3$	2,0	g
$KClO_3$	20,0	g

Komplett tápoldat (CM) (1000 ml)

Czapek törzsoldat	200,0 ml
Vogel-féle mikroelem oldat	0,1 ml
vitamin törzsoldat	10,0 ml
klorocid	50,0 mg
élesztõ kivonat	1,0 g
pepton	3,0 g
kazein hidrolizátum	2,5 g
szacharóz	30,0 g

LB-freeze

Glicerol	44,0 ml
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	8,2 g
KH_2PO_4	1,8 g
Trinátriumcitrát dihidrát	0,5 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,9 g
bakto tripton	10,0 g
élesztõ kivonat	5,0 g
NaCl	5,0 g
pH: 7,0	

LB tápoldat (Luria-Bertrani Medium) (1000 ml)

kazein hidrolizátum	10,0 g
élesztõ kivonat	5,0 g
NaCl	10,0 g
agar	20,0 g
pH: 7,0-7,2	

Oldatok filter mosáshoz (1000 ml)

I. oldat:

20 × SSC	100,0 ml
SDS	1,0 g

II. oldat:

20 × SSC	50,0 ml
SDS	1,0 g
III. oldat:	
20 × SSC	5,0 ml
SDS	1,0 g

Prehibridizációs elegy

5 × SSC

0,5 % SDS

5 × Denhardt's

200 µg/ml élesztõ RNS

Prehibridizációs elegy (HD filter-hez)

5 × SSC

0,5 % SDS

5 × Denhardt's

0,01 M EDTA

5 mg/ml frissen denaturált egyszálú hal DNS

Regenerációs közeg (1000 ml)

2 × regenerációs közeg	500,0 ml
1,6 M szacharóz oldat	500,0 ml

Sárgarépás táptalaj (1000 ml)

fõtt, turmixolt sárgarépa	400,0 g
agar	20,0 g

STC

Szorbitol	218,6 g
Tris-HCl (pH: 8,0)	1,6 g
$CaCl_2$	5,5 g

Vitamin törzsoldat (1000 ml)

tiamin (B1-vitamin)	100,0 mg
riboflavin (B2-vitamin)	30,0 mg

piridoxin (B6-vitamin)	75,0	mg
kalcium-pantotenát (B5-vitamin)	200,0	mg
nikotinamid (B3-vitamin)	75,0	mg
aszkorbinsav (C-vitamin)	50,0	mg
p-aminobenzoesav	5,0	mg
kolin-klorid	200,0	mg
fólsav	5,0	mg
biotin (H-vitamin)	5,0	mg
inozitol	4,0	g
50 %-os etanol	1000,0	ml

Vogel-féle mikroelem oldat (100 ml)

citromsav	5,0	g
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	5,0	g
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$	1,0	g
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,25	g
$MnSO_4 \times 7H_2O$	0,05	g
H_3BO_3	0,05	g
$Na_2MO_4 \times 2H_2O$	0,05	g

X-GAL törzsoldat

20 mg/ml töménységû oldatot készítünk: 0,2 g X-GAL-hoz 10 ml dimetil-formamidot adunk. A csövet sötétben, –20°C-on tároljuk. A táptalajt tartalmazó Petri-csésze felületére csészénként 40 µl-t szélesztünk.

YEPD-2G (1000 ml)

élesztõ kivonat	3,0	g
bakto pepton	10,0	g
glükóz	20,0	g

M3. 9. TÁBLÁZAT

9. táblázat A *F. verticillio*ides FGSC 7603 vad típusú és a Δ*FvMAT1-2-1/15* mutáns törzsben eltérõen expresszálódott szekvenciák funkcionális kategóriák szerinti besorolása

(a-l: az azonos felsõ index-szel ellátott klónok egyazon kontigba tartoznak; a fajok teljes neve a táblázat végén található)

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	¡				
Anyagcsere						
001	+		α/ß-hidroláz	*P. putida*	AAN69537	6E-83
002		+	α-ketoglutarát-függõ xantin dioxigenáz	*E. nidulans*	CAI47587	3E-119
003	+		δ-6-elongáz	*P. tricornutum*	AAW70157	2E-22
004	+		δ-6-elongáz	*P. tricornutum*	AAW70157	2E-22
005	+		5-aminolevulinát szintáz	*G. fujikuroi*	BAB68405	1E-122
006		+	ABC transzporter, ATP-kötõ fehérje	*B. pseudomallei*	ABA49992	3E00
007	+		Acetát kináz	*N. crassa*	CAE76499	2E-106
008		+	Alkohol dehidrogenáz, cink tartalmú	*A. fumigatus*	EAL89964	4E-60
009		+	Argináz	*A. fumigatus*	EAL92438	1E-91
010	+		Argininoszukcinát szintáz	*S. cerevisiae*	CAA62528	2E-43
011	+		Auxin export szupercsalád	*A. fumigatus*	EAL90922	5E-41
012		+	Ctr réz traszporter család	*A. fumigatus*	EAL85758	4E-34
013	+		Dihidropikolinát szintetáz fehérje család	*A. fumigatus*	EAL85271	1E-47
014[a]		+	D-xilulóz 5-foszfát /D-fruktóz 6-foszfát foszfoketoláz	*A. fumigatus*	EAL86321	1E-26
015		+	D-xilulóz 5-foszfát /D-fruktóz 6-foszfát foszfoketoláz	*A. fumigatus*	EAL92505	4E-51
016		+	Endoglükoceramidáz	*A. fumigatus*	EAL86246	7E-05
017		+	Feltételezett α, α-trehalóz-foszfát szintáz alegység TPS2	*A. fumigatus*	EAL92998	6E-67
018[b]		+	Feltételezett α-glükozidáz	*P. minioluteum*	CAC09327	5E-69
019		+	Feltételezett α-glükozidáz	*P. minioluteum*	CAC09327	9E-93
020[b]		+	Feltételezett α-glükozidáz	*P. minioluteum*	CAC09327	9E-93
021		+	Feltételezett α-glükozidáz	*P. minioluteum*	CAC09327	3E-61
022	+		Feltételezett 1, 4-benzokinon reduktáz	*N. crassa*	CAE76242	2E-79
023	+		Feltételezett aminosav permeáz (Dip5)	*A. fumigatus*	EAL93176	6E-65
024	+		Feltételezett aminosav permeáz család	*A. fumigatus*	EAL84500	1E-85

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	¡				
Anyagcsere						
025	+		Feltételezett aminotranszferáz, V osztály	*A. fumigatus*	EAL90276	1E-92
026	+		Feltételezett ammónium transzporter MEPa	*N. crassa*	CAD21326	1E-113
027	+		Feltételezett citokróm P450 monooxigenáz	*Z. mays*	T02955	2E-11
028	+		Feltételezett észteráz	*A. fumigatus*	EAL91616	1E-85
029	+		Feltételezett foszfogliceromutáz	*N. crassa*	CAF05897	1E-68
030	+		Feltételezett foszfogliceromutáz	*N. crassa*	CAF05897	2E-120
031	+		Feltételezett glükózamin-6-foszfát deamináz	*N. crassa*	CAE85549	1E-06
032	+		Feltételezett hexokináz	*N. crassa*	CAE85550	4E-61
033	+		Feltételezett hexokináz	*N. crassa*	CAE85550	5E-66
034	+		Feltételezett karbon katabolit represszor fehérje	*A. fumigatus*	EAL88643	1E-47
035		+	Feltételezett kation exchanger	*A. fumigatus*	EAL84481	3E-38
036		+	Feltételezett kation exchanger	*A. fumigatus*	EAL84481	7E-04
037	+		Feltételezett MFS transzmembrán transzport fehérje	*P. chrysogenum*	AAY23170	9E-99
038	+		Feltételezett mitokondriális foszfátszállító fehérje (Mir1)	*A. fumigatus*	EAL90845	2E-68
039		+	Feltételezett NADPH kinon oxidoreduktáz homológ PIG3	*N. crassa*	CAD70876	2E-85
040		+	Feltételezett neutrális aminosav permeáz	*N. crassa*	CAE76088	2E-67
041[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
042[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
043[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
044[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
045[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
046[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
047[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
048[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
049[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
050[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
051[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
052[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77

Kln	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	*¡*				
Anyagcsere						
053[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
054[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
055[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
056[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
057[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
058[c]		+	Feltételezett nitriláz	*A. fumigatus*	EAL84990	8E-77
059	+		Feltételezett OPT transzporter család	*C. albicans*	XP_718105	1E-10
060	+		Feltételezett oxiszterol kötõ fehérje (Osh5)	*A. fumigatus*	EAL92408	2E-40
061		+	Feltételezett piruvát dehidrogenáz ß lánc prekurzor (PDB1)	*N. crassa*	CAB97287	6E-81
062	+		Feltételezett piruvát dekarboxiláz PdcA	*A. fumigatus*	EAL92474	3E-70
063	+		Feltételezett piruvát dekarboxiláz PdcA	*A. fumigatus*	EAL92474	3E-84
064	+		Feltételezett porfobilinogén szintáz	*N. crassa*	CAD70821	3E-81
065		+	Feltételezett P-típusú kálcium ATPáz	*A. fumigatus*	EAL90415	1E-93
066		+	Feltételezett sziderokrom-vas transzporter (Sit1)	*A. fumigatus*	EAL86866	8E-86
067	+		Feltételezett vakuoláris célfehérje	*C. albicans*	XP_711465	1E-20
068		+	Foszfoglicerát kináz	*G. zeae*	EAA73460	7E-146
069		+	Foszfoglicerát mutáz domén	*A. fumigatus*	EAL92577	1E-114
070	+		Foszfolipáz/Karboxilészteráz	*Nocardioides sp.*	ZP_00660025	3E-11
071	+		Foszforibozil-difoszfát szintáz 4-es izoform	*A. fumigatus*	EAL89710	6E-132
072		+	Fruktozil aminosav oxidáz	*N. crassa*	CAE85581	2E-18
073	+		Gamma-glutamiltranszpeptidáz	*P. fluorescens*	ABA75303	1E-99
074	+		Glicin dehidrogenáz	*A. fumigatus*	EAL84525	1E-104
075		+	Glutamin szintetáz	*G. fujikuroi*	CAC27836	2E-146
076		+	Hisztidin bioszintézis trifunkciós fehérje (his-3)	*N. crassa*	CAE76555	3E-120
077[d]	+		Karbon katabolit represszió regulator	*G. fujikuroi*	CAA76330	2E-89
078[d]	+		Karbon katabolit represszió regulátor	*G. fujikuroi*	CAA76330	2E-89
079[d]	+		Karbon katabolit represszió regulátor	*G. fujikuroi*	CAA76330	2E-89
080	+		Karbonikus anhidráz család típusú fehérje	*A. fumigatus*	EAL85418	2E-89

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	¡				
Anyagcsere						
081	+		Ketol-sav reduktoizomeráz	*G. zeae*	EAA67345	2E-147
082	+		Ketol-sav reduktoizomeráz	*G. zeae*	EAA67345	8E-134
083	+		Malát szintáz, glioxiszómális	*G. zeae*	EAA70869	8E-50
084	+		Mannitol-1-foszfát 5-dehidrogenáz-szerû fehérje	*M. grisea*	AAX07705	1E-115
085		+	Mannóz-1-foszfát guanililtranszferáz	*H. jecorina*	AAC39498	2E-149
086		+	Metiltranszferáz FkbM	*T. erythraeum*	ZP_00675486	4E00
087	+		MIPC szintáz alegység SurA	*A. fumigatus*	XP_747610	1E-42
088	+		Mitokondriális F1 ATP szintáz ß alegység	*A. thaliana*	CAC81058	1E-04
089		+	Mitokondriális import belsõ membrán transzlokáz alegység TIM17	*G. zeae*	EAA74619	3E-79
090	+		MSF membrán transzporter	*A. fumigatus*	EAL90365	2E-59
091		+	N-acetilglükózaminiltranszferáz	*N. crassa*	EAA32165	1E-103
092	+		NADP-függõ glutamát dehidrogenáz	*G. fujikuroi*	CAC45043	9E-140
093	+		Nitrát reduktáz	*S. oleracea*	BAA13047	6E-16
094		+	Nitroalkán oxidáz	*F. oxysporum*	AAL57485	1E-155
095[e]		+	Nitroalkán oxidáz	*F. oxysporum*	AAL57485	1E-155
096[e]		+	Nitroalkán oxidáz	*F. oxysporum*	AAL57485	1E-152
097		+	Plazmamembrán cink ion transzporter	*A. fumigatus*	XP_731508	4E-59
098		+	Preprotripszin	*F. oxysporum*	AAB27568	4E-114
099		+	Protein foszfatáz 2A B56-delta szabályozó alegysége	*N. crassa*	CAC28812	1E-113
100	+		Saccharopine dehidrogenáz	*S. pombe*	Q09694	2E-34
101	+		Tirozináz prekurzor	*N. crassa*	CAE81941	7E-34
102		+	Vakuoláris ATP szintáz B alegység	*G. zeae*	EAA67943	3E-151
103	+		Vakuoláris ATP-szintáz d alegység	*G. zeae*	EAA74514	2E-137
Sejtszintû védekezés						
104		+	Etilénre reagáló proteináz inhibitor I prekurzor	*L. esculentum*	P20076	5E-47
105	+		Formát dehidrogenáz (NAD-függõ formát dehidrogenáz)	*G. zeae*	EAA75069	7E-127

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	*¡*				
Sejtszintû védekezés						
106	+		Hõsokk fehérje 60, mitokondriális prekurzor	*G. zeae*	EAA73737	4E-94
107[f]	+		Hõsokk fehérje SSC1-szerû	*M. grisea*	AAX07628	2E-56
108[f]	+		Hõsokk fehérje SSC1-szerû	*M. grisea*	AAX07628	2E-56
109		+	Kataláz-peroxidáz	*N. crassa*	AAL66352	4E-82
110		+	Manganáz rezisztencia 1 fehérje	*S. cerevisiae*	CAA04646	6E-25
111		+	pH szabályozó fehérje	*G. moniliformis*	AAO64251	3E-114
112	+		Sejtfal integritás és stressz válasz komponens 4 prekurzor	*S. cerevisiae*	P38739	7E00
113	+		UV excíziós javító fehérje RadW	*A. fumigatus*	XP_754028	8E-31
Sejtosztódás/-növekedés						
114	+		A-agglutinin alegység prekurzor	*S. cerevisiae*	P32323	3E-02
115	+		a-agglutinin magfehérje AGA1 homológ	*S. pombe*	T42367	8E-02
116		+	DNáz1 fehérje	*N. crassa*	CAD21357	5E-17
117	+		DNS polimeráz ε, A katalitikus alegység	*S. cerevisiae*	P21951	4E00
118		+	Feltételezett sejt ciklus szabályozó és szeneszcencia fehérje	*N. crassa*	CAE76477	6E-71
119	+		Feltételezett, sejt osztódási ciklust szabályozó fehérje CDC50	*N. crassa*	CAD21366	3E-52
120		+	Importin α-2 alegység	*M. musculus*	XP_895972	5E-01
121	+		Poliubikvitin	*S. pombe*	AAC64787	3E-152
Sejtszerkezet						
122		+	ß-1,3-glükán kötõ fehérje	*N. crassa*	CAC28724	4E-28
123	+		Extracelluláris mátrix fehérje prekurzor	*F. oxysporum*	AAL47843	1E-89
124		+	Feltételezett sejtfal adhezin	*C. albicans*	XP_714666	2E-04

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	¡				
Sejtszerkezet						
125		+	Feltételezett T-complex fehérje 1, εalegység	*A. fumigatus*	EAL88607	1E-93
126	+		Felszínen lokalizált külsõ membránfehérje	*X. fastidiosa*	AAF84325	1E-02
127	+		Fibrinogén A-α-lánc	*S. scrofa*	BAA07817	1E-03
128		+	Golgi összerendezõdést támogató fehérje	*A. fumigatus*	XP_750751	3E-64
129	+		Külsõ membrán fehérje	*S. enterica*	YP_149528	4E00
130	+		Tubulin α-lánc	*G. zeae*	EAA67945	4E-127
131		+	Woronin test fehérje	*N. crassa*	AAB61278	4E-65
Jelfogás/jelátvitel						
132		+	Ca/CaM-függõ kináz-1	*N. crassa*	AAL14118	5E-118
133		+	CCG-6	*N. crassa*	CAD70877	2E-17
134		+	esdC homolog	*S. macrospora*	CAH03680	6E-41
135		+	esdC homológ	*S. macrospora*	CAH03680	5E-35
136		+	Feltételezett homeoprotein	*N. crassa*	CAE76096	3E-43
137		+	Feltételezett protein kináz	*A. fumigatus*	EAL88773	9E-05
138	+		Feltételezett protein kináz (Lkh1)	*A. fumigatus*	EAL91008	1E-23
139		+	Feltételezett receptor kináz	*S. bicolor*	AAM94320	1E00
140		+	Feltételezett SNARE fehérje (Ufe)	*A. fumigatus*	EAL93262	8E-41
141		+	Feltételezett szerin/treonin kináz	*D. discoideum*	XP_646132	1E00
142		+	Feltételezett szerin/treonin kináz receptorhoz kapcsolt fehérje	*C. neoformans*	AAW41455	8E-15
143		+	Feromon válasz által kiváltott sejtciklus leállításért felelõs fehérje	*C. neoformans*	AAW40619	2E00
144		+	Foszfatidát citidiltranszferáz	*A. fumigatus*	XP_751919	5E-39
145		+	GTP-kötõ fehérje ypt1	*G. zeae*	EAA74326	4E-103
146		+	Mitogén-aktivált protein kináz STY1	*N. crassa*	XP_327310	2E-146
147	+		Olfr973	*M. musculus*	AAS99804	5E00

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	*¡*				
Jelfogás/jelátvitel						
148		+	Opsin-szerû fehérje	*G. fujikuroi*	CAD97459	9E-143
149	+		PH domén fehérje	*A. fumigatus*	EAL89069	7E-30
150	+		Szerin/treonin kináz két komponensû szenzor doménnel	*Nostoc sp.*	BAB72843	6E00
151		+	Szignál transzdukciós hisztidin kináz	*M. magneticum*	BAE49077	6E00
152		+	Sztomatin-szerû fehérje	*G. fujikuroi*	BAB68403	4E-135
153[g]		+	ThiJ/PfpI fehérje család	*A. fumigatus*	EAL86037	1E-16
154[g]		+	ThiJ/PfpI fehérje család	*A. fumigatus*	EAL86037	2E-16
155		+	WC-2 fehérje	*M. grisea*	AAX07710	2E-07
Fehérjeszintézis						
156	+		40S riboszóma fehérje S12	*G. zeae*	EAA77525	2E-64
157	+		40S riboszóma fehérje S13	*G. zeae*	EAA76607	8E-71
158		+	40S riboszóma fehérje S15a (PPCB8)	*B. napus*	Q00332	2E-37
159[h]	+		40S riboszóma fehérje S23	*G. zeae*	EAA74990	1E-72
160[h]	+		40S riboszóma fehérje S23	*G. zeae*	EAA74990	7E-78
161	+		40S riboszóma fehérje S27	*N. crassa*	XP_324798	5E-41
162	+		40S riboszóma fehérje S7	*G. zeae*	EAA76320	3E-107
163	+		60S riboszóma fehérje L11	*S. pombe*	Q10157	3E-67
164	+		60s riboszóma fehérje l21	*A. fumigatus*	EAL92872	2E-52
165	+		60S riboszóma fehérje L27a (L29)	*G. zeae*	EAA78050	2E-82
166	+		60S riboszóma fehérje L36 (TRP36)	*G. zeae*	EAA68099	2E-41
167	+		ADP-ribozilációs factor	*G. zeae*	EAA67817	2E-101
168		+	Elongációs faktor 3-szerû fehérje	*M. grisea*	AAX07692	2E-88
169	+		Eukarióta transzlációs iniciációs faktor 3-szerû fehérje; 11-es alegység	*M. grisea*	AAW69356	1E-86
170	+		Fehérjét kötõ/ubikvitin-fehérje ligáz	*A. thaliana*	NP_850478	3E00

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	¡				
Fehérjeszintézis						
171	+		Feltételezett 40S riboszóma fehérje S24	*N. crassa*	CAD71100	5E-49
172	+		Feltételezett 60s riboszóma fehérje L2 (mitokondriális)	*N. crassa*	CAD21256	7E-46
173	+		Feltételezett metionil aminopeptidáz	*N. crassa*	CAD71035	1E-101
174	+		Feltételezett transzlációs elongációs faktor EF-Tu prekurzor	*N. crassa*	CAC28833	1E-88
175		+	L10-A-szerû 60S riboszóma fehérje	*M. grisea*	AAW69346	5E-107
176	+		Mitokondriális riboszóma fehérje kis alegysége; Mrps35p	*S. cerevisiae*	NP_011681	2E-06
177	+		Mitokondriális riboszóma fehérje L36	*S. pombe*	NP_595638	6E-07
RNS-szintézis						
178		+	bZIP transzkripciós faktor LziP	*A. fumigatus*	XP_753012	8E-05
179		+	Feltételezett ATP-függõ RNS helikáz (Drs1)	*A. fumigatus*	EAL90830	1E-32
180	+		Feltételezett cink RING finger fehérje	*C. albicans*	EAK96719	5E-08
181	+		Feltételezett transzkripciós faktor BTF3a	*N. crassa*	CAE76548	1E-58
182[i]		+	Olf-1/EBF-szerû 3-as transzkripciós faktor	*P. troglodytes*	XP_519669	6E-01
183[i]		+	Olf-1/EBF-szerû 3-as transzkripciós faktor	*P. troglodytes*	XP_519669	6E-01
184[i]		+	Olf-1/EBF-szerû 3-as transzkripciós faktor	*P. troglodytes*	XP_519669	6E-01
185		+	Olf-1/EBF-szerû 3-as transzkripciós faktor	*P. troglodytes*	XP_519669	6E-01
186		+	tRNS-“splicing” endonukleáz ß lánc	*N. crassa*	CAB88602	2E-46
187		+	U1 kis nukleáris ribonukleoprotein 70 kDa	*A. fumigatus*	EAL91268	2E-46
Nem besorolható						
188	+		67 kDa miozin-kereszt-reaktív antigén család	*A. fumigatus*	EAL91605	7E-06
189		+	Annexin ANXC3.1	*A. fumigatus*	EAL85432	2E-28
190		+	CG8713-PA	*A. mellifrea*	XP_393264	7E-01

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	*¡*				
Nem besorolható						
191[j]		+	Feltételezett allergén	*C. neoformans*	AAW44097	2E-25
192[j]		+	Feltételezett allergén	*C. neoformans*	AAW44097	1E-25
193[j]		+	Feltételezett allergén	*C. neoformans*	AAW44097	7E-12
194[j]		+	Feltételezett allergén	*C. neoformans*	AAW44097	1E-25
195		+	Feltételezett exportált fehérje	*B. parapertussis*	CAE40185	8E-26
196		+	Feltételezett membránhoz kötött C2 domén fehérje (vp115)	*A. fumigatus*	EAL84710	2E-60
197[k]		+	Feltételezett rasp f 7 allergén	*N. crassa*	CAD70798	7E-31
198[k]		+	Feltételezett rasp f 7 allergén	*N. crassa*	CAD70798	5E-15
199	+		Feltételezett retrotranszpozon fehérje	*O. sativa*	ABA97830	6E-01
200	+		GLP_14_41229_37921	*G. lamblia*	EAA39748	5E00
201		+	OS-2 fehérje	*G. gallus*	XP_418353	3E-01
202		+	RIKEN cDNA 8430410A17	*M. musculus*	AAH24401	7E-108
203[l]		+	S222	*T. aestivum*	AAD10252	2E-93
204		+	Y55B1BR.3	*C. elegans*	NP_497198	3E-02
Hipotetikus fehérjék						
205	+		Hipotetikus fehérje	*G. fujikuroi*	CAG28683	5E-38
206	+		Hipotetikus fehérje	*G. fujikuroi*	CAG28683	5E-38
207		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA70773	5E-74
208		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA75931	3E-32
209	+		Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA68333	2E-10
210	+		Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA67972	3E-55
211		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA67654	2E-81
212		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA68557	4E-34
213		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA73871	1E-23
214		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA73884	3E-43
215		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA71288	9E-27
216		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA77227	5E-48

Klón	*Expresszió a mutánsban*		*Hasonlóság*	*Fajok*	*Adatbanki szám*	*E érték*
	^	*i*				
Hipotetikus fehérjék						
217		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA73978	3E-31
218		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA70655	4E-53
219[i]		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA68216	2E-105
220[i]		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA68216	2E-105
221[i]		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA68216	2E-105
222		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA77344	1E-61
223		+	Hipotetikus fehérje	*G. zeae*	EAA72018	3E-52
224		+	Hipotetikus fehérje	*M. grisea*	XP_367120	2E-20
225		+	Hipotetikus fehérje	*N. crassa*	XP_322154	5E-33
226	+		Ismeretlen fehérje	*O. sativa*	XP_475204	6E-34

A. fumigatus - Aspergillus fumigatus
A. thaliana - Arabidobsis thaliana
B. napus - Brassica napus
B. parapertussis - Bordetella parapertussis
B. pseudomallei - Burkholderia pseudomallei
C. albicans - Candida albicans
C. elegans - Caenorhabditis elegans
C. neoformans - Cryptococcus neoformans
D. discoideum - Dictyostelium discoideum
E. nidulans - Emericella nidulans
F. oxysporum - Fusarium oxysporum
G. gallus - Gallus gallus
G. lamblia - Giardia lamblia
H. jecorina - Hypocrea jecorina
L. esculentum - Lycopersicon esculentum
M. grisea - Magnaporthe grisea
M. magneticum - Magnetospirillum magneticum
M. musculus - Mus musculus
O. sativa - Oryza sativa
P. chrysogenum - Penicillium chrysogenum
P. fluorescens - Pseudomonas fluorescens
P. minioluteum - Penicillium minioluteum
P. putida - Pseudomonas putida
P. tricornutum - Phaeodactylum tricornutum
P. troglodytes - Pan troglodytes
S. bicolor - Sorghum bicolor
S. cerevisiae - Saccharomyces cerevisiae
S. enterica - Salmonella enterica
S. macrospora - Sordaria macrospora
S. oleracea - Spinacia oleracea
S. scrofa - Sus scrofa
T. aestivum - Triticum aestivum
T. erythraeum - Trichodesmium erythraeum
X. fastidiosa - Xylella fastidiosa
Z. mays - Zea mays

M4. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

TUDOMÁNYOS DOLGOZATOK:

Anita Keszthelyi, Apor Jeney, Zoltán Kerényi, Odette Mendes, Cees Waalwijk & László Hornok (2007): Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Antonie van Leeuwenhoek* (megjelenés alatt)

Waalwijk, C., **Keszthelyi A.**, van der Lee, T., Jeney A., de Vries, I., Kerenyi Z., Mendes, O. and Hornok L. (2006): Mating type loci in *Fusarium*: structure and function. *Mycotoxin Research* 22:54-60.

MÁS TÉMÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS DOLGOZATOK:

Jeney, A., Béki, E., **Keszthelyi, A.**, Leslie, J.F. and Hornok, L. (2007): Cloning and characterization of *Fpmtr*, an aminoacid transporter gene of *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*). *Journal of Basic Microbiology* 47(1): 16-24.

KONFERENCIA ELÕADÁSOK, POSZTEREK:

Keszthelyi A., de Vries, I., Jeney A., Kerényi Z., Mendes, O., van der Lee, T., Waalwijk, C., Hornok L. (2005): Tagging potential target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). A *Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyûlése és a 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely*

Jeney A., **Keszthelyi A.**, Hornok L. (2005): Inactivation of *Fpmtr*, an unusual amino acid transporter gene disturbs sexual and parasexual events in *Fusarium proliferatum*. A *Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyûlése és a 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely*

Oláh B., Kerényi Z., Jeney A., **Keszthelyi A.**, Hornok L. (2005): Cloning and characterization of *Fpac1*, an adenylate cyclase gene from *Fusarium proliferatum*. A *Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyûlése és a 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely*

Keszthelyi A., de Vries, I., Jeney A., Kerényi Z., Mendes, O., van der Lee, T., Waalwijk, C. and Hornok L. (2005): Transcript profile changes in a ΔMAT-2 strain of *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *MycoGlobe EU-USA Bilateral Workshop on Toxigenic Fungi and Mycotoxins, New Orleans, USA*

Jeney A., Béki E., **Keszthelyi A.**, Hornok L. (2004): Fonalasgombák aminosav transzporterei, egy hipotetikus aminosav permeáz gén izolálása *Fusarium proliferatum*ból. *Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyûlése, Keszthely*

Ádám A.L., Oláh B., Kerényi Z., **Keszthelyi A.** és Hornok L. (2004): Jelátviteli útvonalak a *Giberella fujikuroi*-ban. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyûlése, Keszthely*

Keszthelyi A., Kerényi Z., Posta K. és Hornok L. (2004): Transzkripciós profilok összehasonlítása egy, a párosodási típus génjében null-mutáns és a vad típusú törzs között a Fusarium verticillioides-ben (Gibberella fujikuroi). *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyûlése, Keszthely*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetõmnek, Dr. Hornok Lászlónak, aki a dolgozatomhoz szükséges kutatómunka feltételeit megteremtette.

Köszönettel tartozom a Mikológia csoport minden egykori és jelenlegi tagjának, elsõsorban Dr. Jeney Apornak, Dr. Kerényi Zoltánnak és Oláh Brigittának, akik sokat segítettek abban, hogy ez a munka megszülethessen.

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.