

Szignálátviteli gének izolálása *Gibberella fujikuroi*ból című pályázat zárójelentése (T/F 046529)

A kutatás modellszervezetéül a pályázat a *Gibberella fujikuroi*t választotta, mert ennek a gombának mind ivarosán, mind klónosan szaporodó vonalai vannak és ez lehetőséget adott a különböző funkciójú MAP kináz gének többirányú szignálátviteli szerepének a vizsgálatára. Másrészt, gazdaságilag is jelentős gyűjtőfajról van szó, amelynek különböző *Fusarium* anamorfjai az egész világon elterjedtek, sok termesztett növényen okoznak megbetegedést, és egy sor másodlagos anyagcsereterméket, köztük mikotoxinokat termelnek (Leslie and Summerell, 2006).

A pályázat keretében sor került a fonalas gomba MAP kinázok körében egy alcsoportspecifikus PCR-alapú klónozási rendszer kidolgozására, valamint a *F. proliferatum* két MAP kináz génje genomi szekvenciájának a meghatározására. A *Fusarium proliferatum* (teleomorf: *Gibberella intermedia*) *Fphog1* ill. a *Fusarium verticillioides* (teleomorf: *Gibberella fujikuroi*) *Fvmk2* MAP kináz génjeinek funkcionális analízisét null mutánsok előállításával ill. a mutánsok komplementálásával végezték el. Az alábbiakban ezek az eredmények kerülnek ismertetésre. A *Fusarium proliferatum* $\Delta Fphog1$ mutánsra vonatkozó eredmények jórészt már publikálásra kerültek, a *Fusarium verticillioides* $\Delta Fvmk2$ MAP kináz mutáns fenotípusára vonatkozó eredményeket a szerzők 2008-ban kívánják publikálni.

1) Gomba MAP kinázok alcsoportspecifikus klónozása

A rendelkezésre álló gomba MAP kináz gének szekvenciáinak számítógépes összehasonlításával megállapítható volt, hogy a gomba MAP-kináz

gének három különálló alcsoportot alkotnak (Ádám et al., 2005), amely megfelel a Kültz (1998) által leírt MAPK alcsoportok közül a yeast and fungal stress activated protein kinase (YSAPK, korábban HOG1-típusú MAPK) valamint a yeast and fungal extracellular regulated kinase (YERK1 and YERK2) alcsoportoknak. A három alcsoport egymáshoz való viszonyában már kevésbé egységes az irodalom. Bár a gomba MAP-kinázok dichotomikus törzsfája általában elfogadott, a YERK1 alcsoport YSAPK alcsoporthoz viszonyított helyzete vitatott (Xu, 2000; Park et al., 2004). Jelen eredmények (Ádám et al., 2005) más közleményekkel együtt (Kültz, 1998; Caffey et al., 1999; Mey et al., 2002) azt támasztják alá, hogy az YSAPK alcsoport szeparált a közös eredetű YERK1 és YERK2 alcsoportoktól (Ádám et al., 2005; 2008a, 1. ábra). Ezt támasztja alá-többek között- az is, hogy az YSAPK alcsoportban számos új, alcsoportspecifikus konzervált motívum volt kimutatható, amely a gomba YERK1 és 2 illetve egyéb nem gomba MAPK alcsoportokban nem volt megtalálható (Ádám et al., 2005).

A fent ismertetett YSAPK-specifikus motívumokra épített indítószekvenciák felhasználásával a csoport kidolgozott egy „nested” PCR-re alapozott alcsoport specifikus MAP kináz klónozási rendszert a fonalas gombák körében. A fenti megközelítéssel sikeresen klónozták az YSAPK MAPK alcsaládba tartozó szekvenciariészeket a *Mucor*, *Aspergillus*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* és *Trichoderma* fajokból (Ádám et al., 2005). A *Fusarium proliferatum* (teleomorf: *Gibberella intermedia*), a *F. culmorum* és a *Trichoderma harzianum* (teleomorf: *Hypocrea lixii*) HOG1-típusú MAPK géneinek szekvenciariészleteit annotálták az NCBI adatbázisában is (DQ071423, DQ065608 és DQ071424).

2) A *Fusarium proliferatum* Fphog1 MAP kináz gén funkcionális jellemzése: szerepe az abiotikus stressztoleranciában és a programozott sejthalál (PCD) gátlásában

A *Fusarium proliferatum* (teleomorf: *Gibberella intermedia*) YSAPK MAPK génjének (*Fphog1*) teljes genomi szekvenciája a szekvenciaszakasz jobb és bal oldali kiterjesztésével határozták meg, SON (single oligonucleotide nested) PCR (Antal et al., 2004) alkalmazásával. A MAP kináz gének klónozására elsőként használtak SON PCR-t. A gén, amely 340 bp promóter régiót is magában foglal, EF467357 számon lett annotálva az NCBI adatbázisában (Ádám et al., 2008a,b in press).

Az *Fphog1* gén null mutánsát funkcionális analízisnek vetették alá. A szexuális rekombináció és a növényi szövetben való invázív növekedés szempontjából nem találtak különbséget a vad és a mutáns törzs között (Ádám et al., 2008a). Az *Fphog1* gén expressziója szemikvantitatív RT-PCR és kvantitatív valós idejű qrtPCR módszerekkel vizsgálva nem mutatott változást a gomba életciklusának különböző morfogenetikai fázisaiban: a nem csírázó ill. csírázó konídiumban és a hifális növekedés alatt (Ádám et al., 2008a). Ez azt eredményezi, hogy a gomba különböző fejlődési fázisaiban lehetőség nyílik az *Fphog1* gén funkcióinak vizsgálatára. Ennek megfelelően a hő- és UV-stresszt intakt konídiumokon, a hidrogén-peroxid, só- és ozmotikus stresszt micéliumon vizsgálták (Ádám et al., 2008b).

A vizsgált abiotikus stresszorokkal szemben, így az UV-B, UV-C sugárzás, externális hidrogén-peroxid kezelés, hőstressz, sóstressz és ozmotikus stressz esetében a $\Delta Fphog1$ mutáns törzs jelentősen szenzitívebb volt, mint a vad szülő. A mutáns vad típusú *Fphog1* génnel (saját promóterét alkalmazva) történő komplementálása a mutáns fenotípusra jellemző stressz-szenzitivitást feloldotta (Ádám et al., 2008b, 1. táblázat). A jelen publikáció az első a fonalas gombák körében, amely kimutatja egy HOG-típusú MAPK mutánsban, a $\Delta Fphog1$ -ben az élesztőkben (*S.cerevisiae*, *S.pombe*) leírt Hog1-függő összes fő abiotikus stresszfunkciókat (Brewster et al., 1993; Gacto et al., 2003).

A só és ozmotikus (szorbitol) stresszorok hatására a $\Delta Fphog1$ mutánsban a növekedés gátlása fokozott mértékű sejthalállal társult. A mutánsban négy programozott sejthalál (PCD) markert azonosítottak: az aktív oxigéngyökök (AOS) fokozott képződését, a mitokondriális membránpotenciál-változását, a sejtmag dezintegrációját és a nukleáris DNS-fragmentációját. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az FpHOG1 protein egyik fontos funkciója az apoptózis kivédése abiotikus sztrész esetén (Ádám et al., 2008b, 2. ábra). Ismereteink szerint ez az első közlemény a HOG-típusú MAP kinázok apoptózisban játszott szerepéről. A gomba apoptózis modell –az apoptózis mechanizmusok elővilágban tapasztalható nagyfokú konzerváltsága miatt– gyakorlati vonatkozásokkal is rendelkezhet. Ismeretes, hogy a ráksejtek ellen használt számos természetes és mesterséges drog hatásmechanizmusa az apoptózis indukción alapul és a transzplantált szervekben jelentkező károsodás (reperfusion injury) is részben ezen alapul. Gyakorlati szempontból egy egyszerű, jól tenyésztethető, nagy tömegben előállítható szervezeten lehet tanulmányozni a programozott sejthalál eseményeit, és az apoptózis indukciójára vagy gátlására alkalmas hatóanyagok is jól vizsgálhatók ebben a rendszerben.

Az ozmotikus és sóstressz kapcsán kvantitatív valós idejű qrtPCR alkalmazásával megállapították, hogy az *Fphog1* gén transzkripcionálisan nem regulált. A vizsgálatokban összehasonlítottak két qrtPCR értékelési módszert: az összehasonlító (comparative) C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak and Schmittgen, 2001) és a gene expression's C_T difference (GED) (Scheffe et al., 2006) módszert. Ez utóbbi módszer az egyes minták individuális PCR hatékonyságát ($E_i = 10^s - 1$) is figyelembe veszi, ahol s a PCR kinetikus görbe 3-5 pontjára illesztett regressziós egyenes maximális meredeksége, maximális R^2 érték mellett. A két módszerrel számolt eredmények között szignifikáns különbség nem volt (Ádám et al., 2008a,b), abból adódóan, hogy az egyes minták ill. ismétlések PCR hatékonysága között nem volt jelentős különbség. Ezzel szemben, elsősorban humán rendszerekben viszont figyelembe kell venni ezt a faktort, ahol pld. ugyanaz a gén

expressziója különböző szövetekben ill. szervekben eltérő PCR-hatékonyság mellett detektálható (Scheffe et al., 2006).

3) A *Fusarium proliferatum* *Fphog1* MAP kináz gén kapcsolata a másodlagos anyagcserével: a fumonizin toxinbioszintézis-gének kifejeződése a vad és a $\Delta Fphog1$ mutáns genotípusban

A *Fusarium* fajok mikotoxin termelésének regulációjáról kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Eddigi kutatások kiderítették, hogy a *Fusarium graminearum*ban a HOG1 homológ *Fgos2* MAP kináz pozitívan regulálja a trichotecén bioszintézist (Ochiai et al. 2007). A *Fusarium verticillioides*ben a fumonizin szintézis génklaszter két eleme, a *fum1* (poliketid szintáz) és a *fum8* (alfa-aminotranszferáz) toxintermelést serkentő körülmények között transzkripcionális regulációt mutat (Brown et al. 2007). A $\Delta Fphog1$ mutáns törzs segítségével lehetőség nyílik az FpHOG1 és a fumonizin bioszintézis útvonal kapcsolatának vizsgálatára, különös tekintettel a fent említett két gén transzkripcionális regulációjára. A *fum1* és a *fum8* szekvenciárészletét sikeresen izoláltuk *F. proliferatum*ból. Jelenleg a qrtPCR kísérletek folyamatban vannak. A továbbiakban *Fphog1* MAP kináz fumonizin bioszintézisben játszott szerepére vonatkozó eredményeket, összehasonlítva a *F. proliferatum* adenilát cikláz mutánsok($\Delta Fpac$) esetleges hasonló szerepével, kívánják értékelni.

4) A *Fusarium verticillioides* *Fvmk2* MAP kináz gén szerepe a sejtfalintegritás megőrzésében

Hasonló megközelítést alkalmazva klónozták a *F. proliferatum* YERK2 alcsaládba tartozó MAPK génjét, amely az *Fpmk2* nevet kapta. Ezt a gént DQ412706 számon annotálták az NCBI adatbázisában 2006-ban. Az 1257 bp hosszúságú kódoló szekvencia TEY kettős foszforilációs motívumot tartalmaz, amely a YERK MAP kinázok sajátja. A *F. proliferatum* *Fpmk2* génjének kódoló szekvenciája 96%-os homológiát mutatott a *F. verticillioides* egy hipotetikus MAP kináz génjével (FVEG_03043, www.broad.mit.edu). A homológia a 391 bp hosszúságú promóter régió esetében is 93%-os volt. Ezt kihasználva a *F. verticillioides*ben állítottak elő null mutánsokat ($\Delta Fvmk2$) homológ rekombinációs módszerrel, higromicin marker gén felhasználásával. Ez azért is volt kedvezőbb, mert a *F. verticillioides* genomjának jelentős része már megtalálható az adatbázisban (www.broad.mit.edu), a *F. graminearum* genomját pedig nemrég publikálták (Cuomo et al., 2007). Az *Fvmk2* gén ortológja, a *S. cerevisiae* *slt2/mpk1* génje elsősorban a szexuális rekombinációban és a sejtfa integritásának fenntartásában játszik fontos szerepet. Az *Fvmk2* gén funkcionális vizsgálata jelenleg több irányban is folyik:

- a) A szexuális rekombinációban játszott szerepét GFP fúziós protein konstrukció felhasználásával kívánják vizsgálni. A MAP kinázok foszforilációs (azaz enzimatis) aktivitásának fő feltétele a kettős foszforilációs motívum (TEY) foszforiláltsági szintje (Ádám et al., 1997). A MAP kináz proteinek posztranszlációs aktivációját (vagyis a TEY motívum foszforilációját) követően a MAPK protein a citoszolból a sejtmagba vándorol (Kojima et al., 2004), amely lehetővé teszi az *Fvmk2* gén lokalizációjának nyomon követését a peritécium képződéséhez vezető morfogenetikai folyamatok során, mind az anyai, mind az apai vonalban. Jelenleg a GFP konstrukciók tesztelése van folyamatban.

- b) A sejtfa integritás szignálútjainak (cell wall integrity signalling, CWIS) fontos szereplői a YERK2 alcsaládba tartozó MAP kinázok. *In silico* analízis segítségével a *S. cerevisiae* adatbázis (www.yeastgenome.org) felhasználásával azonosították a *F.*

graminearum és a *F. verticillioides* adatbázisban (www.broad.mit.edu) a CWIS útvonal további lehetséges tagjait. Az adatok az upstream (MAPKK, MAPKKK) és downstream komponensek (transzkripciósfaktorok) jelentős konzerváltságára utalnak. Az upstream komponensek közül a *S. cerevisiae* *slt2/mpk1* MAP kináz felett elhelyezkedő MAPK kináz és MAPKK kináz (*mkk2* és *bck1*) gének 48,1% és 47,8% ill. 20,6% és 19,6% homológiát mutattak a *F. verticillioides* ill. *F. graminearum* megfelelő hipotetikus génjeivel (*F. verticillioides* FVEG_05280 és FVEG_05000.3 illetve *F. graminearum* FGSC_07295 és FGSC_06326.3). Ezek a bioinformatikai eredmények azt bizonyítják, hogy a CWIS útvonal a *F. verticillioides*ben is aktívan működhet.

- c) A $\Delta Fvmk2$ mutánsal végzett funkcionális vizsgálatok is igazolták az *Fvmk2* sejtfalintegritás regulációjában betöltött feltételezett szerepét. Három különböző, a sejtfal dezintegrációját okozó kezeléssel (kongó vörös, calcofluor white és SDS) teszteltük a mutáns fenotípusát. A kongó vörös és az SDS esetében a $\Delta Fvmk2$ mutáns egyértelműen szenzitívebb volt, mint a vad típus (3., 4A és B ábrák) a calcofluor white esetében azonban nem (3. és 4C ábrák). A 300 mM calcofluor white-tal végzett kezelés mind a vad, mind a mutáns törzs növekedését az idő függvényében egyre fokozódó mértékben, de egyformán gátolta (4C ábra). Az *Aspergillus fumigatus* esetében a megfelelő $\Delta mpkA$ YERK2 MAPK mutánsal végzett kísérletek során mindhárom előbbi komponens esetében kimutatták a mutáns szenzitivitását (Valiante et al., 2007). Ez részben a két gomba eltérő sejtfalösszetételével ill. az egyes sejtfalkomponensek eltérő regulációjával függhet össze. A calcofluor white antifungális aktivitása kitin-kötő tulajdonságával függ össze, a kongó vörös pedig a béta1,3-glükán poliszacharidokhoz kötődik. Az SDS hatásmechanizmusa a sejtfal vonatkozásában nem ismert. Morfológiailag a $\Delta Fvmk2$ mutáns bár légmicéliumot képez, optimális körülmények között is 20-30%-kal lassabb növekedést mutatott LCM agaron (3. ábra).

További kérdés, hogy ez a feltehetően abnormális sejtfal szerepet játszik-e a $\Delta Fvmk2$ mutáns szexuális rekombinációjának gátoltságában.

- d) A CWIS útvonal két új funkcióját azonosították a *F. verticillioides* $\Delta Fvmk2$ YERK2 MAPK mutánsban: 1) az alkohol és 2) formamid (HCONH₂) toleranciában játszott szerepét (3. és 4D. ábrák). A funkció specificitását igazolja, hogy a formamiddal szemben egy másik MAPK mutáns, a $\Delta Fphog1$ nem mutatott szenzitivitást (4E ábra) és 2,5% DMSO-val szemben egyik MAPK mutáns sem. Érdekes módon azonban az etanol-toleranciában a HOG1 MAPK útvonal is szerepet játszik. Ezen eredmények gyakorlati szempontból is érdeklődésre tarthatnak számot környezetvédelmi (az aril-nitrilek és cianidok lebomlása aril-savamidokat, például formamidot eredményez) és bioenergetikai szempontból. A fenti vizsgálatok eredményeit a szerzők két publikációban kívánják, nemzetközi szinten megjelentetni.

Összefoglalás

A gomba MAP kináz gének analízisével a szerzők YSAPK és YERK MAP kináz alcsoport-specifikus motívumokat azonosítottak a fonalas gombák körében. Ezt felhasználva a fonalas gomba MAP kinázok körében egy alcsoport-specifikus „nested” PCR-alapú klónozási rendszer kidolgozására (Ádám et al., 2005), valamint a *Fusarium proliferatum* két MAP kináz génje (*Fphog1* és *Fpmk2*) genomi szekvenciájának a meghatározására került sor (Ádám et al., 2008a, b). Az YSAPK alcsoportba tartozó $\Delta Fphog1$ mutáns funkcionális vizsgálata és komplementálása igazolta a gén abiotikus stressztoleranciában (hő- só-, ozmotikus, UV-C és hidrogén-peroxid stressz) betöltött fontos szerepét. A só- és ozmotikus stressz kapcsán a szerzők igazolták, hogy az *Fphog1* gén a programozott sejthalál (PCD) negatív regulátora. A rendelkezésre álló ismeretek szerint ez az első közlemény a HOG-típusú MAP kinázok apoptózisban játszott

szerepéről. A só- ill ozmotikus stressznek kitett $\Delta Fphog1$ mutáns micéliumsejtekben négy ismert apoptózis marker fokozott jelenlétét azonosították: aktív oxigénformák keletkezése, mitokondriális membránpotenciál változása, setmagok dezintegrációja és a sejtmag DNS fragmentációja (Ádám et al., 2008b). A *Fusarium verticillioides* $\Delta Fvmk2$ mutánsa fokozott szenzitivitást mutatott a sejtfal dezorganizációját kiváltó faktorokkal (kongó vörös, SDS) szemben. A mutáns szintén szenzitívebb volt az alkohol- és formamid-kezeléssel szemben. Bioinformatikai adatok is azt mutatják, hogy a *F. verticillioides*ben a CWIS (cell wall integrity signalling) útvonal aktív szerepet tölt be a sejtfal integritás fentartásában és a környezeti adaptációban.

A gomba apoptózis modell illetve az *Fvmk2* YERK2 MAPK gén alkohol- és formamid-toleranciában játszott szerepe gyakorlati (gyógyszerészeti, környezetvédelmi és bioenergetikai) felhasználási lehetőségeket is kínál a jövőben.

(Két cikk elfogadását igazoló levelet mellékelünk a zárójelentéshez.)

Irodalom

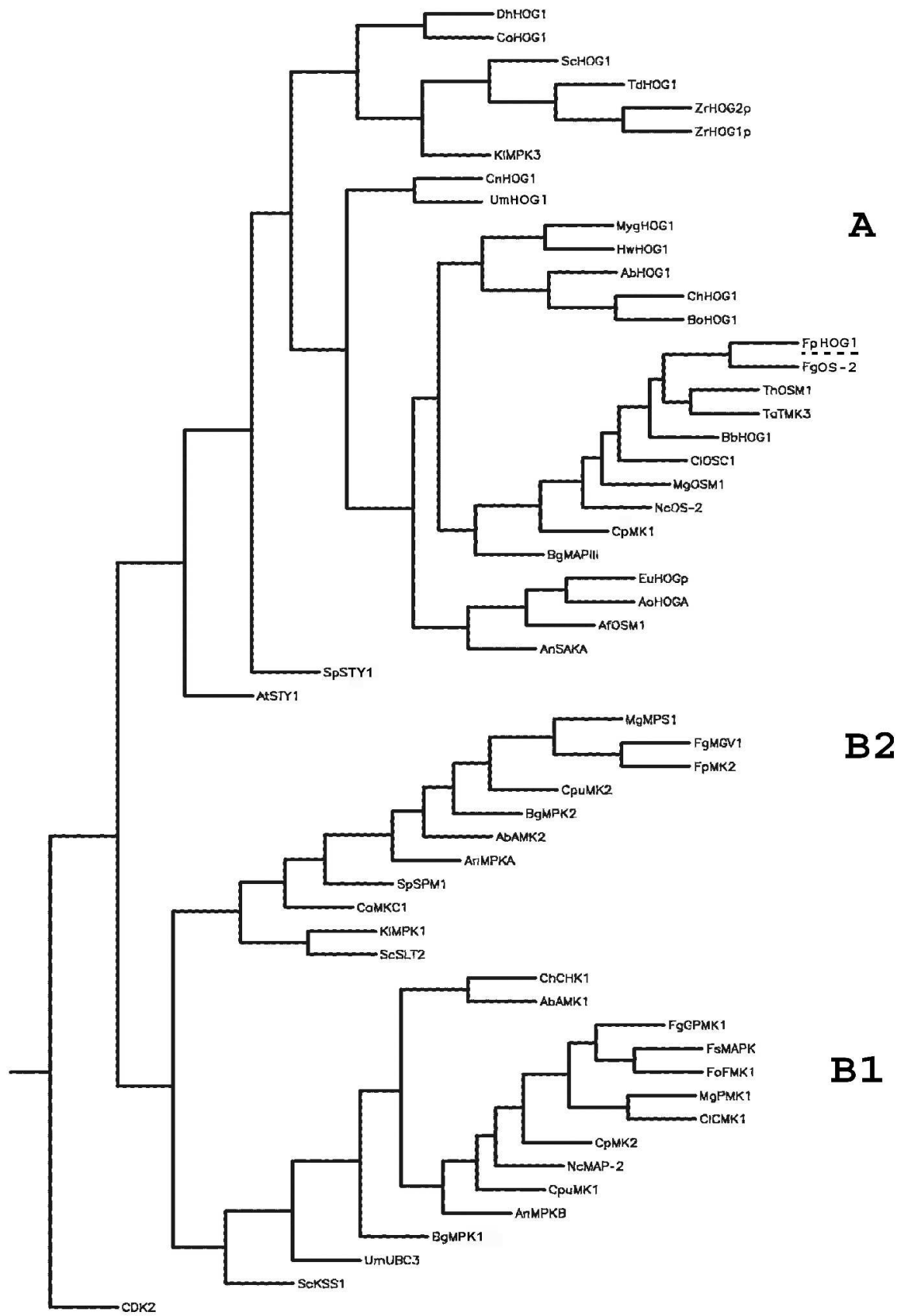
Antal, Z., Rasclé, C., Fevre, M. and Bruel, C. (2004): Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Curr. Genet.* 46, 240-246.

Ádám, A.L., Kohut, G., Hornok, L. (2008a): Cloning and characterization of a HOG-type MAP kinase encoding gene from *Fusarium proliferatum*. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.*, 43 (in press)

Ádám, A.L., Kohut, G., Hornok, L. (2008b): *Fphog1*, a HOG-type MAP kinase gene, is involved in multistress response in *Fusarium proliferatum*. *Journal of Basic Microbiology* (in press)

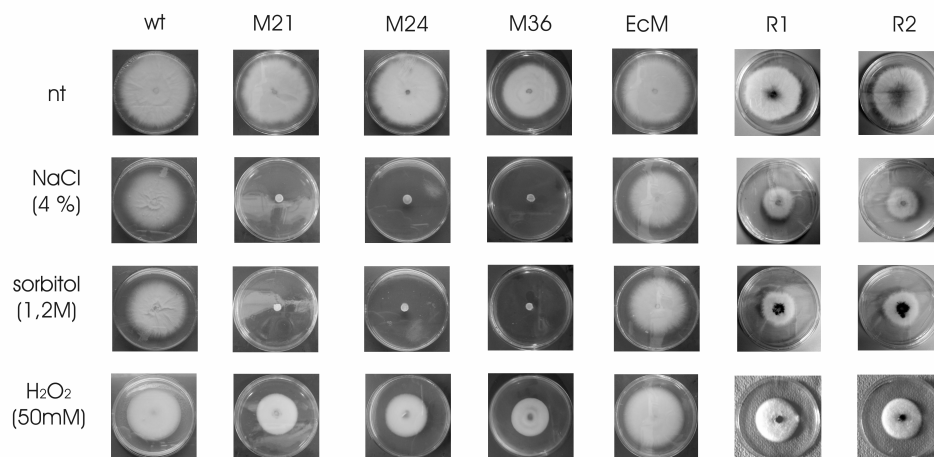
- Ádám, A. L., Kohut, G. and Ládai, M. (2005): Identification of new molecular hallmarks for YSAPK MAPKs: Application for cloning strategies in different fungal filamentous species. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.* 40, 233-249.
- Ádám, A. L., Pike, S., Hoyos, M. E., Stone, J. M., Walker, J. C. and Novacky, A. (1997): Rapid and transient activation of an MBP kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.* 115, 853-861.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. and Gustin, M.C. (1993): An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259, 1760-1763.
- Caffrey, D.R., Luke, A.J., O'Neill, C., Shields, D.C. (1999): The evolution of the MAP kinase pathway: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *J. Mol. Evol.* 49, 567-582.
- Cuomo C.A., Güldener, U., Xu, J.R. et al. (2007): The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317, 1400-1402.
- Brown, D.W., Butchko, A.E.R., Busman, M. Proctor, R.H. (2007) The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)₂Cys₆ protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. *Eukaryotic Cell*, 6, 1210-1218.
- Gacto, M., Soto, T., Vicente-Soler, J., Villa, T.G., Cansado, J., 2003. Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *Int. Microbiol.*, 6, 211-219
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi., T. and Okuno, T. (2004): Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 53, 1785-1796.
- Kültz, D. (1998): Phylogenetic and functional analysis of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J. Mol. Evol.* 46, 571-588.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. (2006): *Fusarium* Laboratory Manual, Blackwell Publishing, Oxford.
- Mey, G., Held, K., Scheffer, J., Tenberge, K.B., Tudzynski, P. (2002): CPMK2, an SLT-2 homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* 46, 305-318.

- Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M. and Kimura, M. (2007): Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 639-644.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Park, S-M., Choi, E.S., Kim, M.J., Cha, B.J., Yong, M.S., Kim, D.H. (2004): Characterization of HOG1 homologue, CpMK1 from *Cryphonectria parasitica* and evidence for hypovirus-mediated perturbation of its phosphorylation in response to hypertonic stress. *Mol. Microbiol.* 51, 1267-1277.
- Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T. and Funke-Kaiser, H. (2006): Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J. Mol. Med.* 84, 901-910.
- Xu, J-R. (2000): MAP kinases and fungal pathogens. *Fungal Genet. Biol.* 31, 137-152.
- Valiante, V., Heinekamp, Jain, J., Hartl, A., Brakhage, A,A.: The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genet. Biol.* (in press)



1. ábra

Phylogenetic relationships of fungal MAPKs. The three main branches of fungal MAPKs are indicated by A (YSAPK MAPKs), B1 (YERK1 MAPKs) B2 (YERK2 MAPKs). Abbreviations for MAPK protein sequences are: AbAMK1, AbAMK2, AbHOG1 (*Alternaria brassicicola*, AAS20192, AAU11317, AAX86000); AfOSM1 (*Aspergillus fumigatus*, CAD28436); AnMPKA, AnMPKB, AnSAKA (*Aspergillus nidulans*, AAD24428, AAF12815, AAF97243); AoHOGA (*Aspergillus oryzae*, BAD89083); AtSTY1 (*Aspergillus terreus*, XP_001215735); BbHOG1 (*Beauveria bassiana*, AAS77871); BgMAPIII, BgMPK1, BgMPK2 (*Blumeria graminis*, AAL83917, AAG53654, AAG53655); BoHOG1 (*Bipolaris oryzae*, BAE48722); CaHOG1, CaMKC1 (*Candida albicans*, XP_721137, CAA54129); ChCHK1, ChHOG1 (*Cochliobolus heterostrophus*, AAF05913, BAD99295); CICMK1, CIOSC1 (*Colletotrichum lagenarium*, AAD50496, BAD11137); ClpMK1, ClpMK2 (*Claviceps purpurea*, CAC47939) (*Claviceps purpurea*, CAC87145); CnHOG1 (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, AAM26267); CpMK1, CpMK2 (*Cryphonectria parasitica*, AAO27796, AAP86959); DhHOG1 (*Debaryomyces hansenii*, AAF24231); EuHOGp (*Eurotium herbariorum*, ABB16294); FgGPMK1, FgMGV1, FgOS-2 (*Fusarium graminearum*, EAA74589, AAM13670, XM389788); FoFMK1 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, AAG01162); FpHOG1, FpMK2 (*Fusarium proliferatum*, ABD67163, ABD67163); FsMAPK (*Fusarium solani*, AAB72017); HwHOG1 (*Hortaea werneckii*, AAM64214); KIMPK1, KIMPK3 (*Kluyveromyces lactis*, AAF61706, XP_455981); MgMPS1,

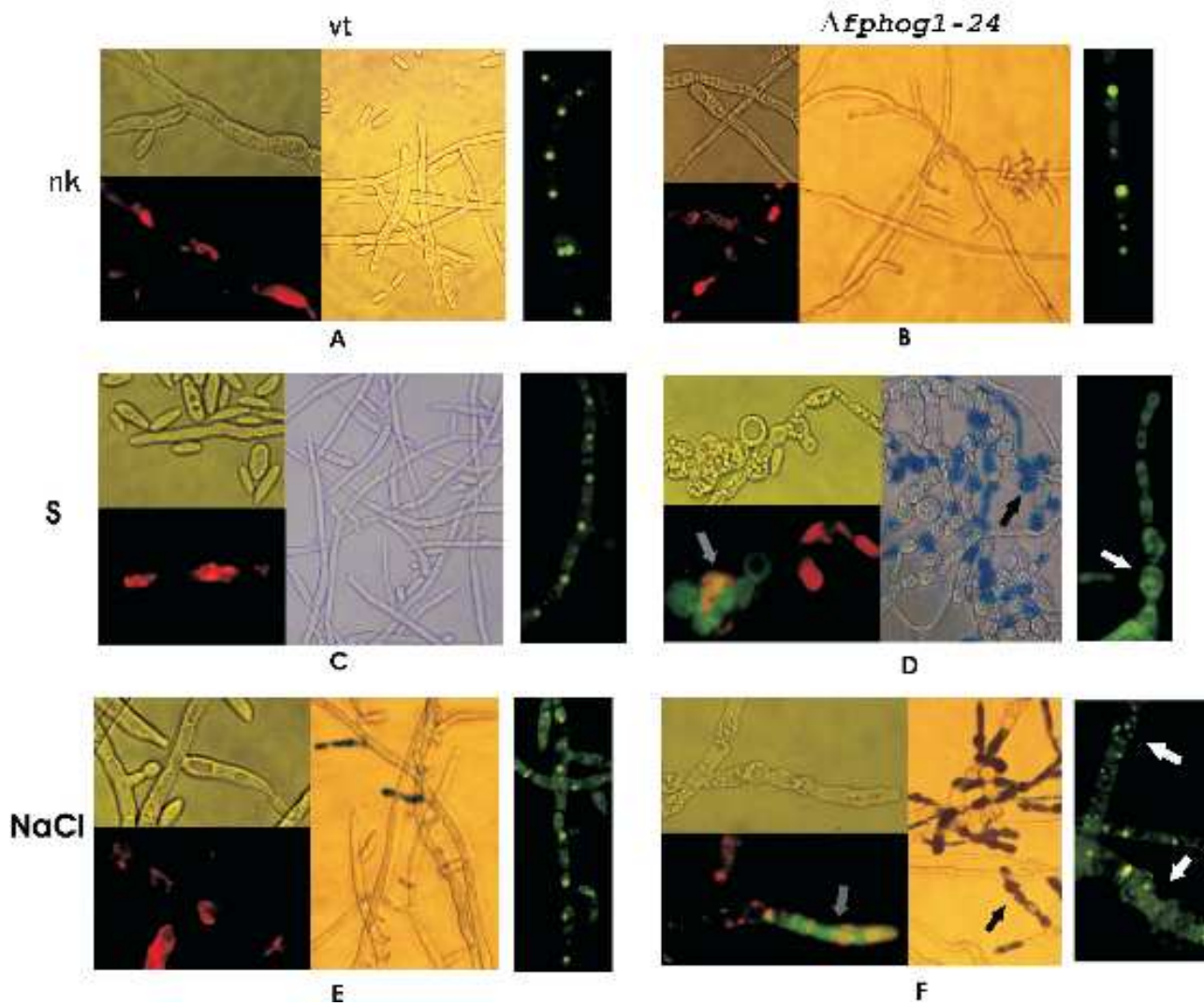


	wt	M21	M24	M36	EcM	R1	R2
nt	100±0,12	100±0,12	100±0,14	100±0,12	100±0,10	100±0,14	100±0,21
NaCl (2 %)	91,1±0,11	ns	25,3±3,10	ns	ns	ns	ns
(4 %)	82,4±0,58	11,9±0,72	14,1±0,76	13,1±0,72	88±1,13	58±0,99	63,5±5,02
(8 %)	49,1±0,12	ns	8,3±0,40	ns	ns	ns	ns
sorbitol (0,8)	98,9±2,10	ns	18±0,30	ns	ns	ns	ns
(1,2M)	77,9±0,45	9±0,15	11±0,76	7,8±0,78	84,1±1,43	66,1±5,89	63,2±5,02
(1,8M)	56,1±0,20	ns	8±1,10	ns	ns	n.s.	ns
H ₂ O ₂ (25mM)	93,4±0,35	ns	72,3±0,17	ns	ns	n.s.	ns
(50mM)	79±2,25	59±1,70	63,2±0,17	55±2,13	88,1±0,64	68,5±1,14	72±3,14
(100mM)	58,5±2,12	ns	46±2,40	ns	ns	ns	ns
UV-C	39,9±3,10	10,4±5,55	2,87±0,10	10,9±2,17	29,7±9,07	24,7±2,84	33,54±7,91
heat	91,1±10,02	42,6±9,68	36,2±0,86	37,5±18,53	68,6±5,66	67,9±6,30	67,1±7,19

1. táblázat

Effect of different stressors on mycelial growth and conidial viability of wild type (wt), *Fphog1-21* (M21), *Fphog1-24* (M24), Δ *Fphog1-36* (M36), ectopic integration mutant (EcM) and rescued (R1 and R2) strains of *F. proliferatum* ITEM 2287. (A) Effect of sorbitol, NaCl, and hydrogen peroxide (H₂O₂) treatments on radial growth of wild type, mutant and rescued strains. Photos were taken after 6 days of growth on CM agar plates. (B) Radial growth and conidial viability (in percentage±standard deviation of corresponding controls) of wild

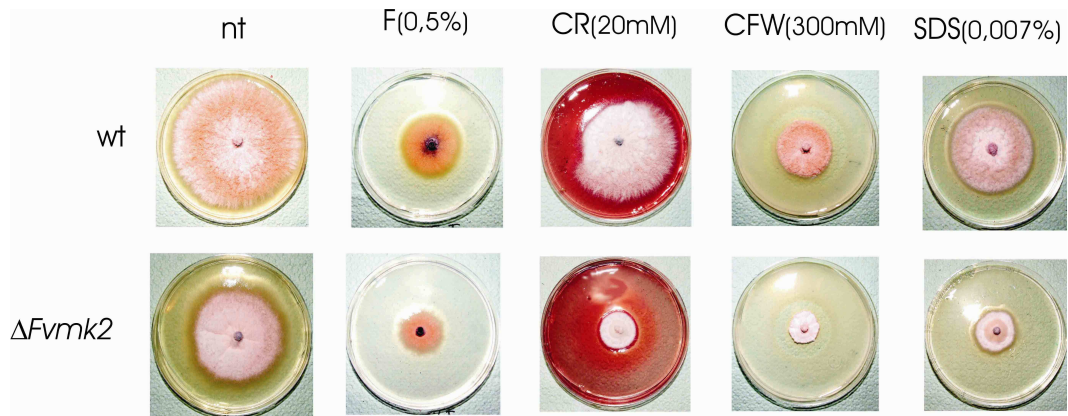
type, mutant, ectopic integration mutant and rescued strains after exposition to NaCl, sorbitol, H₂O₂ UV-C (50 J/m² for 4 min) or heat (45 C_o for 20 min). Nt, non-treated control samples; ns, not studied. Experiments were repeated at least three times with the same results. Results of a representative experiment are presented.(From *Ádám et al.*, 2008, *Journal of Basic Microbiology*, in press)



2.ábra

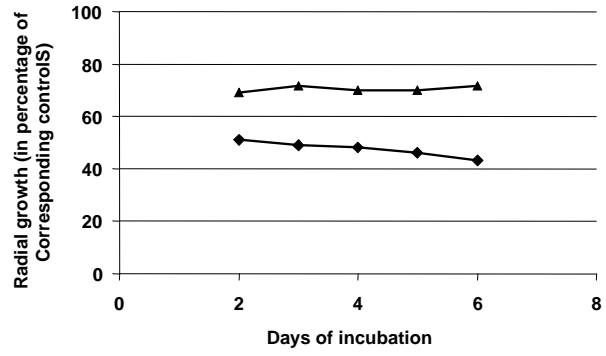
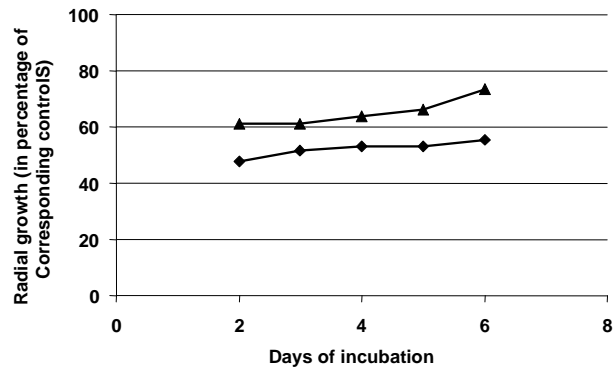
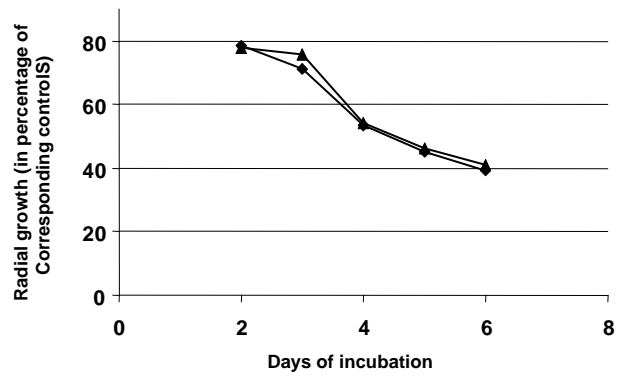
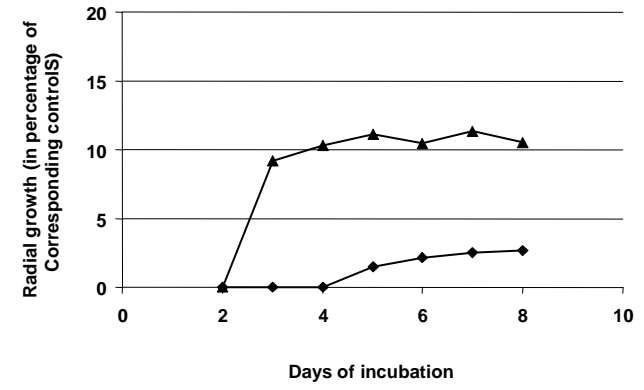
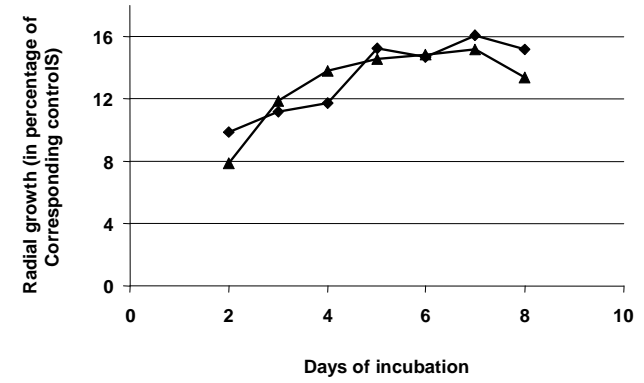
Light and fluorescence microscopy of the wild type strain of *F. proliferatum* ITEM 2287 (wt, panels A, C, E) and its $\Delta Fphog1-24$ mutant (panels B, D, F) after 24 h exposure to hyperosmotic stress. The two photographs (one below the other) on the left part of each panel were taken of the same group of cells stained with the fluorescent dye, JC-1: the upper pictures were taken after normal illumination, while the lower ones were obtained after excitation with a fluorescent burner at 490 nm. Grey arrows point to intense green fluorescence, indicating apoptotic-like cell death in panels D and F. The central pictures of panels A, B, C, D, E, and F show mycelial cells stained with Evans blue: black arrows on D and F point to

Evans blue positive dead cells of the $\Delta Fphog1-24$ mutant, forming a string of pearls. (N.B. A few phyalides of the wild type died after NaCl treatment – panel E, middle part). On the right side of each panel, photographs of DAPI stained cells are presented: white arrows indicate apoptotic-like cell death accompanied with nuclear disintegration. Nt, non-treated control; NaCl, treated with 4% NaCl; S, treated with 1.2 M sorbitol. (From *Ádám et al.*, 2008, *Journal of Basic Microbiology*, in press)



3.ábra

Effect of different cell wall integrity inhibitors on mycelial growth of wild type (wt), and *Fvmk2* strains of *F. verticillioides*. Effect of formamide (F), congo red (CR), calcofluor white (CFW) and SDS treatments on radial growth of wild type and mutant strains. Photos were taken after 6 days of growth on CM agar plates. (Manuscript in preparation)

A**B****C****D****E**

4. ábra

Radial growth of *Fusarium verticillioides* (A,B,C,D) and *Fusarium proliferatum* (E) wild type (▲) and mutant ($\Delta Fvmk2$ or $\Delta Fphog1$, ◆) strains after exposition to 20 mM congo red (A), 0,007% SDS (B) 300 mM calcofluor white (C) or 2,5% formamide (E,D). (Manuscript in preparation)

Acta Phytopathologica
Editorial Office

*Plant Protection Institute
Hungarian Academy of Sciences
H-1525 Budapest
Herman Otto Str. 15. Box 102.
Hungary*

Budapest, 11. 12. 2007.

Dr. Attila Ádám
Agricultural Biotechnology Center
Mycology Group of the
Hungarian Academy of Sciences
Institute of Plant Protection
Szent István University
H-2103 Gödöllő
Páter K. u. 1.
Hungary

LETTER OF ACCEPTANCE

Dear Dr. Ádám!

Your paper on „A.L. Ádám, G. Kohut and L. Hornok: Cloning and characterization of a Hog-type MAP kinase encoding gene from *Fusarium proliferatum*” has been accepted for publication in the next issue (Vol. 43. No. 1.) of *Acta Phytopathologica*.

With best wishes,


Dr. Zoltán Király
Editor-in-Chief



INBOX: JBM - Decision on your revised manuscript jobm-200...
(59 a 950-ből)

[Tegyük át](#) | [Másoljuk át](#) | [Ezt a levelet ide...](#)

[Törés](#) | [Válasz](#) | [Válasz az összes címre](#) | [Továbbítás](#) | [Átrányítás](#) | [Tiltólista](#) | [A levél forrása](#) | [Mentés más néven](#) | [Nyomtatás](#) | [Spamként \(kórosan levél\) való bejelentés](#)



[Vissza INBOX-hez](#) <>

Dátum: Tue, 29 Jan 2008 01:53:38 -0500 (EST)

Feladó: crika.kolhrc@uni-jena.de

Címzett: adam@abc.hu

Tárgy: JBM - Decision on your revised manuscript jobm-2007-00403.R1

Rész (ek):  2 Attached standard file: * 2248_copy_trans.pdf application/octet-stream 145.69 KB 

28-Jan-2008:

Dear Dr. Adam,

It is a pleasure to provisionally accept your revised manuscript entitled "Fpnog2, a HOG-type MAP kinase gene, is involved in multicross response in *Dunaliella proliferans*" in its current form for publication in the Journal of Basic Microbiology.

For final acceptance please follow the instructions below:

1) To ensure the best reproduction quality of your figures we would appreciate 'hardcopies'/print-outs as well as files of your illustrations in a high resolution format on disc(s) or CD. All figures should preferably be in TIFF or EPS format. Please note that when these kind of files are implemented in a Word document they are automatically downsized to keep the overall file size in check and thereby are rendered insufficient for print production. If TIFF or EPS formats are not available, kindly submit figure files in their original format. In this case make especially sure to include high-quality non-gainy print outs, which could be scanned in by the typesetter, if needed, i.e. if they cannot use the e-formats sent. Each figure should be supplied in a separate file/on a separate sheet and should have the following resolution:
Graph: 800 - 1200 DPI
Photo: 400 - 600 DPI
Color (only CMYK): 300 - 400 DPI
(DPI = dots per inch)

Please send the print-outs and files to the Editorial Office:
Gisela May,
Journal of Basic Microbiology
Wunika
Vor dem Obertore 7
07745 Jena
Germany

2) Copyright: Please go to the journal homepage at <http://www.jbm-journal.de> and download the copyright transfer agreement and return a signed copy to fax given below. An attachment of the copyright transfer agreement is also available for download. Unless you have returned a signed copy we can not further process your manuscript.

3) If your contributions includes color figures you are also required to submit a signed copy of the "Color Charge Agreement" to the Editorial office. This mandatory form can be found on the homepage of the journal at <http://www.jbm-journal.de> under the link "For Authors".

4) Please also include any permission statements, such as for reproduced figures

etc (if applicable).

5) Important: Funded access

John Wiley & Sons, Inc. is now offering a funded access service for authors of journal articles whose funding agency requires deposit of an article in an archive. Authors have the option of paying a fee to ensure that their articles are available to non-subscribers upon publication via Wiley InterScience (<http://www.interscience.wiley.com>), Wiley's online publishing platform, as well as the author's funding agency's preferred archive if applicable.

Funded access is available for JBM and many other Wiley journals. Only authors of primary research articles qualify for this service. Wiley will deposit the final PDF of the article into the funder's archive; this is the final, authoritative version of the article after peer review, editing, any final corrections, online and print formatting, and publication. The fee for ensuring articles are made available through the funded access program is \$3,000 USD per article.

Authors who are interested in finding out more about this service, or who wish to include their article in the funded access program, are asked to go to

http://www.interscience.wiley.com/authorresources/funded_access.html

For further information and an order form containing payment information, Questions can be sent to fundedaccess@wiley.com

You should also inform the editorial office (meyersuls@hotmail.com) if you wish to include this manuscript in the funded access program.

6) Cover image

Do you have an interesting and attractive colour image, related to the work presented in your manuscript, that would be suitable for use on the front cover of the journal? If so, please email the picture, along with a brief description of it, to the editorial office meyersuls@hotmail.com and the editor-in-chief (erika.kothe@uni-jena.de). If selected for the cover, we will eventually require the image to be high resolution so you must ensure that you have a version of the image that complies with the resolution requirements detailed in point 4; however, for initial assessment a low resolution image is satisfactory. The image must not have been published elsewhere and, if selected for the cover, a separate copyright transfer statement will be required as the image is not part of the accepted article.

Unless all items detailed above are dealt with, we cannot process your manuscript further.

We look forward to hearing from you and thank you for submitting your manuscript to the Journal of Basic Microbiology.

Regards,

Prof. Erika Köthe
Editor-in-Chief, Journal of Basic Microbiology
erika.kothe@uni-jena.de

Törítés | Válasz | Válasz az összes címre | Továbbítás | Átirányítás | Tiltólista | A levél törvése |

Vissza INBOX-
hez <>

Mentés más néven | Nyomtatás | Spamként (kérőtlőn levél) való bejelentés

Tegyük át | Másoljuk át | Ezt a levelet ide...

