



Szent István Egyetem
Gödöllő

**FEJLŐDÉSSPECIFIKUS GÉNEK IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE
GIBBERELLA INTERMEDIA (FUSARIUM PROLIFERATUM) GOMBÁBÓL**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Jeney Apor

Gödöllő
2006

A doktori iskola neve: Biológiai Doktori Iskola

Tudományága: Biológia

Vezetője: Dr. Tuba Zoltán
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi
Kar, Növénytani és Növényélettani Tanszék

Témavezető: Dr. Hornok László
az MTA levelező tagja, tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi
Kar, Mezőgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

.....

Dr. Tuba Zoltán
a doktori iskola vezetője

.....

Dr. Hornok László
témavezető

Előzmények, kitűzött célok

A *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito & Kimura haploid, fonalas tömlősgomba gyűjtőfaj tagjai világszerte megtalálhatók. A szexuális szaporodásra képes gyűjtőfajon belül kilenc ún. párosodási populációt (MP-A, MP-B...MP-I), azaz valódi biológiai fajt tudtak elkülöníteni, amelyeket *Gibberella* teleomorf névvel, míg ezek aszexuális alakjait *Fusarium* anamorf névvel látták el. Ezen gyűjtőfaj egyik legismertebb képviselője a *F. proliferatum* (teleomorf alakja a D párosodási populációba tartozó *G. intermedia*). Számos különféle növényről izoláltak már, többek között kukoricáról, búzáról, spárgáról, rizsről, cirokról, datolyapálmáról, fokhagymáról (Abdalla et al., 2000; Desjardins et al., 1997; Dugan et al., 2003; Elmer, 1990; Leslie, 1995; Moretti et al., 1997). Kimutatták jelenlétét tünetmentes szövetekből, magokból is (Munkvold és Desjardins, 1997). Gazdasági jelentőségét mutatja, hogy a mérsékelt égövön, mint a kukorica betegségek egyik okozójaként ismerjük a *F. verticillioide*sseel együtt. Gyökér-, szár- és csőrothadást egyaránt okozhat, de ugyanúgy veszélyes jelenléte a tárolt kukoricaszemekre nézve is. Sokszor nem okoz termésmennyiségi veszteséget, de az állat- és humánegészségügyben komoly kockázatot jelent előfordulása, ugyanis másodlagos anyagcseretermékként fuzarinsavat és mikotoxinok egész sorát termeli: fumonizineket, moniliformint, beauvericint és fuzaproliferint (Nelson et al., 1992; Thiel et al., 1991; Bacon et al., 1996; Marasas et al., 1986; Ritieni et al., 1995; Logrieco et al., 1995).

Az aminosavakat a gombák csakúgy, mint szinte minden más élőlény, nitrogén- és/vagy szénforrásként, illetve a fehérjék építőköveiként hasznosítják. Az aminosavak felvételét aminosav transzporterek (permeázok) végzik másodlagos aktív transzport segítségével, a H⁺-ion elektrokémiai grádiense mentén (Young et al., 1999). A legtöbbjük egy aminosavra, vagy nagyon hasonló struktúrájú aminosavak kis csoportjára specifikus, míg mások az aminosavak széles skálájának szállítását végzik (Sophianopoulou és Diallinas, 1995). Léteznek olyan aminosav transzporterek is, amelyek inkább szenzor/receptor/regulátor funkciót látnak el, mintsem aminosav felvételt. Ilyen például a *Saccharomyces cerevisiae* Ssy1 proteinje, amely az Ssy1-Ptr3-Ssy5 szenzorkomplex részeként, szokatlanul hosszú N-terminális doménje révén közvetlen kapcsolatba lép az extracelluláris aminosavakkal, és számos aminosav permeázt kódoló gén transzkripcióját szabályozza (Didion et al., 1998; Klasson et al., 1999; Forsberg és Ljungdahl, 2001).

A legtöbb aminosav permeáz egymáshoz szignifikáns szekvencia hasonlóságot mutat, és az APC (Amino acid-Polyamine-Organocation) superfamília AAP (Amino Acid Permease) aminosav transzporter családjába tartozik (Jack et al., 2000). Az AAP család minden tagjának 12 α -helikális transzmembrán szegmense és a citoplazmában elhelyezkedő hidrofíli N- és C-terminális doménje van (Sophianopoulou és Diallinas, 1995). Ismert továbbá a fonalas gombáknak egy olyan aminosav transzporter csoportja is, amelyekbe az úgynevezett Mtr-típusú transzporterek tartoznak. E fehérjék között minimális a szekvencia hasonlóság, viszont 12 helyett csak 11 α -helikális transzmembrán

szegmensük van. Ezek a permeázok annak az eukarióta specifikus AAAP (Amino Acid/Auxin Permease) családnak a tagjai, amelybe a növények auxin transzporterei, egyes növényi és állati aminosav permeázok és a *S. cerevisiae* vakuoláris aminosav transzporterei tartoznak (Young et al., 1999; Russnak et al., 2001). Az AAAP család valószínűleg szintén az APC szuperfamíliába sorolható (Jack et al., 2000).

Az aminosav transzporterek szabályozása transzkripciós és poszttranszlációs szinten történik. Transzkripciós szinten az új aminosavak szintézisében elsősorban a szubsztrátum indukció és/vagy nitrogén/szén katabolit represszió játszik döntő szerepet (Sophianopoulou és Diallinas, 1995). A nitrogén katabolit represszió a leginkább tanulmányozott szabályozási forma, melynek során a preferált nitrogénforrások jelenlétében lecsökken az aminosav permeáz gének expressziós szintje. Az általános aminosav transzporter gén aktivitásának represszióját figyelték meg NH_4^+ ion jelenlétében a *Penicillium chrysogenum* és a *Neurospora crassa* esetében egyaránt (DeBusk és DeBusk, 1980; Trip et al., 2004b). A permeázok *de novo* szintézisében rendkívül fontos szerepet kapnak a transzkripciós faktorok. A nitrogén katabolit represszió során a GATA-típusú „cinkujj” transzkripciós faktorok hiánya miatt nem aktiválódik egy sor, a nitrogén anyagcserében részt vevő gén, így például az aminosav transzportereket kódoló gének (Marzluf, 1997). Aminosav éhezés hatására, a GCN4-szerű fehérjék szintje a sejten belül megnő, és indukálják az aminosav bioszintézis általános szabályozásában résztvevő gének transzkripcióját, azok promótereinek TGACTC szekvencia motívumaihoz kötődve (Ebbolle et al., 1991). A poszttranszlációs szintű reguláció a megnövekedett belső aminosav készlet következtében kialakuló feedback-gátlás, transz-inhibíció és/vagy a tápközegben jelenlevő ammónia vagy glutamin által kiváltott inaktiváció révén történik (Sophianopoulou és Diallinas, 1995).

Bár a legtöbb aminosav transzportert kódoló gén konstitutívan expresszálódik, vagy a tápközegben jelenlevő tápanyag által erősen szabályozott, de találunk kevés kivételt is (Gow és Gadd, 1995). Az *Aspergillus nidulans* prolin transzporterét kódoló *prnB* gén expresszióját egyaránt indukálja a prolin jelenléte, az aminosav éhezés és a konídiumok csírázása, ugyanakkor az ammónia és a glükóz együttes jelenléte represszálja működését. A csírázó konídiumban a *prnB* expressziója valódi fejlődésbeli jelenség (Tazebay et al., 1997).

A *Fusarium*ok aminosav transzportereiről nem található semmilyen adat az irodalomban. A *F. proliferatum* fejlődésspecifikus génjeinek keresése során azonosítottunk egy szokatlan aminosav transzportert. Ennek jellemzése adja doktori értekezésem fő gerincét. Kutatómunkánk célkitűzése a következő volt:

Olyan gének azonosítása, izolálása és jellemzése a modellszervezetként használt *F. proliferatum* ITEM 2287 törzsből, amelyek az élelciklus egy-egy jól meghatározott szakaszában kapcsolódnak be, ezen belül

- fejlődési stádiumtól függően expresszáladó gének izolálása cDNS-AFLP módszerrel,
- egy különleges, aminosav transzportert kódoló gén, az *Fpmtr* funkciójának megállapítása *Fpmtr* null mutáns törzsek létrehozásával.

Módszerek

A gombatörzsek tenyésztése

A növekedési görbe felvételéhez, a cDNS-AFLP kísérletekhez, a $\Delta Fpmtr$ mutáns törzsek csírázásának és az *Fpmtr* gén expressziójának vizsgálatához hozzávetőleg 10^8 db konídiummal inokuláltunk 100 ml komplett és minimál tápoldatot, és sötétben rázattuk 220 órán át (26°C, 180 rpm). A vad és a mutáns törzsek növekedési sajátosságainak összehasonlítását komplett, minimál és szervesen nitrogén nélküli triptofánt vagy glutaminsavat vagy arginint tartalmazó minimál állótenyészetben (10^6 db/ml konídium, 3 nap, 26°C, sötét), szárazanyagtömeg mérésével végeztük. A toxikus aminosav analóg p-fluoro-fenilalaninnal (FPA) szembeni érzékenység vizsgálatához, 10^6 db/ml végkoncentrációjú konídiummal inokuláltunk 20 ml módosított Vogel minimál tápoldatot, amelyben az NH_4NO_3 -ot ekvimoláris mennyiségű KNO_3 -ra vagy NH_4Cl -ra cseréltük (Margolis-Clark et al., 2001), és az álló tenyészetet 3 napig 26°C-on inkubáltuk.

cDNS-AFLP

Totál RNS-t vontunk ki a *F. proliferatum* ITEM 2287 törzs 9 valamint 202 órás tenyészetéből, és egy-, majd kétszálú cDNS-t hoztunk létre. A kétszálú cDNS-t *EcoRI* és *MseI* restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, és a létrejött cDNS fragmentumok végeire helyspecifikus, dupla szálú adaptorokat ligáltunk. A ligálás után az adaptorokra specifikus indítószekvenciákkal nem szelektív preamplifikálást végeztünk, majd a kapott PCR termékeket szelektíven felsokszoroztuk olyan indítószekvenciák alkalmazásával, amelyeknek 3' végeiken egy vagy két szelektív bázis helyezkedett el (Vos et al., 1995). Az *EcoRI* indítószekvenciákat 5' végükön [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP-vel radioaktívan jelöltük, így a felsokszorozott cDNS-fragmentumok közül csak azokat tudtuk detektálni 6 %-os denaturáló akrilamid gélen, amelyeknek legalább egy *EcoRI* végük volt. A gélt Whatman papírra szárítottuk, ahonnan a differenciáló fragmentumokat kivágtuk, és a szelektív amplifikáció során alkalmazott primerkombinációkat használva újra felsokszoroztuk azokat. A PCR

termékeket elektroforézist követően agaróz gélből izoláltuk, majd *pBluescript* II KS+ (Stratagene) vektorba ligáltuk, és az így nyert plazmiddal transzformáltuk az *Escherichia coli* DH5 α (Stratagene) törzsét (Sambrook és Russel, 2001). A megfelelő rekombináns plazmidot hordozó telepeket az alfa-komplementáció segítségével választottuk ki. A baktériumok 14-16 órás tenyészetéből minipreparálással nyertük ki a plazmid DNS-t. A cDNS-AFLP klónok fejlődési állapottól függő expressziós különbségeinek kimutatására, független kísérletként, Northern hibridizációs kísérleteket végeztünk el. A cDNS-AFLP klónok és későbbiekben az *Fpmtr* gén nukleotid sorrendjét a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban működő, Gene Analyzer 3100 (Applied Biosystems) berendezéssel határoztuk meg.

A *F. proliferatum* génkönyvtár készítése, az *Fpmtr* gén izolálása és expressziójának vizsgálata

A *F. proliferatum* ITEM 2287 törzs genomi DNS-t *Sau3AI* enzimmel részlegesen emésztettük, majd a 10-22 kb nagyságú fragmentumok ligálását a Lambda DASH[®] II bakteriofág vektorba (Gigapack[®] III Gold Cloning, Stratagene), a könyvtár amplifikálását és titerének meghatározását a gyártó utasításait követve végeztük. A plakk hibridizálásnál próbaként a random priming módszerrel [³² α P]dCTP-vel radioaktívan jelölt, az *Fpmtr* génrészletet tartalmazó cDNS-AFLP klón szolgált. A plakk hibridizációt, a fág DNS tisztítást, térképezést, valamint az *Fpmtr* gént tartalmazó 5000 kb méretű, *XbaI* enzimmel generált fragmentum *pBluescript* II KS+ vektorba klónozását hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel végeztük (Sambrook és Russel, 2001). Az így létrehozott plazmidot, pAPXbaI-nek neveztük el. A *F. proliferatum*-ból klónozott *Fpmtr* gén nukleotid sorrendjét szekvencia adatbázisban helyeztük el (GenBank), ahol a DQ067573 génbanki azonosító számot kapta. Az *Fpmtr* gén fejlődésspecifikusságának igazolását Northern analízissel végeztük el, ahol a totál RNS 9, 15, 24, 48, 72, 120 és 144 órás Vogel minimál tápoldatban rázatott (26C°, 180 rpm, sötét) gombából származott.

A kiütő konstrukció létrehozása, a *F. proliferatum* ITEM 2287 transzformálása

Higromicin rezisztenciát hordozó pAN7-1 (Punt et al., 1987) vektorból a higromicin-foszfotranszferáz kazettát (*hph*) amplifikáltuk, *pBluescript* II KS+ vektorba ligáltuk, így kaptunk egy általunk pPHP-nak nevezett plazmidot. Az *Fpmtr* gént tartalmazó pAPXbaI plazmidból PCR-rel felszaporítottunk egy 2,8 kb nagyságú darabot, amelyet pSTBlue-1 (Novagen) vektorba ligáltuk. Az így kapott, pAP-nek elnevezett plazmidot *NcoI* enzimmel emésztettük, a végeit feltöltöttük és a kieső 477 bp hosszúságú (az *Fpmtr* gén 637-1114 bp közötti) szakasz helyére a pPHP plazmidból *EcoRV* enzimmel kivágott és CIAP-pal kezelt *hph*-t ligáltuk. Az így létrehozott transzformáló vektort pAPPHP-nak neveztük el. A protoplaszt készítést, a pAPPHP vektorral történő transzformálást, a transzformánsok regenerálását és szelektálását higromicinnel Proctor és

munkatársai (1997) utasításai szerint végeztük. A transzformánsok monospórázása után - ismerve a gén és környezetének, valamint a vektornak a restriktív térképét -, Southern hibridizációs kísérlettel és PCR-rel igazoltuk a transzformáló vektor-konstrukció megfelelő beépülését a recipiens genomba.

A fumonizin B1 (FB1) termelés meghatározása

A fumonizin termelés meghatározásához 1% kukoricadara kivonatot tartalmazó módosított Myro tápoldatban tenyésztettük a gombákat sötétben, 28°C-on, rázatott (125 rpm) körülmények között, 5 napon át (Dantzer et al., 1996). A képződött micélium feltárását acetonitril alapú oldatban való egy órás rázatással végeztük, majd centrifugálás után (2 perc, 12000 rpm) a felülúszót 0,1 % PBS x Tween20 oldattal hígítottuk. Az FB1 mérés monoklonális antitesten alapuló ELISA eljárással történt a gyártó (Toxiklon ELISA kit) által ajánlott módszer szerint (Barna-Vetró et al., 2000).

Az *Fpmtr* szerepének vizsgálata a szexuális reprodukcióban és a vegetatív kompatibilitásban

A *F. proliferatum* törzsekből nitrátot nem hasznosító (*nit*) mutánsokat hoztunk létre klorátos táptalajon (Puhalla, 1985). Meghatároztuk a létrejött *nit* mutánsok fenotípusát különböző nitrogénforrásokkal kiegészített minimál táptalajon való növekedésük alapján, majd elvégeztük az úgynevezett komplementációs tesztet. Ennek során a komplementálható mutációkat hordozó *nit* mutánsokat párosával nitrogénforrásként csak nitrátot tartalmazó táptalaj felületére oltottuk (Correll et al., 1987).

A párosodási kísérleteket a peritéciumok kialakulásának kedvező sárgarépas táptalajon (200 g/l sárgarépa, 20 g/l agar) végeztük műanyag dobozokban, „veg-boxokban”, Klittich és Leslie (1988) leírása szerint. Vizes agaron növesztett gombáról lemosott konídiumokat hím partnerként, sárgarépas agaron tenyésztett gomba, mint női partner, micéliumával kevertük össze. 47 napon át 25°C-on inkubáltuk, 12 órás sötét periódust, 12 órás megvilágítottal váltogatva. A lejátszódó eseményeket (pionnoteszek, peritéciumok megjelenése, érése) sztereo mikroszkóp alatt rendszeresen nyomon követtük.

A vad típusú törzs és a $\Delta Fpmtr$ mutáns kolonizálási képességének vizsgálata kukoricán

F. proliferatum ITEM 2287 vad típusú törzsnek és $\Delta Fpmtr$ mutánsának micéliumával behálózott szalmát, cserepekbe helyezett sterilizált föld felső 5 centiméternyi rétegével kevertük össze (Oren et al., 2003). A kukorica magokat 1% (w/v) nátrium-hipoklorittal történő felületi sterilizálás után 2,5 cm mélyre ültettük el. A kukorica növényeket üvegházban neveltük 3 héten át, 25-28°C-on, természetes megvilágításban. Hetenként vágtuk le a növényeket közvetlenül a talaj felett, és miután 1% (w/v) nátrium-hipoklorittal elvégeztük a felületi sterilizálást, három részre daraboltuk. Ezekből

külön-külön DNS-t izoláltunk, majd templátként azonos koncentrációjú DNS-eket használva, *F. proliferatum* specifikus indítoszekvenciákkal PCR-t hajtottunk végre (Waalwijk et al., 2003). Mind a három részből *Fusarium* szelektív pepton-pentakloro-nitrobenzén (PCNB) táptalajra is helyeztünk le növénydarabokat, és szobahőmérsékleten 10 napon át inkubáltuk (Papavizas, 1967).

Eredmények

cDNS-AFLP kísérletek a *F. proliferatum* ITEM 2287 törzssel

Munkánk elsődleges célja az volt, hogy a *F. proliferatum* ITEM 2287 törzsben fejlődési stádiumtól függően expresszálandó géneket izoláljunk és jellemezzünk. Meghatároztuk a gomba növekedési görbéjét szárazanyagtömeg mérés alapján, és ezek alapján a 80-90 %-ban csírázásnak indult 9 órás, valamint a 202 órás késő stacioner fázisban lévő gombából nyert micéliumot használtuk a további cDNS-AFLP kísérletekhez. Mintegy 160 primerkombinációt használva 310 olyan fragmentumot generáltunk, amelyek vizuális becslés alapján a 9 és a 202 órás minták között szignifikáns intenzitásbeli különbséget mutattak. A kapott jelek erősségét, valamint méretét figyelembe véve negyvennyolcat Northern analízisnek vetettük alá azért, hogy igazoljuk a cDNS-AFLP kísérletek során kapott intenzitásbeli szignifikáns differenciációjukat. Ezek közül hét darab mutatott fejlődési állapottól függő expressziót, azaz csak ebben a hét esetben támasztottuk alá a cDNS-AFLP során kapott eredményeket.

Génbanki adatok alapján megállapítottuk, hogy ebből négy klón ad szignifikáns hasonlóságot valamilyen már ismert fehérjével. A csak 9 órás korban expresszálandó fragmentumok egyike a neutrális alifás és aromás aminosav permeázt kódoló *P. chrysogenum* *PcMTR* (Trip et al., 2004a), valamint a *N. crassa* *mtr* génjével mutatott azonosságot (Stuart et al., 1988; Koo és Stuart, 1991). A másik cDNS fragmentum, a *Colletotrichum lindemuthianum*ban a biotróf-nekrotrof állapot közötti átmenetet kontrolláló, GAL4 szerű transzkripciós faktort kódoló, *CLTA1* génnel adott homológiát (Dufrense et al., 2000). A 202 órás cDNS klónok közül az egyik a *N. crassa* mioinozit transzport fehérjéjét, valamint az *Apium graveolens* mannit transzporterét kódoló génnel (Noiraud et al., 2001), míg a másik a *S. cerevisiae* SAP155 fehérjéjét kódoló génnel adott szignifikáns hasonlóságot. A SAP155 a SIT4 foszfatázokkal alkotott komplexként, a mitózis késő G₁ fázisának számos életfolyamatában játszik szerepet (Luke et al., 1996).

A *F. proliferatum* ITEM 2287 törzs *Fpmtr* génjének jellemzése

A további kísérleteket a *PcMTR*-rel és az *mtr*-rel azonosságot mutató cDNS klónnal végeztük, mivel irodalmi adatok alapján a legtöbb aminosav transzporter fehérjéjét kódoló gén konstitutívan expresszálandó (Sophianopoulou és Diallinas, 1995), míg ebben az esetben fejlődésspecifikus

megnyilvánulást tapasztaltunk. A génbanki hasonlóságok alapján a gént *Fpmtr*-nek, a róla átiródó fehérjét pedig FpMtr-nek neveztük el. A gén teljes kópiájának izolálása érdekében elkészítettük a *F. proliferatum* genomi génkönyvtárát. A génen egy 156 bp, valamint egy 1230 bp hosszúságú exont azonosítottunk, köztük egy 53 bp hosszúságú intronnal. Az ATG kodon előtti 1097 bp-nyi szekvencia szakaszon jellegzetes CAAT boxokat azonosítottunk. A promóter régióban azonosítottunk még olyan kétszer ismétlődő TGA CTC szekvenciát, amely az aminosav bioszintézis általános szabályozásában résztvevő GCN4-szerű proteinek felismerő szekvenciája (Ebbole et al., 1991), valamint három ismétlésben a nitrogén anyagcsere folyamat szabályozásában részt vevő regulátor proteinek GATA magszekvenciáját (Marzluf, 1997). Az *Fpmtr* egy kópiában van jelen a *F. proliferatum* genomjában, és expressziós mintázata eltér az eddig ismert aminosav transzportert kódoló génekétől, ugyanis a gomba számára elérhető nitrogénforrástól függetlenül, mindig erősen expresszálódik csírázáskor, míg 48 órás kortól már nem nyilvánul meg. Azaz az *Fpmtr* valódi fejlődésspecifikus gén.

Az *Fpmtr* egy 462 aminosavból álló fehérjét kódol. Az FpMtr topológiai analizését a Kyte & Doolittle algoritmus alapján elvégezve megállapítottuk (Kyte és Doolittle, 1982), hogy a fehérjének valószínűleg 11 α -helikális membránt átérő doménje van, ugyanúgy ahogyan az egyedi AAP család tagjainak, amelybe egyes állati és növényi auxin és aminosav transzporterek, a *S. cerevisiae* vakuoláris aminosav transzporterei, valamint az Mtr-típusú fehérjék tartoznak (Young et al., 1999).

Az *Fpmtr* gén funkciójának vizsgálatához, a szelekciós markerként is szolgáló *hph* (higromicin foszfortranszferáz) kazetta felhasználásával pAPHPH-nak elnevezett kiütő konstrukciót készítettünk, amellyel transzformáltuk a *F. proliferatum* protoplasztjait. A higromicin rezisztens transzformánsok monospórázása után, Southern hibridizációs kísérlettel és PCR-rel igazoltuk a transzformáló vektor-konstrukció megfelelő beépülését a recipiens genomba. A kettős rekombináció két esetben történt meg, a $\Delta Fpmtr43$ és a $\Delta Fpmtr47$ jelű törzseknél.

ELISA eljárással (Barna-Vetró et al., 2000) meghatároztuk a vad típusú és $\Delta Fpmtr$ mutánsainak fumonizin termelését, és nem tapasztaltunk közöttük eltérést, minden törzs jelentős mennyiségben termelt FB1-et. A mutánsok normálisan növekedtek folyékony és szilárd tápközegben egyaránt, ugyanakkor a konídiumok csírázása kicsit elhúzódott a vad típuséhoz képest, és ezzel párhuzamosan abnormális csíratömlő fejlődést figyeltünk meg.

Megállapítottuk, hogy a $\Delta Fpmtr$ mutáns törzsek rezisztensek az FPA toxikus aminosav analógra ugyanúgy, ahogyan a *N. crassa mtr* hiányos mutánsai (Stuart et al., 1988). Az FPA bejutása a sejtbe a *N. crassa* három aminosav transzport rendszere közül, az *mtr* gén által kódolt neutrális és aromás aminosavak felvételéért felelős rendszerrel, valamint a *pmg* gén által kódolt általános aminosav transzport rendszerrel történik meg. Ez utóbbi működését az NH_4^+ ion jelenléte blokkolja (DeBusk és DeBusk, 1980). Nitrogénforrásként csak NH_4^+ iont tartalmazó minimál

tápotdatban a vad típusú törzs lényegesen érzékenyebben reagált az FPA jelenlétére. Szárazanyag tartalom mérés alapján, a vad típusú törzsekre nézve majdnem 80%-os inhibíciós hatással volt a 65 μ M FPA mennyiség. A leoltás után a 10. órában hozzáadott FPA esetén megmaradt a növekedésbeli különbség a mutáns és a vad törzsek között. Ugyanakkor a 20. órában hozzáadott FPA nem okozott különbséget a kétféle törzs növekedése között, a mutánsok ugyanúgy szenzitívek voltak a toxinra, mint a vad típusú törzs. Ez alátámasztja az *Fpmtr* gén expressziós vizsgálatának eredményét, miszerint a gén csak a csírázáskor és a növekedés korai szakaszában aktív.

Talajfertőzéses kísérlettel igazoltuk, hogy a *F. proliferatum* endofitonként kolonizálja a kukorica szöveteket, miközben a növény tünetmentes maradt. A *F. proliferatum*ra szelektív indítószekvenciákkal végzett PCR vizsgálat eredményeit alátámasztotta az a kísérlet, amelyben a levágott kukorica részeket *Fusarium* szelektív PCNB táptalajra helyeztük. A gomba 5-7 nap elteltével azokról a növényi részekről nőtt le a táptalajra, amelyekből PCR-rel is igazoltuk jelenlétét. A $\Delta Fpmtr$ mutánsok a kolonizálásban hátrányt szenvedtek.

A $\Delta Fpmtr$ mutánsok és a vad típusú törzs párosodási tulajdonságait vizsgálva szintén jelentős különbségeket figyeltünk meg. A $\Delta Fpmtr$ mutánsok hím-fertilitása nem változott, női fertilitásuk azonban jelentősen gyengült. Sárgarépa táptalajon történő, 47 napos tenyésztés után a peritéciumok száma 98 %-kal csökkent a vad típushoz képest, és csak a keresztezés utáni 26. napon történt megjelenésük, míg a vad típusú törzs esetében már a 8. napon.

A *F. proliferatum* ITEM törzseiből és a két $\Delta Fpmtr$ transzformánsból állítottunk elő nitrátot nem hasznosító mutánsokat. A vad típusú, ITEM 2287 törzs vegetatív önkompatibilis, azaz komplementer, nitrátot nem hasznosító mutánsai (*nit1*, *nitM* és *nit3*) nem hoznak létre életképes heterokarióta sejteket. A $\Delta Fpmtr$ *nit*-mutánsai azonban képesek voltak komplementálni a vad típusú törzs megfelelő auxotróf mutánsait, azaz ennek az érdekes és szokatlan aminosav transzporter génnek az inaktiválásával sikerült megszüntetni a vegetatív önkompatibilitást. Ugyanakkor a $\Delta Fpmtr$ mutánsok továbbra is vegetatív inkompatibilisek maradtak más *F. proliferatum* törzsekkel.

Új tudományos eredmények

1. A *F. proliferatum*ban fejlődési stádiumtól függő expressziós különbségek kimutatására szolgáló cDNS-AFLP eljárással számos cDNS klónt azonosítottunk. Köztük, génbanki homológiák alapján, egy neutrális alifás és aromás aminosav transzporter gént (*Fpmtr*).
2. A *F. proliferatum* genomi génkönyvtárából izoláltuk az *Fpmtr* gén teljes kópiáját, amelyen két exont azonosítottunk (156 és 1230 bp hosszúságúak), közöttük egy rövid (53 bp hosszúságú) intronnal.
3. Megállapítottuk, hogy a génről átíródó FpMtr transzporter fehérjének valószínűleg 11 transzmembrán doménje van. Ez alapján az AAAP családba sorolt, ritkán előforduló Mtr-

típusú aminosav permeázokat az FpMtr transzportterrel, mint újabb taggal bővítettük. A *G. fujikuroi* gyűjtőfajnak ez az első leírt aminosav transzportere.

4. *hph* (higromicin foszfortranszferáz) kazetta felhasználásával két *Fpmtr* null mutánst hoztunk létre, amelyek rezisztensek a p-fluoro-fenilalanin (FPA) toxikus aminosav analógra. Megállapítottuk, hogy ellentétben a fonalas gombák eddig ismert neutrális aminosav transzportereivel, amelyek konstitutívan expresszálódnak, az új aminosav transzporter gén határozottan erős expressziót mutat konídium csírázáskor, de 48 órás korban már nem észlelhető transzkripciója.
5. A vad típusú és a $\Delta Fpmtr$ mutáns törzsek fenotípusos összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy a *F. proliferatum* *Fpmtr* génje mind a szexuális, mind a paraszexuális folyamatokban kitüntetett szerepet játszik, s ez a transzporter a növényi szövetben való kolonizációs aktivitásra is hatással van.

Következtetések és javaslatok

A *F. proliferatum* ITEM 2287 törzsben a fejlődési stádiumtól függően expresszálódó gének keresését cDNS-AFLP módszerrel végeztük. Az ennek során kapott, több mint 300 differenciáló fragmentumból végül csak hét bizonyult ígéretesnek Northern-hibridizációval történt ellenőrzés után is. A módszer kitalálójának és első alkalmazójának véleménye szerint, a hagyományos RNS-analizáló Northern kísérletek eredményét teljes mértékben tükrözi a cDNS-AFLP-t alkalmazó vizsgálatok eredménye, tehát annak kiváltására alkalmas (Bachem et al., 1996). Kísérleteink eredményeiből azonban levonható az a következtetés, hogy a cDNS-AFLP módszer eredményeit minden esetben alá kell támasztani egy független vizsgálattal, mint amilyen a Northern analízis, vagy a szekvencia adatok birtokában végezhető Real Time PCR.

A cDNS-AFLP kísérletek során kapott, csak 9 órás korban megnyilvánuló klónok egyike, a *P. chrysogenum* *PcMTR* génjével (Trip et al., 2004a), valamint a *N. crassa* úgynevezett metiltriptofán (*mtr*) rezisztens génnel mutatott azonosságot (Stuart et al., 1988; Koo és Stuart, 1991), amelyek egyaránt aromás és neutrális alifás aminosav transzportert kódolnak. Az aszkomicéta gombák közül az *A. nidulans*, a *P. chrysogenum* és a *N. crassa* aminosav permeázairól szóló irodalmat tudtuk felhasználni kísérleteinkhez, ugyanis a *G. fujikuroi* aminosav transzport rendszeréről semmilyen információval nem rendelkezünk.

A fejlődésspecifikus tulajdonságot mutató gént *Fpmtr*nek neveztük el, és a *F. proliferatum* genomai génkönyvtárából izoláltuk teljes kópiáját. A promóter régióban azonosított szekvencia motívumok alapján valószínűnek tűnik, hogy a *F. proliferatum*ban is jelen vannak a GCN4-szerű és a GATA-típusú transzkripciós faktorok. Ebből tovább következtethetünk arra, hogy a nitrogén

katabolit represszió a *F. proliferatum*-ban is fontos szerepet játszhat az aminosav felvétel szabályozásában. Ennek bizonyításához elvégeztük a $\Delta Fpmtr$ mutáns és a vad típusú törzs FPA toxikus aminosav analóggal szembeni érzékenységének összehasonlítását, NH_4^+ iont tartalmazó minimál táptalajban. Az FPA felvételében valószínűleg két aminosav transzporter vesz részt, ahogyan a *N. crassus*-ban (DeBusk és DeBusk, 1980). Az egyik (talán az általános aminosav permeáz) NH_4^+ ion jelenlétében nem, vagy alig működik – a *N. crassus*-hoz hasonlóan –, így az FPA bejutása a sejtekbe az FpMtr segítségével történik. Ezért tapasztalhattunk NH_4^+ ion tartalmú tápközegben a $\Delta Fpmtr$ mutánsokban nagyobb rezisztenciát az FPA-val szemben, mint a vad típusú törzsben. Tehát a *F. proliferatum*-ban, az aminosavak felvételének szabályozásában a nitrogén katabolit represszió valóban szerepet játszik. Ugyanakkor kérdéses, amennyiben az NH_4^+ ion nem blokkolja az FpMtr-el történő aminosav transzportot, akkor miért van jelen az *Fpmtr* gén promóter régiójában a GATA szekvencia motívum? Ahogyan az aminosav éhezés sem okozott változást az *Fpmtr* expressziójában, pedig a GCN4-szerű regulátor fehérjék kötőhelyeként azonosított TGACTC szekvencia sor is megtalálható a promóter részben. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy nem találtunk növekedésbeli különbséget a vad és a mutáns törzs között akkor, amikor a gombákat különböző aminosavakkal kiegészített minimál tápoldatban tenyésztettük. Ez alapján nem tudtuk meghatározni, hogy mely aminosavak szállítását végzi az FpMtr fehérje, sőt még azt sem, hogy egyáltalán végez-e aminosav felvételt. Bár ez utóbbi kérdést eldönteni látszik a vad és a mutáns törzseknek az FPA jelenlétére adott szenzitivitásbeli különbsége. A kérdés végső megválaszolására, érdemes lenne radioaktív szén-14 tartalmú aminosavakkal megvizsgálni az FpMtr transzporter szerepét.

Az FPA-val kapcsolatos kísérletek eredményei, valamint az FpMtr transzporter topológiai analízise megerősítettek bennünket abban, hogy az *Fpmtr* gén egy olyan fehérjét kódol, amely az Mtr-típusú proteinek közé tartozik, azaz az AAAP család tagja (Young et al., 1999). Ugyanakkor, míg az *Fpmtr* fejlődésspecifikusságot mutat, azaz korai életszakaszban aktív és az öregedő gombában represszált a gén, addig az *mtr* konstitutívan expresszálódik minimál tápközegben (Koo és Stuart, 1991; Wolfenbarger, 1980). Az irodalomban leginkább csak olyan aminosav transzportereket találunk, amelyek a tápközegben jelenlevő tápanyag által erősen szabályozottak, vagy kódoló génjük konstitutívan expresszálódik egész életük folyamán (Gow és Gadd, 1995). Ez alól ritka kivétel a szaprofiton *A. nidulans prnB* génje, amelynek expresszióját egyaránt indukálja a prolin jelenléte, az aminosav éhezés és a konídiumok csírázása, ugyanakkor az ammónia és a glükóz együttes jelenléte represszálja működését (Tazebay et al., 1997). Az *Fpmtr* expresszióját azonban vizsgálataink szerint nem befolyásolja a tápközeg minősége, hanem mindig ugyanazt az expressziós mintázatot mutatja.

Mindezek alapján felvetődik annak a lehetősége, hogy ha az FpMtr végez is valamilyen aminosav transzport tevékenységet, mégis inkább receptor/szenzor fehérjeként működhet. Trip és munkatársai (2004a) szerint az Mtr homológoknak a gomba genomokban található alacsony kópiaszáma is azt a hipotézist erősíti, miszerint az Mtr-típusú fehérjék szenzor funkciót láthatnak el. A $\Delta Fpmtr$ mutánsokban észlelt fenotípusos változások alátámasztják az Mtr transzporterek szenzorként való működését. Az *Fpmtr* inaktiválása késlelteti a konídiumok csírázását, és ezzel párhuzamosan a csíratömlő deformált növekedése figyelhető meg, ami talán a növekedésben bekövetkező átmeneti zavar eredménye lehet.

A *G. fujikuroi* gyűjtőfaj tagjai endofiton életmódot folytatva kolonizálhatják gazdanövényeiket (Leslie és mtsai., 1990), de nem ismert még, hogy miért fordulhat elő ez a tünetmentes fertőzés, és mi váltja ki végül a rothadást, vagy a hervadást a gomba által kolonizált szövetekben (Munkvold és Desjardins, 1997). Talajfertőzéses kísérleteink során megállapítottuk, hogy a *F. proliferatum*-ra is jellemző az endofiton életmód, hiszen a gomba jelenlétét tünetmentes kukoricában ki tudtuk mutatni. Ugyanakkor, a kukorica szövetek kolonizálásában az *Fpmtr* hiánya hátrányt jelentett a gomba számára, azt sejtetve, hogy a nem optimális környezeti feltételekhez való alkalmazkodásban komoly feladata lehet a génnek.

A *G. fujikuroi*-ban a peritéciumok képződéséhez igen nehéz a megfelelő körülményeket biztosítani, de ha az megtörténik, akkor a gomba szexuális ciklusa beindítható (Klittich és Leslie, 1988). E folyamat genetikai háttere meglehetősen bonyolult, és jórészt még felderítetlen. Az *Fpmtr*-nek szerepe lehet benne, így magyarázható, hogy hiánya valamilyen jelátviteli zavart okozva gyengíti a gomba női fertilitását. Az *Fpmtr* működése a vegetatív inkompatibilitás jelenségével is kapcsolatba hozható. Az FpMtr szenzor funkcióját erősíti meg az az eredményünk, miszerint a vegetatív önincompatibilis vad típusú törzs *nit* mutánsait a $\Delta Fpmtr$ *nit* mutánsok képesek voltak komplementálni.

Úgy tűnik tehát, hogy az *Fpmtr* számos fejlődési folyamatban játszik szerepet, úgy mint a szexuális és paraszexuális rekombinációban, esetleg a környezeti felvételekhez való adaptálódásban. Az FpMtr pedig inkább szenzor/receptor fehérje, mintsem tipikus aminosav transzporter. Érdeemes lenne azért megvizsgálni radioaktív technikával, végez-e valamilyen aminosav felvételt az FpMtr? A már más gombákban ismert, aminosav felvételben szerepet játszó transzportereket, transzkripciós faktorokat kódoló gének szekvenciái alapján pedig fel lehetne deríteni a *F. proliferatum* teljes aminosav transzport rendszerét.

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.
- Bachem, C.W.B., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil D., Zabeau, M. and Visser, R.G.F. (1996): Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9:745–753.
- Bacon, C.W., Porter, J.K., Norred, W.P. and Leslie, J.F. (1996): Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4039-4043.
- Barna-Vetró, I., Szabó, E., Fazekas, B. and Solti, L. (2000): Development of a sensitive ELISA for the determination of fumonisin B₁ in cereals. *J. Agric. Food Chem.* 48:2821-2825.
- 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.
- Dantzer, W.R., Pometto, A.L. 3rd and Murphy, P.A. (1996): Fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* strain M5991 in a modified Myro liquid medium. *Natural Toxins* 4:168-173.
- DeBusk, R.M. and DeBusk, A.G. (1980): Physiological and regulatory properties of the general amino acid transport system of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 143:188-197.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D. and Nelson, P.E. (1997): Production of fumonisin B₁ and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice and from various geographical areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1838-1842.
- Didion, T., Regenbreg, B., Jorgensen, M.U., Kielland-Brandt, M.C. and Andersen, H.A. (1998): The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 27:643-650.
- Dufrense, M., Perfect, S., Pellier, A.L., Bailey, J.A. and Langin T (2000): A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Plant Cell* 12:1578-1589.
- 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 Pathology* 52:426.
- Ebbole, D.J., Paluh, J.L., Plamann, M., Sachs, M.S. and Yanofsky, C. (1991): *cpc-1*, the general regulatory gene for genes of amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*, is differentially expressed during the asexual life cycle. *Mol. Cell. Biol.* 11:928-934.
- Elmer, W.H. (1990): *Fusarium proliferatum*, as casual agent in Fusarium crown an root rot of asparagus. *Plant Disease* 74:938.
- Forsberg, H., Ljungdahl, P.O. (2001): Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.* 21:814-826.
- Gow, N.A.R. and Gadd, G.M. (1995): *The Growing Fungus*. London: Chapman and Hall.
- Jack, D.L., Paulsen, I.T. and Saier, M.H. (2000): The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146:1797-1814.
- Klasson, H., Fink, G.R. and Ljungdahl, P.O. (1999): Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.* 19:5405-5416.

- Klittich, C.J.R. and Leslie, J.F. (1988): Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118:417-423.
- Koo, K. and Stuart, W.D. (1991): Sequence and structure of *mtr*, an amino acid transport gene of *Neurospora crassa*. *Genome* 34:644-651.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Leslie, J.F. (1995): *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Can. J. Bot.* 73:S282–S291.
- Leslie, J.F., Pearson, C., Nelson, P. and Toussoun, T. (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., Mule, G., Moretti, A. and Ritieni (2004): A 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.
- Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A. and Corda, P. (1995): Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease* 79:727-731.
- Luke, M.M., Della, Seta, F., Di Como, C.J., Sugimoto, H., Kobayashi, R. and Arndt, K.T. (1996): The SAPs, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 16:2744-2755.
- Marasas, W.F.O., Thiela, P.G., Rabie, C.J., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A. (1986): Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 78:242-247.
- Margolis-Clark, E., Hunt, I., Espinosa, S. and Bowman, B.J. (2001): Identification of the gene at the *pmg* locus, encoding system II, the general amino acid transporter in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 33:127-135.
- Marzluf, G.A. (1997): Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:17-32.
- Moretti, A., Logrieco, A., Doko, B., Frisullo, S., Visconti, A. and Bottalico, A. (1997): *Fusarium proliferatum* from asparagus in Italy: Occurrence, fertility and toxigenicity. *Cereal Res. Comm.* 25:785-786.
- Munkvold, G.P. and Desjardins, A.E. (1997): Fumonisin in Maize: Can we reduce their occurrence? *Plant Disease* 81:556-565.
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. and Desjardins, A.E. (1992): Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:985-989.
- Noiraud, N., Maurousset, L. and Lemoine, R. (2001): Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* 13:695-705.
- 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.* 69:1695-1701.
- Papavizas, G.C. (1967): Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of *Fusarium* from soil. *Phytopathology* 57:848-852.

- 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.
- Puhalla, J.E. (1985): Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63:179-183.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, 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.
- Ritieni, A., Fogliano, V., Randazzo, G., Scarallo, A., Logrieco, A., Moretti, A., Mannina, L. and Bottalico, A. (1995): Isolation and characterization of fusaproliferin, a new toxic metabolite from *Fusarium proliferatum*. *Natural Toxins* 3:17-20.
- Russnak, R., Konczal, D. and McIntire, S.L. (2001): A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* 276:23849-23857.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sophianopoulou, V., Diallinas, G. (1995): Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:53-75.
- Stuart, W.D., Koo, K. and Vollmer, S.J. (1988): Cloning of *mtr*, an amino acid transport gene of *Neurospora crassa*. *Genome* 30:198-203.
- Tazebay, U.H., Sophianopoulou, V., Scazzocchio, C. and Diallinas, G. (1997): The gene encoding the major proline transporter of *Aspergillus nidulans* is upregulated during conidiospore germination and in response to proline induction and amino acid starvation. *Mol. Microbiol.* 24:105-117.
- Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A. and Nieuwenhuis, J.J. (1991): Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1089-1093.
- Trip, H., Evers, M.E. and Driessen, A.J.M. (2004a): PcMtr, an aromatic and neutral aliphatic amino acid permease of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* 1667:167-173.
- Trip, H., Evers, M.E., Kiel, J.A. and Driessen, A.J. (2004b): Uptake of the beta-lactam precursor alpha-amino adipic acid in *Penicillium chrysogenum* is mediated by the acidic and the general amino acid permease. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4775-4783.
- 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.
- Waalwijk, C., Kastelein, P., de Vries, I., Kerényi, Z., van der Lee, T., Hesselink, T., Köhl, J. and Kema G. (2003): Major Changes in *Fusarium* spp. in Wheat in the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:743-754.
- Wolfenbarger, L. (1980): Transport and utilization of amino acids by fungi. 63-87. p. In: Payne, J. W. (ed): *Microorganisms and nitrogen sources*. New York: Wiley.
- Young, G.B., Jack, D.L., Smith, D.W. and Saier, M.H. Jr. (1999): The amino acid/auxin: proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta* 1415:306-322.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

TUDOMÁNYOS DOLGOZATOK

Jeney, A., Béki, E., Keszthelyi, A., Leslie, J.F. and Hornok, L. (2006): Inactivation of *Fpmtr*, an amino acid transporter gene causes communication disturbances in *Fusarium proliferatum*. *Journal of Basic Microbiology* (közlésre benyújtva)

Jeney, A., Béki, E., Mulé, G. and Hornok, L. (2004): Identification of growth stage specific transcript profiles in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi*, mating population D) by cDNA-AFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology* 110: 619-625.

A DOKTORI KÉPZÉS ALATT MÁS TÉMÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS DOLGOZATOK

Waalwijk, C., Keszthelyi A., van der Lee, T., **Jeney, A.**, de Vries, I., Kerényi, Z., Mendes, O. and Laszlo Hornok (2006): Mating type loci in *Fusarium*: structure and function. *Mycotoxin Research* 22:xx-xx (megjelenés alatt)

Hornok László, Békési Pál, Giczey Gábor, **Jeney Apor**, Nicholson Paul, Parry David, Ritieni Alberto, Xu Xingming (2005): Kalászfuzáriózis kórokozók előfordulása és a mikotoxin szennyeződés mértéke magyarországi őszi búza állományokban 2001. és 2004. között. *Növénytermelés* 54: 217-235

Fekete-Forgács, K., **Jeney, A.**, Varga, G. and Lenkey, B. (2000): Investigation of alpha-glucosidase as a potential virulence factor of *Candida albicans*. *Journal of Basic Microbiology* 40: 105-110.

KONFERENCIA ELŐADÁSOK, POSZTEREK:

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

Keszthelyi Anita, Ineke de Vries, **Jeney Apor**, Kerényi Zoltán, Odette Mendes, Theo van der Lee, Cees Waalwijk, Hornok László (2005): Tagging target genes up-regulated by the MAT-2 product in *Fusarium verticillioides*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely

Oláh Brigitta, Kerényi Zoltán, **Jeney Apor**, Keszthelyi Anita, Hornok László (2005): Cloning and characterization of *Fpac1*, an adenylate cyclase gene from *Fusarium proliferatum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése 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 Δ MAT-2 strain of *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Mycoglobe EU-USA Bilateral Workshop on Toxigenic Fungi and Mycotoxins, New Orleans, USA*

Jeney Apor, Béki Emese, Keszthelyi Anita, Hornok László (2004): Fonalasgombák aminosav transzporterei, egy hipotetikus aminosav permeáz gén izolálása *Fusarium proliferatum*ból. *Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely*

Jeney Apor, Moretti Antonio, Barna-Vetró Ildikó, Posta Katalin, Hornok László (2002): Molekuláris módszerek a *Gibberella fujikuroi* fumonizin termelő és nem termelő törzseinek elkülönítésére. *Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely*

Fekete, C., Mulé, G., **Jeney, A.** and Hornok, L. (2002): Differentiating between fumonisin producing and non-producing strains of *Gibberella fujikuroi* by DDRT-PCR. *6th European Conference on Fungal Genetics, Pisa*