

Reprodukciós stratégiák a *Gibberella fujikuroi*-ban (T 043221)

Bevezetés

A *Gibberella fujikuroi* gyűjtőfaj, amely jelenleg kilenc párosodási populációt (biológiai fajt) és több tucat kizárólag ivartalanul szaporodó vonalat foglal magában (Leslie, 1995, Nirenberg és O'Donnell, 1998). Újabb rendszertani feldolgozásokban a biológiai fajokat szabályos binomiális névvel írták le (*G. circinata*, *G. fujikuroi*, *G. intermedia*, *G. konza*, *G. moniliformis*, *G. nyagamai*, *G. sacchari*, *G. subglutinans*, *G. thapsina*), melléjük rendelve a megfelelő *Fusarium* anamorf neveket (Desjardins 2003, Zeller et al. 2003). Ezek a gombák világszerte elterjedtek, s a legkülönbözőbb gazdanövényekről – így banánról, búzáról, cirokról, cukornádról, fenyőfákról, fűgéről, kukoricáról, mangóról, paradicsomról, rizsről – izolálták őket (Leslie és Summerell, 2006). A fajkomplexum tagjai egy sor másodlagos anyagcsereterméket termelnek, többek között fumonizineket (Thiel et al. 1991), gibberellinsavat (Tudzynski és Hölter, 1998), moniliformint (Leslie et al. 1996) fuzarinsavat (Bacon et al. 1996), beauvericint (Logrieco et al. 1998) és fuzaproliferint (Ritieni et al. 1995), amelyek élelmiszereket és takarmányt szennyezve humán- és állategészségügyi veszélyt jelentenek.

Ivaros szaporodás a *Fusarium/Gibberella*-fajokban

Az ivaros szaporodó *Gibberella/Fusarium*-fajok döntő többsége heterothalliás, azaz csak két, ellentétes párosodási típusba tartozó törzs közötti kölcsönhatás vezethet ivaros struktúrák megjelenéséhez. Ezekben a fajokban több-kevesebb rendszerességgel végbemegy a meiózisos rekombináció, amely a fajon belüli változékonyság leghatékonyabb gerjesztője, s működése új mikotoxin kemotípusok vagy virulens vonalak kialakulásával jár. Egyetlen homothalliás faj ismert a nemzetségben, a *G. zaeae* (*F. graminearum*), amelynek egyedei egyazon telepen belül is képesek ivaros struktúrák kifejlesztésére, ami azzal az előnnyel jár, hogy ily módon hatékony inokulumforrásként szolgáló aszkospórák képződhetnek nagy tömegben. Ugyanakkor, számos olyan, növénykórtani és toxikológiai szempontból egyaránt fontos faj van a nemzetségben (és a *G. fujikuroi* fajkomplexumom belül is), amelyeknek nem ismert az ivaros alakjuk, s mai tudásunk szerint kizárólag aszexuálisan szaporodó klónos vonalak alkotják populációikat (**Hornok, 2007**). Elméleti megfontolások szerint az első csoportba

tartozó fajokban nagy, a másodikba soroltakban mérsékelt, a harmadikba tartozókban pedig igen mérsékelt lehet a fajon belüli geno- és fenotípusos variabilitás. Ezt azonban nem igazolják a különböző felmérések: 'aszexuálisnak' ismert fajok is lehetnek nagyok sikeres kórokozók, s rájuk is jellemző a morfológiai, élettani, molekuláris sokszínűség, valamint a mikotoxin termelés változatossága (Nagy et al. 1995, Kerényi et al. 1987*).

Az ivaros szaporodás genetikai háttere

Más tömlősgombákhoz hasonlóan a *Gibberella*-fajokban is egyetlen lókuszt, a *mating type locus* szabályozza az ivaros szaporodást (Fincham et al. 1979). A heterothalliás fajok ellentétes párosodási típusba tartozó törzseiben ennek a lókusznak egyik vagy másik allélja van jelen, a *MAT1-1* és *MAT1-2* idiomorfok, amelyek három (*MAT1-1-1*, *MAT1-1-2* és *MAT1-1-3*), illetve egy (*MAT1-2-1*) gént tartalmaznak, homothalliás fajokban viszont mindkét idiomorf megtalálható ugyanazon törzsben, még hozzá szorosan kapcsoltnak (Yun et al. 2000; Waalwijk et al. 2006.). A kizárólag ivartalanul szaporodó *Fusarium*-fajok közül először a *F. oxysporum*-ban igazolták a MAT gének jelenlétét és transzkripcióját (Arie et al. 2000). Később sikerült olyan diagnosztikai PCR primereket kifejleszteni (Kerényi et al. 1999), amelyek segítségével minden eddig megvizsgált *Fusarium*-fajban ki lehetett mutatni a MAT gének jelenlétét, sőt RT-PCR és Northern analízissel azt is igazolták, hogy ezek a gének hibátlanul átíródnak (Kerényi et al. 2004). Összesen 22 *Fusarium*-fajt vontak be ezekbe a vizsgálatokba, s mert közülük 17 mitózisos holomorf volt kimondható, hogy valószínűleg minden 'aszexuális' *Fusarium*-fajnak ép és konstitutívan átíródó MAT génjei vannak.

A MAT idiomorfokban található kódoló szekvenciák közül a *MAT1-1-1* és a *MAT1-2-1* az ivaros kommunikáció legfőbb szabályozói (Turgeon, 1998). E gének termékei konzervatív α -box, illetve HMG-box (high mobility group) doméneket tartalmaznak. Más aszkomicétákban ezek a transzkripció faktorok feromon receptor és feromon prekursor géneket szabályoznak (Pöggeler, 2000; Pöggeler és Kück, 2001). Feromon kommunikáció teszi lehetővé az ellentétes párosodási típusba tartozó törzsek kölcsönös felismerését (Bistis, 1983), de bizonyos megtermékenyítés utáni eseményekre (ilyen pl. a zigótává egyesülő két sejtmag közötti felismerésre) is hatással vannak a feromonok (Debuchy, 1999).

Nem tudjuk, miért tartalmaznak konstitutívan átíródó MAT géneket a – mai ismereteink szerint – kizárólag ivartalanul szaporodó gombák. Az egyik hipotézis szerint ezeknek az „aszexuális” gombáknak is van rejtett ivaros ciklusuk, de teleomorfjaikat azért nem észleljük, mert náluk a párosodás ritka esemény és/vagy különleges indukciós

körülményeket igényel, ami kísérletes körülmények között nem reprodukálható (Turgeon, 1998). Egy alternatív feltételezés szerint – amit mi is vallunk – azért van szükség működőképes *MAT* génekre az ivartalan szaporodás fázisában, mert e gének transzkripciósfaktorai egyéb, a mindennapos élethez szükséges géneket is szabályoznak az ivaros folyamatokat irányító gének mellett.

A *MAT1-2-1* gén inaktiválása változásokat okoz a *Fusarium verticillioides* (*Gibberella moniliformis*, syn: *G. fujikuroi*, *sensu lato*) transzkripciós profiljában

A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzsében irányított mutagenézissel (higromicin B rezisztencián alapuló konstrukció és protoplaszt transzformáció segítségével) inaktiváltuk a *MAT1-2-1* gént. Összehasonlítottuk a vad típusú törzs (WT) és a $\Delta FvMAT1-2-1$ mutáns transzkripciós profilját. Ötnapos, párosodást indukáló körülmények között (sárgarépa-agaron, 12/12 h sötét-fény periódus mellett 25°C-on) nevelt tenyészetekből vontunk ki RNS-t, s ebből reprezentatív cDNS könyvtárat hoztunk létre. (Ebben az időpontban még nincsenek látható jelei az ivaros struktúráknak, így a vegetatív szaporodás fázisában levő tenyészetek kerültek összehasonlításra.) A mutáns és a WT cDNS fragmentumait robottechnikával hibridizáltattuk a WT-ből készített reprezentatív genomi klóntár fragmentumaival, nagysűrűségű, differenciál-hibridizációs technika segítségével. Mindösszesen 7600 klónt hasonlítottunk össze. A hibridizációs intenzitás különbségeit denzitometriával és számítógépes elemzéssel értékeltük, s minden olyan klónt izoláltunk, amely szignifikánsan eltérő jelet mutatott a WT és a mutáns cDNS-ek összehasonlításakor. Összesen 241 olyan EST klónt (expressed sequence tags) találtunk, amely eltérően regulálódott a mutánsban és a WT-ben. Ezek nukleotid sorrendjét meghatároztuk és összehasonlító szekvencia elemzésnek vetettük alá őket. Kétszáztizennyolc olyan klónt azonosítottunk, amely ismert fehérjékkel mutatott homológiát, ezek 55% alul-, 45%-a pedig felül-regulálódott a $\Delta FvMAT1-2-1$ mutánsban, ami azt bizonyítja, hogy a *MAT1-2-1* gén által kódolt transzkripciós faktor pozitív és negatív regulációs szerepet egyaránt betölthet, célgéntől függően.

Funkcionális csoportokba soroltuk a mutánsban alul- illetve felül-regulálódott géneket. Az alul-regulálódott gének (amelyeket tehát pozitívan befolyásol a *MAT1-2-1* transzkripciós faktor) 48,7%-a az „anyagcsere”, 18,0%-a a „jelfogás/jelátvitel”, 7,2%-a az „RNS-szintézis”, 4,5%-a a „sejtszerkezet”, 3,6%-a „védekezés”, 2,7%-a a „sejtosztódás”, további 2,7 %-a a „fehérje-szintézis” és 12,6%-a az „ismeretlen” kategóriába került. A felül-regulálódott gének (ezeket negatívan szabályozza a *MAT1-2-1*) esetében a fenti kategóriák (ugyanabban a

sorrendben) részaránya így alakult: 52,7, 4,3, 2,1, 5,4, 6,5, 5,4, 20,4 és 3,2%. [A klónok részletes felsorolása és a megoszlási ábrák meghaladják a zárójelentés terjedelmi kereteit a részletes adatok iránt érdeklődőket most megjelent, **Keszthelyi et al. (2007)** dolgozatunkhoz irányítjuk. Ami azonban feltűnő, és itt külön is említést érdemel az az, hogy a MAT1-2-1 transzkripciós faktor nagyszámú, a jelátvitelben/jelfogásban szereplő gént pozitívan szabályoz, de negatív hatással van egy sor fehérjeszintézisben résztvevő génre.]

A *MAT1-2-1* gén tehát egy sor olyan gént is szabályoz, amelyek nem játszanak szerepet a párosodásban, hanem az életciklus egyéb szakaszaiban működnek. Ezzel tehát kísérletes bizonyítékot szolgáltatunk arra a feltételezésre, amely szerint „aszexuális” gombáknak is szükségük van működőképes *MAT* génekre mert ezek az ivaros folyamatok mellett egyéb lényeges életfunkciókra is befolyással vannak. (S nyilván, az ivaros szaporodásra képes gombák, ugyanígy hasznát veszik vegetatív életciklusukban a konstitutívan átíródó *MAT* génjeiknek.)

A *MAT1-2-1* gén által regulált gének funkcionális elemzése

A 211 „értelmes” EST klónt a SeqMan program segítségével kontigokba rendeztük, s így összesen 11 többszörös és 181 egyszeres kontigot kaptunk. Valamennyi érdekesnek tűnik beható funkcionális elemzésre, de – anyagi és technikai kapacitásunk korlátai miatt – egyelőre három gén irányított inaktiválására és a mutánsok fenotípusos elemzésére nyílt módunk.

Klónoztuk és meghatároztuk a teljes *Fpmtr1* gént, amely egy Mtr-típusú (metilriptofán rezisztens) aminosav transzportert kódol, és fejlődésspecifikus: csak fiatal hifákban és csírázó konídiumokban expresszálódik. A $\Delta Fpmtr1$ mutánsok vegetatív növekedése és sporulációja teljesen normális volt egy sor szintetikus táptalajon, ugyanakkor endofiton kolonizációs képességük csökkent, amikor kukorica csíranövényeket fertőztünk velük. Egy kevésbé optimális környezetben tehát már zavart tud okozni ennek a transzporternek a hiánya. Minden mutáns fertilesnek bizonyult, ha hím partnerként használtuk őket pároztatási kísérletekben, de a reciprok keresztezésben nő-sterilnek bizonyultak. Továbbá, az *Fpmtr1* gén inaktiválása feloldotta a vegetatív ön-inkompatibilitást is ebben a gombában. Az FpMTR fehérje tehát – nélkülözhető aminosav-transzporter funkciója mellett – szenzor/receptor funkciót is betölt. Munkacsoportunknak elsőként sikerült igazolni egy ilyen transzporterről, hogy részt vesz azokban a felismerési folyamatokban, amelyek mind az ivaros, mind a paraszexuális rekombináció előfeltételeit jelentik (**Jeney et al., 2007**).

Egy nitrilázt kódoló gén fragmentumai nagyon redundánsan bukkantak elő a *F. verticillioides* Δ *MAT1-2-1* mutánsban alul-regulált EST klónok között, s northern elemzés is igazolta, hogy ezt a gént a MAT1-2-1 fehérje stimulálja. Összeraktuk a teljes nitriláz szekvenciát, s kiderült, hogy ez az egykópiás gén valóban a *MAT1-2-1* termékének szabályozása alá esik (promóterén megvan a HMG-box kötőhely). A Δ *Fpmtr1* mutánsok hím partnerként fertilisek voltak, s amikor női partnerként használtuk őket, akkor több perithécium keletkezett, mint a WT női partner esetében, s hamarabb jelentkeztek ezek a képletek a megszokottnál. Ugyanakkor, a perithéciumok aprók maradtak, nem mentek át a tipikus érési folyamaton, s abnormális askospórák képződtek bennük. Ez a fenotípus hasonló volt ahhoz, amit Raju és Leslie (1992) talált olyan vad típusú *Neurospora crassa* törzsekben, amelyekben blokkolódott a meiózis. A nitriláz fertilitást befolyásoló szerepére kétféle magyarázat lehet: (1) a nitrilázoknak van egy olyan amidáz aktivitásuk, amelynek hasznát veszik a nitrogén anyagcsere során keletkező toxikus termékek lebontásakor (a Δ *Fpmtr1* szokatlan kék pigmentet termeltek, ami cianid-képződésre utal), s erre nagyszükség van a párosodáskor, ami csak természetes növényi szubsztrátumokon valósul meg, vagy (2) reverz amidáz aktivitása is lehet ennek a nitriláznak, s ez esetben a feromonok érésehez szükséges lipofil addíciók elvégzésén munkálkodik az enzim (**Keszthelyi et al. 2006**, – egyelőre csak konferencián számoltunk be erről az eredményről, mert a nyomtatott közléshez a hiánymutáns restaurációját kérték a bírálók, ami egy alternatív, nem higromicin-rezisztencián alapuló transzformációs rendszer kidolgozását igényli, s a min dolgozunk, de a munka „nem fért már bele” a pályázat futamidejébe).

A cAMP-mediált jelátviteli útvonal – a MAPK útvonallal együttműködve – számos fejlődési folyamatot ellenőriz a gombákban (Yamauchi et al. 2004). A cAMP útvonal sérülése *Ustilago maydis*-ban a fertilitás csökkenését és a virulencia erősödését okozza (Dürrenberger et al. 1998), míg a *N. crassa* adenilát-cikláz hiányos mutánsai fertilisek maradtak, de a perithécium képződés és az askospórák fejlődése késleltetést szenvedett (Ivey et al. 2002). Amikor *F. proliferatum*-ban inaktívtuk az adenilát cikláz kódoló gént azt találtuk, hogy a mutánsok megőrizték hím-fertilitásukat, női fertilitásuk azonban mintegy 90%-kal romlott (**Oláh et al. 2006**). A természetben is előforduló női sterilitás azonban aligha magyarázható az adenilát-cikláz útvonal hibájával, a mutáns törzsek ugyanis más tekintetben is defektesek voltak: lassabban nőttek és gyengült endofiton kolonizációs képességük, vagyis kiszorulnának a természetes mikrobiótából tetemes versenyhátrányuk miatt.

Jelen program legfontosabb hozadéka annak igazolása, hogy a párosodást irányító gének nemcsak az ivaros folyamatokra vannak hatással, hanem a gombák életciklusainak egyéb eseményeit is befolyásolják megfelelő gének alul- illetve felül-regulálásával. Így vált érthetővé, miért tartalmaznak ép, konstitutíven átíródó *MAT* géneket az ún. „aszexuális” gombák. Az is kiderült, hogy az ivaros szaporodó fajokban számos gén hibája okozhat női-sterilitást, ami alapvetően eltolja az adott populáció reprodukcióját a klónos szaporodás irányába, s ennek komoly populáció-biológiai, evolúciós és járványtani következményei vannak.

*A témavezető csoportjában vagy a csoport érdemi részvételével született munkákat vastag szedéssel jelöltük.

Irodalomjegyzék

- Arie, T. *et al.* (2000): *Mol. Pl-Microbe Interact.* **13**, 1330-1339.
- Bacon, C.W. *et al.* (1996): *App. Environ. Microbiol.* **62**, 4039-4043.
- Debuchy, R. (1999): *Fung. Genet. Biol.* **27**, 218-223.
- Desjardins, A.E. (2003): *Annu Rev. Phytopathol.* **41**, 177-198.
- Dürrenberger, F. *et al.* (1998): *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, 5684-5688.
- Fincham, J.R.S. *et al.* (1979): *Fungal Genetics*. 4th edition. University of California Press, Berkeley, California.
- Hornok, L (2007): *Acta Phytopath. Entomol. Hung.* **42**, (in press)
- Ivey, F.D. *et al.* (2002): *Eukaryotic Cell* **1**, 634-642.
- Jeney, A. *et al.* (2007): *J. Basic. Microbiol.* **47**, 16-24.
- Kerényi, Z. *et al.* (1997): *Pl. Pathol.* **46**, 882-889.
- Kerényi, Z. *et al.* (1999): *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4071-4076.
- Kerényi, Z. *et al.* (1999): *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4419-4423.
- Keszthelyi, A. *et al.* (2006): *Acta Microbiol. Immunol. Hun.* **52**, S70-71.
- Keszthelyi, A. *et al.* (2007): *Ant. Leeuw. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **91**, 373-391.
- Leslie, J.F. (1995): *Can. J. Bot.* **73**, S282-S291.
- Leslie, J.F. *et al.* (1996): *App. Environ. Microbiol.* **62**, 1182-1187.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. (2006): *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa.
- Logrieco A. *et al.* (1998): *App. Environ. Microbiol.* **64**, 3084-3088.

- Nagy R. *et al.* (1995): *Microbiology* **141**, 713-719.
- Nirenberg , H.I. and O'Donnell, K. (1998): *Mycologia* **90**, 434-458.
- Oláh, B. *et al.* (2006): *Acta Microbiol. Immunol. Hun.* **52**, S115-116.
- Pöggeler, S. (2000): *Curr. Genet.* **37**, 403-411.
- Pöggeler, S. and Kück, U. (2001): *Gene* **281**, 9-17.
- Raju, N.B. and Leslie, J.F. (1992): *Genome* **35**, 816-825.
- Ritieni, A. *et al.* (1995): *Nat. Toxins* **3**, 17-20.
- Thiel, P.G. *et al.* (1991): *App. Environ. Microbiol.* **57**, 1089-1093.
- Tudzynski, B. and Hölter, K. (1998): *Fung. Genet. Biol.* **25**, 157-170.
- Turgeon, B.G. (1998): *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 115-137.
- Waalwijk, C. *et al.* (2006): *Mycotox. Res.* **22**, 54-60.
- Yamauchi, J. *et al.* (2004): *Mol. Pl.-Microbe Interact.* **17**, 1355-1365.
- Yun, S.-H. *et al.* (2000): *Fung. Genet. Biol.* **31**, 7-20.
- Zeller, K.A. *et al.* (2003): *Mycologia* **95**, 943-954.