

Egy 10,3 kb méretű, lineáris, a mitokondriumban lokalizált DNS-plazmidot izoláltunk a *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*) ITEM 2337-es törzséből, és a plazmidot pFP1-nek neveztük el. Proteináz és exonukleáz hasítások azt mutatták, hogy a plazmid 5' végeit kovalens kötésekkel kapcsolódott terminális fehérjék védik.

A plazmid szerkezetét restrikciós térképezéssel, illetve az ezt követő szekvenálással határoztuk meg. A szekvenciát deponáltuk a GenBank adatbázisba, az EF622512-es azonosítószám alatt. A teljes szekvencia meghatározásával kiderült, hogy a plazmid DNS 10 336 nt-ből áll. A plazmidot két 400 bp hosszúságú, fordítottan ismétlődő szakasz szegélyezi (terminal inverted repeat; TIR). Két fő, az ellentétes szálakon elhelyezkedő, de nem átfedő nyitott olvasási keretet (open reading frame; ORF) azonosítottunk. Az egyik egy fág-típusú RNS polimerázt (ORF1), a másik pedig egy B-típusú DNS polimerázt (ORF2) kódol.

Alacsony mértékű szekvenciabeli hasonlóságok arra engedtek következtetni, hogy a terminális fehérjéket az ORF2 5' végén található szakaszok kódolják. Egy kisebb ORF-et is azonosítottunk, amely ugyancsak kismértékű egyezések alapján, de hasonlóan mutatkozott a fehér korhadást okozó *Pleurotus ostreatus* gombából izolált pMLP1 plazmid mORF1 szakaszához. A hasonlóságot az is erősíti, hogy a pFP1-ben talált kisebb ORF által kódolt fehérje is erősen bázikus ( $pI = 9,25$ ), és valószínű, hogy egy TIR-kötő fehérjét kódol.

Az ORF2, illetve az mORF transzkripcióját indító kodonok TIR régió azonos pozíciójában helyezkednek el. RT PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy az mORF együtt íródik át az ORF1-el. Az ORF1 és ORF2 egy 210 bp-os intergénikus szekvencia választja el egymástól, amely egy 24 bázispáros palindrom szekvenciát is tartalmaz. RT PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy a két nagy transzkriptumban nincs átfedés, így elképzelhető, hogy az intergénikus palindrom transzkripció stop szignálként működik. Hasonló intergénikus palindrom szekvenciát számos plazmidnál kimutattak már.

Az ORF1 szekvenciája erős hasonlóságot mutatott az egy peptidláncból álló RNS-polimerázokhoz, illetve a bakteriofágok és más mitokondriális plazmidok RNS-polimerázaihoz. A ORF1 származtatott aminosavsorrendje 41, 36 és 27 %-os azonosságot mutatott a *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* Bgh, a *Claviceps purpurea* pCLK1, illetve a *Podospora anserina* pAL2-1 plazmidjának RNS polimerázaihoz. További vizsgálatokkal az egy peptidláncból álló RNS-polimerázok mind a 11 konzervált doménjét is azonosítottuk az ORF1-ben.

Az ORF2 C-terminális része hasonlóságot mutatott a bakteriofágok és más mitokondriális plazmidok B típusú DNS-polimerázaihoz. Az összes konzervált exonukleáz és polimeráz domént is azonosítottuk ebben a régióban. A ORF2 származtatott aminosavsorrendje 24, 23 és 19 %-os azonosságot mutatott a *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* Bgh, a *Claviceps purpurea* pCLK1, illetve a *Podospora anserina* pAL2-1 plazmidjának DNS polimerázaihoz. Ez a viszonylag alacsony szintű homológia a hosszú C- és N-terminális részeknek tulajdonítható. RT PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy ezek a szakaszok is átíródnak, ám homológiát semmilyen adatbázisban található szekvenciához nem mutattak. Amikor az ORF2 konzervatív doménjeit tartalmazó szakaszt (700-1291 aa) használtuk a szekvenciák összehasonlításához, 51, 50 és 38 %-os azonosságot mutatott a *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* Bgh, a *Claviceps purpurea* pCLK1, illetve a *Podospora anserina* pAL2-1 plazmidjának DNS polimerázaihoz. Az mORF részleges hasonlóságot (51% a DNS szintjén) mutatott a *Pleurotus ostreatus* pMLP1 plazmidjában kimutatott mORF-hez. Mindkettő ORF egy erősen bázikus fehérjét kódol, vélhetően TIR-kötő fehérjeként funkcionálnak.

A pFP1 azonosítására tervezett indítószekvenciák segítségével mintegy 210 izolátumot tesztelve további hat *F. proliferatum* izolátumban is kimutattuk a plazmid jelenlétét. Valós idejű PCR vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a plazmid 0,6-3,4 kópiában van jelen a mitokondrium genomhoz viszonyítva.

Az ORF1 és az ORF2 konzervatív szakaszaira tervezett indítószekvencia párok segítségével egy 1136, illetve egy 831 bp-os szakaszt szaporítottunk és szekvenáltunk a plazmidtartalmú izolátumokból. A szekvenciákban nem tapasztaltunk eltérést, ami azt mutatta, hogy a földrajzilag eltérő helyről izolált tenyészetek azonos plazmidot tartalmaztak. Ez a mitokondriális plazmidok horizontális terjedését támasztja alá.

Két törzsből megkíséreltük a plazmid irtását, hogy megkeressük a plazmid jelenlétéből fakadó fenotípusváltozásokat. Kimutattuk, hogy a szakirodalomban eddig az irtásra kidolgozott egy lépéses, etídium-bromiddal történő kezelés esetünkben hatástalan. Valós idejű PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy a kezelést túlélő izolátumok többségében a plazmidtartalom nem is változott. A vizsgált mintegy 350 túlélő tesztelése nyomán mindössze 3 olyan izolátumot találtunk, melyben a plazmidtartalom több nagyságrenddel csökkent. Ezen túlélők további fenntartása/átoltása során a plazmidtartalom folyamatosan növekedett, majd elérte a kiindulási értéket (0,6-3,4 kópia/mitokondrium). A plazmid irtása egy kezelést követő regenerálás során tehát nem sikerült, a plazmidtartalmukban nagymértékű csökkenést mutató túlélők további monospórás szelekciója vezetett eredményre, amely már mintegy 70%-os arányban eredményezett plazmidmentes tenyészeteket.

A plazmidtól megfosztott tenyészetek azonban sem növekedésükben, sem fumonizin B1 toxintermelésükben nem mutattak eltérést a plazmidtartalmú „szülő” megfelelő tulajdonságaitól.

Fusarium-fajokkal végzett biodiverzitás vizsgálataink során a *F. subglutinans* és *F. verticillioides* fajokat vizsgáltuk behatóbban.

Azonosítottuk 206, az előzetes morfológiai vizsgálatok alapján *Fusarium subglutinans*-nak azonosított izolátum mitokondriális DNS (mtDNS) RFLP profilját. 184 izolátum két, egymáshoz nagyon hasonló RFLP típusba tartozott. A két RFLP típusból 12-12 izolátum vizsgálata magi gének (beta-tubulin, hiszton H3, calmodulin és IGS) szekvenciáinak

segítségével igazolta, hogy e két RFLP-mintázat valóban a *F. subglutinans* faj mtDNS-ét jellemzik. A gének szekvenciáit felhasználva RFLP markert terveztünk a két csoport azonosítására, és a 186 izolátum beta tubulin és hiszton H3 RFLP vizsgálatával kimutattuk, hogy a két csoport a *F. subglutinans* fajon belüli két csoportját jellemzik, melyet dél-afrikai kutatók (Steenkamp és mtsai) azonosítottak korábban.

Az európai mintákat további vizsgálatoknak vetettük alá. További 36 izolátum beta-tubulin, hiszton H3, calmodulin és IGS szekvenciáit azonosítottuk és elemeztük. A két csoport között 22 helyen azonosítottunk fixálódott nukleotideltéréseket, ami további bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a két csoport filogenetikailag elkülönült egymástól. Steenkamp és munkatársai azonban az egyes csoportokon belül is önálló filogenetikai vonalakat mutattak ki. Vizsgálataink azonban cáfolták ezt az elméletet. Annak ellenére nem tudtunk azonosítani fixálódott nukleotideltéréseket, hogy egy csoporton belül is egy adott gén több allélját azonosítottuk. Ez arra utal, hogy a természetben gyakori a két csoporton belüli meiotikus rekombináció, míg a két csoport között ez kizártnak tűnik.

101 európai izolátum (62 az 1-es, 39 a 2-es csoportba tartozott) mikotoxin-termelését is vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az 1-es csoport izolátumainak 77 %-a termelt kimutatható mennyiségű beauvericint (10-532 µg/g), míg a 2-es csoport egyetlen izolátuma sem termelte ezt a toxint. Ezzel elsőként mutattunk ki eltérést a két csoport fenotípusában, ami további bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a két csoport izolálódott a természetben.

A morfológiailag ugyan *F. subglutinans*nak határozott, banánról, egy orchideafajról, illetve sárkányfűről izolált tenyészetek eltérő mtRFLP mintázatokat mutattak az 1-es és 2-es csoportra jellemző RFLP mintázatoktól. Az izolátumok vizsgálata magi gének (beta-tubulin, hiszton H3, illetve calmodulin) szekvenciáinak segítségével azt mutatta, hogy a vizsgált izolátumok 3 új fajba tartoznak. A fajok morfológiai vizsgálata és leírása folyamatban van.

Fusarium-fajokkal végzett biodiverzitás vizsgálatainkat a *F. moniliforme* (*F. verticillioides*) elemzésével folytattuk. 174 izolátum HaeIII restrikciós enzimmel kapott mitokondriális RFLP mintázatát azonosítottuk. Hat haplotípust különítettünk el. A banánról származó izolátumok (18 db) elkülönültek a főleg kukoricáról és még néhány más gazdáról (*Triticum* sp., *Hordeum vulgare*, *Cucumis melo*) származóktól, és két egymással csaknem megegyező, csak a banánról izolált mintákban azonosított 5-ös és 6-os haplotípusokba tartoztak. A többi 156 izolátumból 144 az 1-es haplotípusba tartozott, és további 12 mintázat az 1-es típushoz igen hasonló 2-4-es haplotípusokat képviselték.

Elképezhető, hogy a banánról származó izolátumok önálló filogenetikai vonalat képviselnek a *F. moniliforme* fajon belül. Ennek eldöntésére azonban további vizsgálatok szükségesek.