B3959

Sclerotinia sclerotiorum patogenezisének molekuláris vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Kasza Zsolt

Témavezetők:

Dr. Pascale Cotton
Dr. Vágvölgyi Csaba
Dr. Michel Fevre

Szegedi Tudományegyetem
Mikrobiológia Tanszék
és
Université Claude Bernard, Lyon I
Laboratoire Biologie Cellulaire Fongique

2003

SZTE Egyetemi Könyvtár
SZEGED
13.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS 1

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 2

1.1. NÖVÉNYI SEJTFAL-PATOGÉN GOMBA BEHATOLÁSA 2

1.1.1. Növényi sejtfal 2

1.1.2. Patogén gomba behatolása a gazdanövénybe 3

1.1.2.1. A *Magnaporthe grisea* speciális fertőző struktúrája (appresszóriuma) 4

1.1.2.2. Sejtfalbontó enzimek 5

1.2. POLIGALAKTURONÁZOK, PEKTINÁZOK TÉRSZERKEZET VIZSGÁLATA 12

1.2.1. Gomba poligalakturonázok molekuláris vizsgálata 12

1.2.2. *Botrytis cinerea* poligalakturonáz rendszerének vizsgálata 14

1.2.3. Poligalakturonázok biokémiai jellemzése, a processzivitás fogalma 16

1.2.4. Poligalakturonáz inhibitor proteinek 18

1.2.5. Pektinolitikus enzimek krisztallográfiás vizsgálata 20

1.3. pH, SZÉN-, NITROGÉNFORRÁS INDUKÁLTA TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS 26

1.3.1. pH szabályozás 26

1.3.2. Szénforrás mediálta represszió 27

1.3.3. Nitrogénforrás mediálta reguláció 31

1.4. GLICERINALDEHID-3-FOSZFÁT DEHIDROGENÁZ (*GPD*) 32

1.5. *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* 33

1.5.1. Általános leírás, morfológia 33

1.5.2. Életciklus 34

1.5.3. Gazdakör 35

1.5.4. *Sclerotinia sclerotiorum* változékonysága 35

1.5.5. Védekezési módok 36

1.5.6. Oxálsav-oxidatív burst (támadás-védekezés) 38

1.5.7. *Sclerotinia sclerotiorum* sejtfalbontó enzimrendszere 40

1.5.7.1. Poligalakturonázok 40

1.5.7.2. Proteázok 45

2. CÉLKITŰZÉSEK 46

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 47

3.1. TÖRZSEK, VEKTOROK 47

3.2. TÁPTALAJOK, OLDATOK 48
3.3. GÉNKLÓNOZÁSNÁL ALKALMAZOTT MÓDSZEREK 50
3.3.1. *Sclerotinia sclerotiorum* génkönyvtárának szűrése specifikus próbákkal 50
3.3.2. Fág DNS tisztitás 53
3.3.3. Kompetens sejtek készítése 53
3.3.4. Ligálás szubklónozási kísérletekben 54
3.3.5.Baktérium transzformáció 54
3.3.6. Plazmid kivonás 55
3.4. GOMBA GENOMIÁLIS DNS ANALIZISE 55
3.4.1. Genomiális DNS izolálás *S. sclerotiorum*-ból 55
3.4.2. Genomiális DNS izolálás *B. cinerea*-ból 56
3.4.3. Southern blot analízis 56
3.5. RNS ANALIZIS SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK 56
3.5.1. RNS izolálás *S. sclerotiorum*-ból 56
3.5.2. RNS izolálás fertőzött növényi szövetből 57
3.5.3. RNS gélelektroforézis, Northern blot analízis 58
3.5.4. RT-PCR analízis 58
3.6. *IN PLANTA* VIZSGÁLATOK 60
3.6.1. Fertőzési vizsgálatok 60
3.6.2. Közvetlen pH mérés a fertőzött növényi szövetben 60
3.6.3. Oxálsav mennyiségi meghatározása 61
3.7. DNS SZEKVENÁLÁS, BIOINFORMATIKAI PROGRAMOK 61
4. EREDMÉNYEK 62
4.1. *S. SCLEROTIORUM GPD* GÉNJÉNEK KLÓNOZÁSA, SZEKVENCIA ELEMZÉSE 62
4.1.1. Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén klónozása 62
4.1.2. *S. sclerotiorum gpd* génjének szekvencia analízise 62
4.1.3. *gpd* gén 5' és 3' szekvenciájának analízise 65
4.1.4. *S. sclerotiorum gpd* génje által kódolt fehérje analízise 67
4.2. *S. SCLEROTIORUM GPD* GÉNJÉNEK EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATA 67
4.2.1. Kodonhasználat vizsgálata 67
4.2.2. A *gpd* gén expressziójának vizsgálata 68
4.2.3. *gpd*, mint molekuláris marker *S. sclerotiorum* infekció során 71

4.3. *S. SCLEROTIORUM PG6* ÉS *PG7* GÉNJÉNEK KLÓNOZÁSA, FUNKCIONÁLIS ANALÍZISE 76
4.3.1. *S. sclerotiorum pg6* és *pg7* génjének klónozása 77
4.3.2. *pg6 és pg7* gének szekvencia analízise 77
4.3.3. *pg6* és *pg7* gének által kódolt fehérjék analízise 81
4.3.4. *pg6* és *pg7* gének 5' szekvenciájának analízise 83
4.4. *S. SCLEROTIORUM* POLIGALAKTURONÁZ GÉNCSALÁDJÁNAK EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATA 85
4.4.1. *S. sclerotiorum* poligalakturonáz géncsaládjának *in planta* expressziós vizsgálata 85
4.4.1.1. Az idő függvényében végzett *in planta* expressziós vizsgálata 85
4.4.1.2. "Térben" (zónákban) végzett *in planta* expressziós vizsgálat 89
4.4.2. *pg5, pg6, pg7* gének *in vitro* expressziós vizsgálata 92
5. ÖSSZEFOGLALÁS 97
6. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ (SUMMARY IN ENHLISH) 101
7. IDÉZETT IRODALOM 105
8. SZERZŐ PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉGE 125
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 127

BEVEZETÉS

A *Sclerotinia sclerotiorum* széles gazdakörrel bíró (több mint 400 gazdanövénye ismert) nekrotróf, fitopatogén gomba. Legnagyobb károkat a mérsékelt övi területeken okozza, ám a világon szinte mindenütt megtalálható. Magyarországon két legfontosabb olajnövényünk, a napraforgó és a repce legfontosabb kórokozója.

Annak ellenére, hogy gazdasági szempontból egy rendkívül fontos növénykórokozó gombáról van szó, az ellene való védekezés ma még nem megoldott. A gomba kitartóképletei (szkleróciumok) rendkívül ellenállóak, a talajban maradva fertőzőképességüket akár évekig képesek megőrizni, s emellett az egész tenyészidőszak során képes fertőzni a gazdanövényt. Számára kedvező körülmények között bármikor támadhat, így tartós védettséget a vegyszeres védekezés sem ad. Noha ma már ismertek kis mértékben toleráns hibridek, olyan fajta/hibrid, mely nagyfokú rezisztenciát mutatna, ma még egyetlen gazdanövénynél sem áll rendelkezésre. A biológiai védekezési kísérletek közül *Coniothyrium minitans* gombával való védekezés látszik a legsikeresebbnek, ám ennek felhasználása még csak zárt termesztő berendezésekben engedélyezett.

A *S. sclerotiorum* okozta fertőzés során a gomba számos sejtfaldegradáló enzimet termel, melyek vélhetően rendkívül fontos szerepet játszanak az infekcióban. Kísérleteink célja *S. sclerotiorum* poligalakturonáz géncsaládjának (*pg 1-3*, *pg5*, *pg6* és *pg7*) jobb megismerése volt, valamint egy olyan molekuláris marker (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén) izolálása, mely lehetővé teszi a gomba-növény kapcsolatban a gomba metabolizmusának nyomon követését. A munkánk során kapott eredmények remélhetőleg hasznosak lesznek egy, a *S. sclerotiorum* ellen hatékony védekezés kialakításában, másrészt alapkutatást végezve eredményeink bővítik a gomba poligalakturonázokat valamint glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt kódoló gének expressziójáról rendelkezésre álló információkat.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. NÖVÉNYI SEJTFAL – SEJTFALBONTÓ ENZIMEK

1.1.1. Növényi sejtfal

A sejtfal meghatározó szereppel bír a növény felépítésében, hisz mechanikai erőt biztosít és fenntartja a sejt alakját és méretét. Mindemellett meghatározó szerepet játszik a transzport folyamatokban és fontos védelmi vonal is. A növényi sejtfal felépítésében négy komponens játszik alapvető szerepet: cellulóz, hemicellulóz, pektin és lignin.

A cellulóz D-glükóz polimer (β-1,4), melynek feladata a sejtfal merevségének biztosítása. A láncok közötti H-hidak egy kristályos szerkezetet (mikrofibrila) eredményeznek. A kristályos és amorf (nem kristályos) régiók aránya eltérő lehet.

A hemicellulóz változatos összetételű heteropoliszacharid. A fő hemicellulóz (xilán) β-1,4 kötéssel kapcsolt D-xilóz alkotta polimer. Ehhez a lánchoz számos oldallánc kapcsolódhat. A másodlagos hemicellulóz glükomannán, melyet egymáshoz β-1,4 kötéssel kapcsolódó D-mannóz és D-glükóz alkot D-galaktóz oldalcsoportokkal. A xiloglükán esetében β-1,4 kötéssel kapcsolt D-glükóz alkotta polimerről van szó, ahol a glükózt D-xilóz helyettesítheti. L-arabinóz és D-galaktóz kapcsolódhat a xilózhoz, míg L-fukóz a galaktózhoz.

A pektin a heteropoliszaharidok egy másik csoportja, ahol α-1,4 kötéssel kapcsolódó D-galakturonsav alkotja a láncot, melyet a "hairy" (szőrös) régióban α-1,2 kötéssel kapcsolódó L-ramnóz helyettesít. Ez a régió nevét a ramnózhoz kapcsolódó L-arabinóz és D-galaktóz alkotta hosszú oldalláncokról kapta. A "smooth" (sima) régióban a galakturonsav gyakran acetilált az O-2/O-3-an, illetve metilált az O-6-on. Jelentős eltérés lehet a különböző sejtfal domének metilációs fokát illetően (0-80%; McCann és Roberts 1996). A nem metilált poligalakturonsav Ca^{2+} kötése révén egy térhalós szerkezetet hozhat létre (un. "egg-box" szerkezet).

A lignin a sejtfal cellulózból és hemicellulózból felépülő rácsszerkezetének molekuláris üregeibe rakódik be, a sejtfal mechanikai ellenálló képességét növeli. A lignin felépítésében meghatározó szerepet játszanak aromás komponensek, melyekhez gyakran metoxi- vagy fenolos hidroxil-csoportok kapcsolódnak. Az aromás egységeket összekötő részekben általában heterociklusban lévő oxigén található.

A sejtfalkutatásban felhasznált különböző módszerek alapján a sejtfal kialakulásának módjára három alapvető modellt dolgoztak ki: celluláris, fázis és hálózat modell.

A celluláris modell a sejtosztodást követő fejlődésre, differenciálódásra épül. Röviddel az osztódás után a sejtek megnyúlnak és egy flexibilis extracelluláris réteget, a primer sejtfalat hoznak létre. Ezt követő rárakódások (appozíció) a rigidebb másodlagos sejtfalat eredményezik. A középlemez a szomszédos növényi sejteket tartja össze, melynek főalkotóeleme a pektin.

A fázis, illetve a hálózat modell a mikroszkópos analízisek eredményeképpen alakult ki. A modell alapja, hogy a cellulóz alapú fibrilláris fázis a mátrix fázisba ágyazódik. A mátrix fázist alkotó komponensek: pektin, hemicellulóz, lignin és fehérje (pl. extenzin). A fibrilláris cellulóz nem kovalensen kapcsolódva a hemicellulózhoz egy cellulóz-hemicellulóz hálózatot hoz létre, összekapcsolva így a fibrilláris és mátrix fázist. Az egyes komponensek, hálózatok közötti keresztkötések egy bonyolult, összetett rendszert eredményeznek. A sejtfal összetétele egy adott fajon, sőt egyeden belül is jelentős eltérést mutathat.

1.1.2. Patogén gomba behatolása a gazdanövénybe (appresszórium/sejtfalbontó enzimek)

A fertőzés létrejöttében meghatározó jelentőségű a patogén gazdán történő megtapadása, illetve az azt követő gazdanövénybe történő behatolás. A fitopatogén gombák többféle módon képesek a gazdanövénybe hatolni, egyes gombák természetes nyílásokon (sztóma, seb), míg mások direkt penetrációval, áttörve a növényi felszínt. Ez utóbbi esetben számos gomba speciális fertőző képletet (appresszórium) hoz létre.

Kísérleti munkám egyik célja a *S. sclerotiorum* növénypatogén gomba poligalakturonáz géncsaládjának vizsgálata és molekuláris jellemzése volt. Az irodalmi áttekintésben ezért a hangsúlyt döntően a gombák sejtfaldegradáló enzimrendszerére (különös figyelemmel a poligalakturonázokra) fektettem. Mindemellett fontosnak tartom az appresszórium, mint speciális fertőző képlet jellemzését is, hisz *Magnaporthe grisea*, mint modellszervezet vizsgálata során a jelenség számos részlete vált ismertté molekuláris szinten.

1.1.2.1. A *Magnaporthe grisea* speciális fertőző struktúrája (appresszóriuma)

A *M. grisea* a rizs világszerte ismert, nagy károkat okozó betegségéért (járványos rizsbarnulás) felelős, s mindemellett fontos kísérleti modellszervezet is. Konídiumának levélre való kerülése után a spóra egy nyálkaréteget termel, mely biztosítja kötődését a kutikulához. A spóra csírázását követően a csíratömlő csúcsán képződik az appresszórium, amely jelentős turgornyomást fejt ki (8 MPa, Howard és mtsi. 1991). Ez a nyomásnövekedés az appresszóriumban az intracelluláris glicerol szint gyors emelkedésével magyarázható, fenntartásában pedig a appresszórium specializált, melanint tartalmazó sejtfala játszik szerepet (Howard és mtsi. 1991). A melanin bioszintézisének gátlása esetén a gomba nem képes betegséget okozni (Chumley és Valent 1990). A növény nem képes ellenállni ennek a jelentős nyomásnak, így a gomba áttöri a kutikulát, valamint az epidermális sejtfalat és egy penetrációs hifával behatol a növénybe. Ezt követően a penetrációs hifa elágazó un. infekciós (fertőző) hifává alakul, melyet a levél teljes kolonizációja követ (Heath és mtsi. 1990). A fertőzés során mind a növényi sejtekben, mind a sejtek között elterjed a gomba, a betegség tünetei 3-5 nappal a fertőzés kezdete után jelentkeznek.

Az appresszóriumképzés molekuláris szintű magyarázata teljes egészében ma még nem lehetséges, ám számos részlet ismert. Az appresszórium kialakulása a növényi szövetfelszín okozta fizikai és kémiai ingerekre való reakció, melyben alapvető szereppel bír a Pth11 membránfehérje (DeZwaan és mtsi. 1999). Az MPG1 hidrofobin hozzájárul a csíratömlő levélfelszínhez való erős kötődéséhez (Talbot és mtsi. 1996), valamint protein-kináz kaszkádok aktiválásához: ezek alapvetők az appresszórium kialakításában, a lipid transzportban és az infekcióban részt vevő sejtek szénhidráttartalékainak kialakításában valamint az emelkedett turgornyomás képzésében (Adachi és mtsi. 1998; Dixon és mtsi. 1999; Thines és mtsi. 2000). Az MPG1 deficiens mutáns virulenciája jelentősen csökkent, ám nem veszett el teljes mértékben.

A penetrációs hifa kialakításában fontos szerepet játszik a PDE1 membránfehérje, mely egy, az aminofoszfolipid transzlokázok DRS2 családjába tartozó P-tipusú ATP-áz. A fertőzésben kulcsszerepet tölt be, hisz a *pde1* mutáns rendkívül redukált penetrációs képességgel bír (Balhadere és Talbot 2001). A P-típus elnevezés az aktivációja során kialakuló foszfoenzim intermediertől származik. A P-tipusú ATP-ázok számos transzport és jelátviteli folyamatban vesznek részt. Jellemző rájuk

egy un. "core", vagy mag struktúra, mely egy foszforilációs és egy ATP-kötő helyből áll, valamint 3 konszenzus szekvenciából. A DRS2 család több, csak rá jellemző doménnel bír (Catty 1997). Jelentősége a membrán foszfolipid asszimetriájának fenntartásában van, mely a biológiai membránok alapvető sajátsága. A kolin foszfolipidek elsősorban (foszfatidilkolin, szfingomielin) a plazmamembrán külső rétegében, míg az aminofoszfolipidek (foszfatidilszerin és foszfatidiletanolamin) nagyobb mértékben a belső rétegben találhatóak. A foszfolipidek asszimetrikus eloszlása a membrán két oldalát eltérő biokémiai tulajdonságokkal, speciális biológiai funkciókkal ruházza fel.

A penetrációs hifa kialakulása az appresszóriumon egy pórus megjelenésével kezdődik, melyre jellemző a specializálódott sejtfal hiánya, valamint a membrán közvetlen kapcsolata a levél felszínével. Az appresszórium pórusából kilépő, a levél kutikulája felé, illetve azon keresztül növő penetrációs hifára a rendkívül gyors sejtfalszintézis és növekedés jellemző (Bourett és Howard 1992). Valószínű, hogy a PDE1 szerepe a hifa növekedésének reorientációjában keresendő, hisz az általa fenntartott membránasszimetria fontos lehet a membrán konformációjának gyors módosulásában a növekedés során. Mindazonáltal az sem zárható ki, hogy az élesztő DRS2-höz (Chen és mtsi. 1999) hasonlóan (mellyel szekvenciáját illetően szoros rokonságot mutat) endocitotikus folyamatokban venne részt. A fonalas gombákban az endocitózis nagy jelentőséggel bír a polarizált növekedésben a membrán reciklizációja miatt. A PDE1 szerepet játszik az endoszómális vezikulák megfelelő mozgásában, illetve dokkolásában a penetrációs hifa kialakulásakor.

A növénypatogén gombák által okozott fertőzésekben szerepet játszó enzimek egy új csoportját reprezentálja a PDE1 fehérje, mely a védekezésben új célpont is lehet, hisz a P-tipusú ATP-ázok a legjobban tanulmányozott fehérjék közé tartoznak topológiájukat, illetve drogokkal szembeni reakciójukat illetően (Moller és mtsi. 1996).

1.1.2.2 Sejtfalbontó enzimek

Kutinázok

A kutikula kutin (és pektin) rétegének lebontásáról számos tudományos megfigyelés áll rendelkezésre. Kutináztermelés egyaránt ismert pro- és eukarioták körében, ám leginkább fonalas gombáknál tanulmányozott. Kutinázaktivitást először

a szaprobionta *Penicillium spinulosum* esetében mutattak ki (Heinen W 1960), majd ezt követően fordult az érdeklődés a kutinázok fertőzésben betöltött szerepe felé. *Fusarium solani f. sp. pisi* esetében immunoelektron mikroszkópos kísérletekkel igazolták a kutináztermelést a gazda kutikuláján való áthatoláskor (Shaykh 1977). Sikeresen akadályozták meg az intakt kutikulájú borsó fertőzését *F. solani f. sp. pisi*-vel, melynek kutinázt termelését inhibitorokkal gátolták, ám ezen ágensek a már roncsolt kutikulájú borsó infekcióját nem befolyásolták (Maiti és Kolattukudy 1979; Köller és mtsi. 1982). *F. solani f. sp. pisi* kutináz génjével transzformált *Mycosphaerella* (mely a papayát természetes nyiláson át támadja) egészséges kutikulával rendelkező növény infekciójára volt képes, *Fusarium* kutináz elleni antitestje pedig megakadályozta ezt a fertőzést (Dickman és mtsi. 1989). Szintén a kutinázok fertőzésben betöltött szerepét igazolta Cavete (1992), aki *Botrytis cinerea* gerberafertőzését gátolta kutináz elleni monoklonális antitesttel.

A *F. solani f. sp. pisi* 77-2-3 törzse egyetlen kutináz gént tartalmaz, ellentétben a nagy virulenciájú törzsekkel, ahol több kópia jelenlétét igazolták (Kolattukudy és mtsi. 1985). Stahl és Schafer (1992) borsóval végzett kísérletek során nem talált eltérést a mutáns és a vad törzs között, azt jelezvén, hogy ebben az esetben a kutinázok nem játszanak szerepet a növény fertőzésében. Mindezzel gyökeresen ellentmondó eredményekről (csökkent virulenciáról) számolt be Rogers (1994), holott kísérleteihez ugyanazt a mutáns törzset és tesztrendszert (borsó) használta. Az ellentmondás okát ő a nem megfelelően végrehajtott és értékelt kísérleti rendszerben látja. A csírázó konídiumok képesek a sztrómán keresztül is a gazdába lépni (Bywater 1959), így ebben a tesztrendszerben elengedhetetlen a folyamatos mikroszkópos ellenőrzés, valamint a különböző spóraszámmal végzett kísérletek. Nagy mennyiségű konídiumot használva, csupán az inkubációs idő végén tett megfigyelések hamis következtetéseket eredményezhetnek, hisz a gazdanövényt a sztrómán át is fertőzni képes mutáns, valamint a vad törzs által okozott tünetek között nincs különbség. A *M. grisea* kutináz génjének roncsolását követően a mutáns kutin-hidroláz aktivitást mutatott (Sweigard 1992; Rogers 1994), így nem dönthető el, hogy a mutáns változatlan infekciós képessége ennek a maradék enzimaktivitásnak köszönhető vagy a kutináz ebben az esetben nem játszik szerepet a patogenitásban. A *Colletotrichum gloeosporioides* kutináz deficiens mutánsa csökkent infekciós képességgel bírt (Dickman és Patil 1986), ám nem találtak összefüggést

Colletotrichum lagenarium 13 mutánsa esetén a kutinázaktivitás valamint a patogenitás között (Bonnen és Hammerschmidt 1989).

Ebben a fejezetben kell említést tenni a növényi kutikula legkülső rétegét alkotó viasz gomba általi degradációjáról, mely ma még kevéssé ismert. *C. gloeosporioides* (avokádót fertőző forma) appresszórium formálásában igazolták a viasz szerepét (Podila és mtsi. 1993; Hwang és mtsi. 1995). Ebben az esetben a specializáció igen magas fokáról van szó, hisz itt a viasz hosszú szénláncú zsíralkohol-komponensei ($>C_{24}$) játszanak meghatározó szerepet, amelyek jelentős mennyiségben találhatóak az avokádót borító viaszban.

Cellulázok

A cellulázok kooperatív módon végzik a cellulóz teljes hidrolízisét. Az endoglükanáz oligoszacharidokat, míg a cellobiohidroláz cellobiózt szabadít fel a polimerből. A β-glükozidáz az oligoszacharidok bontását végzi tovább glükóz monomerig, az exoglükanáz az oligoszacharidokból és cellulózból hasít le glükózt. A natív cellulóz kristályos természete miatt ez a folyamat lassúbb, mint a pektin vagy a xilán lebontása. A növénypatológusok általános véleménye szerint a cellulázok nem játszanak meghatározó szerepet a patogenitásban, mivel tipikusan a fertőzés kései szakaszában jelennek meg (Cooper 1984).

A lignin lebontása

A lignin (hasonlóan a cellulózhoz) különösen ellenálló az enzimatikus bontással szemben. Csupán egyes prokarióták és gombák képesek a lignocellulóz komplett lebontására. A lignin lebontásában részt vevő enzimek vizsgálatában modellszervezettként szolgál a basidiomycota *Phanerochaete chrysosporium*. Ebben az esetben két nagy enzimcsalád érintett a lignin lebontásában: a lignin peroxidázok (LiP) és a Mn-függő peroxidázok (MnP) (Ma és mtsi. 2001). *Pleurotus eryngii*-ből olyan, a lignin lebontásában szerepet játszó peroxidázt izoláltak, mely mind a Mn-függő peroxidázok (Mn^{2+} oxidációja), mind a lignin peroxidázok (aromás szubsztrátok oxidációja) katalitikus tulajdonságaival rendelkezik (Ruiz-Duenas és mtsi. 1999).

Xilanázok

A növényi sejtfal felépítésében fontos szereppel bíró hemicellulóz főkomponense a xilán, így annak lebontását végző xilanázok szerepe fontos lehet a növénykórokozó gomba támadása során. Az endoxilanáz a polimer belső kötéseit hasítva oligoszahacharidokat képez, melyek további degradációját a β-xilozidáz végzi.

Cochliobolus carbonum xilanáz génjének roncsolása nem redukálta a gomba fertőzőképességét, s ebben az esetben is mértek maradék xilanáz aktivitást, a mutáns pedig növekedést mutatott xilánon (Apel 1993). Ez a megfigyelés több xilanáz gént feltételez, ám ismert az is, hogy a sejtfal-depolimerázok nem abszolút specifikusak, így a xilanázok és cellulázok között strukturális hasonlóságot és reciprok aktivitást figyeltek meg (Henrissat 1989).

Proteázok

A proteázok, mint potenciális virulenciafaktorok a humán patogének körében alaposan tanulmányozottak, hisz az emberi, állati intercelluláris mátrix (ellentétben a növényekével) elsősorban fehérje. A növények kapcsán kevesebb információ áll rendelkezésre. A növényi sejtfal szerkezete, valamint összetétele (10 %-a is lehet protein) azt suggalják, hogy a proteázok is fontosak lehetnek az infekcióban (Carpita és Gilbeaut 1993).

Egy aszpartil-proteázt azonosítottak virulenciafaktortként *Botrytis cinerea* fertőzés esetén (Movahedi és Heale 1990). *Pyrenopeziza brassicae* proteáz-negatív, nem-patogén mutánsának cisztein proteáz génnel történő transzformálása helyreállította a gomba fertőzőképességét (Ball és mtsi. 1991). Ezzel szemben *Cochliobolus carbonum* két proteáz génjének inaktiválása redukálta a proteolitikus aktivitást a virulencia változása nélkül (Murphy és Walton 1996). *Cochliobolus heterostrophus* proteáz mutánsa változatlan módon patogén maradt (Lyngholm 1993).

Pektinázok

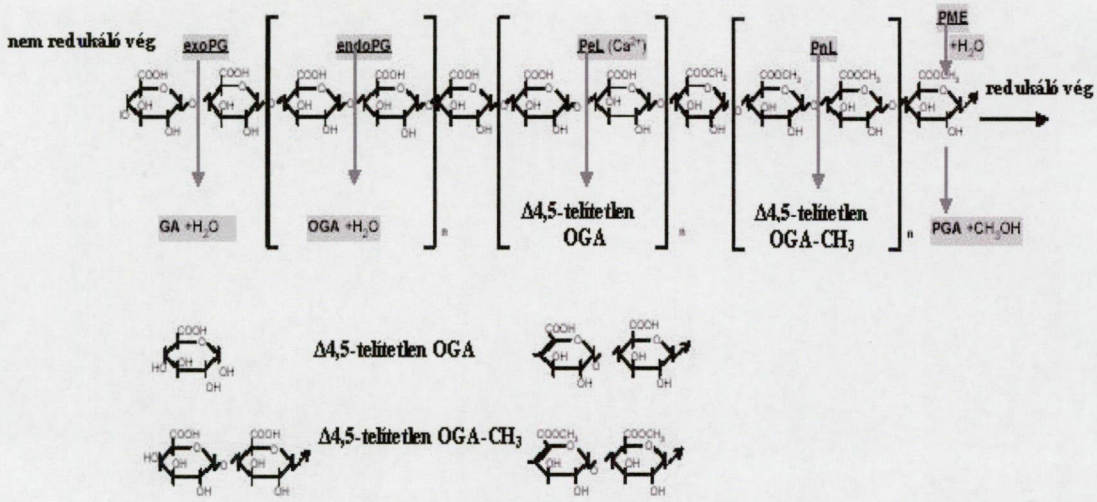
A növénypatogént enzimarzenálja teszi képessé az egyes gazdanövények eltérő, változatos pektinjének lebontására. A pektinázok között különbséget tehetünk reakciómechanizmusuk (β-elimináció, illetve hidrolízis), illetve terminális /random (exo/endopektinázok) támadásmódjuk révén.(**1. ábra).**

Liázok

A pektin, pektát valamint ramnogalakturonát liáz β-eliminációval hasító pektináz: ez a reakció telítetlen nem-redukáló láncvéget eredményez. A pektin, illetve a pektát liáz között világos különbség tehető a Ca^{2+} igény alapján, hisz a pektát liáz számára alapvető fontossággal bír ez az ion, míg a pektin liáz nem igényli aktivitásához. Mindemellett a pektin liáz erősen, míg a pektát liáz gyengén metilált szubsztrátot preferál. A ramnogalakturonát liáz nem igényel Ca^{2+}-ot, ám pozitívan hat aktivitására. A pektin és pektát liáz a pektin "smooth" (sima), míg a ramnogalakturonát liáz a "hairy" (szőrös) régiójában hasít (ten Have 2000)

Egyéb pektinázok

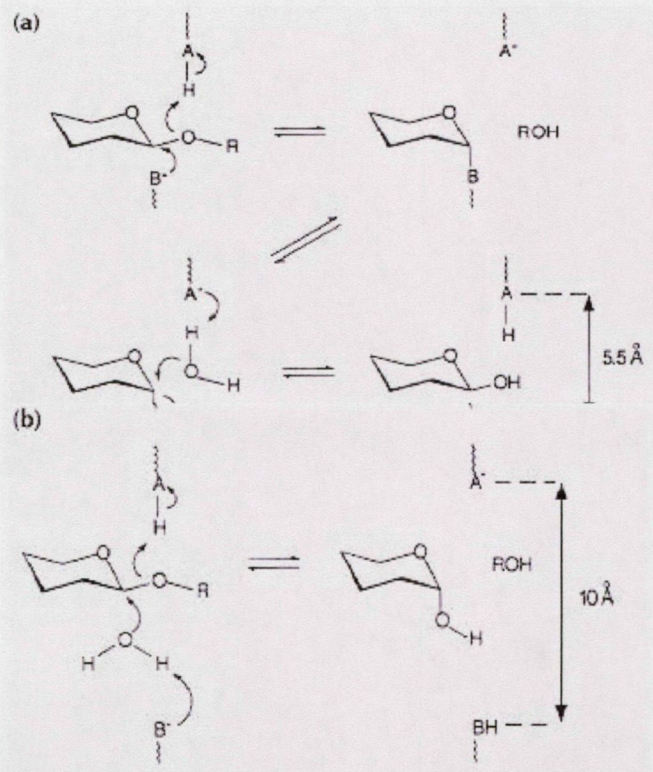
A pektin komplex összetétele magyarázza, hogy lebontásában a fenntiekben ismertetett enzimek mellett számos, más funkciót ellátó enzim is szerepet játszik. A pektin-metilészteráz a metoxi-csoport eltávolításáért felelős, tevékenysége révén a pektin polimer hozzáférhetővé, hasíthatóvá válik a metilációra érzékeny enzimek számára **(1. ábra).** Említést kell tennünk egyes speciális kötéseket hasító enzimekről (pl.: ramnogalakturonát hidroláz, ramnogalakturonát ramnohidroláz, α-ramnozidáz), melyek még hatékonyabbá teszik az adott organizmus pektinolitikus rendszerét.



1. ábra: Pektináz aktivitás poligalakturonát szubsztráttal szemben (metilált és nem-metilált régiókkal). Poligalakturonáz (PG) hidrolizálva a poligalakturonsav (PGA) α-1,4 glikozid kötését monogalakturonsavat (GA) és oligogalakturonsavat (OGA) szabadít fel. Pektát- és pektin liázok (Pel és Pnl) β-eliminációval (többnyire metilált régiókban) Δ4,5 telítetlen oligogalakturonsavat képeznek a nem-redukáló végen. Pektin metilészteráz (PME) a pektin polimer demetilációjában vesz részt (ten Have munkája alapján 2000)

A hidrolízissel hasító enzimek két csoportját különböztetjük meg: a visszatartó móddal (ez kétlépcsős reakció), illetve az invertáló mechanizmussal jellemezhető enzimek (**2. ábra**). A két csoport között közös az, hogy a katalízisben közvetlenül részt vevő aminosavak közül az egyik nukleofil (B), míg a másik protondonor (A).

A random módon hasító endopektinázok különböző méretű oligomereket, míg a polimer végén vágó exopektinázok dimereket és monomereket hoznak létre. A fitopatogén gombák sejtfaldegradáló enzimei közül a pektinázok az elsőként kimutathatók (Cooper 1983).



2. ábra: **a)** A kétlépéses visszatartó mechanizmus: az oxigén sav (A) általi protonációja és a nukleofil (B) általi aglikon eltávolítása jellemzi a reakció első lépését, mely során egy enzim-szubtrát intermedier alakul ki. Ezen átmeneti termék hidrolízise egy, a kiindulási szubsztráttal azonos sztereokémiai tulajdonsággal bíró terméket eredményez. **b)** Invertáló mechanizmus: a reakció egylépéses, amely során a termék sztereokémiája változatlan (Petersen és mtsi. alapján 1997)

1.2. POLIGALAKTURONÁZOK, PEKTINÁZOK TÉRSZERKEZET VIZSGÁLATA

1.2.1 Gomba poligalakturonázok molekuláris vizsgálata

Fokozott figyelmet szeretnék szentelni ennek az enzimcsaládnak, hisz kísérleti munkám ezen témakörhöz (is) kapcsolódik.

A poligalakturonázok a pektin molekula galakturonán kötéseit hidrolízissel hasítják. Reakciómódjukat tekintve megkülönböztetünk exo- illetve endopoligalakturonázokat. A szakirodalom a poligalakturonázok patogenitásban betöltött szerepét illetően nem egységes. A *Botrytis cinerea* 6 endopoligalakturonáz génje közül a *Bcpg1* inaktiválása mintegy 20 %-kal redukált virulenciát okozott (ten Have és mtsi. 1998). *Alternaria citri* endopoligalakturonáz mutánsa szintén redukált patogenitást mutatott citrusféléken (Isshiki és mtsi. 2001). *Claviceps purpurea* mindkét poligalakturonázának inaktiválása gyakorlatilag teljesen avirulenssé tette a mutánst (Oeser és mtsi. 2002).

Ezzel szemben a szelídgesztenyevészt okozó *Cryphonectria parasitica* 3 azonosított *pg* génje közül a *pg1* inaktiválása nem okozott fenotipikus változásokat. A *pg1* gén a legerőteljesebben kifejeződő gén *in vitro* körülmények között, ám *in planta* kevesebb, mint 5%-át adja az összPG-aktivitásnak (Gao és mtsi. 1996). *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* három természetes izolátuma deficites az *endopg1* génben. Ezen törzsek transzformálása a *pg1* génnel nem okozott észlelhető változást (Di Pietro és Roncero 1998).

F. oxysporum f. sp. lycopersici másik endopoligalakturonáz génjének (*pg5* gén) inaktiválását is hasonló megfigyelések követték (Garcia-Maceira és mtsi. 2001). Ebben az esetben nem alkotható egyértelmű, pontos kép a vizsgált gén fertőzésben betöltött szerepéről, hisz nem az összes, ismert gént inaktiválták, a maradék PG-aktivitás pedig elégséges lehet vad típusú virulencia kialakítására.

A kukoricát károsító *Cochliobolus carbonum* mindkét (exo- és endopoligalakturonáz) génjének disztrupciója nem okozott változást a gomba infekciós képességében (Scott-Craig és mtsi. 1998). Ismert tény, hogy az egyszikűek primer sejtfalának felépítésében nagyságrenddel kevesebb (körülbelül mintegy tizede) a pektin, mint a kétszikűeknél. Ez nem magyarázza azonban a *C. carbonum* esetében tapasztalt jelenséget, hisz *Claviceps purpurea* a fűfélék és gabonák magházát támadja.

Gombafajonkét jelentős eltérést találtak az endopoligalakturonázokat kódoló géneket illetően. Hét gént magába foglaló multigén családot írtak le *A. niger* esetében (Parenicová és mtsi. 1998), hat génről számoltak *B. cinerea*–nál (Wubben és mtsi. 1999), hét gén ismert az általam is tanulmányozott *S. sclerotiorum* gombában (Fraissinet-Tachet és mtsi. 1995). Három gén ismert a fentiekben említett *C. parasitica* és *A. flavus*, kettő *C. purpurea*, *F. oxysporum* és *Colletotrichum lindemuthianum* (Centis és mtsi. 1996), míg egy *F. moniliforme* (Caprari és mtsi. 1993) valamint *C. carbonum* –a másik ismert poligalakturonáz exoaktivitást mutat– esetében.

A poligalakturonáz géncsalád biológiai jelentősége ma még nem tisztázott. Egyes vélemények szerint a géncsalád mérete összefüggésben áll az adott gomba gazdaspecificitásával. Széles gazdakörrel bíró patogén esetén nagy számú gén áll a gomba rendelkezésére, míg a gazdanövények redukált száma a kevés *pg* génnel lenne magyarázható (Esquerré-Tugayé és mtsi. 2000). A sok gén lehetővé teheti a patogén számára a különböző gazdanövények eltérő szerkezetű és összetételű sejtfalának degradációját, valamint növelheti a gomba adaptációs képességét a védekezési reakciókkal szemben. A *B. cinerea* és a *S. sclerotiorum* esetében ezen elmélet összefüggésben áll a tapasztaltakkal, hisz mindkét nekrotróf gomba széles gazdakörrel bír, míg a két *pg* génnel rendelkező *C. lindemuthianum* specificitása csupán a Fabacaea-ékra szűkíthető. Ismertek azonban olyan *Botrytis* fajok (szerzők nem pontosították), melyek egyetlen növényt fertőznek, ám a más *Botrytis* törzsekben leírt összes *pg* génnel rendelkeznek (Wubben és mtsi. 1999). A sok növényt fertőzni képes *Phytophtora cinnamonni* 17 poligalakturonázát azonosították, ám szintén nagyszámú génnel rendelkezik a néhány Solanacaea-t károsító *Phytophtora infestans* is. Ezen esetekben elképzelhető, hogy nem minden gén kódol funkcióképes fehérjét.

Lehetséges, hogy a magyarázat nem, illetve nem csupán a patogén gazdakörének méretével áll összefüggésben. A számos PG izoforma reflektálhat a növényi sejtfal komplexitására, hisz annak felépítése eltérő lehet fajon, sőt egy adott egyeden belül is. A patogénnek rendelkeznie kell a különböző növényi szövetek eltérő körülményei között is aktív izoenzimmel.

1.2.2. *Botrytis cinerea* poligalakturonáz rendszerének vizsgálata

B. cinerea endopoligalakturonáz rendszere jól jellemzett, számos információ áll rendelkezésre, s mivel az általám vizsgált fitopatogén gomba (*S. sclerotiorum*) közeli rokona (Sclerotiniaceae család, Botrytis génusz), így fontosnak tartom ezen ismeretek összefoglalását.

Ten Have és mtsi. 1998-ban izolálták *A. niger pgaII* heterológ génpróbát használva az első (*Bcpg1*) poligalakturonázt *B. cinerea*-ból (SAS 56 törzs). *In vitro* (1% PGA-n, 1% szacharózon) valamint *in planta* (paradicsom levelének fertőzése során) hasonló, konstitutív *Bcpg1* expressziót figyeltek meg. A gén roncsolásával (parciális génhelyettesítéssel) kapott mutáns még mindig fertőzőképes volt, ám a gomba növényen történő inokulációját követően a lézió növekedése jelentősen lassabb volt a kontrollhoz képest. Mindebből azt a következtetést vonták le, hogy a *Bcpg1* gén meghatározó szerepet játszik a fertőzésben. *Bcpg1* gént hibridizációs próbaként használva, nem szigorú hibridizációs feltételeket alkalmazva számos pozitív fágklónt izoláltak a *B. cinerea* génbankjának vizsgálata során. Ezen klónok restrikciós enzim, Southern- valamint nukleotidszekvencia analízise 5 újabb poligalakturonáz gén (*Bcpg 2-6*) azonosítását eredményezte.

Megvizsgálva különböző *B. cinerea* törzset illetve különböző *Botrytis* fajokat minden esetben az összes gén jelenlétét igazolták (Wubben és mtsi. 1999), amely megkérdőjelezi, hogy valóban a széles gazdaspecificitást (*B. cinerea* több mint 200 növényt képes betegíteni) szolgálja-e a számos gént tartalmazó géncsalád jelenléte, hisz a *Botrytis* génusz tagjai közül csupán a *B. cinerea* rendelkezik nagyszámú gazdanövénnyel. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy a hibridizációs kísérlet csupán DNS-szintű információt ad, s nem árul el semmit arról, hogy az adott gén valóban kifejeződik-e illetve az egyes izolátumokban az adott fehérjék ugyanazon funkcióval rendelkeznek-e (lásd **1.2.1. "Gomba poligalakturonázok molekuláris vizsgálata"** c. fejezetet).

A gének expressziójának *in vitro* vizsgálatát követően a következő megállapításokat tették: A *Bcpg1* és *Bcpg2* gének mind a négy vizsgált szénforráson (pektin, glükóz, galakturonsav, poligalakturonsav) kifejeződtek, *Bcpg4* és *Bcpg6* géneknél a galakturonsav, míg *Bcpg3* gén esetén az alacsony pH indukáló hatását figyelték meg. A *Bcpg4* génnél az indukált expresszió glükózzal represszálható volt, *Bcpg5* indukciójának magyarázatára pedig az alacsony pH és galakturonsav együttes

hatását ajánlották (Wubben és mtsi. 2000). Korábban Van der Cruyssen és mtsi.(1994) biokémiai analízisük során leírtak egy konstitutívan kifejeződő bázikus endoPG-t, amely nincs glükóz represszionak alávetve (*Bcpg1* és *Bcpg2* esetében tapasztaltak), valamint beszámoltak galakturonsav által indukált savas endoPG-okról is (*Bcpg4* és *Bcpg6* vizsgálata során megfigyeltek). Az egyes gének promotereinek analízise során PacC és CreA traszkripciós faktorok által felismert konszenzus szekvenciákat azonosítottak, valamint Tudzynski és mtsi. (2000) CreA-val homológ fehérjét kódoló gént írtak le (lásd **1.3. "pH, szén- és nitrogénforrás indukálta transzkripciós szabályozás"** c. fejezetet).

In planta (paradicsom, bab, alma, cukkini) végzett vizsgálatok az *in vitro* kísérletekhez hasonlóan a poligalakturonáz gének differenciált expresszióját mutatták, függően a gazdanövénytől illetve az infekció előrehaladtától (ten Have és mtsi. 2001). A *Bcpg1* gén az összes vizsgált növény fertőzése során kifejeződött, bár eltérő intenzitással. *Bcpg2* három növény esetében a fertőzés kezdeti szakaszában volt detektálható, alma esetében nem mutatott expressziót. A savas pH-val rendelkező alma esetében gyenge *Bcpg1* aktivitás mellett erős *Bcpg3* és *Bcpg5* expressziót tapasztaltak, amely összhangban áll az *in vitro* kísérletek során tett megfigyelésekkel. *Bcpg4* expressziója bab és paradicsom fertőzése során összhangban áll, követi *Bcpg1* és *Bcpg2* kifejeződését, amely szintén megerősíti az *in vitro* vizsgálat során tapasztalt galakturonsav okozta indukciót, ugyanakkor *Bcpg6* is hasonló képet mutatott az *in vitro* ananlízis során, ám *in planta* a két gén eltérő expressziós mintázatot mutat. Mindez jól mutatja, hogy az *in vitro* körülmények között szerzett tapasztalatok valóban csupán tájékoztató jellegűek, hisz egy növény fertőzése során számos tényező együttes hatása érvényesül, amelyek modellezése rendkívül nehéz és hosszadalmas munka. Mindazonáltal az *in vitro* szerzett tapasztalatok rendkívül fontosak és hasznosak az *in planta* tapasztalt megfigyelések magyarázatában.

Összegzésül elmondható, hogy mind a 6 gén expresszálódott *in vitro* és *in planta*, ám eltérő módon. A ma ismert adatok birtokában elmondható, hogy *B. cinerea* endopoligalakturonáz géncsaládja egy különböző körülmények között kifejeződni képes, flexibilis rendszert biztosít a gomba számára, ugyanakkor a jelenlegi ismeretek szerint széles gazdaköre nem magyarázható ezzel. Elképzelhető, hogy a *Bcpg1* és *2* gének (körülményektől függően együtt illetve külön-külön) biztosítanak egy állandó aktivitást s ehhez társulnak az egyes, valószínűleg

"specifikusabb feladatú" poligalakturonázok. Jelenlegi tudásunk szerint nem állíthatjuk, hogy az egyes gének között kooperatív működés lenne, nevezetesen az egyes enzimek által képzett termék(ek) indukálnák a géncsalád egyéb tagjainak átíródását illetve gátolnák azok működését, ugyanakkor ezen kaszkádszerű működés nem zárható ki, sőt vonzó, logikus elmélet. Mindazonáltal igazolásához számos újabb kísérlet szükséges, hisz nagyon sok kérdésre választ adnának újabb molekuláris (génroncsolás), biokémai (processzivitás vizsgálata) és sztereokémiai (háromdimeziós szerkezet meghatározása és analízise) vizsgálatok.

1.2.3.Poligalakturonázok biokémiai jellemzése, a processzivitás fogalma

Az *A. niger* szaprofita gomba poligalakturonáz családját alkotó hét fehérje biokémiai tulajdonságairól számos információ áll már rendelkezésre.

Az *A. niger* génkönyvtárának vizsgálata 7 endopoligalakturonáz (PGI, II, A-E) gén jelenlétét igazolta (Bussink és mtsi. 1992). Az enzimcsalád mind a 7 tagját klónozták (Bussink és mtsi. (1990, 1991, 1992); Parenicova és mtsi. (1998, 2000 A és B), az érett fehérjék 66-85%-os homológiájáról számoltak be, endo módon hasító poligalakturonázként jellemezték őket. Az egyes enzimek túltermeltetését és tisztítását a speciális biokémiai paraméterek meghatározása követte. A pH optimumukról elmondható, hogy a savas tartományba esik (pH 3.8 (PGE)-pH5.0 (PGD). Az egyes fehérjék azonban egészen eltérő specifikus aktivitást mutattak poligalakturonáttal, mint szubsztráttal szemben: PGC 415; PGII 36.5; PGA 16; PGI 13.8; PGB 8.3; PGD 1.55; PGE 0.5 μkat/mg. Ezek az eredmények jelzik, hogy a csekély specifikus aktivitást mutató enzimek esetében a poligalakturonsav nem ideális szubsztrát. Mindemellett PGA és B részlegesen metilált szubsztrát preferenciát mutat (22-45%), szemben a többi poligalakturonázzal, melyek eltérő toleranciával rendelkeznek a metilált szubsztráttal szemben [(legérzékenyebbnek a PGII mutatkozott), Benen és mtsi. 1999; Parenicova és mtsi. 1998, 2000 A és B)].(Szeretnék utalni az endoPGII krisztallográfiás vizsgálata során az Asn-186 és Glu-252 vizsgálat során kapott eredményekre, lásd **1.2.5. "Pektinolitikus enzimek krisztallográfiás vizsgálata"** c. fejezetet).

A biokémiai vizsgálatok során processzív enzimként jellemezték a PGI, A, C és D enzimeket, míg nem-processzívként a PGII, B és E fehérjéket. A processzivitás fogalmát először Robyt és French (1967, 1970) írták le α-amilázok kapcsán:

többszörösen támadó enzimként definiálták a processzív enzimet, amelyek az első hasítást követően nem engedik el a szubsztrátot, így az újabb enzimtámadásnak van kitéve. Ezzel szemben a nem-processzív enzim a szubsztrátot csupán egyszer hasítja. Ennek következtében egy nem-processzív enzim polimert történő emésztése során hosszú oligomerek képződnek, melyek a reakció előrehaladtával fokozatosan, arányosan alakulnak át kisebb oligomerekké illetve monomerré. Egy processzív tulajdonságú enzim esetében viszont (a többszörös támadásnak köszönhetően) a reakció kezdetét követően gyorsan megjelennek a rövid oligomerek illetve monomerek (Parenicova és mtsi. 2000).

Különböző hosszúságú oligomerekkel végzett kísérletekből kapott enzimkinetikai adatok (v_{max}, K_m), valamint egy adott glikozidos kötés kapcsán tapasztalt hasítási gyakoriság ("bond-cleavage frequencies", BCF) felhasználhatóak az adott enzim alegység számának becslésére (Benen és mtsi. 1999). *A. niger* endoPG I, II és C esetében tett vizsgálatok során azt állapították meg, hogy minimálisan 7 alegység alkotja ezen enzimeket (Benen és mtsi. 1999), ezzel szemben PGD esetében a szerzők csupán 4 lehetséges alegységről tesznek említést. Mindazonáltal a PGD az egyetlen *A. niger* poligalakturonáz, mely hidrolizálni képes a digalakturonát szubsztrátot, a szerzők, mint oligogalakturonát hidrolázt definiálták (Parenicova és mtsi. 2000).

Benen és mtsi. (1999) a –5-ös alegység müködésével magyarázták endoPGI processzivitását feltételezve, hogy ez az az alegység, mely a hasítást követően kötve tartja a szubsztrátot. A nem-processzív endoPGII-vel kapott krisztallográfiás eredmények (van Santen és mtsi. 1999), valamint az *A. niger* endopoligalakturonázok elsődleges szekvenciáit felhasználva rendkívül érdekes megállapítást tettek a processzivitás kapcsán (Pages és mtsi. 2001). Munkájuk konklúziója az volt, hogy egy aminosaveltéréssel magyarázható egy enzim (*A. niger* endopoligalakturonázok esetében) processzív, illetve nem-processzív tulajdonsága. A processzív enzimeknél egy arginint, míg a nem-processzíveknél egy szerint találunk a fehérje –5-ös alegységében. Az eredetileg processzív tulajdonsággal bíró endoPGI-nél egy arginin-szerin csere (R95S) nem-processzívvé tette az enzimet, míg ezzel ellenkezőleg az endoPGII-öt (mely eredetileg nem-processzív volt) a szerin-arginin (S91R) csere processzívvé alakította. Itt kell megjegyezni, hogy a PGD esetében ez az elmélet nem alkalmazható, hiszen a 4 alegységes enzim nem rendelkezik az itt jellemzett –5-ös alegységgel. Ismert az is, hogy a PGD jelentős

szekvenciaeltérést mutat a fehérje N-terminális oldalán valamint a szerzők (megkülönböztetve a többi *A.niger* endopoligalakturonáztól) oligogalakturonát hidrolázként definiálták.

Összegzésképpen elmondható az *A. niger* 7 (illetve 6 és PGD?) tagot számláló poligalakturonáz családja a poligalakturonázokra jellemző savas pH optimumot mutat, ám az egyes enzimek poligalakturonsav szubsztráttal szemben mutatott specifikus aktivitása rendkívül markánsan eltérő volt (PGC esetén kiemelkedően magas a többihez viszonyítva). Mindemellett a szubsztrát metiláltságával szemben mutatott aktivitásbeli különbségek, processzív illetve nem-processzív módon hasító enzimek, valamint a csupán PGD-re jellemző digalakturonát hasító képesség egy egymásra épülő enzimkaszkád összehangolt működését feltételezi a pektin degradáció során. Elképzelhető, hogy a poligalakturonáttal szemben legjelentősebb specifikus aktivitást mutató, processzív módon hasító PGC által generált különböző hosszúságú oligomerek indukálhatják az egyes endopoligalakturonáz géneket, ahol az egyes fehérjék bizonyos hosszúságú és/vagy metiláltságú és/vagy összetételű szubsztrátra "specializáltak". Valószínűsíthető, hogy a PGD a lebontási folyamat végső fázisában játszik fontos szerepet.

1.2.4. Poligalakturonáz inhibitor proteinek (PGIPs)

Az utóbbi évtizedben került igazán az érdeklődés homlokterébe a poligalakturonáz inhibitor proteinek (PGIPs) növényi védelmi rendszerben betöltött szerepe. Ezek a fehérjék a sejtfalban lokalizáltak, s az un. "leucin rich repeat"(LRR) fehérjecsalád tagjai. Ezen csoportba tartozó fehérjék közül számos meghatározó szereppel bír a patogénekkel szembeni védekezésben.

Phaseolus vulgaris (bab) PGIP-jének jelenlétében *F. moniliforme* vagy *A. niger* endoPG-jének homogalakturonánnal történő inkubációja során elicitor-aktivitású (a növény védelmi rendszerét indukálni képes) oligomerek (OGA) szabadultak fel (Cervone és mtsi. 1989). Ezen megfigyelésből azt a következtetést vonták le, miszerint a poligalakturonsav endoPG általi lebontása során olyan speciális hosszal, polimerizációs fokkal bíró oligomerek akkumulálódnak, melyek aktiválni képesek a növény védelmi rekcióit. *B. cinerea* endoPG-aktivitását teljes mértékben gátolta körtéből izolált PGIP, ebben az esetben sem OGA akkumulációt,

sem elicitor hatást nem figyeltek meg (Sharrock és Labavitch 1994). Cook és mtsi. (1999) négy PGIP-pel hét gomba endoPG-t teszteltek: itt egyértelmű volt a endoPG-ékre tett gátló hatás, ám egyetlen esetben sem számoltak be speciális hosszal bíró oligomer felhalmozódásáról, így valószínűsíthető, hogy ez nem általános érvényű. Lehetséges, hogy Cervone és mtsi. (1989) által leírt OGA felhalmozódás –fentiekben részletezett- egy speciális rezisztencia hatásmechanizmust takar.

Jelentős előrelépést jelentett, hogy az elmúlt néhány évben röntgenkrisztallográfiás eljárással három poligalakturonáz struktúráját sikerült meghatározni. Ma már jóval többet tudunk így egy prokarióta (*Erwinia carotovora*), illetve két gomba PG-ról (*A. niger*-AnPG, van Santen és mtsi. 1999; illetve *F. moniliforme*-FmPG, Pickersgill és mtsi. 1998). A két utóbbi fehérje β-hélix szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat, a két fehérje szinte teljesen egymásba illeszthető. *F. moniliforme* egyetlen poligalakturonázának *P. vulgaris* PGIP2-vel alkotott komplexének analízise rendkívül fontos információt adott azon aminosavakról, amelyek a poligalakturonáz részéről játszanak fontos szerepet a kapcsolat kialakításában. A szubsztrát-kötőhelyen található Arg-267 és Lys-269, valamint az aktív centrum előtt lokalizált His-188 szerepét találták meghatározónak. Az érintett aminosavak pozíciója azt suggalja, hogy a PGIP kompetíciót folytat a szubsztráttal a kötőhelyért, illetve az enzimreakciót sztérikus módon is gátolja az aktív centrum előtti közvetlen kötődéssel. E három aminosav az adott pozícióban megtalálható AnPGII-ben is, valószínűleg hasonló funkcióval bírnak *P. vulgaris* PGIP2-vel szemben. Ugyanakkor ismert, hogy AnPGII valamint FmPG eltérő affinitást mutat *P. vulgaris* PGIP2-vel szemben, valamint PGIP specificitásuk is más, hisz amíg AnPGII-öt gátolja *P. vulgaris* PGIP1, addig a FmPG-t nem.

A növény egyedfejlődése során számos folyamatban szerepelnek poligalakturonázok: növekedésben, gyümölcs puhulásában, gyökér kialakulásában, növényi szerv leválásában (abcisszió), pollen kialakulásában. Joggal merül fel a kérdés, vajon milyen módon kerülik ki a növényi poligalakturonázok a patogének poligalakturonázai ellen termelt PGIP-ek hatását. Federici és mtsi. (2001) azt tapasztalták, hogy a FmPG esetében jellemzett His-188-nak megfelelő aminosav prolin a növényi poligalakturonázokban, valamint egy triptofán található az aktív centrumban. FmPG-ében a His-188 cseréje prolinra valamint egy triptofán inszerciója a gomba poligalakturonáz aktív centrumába teljesen gátolta *P. vulgaris* PGIP2-vel történő kölcsönhatást.

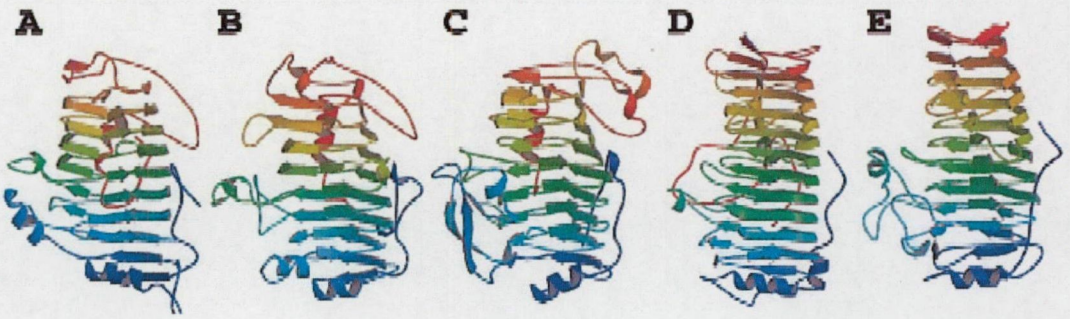
A *P. vulgaris* PGIP1 és PGIP2 szekvenciája között 8 aminosavnyi eltérés van. A PGIP2 nyolc érintett aminosavjának egyenkénti cseréje PGIP1 megfelelő aminosavjára minden esetben csökkentette a FmPG-vel szembeni affinitást. A 253-as pozióban lévő glutamin szerepét meghatározónak találták, lizinre történő cseréje drámaian csökkentette a kölcsönhatást. Valószínűleg hidrogén kötések kialakítása révén járul hozzá a glutamin a PG-PGIP komplex képzéséhez. A lizin glutaminra történő visszacseréje újra képessé tette a fehérjét FmPG-jének kötésére (Leckie és mtsi. 1999).

Összegzésképpen tehát elmondható, hogy kórokozók elleni védekezésében fontos és speciális szereppel bírnak a növényi poligalakturonáz inhibitor proteinek. Ezek a fehérjék gátolják és modulálják a patogén poligalakturonázainak aktivitását, bizonyos esetekben elősegítik elicitor-aktív oligomerek felszabadulását, valamint ezek mennyiségének növekedését, amelyek további védelmi reakciókat indukálnak. A patogének poligalakturonázai és az őket gátoló inhibitor proteinek kapcsolatára nagyfokú specializáltság jellemző, egy igen finom, sajátos védekezést biztosítva így a növénynek.

1.2.5. Pektinolitikus enzimek krisztallográfiás vizsgálata

Az elmúlt néhány évben a krisztallográfiás vizsgálati módszer rohamos fejlődésének köszönhetően számos pektinolitikus enzim háromdimenziós szerkezete vált ismertté: három pektát-liáz (*Erwinia chrysanthemi* PelC, PelE és *Bacillus subtilis* Pel), két *A. niger* pektin-liáz PelA és B, *A. aculeatus* rhamnogalakturonázA, valamint *E. carotovora* poligalakturonáz és *A. niger* endopoligalakturonázII.

A növényi sejtfal felépítésében meghatározó szereppel bíró pektin hasítása történhet a liázokra jellemző β-eliminációval, illetve a poligalakturonázok által hidrolízissel. Ez utóbbi enzimekre jellemző, hogy víz addiciójával hasítják a glikozidos kötést, míg a liázok a C5-ről egy protont transzferálnak a glikozidos kötésnek, így hasítván azt. A β-eliminációval történő hasítás során a végtermékben a nem-redukáló vég felöl a C4-C5 között telítetlen kötés alakul ki. A glikozid hidrolázok savas, míg a liázok lúgos pH optimummal rendelkeznek a katalízisben.

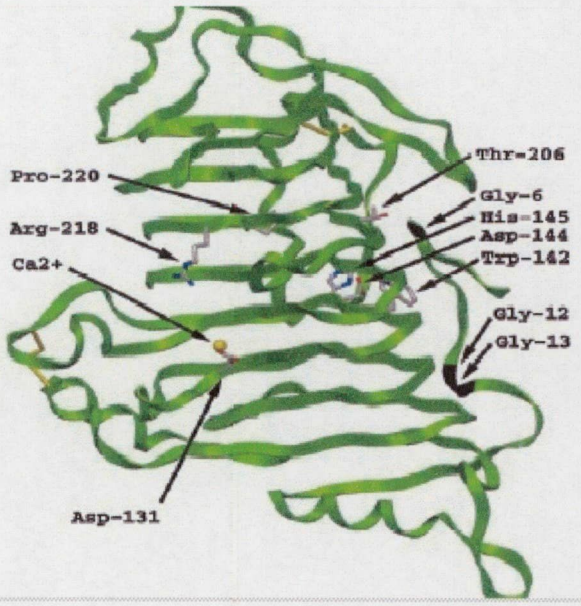


3. ábra: Pektinolitikus enzimek háromdimenziós megjelenítése **A)** *E. chrysanthemi* pektát-liázC **B)** *E. chrysanthemi* pektát-liázE **C)** *A. niger* pektin liázB **D)** *E. carotovora* poligalakturonáz **E)** *A. aculeatus* rhamnogalakturonázA (Herron és mtsi. munkája alapján 2000)

Az eltérő reakciómechanizmus ellenére az ismert pektinolitikus enzimek alapvetően megegyező háromdimenziós szerkezettel bírnak: egy jobbmenetes parallel β-hélix struktúra (**3. ábra**) *E. chrysanthemi* PelC esetében 8 csavarulat található a hélixben, melyek egymásra rakódva 3 parallel elhelyezkedésű β-lemezt hoznak létre (Yoder és mtsi. 1993). Jellemző erre a formára, hogy a belül található szomszédos aminosavak egy belső, stabilizáló szereppel rendelkező magot ("core") hoznak létre. Ugyanakkor a felszínen elhelyezkedő aminosavak hurkokat ("loop") képeznek, melyek hosszukat és összetételüket illetően eltérőek lehetnek. A belső magból kinyúlva ezen hurkok képzik a szubsztrát-kötőhelyet és az aktív centrumot.

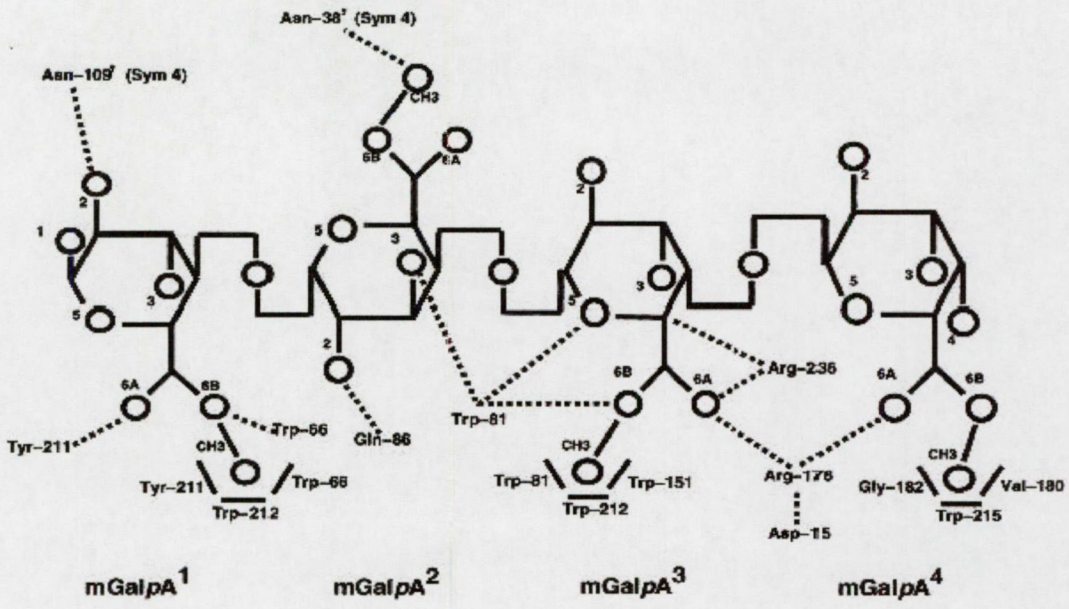
PelC (*E. chrysanthemi* pektát-liáz C) struktúrájának analízise két dologról adott felvilágosítást: egy feltételezett Ca^{2+}-kötő helyről, valamint ezen kötőhelyet körülölelő negatív töltésű árokról, melynek felépítése képessé teszi galakturonsav monomerből felépülő oligomer megkötésére (Yoder és mtsi. 1993). *E. chrysanthemi* egy másik pektát-liázáról (PelE, mely 22% szekvencia homológiát mutat PelC-vel) ismert, hogy a feltételezett Ca^{2+}-kötő hely mellett koncentrálódik a negatív töltések döntő többsége (Lietzke és mtsi. 1994). PelC és PelE háromdimenziós szerkezetének egymáshoz illesztése során (felhasználva a primer szekvenciák párosítása ("aligment") során nyert információkat) 10 konzervatív pozíciójú aminosavat azonosítottak, melyek elhelyezkedésűkből fakadóan két csoportra voltak oszthatóak (**4. ábra,** Herron és mtsi. 1995). Az első csoportot alkotó Asp-131, Arg-218 és

Pro-220 a feltételezett Ca^{2+}-kötő hely mellett találhatóak, míg a második csoportot képző 7 aminosav a fehérje ellenkező oldalán lokalizált. Hely specifikus mutagenezis bizonyította, hogy az első csoport 3 tagja érintett a pektinolitikus aktivitásban, ám a második csoport tagjainak szerepe nem tisztázódott (Kita és mtsi. 1996; Herron és mtsi. 2000)



4. ábra : Pektát-liázokban azonosított konzervatív helyzetű aminosavak

Fontos információkat adott a katalitikus aktivitásában sérült mutáns szubsztráttal képzett komplexének vizsgálata (Scavetta és mtsi. 1999). Meglepő volt, hogy a várt eggyel szemben 4 Ca^{2+}-t találtak az enzim-szubtrát komplexben. A legfontosabb felfedezést azonban a pektát-liáz szupercsaládban konzervált pozíciójú Arg-218 szerepét illetően tették, mely C5-ről történő proton elvonását és glikozodis kötés felé továbbítását végzi. Ca^{2+}, valamint egy konzervatív pozíciójú lizin (Lys-190) neutralizálják a savmaradékot és stabilizálják az enol átmeneti formát, s így oly lokális viszonyokat teremtenek a C5, illetve a szomszédos savmaradék körül, mely lehetővé teszi az arginin a protonelvonóként való működést.



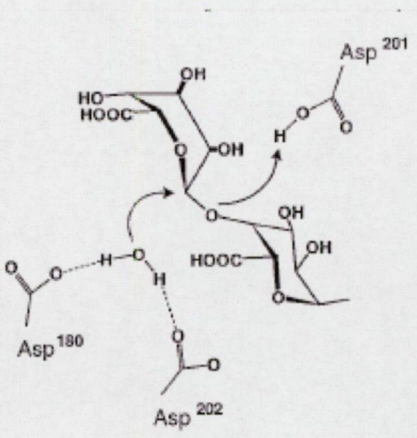
5. ábra: *A. niger* pektin-liáz B és galakturonsav oligomer ($GalpA_4$) feltételezett kölcsönhatása. A hidrogén-kötéseket pontozott vonal, az oxigén atomokat és metil-csoportokat kör jelöli (Herron és mtsi. alapján 2000)

A. niger PelB (pektin-liáz)-szubsztrát komplexet mutat az 5-ös ábra. A pektin-liázok (pektát-liázokkal szemben) a metilált szubsztátot preferálják és aktivitásukhoz nem igénylenek Ca^{2+}. A modell jól mutatja a metil-csoportokat körülölelő hidrofób zsebeket, melyeket elsősorban triptofán és tirozin alkot. Ca^{2+} intermediert stabilizáló szerepét feltételezhetően az Arg-176 veszi át, de lehetséges, hogy a protontranszferben is érintett. Mutációs kísérletek igazolták az Asp-154, Arg-236 és Pro-238 katalízisben betöltött szerepét. Ez utóbbi aminosav az Arg-236 orientációját segíti elő a C5 protonja felé, Asp-154 pedig pozitív töltés (Arg-176) pozíciójának stabilizálásában játszik szerepet. Ezen 3 aminosav pozíciójának megfelelő helyen a pektát-liázoknál is (PelC esetében került említésre) a katalízisben részt vevő aminosavakat találjuk (PelC-nél Asp-131, Arg-218, Pro-220, Vitali és mtsi. 1998, Herron és mtsi. 2000).

A liázok szerkezetének háromdimenziós analízise során bizonyítást nyert tehát, hogy a katalízisben részt vevő aminosavak konzervatívak mind a pektát-, mind a pektin-liázok esetében (β-eliminációval történő hasítás mindkét esetben). Eltérő szubsztrát igényükkel áll összhangban a szubsztrátkötő helyekre jellemző felületi töltés: a pektát-liázok Ca^{2+} kötésével pozítív elektrosztatikus potenciált hoznak létre,

míg pektin-liázok szubsztrátkötő helyének kialakításában részt vevő aminosavak negatív felszíni töltést képeznek. A pektát-liázok az enyhén metilált homogalakturonsavat hasítják, ahol a negatív töltésű galakturonsav momomerek egy globális felszíni negatív töltést hoznak létre, így ezen szubsztrát megkötésére ideális a pozítiv felszíni szubsztrátkötő hely. Ezzel szemben a szubsztrát erősen metilált régióiban a metil-csoportok neutralizálják a monomerek okozta nettó negatív töltést, ezért a pektin-liázok szubsztrátkötő helye eltérő a pektát-liázokra jellemzőktől.

A másik nagy család, a glikozid-hidrolázok háromdimenziós analízise is számos fontos és érdekes információt adott. Az *A. niger* endopoligalakturonáz II-jének röntgenkrisztallográfiás vizsgálata is a fentiekben megismert alapszerkezetet tárta fel (van Santen és mtsi. 1999). A 10 csavarulat alkotta hélixben 4 párhuzamos β-redő található. A "loopok" (hurkok) által formált, a fehérje felszínén található árokban elhelyezkedő aminosavak (Asp-180, Asp-201, Asp-202, His-223, Arg-256, Lys-258) helyspecifikus mutagenezise igazolta ezen aminosavak meghatarázó szerepét a szubsztrát-kötésben/katalízisben. (**6. ábra**). A feltételezett reakciómechanizmus szerint Asp-180 és Asp-202 a támadó víz molekulát aktiválják, míg Asp-201 a hasítandó glikolitikus kötés oxigénjét protonálja. Ezen három aminosav mutációja jelentősen csökkenti az enzim aktivitását (Armand és mtsi. 2000). Arg-256 és Lys-258 a szubsztrátkötésben játszanak szerepet, míg His-223 a háromdimenziós szerkezetben elfoglalt pozicíója révén valószínűleg az Asp-201 ideális ioniozációs állapotát tartja fenn (Armand és mtsi. 2000).



6. ábra: Glikozid-hidrolázok feltételezett reakciómechanizmusa (Armand és mtsi. alapján 2000)

P22 fág ramnozidáz (*Salmonella typhimuriumot* támadó fág azon apparátusának része, mely a baktérium O-antigénjét hidrolizálja) aktív centrumában a fentiekben említett három aszpartáttal (Asp-180, 201 és 202) geometriailag hasonló elhelyezkedésű savas aminosavakat azonosítottak: Glu-359 (Asp-180), Asp-392 (Asp-201) és Asp-395 (Asp-202) (Steinbacher és mtsi. 1996, 1997). *E. carotovora* poligalakturonáz (PehA) esetében az Asp-180-nak és Asp-201-nek megfelelő aminosavak közvetlenül érintettek a katalízisben (Pickersgill és mtsi. 1997). *A. aculeatus* rhamnogalakturonázA-ban is (RgázA; Petersen és mtsi. 1997) is megtalálhatóak ezek az aminosavak, annyi különbséggel, hogy Asp-202-őnek megfelelő aminosavat glutamát helyettesíti. A 2-es ábrán látható, hogy az un. invertáló hidrolázokra kidolgozott alapséma szerint a katalízisben közvetlenül részt vevő aminosavak karboxil-csoportja közötti távolság 10 Å. Érdekességképpen említést érdemel, hogy *A. niger* endoPGII-nél Asp-180 és 201 közötti távolság 4,1 Å, míg P22 fág esetében is eltér a modelltől, mely azt suggalja, hogy a nukleofil támadás valamint a protonáció valószínűleg a glikozidos kötés egyazon oldaláról érkezik.

A glikozil-hidrolázok esetében is konzervatív felépítésű aktív centrumok váltak ismerté a háromdimenziós analízis során. A konzervatív régiók mellett itt is fellelhetők az egyes enzimekre jellemző speciális helyzetű aminosavak. *A. niger* endoPGII-ben Met-150 található, ám a többi 5 *A. niger* endoPG-ben glicint találunk. A kén atom által generált elektrosztatikus potenciál fontos lehet egy esetlegesen speciális, az endoPGII-re jellemző szubsztrát megkötésében. Az endoPGII-nél a Glu-252 alaninra történő cseréje növeli az enzim toleranciáját fokozottan metilált szubsztráttal szemben. Ebben a pozicióban glutamátot találunk PGII és PGA esetében, míg a többi *A. niger* endoPG-nél glicint illetve alanint. EndoPGII-nél Asn-186 glutamátra történő cseréje esetén a teljesen demetilált szubsztrát volt az enzim számára ideális. Asp-282-öt találunk 5 *A. niger* endoPG-nél a PGB-t kivéve, ahol ezen a helyen lizin van. A 28-as glikozil hidroláz alcsalád tagjaira jellemző a konzervatív pozíciójú hisztidin (*A. niger* endoPGII-nél a fentiekben His-223-ként említett, Pages és mtsi. 2000) *A. aculeatus* ramnogalakturonáz A kivételével (Armand és mtsi. 2000), amely szintén bizonyos specializáltságot sejteti. Lehetséges, hogy összefüggésben áll a ramnogalakturonáz ramnóz-galaktóz α-1,2 kötésének hasításával, szemben a poligalakturonázokra jellemző galaktóz-galaktóz α-1,4 aktivitásával.

Összegzésképpen elmondható, hogy mind a liázok, mind a poligalakturonázok hasonló háromdimenziós szerkezetet mutatnak (jobbmenetes parallel β-hélix struktúra). Ezen vizsgálati módszerrel tett megfigyelések alátámasztják a biokémia vizsgálatok során tett észrevételeket, miszerint az egyes reakció mechanizmusokhoz (β-elimináció, hidrolízis) konzervatív felépítésű katalítikus centrumok társíthatóak. Ez a vizsgálati módszer fehérje, illetve fehérje-szubsztrát szinten adhat magyarázatot a patogén által termelt különböző enzimek számos izoformájának fertőzésben betöltött szerepére. Az egyes izoformák specificitását meghatározó aminosavak azonosítása révén lehetőség nyílik a patogenezis során zajló események pontos rekonstrukciójára, az egyes enzimformák speciális feladatának precíz meghatározására.

1.3. pH, SZÉN- ÉS NITROGÉNFORRÁS INDUKÁLTA TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS

A külső körülményekhez való alkalmazkodás, a homeosztázis fenntartása, a megfelelő gének aktiválása illetve represszió ja a gombák körében is alapvető jelentőségű. Számos szabályozó mechanizmus vesz részt egy rendkívül komplex és bonyolult regulációs rendszer kialakításában. Ennek a rendszernek a teljes áttekintésére nem vállalkozok, hisz ennek a dolgozatnak nem ez a célja, ám kísérleti eredményeim értékeléséhez, analíziséhez mindenképpen szükségesnek tartom három alapvető folyamat összefoglalását.

1.3.1. pH szabályozás

A. nidulans-ban PacC transzkripciós faktor mediálta pH regulációt irtak le (Denison 2000). Hat *pal* gén (*pal A, B, C, F, H, I*) alkotta ambiens pH érzékelő szignál transzdukciós rendszer szabályozza a PacC fehérjét. Savas pH-n a PacC nem aktivátora az alkalikus géneknek és nem represszora a savas géneknek, így az acidikus gének nem represszáltak, míg az alkalikus gének nem expresszáltak. Lúgos közegben a *pal* rendszeren keresztül a PacC fehérje aktiválódik, s mint az alkalikus gének aktivátora, illetve az acidikus gének represszora tevékenykedik. A *pal* mutánsok ezért a savas körülmények közötti növekedésre jellemző fenotípust mutatnak.

Alkalikus pH-n az inaktív PacC fehérje aktiválása a C-terminális inhibitor régió proteolitikus hasításán keresztül zajlik. Savas pH-n a PacC fehérjén belüli, intramolekuláris kölcsönhatások miatt a hasítás nem jöhet létre. Lúgos pH-n ezen molekulán belüli kötések a *pal* rendszernek köszönhetően megszünnek, így lehetőség nyílik a proteolítikus hasításra.

A *pal* rendszer hatásmechanizmusa ma még nem tisztázott. A PalB egy proteáz, mely a calpainnal, egy kálcium aktiválta cisztein proteázzal mutat hasonlóságot (Denison és mtsi. 1995). Valószínűleg a proteolitikus aktivációban játszik szerepet a PalB fehérje. A *palI* és *palH* gének szekvenciájuk alapján nagy valószínűséggel membránfehérjét kódolnak, így funkciójukat tekintve pH-szenzor proteinként a külső pH érzékelésében játszhatnak szerepet.

Meghatározó szereppel bír a *S. sclerotiorum* okozta fertőzés során a gomba által termelt oxálsav (lásd **1.5.6. "Oxálsav-oxidatív burst"** című fejezet). Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a pH számos folyamat szabályozásában döntő fontosságú. Növekvő alkalikus pH-nak kitett *S. sclerotiorum* növekvő oxálsav produkciót mutatott; szklerócium képzését elősegítette a savas, ám gátolta a neutrális pH. Rollins és mtsi. (2001) *S. sclerotiorum*-ból klónozta a *pacC*-vel homológiát mutató *pac1* gént. *Pac1* gén promoter szekvenciájának analízise 8 konszenzus PacC kötőhelyet tárt fel, mely autoregulációt sugall. Mindemellett a szekvencia alapján jósolt szerkezete is számottevő hasonlóságot mutatott az *A. nidulans* PacC fehérjével. A két fehérje közötti funkcionális homológiát *A. nidulans pacC* null mutánsának *pac1*-gyel történő komplementációjával igazolták. Mindez azt suggalja, hogy *S. sclerotiorum*-ban is létezik a Pal/Pac rendszer, s feltételezhetően hasonló módon működve hasonlót funkciót tölt be, mint *A. nidulans pal* rendszere. A *pal* rendszert képző gének klónozása és funkcionális analízise folyamatban van (Antal és Bruel, személyes közlés).

1.3.2. Szénforrás mediálta represszió ("carbon catabolita repression")

A fitopatogén gomba pektinbontó enzimei révén a növényi sejtfal lebontásával a növekedéséhez szükséges szénforráshoz jut. A pektin lebontása során képződő oligomerek, egyszerű cukrok meghatározó szerepet játszanak a pektinolitikus enzimek transzkripciójának szabályozásában. A szén katabolit represszió ("carbon catabolite repression") egy olyan transzkripciós szabályozó

mechanizmus, amely lehetővé teszi a gomba számára, hogy metabolizmusát a rendelkezésére álló glükózhoz (esetlegesen más metabolizálható szénforráshoz) igazítsa.

A glükóz mediálta génrepresszió *Saccharomyces cerevisae*-ben jól jellemzett folyamat. A Migp1 egy Cys_2His_2 cink ujj ("zinc finger") transzkripciós fehérje, mely az Ssn6p és Tup1p faktorokkal együtt a glükóz represszált gének 5'-SYGGRG-3' konszenzus promoter szekvenciájához kötődve gátolja azok transzkripcióját. Amennyiben nincs glükóz, Snf1p szerin-treonin kináz aktiválódik és foszforilálja Mig1p-t, amely nem fejt ki tovább represszor hatást és elhagyja a sejtmagot. Glükóz jelenlétében Snf1p inaktív, nem foszforilálja Mig1p-t, amely a sejtmagba lépve represszálja a célgéneket (Ostling és Ronne 1998; Treitel és mtsi. 1998). Egy második (Mig2p) cink ujj faktort is azonosítottak, ám ez kisebb jelentőséggel bír, mint a Mig1p. Mig2p erősíti, finomítja az invertázt kódoló *SUC2* gén Mig1p általi szabályozását, ám nem gyakorol hatást egyéb glükóz-represszált génre. Az extracelluláris glükóz koncentrációjáról egy foszforilációs kaszkád szállítja az információt a sejtbe.

Fonalas gombák esetében jóval kevesebb információ áll rendelkezésre. *A. nidulans*-ban azonosított Cys_2His_2 fehérje (CREA) DNS-kötő doménje nagy homológiát mutat a Mig1p ezen doménjével, s emellett képes a glükóz represszált gének 5'-SYGGRG-3' motívumjához kötődni. Hasonló fehérjéket azonosítottak *A. niger*-ben (CREA, Drysdale és mtsi. 1993), *T. reesei*-ben és *T. harzianum*-ban (CRE1, Strauss és mtsi. 1995; Ilmen és mtsi. 1996; Takashima és mtsi. 1996), valamint *Metarhizium anisopliae*-ben (CRR1, Screen és mtsi. 1997), mely alapjaiban analóg regulációt feltételez. *A. nidulans*-ban glükózon alacsonyabb a CREA-szintet detektáltak (represszor szénforrás), mint glicerolon vagy arabinózon (nem represszor szénforrás) (Shroff és mtsi. 1996; Strauss és mtsi. 1999). Hasonló jelenségről számoltak be *T. reesei* esetében, ahol a nem-represszáló szénforráson tapasztalt magas *cre1* transzkriptum szint teljesen eltűnt, miután glükózt adtak a tápközeghez (Ilmen és mtsi. 1996).

S. sclerotiorum-ból is klónozásra került a *cre1* gén, homológiát mutatva a *creA* és *MIG1* génekkel. A *cre1* gén expresszója pozitív korrelációt mutat az exocelluláris glükóz koncentrációval ellentétben az *A. nidulans* és *T. reesei* esetében tapasztaltakkal. Ugyanakkor *S. sclerotiorum cre1* gén transzkripciója is függ a külső szénforrástól. Western-blot analízis jóval magasabb CRE1 szintről tanúskodik

glükózon és glicerolon, mint pektinen. (Ez esetben is igazolódott tehát, hogy CRE1 szintézisét nem kizárólag glükóz válthatja ki, de más szénforrás is.) A pektinen tapasztalható poligalakturonáz aktivitás represszálható glicerollal (represszió mértéke kisebb, mint glükóz esetén) jelezvén, hogy glicerol befolyásolhatja az exocelluláris enzimszintézist (Riou és mtsi. 1991). Hasonló megfigyelést tettek *A. nidulans*-ban is (Solis és mtsi. 1990). Tisztázásra vár még, hogy CRE1 érintett-e ebben a folyamatban.

CRE1 stabil fehérje, mely stabilitás független a rendelkezésre álló szénforrástól. A gomba nem-indukáló közegből (pektin) indukáló tápfolyadékra (glükóz) történő átoltása után röviddel (30 perc elteltével) cikloheximiddel gátolták a fehérjeszintézist, s ezután vizsgálták a CRE1 fehérje mennyiségét immunodetekcióval. Ez a félóra elegendő volt nagy mennyiségű CRE1 szintéziséhez, ami azután 6 órával később is detektálható volt. Hasonló eredménnyel zárult a glükózról pektinre történő transzfer is (Vautard-Mey és mtsi. 1999). CRE1 represszor pektinen is (bár kisebb mértékben) detektálható Western-blot analízis során, sőt glükózról pektinre történő transzfer után nagy mennyiségben van jelen (már rögtön a transzfer után). Ismert az is, hogy a pektin indukálja az endopoligalakturonázok szintézisét is (lásd **1.2. "Poligalakturonázok, pektinázok térszerkezet vizsgálata"** című fejezetet). Igazolást nyert az is, hogy a *pg1* gén promoterében található 5'-SYGGRG-3' motívum, s ehhez a CREA transzkripciós faktor képes is kötődni (Reymond-Cotton és mtsi. 1996). Ezek az eredmények azt suggalják, hogy a CRE1 fehérje (CREA-homológ) érintett az endopoligalakturonázok regulációjában (Reymond-Cotton és mtsi. 1996; Vautard és mtsi. 1999), ám a fenntiekben leírt eredmények ismeretében a pektinen tapasztalt endopoligalakturonáz transzkripció nem magyarázható a CRE1 represszor gyors degradációjával (hisz stabilnak bizonyult).

Egy transzkripciós faktor működésének szabályozása lehetséges celluláris kompartmentizáció révén is. *S. sclerotiorum* szubcelluláris frakcióinak vizsgálata (mag és citoszol frakció) bizonyította, hogy a glükózon növekvő hifa esetén CRE1 a magban található, ám az a citoplazmába távozik, ha nincs glükóz a tápközegben. A creA$^-$ *A. nidulans* mutáns transzformációja GFP-CRE1 fúziós fehérjével igazolta ezt a megfigyelést (Vautard-Mey és mtsi. 1999). *Aequorea victoria* medúza zöld fluoreszkáló fehérjéjének (GFP: green fluorescent protein) C-terminálisát fuzionáltatták *S. sclerotiorum* CRE1 N-terminálisával. Ezen eredmények

ismeretében a glükózról pektinre történő transzfer után tapasztalható endopoligalakturonáz expresszió nagy valószínűséggel a represszor megváltozott intracelluláris lokalizációjával magyarázható. Annak a lehetőség, hogy a *S. cerevisiae* kofaktorainak (Ssn6p, Tup1p) megfelelő fehérjék is szerepet játszanak ebben a folyamatban csekély, hisz ilyen faktorokat idáig tudomásom szerint nem irtak le. A *Neurospora crassaban* leírt *rco-1* gén (mely szekvencia homológiát mutat a *TUP1* génnel) nem játszik szerepet a glükóz represszióban.

Vautard-Mey és mtsi. (2000) egy újabb GFP-CRE1 fúziós proteint állítottak elő, ahol szerin-alanin cserével (S266A) mutáltatták a CRE1 fehérje egy AMPK (cAMP-függő protein-kináz) foszforilációs motívumát. CRE1 elvesztette represszor képességét (jelezve egy szerin-treonin kináz szerepét ebben a folyamatban), ám fluoreszcens mikroszkópos analízis igazolta a fúziós protein magi jelenlétét. A magba passzív diffúzióval történő belépése nem valószínű a fúziós termék nagy mérete miatt: 74 kDa, míg Turpin és mtsi. (1999) által jelzett határ a nukleáris póruson keresztüli diffúzió számára 60 kDa.

Számos eredmény (pl.: a foszforilálható S_{266} mutációja megszünteti a represszor aktivitását; a CRE1 funkciójának elvesztése ellenére is a magban lokalizált; a CRE1 nem tudja komplementálni a MIG1/2 deficiens *S. cerevisiae*-t (Vautard és mtsi. 1999) azt suggalja, hogy a glükóz represszió eltérő módon zajlik élesztőben és fonalas gombában. Sikerült klónozni *S. sclerotiorum SNF1* génjét, mely gyenge és konstitutív expressziót mutatott mind *in planta*, mind *in vitro* körülmények között, függetlenül a szénforrástól. (S. Vacher személyes közlés). Snf1 egy protein-kináz, mely élesztőben a Mig1 fehérje regulációjában játszik szerepet (Treitel és mtsi. 1998). *C. carbonum* (kukoricát károsító fitopatogén gomba) *SNF1* génjének izolációját követően toxintermelő és toxint nem termelő törzsből egyaránt előállítottak *SNF1* mutánst (Tonukari és mtsi. 2000). A mutánsok redukált növekedést mutattak komplex szénforrásokon (pektin, xilán, kukorica sejtfalkivonat) és egyes egyszerű cukrokon (galaktóz, galakturonsav, maltóz, xilóz, arabinóz), ám nem tapasztaltak eltérést glükózon, fruktózon, illetve szaharózon történő növekedés esetében. A toxintermelő törzs esetében HC-toxin termelése, konídium és appresszórium képzése normális volt, ugyanakkor a sejtfaldegradáló enzimtermelés (β-1,3-glükanáz, pektináz, xilanáz) szintén redukált volt. *In planta* végzett kísérletek igazolták, hogy *Snf1p* szerepet játszik a kukorica infekciójában.

1.3.3. Nitrogénforrás mediálta génreguláció

A másik intenzíven kutatott terület a nitrogénforrás mediálta génreguláció. Ezt a témakört (a fentiekben jellemzett szénforrás okozta regulációhoz hasonlóan) csupán az alapfogalmakat, alapfolyamatokat érintve ismertetem, hisz rendkívül sok és szerteágazó információ áll rendelkezésre, ám ezen szabályozó folyamatok alapjainak ismeretét mindenképpen fontosnak, sőt elengedhetetlennek tartom.

Számos információ ismert már *areA* (*A. nidulans*, Kudla és mtsi. 1990), *nit-2* (*N. crassa*, Fu és mtsi. 1987), *GLN-3* (*S: cerevisiae*, Minehart és mtsi. 1991), *nre* (*Penicillium chrysogenum*, Haas és mtsi. 1995) gének által kódolt pozitív módon ható (nitrogén mediálta szabályozásban érintett) fő regulátor fehérjékről. Ezen transzkripciós faktorok a GATA-család tagjai, velük rokonságot mutató fehérjéket jellemeztek a növény- és állatvilágban is. Jellemző ezekre a fehérjékre a Cys_2-Cys_2 cink-ujj motívum, valamint a célgén 5'-GATA-3' és 5'-TATC-3' (GATA szekvencia komplementer inverze) promoter szekvenciájához kötődő DNS-kötő domén (Feng és mtsi. 1993; Marzluf és mtsi. 1997). A magasabbrendűekre leírt GATA-faktorokra két, míg a gombák esetében általában egy cink-ujj motívum jellemző (ám ismert kivétel is, mint például *Ustilago maydis*-nél leírt URBS1 szintén két cink ujjal rendelkezik, Haas és mtsi. 1997.) Ezek az általános (globális) transzkripciós faktorok számos nitrogén anyagcserében érintett gén transzkripciós szabályozásában fontosak, pozitív aktiváló módon, amikor nitrogén-forrás nem áll rendelkezésre. Fontos említést tenni arról, hogy egy adott faj rendelkezhet több GATA-faktorral is: *N. crassa*-ban legalább 5 (NIT1, WC1, WC2, NGF1, SRE, Feng és mtsi. 1998), *S. cerevisae*-ben legalább 4 (GLN3, DAL80, GAT1/NIL1, DEH1, Stanbrough és mtsi. 1995) ilyen fehérje létezik. Az is ismert, hogy az egyes szabályozó folyamatokban szerepet játszó GATA-faktorok nem csupán pozitív módon szabályoznak, mert hisz ismertek negatív hatású GATA transzkripciós faktorok is (DAL80, URBS1). Fontos az egyes GATA-faktorok által szabályozott gének promotereiben a kötőhelyek száma, orientációja, egymáshoz viszonyított helyzete, hisz 2 GATA-kötőhely funkcionálisan aktív elrendezése esetén azokat kevesebb, mint 30 bp választja el (Marzluf és mtsi. 1997). Ugyanakkor az is ismert, hogy számos faktor egymással átfedő kötőhellyel bír, valamint az a tény, hogy milyen sokrétegű, szerteágazó szabályozásban vesznek részt ezek a fehérjék azt feltételezi, hogy bonyolult és összetett transzkripciónális szabályozó folyamatokról van szó. Erre példa *N. crassa*

nit-3 (NADPH-függő nitrát-reduktázt kódoló gén, transzkripciós aktiválásahoz nitrogén derepresszió és nitrát indukció együttes hatása szükséges) NIT-2 és NIT-4 (Cys_6/Zn_2 domén felelős a DNS kötésért) transzkripciós faktorok általi szabályozása. NIT-2 illetve NIT-4 önmagában nem képes aktiválni a gént, együttes kötődésük szükségeltetik. Ez a kooperáció feltételezi ezen faktorok egymással történő kölcsönhatását, egy protein-protein interakciót (Feng és mtsi., 1998). Ez a jelenség nem példa nélküli, hisz emlős GATA-1 fehérje Sp1 és EKLF proteinekkel (Merika és mtsi. 1995), míg GATA2 JUN és FOS faktorokkal képez kapcsolatot (Kawana és mtsi. 1995).

1.4. GLICERINALDEHID-3-FOSZFÁT DEHIDROGENÁZ (GPD)

A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GPD) kulcsenzim a glikolízisben és a glükoneogenezisben: a glicerinaldehid-3-foszfát glicerinsav-1,3-difoszfáttá való átalakulását katalizálja. A *gpd* egy erősen kifejeződő gén: élesztőknél a poly (A)+ RNS 2-5%-át a *gpd* mRNS (Holland és Holland 1978; Edens és mtsi. 1984), illetve a sejten belüli fehérjék közel 5%-át a GPD teszi ki (Krebs és mtsi. 1953).

A *gpd* gén jelentősége kettős a molekuláris mikológiában. Egyrészt számos publikáció ismert, melyek a *gpd* gén szekvenciáján alapuló filogenetikai elemzést írnak le (Harmsen és mtsi. 1992; Jungehülsing és mtsi. 1994; Verdoes és mtsi. 1997, Wolff és mtsi. 2002). Másrészt egy erős expressziót mutató génről van szó, így promoter szekvenciáját számos esetben használták fel transzformációs rendszerek kialakítására a gombák körében (Punt és mtsi. 1987; Jungehülsing és mtsi. 1994; Varma és mtsi. 1999; Wolff és mtsi. 2002). Homológ transzformációs rendszer esetén (valamely saját gén promoterét felhasználó rendszer) számos esetben az adott gén hatékonyabb expresszióját tapasztalták (Mach és mtsi. 1994; Osiewacz és Ridder 1991).

Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gént erős expressziója mellett konstitutívan kifejeződő génként tartják számon (Holland és Holland 1978; Waterham és mtsi. 1997; Hirano és mtsi. 1999). Mindezzel ellentétben ma már ismert olyan tanulmány is, mely a *gpd* gén regulált expressziójáról számol be. Puyeski és mtsi. (1997) *T. harzianum gpd* génjét vizsgálva eltérő mértékű expressziót észleltek a rendelkezésre álló szénforrástól (glükózon erősebb, mint *Rhizoctonia solani* sejtfalát

alkalmazva), illetve az egyes életszakaszoktól (csökken a *gpd* gén expressziója a sporuláció alatt) függően.

1.5. *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

1.5.1. Általános leírás, morfológia

A *S. sclerotiorumot* elsőként Libert (1837) írta le *Peziza sclerotiorum* néven. Fuckel 1870-ben hozta létre a *Sclerotinia* génuszt (melyre jellemző, hogy imperfekt alak nincs) és Libert iránti tiszteletből új névvel (*S. libertiana*) illette ezt a gombát. Wakefield (1924) utal a Nemzetközi Botanikai Nomenklatúra szabályaitól való eltérésre, illetve Massee-t nevezi meg a *S. sclerotiorum* név megalkotójaként, így a *S. sclerotiorum* (Lib) Massee nevet javasolja. Azonban de Bary már 1884-ben használta publikációjában a *S. sclerotiorum* elnevezést, így valószínűleg akkor járunk el helyesen ha *S. sclerotiorum* (Lib) de Bary elnevezést alkalmazzuk.

A *S. sclerotiorum* az aszkuszos gombák legnagyobb, legtöbb fajt számláló rendjébe (Leotiales) tartozik. A rendre az egyszerű falú és egyszerű pórussal nyíló aszkuszok jellemzőek. A termőtest csésze vagy tányér alakú, nyeles vagy nyeletlen.

A Sclerotiniaceae családra barna színű, nyeles apotécium jellemző. Az aszkuszok hengeres alakúak, az aszkospórák elliptikusak és legtöbbször egysejtűek.

Mesterséges tenyészetben hófehér, sűrű micéliummal szövi be a táptalaj felületét. Öreg tenyészetekben mikrokonídiumok képződését figyelték meg (Willetts és Wong 1992, Gulya 1997). Ezek apró (2-3 μ-os), ivarsejt értékű képletek. A gomba növekedési optimuma 20-25°C közé tehető (Zándoki 2001).

Kedvezőtlen körülmények közötti túlélést a gomba kitartóképlete, a szklerócium (0.2-2 cm) biztosítja. Valódi szkleróciumról van szó, hisz fekete kéregrészre (cortex) és világosabb velőállományra (medulla) tagolódik (Willetts és Bullock 1996). A szkleróciumok képződése hifatömegből indul, a kéregsejtekben melanin halmozódik fel (fekete vagy barna színt okozva). A barna és a fekete szkleróciumok csírázási sebességében jelentős eltéréseket tapasztaltak, hisz a barnáké gyorsabb (Huang és Kosub 1990).

A szklerócium a fertőzött növényi részeken/részekben bárhol kialakulhat. Mesterséges tenyészetben a képződő kitartóképletek mérete, száma a tápanyagellátás és a törzsek függvényében erősen változik, változó továbbá a szklerócium képzés "mintázata" is (körkörös, szórt stb.). A kisebb szkleróciumok fertőzőképesebbek, mint a nagyobb méretűek (Gulyás 1993).

A gomba karpogén csírázásakor a szkleróciumokon apotéciumok képződnek. Ezek világosbarna, kehely alakú képződmények, a szkleróciumokból eredő nyélen fejlődnek, egy szkleróciumon akár 8–10 darab is (Gulya 1997). Az apotéciumokon aszkuszok képződnek, melyek 8, egysejtű, hialin aszkospórát tartalmaznak. Az aszkospórák mérete 10–113 x 5–6 μm.

A karpogén csírázást legerőteljesebben a hőmérséklet befolyásolja, az apotéciumok képződéséhez hűvös, nedves körülményekre van szükség (Huang és Kosub 1989).

1.5.2. Életciklus

A hifaaggregáció révén kialakuló áttelelő képlet a szklerócium, mely biztosítja a gomba számára a kedvezőtlen körülmények közötti túlélést. A gomba áttelelése szklerócium formájában a talajban vagy a növényi maradványokon történik.

Tavasszal megfelelő talajhőmérséklet {a csírázáshoz szükséges optimális hőmérséklet törzstől függően változik (Zándoki 2001) és nedvesség esetén a szkleróciumok kicsíráznak és fertőzik a kelő gazdanövényeket.

A vegetációs időszak későbbi szakaszában a gomba kétféle módon fertőz:

A talajfelszín közelében lévő szkleróciumok micéliumot képeznek (micéliális csírázás) és a gyökéren keresztül fertőzve szártőfertőzéseket okoznak. A betegség növényről növényre is terjedhet a talajban, a gyökerek érintkezési pontjain keresztül.

Megfelelő környezeti tényezők esetén (ami általában alacsony hőmérsékletű, csapadékos időszakot jelent) a szkleróciumokon apotéciumok jönnek létre. Az aszkuszokból kiszabaduló aszkospórák rövid életűek, ám szél és eső segítségével több kilométer távolságra eljuthatnak (Lacey 1992; Gulya 1997). Megfelelő körülmények között (víz, tápanyag) az aszkospórák kicsíráznak. Az aszkospórák a leveleket, a bimbót, a tányért fertőzik, szárközép-, bimbó-, illetve tányérfertőzést okozva.

A gazdanövény kolonizációját követően a fertőzött növényi szövetekben szkleróciumok alakulnak ki, melyek az elpusztult növénnyel a talajba kerülnek. Kedvező környezeti feltételek esetén a szkleróciumok újra kicsíráznak, így téve teljessé a ciklust.

1.5.3. Gazdakör

Purdy (1979) 361 növényfajt (64 család, 225 génusza) nevez meg, mint *S. sclerotiorum* fertőzésre fogékony gazdát. Boland és Hall (1994) már 408 növényfajról (75 család, 278 génusza) számol be. Ez utóbbi tanulmány 1 Pteridophyta, 4 nyitvatermő és 29 egyszikű növény mellett 384 kétszikű növénygazdáról számol be.

1.5.4. *Sclerotinia sclerotiorum* változékonysága

A *S. sclerotiorum* fajnál nem ismert fiziológiai specializáció (Gulya 1997) (ellentétben pl. a *Fusarium oxysporummal*, melynek különböző rasszai 1–1 gazdanövényfajra specializálódtak).

Ismert azonban, hogy egy adott gazdáról származó izolátum más gazdanövény esetén kevésbé virulens, illetve fordítva is igaz ez a jelenség (Gulya 1997). Ez azonban többszöri átoltás után nem ismételhető, azaz az eddigi ismereteink szerint nincsenek rasszok, amelyek egyik vagy másik gazdanövényt preferálnák (Mesterházy 2000).

Mindezek ellenére az egyes törzsek között természetesen jelentős különbségek vannak (a virulencia és a szkleróciumképzés morfológiája), a kórokozó genetikai variabilitása valószínűleg igen nagy, micéliális- és vegetatív kompatibilitási csoportokat képeznek a különböző törzsek.

A micéliális kompatibilitás azt jelenti, hogy a különböző törzsek hifái képesek egymás közelébe nőni, és egy közös telepet létrehozni (Kohn és mtsi. 1991). Az egymással kompatbilis törzsek, (amelyek egy MCG-be (Micéliális kompatibilitási csoport = "Mycelial Compatibility Group") tartoznak) egymással teljesen össze tudnak nőni, míg az inkompatibilis törzsek esetén az egymás közelébe kerülő idegen hifák elhalnak, a két telep között gátlási zóna alakul ki. Valószínűsíthető –bár a micéliális kompatibilitás genetikai szabályozása még nem teljes mértékben ismert–, hogy a micéliális kompatibilitásért több gén felelős (Kohn és mtsi 1991; Zándoki és mtsi 2001)

Egy vegetatív kompatibilitási csoport esetén ("Vegetative compatibility group" =VCG) egyazon csoportba tartozó törzsek hifái nemcsak egymás közelébe tudnak nőni, hanem hifa anasztomózisokon keresztül heterokariont tudnak egymással képezni, azaz lehetőség van a genetikai információcserére. A vegetatív

kompatibilitás kialakításában az ún. VC–lokuszok játszanak szerepet (Cubeta és mtsi. 1997).

A micéliális és vegetatív kompatibilitási csoportokat összehasonlítva (Ford és mtsi. 1995) arra a következtetésre jutottak, hogy az azonos MCG-be tartozó törzsek nem mindig esnek egybe az egy VCG-be tartozó törzsekkel, ám ennek ellenére logikusnak tűnik az, hogy a micéliális kompatibilitás a vegetatív kompatibilitás előfeltétele, és a VCG-k az MCG-ken belül keresendők.

1.5.5. Védekezési módok

A *S. sclerotiorum* ellen ma még nem áll rendelkezésre egy önmagában hatékony (elegendő) védekezési rendszer, így rendkívül fontos az integrált növényvédelem. A hagyományos agrotechnikai és növénynemesítési védekezési módok mellett ismert számos biológiai és vegyi mód is.

Agrotechnikai védekezés, növénynemesítés

Több hatékony agrotechnikai védekezési módszer ismert: a megfelelő növényi sorrend megválasztása (vetésváltás), helyes talajművelés és növénysűrűség megválasztása, mindezek mellett fontos a megfelelő tápanyagellátottság is, hisz szerves anyaggal rendszeresen ellátott talajon a gomba ritkábban okoz kárt (Mineev és Durynina 1992).

A *S. sclerotiorummal* szemben egyetlen gazdanövény esetében sem találtak rezisztenciát, csupán fogékonyságbeli különbségeket írtak le. A növénynemesítők munkáját nehezíti, hogy a szár, a levél és a tányér rezisztenciája egymástól független genetikai szabályozással rendelkezik.

Biológiai védekezés
Antagonista gombák:

Coniothyrium minitans a legismertebb és a legjobban tanulmányozott *Sclerotinia*–antagonista. A szklerócium mellett a hifát is képes parazitálni (Stewart és mtsi. 2001). A gombából már készítményt is gyártottak (Koni), erre a célra a konídiumokat használják fel valamilyen vivőanyaggal együtt (pl.: cukor). A készítmények szántóföldi alkalmazása még kísérleti stádiumban van.

Sporidesmium sclerotivorum a *Sclerotinia*-nemzetségre specializálódott. A gomba alkalmazása azért tűnt igéretesnek (Gulya 1997), mert a világ szinte minden táján megtalálható, Magyarországon is (Litkei 1989). Hátránya viszont, hogy lassan nő és nehezen sporulál,

Trichoderma fajok: (*T.* harzianum, T. *viride, T. atroviride*)

A *T. atroviride* fajok *in vitro* kísérletekben a *Sclerotinia* egész tenyészetét elpusztították (McBeath 1998). *In planta* vizsgálatok során a *Sclerotiniás* megbetegedéseket jelentősen visszaszorították. (Campos és mtsi 2001).

Baktériumok

A *S. sclerotiorumról* izolált baktériumok közül a legjelentősebbek a *Bacillus* (*B. subtilis*) és a *Pseudomonas* (*P. cepacia, putida, fluorescens*) nemzetségbe tartoznak. A szkleróciumok csírázását jelentősen csökkentették, s magkezelés esetén megvédték a kelő növényt a fertőzéstől (Expert és Digat 1995).

Hipovirulencia

A hipovirulencia jelenségét (virulencia csökkenése) már több gombánál leírták, ám a gyakorlatban csupán még a *Cryphonectria parasitica* (gesztenye kéregrák kórokozója) esetében használják fel ezt a védekezési lehetőséget (Melzer és mtsi. 1998). A hipovirulencia kettős szálú RNS-elem (=dsRNS) megjelenéséhez kapcsolható, melyet a hipovirulens törzsek átadhatnak a virulens törzseknek, így azok is hipovirulenssé válnak (Boland 1993). A *S. sclerotiorumnál* szintén találtak ilyen hipovirulenciával rendelkező törzseket, melyek dsRNS-t tartalmaztak. Ezek lassan növekedtek, az egészséges törzsektől eltérő telepmorfológiát mutattak (Boland 1993). A hipovirulenciáért felelős dsRNS-elemek hifaanasztomózissal egyik törzsből a másikba átvihetőek (Boland 1993; Melzer 1998), ugyanakkor a gyakorlati felhasználást nehezíti, hogy anasztomózis csak egymással kompatibilis törzsek között jöhet létre.

Kémiai védekezés

Magyarországon számos szer használata engedélyezett a *Sclerotinia* elleni védekezésben {pl.: Alert S (hatóanyag: fluzilazol és karbendazim), Kolfugo Super (karbendazim), Mirage 45 EC (prokloráz), Vitavax 2000 (karboxim, thiram)}.

1.5.6. Oxálsav-oxidatív burst (támadás-védekezés)

A *S. sclerotiorum* által kiválasztott oxálsav eszenciális szerepe a fertőzésben már régóta ismert (Maxvell és Lumdsen 1970; Noyes és Hancock 1981). Az oxalát a fertőzött szövetben millimoláris koncentrációban lelhető fel (Godoy és mtsi. 1990). A növénybe manuális úton történő injektálása *S. sclerotiorum* okozta betegség tüneteire emlékeztet (Noyes és Hancock 1981). Oxálsav termelésére képtelen *Sclerotinia* mutáns apatogén, míg a revertáns törzs, mely visszanyerte az oxálsav termelő képességét normál virulenciát mutatott (Godoy és mtsi. 1990). Hasonló eredményekről számoltak be oxálsav termelő, illetve nem termelő *Sclerotinia* törzsek dohány és szója fertőzése során (Cessna és mtsi. 2000).

Az oxálsav infekcióban betöltött szerepét illetően különböző elméletek láttak napvilágot:

- Az oxálsav direkt módon toxikus lehet a növény számára (Noyes és Hancock 1981).
- Gátolja a növény termelte polifenol-oxidáz aktivitását, csökkentve így a növény védelmi rendszerének hatékonyságát (Marciano és mtsi., 1983).
- Az oxálsav gátolja az oxidatív burst kialakulását (Cessna és mtsi. 2000).
- A patogenezis során a gomba által termelt számos enzim (poligalakturonázok, savas proteázok) savas pH-n mutat maximális aktivitást, így az oxálsav az ideális savas közeg létrehozásában játszik szerepet (Bateman és Beer 1965).
- Az oxalát anion a növényi sejtfal felépítésében szerepet játszó Ca^{2+} kelátolásán keresztül gyengítheti a növényt elősegítvén a gomba okozta infekciót (Bateman és Beer 1965).

E két utóbbi elmélet (Bateman és Beer 1965) *Sclerotium rolfsii* vizsgálata során alakult ki, ám valószínűleg általános érvénnyel bír azon esetekben, ahol a növény fertőzése során meghatározó szerepet játszik az oxálsav.

Az oxidatív burst a leginkább kutatott, így erről részletesen kívánok szólni. A növényvilágban általánosan megtalálható folyamat (kontrollált $O_2^{\cdot}$ és H_2O_2 termelés), mely a fertőzött növényi szövet védekező reakciója a támadó mikrobával szemben. Ez a reakció, mely néhány perccel a patogén felismerését követően aktiválódik, elősegíti (növénytől függően) a sejtfalban keresztkötések kialakulását, illetve lignin lerakódását, védekező reakcióban érintett gének transzkripcióját, szekunder metabolitok termelését, hiperszenzitív reakció kialakulását illetve direkt módon toxikusak a patogén számára (Brisson és mtsi. 1994; Doke és mtsi. 1996; Lamb és Dixon 1997). A hiperszenzitív reakció kapcsán fontos megemlíteni, hogy ez az a terület, ahol magyar kutatók világelsők voltak számos kérdés megválaszolásában (Klement és mtsi. 1964). Az oxidatív burst rendkívül gyors kialakulása és a humán immunrendszerben leírt analóg reakció miatt intenzíven kutatott területté vált (Roilides és mtsi. 1999; Liles és mtsi. 2001).

Számos a reakciót kiváltani képes patogén és gazdanövény eredetű elicitor ismert, sőt számos nem élő eredetű elicitort is leírtak (pl. bendikar, melynek kereskedelmi neve Bion). Ezek az elicitorok valószínűleg több, egymástól független szignál transzdukciós úton keresztül aktiválnak egy oxidáz komplexet. Ismert tény, hogy az oxidatív burst kialakulását gátolja az alacsony pH (Legendre és mtsi. 1993), ugyanakkor létrejöttében meghatározó szereppel bír az emelkedett citoplazmatikus Ca^{2+}-szint (gyors, tranziens koncentráció emelkedése hírvivő (messenger) funkciót betöltve a kaszkád további komponenseit aktiválhatja), valamint protein kinázok (Cazale és mtsi. 1999; Romeis és mtsi. 1999), GTP-kötő proteinek (Kawasaki és mtsi. 1999), foszfolipázok (Chandra és mtsi. 1996).

Az oxálsav *S. sclerotiorum* okozta fertőzésben betöltött szerepét illetően ma már számos részlet ismert Cessna és mtsi (2000) jóvoltából. A kísérleti rendszer pH-jának csökkentése (oxálsav helyett sósavval) nagymértékben gátolta az oxidatív burst kialakulását, ugyanakkor az eredmények elemzése azt suggalta, hogy nem magyarázható csupán ezzel az oxálsav reakcióra tett gátló hatása.

Úgy találták, hogy az extracelluláris Ca^{2+} megkötése nem játszik primordiális szerepet az oxidatív burst oxálsav általi gátlásában, hisz oxalát és citrát jóval hatékonyabb inhibitorhatást mutatott (>90%) mint az EGTA (~25%), holott ez utóbbi vegyület legalább 10^4–szer nagyobb affinitást mutat a Ca^{2+}-mal szemben (Martel és Smith 1977). Az oxálsav nem gátolta az átmeneti intracelluláris Ca^{2+}-szint emelkedést, ellentétben egy membránpermeábilis Ca^{2+} kelátorral (BAPTA-AM).

Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy az oxálsav nem a szabad Ca^{2+} megkötésén keresztül gátolja ezt a folyamatot, hanem valószínűsíthetően a kaszkád egy későbbi lépésénél.

Cantharadin (protein-foszfatáz inhibitor) elicitor által keltett oxidatív válaszreakcióra is gátló hatást fejtett ki az oxálsav: ez arra utal, hogy inhibitor hatását a kaszkád adott proteinjének foszforilációját követően fejti ki (Cessna és mtsi 2000).

Összegzésül elmondható, hogy az oxálsav a gazdanövény oxidatív védelmi reakciójára tett gátló hatása révén jelentős előnyt biztosít a fitopatogén gombának, hisz egy növényvilágban általános és gyorsan reagáló védelmi rendszert bénít meg. Egyes növények azonban az oxálsavval szemben speciális védekezéssel bírnak: gyapotban az oxálsav fitoalexin képződést vált ki (Davis és mtsi. 1992), míg mások (búza, árpa) oxalát oxidázt termelnek.

1.5.7. *Sclerotinia sclerotiorum* sejtfalbontó enzimrendszere

1.5.7.1. Poligalakturonázok

A poligalakturonázok kiemelten fontos szerepére utal az a régóta ismert tény, hogy a fertőzés során az elsőként expresszálódó poliszacharidázok (Byrde 1979; Cooper 1983). Riou és mtsi. (1991) 16 szénhidrát szubsztráton tesztelték *S. sclerotiorum* sejtfalbontó enzimtermelését. Az analízis során a glükózidázok és poliszacharidázok számos izoformáját detektálták. A további biokémiai analízis során pektinen, mint egyedüli szénforráson a pektinolitikus enzimek szakaszos termelését figyelték meg (Riou és mtsi. 1992). 5 poligalakturonáz (PG) izoformát detektáltak a vizsgálat kezdeti szakaszában, melyet 4 újabb követett a későbbiekben. 4 izoformához pektinmetilészteráz (PME) aktivitás volt rendelhető, míg liáz aktivitás nem volt detektálható. Glükózon, mint egyedüli szénforráson, jóval alacsonyabb enzimaktivitást mutatott a gomba, hisz csupán 3 PG- és 2 PME konstitutívan expresszálódó izoformáról számolnak be. SDS-PAGE elektroforézis-immunblot analízis során exo-poligalakturonáz (exoPG) és exo-polimetilgalakturonáz (exoPMG) (Riou és mtsi. 1991) antiszérumot használtak az enzimtermelés követésére. Mindkét enzim konstitutív módon expresszálódott pektinen és glükózon, izoelektromos pontjuk alapján megfelelnek a glükózon tapasztalt zimogram (fentiekben ismertett) egyes izoformáinak.

Ezen megfigyelések alapján a szerzők a pektin polimer komplett degradációja során egy szukcesszív (időben eltérő), koordinált pektinolitikus enzimtermelést feltételeznek, ahol egyes izoformák glükóz represszáltak, míg mások konstitutív módon fejeződnek ki. Speciális antiszérumok használatával (exoPG és exoPMG) igazolták ezen enzimek meglétét *S. sclerotiorum*-ban: ezek az enzimek exo-aktivitásuk révén galakturonsav monomert képesek felszabadítani a pektin polimerből. Fraissinet-Tachet és mtsi. (1996) kísérleteik során azt tapasztalták, hogy a galakturonsav indukálja a *S. sclerotiorum* poligalakturonáz és pektináz termelését. Glükóz jelenlétében ez az indukáló hatás represszálódott, egy alap enzimtermeléstől eltekintve. Az előbbiekben megismert konstitutívan kifejeződő exoPG és exoPMG nem bizonyult galakturonsav által sem represszáltnak.

A *S. sclerotiorum* genomi génkönyvtárát heterológ génpróbával (*A. niger*) vizsgálták. A vizsgálat során izolált hét rekombináns fág restrikciós térképezése és Southern-blot analízise alapján két eltérő alcsalád volt elkülöníthető. Az egyik géncsoport mindhárom tagjának (*pg1, 2, 3*) teljes kódoló szekvenciáját tartalmazták a szubklónok, melyek izoelektromos pontjuk alapján (pI: 7.2; 7,5 és 6,9) semleges endopoligalakturonázt (*endopg*) kódoló gének (Fraissinet-Tachet és mtsi., 1995). Mindhárom gén 1143 bp-nyi kódoló régióval bír, melyet nem szakít meg intron és 380 aminosavat tartalmazó fehérjét kódol. Mindhárom gén pre-proproteint kódol, hisz a szekvencia analízis 17 aminosavnyi szignál peptid, valamint 23 aminosavnyi preprotein jelenlétét igazolta. A nukleinsav szekvenciák 5 (*pg2*) ill. 7 (*pg3*) nukleotid eltérést mutattak a *pg1* szekvenciával összevetve, míg fehérje szinten 1-1 aminosavnyi eltérés volt tapasztalható a PG1 fehérjéhez hasonlítva. A szekvenciák között lévő nagyfokú homológia azt suggalja, hogy génduplikáció történt. Waksman (1991) által tápfolyadékból tisztított savas endoPG-kel (PGII–pI 4.8; PGIII–pI 4.9) történő összehasonlítás során az egyes fehérjék aminosav összetételének analízise illetve az izoelektromos pontban való jelentős eltérés is azt suggalta, hogy két poligalakturonáz alcsaládról van szó.

Említést kell tenni *S. sclerotiorum pg5* (*Scpg5*) génjéről is (Y13669), mely a ma ismert endopoligalakturonázok közül leginkább *B. cinerea pg5* (*Bcpg5*) génjével mutat rokonságot (Wubben és mtsi. 1999). Az *Scpg5* gén egy pre-proproteint kódol, hisz a szekvencia analízis egy 19 aminosavnyi szignál peptid, valamint egy 15 aminosavnyi proprotein jelenlétét igazolta. Az érett fehérjét 353 aminosav építi fel, mely izoelektromos pontja alapján (4.71) egy savas endopoligalakturonáz.

S. sclerotiorum kromoszómáinak CHEF elektroforézissel történő elválasztását követően *pg1* próbával szigorú körülmények között történő hibridizálás egy sávot (1.6 Mb), míg kevésbé szigorú feltételek mellett két sávot (1.6 és 3.4 Mb) eredményezett. Mindezek azt jelzik, hogy *pg1*, *pg2* és *pg3* gének ugyanazon kromoszómán találhatóak, illetve a kevésbé szigorú körülmények között kapott két sáv azt suggalja, hogy egy másik *pg* géncsoport is létezik, mely egy másik kromoszómán található.

Martel és mtsi. (1996) *S. sclerotiorum* poligalakturonsavat tartalmazó tápközegéből 14 endopoligalakturonáz izoformát detektáltak ioncserélő kromatográfiás eljárással. Az egyes izoformák eltérő izoelektromos ponttal bírtak hasonló molekulatömeg mellett, mely azt suggalja, hogy a posztranszlációs glikolizáció (mely hatással van a molekulatömegre, ám nem befolyásolja a fehérje nettó töltését) nem meghatározó ezen nagyszámú izoforma kialakulásában. Savas endoPG ellen termelt antitesttel adott keresztreakció intenzitása alapján két csoportra osztották ezen fehérjéket, mely összhangban áll az ismertetett (Fraissinet-Tachet és mtsi. 1995) molekuláris eredményekkel.

Northern hibridizációs analízis igazolta, hogy a *pg2* gén (*pg2* gén esetén az egész neutrális alcsalád értendő, hisz a rendkívül nagyfokú szekvencia homológia nem teszi lehetővé ezen gének elkülönítését hibridizációs analízis során), hogy a fertőzés nagyon korai szakaszában erősen expresszálódik (Cotton és mtsi. 2002). *Scpg5* expresszióját ezidáig még nem vizsgálták.

A neutrális izoformák fertőzésben betöltött szerepének megismerése érdekében a PG2 fehérjét élesztőben (*Kluyveromyces lactis*) termeltették, tisztították és biokémiai tulajdonságait jellemezték (Cotton és mtsi. 2002). A rekombináns enzim pH optimuma 4.5, ám pH 3.5-nél, illetve 5.5-nél a maximális aktivitás csupán 30%-át mutatta. pH 3 alatt, illetve pH 6 felett az enzim inaktív volt. A *S. sclerotiorum* erős oxálsav szekréciója következtében a növényi szövet pH-ja jelentősen csökken a fertőzés során. A biokémia analízis során kapott optimális pH-érték a fertőzés kezdeti szakaszában mért pH-értékeknek felel meg, mely azt feltételezi, hogy a PG2 a fertőzés ezen szakaszában játszik fontos szerepet. PGA–val, mint szubsztráttal kapott alacsony Km-érték (0.06 mg ml^{-1}) azt suggalja, hogy az enzim nagy affinitást mutat ezen szubsztráthoz, ugyanakkor Martel és mtsi. által (1998) *S. sclerotiorum* kései folyadék kultúrájából tisztított endoPG-k magasabb Km-értékkel bírtak. A *S.*

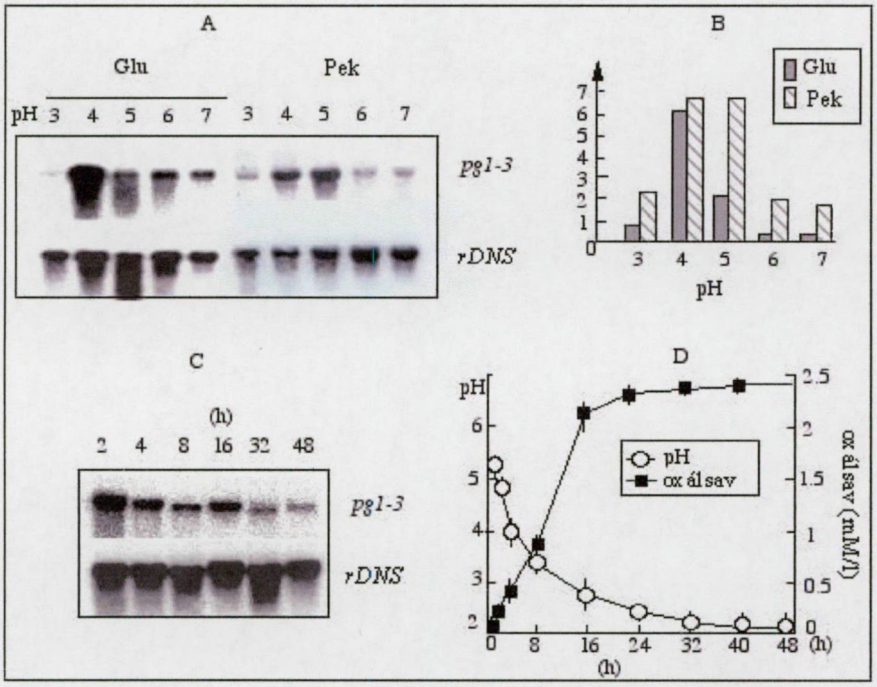
sclerotiorum által szakaszosan termelt endoPG-k tehát olyan enzimek, ahol az időben később megjelenők csökkenő affinitást mutatnak a poligalakturonsavval szemben.

Vékonyréteg-kromatográfiás analízissel vizsgálták (TLC) a PGA lebontása során megjelenő oligogalakturonátokat. Röviddel a reakció kezdetét követően már tri-, tetra- és pentamereket detektáltak. A reakció előrehaladtával arányosan növekedett a dimerek ill. a magas polimerizációs fokkal bíró oligomerek mennyisége (hepta-, octa- és nonamerek). A vizsgálat során nem találtak galakturonsavat (monomer) ill. 10 tagnál hosszabb oligomereket. A galakturonsav monomer hiánya azt bizonyítja, hogy nem exo-aktivitású enzimről van szó, a különböző hosszúságú oligomerek gyors megjelenése pedig processzív reakciómechanizmusról tanúskodik (Cotton és mtsi. 2002).

A *pg1-3* gének expressziójának *in vitro* analízise különböző szénforrásokon valamint eltérő pH értékeken történt (Cotton és mtsi. 2003). Mindkét esetben 48 órás nem pufferelt előkultúrán (glükózzal, mint egyedüli szénforrással kiegészítve) történt a gomba nevelése, majd ezt követte a gomba átvitele különböző szénforrásokkal (ám azonos pH értékkel bíró, pH 4) kiegészített tápfolyadékra (pektin, D-galakturonsav, glükóz), valamint különböző pH értékű (3, 4, 5, 6, 7) glükóz illetve pektin tartalmú tápfolyadékra. Meglepő módon mindhárom vizsgált szénforráson erős expresszió volt detektálható, mitöbb glükózon és D-galakturonsavon erősebb transzkripció volt tapasztalható, mint pektinen. Ugyanakkor a pH *pg1-3* gének expressziójára tett hatása is rendkívül érdekesnek bizonyult, hisz mind glükóz, mind pektin esetében is csupán a pH 4 és pH 5 értékeknél detektálható erőteljes génátíródás. Ezen pH tartománynál savasabb illetve lúgosabb körülmények között jelentősen csökkent a vizsgált gének transzkripciós aktivitása **(7. ábra A-B).** A nem-pufferelt 48 órás előkultúra esetében végzett analízis is igazolta a pH jelentőségét a *pg1-3* gének transzkripciós szabalyozásában, hisz a gomba által termelt oxálecetsav folyamatosan csökkentette a tápfolyadék pH értékét, s ezzel párhuzamosan csökkenő expresszió volt detektálható (**7. ábra C-D**). A *pg1-3* gének kifejeződésének szabályozásában tehát alapvetően a közeg pH értéke játszik szerepet, míg szénforrás mediálta represszió (lásd "**1.3.2. Szénforrás mediálta represszió ("Carbon catabolite repression")**" c. fejezetet) nem volt detektálható.

Összegzésül elmondható tehát, hogy *S. sclerotiorum* számos poligalakturonáz izoformát termel, melyek közül egyesek glükóz represszáltak, míg mások konstitutív módon expresszálódnak. Molekuláris és biokémiai analízis során bizonyságot nyert,

hogy ezen enzimcsalád sokszínűsége elsősorban több génnel (legalább hét) magyarázható, melyek két alcsaládba sorolhatók. Az egyik (neutrális) alcsalád három tagjának szekvencia analízise nagyfokú homológiát mutató gének (*pg1*, *2* és *3*) létét igazolta. *In vitro* analízis alapján a *pg1-3* gének transzkripciójának szabályozása pH függő: szénforrás mediálta represszió nem volt megfigyelhető. A PG2 fehérje vizsgálata bizonyította, hogy egy a fertőzés során rendkívül korán megjelenő poligalakturonázról van szó, mely processzív módon oligomereket szabadít fel a poligalakturonsavból. A PG2 tevékenysége során keletkező oligomerek szubsztrátként szolgálhatnak az időben később kifejeződő poligalakturonázok számára. *Trichoderma*-ban ismert (Messner és mtsi. 1988; Wang és mtsi. 1988; Fritscher és mtsi. 1990) konstitutív módon, alacsony intenzitással kifejeződő celluláz, ahol az általa felszabadított cellulóz és cellodextrin inducerként szolgálnak. Pektinolitikus enzimek galakturonsav általi indukciója is régóta ismert tény (Aguilar és Huitron 1987; Leone és mtsi. 1987).



7. ábra: *S. sclerotiorum pg 1-3* génjeinek expressziós vizsgálata **A-B**) Expresszió a pH függvényében (pH 3-7) glükózon és pektinen **C-D**) Expresszió vizsgálata (Cotton és mtsi. 2003)

1.5.7.2. Proteázok

Növényi infekció során poliklonális antitestet felhasználva öt proteázt detektáltak (Poussereau, személyes közlés). Molekuláris szinten két proteázt kódoló gén került klónozásra: *acp1*, mely egy savas non-aszpartil proteázt kódol (Poussereau és mtsi. 2001A), valamint *aspS*, amely egy aszpartil proteáz szintéziséért felelős (Poussereau és mtsi. 2001B). Mindkét gén bizonyítottan kifejeződik *S. sclerotiorum* okozta fertőzés során (Poussereau és mtsi. 2001A, Poussereau és mtsi. 2001B).

Az *acp1* gén *in vitro* szén, nitrogén valamint pH regulált. Az infekció kezdeti szakaszában expressziója gyenge, ám a fertőzés középső fázisában hirtelen erőteljessé válik, míg a gomba által teljesen kolonizált növényi szövetben csökkenést mutat (Poussereau és mtsi. 2001A).

Az *aspS* gén egy aszpartil proteázt kódol: pH, glükóz, illetve ammónium katabolit represszió nem befolyásolja kifejeződését. A fertőzés rendkívül korai szakaszában (4 óra elteltével) észlelték a géntermék megjelenését. A fertőzés azon fázisában, amikor a vizsgált növényi szövetet robbanásszerűen kolonoziálja a gomba (16-24 óra) jóval intenzívebb génexpresszió volt megfigyelhető (Poussereau és mtsi. 2001B).

Összegzésül elmondható, hogy két oly proteáz klónozására, funkcionális analízisére került sor *S. sclerotiorum* fitopatogén gombából, mely közül az egyik (*aspS*) konstitutív módon kifejeződő, míg az *acp1* gén rendkívül finom reguláció alatt áll. A növényi infekció során mindkét géntermék detektálható. A proteázok fertőzésben betöltött szerepének jobb megismerése érdekében további proteáz gén klónozása van folyamatban (Poussereau, személyes közlés).

2. CÉLKITŰZÉSEK

S. sclerotiorum fitopatogén gomba több mint 400 növényfajt képes megtámadni. A fertőzés során sejtfalbontó enzimek arzenálját termeli, elősegítvén a gazda sejtfalának lebontását s így könnyen metabolizálható tápanyagot biztosít önmagának.

Vizsgálatainkat *S. sclerotiorum* egy sejtfaldegradáló enzimcsaládjának (poligalakturonázok) vizsgálatára fókuszáltuk. Elengedhetetlen egy erős expressziót mutató marker gén izolálása is, mely megbízható belső (gomba) standardként lehetővé teszi a gomba-növény rendszerben a gomba mennyiségének (és metabolizmusának) folyamatos nyomon követését. Mindez azért fontos, mert az egyes gomba gének expressziójának vizsgálata során a fertőzött növényből "kevert RNS" (gomba és növény RNS) kivonása történik. Mindezek ismeretében a következő célok megvalósítását tűztük ki magunk elé:

1.) A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) gén izolálása *S. sclerotiorum* génkönyvtárából.
2.) A *gpd* gén expressziójának vizsgálata.
3.) A *gpd* gén molekuláris markerként való felhasználása gomba-növény rendszerben alkalmazhatóság vizsgálata).
4.) *S. sclerotiorum* poligalakturonáz-család két újabb tagjának izolálása génkönyvtárból (*pg6* és *pg7* gének) és *in vitro* expressziójuk vizsgálata.
5.) *S. sclerotiorum* poligalakturonáz gének (*pg2, 5, 6, 7*) expressziójának *in planta* analízise.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. TÖRZSEK ÉS VEKTOROK

Törzsek

A vizsgálatokban felhasznált fertőzött napraforgóról izolált *S. sclerotiorum* S5 törzs a lyoni Centre de Recherche de Dargoire, Rhône-Poulenc Agrochimie (Lyon) intézetből kaptuk.

A szubklónozási kísérletekhez *E. coli* K12 SURE: *mcrA,* Δ *(mcrBC-hsdRMS-mrr) 171, supE44, thi-1,* λ^-, *gyrA96, relA1, lac*$^-$, *recB, recJ, sbsC, umuC : :Tn5 (Kan*^{r}*) uvrC F*$'$, *pro AB,* $lacI^qZ\Delta M15$, *Tn10 (Tetr)* törzset használtuk. *S. sclerotiorum* EMBL3 fágban létrehozott génkönyvtárának vizsgálatához *E. coli* P2392-es törzsét használtuk, mely a K12-es törzsből származtatható: *F-, mcrA, hsdR514, supE44, supF58, lacY1, galK2, galT22, metB1, trpR55.*

Vektorok

S. sclerotiorum génkönyvtárának vizsgálatához felhasznált *A. nidulans gpd* próbát a pAN 5-22 plazmid tartalmazta, melyet Dr. P. J. Punt (TNO Nutrition and Food Research Institute, Hollandia) bocsájtott a rendelkezésünkre.

Mindhárom gén szubklónozásához (*gpd, pg6, pg7*) pBluescript SK (-) vektort használtunk

Tenyésztési körülmények

S. sclerotiorum S5 törzsének fenntartása 4 C°-on szklerócium formájában zajlik. A kísérletekben felhasznált gomba nevelése PDA (Potato Dextrose Agar, Bio-Mérieux) táptalajon történt 20 C°-on. Folyadék kultúrában végzett kísérletek szintén 20 C°-on, 200 rpm rázatáson zajlottak, inokulomként egy fél Petri-csészényi gombát felhasználva.

A génexpressziós vizsgálatokban 250 ml-es Erlenmeyer-lombikokban 50 ml előkultúrára (YPG) történt a gomba leoltása (6 cm átmérőjű Petri-csészében PDA táptalajon 48 órát nevelt *S. sclerotiorum* 5 mm^2-nyi micéliumával). A 48 órás előnevelést követően a szűréssel összegyűjtött micéliumot steril desztillált vízzel háromszor öblítettük, majd a vizsgált szénforrással kiegészített (poligalakturonázok esetén 1% arabinóz, 1% ramnóz, 1% pektin (alma, Fluka), 1% PGA, 1% GA, 1%

glükóz, 1% degradált PGA, pH 4.5, míg glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz expressziójának vizsgálatakor 1% glükóz, 1% pektin, 1% glicerol, 1% arabinóz.) YP tápfolyadékba transzferáltuk (8 óra). A tápfolyadékok pH-jának beállítása citromsav-Na_2HPO_4 puffer rendszerrel történt. Ez utóbbi un. célkultúrán történő 8 órás rázatást követte a micélium összegyűjtése, desztillált vízzel történő öblítése és folyékony nitrogénben történő azonnali fagyasztása.

3.2. TÁPTALAJOK ÉS OLDATOK

***Botrytis cinerea* extrakciós puffer (genomi DNS kivonás)**
100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% w/v CTAB (hexadeciltrimetilammónium bromid), 0.7 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% v/v merkaptoetanol, 0.3 mg/ml proteináz K

Citromsav 0.1 M ("A" oldat) –Na_2HPO_4 0.2 M ("B" oldat) puffer rendszer
pH 4.5 esetén 100 ml végtérfogat: 55 ml "A" oldat és 45 ml "B" oldat

Cézium klorid oldat (50 ml)
47.8 g cézium-klorid, 1.25 ml 1M Na-citrát
Az oldatot DEPC-cel kezeltük (12 óra), majd autoklávozást követően a felhasználás előtt a következő komponenseket adtuk hozzá:
1 ml 10 mM VRC (vanadil-ribonukleozid komplex), 90 µl ß-merkaptoetanol

Élesztőkivonat-foszfát-glükóz (YPG:"Yeast-Phosphate-Glucose medium", pH 5.5)
0.1% élesztő kivonat, 0,05% $MgSO_4$, 0,1% KH_2PO_4, 2% glükóz

Élesztőkivonat-glükóz (YP:"Yeast-Phosphate medium", pH 4.5)
0.1% élesztő kivonat, 0,05% $MgSO_4$, 2% glükóz

Guanidin tiocianát oldat (100 ml)
50 g guanidin tiocianát, 0.5 g Na-L-szarkozil, 2.5 ml 1M Na-citrát, 0.7 ml ß-merkaptoetanol
Az oldatot a felhasználást megelőző napon készítettük (nem autoklávoztuk, nem kezeltük DEPC-cel, 4°C-on tároltuk). Az oldat készítésekor RN-áz mentes desztillált vizet használtunk.

Hibridizációs oldatok (radioaktív próba esetén)

prehibridizációs/hibridizációs oldat Northern analízishez
5XSSC, 2% SDS, 50% formamid, 5X Denhardt's oldat, 0.1 mg/ml élesztő tRNS (denaturált)

prehibridizációs/hibridizációs oldat Southern analízishez
5XSSC, 0.1% SDS, 50% formamid, 1X Denhardt's oldat, 0.1 mg/ml lazac DNS (denaturált)

Hibridizációban/detektálásban felhasznált oldatok (nem radioaktív próba esetén)

prehibridizációs/hibridizációs oldat
5xSSC, 0,1% (w/v) N-lauroilszarkozin, 0.02% (w/v) SDS, 1% blokkoló reagens

1-es detektáló puffer (pH 7.5)
0.1 M maleinsav; 0.15 M NaCl

2-es detektáló puffer
1.4% blokkoló reagens 1-es detektáló pufferben

3-as detektáló puffer
0.1 M Tris-HCl; 0.1 M NaCl; 50 mM $MgCl_2$ (pH 9.5)

LB-táptalaj (pH 7.0)
1% NaCl; 1% tripton; 0.5% élesztőkivonat; 1.5% agar

LB+maltóz tápoldat
1% NaCl; 1% tripton; 0.5% élesztőkivonat; 0.2% maltóz; 10 mM $MgSO_4$ (pH 7.0)

LB-fedőagar
1% NaCl; 1% tripton; 0.5% élesztőkivonat; 0.7% agaróz; 10 mM $MgSO_4$ (pH 7.0)

Membránra történő plakk (fág) transzferben használt oldatok

denaturáló oldat:
0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

neutralizáló oldat
0.2 M Tris (pH 7.5), 2XSSC

20×SSC
3 M NaCl; 0.3 M Na_3-citrát

MOPS oldat 10X (500 ml)
3.4 g NaOAc, 20.93 g MOPS, 20 ml 0.5 M EDTA
A pH értéket 7.0-re állítottuk és az oldatot sötétben tároltuk.

RNS migrációs gél (200 ml)
3 g agaróz, 20 ml RN-áz mentes 10X MOPS, 174 ml RN-áz mentes desztillált víz
Az agaróz feloldódását követően 50°C-ra hűtöttük az oldatot, majd 10.2 ml 37%-os formaldehidet adtunk hozzá. Migrációs pufferként 10X MOPS oldatot alkalmaztunk.

RNS migrációs oldat
0.75 ml formamid, 0.15 ml RN-áz mentes 10X MOPS, 0.24 ml formaldehid, 0.1 ml RN-áz mentes desztillált víz, 0.1 ml RN-áz mentes glicerol, 80 µl brómfenolkék (10% w/v RN-áz mentes vízben)

***Sclerotinia. sclerotiorum* extrakciós puffer (genomiális DNS kivonásához, 10 ml oldathoz)**
2 ml 1 M (pH 7.5) Tris-HCl (oldatbeli koncentráció: 0.2 M), 0.5 ml 5 M NaCl vagy 0.625 ml 4 M NaCl (0.25 M), 0.5 ml 0.5 M EDTA (0.025 M), 0.5 ml 10% SDS (0.5% SDS)

***Sclerotinia sclerotiorum* komplett tápfolyadék**
0.25% élesztő kivonat, 0.5% maláta kivonat, 1% glükóz

SM puffer
0.58% NaCl; 0.2% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 1 M Tris/HCl (pH 7.5); 2% zselatin

Southern-blot-hoz használt oldatok

denaturációs oldat
0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

neutralizációs oldat
1 M NH_4OAc, 0.02 M NaOH

TAE-oldat
40 mM Tris-ecetsav, pH 7.6; 1 mM Na_2EDTA

3.3. GÉNKLÓNOZÁSNÁL ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

3.3.1. *S. sclerotiorum* génkönyvtárának (EMBL3 fág) szűrése specifikus próbákkal

P2392 *E. coli* törzset OD_{600}=0.6 eléréséig neveltük LB-maltóz tápoldatban. Centrifugálást követően a baktériumsejteket 10mM $MgSO_4$-ban szuszpendáltuk fel, majd EMBL3 fággal (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} hígitási lépcsőket alkalmazva) inkubáltuk együtt (37°C, 30-45 perc). Ezt követően a fertőzött baktáriumsejtekhez LB-fedőtáptalajt (42°C) adtunk, majd ezt LB-alaptáptalajra rétegeztük és egy éjszakát inkubáltuk 37°C-on. Másnap a csészéket 1 órára 4°C-ra helyeztük, majd a plakkokról lenyomatot vettünk (1 perc, szobahő) Amersham (N+) membrán felhasználásával. A membránokat denaturáló (1 perc, szobahő), neutralizáló (5 perc, szobahő) és 2XSSC (5 perc, szobahő) oldatokkal kezeltük. Levegőn történő szárítást követően UV fénnyel rögzítettük a fág DNS-t a membránon, majd ezt követte a speciális próbával történő hibridizálás.

A hibridizálást követően pozitív eredményt adó plakkokat 0.5 ml SM oldatban, 10 µl kloroform hozzáadása után felszuszpendáltuk (1 perc). Ezen második tisztítási körben is hígitási lépcsőket készítettünk (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) és újra

fertőztük a baktérium sejteket. Ebben a fázisban érdemes azon hígitási lépcsővel kapott csészéről membránlenyomatot venni, ahol sok, ám jól elkülöníthető plakk képződik (általában 10^{-2}, 10^{-3}). A hibridizációt követően egy újabb, harmadik tisztítási lépcsőt is csináltunk, s mindezt addig folytattuk amíg minden egyes plakk pozitív jelet adott. A fág –70°C-on történő, hosszú idejű tárolása 7% DMSO (dimetil szulfoxid) hozzáadásával történik.

Génkönyvtár szűrésére használt specifikus próbák:

A.)

S. sclerotiorum génkönyvtárának szűréséhez *pg6* és *pg7* gének esetében *B. cinerea* genomi DNS-ből amplifikált próbákat használtunk, melyeket a *Bcpg6* és *Bcpg3* gének (*Botrytis cinerea pg6* és *pg3* génjei) szekvenciája alapján terveztünk.

A *pg7* gén izolálásához használt próbát a következő primerekkel kaptuk: (*Bcpg3* gén szekvenciája alapján)
5' TCA AGT GCC GCC GCC GTT CCA GTT 3'
5' TGG GTC GTC ACC AGA CGC CGA GTT A 3' várt fragment hossza: 684 bp

A *pg6* gén izolálásához használt próbát a következő primerekkel kaptuk: (*Bcpg6* gén szekvenciája alapján)
5' ATG CCT AAG AAC TCT CAG ATC TCT 3'
5'ATC GAT AAT TGC ATC GGG CTC AGC A 3' várt fragment hossza: 312 bp

B.)

S. sclerotiorum gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) génjének izolálásához a *A. nidulans gpd* génjének 950 bp-nyi (kódoló régió döntő többségét tartalmazó) *ScaI* fragmentjét használtuk, melyet a pAN5-22 plazmidból izoláltuk.

Próbák amplifikálásához használt PCR paraméterek:

94°C- 5 perc – lánc szétválasztás

35 ciklus:
94°C- 45 másodperc - lánc szétválasztás
66°C- 1 perc – primer kötődés
72°C- 1 perc – lánc szintézis

72°C- 7 perc - utószintézis

PCR reakcióelegy (50 µl végtérfogat)

200-200 µM dNTP	50 pmol primer
5 µl 10×Taq puffer	2.5 U Taq-polimeráz
2.5 µM $MgCl_2$	2 µl genomi DNS (50ng/µl)

A mintákra 40 µl steril ásványi olajat rétegeztünk.

Próbák jelölése (radioaktív, nem-radioaktív)

DNS visszaizolálás az agaróz gélből üveggyöngyhöz ("glasmilch") történő adszorpcióval történt (Geneclean II, Bio 101), a gyártó receptje szerint.
A gélből visszaizolált *B. cinerea* poligalakturonáz génfragmenteket digoxigenines (DIG DNA labeling and detection kit; Boehringer Mannheim) módszerrel a gyártó utasításainak megfelelően jelöltük.

A. nidulans gpd-próba jelölése [α-32P]-dCTP felhasználásával történt (T7 Quick Prime Kit-Pharmacia), a radioaktív próba tisztítása (feleslegben maradt izotóp eltávolítása) Séphadex G50 ("spin column") oszlopon zajlott (Sambrook és mtsi. 1989).

Hibridizációs körülmények

A.) Nem radioaktív próba esetén

A hibridizációs membránt (Amersham N+) két órán át 58°C-on hibridizációs pufferrel előhibridizáltuk, majd 12 órán át 58°C-on (nem szigorú körülmény) a jelölt specifikus DNS próbát tartalmazó 2.5 ml hibridizációs pufferrel hibridizáltuk.

A hibridizációs membránt szobahőmérsékleten kétszer 5 percig 2×SSC, 0.1% SDS oldattal, majd kétszer 10 percig 58°C-on 2×SSC, 0.1% SDS oldattal mostuk. Ezt követően az 1-es pufferrel 1 percig, majd a 2-es pufferrel 30 percig, majd a 2-es pufferhez adott 4 µl antitest konjugátummal újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Kétszer tizenöt perces mosást (1-es puffer) követően a detektáláshoz a 3-as pufferhez adott 200 µl előhívó reagenst (p-nitro-tetrazólium kék (NBT) + 5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfát (BCIP) használtunk.

B.) Radioaktív próba esetén

Előhibridizációt (2 óra, 42°C, szigorú körülmények között) követte a specifikus radioaktív próbaként tartalmazó pufferrel történő hibridizáció (16 óra, 42 °C, szigorú körülmények között). A filter hibridizációt követő mosása 42 °C-os 4×SSC, 2XSSC, 0.5XSSC és esetenként 0.1XSSC oldatokkal történt, melyek minden esetben tartalmaztak 0.1% SDS-t. Az egyes oldatokkal történő mosás időtartalma a kézi számlálóval mért radioaktivitás mértékétől függően változhatott (2-15 perc). A radioaktív próbával jelölt membrán expozíciója "phosphoscreen" lemezekre történt, melyek kvantitatív elemzése "phosphoimager" (Packard) berendezés "optiquant" programjának (Packard) segítségével zajlott.

3.3.2. Fág DNS tisztítás

A fágfertőzés után a szétesett baktérium tenyészethez 1 μg/ml-es végkoncentrációban RNáz-t és DNáz-t adtunk, majd 37°C-on 30 percig inkubáltunk. A lizátumhoz ezután 5.8 g NaCl-ot és 9.3 g PEG_{8000}-et (polietilén-glikol) adtunk (100 ml lizátumra), majd 1 órán át 4°C-on inkubáltuk. Centrifugálást követően (10000 rpm/20 perc, 4°C) a csapadékot 10 ml fágpufferben oldottuk, majd ismét centrifugáltunk (8000 rpm/2 perc, 4°C). A felülúszóhoz 100 μl 10% SDS-t és 100 μl 0.5 M EDTA-át (pH 8.0) adtunk, majd 68°C-on 15 percig inkubáltuk. Az elegyet PCI hozzáadása után centrifugáltuk (12000 rpm/5 perc). A PCI kezelést kétszer ismételtük. A vizes fázishoz azonos térfogatban izopropanolt adtunk és -70°C-on 20 percig inkubáltuk. Centrifugálást követően (12000 rpm/10 perc, 4°C), a csapadékot 70%-os etanollal mostuk, vákuumban szárítottuk és 200 μl desztillált vízben feloldottuk.

3.3.3. Kompetens sejtek készítése transzformáláshoz

Egy éjszakán át nevelt *E. coli* K12 SURE törzs tenyészetéből 1 ml-t 100 ml LB tápoldatba átoltva a baktériumokat OD_{660}=0.4 érték eléréséig neveltük 37°C-on. A centrifugálást követően (7000 rpm/10 perc, 4°C), a sejteket 50 ml 50 mM $CaCl_2$ oldatban vettük fel. 10 percig jégben inkubáltuk, ezután újra centrifugáltuk (7000 rpm/10 perc), a kiülepedett sejteket 5 ml 50 mM hideg $CaCl_2$ oldatban

szuszpendáltuk fel és 1 órán át jégben inkubáltuk. A kompetens sejtek 15% glicerolban –70°C-on hónapokig tárolhatók.

3.3.4. Ligálás szubklónozási kísérletekben

Ligálási reakció:

1 µl 10×T4 DNS ligáz puffer

1 µl pBluescript SK (-) plazmid

1 µl T4 DNS ligáz enzim

7 µl inzert DNS

A ligálás 4°C-on 16 órán át történt. A reakciót 10 perces, 65°C-os hőkezeléssel állítottuk le.

3.3.5. Baktérium transzformáció

E. coli K12 SURE törzsének felhasználásával készített fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottuk. Ezzel egyidőben 5 µl ligátumot és 50 µl TCM oldatot (10 mM Tris/ HCl (pH 7.5) 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$) tartalmazó Falcon-csővet jégen hűtöttük. A kompetens sejt hozzáadását követően óvatosan elkevertük a cső tartalmát, majd 30 percet jégben hagytuk, melyet 2 perces 42°C-on történő hősokk követett. Jégen történő hűtés majd 1 ml LB hozzáadását követően 37°C-on 1 órát enyhén rázattuk. A baktériumot ampicillin (100 µg/ml), 40 µl IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid, 20 mg/ml) és 70 µl X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol-β-D-galaktopiranozid, 20 mg/ml) tartalmú LB táptalajra szélesztettük. A felhasznált *E. coli* törzs a β-galaktozidáz enzim C-terminálisát, míg a transzformációhoz használt pBluescript vektor (az antibiotikum rezisztencia gén mellett) az enzim N-terminális részét (α-peptid) tartalmazza. Interallélikus komplementáció révén (amennyiben a transzformált baktérium olyan Bluescript plazmidot tartalmaz, melynek α-peptid klónozó helyeire beépült a kívánt DNS-szekvencia) IPTG és X-Gal jelenlétében fehér telepek képződnek. Ellenkező esetben (sikertelen szubklónozás során) kék telepeket kapunk.

A transzformáns baktériumok fenntartása ampicillinnel (100 /ml) kiegészített LB táptalajon történt.

3.3.6. Plazmid kivonás

Az LB táptalajon nevelt transzformáns sejtekből a plazmid DNS-t a Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad) segítségével tisztítottuk, a gyártó utasítása szerint. Használtuk a Sambrook és mtsi. (1989) által leírt alkalikus lízis módszert is. A nagyobb tisztaság érdekében Qiagen-tip 100-as oszlopon történő tisztítást is végeztünk.

3.4. GOMBA GENOMIÁLIS DNS ANALÍZISE

3.4.1. Genomiális DNS kivonás *Sclerotinia sclerotiorum*-ból (Raeder és Broda 1985)

PDA táptalajra helyezett cellofánon nevelt *S. sclerotiorum*-ot oltottunk komplett tápfolyadékba, majd 72 órás rázatott tenyészetből a micéliumot összegyűjtöttük, folyékony nitrogénnel történő hűtés mellett dörzsmozsárban elporítottuk. (Cellofánon történő előneveléssel csökkenthető a gomba által termelt poliszacharid mennyisége, mely rendkívül zavaró a kivonás során. A kísérlethez közönséges háztartási cellofánt használtunk. A cellofánt detergenssel kezeltük -20 percet főztük detergenses vízben-, majd három órát folyó vízben öblítettük a felesleges detergens eltávolítása céljából. A micélium a cellofánról steril csipesszel könnyen lehúzható.) A kivonás további lépései Eppendorf csőben történtek. 50 mg porított micéliumhoz 500 µl extrakciós puffert adtunk. 350 µl fenol hozzáadását követően erőteljesen összekevertük a cső tartalmát. Ezt 150 µl kloroform hozzáadása, összekeverése és centrifugálása követi (1 óra/13000 g, 20°C). A felső, vizes fázist új csőbe pipettáztuk és 25 µl RN-áz törzsoldatot adunk hozzá (20 mg/ml). 37°C-on történő 10 perces inkubációt 1 térfogat kloroform hozzáadása, összekeverése és centrifugálása követett (10 perc/13000 g, 20°C). A felülúszóhoz ½ térfogat ammónium-acetátot (7.5 M) adtunk, 30 percet jégen inkubáltuk majd centrifugáltuk (1 óra/ 13000 g, 4°C). A DNS felülúszóból történő kicsapása 0.54 térfogatnyi izopropanollal történt. Ezt követően 30-60 másodpercet centrifugáltuk (nagy mennyiségű DNS esetén pipettaheggyel célszerű a DNS összegyűjtése, így is csökkenthető a poliszacharid mennyisége), a kiülepedett DNS-t 70%-os etanollal mostuk, szobahőn szárítottuk majd steril desztillált vízben oldottuk.

3.4.2. Genomiális DNS kivonás *Botrytis cinerea*-ból (Pitkin és mtsi. 1996)

B. cinerea előnevelése is PDA táptalajon, cellofánon történt a fentiekben leírt módon. Csészéről összegyüjtött micélium (5g) porítása folyékony nitrogénnel történt, majd ehhez (50 ml-es, fenolnak ellenálló centrifugacsőben) 10 ml extrakciós puffert adtunk. (65°C, 30 perc). Jégben történő hűtést követően 10 ml PCI-t adtunk (fenol:kloroform:izoamilalkohol, 25:24:1), a cső tartalmát összeráztuk, majd centrifugáltuk (20 perc/10000 rpm, 4°C). A felülúszót CI-vel (kloroform:izoamilalkohol, 24:1) kezeltük, majd centrifugáltuk (20 perc/10000 rpm, 4°C). Amennyiben szükséges volt még egyszer CI-vel kezeltük. A DNS kicsapása a felülúszóból izopropanollal történt, melyet azután 75%-os etanollal mostunk (mely 10mM ammónium-acetátot tartalmazott, pH 7.5). Levegőn történő szárítást követően steril desztillált vízben vettük fel (20 μg RN-áz/ml).

3.4.3. Southern-blot analízis (Southern 1975)

S. sclerotiorum genomi DNS-ének restrikciós enzimekkel történő emésztését követően a DNS-fragmentek elválasztása 1.3%-os agaróz gélben történt TAE pufferben. A futtatást követően a gélt szobahőmérsékleten kezeltük 0.25 M sósavban (2x15 perc), majd denaturációs pufferben (3x15 perc) s végül neutralizációs pufferben (2x20 perc). A DNS-fragmentek hibridizációs membránra (Amersham N+) történő átvitelét követően specifikus próbával (radioaktív módon jelölt *gpd*-próba) zajlott a hibridizáció.

3.5. RNS ANALÍZIS SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

3.5.1. RNS izolálás *S. sclerotiorum*-ból

Az RNS-sel folytatott munkához az összes kellék (pipettahegy, desztillált víz, Eppendorf-cső) sterilizálása 1 óra át 120°C-on vagy kétszer 30 perc keresztül 110°C-on történt. Az RNS elektroforéziséhez használt futtató kád RN-áz mentesítése DEPC-cel (0.1%, 12 óra), illetve új kád esetén 0.5%-os SDS oldat alkalmazásával történt (ezt RN-áz mentes desztillált vízzel öblítettük). A kivonás során nyert RNS tisztaságát OD_{260}/OD_{280} arány alapján állapítottuk meg: 1.7-nél nagyobb érték esetén a mintát tisztának minősítettük.

A.) Guanidin tiocianát módszer (Sambrook és mtsi. 1989)

A folyékony nitrogénnel porított micéliumot guanidin tiocianát oldatban szuszpendáltuk fel és 30 percig állandó forgatás mellett szobahőmérsékleten inkubáltuk. A centrifugálást követően (10000 rpm/30 perc, 15°C) a felülúszót cézium-klorid rétegre (7 ml) pipettáztuk: az ultracentrifuga-csövet guanidin tiocianát oldattal színültig töltöttük. Centrifugálás után (25000 rpm/24 óra, 18°C) eltávolítottuk a felülúszót vigyázva arra, hogy ne érintsük a kiülepedett RNS-t. Az RNS-t 0.5-1 ml desztillált vízben oldottuk, PCI-vel kezeltük, majd a centrifugálást követően a felülúszóból 96%-os etanollal kicsaptuk.

B.) TRIZOL módszer (Gibco-BRL)

Ennél a módszernél fontos, hogy a folyadékkultúrából összegyüjtött micélium a lehető legszárazabb legyen, mert így jelentősen növelhető a kivonás hatékonysága. A gomba micéliumának porítása folyékony nitrogén felhasználásával történt. 100 mg porított micéliumot TRIZOL oldatban homogenizáltunk. Az 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció alatt a reagens a nukleoprotein komplex disszociációját végzi. 0.2 ml kloroform hozzáadását követően a cső tartalmát alaposan összekevertük, majd ezt 3 perc szobahőmérsékleten zajló inkubáció követte. A centrifugálás után (12000 g/15 perc, 4°C) a felső (színtelen) fázist egy új csőbe vittük és 0.5 ml izopropanolt adtunk hozzá, majd 10 percet szobahőn inkubáltuk. A centrifugálást (12000 g/15 perc, 4°C) a kiülepedett RNS 70%-os etanollal történő mosása követte. Levegőn történő szárítás után RN-áz mentes desztillált vízben oldottuk fel az RNS-t.

3.5.2. RNS izolálás fertőzött növényi szövetből

A fertőzött növényi anyagot folyékony nitrogénben történő fagyasztást követően –70°C-on tároltuk. A minta folyékony nitrogénben zajló porítása után a kevert összRNS (gomba és növény RNS) kivonását "Rneasy Mini Spin (Qiagen) Kit"-tel végeztük a gyártó utasításai szerint.

3.5.3. RNS gélelektroforézis, Northern-blot analízis

Az RNS minták analízise RN-áz mentesített futtató kádban 1.5 %-os agaróz gélben történt. 25 µl mintához (10 µg) 25 µl RNS migrációs oldatot adtunk, 15 percet 65 °C-on majd 5 percet jégen inkubáltuk. 1 µl etidium-bromid (1mg/ml) hozzáadása után vittük a mintákat gélre. Az elválasztást követően 2X20 percet kezeltük a gélt 10X RN-áz mentes SSC-ben. A hibridizációs membránra történő transzfer szintén 10X RN-áz mentes SSC-ben történt. Az RNS membránon történő rögzítését UV-val végeztük (5 perc).

3.5.4. RT-PCR analízis

Az RT-PCR reakciót megelőzően az összRNS-t RQ1 Rnáz mentes DN-ázzal kezeltük (Promega). Az RT-PCR reakciót 1.5 µg összRNS felhasználásával végeztük a gyártó ajánlása szerint (Access RT-PCR System, Promega).

RT-PCR reakcióban használt primerek:

pg2 gén: (Génbank azonosító: L29040)
5'-TCTTTCCTCGGCCTTGAGC-3'
5'-GACTTGCCCTTCAAGGAGTG-3'; várt cDNS mérete: 486 bp

pg5 gén: (Génbank azonosító: Y13669)
5'-TGTCCAAGTTTTCAGTATT-3'; várt gDNS mérete: 544 bp
5'-CTACCAGCATTTCCATTAT-3'; várt cDNS mérete: 452 bp

pg6 (Génbank azonosító: AJ539086)
5'-CAAGCTTATTGGAATGGGTAT-3'; várt gDNS mérete: 556 bp
5'-CTGGAGTTGACGATTTGACTA-3'; várt cDNS mérete: 462 bp

pg7 (Génbank azonosító: AJ539087)
5'-TCCGGTTACGAGGATGTTA-3'
5'-GCTCCTGGACACGTCATT-3'; várt cDNS mérete: 380 bp

gpd (Génbank azonosító: AF417110)

5' TGG CTC CTA CTA AAG TTG 3'; várt gDNS mérete: 533 bp

5' CAA GCA GTT GGT TGT GCA AG 3;' várt cDNS mérete: 468 bp

aktin (*act*)

S. sclerotiorum aktin génjének amplifikálására Benito és mtsi. (1998) által leírt *B. cinerea actA* (Génbank azonosító: AJ000335) gén szekvenciája alapján írt primereket használtuk:

5'-CTTCGTGTAGCACCAGAGGA-3'

5'-ATGTTACCATACAAATCCTTA-3' várt cDNS mérete: 610 bp

A *pg5*, *pg6* és *gpd* gének esetében a primerek intronokat határolnak, így az RNS-mintában maradt genomiális DNS szennyződés méret alapján elkülöníthető a cDNS-től. A *pg2*, *pg7* és *act* gének esetében a primerek nem határolnak intronokat, így ezekben az esetekben kontroll PCR-reakciókat végeztünk.

RT-PCR reakciókban alkalmazott paraméterek:

48 °C, 45 perc – reverz transzkripció

95 °C, 2 perc – reverz transzkriptáz inaktiválása

95 °C, 1 perc – templát cDNS denaturációja

60 °C – *pg2* gén
52 °C – *pg5* gén
58 °C – *pg6* gén
56 °C – *pg7* gén
54 °C – *act* gén
55 °C – *gpd* gén
} 1 perc, primer kötödése

68 °C, 1 perc – lánchosszabítás

68 °C, 7 perc – láncjavítás

A reakció során kapott termékek analízise 1%-os agaróz gélen történt. Egy független második analízissel igazoltuk eredményeinket.

RT-PCR reakcióelegy (50 µl végtérfogat; Access RT-PCR System, Promega)

- 1 µl dNTP mix (10-10 mM minden dNTP-ből)
- 10 µl 5X AMV/Tfl reakció puffer
- 50 pmol primer 1
- 50 pmol primer 2
- 2 µl 25 mM $MgSO_4$
- 1 µl AMV reverz transzkriptáz (5U/µl)
- 1 µl Tfl DNS polimeráz (5U/µl)
- X µl (1.5 µg)össz RNS
- Y µl (50 µl-re történő kiegészítés)RN-áz mentes víz

A mintákra 40 µl steril ásványi olajat rétegeztünk.

3.6. *IN PLANTA* VIZSGÁLATOK

3.6.1. Fertőzési vizsgálatok

PDA táptalajon nevelt 4 napos aktívan növekvő *S. sclerotiorum* tenyészetének széléről izolált, 4 X 15 mm-es micélium darabbal történt a vizsgált növények fertőzése. Sárgarépa karógyökerét (*Beta vulgaris*) hosszában 3 mm vastagságú szeletekre vágtuk és ezt fertőztük. Napraforgó (*Helianthus annuus*) esetében 1 hetes csíranövény sziklevelét, míg bab (*Phaseolus vulgaris*) és cikória (*Cichorium intybus*) vizsgálata során kifejlett leveleket használtunk a fertőzési teszthez. A kísérlet előtt a növényi anyagot 70 % etanol-1 % H_2O_2 oldattal fertőtlenítettük (pillanatnyi kezelés). Sárgarépa, cikória és bab esetében a fertőzést Petri-csészében steril desztillált vízzel telített Whatman papíron hajtottuk végre, míg napraforgó vizsgálata során közvetlenül a csíranövény levelét fertőztük. A fertőzési vizsgálatok 20°C-on zajlottak, a mintavételezést követően a fertőzött növényi anyagot folyékony nitrogénben fagyasztottuk és –80°C-on tároltuk.

3.6.2. Közvetlen pH mérés a fertőzött növényi szövetben

A fertőzés során a növényi szövetben a pH mérését felületi elektróddal végeztük (Bioblock Scientific, Illkrich, Franciaország). A pH mérés rendkívül

egyszerű és gyors, hisz ehhez csupán az elektród vizsgált mintához történő érintése szükséges. Minden mérést háromszor ismételtünk meg három eltérő mintán.

3.6.3. Oxálsav mennyiségi meghatározása

S. sclerotiorum által termelt oxálsav mennyiségének meghatározására lehetőség nyílik mind folyadék kultúrából, mind fertőzött növényi anyagból egy enzimreakción alapuló detekciós kit felhasználásával (Sigma). Fertőzött növényi szövet esetében 1g került folyékony nitrogénben történő porításra majd 3 ml steril desztillált vízben való reszuszpendálásra. 30 perc szobahőn történő inkubálást centrifugálás követte (10 perc/5000 rpm), majd ezt követően a felülúszót használtuk fel az enzimreakcióhoz. Minden feltüntetett érték három független mérés átlaga.

3.7. DNS SZEKVENÁLÁS, BIOINFORMATIKAI PROGRAMOK

A kísérleteink során vizsgált DNS szakaszok szekvenálása a GENOME Express grenoble-i laboratóriumában, valamint az MTA Szegedi Biológiai Központban történt.

A DNS szekvenciák összehasonlítását nemzetközi adatbázisokban (NCBI, National Center for Biotechnology; EMBL, European Molecular Biology Laboratory) található szekvenciákkal a BLAST és FASTA programok felhasználásával végeztük. A potenciális szignál peptid hasítóhelyek detekcióját SignalP, a fehérje szekvenciák összehasonlítását (alignment) ClustalW, míg a promoter motívumok keresését Matinspector programmal hajtottuk végre.

A hibridizációs jelek mennyiségi analízisét Optiquant program (Packard) segítségével végeztük el.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

4.1. *S. SCLEROTIORUM GPD* GÉNJÉNEK KLÓNOZÁSA, SZEKVENCIA ELEMZÉSE

4.1.1. Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén klónozása

S. sclerotiorum EMBL3 fágban készített génkönyvtárának szűréséhez *A. nidulans gpd* génjénk 950 bp-nyi *Sca*I fragmentjét használtuk, melyet a pAN 5-22 plazmidból izoláltunk (Punt és mtsi. 1988). A radioaktív izotóppal jelzett *A. nidulans gpd* próbával szűrt génkönyvtárból 4 pozitív klónt izoláltunk. Southern-blot analízis után arra a következtetésre jutottunk, hogy a 4 izolált fág *S. sclerotiorum* genomjának egymással átfedő régióit tartalmazza. A további vizsgálatokat a 10-es számú fággal végeztük, megemésztve a fág DNS-t számos restrikciós enzimmel (egyszeres és kombinált emésztések) olyan fragmente(ke)t keresve, mely ideális a szubklónozási kísérletekhez. Az emésztéseket követő Southern-blot analízis után egy 1965 bp-nyi *EcoRI/Hind*III fragmentet izoláltunk, mely rendkívül erős jelet adott a heterológ *Aspergillus* próbával. Ezen fragment pBSK- vektorba került szubklónozásra, s az így kapott plazmid a pGPD1 nevet kapta.

4.1.2. *Sclerotinia sclerotiorum gpd* génjének szekvencia analízise

A szubklónozott fragment szekvenciájának más gomba *gpd* génekkel történő összehasonlítása 1014 bp-nyi kódoló szekvencia azonosítását tette lehetővé **(8. ábra)**

A kezdő kodon (ATG) környezetében lévő bázisok (AGAATGG) a Kozak-szekvenciának megfelelőek (Kozak 1981; [A/G]XXATGG), nevezetesen –3-as pozicióban egy purin (A/G), valamint +4 helyen egy guanin található, melyek az iniciációs komplex kialakításában játszanak szerepet a riboszómán.

S. sclerotiorum gpd génjének kódoló szekvenciáját két intron szakítja meg. A gomba *gpd* gének intronjainak száma meglehetősen változatos, hisz míg az ascomycota élesztő *gpd* génekben nem találtak intront, addig a basidiomycota élesztők esetében -*Cryptococcus neoformans* esetében 11 (Varma és Kwong 1999), *Phaffia rhodozyma gpd* (Verdoes és mtsi. 1997) génjében 6 -nagyszámú intront írtak le. *Aspergillus niger* (Harmsen és mtsi. 1992) és *A. nidulans* (Punt és mtsi. 1998)

esetében 6 intron ismert, míg *Podospora anserina* (Ridder és Osiewacz 1992) *gpd* génjében csupán 1 intron van.

A *S. sclerotiorum gpd* intronok határoló szekvenciái (5'-GT és 3'-PyAG) megegyeznek a fonalas gombáknál leírt konszenzus szekvenciákkal. *S. sclerotiorum* első intronja konzervatív (+129-es kezdettel) elhelyezkedésű, hisz a vizsgált gombák döntő többségében ezen a helyen intront találunk a *gpd* génben. Ez az egyetlen olyan intron, amely az ascomycota és basidiomycota csoportokat összehasonlítva azonos helyzetű, ugyanakkor az ismert zygomycota *gpd* génekben ebben a pozícióban nem találunk intront (Wolff és Arnau 2002; Ács és mtsi. 2002). Ezzel szemben a második intron pozíciója (+815-es kezdettel) jóval variabilisabb, hisz a jelenleg ismert zygo- és basidomycota *gpd* génekben nem találunk ezen a helyen intront. Említést érdemel, hogy *Cryphonectria parasitica* (Choi és mtsi. 1990) és *Blumeria graminis f. sp. hordei* (Christiansen és mtsi. 1997) esetében szintén két intron azonosítottak, emellett az intronok elhelyezkedése mindkét esetben megegyezik a *S. sclerotiorum* esetében tapasztaltakkal.

```
        acagtgcttgcagcggatttactattactactattactattaatgctactattaatgcttatcga  -649

tagtgatgcaatctgaagctaagcccaatcaaaggcaaagagtacaaagtaggtaataaattttatgaaagt  -577

ttatatcatacaagacaagaccaggtagctagctgtatgaaagggaacctatcaaggtcaaattcgaaacaa  -505

aaccaagaatgttaagagtaacacgtacttcattcatacttcatacttcatcagttcattactttgtttgct  -433

tcttaggccaatctgatctaccccttccgacggtgctttctaaacttggcgctttacataccagtatttaa  -361

gggactaacatggtccaccatccatccacatgcatcaattcattcccacgctaaaggaggggcgctaccgcaa  -289

aattgattcaacaacgaccccaccaaaattcatctcccccctcccgtttcttcctttcctacataaacaacca  -217

attctcccccttcgaaaatcatttcaagaatcatcaaaaatcttacaagtaagtatcctcataccatatcat  -145

tcctctgcttctccgttgtgccttttggtgatctatagcttcaaacgggtacatccgaagctatttttttaac   -73

cttcccgcgctactcttgtcaacaaacaaacgcaaaaaaaggcttttcttacattttctaacatcatctaga    -1

 M   A   P   T   K   V   G   I   N   G   F   G   R   I   G   R   I   V      18
ATG GCT CCT ACT AAA GTT GGT ATC AAC GGT TTC GGA CGT ATC GGA CGT ATC GTC      54

 F   R   N   A   I   E   H   D   D   I   D   I   V   A   V   N   D   P      36
TTC AGA AAT GCT ATC GAG CAT GAT GAC ATC GAT ATC GTC GCT GTC AAC GAT CCT     108

 F   I   E   T   E   Y   A                                                  43
TTC ATT GAG ACT GAA TAT GCC  gtaagttgccgctaccggacctcccaatgacaccaaggacccg   172

                     A   Y   M   L   K   Y   D   S   T   H   G   Q          55
agctaatttttatccttcacagGCA TAC ATG TTG AAA TAT GAC TCC ACT CAC GGT CAA      230

 F   K   G   D   I   K   V   L   S   D   G   L   E   V   N   G   K   K      73
TTC AAG GGT GAT ATC AAA GTC CTC TCC GAC GGA TTG GAG GTT AAT GGC AAG AAA     284

 V   K   F   Y   T   E   R   D   P   A   N   I   P   W   A   E   S   E      91
GTC AAG TTC TAC ACT GAG AGA GAC CCT GCC AAC ATC CCA TGG GCT GAG TCT GAG     338

 A   Y   Y   V   V   E   S   T   G   V   F   T   T   T   E   K   A   K     109
GCA TAC TAC GTT GTC GAG TCC ACC GGT GTT TTC ACC ACC ACC GAG AAG GCT AAG     392

 A   H   L   K   G   G   A   K   K   V   V   I   S   A   P   S   A   D     127
GCA CAT TTG AAG GGT GGT GCC AAG AAG GTT GTC ATC TCT GCT CCT TCC GCC GAT     446
```

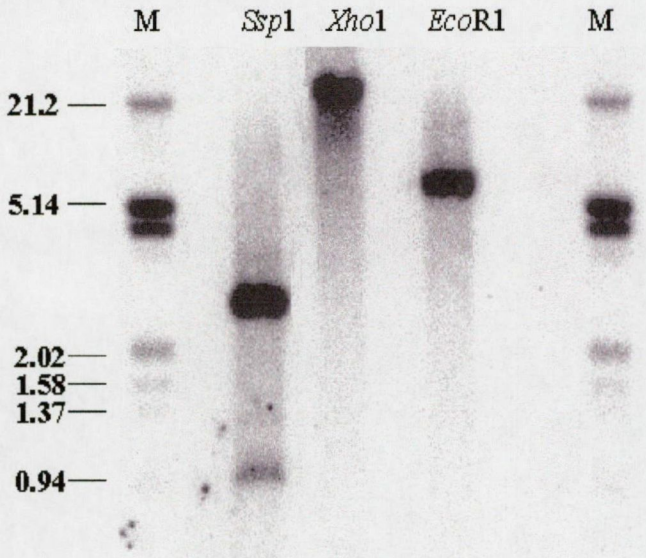
```
 A   P   M   Y   V   M   G   V   N   N   E   T   Y   N   G   E   A   D     145
GCC CCA ATG TAC GTC ATG GGT GTC AAC AAC GAG ACC TAC AAT GGT GAA GCA GAT    500

 V   I   S   N   A   S   C   T   T   N   C   L   A   P   L   A   K   V     163
GTT ATC TCC AAC GCT TCT TGC ACA ACC AAC TGC TTG GCT CCT CTC GCC AAG GTC    554

 I   N   D   E   F   T   I   I   E   S   L   M   T   T   I   H   S   Y     181
ATC AAC GAT GAG TTC ACC ATC ATT GAA AGT TTG ATG ACC ACC ATT CAC TCC TAC    608

 T   A   T   Q   K   T   V   D   G   P   S   A   K   D   W   R   G   G     199
ACT GCC ACC CAA AAG ACC GTT GAT GGT CCA TCC GCT AAG GAT TGG CGT GGA GGA    662

 R   T   A   A   Q   N   I   I   P   S   S   T   G   A   A   K   A   V     217
CGT ACC GCT GCT CAA AAC ATC ATT CCA TCG AGC ACC GGT GCC GCC AAG GCC GTC    716

 G   K   V   I   P   E   L   N   G   K   L   T   G   M   S   M   R   V     235
GGA AAA GTC ATT CCA GAG CTT AAC GGC AAG CTC ACC GGA ATG TCT ATG CGT GTT    770

 P   T   A   T   V   S   V   V   D   L   T   V   R   I   E   K   A   A     253
CCA ACT GCC ACC GTC TCT GTT GTT GAC TTG ACT GTC CGC ATT GAG AAG GCT GCT    824

 S   Y   D   E   I   K   E   V   I   K   K   A   A   N   G   P   L   K     271
TCT TAT GAT GAG ATC AAG GAG GTC ATC AAG AAG GCC GCC AAT GGT CCT CTC AAG    878

                                                         G   I   L   A     275
G gtaagaaatttgtcaatattcattacttttcaatttactaacaacaatgtatagGC ATA TTG GCT     944

 Y   T   E   D   D   V   V   S   T   D   M   N   G   D   N   H   S   S     293
TAC ACC GAG GAC GAT GTT GTC TCC ACT GAC ATG AAC GGT GAC AAC CAC TCC TCC    998

 I   F   D   A   K   A   G   I   S   L   N   K   N   F   V   K   L   V     311
ATC TTC GAT GCC AAG GCC GGT ATC TCC CTC AAC AAG AAC TTC GTC AAG TTG GTT   1052

 S   W   Y   D   N   E   W   G   Y   S   R   R   V   L   D   L   L   H     329
TCC TGG TAC GAC AAC GAG TGG GGT TAC TCT CGT CGT GTC CTT GAC CTC CTC CAC   1106

 Y   I   S   K   V   D   N   K   Q   *                                     339
TAC ATC TCC AAG GTT GAT AAC AAG CAG TAG  gagatttctgctcagtatttaggaagtaatc  1167

aagactctgaccactatttggcaga                                               1192
```

8. ábra: *S.sclerotiorum gpd* génjének szekvenciája

Genomiális DNS-sel végzett Southern-blot analízissel igazoltuk, hogy *S. sclerotiorum* egyetlen *gpd* génnel rendelkezik. A vizsgálat során a genomi DNS-t *Ssp*I (1-szer hasít a homológ próbaként felhasznált *S. sclerotiorum gpd* szekvenciában), *Xho*I (nem hasít a próbában), *EcoR*I (nem hasít a próbában) restrikciós enzimekkel emésztettük, majd a hibridizációt nem szigorú körülmények között végeztük *S. sclerotiorum* homológ *gpd*-próbával (*BamH*I-*Hind*III fragment). *Ssp*I restrikciós enzimmel 2, míg *XhoI*, *EcoR*I enzimekkel 1 hibridizációs sávot kaptunk (**9. ábra**), mely azt igazolja, hogy a *S. sclerotiorum* genomja egy *gpd* gént tartalmaz. Mai ismereteink szerint a gombák döntő többségében egy *gpd* gén található, ám nem minden esetben, hisz *S. cerevisae* (Holland és mtsi. 1983) és *Mucor circinelloides* (Wolff és mtsi. 2002) esetében 3 kópiáról számoltak be, míg *Agaricus bisporus* (Harmsen és mtsi.1992) és *Trichoderma koningii* (Watanabe és mtsi. 1993) gombákból 2 gént írtak le. *A. bisporus* és *M. circinelloides*-nál csupán

SZEGED

egy-egy *gpd* gén transzkripcióját igazolták, míg a többi kópia vagy pszeudogén vagy speciális körülmények között fejeződik ki (pl.: stressz). *S. cerevisiae* 3 GPD-je is eltérő expressziót mutat jelezvén, hogy az egyes izoformák különböző, speciális funkciókkal bírnak (Boucherié és mtsi. 1995).



9. ábra: *S. sclerotiorum gpd* génjének kópiaszám meghatározása

4.1.3. *gpd* gén 5' és 3' szekvenciájának analízise

Az *EcoR*I/*Hind*III fragment szekvenciájának analízise 713 bp hosszúságú promoter szekvenciát tárt fel (**8. ábra**). A *S. sclerotiorum gpd* génjének 5' szekvenciájában tipikus gomba promoter elemeket azonosítottunk. 3 primidin gazdag régió jelenlétét igazoltuk (-81/-56; -145/-128; -257/-230). A CT gazdag régiók különösen az erős expressziót mutató gének promoter szekvenciájára jellemző, számos esetben igazolták (élesztő, fonalas gomba) a transzkripcióban betöltött meghatározó szerepét (Gurr és mtsi. 1988). 2 potenciális TATA- (-114/-111; -152/-148) és 3 CAAT-boksz (-218/-215, -265/-261, -325/-322) is azonosításra került, mely szekvenciák szintén a transzkripció kialakításában játszanak szerepet. *S. sclerotiorum gpd* génjének promoterét *A. nidulans gpd* génjének 5' régiójával összevetve (Punt és mtsi. 1990) az ott detektált *gpd*-, *ct*- és *qa*-motívumokkal

homológ szekvenciákat találtunk. Funkciójuk még nem tisztázott, Punt és mtsi. más glikolitikus gének promoterével összehasonlítva detektálták ezeket a szekvenciákat. *A. nidulans amdS* génjének promoterébe ültetve a *gpd*-boxot (*lacZ* riporter rendszert használva) a vizsgált gén 30 %-kal fokozott expresszióját figyelték meg.

STRE motívumot ("stress response element": 5' AGGGG 3') is azonosítottunk (-412/-408, komplementer inverz formában: 5' CCCCT 3'), mely a gén stressz körülmények közötti aktivációjában érintett (Schuller és mtsi. 1994). *Pleurotus sajor-caju gpd* génje fokozott expressziót mutatott stressz –hideg (4°C, 4 óra), meleg (45°C, 4 óra), só (4M NaCl, 4 óra), szárazság (10 perc vákuum)- esetén (Jeong Jeong és mtsi. 2000). Vizsgálataink során AbaA/Tec1 motív jelenlétét is igazoltuk (5' CATTCY 3' ahol Y: "C" vagy "T", -320/-315). Ezen fehérjék a TEA/ATTS transzkripciós faktor családba tartoznak, mely oly emlős, madár, nematoda, rovar és gomba fehérjéket foglal magába, melyekre jellemző a konzervatív TEA domén (Bürglin 1991). A fehérje ezen 66-76 aminosavnyi szakasza az N-terminális részen helyezkedik el s a TEA konszenzus szekvencia (TCS, 5' CATTCY 3') kötéséért felelős. *A. nidulans* esetében AbaA funkcióját a konidiofór kialakításában határozták meg (Andrianopoulos és Timberlake 1994), míg *S. cerevisiae*-ben a Tec1 transzkripciós faktor egyrészt a Ty1-retrotranszpozon aktiválásában (Laloux és mtsi. 1990), másrészt a Ste12 proteinnel heterodimert alkotva az élesztők fonalas növekedésében (virulenciájában) játszik alapvető szerepet (Madhani és mtsi. 1997; Schweizer és mtsi. 2000). *S. sclerotiorum gpd* génjének 5' szekvenciáját vizsgálva nem találtunk Ste12 transzkripciós faktor kötő helyet (PRE, pheromone response element).

Az analízis során egy potenciális CREA (lásd **1.3.2. "Szénforrás mediálta represszió"** c. fejezetet) kötő helyet azonosítottunk (-271/-266, komplementer inverz formában: 5' CCCCAC 3'), ugyanakkor nem találtunk GATA, PacC transzkripciós faktorokat kötő konszenzus szekvenciákat.

Az izolált *EcoRI/Hind*III fragment 56 bp-nyi terminátor szekvenciát is tartalmazott, melynek vizsgálata során nem találtunk potenciális poliadenilációs helyet (AATAAAA), mely valószínűleg 3' szekvencia rövidségével magyarázható.

4.1.4. *S. sclerotiorum gpd* génje által kódolt fehérje analízise

S. sclerotiorum gpd génje egy 338 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek feltételezett molekulatömege 36.8 kDa. Azonosítottuk az enzim katalítikus funkciójában szerepet játszó ciszteint (152-es pozíció) és hisztidint (179-es pozíció), valamint a szintén konzervatív pozíciójú, foszfát csoporttal kötést kialakító lizint (194-es pozíció) és arginint (234-es pozíció, Milner és mtsi. 1983). Ascomycota GPD szekvenciákhoz hasonlítva a fehérjék közötti rendkívül nagy homológia detektálható: pl. (*A. nidulans*) 79.6 %, (*N. crassa*) 85.9%.

4.2. *S. SCLEROTIORUM GPD* GÉNJÉNEK EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATA

4.2.1. Kodonhasználat vizsgálata

A különböző élőlények esetében eltérő kodonhasználat figyelhető meg, sőt egyazon szervezeten belül is lehet nagy különbség a kodonhasználatban, a vizsgált géntől függően. *S. cerevisiae* esetében az erős expressziót mutató géneknél egyoldalú kodonhasználatról számoltak be (Bennetzen és Hall 1982). Fonalas gombáknál is leírtak hasonló jelenséget (Ballance 1991). Eredményeink ezzel összhangban állnak, hisz *S. sclerotiorum* GPD-jének esetében a 61 lehetséges kodonból csupán 44 kerül felhasználásra. **(1. táblázat).** Megállapítható az is, hogy a felhasznált kodonok 70%-ának harmadik bázisa pirimidin. A táblázatból az is jól látható, hogy a pirimidin bázisok közül a citozin preferált a timinnel szemben. A kodon harmadik bázisával kapcsolatban tett megfigyelések egyeznek az általános tapasztalatokkal, hisz számos esetben írtak le hasonló eredményt (Punt és mtsi. 1988; Ridder és mtsi. 1992; Verdoes és mtsi. 1997).

a.sav	kodon	használt	a.sav	kodon	használt	a.sav	kodon	használt
Ala	GCT	14	Gly	GGT	15	Pro	CCT	6
	GCC	15		GGC	3		CCC	-
	GCA	4		GGA	7		CCA	6
	GCG	-		GGG	-		CCG	-
Arg	CGT	7	His	CAT	2	Ser	TCT	7
	CGC	1		CAC	4		TCC	13
	CGA	-	Ile	AAT	6		TCA	-
	CGG	-		ATC	18		TCG	1
	AGA	2		ATA	1		AGT	1
	AGG	-	Leu	TTA	-		AGC	1
Asn	AAT	4		TTG	8	Thr	ACT	8
	AAC	16		CCT	2		ACC	15
Asp	GAT	13		CTC	7		ACA	1
	GAC	10		CTA	-		ACG	-
Cys	TGT	-		CTG	-	Trp	TGG	4
	TGC	2	Lys	AAG	22	Tyr	TAC	11
Gln	CAA	3		AAA	22		TAT	11
	CAG	-	Met	ATG	8	Val	GTT	13
Glu	GAA	3	Phe	TTC	9		GTC	18
	GAG	16		TTT	-		GTA	-
-	-	-	-	-	-	-	GTG	-

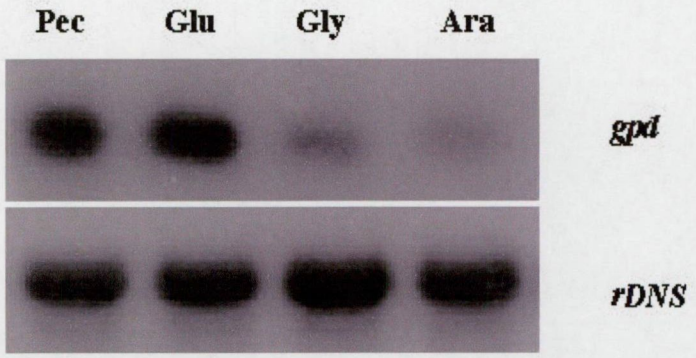
1. táblázat: *S. sclerotiorum gpd* génjének kodonhasználata

4.2.2. A *gpd* gén expressziójának vizsgálata

S. sclerotiorum gpd génjének expresszióját Northern-blot analízissel vizsgáltuk. Az előkultúrában (YPG) 48 óráig nevelt gombát egyedüli szénforrásként glükózt, pektint, glicerolt vagy arabinózt tartalmazó tápfolyadékra vittük át (8 óra). 15 µg összRNS-t agaróz gélen elektroforáltattunk, majd hibridizációs membránra történő átvitelt követően *gpd* gén fragmenttel hibridizáltunk. A várt méretnek megfelelő (1150 bp) jelet kaptunk a *gpd* próbával, míg a gélre felvitt összRNS mennyiségének összhasonlítását a rRNS adta jel tette lehetővé (**10. ábra**).

Vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy *S. sclerotiorum gpd* génje glükózon és pektinen jóval erősebb expressziót mutat, mint glicerolon és arabinózon, mely azt jelenti, hogy nem konstitutív módon kifejeződő génről van szó. Mindez összhangban áll számos, fonalas gombánál tett megfigyeléssel, míg ellentmond az általános dogmának, miszerint a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén egy minden körülmények között azonos módon, konstitutívan kifejeződő gén. A mikoparazita *T. harzianum gpd* génje erős expressziót mutatott glükózon, míg jóval gyengébbet, amikor a gazda (*Rhizoctonia solani*) sejtfalát használták egyedüli szénforrásként. Ugyanezen gomba esetében az egyes életszakaszokban is eltérő *gpd*

expressziót figyeltek meg, hisz csökkent a sporuláció alatt, hisz kevesebb *gpd* mRNS-t detektáltak a konídiofórokban és konídiumokban, mint a vegetatív hifákban (Puyeski és mtsi. 1997).



10. ábra: *S. sclerotiorum gpd* génjének expressziója különböző szénforráson (pektin, glükóz, glicerol, arabinóz)

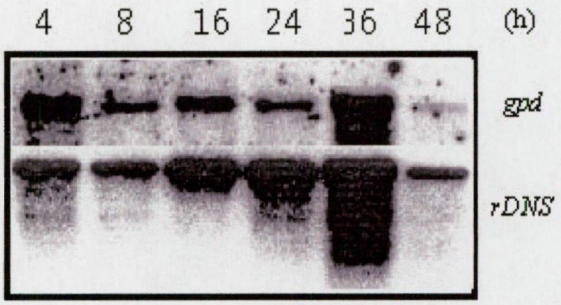
Az *A. nidulans*-ban egyetlen konstitutívan expresszálódó *gpd* kópiát írtak le (Punt és mtsi. 1998, 1990), ám Redkar és mtsi. (1998) egy magas NaCl koncentrációt toleráló törzsből (FGSC 359) a megfigyeltekhez képest erősebb *gpd* expresszióról számoltak be. A stressz hatására patkány aortában fokozott *gpd* mRNS akkumulációt (Ito és mtsi. 1996), illetve *Pleurotus sajor-caju gpd* génjének fokozott expresszióját (Jeong Jeong és mtsi. 2000; lásd **4.1.3 "*gpd* gén 5' és 3' szekvenciájának analízise"** c. fejezetet) írták le.

M. circinelloides 3 *gpd* génjéből (*gpd1*, *2*, *3*) csupán a *gpd1* gén transzkripcióját sikerült bizonyítani. Expressziós vizsgálatok ebben az esetben is azt mutatták, hogy ez a gén is regulált módon fejeződik ki (Wolff és mtsi. 2002). Glükózon erősebb transzkripcióról számoltak be, mint glicerolon és etanolon. Emellett folyamatos mintavételezés és analízis mellett glükózon és galaktózon azt tapasztalták, hogy a tápfolyadékban a folyamatosan csökkenő cukorkoncentrációval (az idő előrehaladtával csökken a cukor mennyisége) korrelál a *gpd* gén expressziója, az is csökkenő tendenciát mutat. Cukrot adva a tápfolyadékhoz erősebb *gpd* expressziót detektáltak, mely eredmények egyértelműen regulált, a rendelkezésre álló cukorkoncentrációjától függő transzkripciót bizonyítanak.

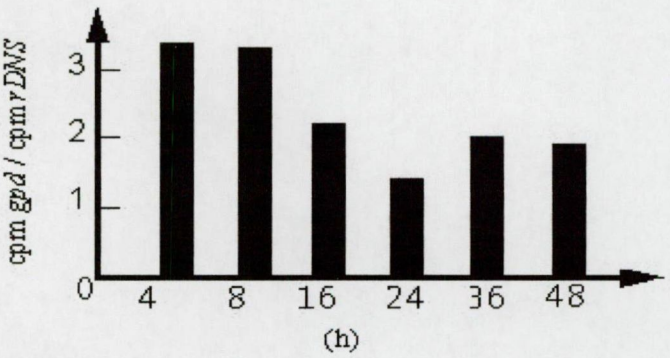
S. sclerotiorum-mal végzett kísérleteink hasonló szabályozás meglétét jelezték (**11. ábra**). Glükózon, mint egyedüli szénforráson nevelve a gombát azt tapasztaltuk, hogy a glükóz csökkenő mennyisége mellett párhuzamosan csökkent a

gpd gén expressziója is, ugyanakkor a gomba biomassza emelkedése intenzív növekedést jelez.

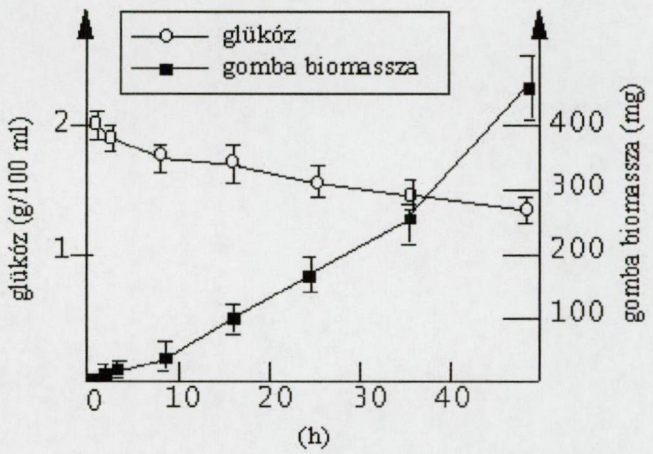
A.



B.



C.



11. ábra: **A.**) Glükózon detektált *gpd* expresszió az idő függvényében **B.**) Standardizált expressziós értékek **C.**) A glükóz koncentráció és a gomba biomassza változása a kísérlet során

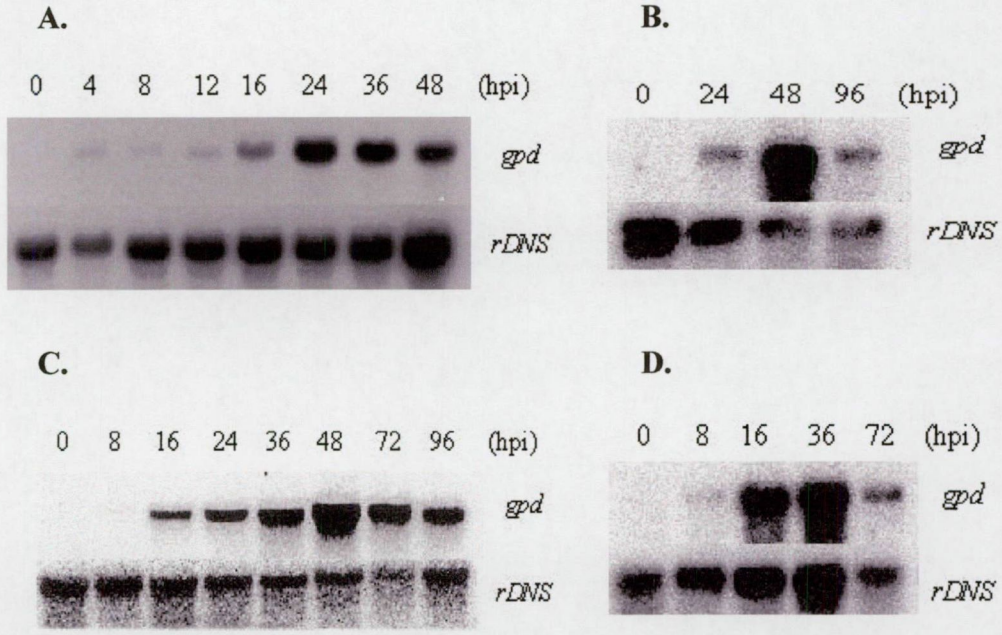
4.2.3. *gpd*, mint molekuláris marker *S. sclerotiorum* infekció során

Az *in vitro* kísérletek mellett meghatározó jelentőségűek az *in planta* eredmények. A fertőzés során a gomba-növény rendszerben a gomba mennyisége folyamatosan nő, következésképpen a fertőzött növényből kivont összRNS-ben folyamatosan emelkedik a gomba RNS mennyisége. *In planta* rendszerben egy molekuláris marker alkalmazásával lehetőség nyílik a gomba génexpressziónak (pl. sejtfaldegradáló enzimek) a gomba biomasszával történő összehasonlítására.

S. sclerotiorum esetében mindeddig nem írtak le a gyakorlatban jól és könnyen alkalmazható belső molekuláris markert, holott ez fontos lenne, hisz így összehasonlítható lenne a sejtfalbontó enzimeket kódoló gének expressziója a gomba metabolikus állapotával.

Négy gazdanövény fertőzését végeztük el (bab, cikória, napraforgó, sárgarépa) és folyamatos mintavételezés mellett vizsgáltuk a *gpd* gén expresszióját (**12. ábra**). Minden esetben hasonló profilt detektáltunk, hisz mind a négy növénynél fokozatosan erősödő *gpd* expresszió figyelhető meg egy csúcspont eléréséig (bab-36 óra, cikória-48 óra, napraforgó-24 óra, sárgarépa-48 óra), majd ezt csökkenő génexpresszió követte. A fertőzést vizuálisan követve látható a növény gomba általi fokozatos kolonizációja, viszont nem érzékelhető egy csúcspont, illetve az azt követő (gén szinten tapasztalt) visszaesés. Véleményünk szerint a *gpd* gén expressziójának minden esetben tapasztalt (egy csúcspontot követő) csökkenése azzal magyarázható, hogy a gomba számára egy idő után már nem nyújt ideális feltételeket a gazdanövény. A fertőzés végső fázisában a teljesen kolonizált növényi szövet már nem biztosít elegendő tápanyagot a patogén számára, így az nem "érdekelt" abban, hogy oly szinten aktívan tartsa metabolizmusát, mint az látható a fertőzés korai szakaszában. *In vitro* kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy *S. sclerotiorum gpd* génje nem konstitutívan módon fejeződik ki. A *gpd* gén expresszióját *in planta* körülmények között vizsgálva nem tapasztaltunk fluktuációt, a fertőzés folyamán egy csúcspont eléréséig fokozatosan növekvő majd ezt követően csökkenő expresszió volt detektálható. Következésképpen *S. sclerotiorum gpd* génje felhasználható és alkalmazható, mint belső molekuláris marker, hisz követi a gomba metabolikus állapotát a fertőzés során, lehetőséget biztosítva így, hogy viszonyítási alapként használjuk a sejtfaldegradáló enzimeket kódoló gének expressziójának vizsgálatakor. Alapvető és döntő különbség az *in vitro* és *in planta* kísérleti rendszer között, hogy

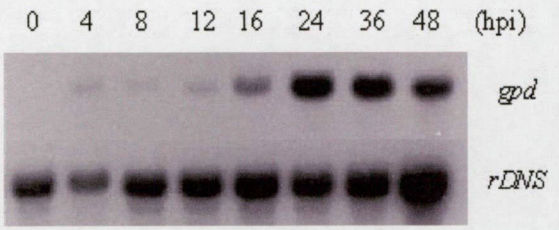
míg *in vitro* körülmények között egyetlen szénforrás génexpresszióra tett hatását vizsgáltuk, addig az *in planta* kísérlet során számos szénforrás áll a gomba rendelkezésére, melyek a *gpd* gén folyamatos transzkripcióját biztosítják. (Természetesen mindez teljes bizonyossággal csupán a kísérletbe bevont négy növény esetében mondható el.)

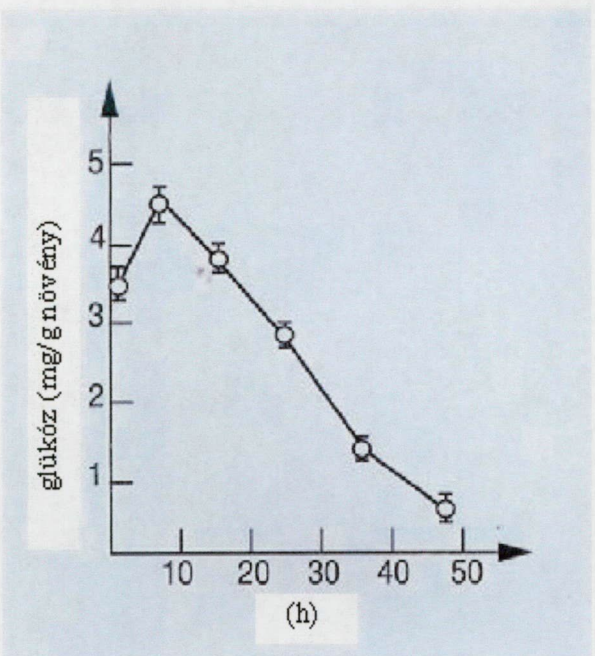


12. ábra: *S. sclerotiorum gpd* génjének expressziója *in planta* kísérleti rendszerben **A**.) napraforgó **B**.) cikória **C**.) sárgarépa **D**.) bab

Az *in vitro* kísérletek során glükózon, mint egyedüli szénforráson történt vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a *gpd* gén csökkenő expressziót mutat, páthuzamosan a csökkenő cukor koncentrációval. Fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy milyen kapcsolat áll fenn *in planta* a glükóz koncentációja és *S. sclerotiorum gpd* génjének expressziója között.(**13. ábra**) A napraforgóval végzett kísérlet során egy kezdeti rövid koncentráció emelkedéstől eltekintve fokozatos csökkenést tapasztaltunk a glükóz mennyiségének vizsgálata során a már jellemzett *gpd* profil mellett. A kezdetben megfigyelt emelkedés valószínűleg az összetett cukrokból felszabaduló glükózzal magyarázható, a későbbi csökkenés során pedig a gomba, mint könnyen felhasználható szénforrást, metabolizálja a rendelkezésre álló glükózt. *In vitro* kísérletekkel ellentétben tehát itt csökkenő glükóz koncentráció mellett fokozatosan erősödő *gpd* expresszió figyelhető meg a fertőzés kezdeti szakaszában. A kísérlet során tett megfigyelésünk ebben az esetben is az *in planta* rendszer

összetettségével magyarázható, hisz a glükózon kívül számos egyéb metabolizálható tápanyag áll a patogén rendelkezésére, mely lehetőséget biztosít a gomba számára a gyors növekedésre, a gazda kolonizációjára, mely természetesen fokozott anyagcserével párosul.





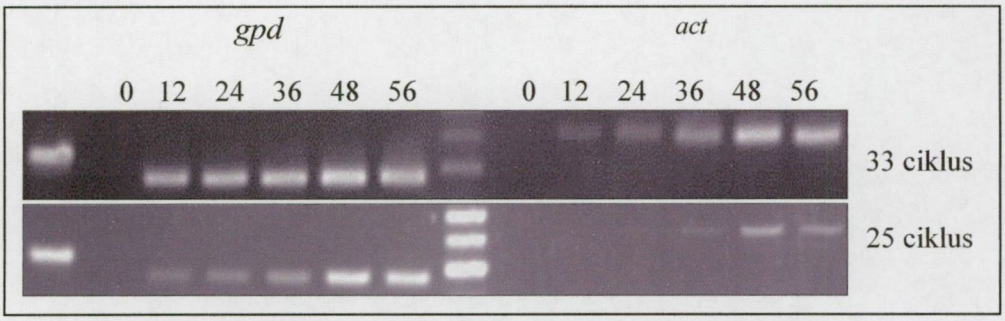
13. ábra: *S. sclerotiorum* napraforgó fertőzése során detektált *gpd* expresszió a fertőzött növényben mért glükóz koncentráció függvényében

Ma már több olyan publikáció ismert, melyek a *gpd* gén regulált (nem konstitutív) expressziójáról számolnak be. Számos kutató ezért az aktin, valamint tubulin gének használatát részesíti előnyben belső molekuláris markerként (Benito és mtsi. 1998; Li és mtsi. 2002;). Számos élőlény aktin génjének szekvenciája ismert, melyeket összehasonlítva elmondható, hogy egy rendkívül konzervatív génről van szó, filogenetikai szempontból egymástól meglehetősen távol álló szervezetek esetében is. Erre alapozva, a már ismert *B. cinerea* aktin szekvenciát (Benito és mtsi. 1998) felhasználva primereket készítettünk, majd ezek segítségével *S. sclerotiorum*

genomiális DNS-ből aktin próbát amplifikáltunk. A kísérletképpen végzett Northern-blot analízisek után azt a következtetést vontuk le, hogy az aktin gén jóval gyengébben, kisebb mértékben fejeződik ki, mint a a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén, így ez a kísérleti rendszer nem ideális a két gén expressziójának komparatív analízésére. Célunk eléréséhez így egy jóval érzékenyebb molekuláris technikára volt szükségünk, ezért RT-PCR alkalmazása mellett döntöttünk. Ezen technika lényege, hogy a vizsgált célgénről átíródott mRNS-ről (ha kifejeződik a gén az adott körülmények között) reverz transzkriptáz segítségével cDNS szintetizálódik, melynek amplifikációja a reakció második szakaszában "hagyományos" PCR-ral történik.

Eredményeink feltárták, hogy ezzel a módszerrel is (mindkét gén esetében) a már ismertetett és jellemzett profilt kapjuk. A fertőzés előrehaladtával fokozódó génexpressziót detektáltunk, majd egy csúcspont (48 óra) elérését követően a vizsgált gének transzkripciós aktivitása csökkent. (Említést érdemel, hogy a Northern-blot esetében is ezt az expressziós mintázatot detektáltuk, ugyanakkor ebben az esetben nem 24 óránál, hanem 48 óránál van az expressziós csúcspont. Figyelembe kell vennünk, hogy ezen eredmények egy más kísérleti rendszerben születtek, egy jóval érzékenyebb módszer felhasználásával. Gének expressziójának vizsgálatakor, egymástól független kísérletek elvégzésekor számos esetben van némi eltérés az eredményekben még akkor is, ha mindig azonos módon és körülmények között is végezzük kísérleteinket. Ezekben az esetekben a megegyező expressziós mintázat és profil a meghatározó, mint a mi esetünkben is.) Ezzel a módszerrel is igazolást nyert, hogy a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén jóval erősebb expressziót mutat, mint az aktin gén. A módszernél fontos a reakció során alkalmazott ciklusszám helyes megválasztása **(14. ábra).** Látható, hogy a fokozottabb expressziós aktivitással bíró *gpd* génnél 33 ciklust alkalmazva a reakció már a telítési fázishoz közelít, az egyes mintavételezési időponthoz rendelhető génaktivitásbeli különbség rejtetté válik. Mindez azzal magyarázható, hogy bizonyos ciklusszám fölött (dacára a kiindulási mintában a célgén eltérő mennyiségben fellelhető mRNS-ének) azonos vagy közel azonos intenzitású termék detektálható. Ezért alapvető, hogy az RT-PCR-t használva megtaláljuk a "leginformatívabb" ciklusszámot. (Célszerű bizonyos esetekben eltérő ciklusszámmal több reakciót elvégezni.) Esetünkben az aktin génnél a 33 ciklus alkalmazása tűnt eredményesnek, szemben a *gpd*-vel, ahol ezen ciklusszámnál a különbségek már nehezebben detektálhatóak. 25 ciklus viszont

jobb és eredményesebb volt az erősebb expressziót mutató *gpd*-nél, aktin esetében viszont számos részlet rejtve maradt ilyen paraméter mellett.



14. ábra: *S. sclerotiorum gpd* és aktin génjének expressziós analízise RT-PCR módszerrel napraforgó fertőzése során

Összegzésképpen elmondható tehát, hogy sikerült *S. sclerotiorum* génbankjából a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén teljes kódoló szekvenciáját, 713 bp promoter és 56 bp terminátor szekvenciát izolálnunk. A gén *in vitro* kísérleteink során regulált (nem konstitutív) expressziót mutatott, ugyanakkor Northern-blot és RT-PCR módszerek felhasználásával kapott eredményeinket értékelve bizonyítottnak látjuk, hogy *S. sclerotiorum* fertőzése során a *gpd* gén eredményesen és jól alkalmazható, mint belső molekuláris marker. Expressziós vizsgálataink során bebizonyosodott, hogy egy rendkívül erősen kifejeződő génről van szó, tehát az izolált promoter szekvencia felhasználásával lehetőség nyílhat transzformációs vektorok kialakítására. Mindemellett egy transzformációs rendszer kialakítása során, a bizonyítottan regulált expresszió szükségessé teszi a megfelelő táptalaj, szelekciós közeg kialakítását, mely biztosítja az erős transzkripciós aktivitást.

SZEGED

4.3. *S. SCLEROTIORUM PG6* ÉS *PG7* GÉNJÉNEK KLÓNOZÁSA, FUNKCIONÁLIS ANALÍZISE

Molekuláris és biokémiai analízis bizonyította, hogy *S. sclerotiorum* több poligalakturonáz génnel rendelkezik. Ezt az enzimcsaládot legalább hét gén alkotja, melyeket további két alcsaládba oszthatunk. (Fraissinet-Tachet és mtsi. 1995; lásd **1.2. "Poligalakturonázok, pektinázok térszerkezet vizsgálata"** c. fejezetet). Klónozásra került *pg1*, *pg2* és *pg3* gének rendkívül nagy szekvencia homológiát mutatnak, szekvenciájuk alapján kalkulált fehérjék semleges izoelektromos ponttal (pI) rendelkeznek (Fraissinet-Tachet és mtsi. 1995; Cotton és mtsi. 2002). Klónozásra került továbbá a *pg5* gén is, mely egy savas pI-vel bíró fehérjét kódol (Cotton és mtsi. 2003). A *pg2* funkcionális analízise során kiderült, hogy már a fertőzés nagy korai szakaszában expresszálódik, PG2 pedig processzív módon hasító enzim (Cotton és mtsi. 2002).

S. sclerotiorum közeli rokonságban álló *B. cinerea* 6 poligalakturonáz génnel rendelkezik (Wubben és mtsi. 1999; lásd **1.2.2. "*Botrytis cinerea* poligalakturonáz rendszerének vizsgálata"** c. fejezetet). Wubben és mtsi. által gomba poligalakturonázokkal végzett filogenetikai analízis számos érdekes információval szolgált. Több poligalakturonáz csoportot ("cluster") különböztettek meg, ahol külön alcsaládot (III-as csoport) alkot a *Bcpg1* gén (*B. cinerea pg1* gén) a *Scpg1*, *2* és *3* génekkel (*S. sclerotiorum pg1*, *2* és *3*), közeli rokonságot mutattak a *Bcpg2*, *4*, *5* és *Scpg5* gének (IV-es alcsalád), valamint különálló csoportot képeztek a *Bcpg3*, *6* és *AnpgD* (*A. niger pgD*) gének (V-ös csoporton belüli alcsalád).

Célunk az volt, hogy újabb poligalakturonáz géneket klónozzunk, továbbá regulációjukat és infekcióban betöltött szerepüket vizsgálva, minél jobban megértsük *S. sclerotiorum* poligalakturonáz géncsaládjának funkcióját. Választásunk a *Bcpg 3* és *6* génekre esett, mert ezen gének a Wubben és munkatársai által végzett filogenetikai analízis során oly különálló csoportot alkottak, mely nem tartalmaz eddig ismert *Sclerotinia* poligalakturonáz gént.

4.3.1. *S. sclerotiorum pg6* és *pg7* génjének klónozása

Az ismert *B. cinerea* (*Bcpg 1-6*) valamint *S. sclerotiorum* poligalakturonáz (*Scpg 1, 2, 3, 5*) gének szekvenciáinak összehasonlítása során oly specifikus szekvencia részeket kerestünk, melyek egyedülállóan a *Bcpg3*, illetve a *Bcpg6* génekre jellemzőek. Ezen szakaszokra primereket (BCPG 3A-C valamint BCPG 6 A-B) terveztünk, majd *B. cinerea* genomiális DNS-ből amplifikált fragmenteket használtuk *S. sclerotiorum* génbankjának vizsgálatához. Rendkívül fontos volt a lehető legspecifikusabb *pg3* és *pg6* hibridizációs szonda alkalmazása, valamint az ideális hibridizációs hőmérséklet megtalálása (58 C°, melyet kísérleteink során a hibridizációs hőmérséklet fokozatos csökkentésével azonosítottunk), elkerülendő a már ismert *S. sclerotiorum* poligalakturonáz gének izolálását. (Túl alacsony hibridizációs hőmérséklet esetén számos fals pozitív jel kapható, míg túl magas hőmérsékletnél, heterológ próbát alkalmazva, pozitív jelek teljes hiánya tapasztalható.)

Bcpg6 próbával 3 pozitív rekombináns fágot izoláltunk *S. sclerotiorum* génbankjából. A legerősebb jelet adó fággal folytattuk a további vizsgálatokat: az izolált fág DNS-t restrikciós enzimekkel emésztettük, majd a *Bcpg6* próbával történő hibridizációt követően egy 3.6 kb-os *EcoO109I* fragmentet pBSK- vektorba szubklónoztunk.

Bcpg3 próbával egyetlen pozitív jelet adó rekombináns fágot izoláltunk. A restrikciós emésztéseket követően egy 1.5 kb-os *XhoI* és egy 4.6 kb-os *EcoRI* fragment került pBSK- vektorba szubklónozásra.

4.3.2. *pg6 és pg7* gének szekvencia analízise

A szubklónozott fragmentek szekvenciájának analízise igazolta, hogy a *Bcpg3* és *Bcpg6* génekkel homológ *S. sclerotiorum* poligalakturonáz géneket izoláltunk, melyeket *Scpg6*-nak illetve *Scpg7*-nek neveztünk el. (A *Bcpg3*-mal homológ gént *Scpg7* névvel illettük, hisz 3-as számú *S. sclerotiorum* poligalakturonáz már létezik.)

Scpg6 gén 1110bp-nyi kódoló szekvenciát tartalmaz, melyet két intron szakít meg (**15. ábra**). A szubklónozott fragment emellett tartalmazott még 607

bp-nyi promoter és 270 bp-nyi terminátor szekvenciát. A kezdő kodon (ATG) környezetében lévő szekvencia (ACCATGC) analízise során megállapíthatjuk, hogy a Kozak-szekvenciának megfelelően a –3-as pozícióban adenint találunk, ugyanakkor a konszenzus szekvenciától eltérően +4-es pozícióban guanin helyett citozin található. Mindkét intron esetében az 5'(GT) és 3' (PyAG) határoló szekvenciák megegyeznek a fonalas gombáknál leírt konszenzus szekvenciákkal. *B. cinerea pg6* génjében szintén 2 intront írtak le, melyek génben elfoglalt helyzetét *Scpg6* gén intronjaival összevetve a következőket állapíthatjuk meg: az első intron pozíciója *B. cinerea* esetében +352-+397 (45 bp hosszú), míg *S. sclerotiorum*-ban +365-+413 (48 bp-nyi hossz); a második intron pozíciója *B. cinerea*-nál +799-+851 (52 bp-nyi hossz), *S. sclerotiorum*-ban pedig +799-+846 (47 bp-ny hossz). Mindebből az állapítható meg, hogy az intronok hossza, helyzete hasonló, ám a második intron kezdő bázisától eltekintve nem konzervatív helyzetű.

```
                                                    ggcctccaaccagaagtcatggatagatctg  -577

ttctagatttatgctaaatggaagatttgaggaattttccagagctatttgacttcaaataaagtttattgg  -505

cagaccttattacttgtggaaaattcgaacttgcaaataatactaggtgggcggcgacctgctgccaagctg  -433

aaatctggggttgtggaaagggagatgaaacattggagaacattcatcattattgcggaccgagttcccatc  -361

tagagatttncatctagcaccactttattgaacttttggtattcatggggtgtcttttctggtaaaatgcgg  -289

atgtcttctcagctcacacttctgcgattatattaatattaatttgcggagaacaatgtacgtacttatccc  -217

cgcccatgagaagatcagtatgtatcattcggttttcttttcggcatgaggaaaggaggttctaggaagatt  -145

gccatacttggccttccagtacttttataaactcgagtgttctcgatgctctccctgaattctgcaagtttga   -73

ctttattcattacttgcctcctcctgatttctgcatgtttagcttcattcatcttgttgattaactcacacc    -1

 M   H   R   D   F   S   I   P   G   L   L   A   L   T   L   A   G   V      18
ATG CAT AGA GAC TTT TCC ATC CCA GGG CTC TTA GCC CTC ACT TTA GCA GGC GTT      54

 C   T   A   Q   T   A   C   T   A   S   V   Y   S   Q   I   A   P   C      36
TGC ACA GCT CAA ACA GCA TGC ACT GCT TCA GTG TAT TCC CAA ATC GCT CCT TGT     108

 V   A   S   S   T   A   I   V   L   N   N   I   Y   A   P   S   G   S      54
GTT GCA TCC TCG ACA GCA ATT GTG CTG AAC AAT ATA TAT GCA CCA TCA GGA AGC     162

 S   I   D   L   T   K   V   K   A   G   T   K   I   T   F   A   G   K      72
AGT ATT GAC TTG ACT AAA GTC AAG GCC GGT ACT AAA ATC ACT TTT GCC GGG AAA     216

 T   T   F   G   F   T   N   D   S   S   F   D   P   I   K   L   S   G      90
ACA ACT TTT GGA TTC ACC AAC GAT AGT AGC TTC GAC CCA ATA AAA TTA TCG GGC     270

 S   G   I   H   V   T   G   A   P   G   A   V   I   D   G   N   G   Q     108
TCG GGA ATT CAC GTC ACC GGT GCG CCA GGT GCA GTC ATT GAT GGC AAT GGC CAA     324

 A   Y   W   N   G   Y   G   S   N   D   D   V   P                         121
GCT TAT TGG AAT GGG TAT GGC TCG AAC GAT GAT GTG CCA AA gtatgttttcacagcaa     382

                                K   P   N   H   F   I   A   A   S   K      131
ttcaaacatgattaagctaataatgaatccagG CCA AAT CAT TTT ATC GCT GCC TCG AAA       442

 L   V   G   G   S   V   I   E   N   L   Y   I   Q   N   W   P   V   H     149
TTG GTT GGC GGT TCC GTG ATC GAG AAT CTA TAT ATT CAG AAC TGG CCG GTC CAT     496

 L   F   T   I   T   G   A   V   G   L   T   V   Q   N   L   I   L   N     167
```

```
CTT TTC ACT ATT ACC GGT GCT GTT GGG CTG ACC GTC CAG AAC CTG ATT CTT AAC    550

 N   T   A   G   D   V   P   N   A   A   S   G   T   L   P   A   A   H    185
AAC ACA GCA GGA GAC GTG CCG AAT GCT GCC AGT GGT ACT TTG CCT GCA GCT CAC    604

 N   S   D   G   F   D   L   S   S   S   V   D   T   I   I   R   N   S    203
AAT TCG GAT GGA TTC GAT CTG AGC TCG AGC GTA GAC ACG ATA ATC AGG AAT TCA    658

 S   V   Y   N   Q   D   D   C   V   A   V   T   S   G   N   N   I   T    221
TCC GTT TAC AAT CAG GAT GAC TGC GTA GCT GTT ACG AGC GGG AAC AAC ATT ACC    712

 I   D   G   L   Y   C   S   G   G   H   G   L   S   I   G   S   V   G    239
ATT GAT GGA TTG TAT TGC TCA GGT GGC CAT GGT CTT TCC ATC GGA TCT GTA GGT    766

 G   K   S   N   N   N   V   T   N   I   T                              250
GGA AAG AGC AAT AAC AAT GTG ACA AAC ATT ACT  gtaagttctatgtaccggctatcgaat   826

                         F   K   N   S   Q   I   V   N   S   S   N   G   A   263
ttccttctcactattttccagTTT AAA AAT AGT CAA ATC GTC AAC TCC AGC AAC GGA GCT   886

 R   I   K   S   N   E   G   T   T   G   F   I   S   N   I   T   Y   S    281
CGC ATC AAG TCC AAC GAA GGA ACC ACC GGC TTC ATC TCC AAC ATC ACA TAC AGT    940

 N   I   K   L   T   N   I   D   T   Y   G   I   D   V   Q   Q   D   Y    299
AAT ATT AAG CTC ACC AAC ATT GAT ACC TAT GGC ATC GAT GTA CAA CAA GAT TAC    994

 L   N   G   G   P   T   G   N   P   T   N   G   V   L   I   Q   N   I    317
TTA AAC GGA GGC CCA ACA GGA AAC CCA ACA AAC GGT GTC CTT ATC CAG AAT ATT   1048

 L   F   Q   N   V   T   G   T   A   A   A   S   A   R   N   Y   Y   V    335
TTG TTC CAA AAT GTG ACT GGA ACA GCC GCA GCT AGC GCC AGA AAC TAC TAC GTG   1102

 L   C   G   S   G   S   C   N   N   I   T   F   S   G   V   K   I   T    353
CTC TGT GGA TCC GGA AGT TGT AAC AAT ATT ACT TTC TCT GGA GTT AAG ATT ACT   1156

 G   G   A   V   A   S   T   C   N   Y   P   S   T   G   C   P   K   *    371
GGA GGA GCA GTA GCA AGT ACT TGT AAC TAT CCA TCA ACC GGC TGT CCT AAG TAG   1210

gcttgcatcatgaactgaagggattaaggatctctcaggtagaagagaggaaaggagttaggtatcgaacat  1282

gttgcgtgttgccttctgcgtaatgggtgtgcagaaatctatccttataaccacagaaatatttcaaatata  1354

tcaaatatatcaaatatatcaaatatatcaaatatatcaaatatatcaaatatatcaaatatatcaaatata  1426

tcaaatatatcaaatatatcaaatatatcaaa                                        1458
```

15. ábra: *S. sclerotiorum pg6* génjének szekvenciája (a promoter-elemekről bővebben a **4.3.4. "*pg6* és *pg7* gének 5' szekvenciáinak analízise"** című fejezetben)

Scpg7 gén esetében az analízis 549 bp promoter és 224 bp terminátor szekvencia mellett 1179 bp-nyi kódoló szekvenciát tárt fel. A *Bcpg3*-hez hasonlóan ebben a génben is csupán egy intron található, ám ezek hossza és elhelyezkedése ebben az esetben is eltérő (*Scpg7* génben +9-+125, míg *Bcpg3* génben +43-+129). *Scpg7* gén intronjában is megtalálhatóak a tipikus 5' (GT) és 3' (PyAG) konszenzus szekvenciák. A kezdő ATG kodont határoló szekvencia ebben az esetben (TGCATGC) eltér a Kozak-szekvenciától, hisz +4-es pozícióban a *Scpg6* génhez hasonlóan egy citozint találunk, míg –3-as pozícióban jelen esetben egy timin van.(**16. ábra**)

```
                                aattttcctctggaaacaaacggaaaaaaaataactttatattaa  -505

aacgttcttgacgtagactccacacttcgtttatgtgctgggaaaacctcctgtaatttcctgcatgcatgg  -433

gagctctggcggtagcatgcaaactatctatcggatgacatagatccttgtattgatcaatttcttcttgtc  -361

ctgctcatgtatatcttcacgtctctccgttctcagtcacattatcaacaaccaactctcttcacattcaca  -289

ctcttttaacatactcaatttttgtttccccattgaagcattaccttcgttgaacgagaaattgctggcc  -217

aaaatgcgcattccaattattcttggaggcttagcctcaatcgctcttgcttgcgacaacccagatcacgat  -145

gcttgcgctaacgctttcacccgtttctgccgcagctgctggtcctttctgcgccacatacactcaatcggc   -73

aaacgcggcaacgaccgatcttcccgcttttgcttcagcatgtgcatacaagccaaagaaattgtctagtgc    -1

 M   Q                                                                       2
ATG CAG CT gtcttagcgtacccaccactttggctactgtttccgtgagtacattctaaagaatacctcg    69

                                                        L   A   S   A   T     7
agtctgaagtcctagactaacttgtacatcagaagagctcaagcgccgctgtcagC GCT TCG GCC ACC   137

 T   S   V   T   A   L   T   H   V   A   V   T   T   S   A   S   S   T     25
ACC TCG GTC ACA GCT TTA ACT CAC GTA GCA GTA ACC ACC TCC GCT TCA AGC ACT   191

 A   V   A   S   S   A   S   A   A   S   A   V   I   T   P   A   P   S     43
GCA GTC GCA TCC AGC GCA TCT GCA GCT AGC GCA GTC ATC ACA CCG GCA CCA TCA   245

 A   P   A   G   C   T   A   T   A   Y   A   D   I   A   F   V   V   A     61
GCC CCA GCC GGA TGC ACA GCA ACA GCT TAT GCT GAT ATT GCC TTC GTT GTT GCC   299

 S   C   T   N   I   V   L   D   N   I   S   A   P   A   S   S   T   I     79
TCG TGC ACA AAC ATC GTC TTG GAT AAC ATT TCA GCA CCA GCA AGC TCC ACC ATT   353

 D   L   Q   K   L   K   D   G   T   T   V   T   F   S   G   K   T   T     97
GAT CTT CAA AAG CTC AAA GAC GGA ACT ACC GTC ACT TTC TCC GGA AAG ACT ACT   407

 F   G   T   T   S   D   D   S   F   N   P   I   V   V   K   G   K   N    115
TTT GGA ACC ACT TCC GAT GAT AGC TTC AAC CCA ATT GTC GTC AAG GGT AAG AAC   461

 I   T   L   T   G   A   P   G   H   V   I   D   G   N   G   P   A   Y    133
ATT ACC CTT ACT GGA GCT CCT GGA CAC GTC ATT GAT GGA AAT GGA CCT GCA TAC   515

 W   D   G   E   G   S   N   G   G   T   K   K   P   D   H   F   F   V    151
TGG GAT GGA GAG GGT TCT AAC GGA GGA ACC AAG AAG CCT GAT CAC TTC TTC GTT   569

 V   K   D   I   V   N   G   V   I   S   N   L   N   I   Q   N   W   P    169
GTA AAG GAT ATC GTC AAT GGT GTT ATC AGC AAC CTC AAC ATC CAA AAC TGG CCT   623

 T   H   C   F   D   I   T   G   A   K   G   L   T   V   S   G   L   T    187
ACT CAC TGC TTC GAT ATC ACC GGT GCC AAG GGT CTT ACC GTC TCA GGA CTT ACC   677

 L   D   N   S   A   G   D   A   P   N   S   A   S   G   S   K   A   A    205
CTT GAT AAC TCT GCT GGA GAT GCC CCT AAC TCA GCA TCT GGC AGC AAA GCA GCC   731

 A   H   N   S   D   G   F   D   I   S   N   S   D   S   V   T   L   K    223
GCA CAC AAC AGT GAT GGA TTT GAC ATT TCC AAC TCC GAC TCT GTA ACC CTC AAG   785

 N   I   V   V   K   N   Q   D   D   C   V   A   V   T   S   G   S   N    241
AAC ATT GTT GTC AAG AAC CAA GAT GAT TGC GTC GCC GTC ACA TCT GGT TCT AAC   839

 I   L   V   T   G   M   A   C   S   G   G   H   G   L   S   I   G   S    259
ATC CTC GTA ACC GGA ATG GCC TGT TCA GGT GGC CAC GGT CTC TCT ATC GGA TCC   893

 V   G   G   K   S   N   N   T   V   S   G   V   T   F   S   D   S   T    277
GTC GGT GGA AAA TCC AAC AAC ACC GTC TCT GGC GTT ACC TTC TCC GAC TCC ACC   947

 I   T   N   S   Q   N   G   C   R   I   K   S   N   S   G   K   T   G    295
ATC ACC AAC AGT CAA AAC GGA TGC CGC ATC AAG TCT AAC TCT GGC AAG ACC GGT  1001

 T   I   E   N   V   T   Y   S   N   I   Q   M   S   N   I   S   N   Y    313
ACC ATC GAG AAC GTC ACT TAC AGC AAC ATC CAG ATG TCC AAC ATC TCC AAC TAC  1055

 G   I   D   V   Q   Q   D   Y   L   N   G   G   P   T   G   E   P   T    331
GGT ATC GAC GTT CAA CAA GAT TAC TTG AAC GGT GGA CCA ACT GGC GAG CCA ACA  1109
```

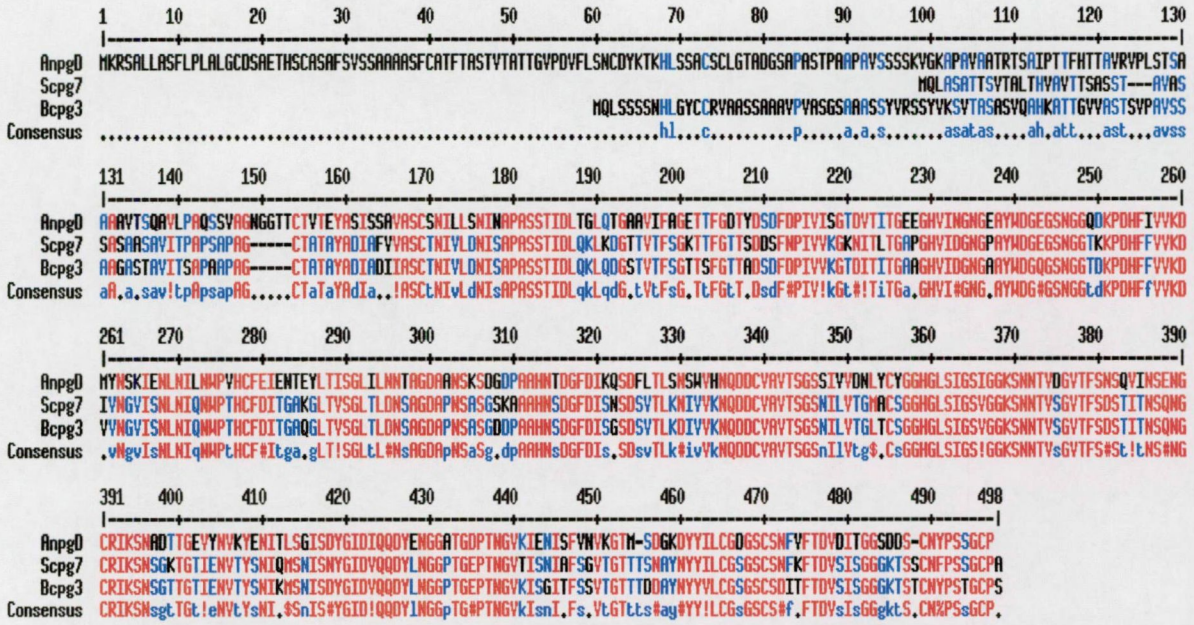
```
 N   G   V   T   I   S   N   I   A   F   S   G   V   T   G   T   T   T     349
AAC GGC GTT ACC ATC TCC AAC ATT GCC TTC TCC GGC GTC ACC GGT ACA ACC ACT   1163

 S   N   A   Y   N   Y   Y   I   L   C   G   S   G   S   C   S   N   F     367
AGC AAC GCA TAC AAC TAC TAC ATC CTT TGC GGA AGT GGC TCC TGC TCC AAC TTC   1217

 K   F   T   D   V   S   I   S   G   G   G   K   T   S   S   C   N   F     385
AAA TTC ACA GAT GTT AGC ATC TCT GGA GGT GGA AAG ACC TCA TCC TGC AAC TTC   1271

 P   S   S   G   C   P   A   *                                             393
CCA TCT TCT GGA TGC CCT GCA TAA  atttccatcatgaatgtagattgatttaaggtgtgatga  1334

taagttttagtcataggaggattgggtgaagtgaaattttggagatcgcaggcggttgaaatacacttctgt  1406

atgtatgtatatttagttcttgtatagcattcgagatcaat
```

16. ábra: *S. sclerotiorum pg7* génjének szekvenciája (a promoter-elemekről bővebben a **4.3.4. "*pg6* és *pg7* gének 5' szekvenciáinak analízise"** című fejezetben)

4.3.3. *pg6* és *pg7* gének által kódolt fehérjék analízise

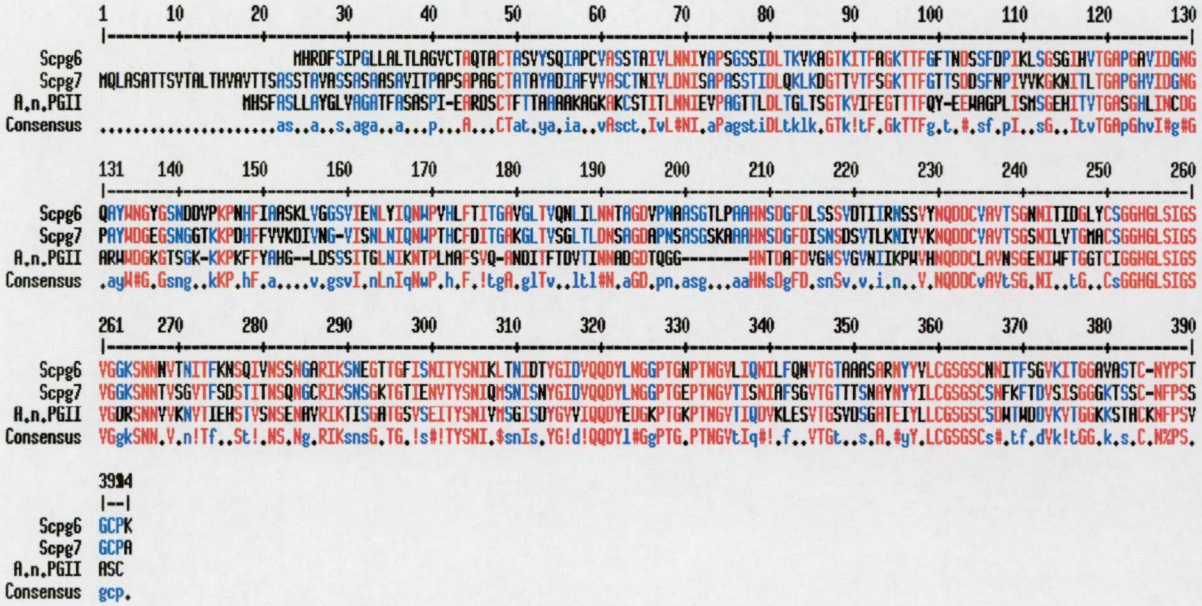
S. sclerotiorum pg6 génje egy 370 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek izoelektromos pontja (pI) 6.19, valamint egy potenciális szignál peptid hasítóhely található a CTA-QT (21. és 22. pozícióban) aminosavak között. *Bcpg6* (U68722) gén által kódolt enzimet 371 aminosav alkotja, a potenciális szignál peptid hasítóhely pedig megegyező (CTA-QT 21. és 22. aminosavak között) az *Scpg6* génnél tapasztalttal, ám kalkulált izoelektromos pontja jóval alacsonyabb (4.83).

Wubben és mtsi. (1999) által készített filogenetikai törzsfa alapján *Bcpg3* génhez legközelebb *A. niger* D poligalakturonáz génje áll (*AnpgD*). ScPG7, BcPG3 és AnPGD fehérjékkel végzett szekvencia összehasonlítás (**17. ábra**) jól mutatja, hogy a fehérjék N-terminális régiója speciális, egyedi, ugyanakkor az enzimek középső valamint C-terminális régiója között figyelemreméltó homológia figyelhető meg. ScPG7 proteint 392, BcPG3 (U68717) fehérjét 434, míg AnPGD (Y18806) enzimet 495 aminosav építi fel, feltételezett izoelektromos pontjuk 5.06, 4.36 és 4.21. Potenciális szignál peptid hasítóhely detektálható ScPG7 (TSA-SS, 22. és 23. aminosav között) és AnPGD fehérjék esetében (ALG-CD, 16. és 17. aminosav között). Wubben és mtsi. (1999) BcPG3 fehérje potenciális szignál peptid hasítóhelyét (AnPGD fehérjéhez hasonlóan) a 16. és 17. aminosav között jelzik, ám az általam végzett vizsgálat szerint (SignalP) ezen fehérje nem hordoz szignál peptidet.



17. ábra: BcPG3, ScPG7 és AnPGD fehérjék szekvenciáinak összehasonlítása ("alignment")

ScPG6 (227-240 szekvencia) és ScPG7 (249-262 szekvencia) fehérjékben egyaránt megtalálható a gomba poligalakturonázokra jellemző CXGGHGXSIGSVG motívum, ahol X mindig hidrofób aminosav. Baktériumok és magasabb rendű növények poligalakturonázaival összevetve GHGXSXGS motívumra redukálódik ez a szekvencia (Reymond és mtsi. 1994). Az irodalmi áttekintés során részletesen taglaltam *A. niger* PGII poligalakturonázának krisztallográfiás vizsgálatát, a szubsztrát-kötésben/katalízisben meghatározó szereppel bíró aminosavak (Asp-180, Asp-201, Asp-202, His-223, Arg-256, Lys-258) azonosítását, jellemzését (lásd **1.2.5. "Pektinolitikus enzimek krisztallográfiás vizsgálata"** c. fejezetet). ScPG6 és ScPG7 valamint *A. niger* PGII fehérjék szekvenciájának összehasonlítása során megállapíthatjuk **(18. ábra)**, hogy az említett aminosavak ScPG6 és ScPG7 enzimekben is megtalálhatóak (Asp (D)-214, 233 és 234; His (H)-254, Arg (R)-287, Lys (K)-289; az aminosavak számozása a **18. ábra** alapján). E két utóbbi aminosav (arginin és lizin) a pozítiv töltésű RIK régiót alkotják (arginin-izoleucin-lizin), mely valószínűleg a szubsztrát karboxi-csoportjával lép ionos kölcsönhatásba (Bussink és mtsi. 1992). Ez a szekvencia megtalálható mind a prokarióták, mind a magasabbrendű növények poligalakturonázaiban.



18. ábra: ScPG6, ScPG7 és AnPGII fehérjék szekvenciáinak összehasonlítása ("alignment")

4.3.4. *pg6* és *pg7* gének 5' szekvenciáinak analízise

Scpg6 gén promoteréből 607 bp-nyi szakaszt sikerült szubklónoznunk és elemeznünk (**15. ábra**). Vizsgálatunk során 1 potenciális CAAT- (-235/-232) és 2 TATA-bokszot (-261/-258,-120/-117) találtunk. Eltérően az *Scpg7* gén promoterétől ebben az esetben PacC (5' GCCAAG 3', -441/-436) és CREA (5' CTGGGG 3', -428/-423) konszenzus kötőhelyeket detektáltunk, s emellett 2 GATA-kötőhely is azonosításra került (komplementer inverz formában: 5' TATC 3', -222/-219, -194/-191), melyeket 28 bp választ el, így funkcionálisan aktívak lehetnek. Megállapítást nyert, hogy a vizsgált promoter egy Ste12 fehérjekötő konszenzus szekvenciát tartalmaz (5' TGAAACA 3', -407/-401), ugyanakkor nem találtunk AbaA/Tec1 kötő szekvenciát (5' CATTCY 3'). Vizsgálatunk során Azam és mtsi. (2002) által *Flammulina velutipes* oxalát dekarboxiláz promoterében footprinting módszerrel azonosított "savas motívum"-hoz (5'-GCGGGGTCGCCGA-3') közelő álló (Matinspector program, maximálisan 6 bp "mismatch" feltétellel) szekvenciát azonosítottunk (5'-AGCA**GGTCGCCG**-3';-453/-442 komplementer inverz formában: 5'-**CGGCGACC**TGCT-3'). Azam és mtsi. (2002) megállapították, hogy az oxálsav lebontásában szerepet játszó enzim indukcióját nem maga az oxálsav

SZEGED

okozza, hanem az alacsony pH, így munkájuk során azonosított motívumot LPRE névvel illették ("low pH response element").

A szubklónozott szekvencia (*pg7* gén esetében) analízise 549 bp-nyi promoter jelenlétét igazolta, melyben számos promoter-elemet azonosítottunk (**16. ábra**). Vizsgálatunk során 4 potenciális CAAT-(-375/-372, -203/-200, -179/-176,-80/-77) és 2 TATA-boksz (-512/-509, -351/-348), valamint 2 CT-gazdag régió (-270/-256, -54/-37) jelenlétét igazoltuk. Azonosításra került 4 TATC (komplementer inverz szekvencia) (-408/-405, -404/-401, -349/-346, -318/-315) motívum, melyek az extracelluláris nitrogén okozta génregulációban játszhatnak szerepet (GATA transzkripciós faktor potenciális kötőhelyei). Fontos az egyes kötőhelyek egymáshoz viszonyított helyzete, hisz 2 GATA-kötőhely funkcionálisan aktív elrendezése esetén azokat kevesebb, mint 30 bp választja el (Marzluf és mtsi. 1997). Igazolást nyert, hogy *Scpg7* gén vizsgált promoter szekvenciájában található egy AbaA/Tec1 motív (5'-CATTCY-3', -208/-203), ugyanakkor nem találtunk Ste12, PacC, STRE és CREA transzkripciós faktorok kötésében szerepet játszó konszenzus szekvenciákat. A fenntiekben ismertetett módon kerestünk Azam és mtsi. (2002) által azonosított "savas motívummal" homológ szekvenciát *Scpg7* gén promoterében is. Ebben az esetben is komplementer inverz formában (-167/-155, 5'-CTT**GCGACAACCC**-3') azonosítottunk egy szakaszt (5'-GGGTT**GTCGCAAG**-3'). A *Scpg6* gén promoterében talált szekvenciával összevetve megállapíthatjuk, hogy **"GTCGC"** motívum mindkét esetben megtalálható és megegyező a *F. velutipes* esetében publikálttal. Rendkívül érdekes feladat lehet a jövőben ezen motívum további funkcionális vizsgálata, kiváltképp egy olyan gomba esetében, mint *S. sclerotiorum*, mely számára a pH alapvető szabályozó szereppel bír.

4.4. *S. SCLEROTIORUM* POLIGALAKTURONÁZ GÉNCSALÁDJÁNAK EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATA

Korábban négy *S. sclerotiorum* poligalakturonáz volt ismert (*Scpg 1, 2, 3, 5*, lásd **1.2. "Poligalakturonázok, pektinázok térszerkezet vizsgálata"** c. fejezetet). Munkám során *S. sclerotiorum* génbankjából két újabb poligalakturonáz gént izoláltam (*Scpg6* és *Scpg7*), ezen gének *in vitro* és *in planta* expressziós vizsgálatáról ebben a fejezetben számolok be.

4.4.1. *S. sclerotiorum* poligalakturonáz géncsaládjának *in planta* expressziós vizsgálata

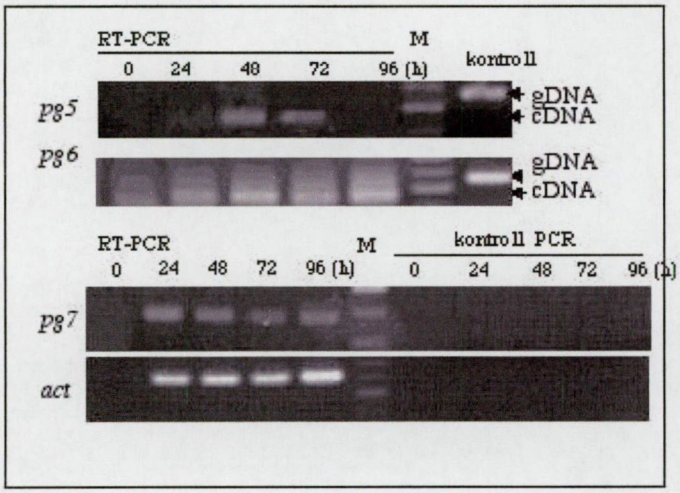
Vizsgálatunkban sárgarépa karógyökerét használtuk gazdanövényként, hisz ennek beszerzése, kezelése rendkívül egyszerű. Kísérleteinket két különböző rendszerben végeztük, egyfelöl vizsgáltuk az endopoligalakturonázok expresszióját az idő függvényében (0-96 óra), másfelől a "térben". Ez utóbbi esetben a fertőzött karógyökér öt zónáját különítettük el, ahol az egyes zónákhoz eltérő fertőzöttségi szint kapcsolható, melynek következménye, hogy az egyes zónákban mérhető oxálsav mennyiség és pH szintén különböző (pH 3.1-6.3). Az egyes zónák elkülönítése a pH valamint vizuális tényezők alapján történt (részletesen a **4.4.1.2. "Térben (zónákban) végzett *in planta* expressziós vizsgálat"** című fejezetben).

4.4.1.1. Az idő függvényében végzett *in planta* expressziós vizsgálat

Az idő függvényében történő analízis során első lépésként 24 órás mintavételezéssel dolgoztunk (0-96 óra). Northern-blot analízis során nem detektáltuk génexpressziót, így a Northern-blot technikánál jóval érzékenyebb molekuláris módszer, az RT-PCR technika alkalmazása vált szükségszerűvé. Az RT-PCR technika fokozott érzékenysége miatt széleskörben alkalmazott molekuláris biológiai módszer (Poussereau és mtsi. 2001; Goidin és mtsi. 2001; Li és Goodwin 2002). Vizsgálatunk során belső standardként aktint használtuk, mely lehetőséget nyújt arra, hogy összehasonlítsuk az egyes reakciókba bevitt összRNS mennyiséget. Az aktinnal végzett kísérlet mutatja, hogy a 96 órás minta esetében több templát került a reakcióba, mely fontos az egyes poligalakturonázokkal kapott eredmények értékelése során. (Ugyanakkor figyelembe kell vennünk azt a tényt, hogy a fertőzés időbeli előrehaladtával folyamatosan nő a gomba RNS aránya az összRNS

mennyiségéhez viszonyítva, így ez is magyarázatul szolgálhat a tapasztaltakra.) Említést kell tennünk az RT-PCR során alkalmazott eltérő ciklusszámról is, hisz az aktinnal végzett kísérlet esetében 33 ciklust, míg a poligalakturonázok esetében 40 ciklust használtunk. A belső standarként figyelembe vett aktin esetében azért alkalmaztunk csupán 33 ciklust, mert így még látható és elkülöníthető az eltérő sávintenzitás, ugyanakkor 40 ciklus esetén a reakció telítési fázisba jut, s a reakcióba bevitt eltérő mennyiségű templát RNS ellenére azonos intenzitású sávok detektálhatóak. Fontos viszont, hogy a poligalakturonázokkal végzett kísérletek azonos ciklusszámmal történjenek, hisz ellenkező esetben a kapott eredmények értelmezése rendkívül bizonytalan. Nagyon lényeges a nem fertőzött növényi RNS-sel végzett kontroll reakció ("0" óra a **19. ábrán**), melyet a *pg6* gén vizsgálata során kapott eredményünk is mutat. A poligalakturonázok a növényekben számos jelenségben érintettek, így előfordulhat, hogy a gomba génekre írt speciális primerek egyes esetekben keresztreakciót mutatnak, mely aspecifikus sávként jelenik meg a reakció során. Ezen sávok értékelésében segít a kontroll reakció alkalmazása.

Vizsgálatunk során mindhárom vizsgált poligalakturonáz detektálható volt, de eltérő módon (**19. ábra**). A *pg6* gén lényegében konstitutív módon fejeződött ki; a 96 óránál tapasztalt erősebb expresszió magyarázható az aktinnál tapasztalt nagyobb gomba RNS mennyiséggel, bár 48 óránál is detektálható egy enyhe expressziós csúcs. A *Scpg7* gén esetében egyértelműen megállapítható, hogy az expresszió a fertőzés kezdeti szakaszában jóval erősebb (24, 48 óra), s az infekció befejező fázisában fokozatosan csökken. *Scpg5* gén esetében csupán 48 és 72 óránál detektáltunk expressziót.



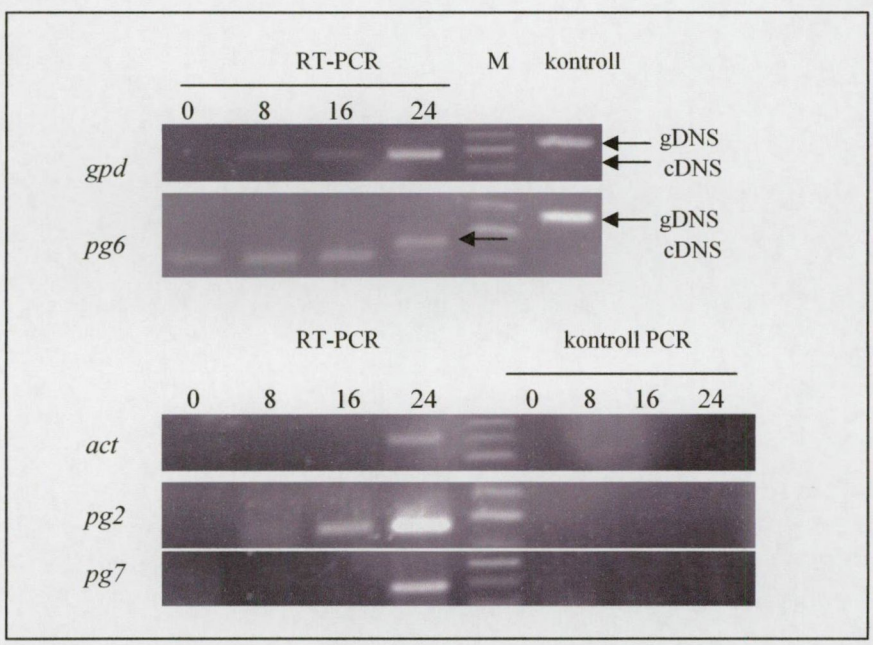
19. ábra: *S. sclerotiorum pg5*, *pg6* és *pg7* génjeinek expressziós vizsgálata az idő függvényében sárgarépa infekciója során

Kísérleteink során mindvégig szigorúan azonos feltételeket alkalmaztunk (pl.: azonos összRNS mennyiség minden reakcióban, megegyező cikluszám a poligalakturonázok esetében, megegyező koncentrációjú gél alkalmazása az amplifikátumok analízise során, azonos koncentrációjú etidium-bromid alkalmazása a gél festése során, azonos ideig zajló festés, megegyező fotozási paraméterek használata a gélek fényképezése során). Ezért, bár ezen "hagyományos" RT-PCR (ellentétben a "real-time PCR-ral") nem kvantitatív módszer, a fentiekben ismertetett azonos reakció körülmények mellett lehetőség nyílik bizonyos, az egyes gének expressziójának mennyiségével kapcsolatos következtetések levonására. Nevezetesen megállapítható, hogy a három vizsgált gén közül az adott kísérleti rendszerben (répa karógyökerének fertőzése) a *pg5* expressziója a leggyengébb, valamint a *pg7* gén 24 és 48 óránál tapasztalt expressziója a legintenzívebb.

Cotton és mtsi. (2002) Northern-blot technikát alkalmazva megállapították, hogy *S. sclerotiorum pg2* génje napraforgó fertőzése során már az infekció nagyon korai szakaszában (16 órával a fertőzést követően) expresszálódik. A kísérlet során kapott eredmény érdekessége, hogy a *pg2* gén 16 óránál tapasztalt expressziója jóval erősebb volt, mint a belső, metabolikus standarként alkalmazott *gpd* géné. Mindezen megfigyelések ismeretében kíváncsiak voltunk, hogy az egyes *S. sclerotiorum* poligalakturonázok (*pg2*, *pg5*, *pg6*, *pg7*) milyen expressziót mutatnak répa infekciójának kezdeti szakaszában (0-24 óra).

A molekuláris markerként alkalmazott aktin csupán 24 órával a fertőzést követően volt detektálható (**20. ábra**). A kísérlet során ebben az esetben is 33 ciklust

használtunk, hogy összehasonlítható legyen a fenntiekben ismertetett (0-96 óra) kísérlettel. Napraforgó fertőzése során végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk (lásd a **4. 2. 3. "*gpd*, mint molekuláris marker *Sclerotinia sclerotiorum* infekció során"** c. fejezetet), hogy a *gpd* gén erősebb expressziót mutat, mint az aktin. Az adott kísérleti rendszerben, a fertőzés kezdetén, amikor még szabad szemmel nem is látható a gomba okozta fertőzés a növényen, fontosnak tartottuk a *gpd* gén expressziós vizsgálatát is, hisz plusz információkkal szolgálhat a gomba metabolikus állapotáról. Igazolást nyert a napraforgóval végzett analízis során kapott eredmény répa fertőzése során is, hisz ellentétben az aktin génnel, a *gpd* gén (ha nagyon gyengén is) de már 8 órával az infekció kezdetét követően detektálható volt. A fertőzés kezdeti szakaszában a *pg6* és *pg7* gén 24 óránál mutatott expressziót, míg a *pg5* gén nem volt detektálható. Napraforgó fertőzése során tapasztaltakkal teljes összhangban (Cotton és mtsi. 2002) a *pg2* gén répa infekciója során is már rendkívül hamar erőteljes transzkripciót mutat (8 óra után), mely ebben az esetben is erőteljesebb, mint a *gpd* gén expressziója.



20. ábra: Sárgarépa infekció kezdeti szakasza (0-24 óra) során detektált poligalakturonáz expresszió *S. sclerotiorum* okozta fertőzés során

Az idő függvényében végzett *in planta* expressziós vizsgálatokat összegezve a következőket mondhatjuk el: mind a négy vizsgált gén detektálható volt sárgarépa karógyökerének fertőzése során (*pg2*, *pg5*, *pg6*, *pg7*). A vizsgált poligalakturonáz gének szakaszos kifejeződést mutattak, hisz a *pg2* gén a fertőzés rendkívül korai

szakaszában detektálható már (8 óra után), *pg6* és *pg7* gén 24, míg a *pg5* gén csupán 48 órával a fertőzés kezdetét követően volt először észlelhető. RT-PCR technikával kapott eredményekkel összhangban áll répa fertőzése során Northern-blot technikával kapott *pg2* expressziós mintázat, hisz ebben az esetben is igazolódott, hogy ez a gén rendkívül korán (8 órával a fertőzés kezdete után) már detektálható, holott a *gpd* gén még nem.

Jelen kísérletsorozatban végzett vizsgálat után megállapítható, hogy a *pg6* és a *pg7* gén az első észlelést követően (24 óra) a fertőzés teljes hossza alatt kifejeződik, mindazonáltal *pg7* gén a fertőzés kezdeti/középső szakaszában (24-48 óra), míg *pg6* gén az infekció befejező stádiumában (96 óra) mutatott fokozott expressziót. A fertőzésnek csupán a középső/befejező szakaszában (48-72 óra) volt detektálható a *pg5* gén, s elmondható, hogy a vizsgált négy poligalakturonáz közül ez a gén mutatta a leggyengébb expressziót.

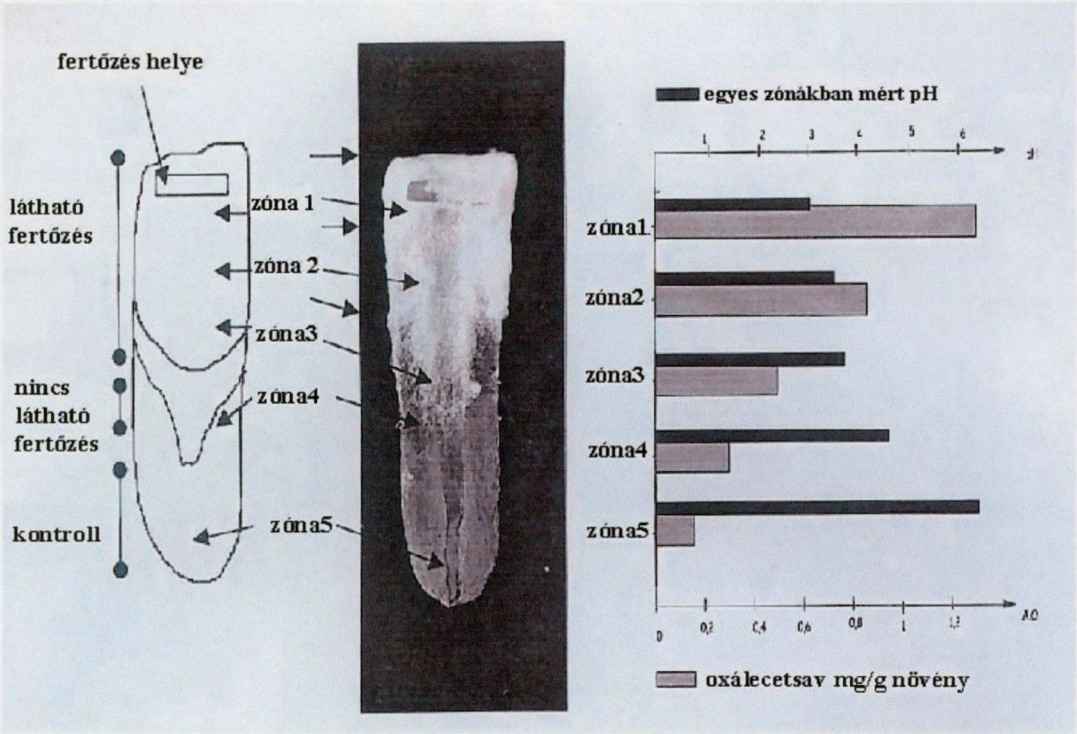
4.4.1.2. " Térben" (zónákban) végzett *in planta* expressziós vizsgálat

Sárgarépa karógyökerének 5 eltérő zónáját különítettük el az egyes régiókhoz kapcsolható fertőzöttségi szint, valamint pH-érték alapján (**21. ábra**). Az idő függvényében végzett vizsgálat során tapasztalt szakaszos expressziót követően fontosnak tartottuk ezen új, eltérő kísérleti rendszerben végzett analízist.

Egyes zónaként definiáltuk a gomba által teljesen kolonizált részt, mely a fertőzés helyét körülölelő zóna. Kettes zóna a répa karógyökerének azon része, mely szintén teljes mértékben fertőzött (ez alapján szemmel nem különíthető el az egyes zónától), ám a növényi szövet állaga tapintásra jóval ellenállóbb, keményebb, mint az az egyes zónában tapasztalható. Mindez természetesen a fertőzés eltérő szintjével magyarázható, hisz az egyes zóna esetében a gomba okozta degradáció teljes, míg a kettes zóna az infekció egy későbbi fázisát képviseli, ahol még a növény viszonylagosan ép. A hármas zónában a fertőzés (a hifák) szemmel már/még látható, ám a gomba mennyisége egyértelműen kevesebb, mint a kettes zóna esetén látható. A négyes zóna az a szűk tartomány, ahol még szemmel nem látható a gomba okozta fertőzés (ám a gomba már megtalálható itt is, ezt igazolja az aktin expressziója), ám a felületi pH-mérővel egyértelműen igazolható az oxálsav okozta pH-csökkenés (pH 4.4 szemben az egészséges növénnyel pH 6.3).

Aktinnal, mint belső standarddal végzett analízis során az egyes (pH 3.1) és kettes (pH 3.5) zónában (fertőzés középső és befejező szakasza) jóval nagyobb

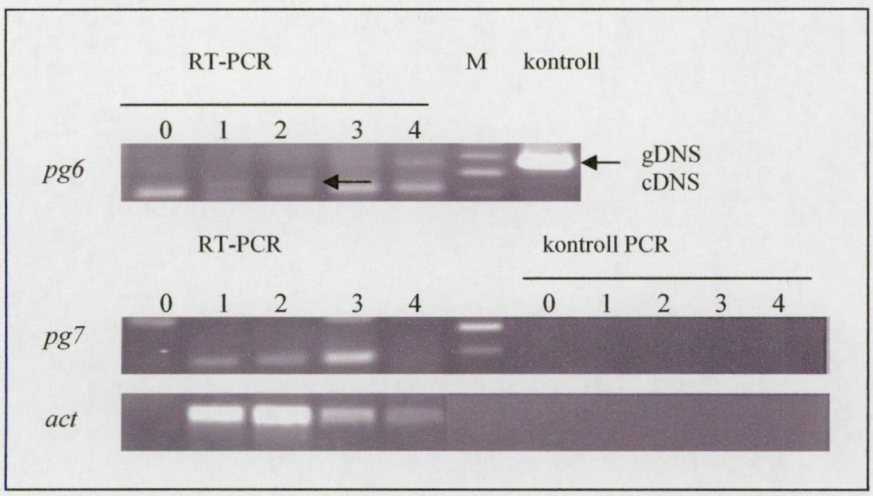
mennyiségű gombát detektáltunk, mint a hármas (pH 3.9) és négyes (pH 4.4) zónákban. Ezen reakciók előtt (hasonlóan az összes eddig ismertetett kísérlethez) fotometriásan és gélen történő futtatással kalibráltuk a reakcióba bevitt összRNS mennyiséget. Az egyes és kettes zóna esetében tapasztalt jóval erősebb jelintenzitás egyértelműen a sokkal előrehaladottabb fertőzöttségi szinttel (több gomba) magyarázható. Az egyes zónákban az aktin expressziójának vizsgálatakor tapasztalt ugrásszerű, nagyságrendi eltérés, mely jóval markánsabb, mint amit az idő függvényében végzett kísérletek során tapasztaltunk, a sajátságos, speciális megközelítési módból fakad, hisz itt szempont volt az egyes zónák eltérő fertőzöttségi szintje.



21. ábra: Zónákra tagolt sárgarépával végzett fertőzési vizsgálat (az egyes zónákhoz pH-érték és oxálecetsav-mennyiség rendelhető)

Összhangban az idő függvényében végzett vizsgálatokkal a *pg6* gén a fertőzés befejező stádiumában, az egyes és kettes zónában mutat expressziót (**22. ábra**). Jelen kísérleti körülmények között a *pg6* gén nem volt detektálható az infekció kezdeti stádiumában, hármas és négyes zónában. A *pg7* gén az egyes, kettes és hármas zónában is detektálható volt. Az egyes reakciótermékek (amplifikátumok)

intenzitását a belső standarként alkalmazott aktinnal összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a fertőzés kezdeti szakaszában (hármas zóna) a legerőteljesebb ezen gén expressziója, mely szintén igazolja a korábbi eredményeket. Az idő függvényében végzett vizsgálatok során megállapítást nyert, hogy a négy vizsgált poligalakturonáz gén közül a *pg5* gén kifejeződése volt a leggyengébb. Vizsgálatunk során ebben a kísérleti rendszerben nem volt detektálható a *pg5* gén. Cotton és mtsi. igazolták, hogy a *pg2* gén a fertőzés legkorábbi stádiumát reprezentáló négyes zónában mutatja a legerősebb expressziót, mely a hármas és kettes zónában fokozatosan csökken, míg az infekció végső szakaszát képviselő egyes zónában már nem detektálható (nem publikált adat, személyes kommunikáció).



22. ábra: *S. sclerotiorum* poligalakturonáz (*pg6*, *pg7*) expresszió a zónákra tagolt sárgarépa infekciója során

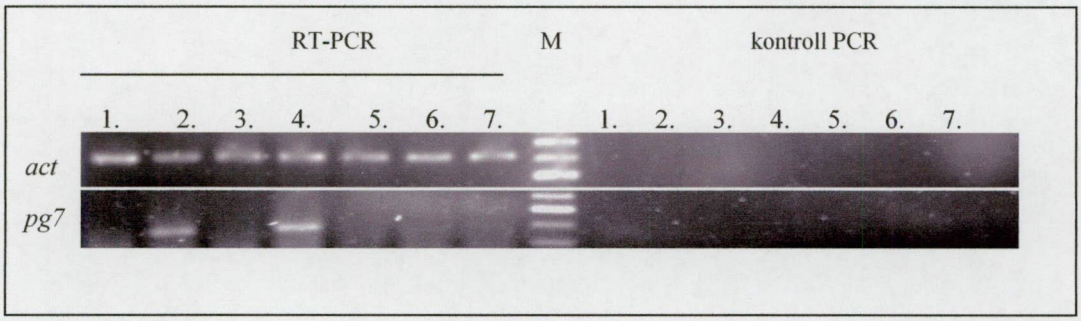
Összegzésképpen elmondható, hogy a zónákra tagolt *in planta* kísérleti rendszerben is igazoltuk *S. sclerotiorum* poligalakturonázainak szakaszos expresszióját. Igazolva az idő függvényében végzett kísérleteket, ebben az esetben is megállapíthatjuk, hogy a *pg2* gén már a fertőzés rendkívül korai szakaszában átíródik majd fokozatosan csökkenő intenzitással expresszálódik. Hasonlóan a korábbi eredményekhez *pg7* gén a fertőzés kezdeti, míg *pg6* gén az infekció befejező szakaszában mutat fokozottabb transzkripciót. Ez a kísérleti rendszer hasznos, új információkkal szolgál hisz különböző fertőzöttségi szinthez biokémiai adatok

(oxálsav mennyiség és pH-érték az adott zónában) valamint molekuláris eredmények (expressziós eredmények) kapcsolhatóak.

4.4.2. *pg5*, *pg6* és *pg7* gének in vitro expressziós vizsgálata

Glükózt, mint egyetlen szénforrást tartalmazó tápfolyadékon 48 órát előnevelt gombát vittünk át hét különböző szénforrással (glükóz, arabinóz, pektin, glicerol, ramnóz, galakturonsav, poligalakturonsav) kiegészített tápfolyadékba. 8 órás rázatást követően került sor a micélium összegyűjtésére és a molekuláris analízisre.

RT-PCR-ral végzett kísérleteink során csupán a *pg7* gén esetében detektáltunk expressziót (pektinen és glükózon; **23. ábra**). *Scpg5* és *Scpg6* gének promoter analízise során a glükóz represszióban szerepet játszó CREA transzkripciós faktor kötőhelyét azonosítottuk, míg *Scpg7* gén promoterében nem találtunk CREA kötőhelyet. Mindez összhangban áll az általunk tett megfigyeléssel, hisz csupán a *pg7* mutatott glükózon expressziót. Mindemellett meglepőnek találjuk kísérletünk eredményét, hisz az egyes *S. sclerotiorum* poligalakturonázoknak megfelelő *B. cinerea* poligalakturonázok -*Bcpg3/Scpg7*, *Bcpg5/Scpg5*, *Bcpg6/Scpg6*, mely gének között figyelemre méltó szekvencia homológia figyelhető meg fehérje szinten, sőt a promoter szekvenciák esetében is (Wubben és mtsi.1999, jelen tanulmány)- erőteljes expressziót mutattak glükózon, pektinen, poligalakturonsavon és galakturonsavon (Wubben és mtsi. 2000). Figyelemreméltó, hogy a növényi sejtfal felépítésében meghatározó szereppel bíró és a poligalakturonázok expressziós vizsgálata során általánosan alkalmazott szénforrások közül (pektin, poligalakturonsav, galakturonsav, arabinóz, ramnóz) egy sem indukálta *Scpg5* és *Scpg6* gének expresszióját, s *Scpg7* gén esetében is csupán pektin esetében detektáltunk expressziót.



23. ábra: *Scpg7* gén expressziójának analízise különböző szénforrásokon (1.-től 8.-ig: előkultúra, pektin, poligalakturonsav, glükóz, arabinóz, galakturonsav, ramnóz)

Az a tény, hogy *in planta* kísérleti rendszerben mindhárom gén detektálható volt nyilvánvaló teszi, hogy az általunk alkalmazott *in vitro* kísérleti körülmények eltérőek a növényben megtalálható feltételektől, s *Scpg5* és *Scpg6* gének transzkripciója számára nem ideális, hisz a vizsgált 7 szénforrás közül egyiken sem detektáltunk expressziót. A vizsgált gének promoter analízise során igazolást nyert, hogy a pH fontos szerepet játszhat ezen gének transzkripciós szabályozásában. Véleményünk szerint az *in vitro* körülmények között kapott (negatív) eredmények nem a kísérlet folyamán alkalmazott pH-értékkel magyarázhatóak. Az előkultúrán nevelt gomba átoltása pH 4.5-ös tápfolyadékra (citromsav/Na_2HPO_4 puffer-rendszer a vizsgált szénforrással kiegészítve) történt, mely érték a 8 órás rázatást követően a következő volt: (galakturonsav-pH 3.7; pektin-pH 3.9; glükóz, ramnóz, arabinóz, poligalakturonsav-pH 4.3). *In planta* kísérleteink igazolták, hogy ebben a pH-tartományban a vizsgált gének kifejeződnek (*pg5* esetében kapott negatív eredmény a zónákra tagolt *in planta* kísérleti rendszerben véleményünk szerint az eltérő kísérlettel/kísérleti rendszerrel magyarázható, hisz egyfelöl az idő függvényében végzett vizsgálatok során detektálható volt –bár rendkívül gyenge expressziót mutatott- másfelöl a *pg6* és *pg7* gén esetében is gyengébb expressziót detektáltunk a "térben" történő expressziós vizsgálat során).

Biokémiai analízis során különböző szénforráson (glükóz, pektin) eltérő számú *S. sclerotiorum* poligalakturonázt detektáltak, illetve pektinen a poligalakturonáz izoformák időben eltérő kifejeződését tapasztalták. A vizsgálat során egyes izoformák glükóz represszáltnak, míg mások konstitutív módon kifejeződőnek bizonyultak (Riou és mtsi. 1992; lásd **1.2. "Poligalakturonázok, pektinázok térszerkezet vizsgálata"** c. fejezetet). *B. cinerea* hat poligalakturonázának *in vitro* és *in planta* vizsgálata során az egyes gének eltérő,

differenciált expressziójáról számoltak be (Wubben és mtsi., 2000; ten Have és mtsi. 2001), mindemellett biokémiai vizsgálatuk során Van der Cruyssen és mtsi. (1999) egy konstitutívan kifejeződő, glükóz által nem represszált endopoligalakturonáz izoformát is leírtak (ezen eredmények igazolják *Bcpg1* és *Bcpg2* génnel kapott molekuláris analízis eredményét, lásd **1.2.2. "*Botrytis cinerea* poligalakturonáz rendszerének vizsgálata"** c. fejezetet). A *S. sclerotiorum* okozta fertőzés rendkívül korai szakaszában detektálható, majd fokozatosan csökkenő expressziót mutató *pg2* gén (Cotton és mtsi. 2002; jelen tanulmány) kódolta PG2 vékonyréteg-kromatográfiás analízise poligalakturonsav bontása során különböző hosszú oligomerek jelenlétét igazolta (Cotton és mtsi. 2002). Az *A. niger* poligalakturonáz családjának 7 tagjával végzett biokémiai és röntgendiffrakciós analízis során igazolást nyert, hogy az egyes enzimek számos szempontból specializáltak (poligalakturonsavval szemben mért specifikus aktivitás, szubsztrát metiláltságával szembeni érzékenység, processzív/nem-processzív hasítási mód, csupán a PGD-re jellemző digalakturonát hasító képesség, lásd **1.2.3. "Poligalakturonázok biokémiai jellemzése, a processzivitás fogalma"** c. fejezetet). Mindezen eredmények ismeretében a poligalakturonáz géncsalád(ok) kódolta enzimek koordinált tevékenységét feltételezik a pektin degradációja során (Cotton és mtsi. 2002; Götesson és mtsi. 2002; Williams és mtsi. 2002). A fertőzés kezdeti szakaszában megjelenő poligalakturonázok tevékenységének köszönhetően oly hosszal, összetétellel bíró oligomerek szabadulhatnak fel a pektin polimerből, melyek képesek lehetnek újabb poligalakturonáz gének specifikus aktivilására. Növényfajonként, adott növény különböző szöveteiben a sejtfal összetétele, biokémiai paraméterek (pH-érték például) markánsan eltérhetnek egymástól, ám ezen összehangolt, rendkívül finoman szabályozott rendszer biztosíthatja a pektin teljes degradációját. A géncsaládot alkotó számos poligalakturonáz specifikus aktivitással, szereppel bírva csupán bizonyos körülmények között jelenne meg, egy flexibilis rendszert biztosítva így a patogénnek. Ezzel összhangban egyes kutatók összefüggést látnak a géncsalád mérete és a gazdaspecificitás között, hisz véleményük szerint minél több tagot számlál egy poligalakturonáz géncsalád, annál több gazdanövényben lehet képes a patogén sikeresen támadni a gazda pektin rendszerét (Esquerré-Tugayé és mtsi. 2000). Ez az elmélet igaz *S. sclerotiorum* és *B. cinerea* esetében hisz mindkét gomba nagy poligalakturonáz géncsaláddal és széles gazdakörrel rendelkezik, valamint *C. lindemuthianum* esetében is, ahol csupán a két

poligalakturonázzal bíró gomba a Fabacaea-ékre specializálódott. Mindazonáltal az elmélet nem igaz a szűk gazdaspektrummal jellemzett *Botrytis* fajokra, amelyek *B. cinerea*-hoz hasonlóan nagy számú poligalakturonázzal rendelkeznek (Wubben és mtsi. 1999). Véleményünk szerint a számos tudományos eredmény igazolja a fentiekben vázolt gondolatmenetet (koordinált pektiniolitikus rendszer), egy patogén gazdaspecificitása azonban (gazdakör nagysága) nem magyarázható csupán a poligalakturonáz géncsalád tevékenységével, hisz számos esetben igazolódott, hogy különböző gombákban eltérő jelentőséggel bírnak a poligalaktruonázok a patogenecitásban. *C. carbonum* mindkét poligalakturonáz génjének inaktiválása nem befolyásolta a gomba betegítő képességét (Scott-Craig és mtsi. 1998, lásd **1.2.1. "Gomba poligalakturonázok molekuláris vizsgálata"** c. fejezetet), mely nyilvánvalóvá teszi, hogy ebben az esetben teljes más tényezőkkel magyarázható a gomba infekciós képessége. Mindemellett az is ismert tény, hogy egy növény egyeden belül is eltérő lehet a pektin összetétele, illetve mennyisége. A fűfélék, cereáliák fiatal ováriumát támadó *Claviceps purpurea* két endopoligalakturonáza számára mintegy "irányjelzőként" szolgál a termő pektin tartalma (Oeser és mtsi. 2002). Ebben az esetben tehát nem a gazdakör nagyságában, hanem az adott szerv, szövet pektin rendszerében, annak összetételében, szerkezetében keresendő a poligalakturonázok szerepe. Mindazonáltal a poligalakturonázok patogenecitásban betöltött fontos szerepét igazolják a poligalakturonáz-inhibitor proteinek (PGIPs), amely napjainkban egy rendkívül intenzíven kutatott területe a gazda-patogén kölcsönhatásnak (lásd **1.2.4. "Poligalakturonáz inhibitor proteinek (PGIPs)"** c. fejezetet).

***S. sclerotiorum* poligalakturonáz rendszeréhez kapcsolódó kísérleteinket összegezve elmondható, hogy céljainknak, elvárásainknak megfelelően izoláltuk a géncsalád két újabb tagját: a *pg6* és a *pg7* géneket. *In planta* végzett funkcionális analízisünk (melyet kiterjesztettünk két korábban izolált poligalakturonáz génre, a *pg2* és a *pg5* génekre) igazolta mind a négy vizsgált gén expresszióját a fertőzés során. Összhangban a korábban végzett biokémia vizsgálatok eredményeivel az egyes gének szakaszos (időben és térben eltérő) expresszióval jellemezhetők, és *S. sclerotiorum* esetében is egy összehangolt, koordinált pektinolitikus enzimrendszert feltételez. Az általunk kapott kísérleti eredmények egy rendkívül komplex génregulációt sugallnak, amelyben feltételezhetően központi szereppel bír az adott reakcióközeg**

pH-értéke valamint a különböző hosszú és összetételű pektin degradációs termékek. Feltételezésünk szerint a fertőzés nagyon korai szakaszában megjelenő PG2 endopoligalakturonáz (*pg1*, *pg2* és *pg3* gének a rendkívül nagyfokú szekvencia homológia miatt nem különíthetőek el egymástól az expressziós vizsgálatok során, így ezen vizsgálatok során a *pg2* megjelölés alatt e három gén együttesen értendő) képezte különböző hosszú oligomerek képesek lehetnek a poligalakturonáz géncsalád újabb tagjainak specifikus indukciójára.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Sclerotinia sclerotiorum egy széles gazdakörrel bíró, nekrotróf fitopatogén gomba. A gazdanövény fertőzése során számos sejtfaldegradáló enzimet termel, melyek lebontva a növényi szöveteket tápanyagot szolgáltatnak a gomba növekedéséhez. A poligalakturonázok a magasabbrendű növények sejtfalának felépítésében meghatározó szereppel bíró pektin lebontásában játszanak szerepet. Biokémiai analízisek igazolták, hogy pektinen, mint egyedüli szénforráson növekvő gomba számos exo- és endopoligalakturonázt termel. *S. sclerotiorum* négy endopoligalakturonáz génje (*pg1*, *pg2*, *pg3*, *pg5*) került klónozásra. A gomba által szekretált oxálecetsav jelentősen módosítja a fertőzött növényi szövet pH értékét, megfelelő közeget biztosítva így a sejtfaldegradáló enzimek müködéséhez.

Céljaink a következőek voltak:

- Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) gén izolálása *S. sclerotiorum* génkönyvtárából.
- A *gpd* gén expressziójának vizsgálata.
- A *gpd* gén molekuláris markerként való felhasználása gomba-növény rendszerben (alkalmazhatóság vizsgálata).
- *S. sclerotiorum* poligalakturonáz-család két újabb tagjának izolálása génkönyvtárból (*pg6* és *pg7* gének) és *in vitro* expressziójuk vizsgálata.
- *S. sclerotiorum* poligalakturonáz gének (*pg2*, *5*, *6*, *7*) expressziójának *in planta* analízise.

Eredményeink:

S. sclerotiorum glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) génjének klónozása és jellemzése

A *gpd* gén *S. sclerotiorum* génkönyvtárából (EMBL3 fág) került izolálásra. A szubklónozott fragment szekvenciájának analízise 1133 bp-nyi nyitott olvasási keret és 735 bp-nyi promoter jelenlétét igazolta. A nyitott olvasási keretet két intron szakítja meg. Az intronok határoló szekvenciái (5'-GT és 3'-PyAG) megegyeznek a

fonalas gombáknál leírt konszenzus szekvenciákkal. A *gpd* gén 5' szekvenciájának analízise során számos tipikus promoter elem került azonosításra.

S. sclerotiorum gpd génje egy 338 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek feltételezett molekulatömege 36.8 kDa. Más gomba GPD szekvenciákhoz hasonlítva a fehérjék között nagy homológia detektálható. *S. sclerotiorum* GPD-jének esetében a 61 lehetséges kodonból csupán 44 kerül felhasználásra, mely jellemző az erős expressziót mutató génekre. Southern-blot analízis igazolta, hogy *S. sclerotiorum* egyetlen *gpd* génnel rendelkezik.

A *gpd* gén expressziójának *in vitro* analízise

Glükózt tartalmazó előkultúrában nevelt gombát egyedüli szénforrást tartalmazó tápfolyadékra vittük át (glükóz, pektin, arabinóz, ramnóz). Northern-blot analízis igazolta, hogy a *S. sclerotiorum gpd* génje nem konstitutív módon fejeződik ki.

A *gpd* gén, mint molekuláris marker *S. sclerotiorum* infekció során

Négy vizsgált növény (napraforgó, bab, répa, cikória) fertőzése során a *S. sclerotiorum gpd* génje erős expressziót mutatott. Northern-blot analízis mind a négy esetben hasonló expressziós profilt igazolt. A *gpd* hibridizációs jel erőssége a fertőzés előrehaladtával fokozatosan nőtt, majd akkor ért el egy maximumot amikor a gomba teljes mértékben kolonizálta a gazdanövényt. Ezt követően fokozatosan csökkent a hibridizációs jel intenzitása.

A gomba-növény kapcsolatban az aktin (*act*) gyakran használt molekuláris marker a gomba növekedésének nyomon követésére. Napraforgó fertőzése során kapott *gpd* és *act* expressziós mintázat összehasonlítását végeztük el. Az aktin gén gyenge expressziója nem tette lehetővé Northern-blot alkalmazását, a vizsgálathoz RT-PCR módszert használtunk. Mindkét gén esetében hasonló expressziós mintázatot detektáltunk.

Eredményeink igazolták, hogy a *S. sclerotiorum gpd* génje -annak ellenére, hogy *in vitro* körülmények között regulált módon fejeződött ki- eredményesen és jól alkalmazható a gazdanövény fertőzése során, mint belső molekuláris marker a gomba növekedésének, metabolikus állapotának nyomon követésére. Az *in vitro* expressziós

vizsgálatok igazolták, hogy a *gpd* egy erősen kifejeződő gén, így promoter szekvenciája felhasználható transzformációs vektorok kialakítására.

Sclerotinia sclerotiorum két új endopoligalakturonáz (*pg6* és *pg7*) génjének klónozása és jellemzése

A *pg6* és *pg7* gén *S. sclerotiorum* génkönyvtárából (EMBL3 fág) került izolálásra, melyhez *Botrytis cinerea* megfelelő génjeiből PCR-ral amplifikált specifikus próbákat használtunk. A szubklónozott fragment szekvenciájának analízise 1110 bp-nyi kódoló, 607 bp-nyi promoter és 270 bp-nyi terminátor szekvenciát igazolt *pg6* gén esetében, míg 1179 bp-nyi kódoló, 549 bp-nyi promoter és 224 bp-nyi terminátor szekvenciát *pg7* gén esetében. A *pg6* génben két, míg *pg7* génben egy intront azonosítottunk. Mindkét gén promoterében számos transzkripciós faktor kötésében részt vehető specifikus szekvenciák jelenlétét igazoltuk. Mindkét fehérje esetében tipikus poligalakturonáz motívumokat azonosítottunk.

S. sclerotiorum endopoligalakturonázainak funkcionális analízise

Glükózt tartalmazó előkultúrában nevelt gombát különböző, egyedüli szénforrást tartalmazó tápfolyadékra vittük át. RT-PCR módszert használtunk a *pg6* és *pg7* gén *in vitro* expressziójának jellemzésére. Csupán a *pg7* gén esetében detektáltunk expressziót (pektin és glükóz jelenlétében).

In planta expressziós (répa fertőzése) vizsgálat során négy *S. sclerotiorum* endopoligalakturonáz transzkripcióját vizsgáltuk (*pg2* és *pg5* korábban került klónozásra, míg *pg6* és *pg7* jelen munka során). Idő függvényében (0-96 óra) valamint zónákban (répa karógyökerének 5 zónáját különítettük el, ahol az egyes régiókhoz eltérő fertőzöttségi szint és pH-érték kapcsolható) végeztünk vizsgálatokat.

Vizsgálatunk során igazolást nyert, hogy mind a négy poligalakturonáz expresszálódott. A vizsgált gének expressziója mind időben, mind a zónákkal végzett kísérletek során szakaszos volt.

Feltételezésünk szerint az egyes endopoligalakturonázok által képzett különböző hosszúságú oligomerek képesek lehetnek a poligalakturonáz géncsalád újabb tagjainak specifikus indukciójára. Ez az elmélet magyarázatul szolgál az *in vitro*

vizsgálat során kapott eredményekre, ahol az alkalmazott kísérleti körülmények eltérőek a növényben megtalálható feltételektől. Valószínűleg a pH is központi szerepet játszik a endopoligalakturonáz gének expressziójának szabályozásában.

6. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ (SUMMARY IN ENGLISH)

Sclerotinia sclerotiorum is a plant pathogenic ascomycete fungus that attacks a wide range of host species. Biochemical analyses have shown that during the interaction with its host, *Sclerotinia sclerotiorum* secretes a complete set of cell wall-degrading enzymes (proteases, pectinases, cellulases, hemicellulases) that macerate the host tissues and provide nutrients for mycelial growth. Among the wide array of secreted cell wall degrading enzymes, polygalacturonases (PGs) are involved in the degradation of pectins, the structural polysaccharides found in the middle lamella and the pimary cell wall of higher plants. During growth on pectic polymers, several endo- and exo-enzymes are sequentially secreted. Molecular genetics has allowed the characterization of several endoPG genes (*pg1*, *pg2*, *pg3*, *pg5*). During the infection *Sclerotinia sclerotiorum* secretes oxalic acid in infected tissues which progressively shifts the pH of the plant apoplasm to acidic values provides an ideal condition for the cell wall-degrading enzymes.

The aims of this study were:

- To clone the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) gene of *Sclerotinia sclerotiorum*.
- To characterize the *gpd* gene at sequence level (molecular organisation, codon usage, promoter sequence) and its expression.
- To use the the *gpd* gene as a molecular marker during plant pathogenesis.
- To clone two new polygalacturonases (*pg6* and *pg7*) of *Sclerotinia sclerotiorum* and characterize them at sequence level.
- To characterize the expression of the polygalacturonase genes of *Sclerotinia sclerotiorum*.

Our new scientific results:

Cloning and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) gene of *Sclerotinia sclerotiorum*

The *gpd* gene of *Sclerotinia sclerotiorum* was cloned from the genomic library. Analysis of the fragment subcloned revealed an ORF of 1133 bp and a promoter of 735 bp. The ORF contained two putative introns with conventional splice sites

(5'-GT and 3'-PyAG). Analysis of the promoter sequence demonstrated the presence of several elements that could act as signals required for transcription initiation and regulation.

The genomic DNA encodes a protein containing 338 amino acids, with a molecular weight of 36.3 kDa. Alignment of the amino acid sequence with those of other ascomycetes indicates extensive homology throughout the GPD proteins. Only 44 of the 61 possible sense codons are used. Generally, the highly expressed genes show more marked codon bias than genes expressed at a low level.

On Southern-blot analysis, *Sclerotinia sclerotiorum* was found to possess the *gpd* gene in a unique copy.

Expression of *gpd* during *in vitro* growth of the fungus

During a shift experiment, *Sclerotinia sclerotiorum* was transferred from a glucose culture to fresh media containing different carbon sources (glucose, pectin, arabinose, rhamnose) Northern-blot analysis revealed that the *gpd* was differentially expressed.

These results prove that the *gpd* gene in *Sclerotinia sclerotiorum* is not a constitutively expressed gene (a main housekeeping gene generally is considered as a constitutively expressed gene).

***gpd* as a molecular marker during plant pathogenesis**

The *gpd* gene was highly expressed during the pathogenesis of four different plants. Northern analysis revealed similar expression profiles. The intensity of the *gpd* hybridization signals increased and reached a maximum when the plant tissues were completely invaded by the fungus.

As actin is frequently used as a marker of fungal growth during plant-fungus interactions, we compared the expression profiles obtained with *gpd* and actin during sunflower pathogenesis. Since the level of expression did not allow detection of the actin transcript by Northern-blot, the analysis was performed by RT-PCR. The analysis disclosed similar profiles for the two genes

The results indicate that, even if *gpd* is not a constitutively expressed gene, its profile during pathogenesis reflects the amount of fungus during the interaction of *S. sclerotiorum* with its plant host. Our results prove that *gpd* can be used as a molecular

(internal) marker during plant infection in order to estimate the progress of the infection and to quantify the fungal gene expression in *planta* in relation to the fungal biomass. It was confirmed that, in certain *in vitro* conditions *gpd* is a strongly expressed gene, and its promoter sequence can be used for plasmid construction for transformation.

Cloning and characterization of the endopolygalacturonases (*pg6* and *pg7*) gene of *Sclerotinia sclerotiorum*

The *pg6* and *pg7* genes were obtained by PCR amplification of *Botrytis cinerea* DNA with primers derived from the published sequences of *Bcpg3* and *Bcpg6*. Fragments of 312 and 684 bp were amplified for *Bcpg6* and *Bcpg7*, respectively. They were then sequenced and used to screen the *S. sclerotiorum* EMBL3 genomic library.

After subcloning the sequence analysis identified 1110 bp coding sequence, 607 bp promoter and 270 bp terminator sequences for the *pg6* gene, and 1179 bp coding sequence, 549 bp promoter and 224 bp terminator sequences for the *pg7* gene. We identified 2 introns in the *pg6* and 1 intron in the *pg7* gene with the typical fungal intron sequences. Analysis of the protein sequences revealed the typical polygalacturonase motifs. Promoter sequence analysis confirmed the presence of several motifs required for the binding of transcription factors.

Functional analysis of endopolygalacturonases of *Sclerotinia sclerotiorum*

During a shift experiment, the fungus was transferred from a glucose culture to fresh media containing different carbon sources. We used a RT-PCR method (a more sensitive molecular method than Northern-blot analysis) in order to characterize the *in vitro* expression of the *pg6* and *pg7* genes. During our *in vitro* analysis we detected only the *pg7* expression (in the presence of pectin and glucose).

In the course of the infection of carrot we examined the expressions and the roles of the four known endopolygalacturonases of *Sclerotinia sclerotiorum* (*pg 2* and *pg 5* were cloned earlier and *pg 6* and *pg7* were cloned during this work). The expressions of the endopolygalacturonase genes were determined in time (0-96 h) and "in space" (five adjacent zones of carrot tissue) were sampled, each reflecting a different

Sclerotinia infection and a different pH as a result of the oxalic acid production of *Sclerotinia sclerotiorum* (pH range 3.1-6.3).

Our results revealed that *in planta* all the endopolygalacturonases (*pg2*, *pg5*, *pg6* and *pg7*) were expressed. The expression of these genes appears to be sequential in time. The sequential expression was confirmed spatially too.

We hypothesize that the oligogalacturonides generated by the individual enzymes may serve as substrates for the other endopolygalacturonase(s), like a cascade. This hypothesis can explain the results we obtained *in vitro*, when we could not find ideal (specific vegetal) conditions to activate the expressions of *pg6* and *pg7*. The pH probably plays an essential role in the regulation of endopolygalacturonases, as indicated in our spatial experiment.

7. IDÉZETT IRODALOM

- Ács K, Kasza Zs, Lukács Gy, Schwab H, Vágvölgyi Cs (2002) – Cloning and sequence analysis of *Mucor circinelloides* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene; Acta Microb. et Immun. Hung. 49: 305-312.
- Adachi K, Hamer JE (1998) - Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*; Plant Cell 10:1361-1373
- Andrianopoulos A, Timberlake WE (1994) - The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. Mol Cell Biol.; 14(4):2503-15
- Aguilar G, Huitron C (1987) – Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp by galacturonic acid and glucose addition; Enzyme Microb. Technol. 9: 690-696
- Apel PC, Panaccione DG, Holden FR, Walton JD (1993) – Cloning and targeted gene disruption of *XYL1*, a β 1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*; Mol. Plant-Microbe Interaction 6: 467-473
- Armand S, Wagemaker MJM, Sánchez-Torres P, Kester HCM, van Santen Y, Dijkstra BW, Visser J, Benen JAE (2000) - The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis; J. Biol. Chem. 275: 691 - 696
- Azam M, Kesarwani M, Chakraborty S, Natarajan K, Datta A (2002) Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the oxalate decarboxylase gene from *Flammulina velutipes*; Biochem. J. 367 (Pt1) 67-75
- Balhadere PV, Talbot NJ (2001) - *PDE1* encodes a P-Type ATPase involved in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*; Plant Cell 2001 13: 1987-2004
- Ball AM, Ashby AM, Daniels MJ, Ingram DS, Johnstone K (1991) – Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape; Physiol. Mol. Plant Pathology 38: 147-161
- Ballance DJ (1991) – Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure; Molecular Industrial Mycology 1-29

- Bateman DF, Beer SV (1965) – Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotiorum rolfsii*; Phytopathology 55: 204-211
- Benen JAE, Kester HCM, Visser J (1999) – Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C; Eur. J. Biochem.: 259: 577-585
- Benito EP, ten Have A, van't Klooster JW, van Kahn JAL (1998) – Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*; Eur. J. of Plant Pathology 104: 207-220.
- Bennetzen JL, Hall BD (1982) – Codon selection in yeast; J. Biol. Chem. 135: 601-604
- Boland GJ, Hall R (1994) – Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*; Can. J. Plant Pathology 16: 93-100
- Boland GJ, Mould MJR, Robb J (1993) – Ultrastructure of a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* containing double stranded RNA; Physiological and Molecular Plant Pathology 43: 21 – 32.
- Bonnen AM, Hammerschmidt R (1989) – Role of cutinolytic enzymes in infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*; Physiol. Mol. Plant Pathology 35: 475-481
- Boucherie H, Bataille N, Fitch IT, Perrot M, Tuite MF (1995) - Differential synthesis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides in stressed yeast cells; FEMS Microbiol. Lett. 125:127-133
- Bourett TM and Howard RJ (1992) – Actin in penetration pegs of the fungal rice blast pathogen, *Magnaporthe grisea*; Protoplasma 168: 20-26
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C (1994) – Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance; The Plant Cell 6 (12): 1703-1712
- Bussink HJD, Brouwer KB, de Graaff LH, Kester HCM, Visser J (1991) - Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*; Curr. Genet. 20:301-307
- Bussink HJD, Buxton FP, Fraaye BA, de Graaff LH, Visser J (1992) - The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes; Eur. J. Biochem. 208: 83-90
- Bussink HJD, Kester HCM, Visser J (1990) - Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonaseII of *Aspergillus niger*; FEBS Lett. 273:127-130

- Bürglin TR (1991) - The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif; Cell 66: 11-12
- Byrde RJW (1979) – Role of polysaccharide-degrading enzymes in microbial pathogenicity. In Berkeley RCW, Gooday GW, Ellwood DC (eds) Microbial polysaccharides and polysaccharases. London: Acaemic Press 417-436
- Bywater J (1959) – Infection of peas by *Fusarium solani* var. Martii forma 2 and the spread of the pathogen; Trans. Brit. Mycol. Soc. 42: 201-212
- Campos T, Roselló J, Hermosa MR, Rubio B, Grondona I, Monte E (2001) - Biological control of fungal and bacterial plant pathogens; IOBC wprs Bulletin vol.24: 113 - 116
- Caprari C, Richter A, Bergmann C, Cicero SL, Salvi G, Cervone F, De Lorenzo G (1993) – Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*; Mycol. Res. 97: 497-505
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) – Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth; Plant J. 3: 1-30
- Catty P, de Kerchove d'Exaerde A, Goffeau A (1997) - The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases; FEBS Lett. 409: 325-332
- Cavete JS (1992) – Function of cutinolytic enzymes in the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea* Ph.D. Dissertation – University of Utrecht, The Netherlands: 75-84
- Cazale AC, Droillard MJ, Wilson C, Heberle-Bors E, Barbier-Brygoo H, Lauriere C (1999) - MAP kinase activation by hypoosmotic stress of tobacco cell suspensions: towards the oxidative burst response?; Plant J 19(3): 297-307
- Centis S, Dumas B, Fournier J, Marolda M, Esquerré-Tugayé MT (1996) – Isolation and sequence analysis of *Clpg1*, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*; Gene 170: 125-129
- Cervone F, Hahn MG, Lorenzo G, de Darvill A, Albersheim P (1989) Host-pathogen interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses; Plant Physiol. 90: 542-548
- Cessna SG, Sears VE, Dickman MB, Low PS (2000) – Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant; Plant Cell 12: 2191-2199

- Chandra S, Heinstein PF, Low PS (1996) - Activation of phospholipase A by plant defense elicitors; Plant Physiology; 110: 979 - 986
- Chen CY, Ingram MF, Rosal PH, Graham TR (1999) - Role for Drs2p, a P-Type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function; J. Cell Biol. 147: 1223-1236
- Chumley FG, Valent B (1990) – Genetic analysis of melanin-deficient, non-pathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*; Mol. Plant-Microbe Interact. 3:135-43
- Christiansen SK, Justesen AF, Giese H (1997) - Disparate sequence characteristics of the *Erysiphe graminis* f.sp. hordei glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene; Curr. Genetics 31: 525-29
- Choi GH, Nuss DL (1990) - Nucleotide sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Cryphonectria parasitica*; Nucleic Acids Res. 18: 5566
- Cook BJ, Clay RP, Bergmann CW, Albersheim P, Darwill AG (1999) – Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins; Mol. Plant-Microbe Interaction 12: 703-711
- Cooper RM (1983) – The mechanisms and significance of enzyme degradation of host cell walls by parasites; In Biochemical Plant Pathology; JA Callow, ed John Wiley & Sons, Chichester UK: 101-135
- Cooper RM (1984) – The role of cell wall-degrading enzymes in infection and damage; In RKS Wood, GJ Jellis, eds Plant Diseases: Infection, Damage and Loss. Blackwell Scientific Publications, Oxford UK: 13-27
- Cotton P, Kasza Zs, Bruel C, Rascle C, Fevre M (2003) Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*; FEMS Microbiology Letters 227 (2): 163-169
- Cotton P, Rascle C, Fevre M (2002) – Characterization of PG2, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast; FEMS Microbiology Letters 213: 239-244
- Cubeta CA, Cody BR, Kohli Y, Kohn LM (1997) - Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in Eastern North Carolina; Phytopathology, 87: 1000 – 1004

- Davis DA, Tsao D, Seo JH, Emery A, Low PS, Heinstein P (1992) – Enhancement of phytoalexin accumulation in cultured plant cell by oxalate; Phytochemistry 31: 1603-1607
- de Bary A (1884) – Vergleichend Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien. (Comparative morphology und biology of the fungi, mycetozoa and bacteria. Translated by Garnsey HEF revised by Balfour IB, the Clarendon Press, Oxford. 1887). 525 pp
- Denison SH (2000) – pH regulation of gene expression in fungi; Fungal Genetics and Biology 29: 61-71
- Denison SH, Orejas M, Arst HNJr (1995) – Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease; J. Biol.Chem. 270: 28519-28522
- de Vries RP, Visser J (2001) - *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides; Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 497-522
- Dezwaan TD, Carroll AM, Valent B, Sweigard JA (1999) - *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues; Plant Cell 11: 2013-2030
- Dickman MB, Patil SS (1986) – Cutinase deficient mutants of *Colletotricum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit; Physiol. Mol. Plant Pathology 28: 235-242
- Dickman MB, Podila GK, Kolattukudy PE (1989) – Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host; Nature 342: 446-448
- Di Pietro A, Roncero MIG (1998) – Cloning, expression and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*; Mol. Plant-Microbe Interaction 11: 91-98
- Dixon KP, Xu JR, Smirnoff N, Talbot NJ (1999) - Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*; Plant Cell 11: 2045-2058
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K(1996) - The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review; Gene 179(1): 45-51
- Drysdale MR, Kolze SE, Kelly JM (1993) – The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*; Gene 103: 241-245
- Edens LE, Bom J, Ledeboer AM, Maat J, Toonen MY, Visser C, Verrips CT (1984) - Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast; Cell 37: 629-633

- Esquerré-Tugayé MT, Boudart G, Dumas B (2000) – Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens; Plant Physiol. Biochem. 38: 157-163
- Expert JM, Digat B (1995) - Biocontrol of *Sclerotinia* wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains; Canadian Journal of Microbiology 41: 685 – 691
- Federici L, Caprari C, Mattei B, Savino C, Di Matteo A, De Lorenzo G, Cervone F, Tsernoglou D (2001) - Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) PNAS, Nov 2001; 98: 13425 - 13430
- Feng B, Marzluf GA (1998) - Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*; Mol. Cell. Biol. 18 (7): 3983-3990
- Feng B, Xiao X, Marzluf GA (1993) - Recognition of specific nucleotide bases and cooperative DNA binding by the trans-acting nitrogen regulatory protein NIT2 of *Neurospora crassa*; Nucleic Acids Research 21 (17): 3989-3996
- Ford EJ, Miller RV, Gray H, Sherwood JE (1995) - Heterokaryon formation and vegetative compatibility in *Sclerotinia sclerotiorum*; Mycological Research 99: 241 – 247
- Fraissinet-Tachet L, Fevre M (1996) – Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*; Current Microbiology 33: 49-53
- Fraissinet-Tachet L, Reymond-Cotton P, Fevre M (1995) – Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*; Curr. Genet. (1995) 29: 96-99
- Fritscher C, Messner R, Kubicek CP (1990) – Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*; Exp. Mycol. 14: 405-415
- Fu YH, Marzluf GA (1987) - Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*; Mol. Cell. Biol., 7(5): 1691-6
- Fuckel L (1870) – Symbolic mycologicae. Beitrage zur Kenntniss der Rheinischen Pilze. Jahrb. Naussauischen Vercins Naturk. 23-24: 1-459
- Gao S, Choi GH, Shain L, Nuss DL (1996) – Cloning and targeted disruption of *enpg-1* , encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the

chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*; Appl. Environ. Microbiol. 62: 1984-1990

- García-Maceira FI, Di Pietro A, Huertas-González MD, Ruiz-Roldán MC, and Roncero MIG (2001) - Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection; Appl. Envir. Microbiol. 67: 2191 - 2196
- Goidin D, Mamessier A, Staquet M-J, Schmitt D, Berthier-Vergnes O (2001) - Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations; Analytical Biochemistry 295 (1): 17-21.
- Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R (1990) – Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*; Physiol. and Molecular Plant Pathology 37: 179-191
- Götesson A, Marshall JS, Jones DA, Hardham AR (2002) - Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*; Molecular Plant-Microbe Interactions 15 (9): 907-921
- Gulya T, Rashid KY, Masirievic SM (1997) - Sunflower Diseases. Pages 263–379. In Sunflower Technology and Production A. A. Schneiter, ed. Amer. Soc. Agronomy, Madison, WI. USA. Monograph 35
- Gulyás A (1993) - A napraforgó rezisztenciája a fehérpenészes rothadás kórokozójának (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) különböző izolátumaival szemben; Kandidátusi értekezés, Mosonmagyaróvár.
- Gurr SJ, Unkles SE, Kinghorn (1988) – Gene structure in eukaryotic microbes; SGM special publication, vol 23. IRL Press Oxford 93-139
- Haas H, Angermayr K, Stoffler G (1997) - Molecular analysis of a *Penicillium chrysogenum* GATA factor encoding gene (*sreP*) exhibiting significant homology to the *Ustilago maydis* urbs1 gene; Gene 184 (1): 33-7
- Haas H, Bauer B, Redl B, Stoffler G, Marzluf GA (1995) - Molecular cloning and analysis of *nre*, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*; Curr. Genet. 27 (2): 150-158
- Harmsen MC, Schuren FHJ, Moukha SM, Van Zuilen CM, Punt PJ, Wessels JHG (1992) – Sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes

from the basidiomycetes *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Agaricus bisporus*; Curr. Genetics 22 (6): 447-454

- Heinen W (1960) – Über den enzymatischen Cutinabbau I. Mitteilung: Nachweis eines Cutinase-Systems; Acta Bot. Neerl. 9: 167-190
- Heath MC, Valent B, Howard RJ, Chumley FG (1990) – Correlations between cytologically detected plant-fungal interactions and pathogenicity of *Magnaporthe grisea* toward weeping lovegrass; Phytopathology 80: 1382-86
- Henrissat B, Claeyssens M, Tomme P, Lemesle L, Mornon JP (1989) - Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. Gene, 81(1): 83-95
- Herron SR, Benen JAE, Scavetta RD Visser J, Jurnak F (2000) - Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens; PNAS 97: 8762 - 8769
- Hirano T, Sato T, Okawa K, Kanda K, Yaegashi K, Enei H (1999) - Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Lentinus edodes*; Biosci. Biotech. Biochem 63 (7):1223-1227.
- Holland MJ, Holland JP (1978) – Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase; Biochemistry 17: 4900-4907
- Holland JP, Labieniec L, Swimmer C, Holland MJ (1983) - Homologous nucleotide sequences at the 5' termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families. The primary structure of a third yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene; J. Biol. Chem. 258: 5291-9
- Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP (1991) – Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11281-84
- Huang HC, Kosub GC (1989) - A simple method for production of apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*; Plant Protection, 31: 333 – 345
- Huang HC, Kosub GC (1990) - Cyclic occurence of *Sclerotinia* wilt of sunflower in western Canada; Plant Disease, 74: 766 – 770
- Hwang CS, Flaishman MA, Kolattukudy PE (1995) - Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene, Plant Cell, 7: 183 - 193

- Ilmen M, Thrane C, Penttila M (1996) – The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant forms; Mol. Gen. Genet. 251: 451-460
- Isshiki A, Akimitsu K, Yamamoto M, Yamamoto H (2001) – Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*; Mol. Plant-Microbe Interaction 14: 749-757
- Ito Y, Pagano PJ, Tornheim K, Brechter P, Cohen RA (1996) - Oxidative stress increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels in isolated rabbit aorta; Am. J. Physiol. 270 (1 Pt 2): H81-87
- Jeong-Jeong M, Chul Park S, Bin Kwon H, Ok Byun M (2000) – Isolation and characterization of the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Biochem. and Biophy. Research Communications 278: 192-196
- Jungehülsing U, Arntz C, Smit R, Tudzynski P (1994) - The *Claviceps purpurea* glyceraldehyde-3-phosphate dehidrogenase gene: cloning, characterization and use for the improvement of dominant selection system; Curr. Genet. 25: 101-106
- Kawana M, Lee ME, Quertermous EE, Quertermous T (1995) - Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene; Mol. Cell. Biol. 15: 4225-4231
- Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K (1999) - The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants; PNAS 96: 10922 - 10926
- Kita N, Boyd CM, Garrett MR, Jurnak F, Keen NT (1996) - Differential effect of site-directed mutations in *pelC* on pectate lyase activity, plant tissue maceration, and elicitor activity; J. Biol. Chem. 271: 26529 – 26535
- Klement Z , Farkas GL, Lovrekovich L (1964) – Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf; Phytopathology 54: 474-477
- Kohn LM, Stasovski E, Carbone I, Royer J, Anderson JB (1991) - Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*; Phytopathology, 81: 480 – 485
- Kolattukudy PE, Soliday CL, Woloshuk CP, Crawford M (1985) Molecular genetics of filamentous fungi, WE Timberlake, ed (New York: Alan R. Liss, Inc) 421-438
- Kozak M (1981) – Composition and analysis of sequences upstream from the translation start site in eukaryotic mRNAs; Nucl. Acid Res. 12: 857-872

- Köller W, Allan CR, Kolattukudy PE (1982) – Protection of *Pisum sativum* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* by inhibition of cutinase with organophosphorus pesticides; Phytopathology 72: 1425-1430
- Krebs EG, Rafter GW, Junge JM (1953) – Yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. II. Yeast protein 2.; J. Biol. Chem. 200: 479-492
- Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martinez-Rossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davis RW, Arst HN (1990) - The regulatory gene areA mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger; EMBO J. 9: 1355-1364
- Laloux I, Dubois E, Dewerchin M, Jacobs E (1990) - TEC1, a gene involved in the activation of Ty1 and Ty1-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis; Mol. Cell. Biol. 10 (7): 3541-50
- Lamb C, Dixon RA (1997) – The oxidative burst in plant disease resistance; Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 251-275
- Leckie F, Mattei B, Capodicasa C, Hemmings A, Nuss L, Aracri B, de Lorenzo G, Cervone F (1999) – The specificity of polygalactruonase inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed β-strand/β-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability; EMBO J 18: 2352-2363
- Legendre L, Rueter S, Heinstein PF, Low PS (1993) – Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells; Plant Physiol. 102: 233-240
- Leone G, van den Heuvel J (1987) – Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*; Can. J. Micro. 65: 2133-2141
- Li J, Goodwin PH (2002) - Expression of *cgmpg2*, an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, in culture and during infection of *Malva pusilla*; Journal Phytopathology 150 (4-5): 213-219
- Libert MA (1837) – Plante Crytogamicae arduennae (Exsiccati) No. 326.
- Lietzke SE, Yoder MD, Keen NT, Jurnak F (1994) - The three-dimensional structure of pectate lyase E, a plant virulence factor from *Erwinia chrysanthemi*; Plant Physiology, Nov 1994; 106: 849 – 862
- Liles WC, Thomsen AR, O'Mahony DS, Klebanoff SJ (2001) - Stimulation of human neutrophils and monocytes by staphylococcal phenol-soluble modulin; J. Leukoc. Biol., 70(1): 96-102

- Litkei J (1989) - Characteristics of isolates of *Sporidesmium sclerotivorum*; Acta-Phytopathologica of Entomologica-Hungarica 24:3-4, 311-315
- Lyngholm K (1993) – Mutants for enzyme production in *Cochliobolus heterostrophus*; Masters thesis, Iowa State University, Ames
- Ma B, Mayfield MB, Gold MH (2001) - The Green Fluorescent Protein Gene Functions as a Reporter of Gene Expression in *Phanerochaete chrysosporium*; Applied and Environmental Microbiology Vol. 67, No.2 948-955
- Mach RL, Schindler M, Kubicek CP(1994) - Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals; Curr. Genet. 25 (6): 567-570.
- Madhani HD, Styles CA, Fink GR (1997) - MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation; Cell 91 (5): 673-684
- Maiti LB and Kolattukudy PE (1979) – Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase; Science 205: 507-508
- Marciano P, DiLenna P, Magro P (1983) – Oxalic acid, cell wall degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower; Physiol. Plant Pathology 22: 339-345
- Martel MB, Letoublon R, Fevre M (1998) – Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*; FEMS Microbiology Letters 158: 133-138
- Martel MB, Letoublon R, Fevre M (1996) – Purification of endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*: multiplicity of the complex enzyme system; Current Microbiology 33: 243-248
- Martell AE, Smith RD (1977) – Critical stability constants, Vol 3 (Nex York and London: Plenum Press)
- Marzluf GA (1997) - Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi; Microbiol. and Mol. Biol. Reviews 61: 17-32
- Maxwell DP, Lumsden RD (1970) – Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture; Phytopathology 60: 1395-1398
- McBeath JH (1998) - Control of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Trichoderma atroviride* in Alaska; ICPP, 98, Edinburgh, Abstract CD
- McCann MC, Roberts K (1996) Pectins and Pectinases, Edited by Visser J and Voragen, AGJ Elsevier Sciences BV Amsterdam, The Netherlands: 91-107

- Melzer MS, Ikeda SS, Boland GJ (1998) - Interspecific transmission of a hypovirulence associated double stranded RNA from *Sclerotinia sclerotiorum* to *Sclerotinia minor* by hyphal anastomosis; ICPP. 98, Edinburgh, Abstract CD
- Merika M, Orkin SH (1995) - Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF; Mol. Cell. Biol. 15: 2437-2447
- Messner R, Gruber F, Kubicek CP (1988) - Differential regulation of synthesis of multiple forms of specific endoglucanases by *Trichoderma reesei* QM9414; J. Bacteriol., 170(8): 3689-93
- Mesterházy Á (2000) - A rezisztencia nemesítés alapjai és molekuláris vonatkozásai; Egyetemi jegyzet, Szeged
- Milner RJ, Brow MD, Cleveland DW, Shinick TM, Sutcliffe JG (1983) - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase protein and mRNA are both differentially expressed in adult chickens but not chick embryos; Nuc. Acids Res. 11: 3301-3315
- Mineev VB, Durynina EP (1992) - Soil–agrochemical aspects of sunflower resistance to white rot; Agrokhimiya, No. 12: 57 – 67
- Minehart PL, Magasanik B (1991) - Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain; Mol. Cell. Biol. 11 (12):6216-6228
- Moller JV, Juul B, le Maire M (1996) - Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases; Biochim. Biophys. Acta 1286 (1): 1-51
- Movahedi S, Heale JB (1990) – The roles of aspartic protease and endopectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea*; Physiol. Mol. Plant Pathol. 36: 303-324
- Murphy JM, Walton JD (1996) – Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*. cloning and targeted disruption of *ALP1*; Mol. Plant-Microbe Interaction 9: 290-297
- Noyes RD, Hancock JG (1981) – Role of oxalic acid in the sclerotinia wilt of sunflower; Physiol. Plant Pathology 18: 123-132
- Oeser B, Heidrich PM, Müller U, Tudzynski P, Tenberge KB (2002) - Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction; Fungal Genetics and Biology 36 (3): 176-186

- Osiewacz HD, Ridder R (1991) – Genome analysis of imperfect fungi: electrophoretic karyotyping and characterization of the nuclear gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) of *Curvularia lunata*
- Ostling J, Ronne H (1998) - Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose; Eur. J: Biochem. 252: 162-168
- Pages S, Heijne WHM, Kester HCM, Visser J, Benen JAE (2000) - Subsite mapping of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II by site-directed mutagenesis; J. Biol. Chem. 275 (38): 29348-29353
- Pages S, Kester HCM, Visser J, Benen JAE (2001) – Changing a single amino acid residue switches processive and non-processive behavior of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase I and II; J. Biol. Chem. 276 (36): 33652-33656
- Parenicova L, Benen JAE, Kester HCM, Visser J (1998) - *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*; Eur. J. Biochem. 251: 72-80
- Parenicova L, Benen JAE, Kester HCM, Visser J (2000A) – *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*; Biochem. J. 345 Pt 3: 637-44
- Parenicova L, Kester HCM, Benen JAE, Visser J (2000B) – Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties; FEBS Lett. 467: 333-336
- Petersen TN, Kauppinen S, Larsen S (1997) - The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel beta helix. Structure, 5(4): 533-44
- Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K., and Jenkins, J. (1998) - Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* J. Biol. Chem. 273: 24660-24664
- Pitkin JW, Panaccione DG, Walton JD (1996) - A putative cyclic peptide efflux pump encoded by the TOXA gene of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*; Microbiology, 142: 1557 - 1565
- Podila GK, Rogers LM, Kolattukudy PE (1993) – Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*; Plant Physiol. 103: 267-272

- Poussereau N, Creton S, Billon-Grand G, Rascle C, Fevre M (2001A) - Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*; Microbiology 147: 717-726
- Poussereau N, Gente S, Rascle C, Billon-Grand G, Fevre M (2001B) - *aspS* encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis; FEMS Microbiology Letters 194 (1): 27-32
- Punt PJ, Dingemanse MA, Jacobs-Meijjsing BJM, Pouwels PH, Van den Hondel C (1988) – Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*; Gene 69:49-57
- Punt PJ, Dingemanse MA, Kuyvenhoven A, Soede RDM, Pouwels PH, Van den Hondel C (1990) – Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Gene 93:101-109
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, Pouwels PH, Van den Hondel C (1987) – Transformation of *Aspergillus nidulans* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*; Gene 56: 117-124
- Purdy LH (1979) – *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact; Phytopathology 69: 875-880.
- Puyeski M, Ponce-Noyola P, Horwitz BA, Herrera-Estrella A (1997) - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in Trichoderma harzianum is repressed during conidiation and mycoparasitism; Microbiology 143: 3157-3164
- Raeder U, Broda P (1985) – Rapid preparation of DNA filamentous fungi; Lett. Appl. Microbiol. 1:17-20
- Redkar RJ, Herzog RW, Singh NK (1998) - Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter by osmotic signals; Applied and Environm. Microbiol. Vol. 64: 2229-2231
- Reymond-Cotton P, Fraissinet-Tachet L, Fevre M (1996) – Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase *pg1* gene: possible involvment of CREA in glucose catabolite repression; Curr. Genet. 30: 240-245
- Reymond P, Deléage G, Rascle C, Fevre M (1994) – Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*; Gene 146: 233-237
- Ridder R, Osiewacz HD (1992) – Sequence analysis of the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) of *Podospora anserina*: use of

homologous regulatory sequence to improve transformation efficiency; Curr. Genetics 21: 207-213

- Riou C, Fraissinet-Tachet L, Freyssinet G, Fevre M (1992) – Secretion of pectic isoenzymes by *Sclerotinia sclerotiorum*; FEMS Microbiology Letters 91: 231-238
- Riou C, Freyssinet G, Fevre M (1991) – Production of cell-wall degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*; Applied and Environmental Microbiology 57 (5): 1478-1484
- Robyt JF, French D (1967) - Multiple attach hypothesis of alpha-amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae* alpha-amylases; Arch. Biochem. Biophys. 122 (1): 8-16
- Robyt JF, French D (1970) – Multiple attack and polarity of action of porcine pancreatic α-amylase; Arch. Biochem. Biophys. 138 (2): 662-670
- Rogers LM, Flaishman MA, Kolattukudy PE (1994) – Cutinase gene disruption in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* decreases its virulence on pea; Plant Cell 6: 935-945
- Roilides E, Tsaparidou S, Kadiltsoglou I, Sein T, Walsh TJ (1999) - Interleukin-12 enhances antifungal activity of human mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*: implications for a gamma interferon-independent pathway; Infect. Immun., 67: 3047 – 3050
- Rollins JA, Dickman MB (2001) - pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog; Appl. Envir. Microbiol. 67: 75 - 81
- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H, Jones JDG (1999) - Rapid Avr 9- and Cf-9 –dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses; Plant Cell, 11: 273 - 288
- Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Martinez AT (1999) – Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase confirms its ability to oxidize Mn^{2+} and different aromatic substrates; Applied and Environ. Microbiol. 65 (10): 4705-4707
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) – Molecular cloning: laboratory manual (2nd edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Scavetta RD, Herron SR, Hotchkiss AT, Kita N, Keen NT, Benen JAE, Kester HCM, Visser J, Jurnak F (1999) - Structure of a Plant Cell Wall Fragment Complexed to Pectate Lyase C; Plant Cell, 11: 1081 - 1092

- Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H (1994) - The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene; EMBO J. 13: 4382-4389.
- Schweizer A, Rupp S, Taylor BN, Röllinghoff M, Schröppel K (2000) - The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*; Mol. Microbiol. 38 (3) 435-445
- Scott-Craig JS, Cheng Y-Q, Cervone F, De Lorenzo G, Pitkin JW, Walton JD (1998) - Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases; Appl. Envir. Microbiol. 64: 1497-1503
- Screen S, Bailey A, Chamley K, Cooper R, Clarkson J (1997) – Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein; Curr. Genet. 31: 511-518
- Sharrock KR, Labavitch JM (1994) – Polygalacturonase inhibitors of Bartlett pear fruits: differential effects on *Botrytis cinerea* polygalacturonase isoenzymes and influence on products of fungal hydrolysis of pear cell walls and on ethylene induction in cell culture; Physiol. Mol. Plant Pathol. 45: 305-319
- Shaykh M, Soliday CI, Kolattukudy PE (1977) – Proof of the production of cutinase by *Fusarium solani* f. sp. *pisi* during penetration into its host, *Pisum sativum*; Plant Physiol. 60: 170-172
- Shroff RA, Lockington RA, Kelly JM (1996) – Analysis of mutations in the *creA* gene involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*; Can. J. Microbiol. 42: 950-959
- Solis S, Flores ME, Huitron C (1990) – Isolation of endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043; Biotech. Lett. 12: 751-756
- Southern E (1975) – Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis; J. Mol. Biol. 98: 503
- Stahl DJ and Schafer W (1992) – Cutinase is not required for fungal pathogenecity on pea; Plant Cell 4: 621-629
- Stanbrough M, Rowen DW, Magasanik B (1995) - Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9450-9454

- Steinbacher S, Baxa U, Miller S, Weintraub A, Seckler R, Huber R (1996) - Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with *Salmonella* sp. O-antigen receptors; PNAS 93: 10584 - 10588
- Steinbacher S, Miller S, Baxa U, Weintraub A, Seckler R (1997) - Interaction of Salmonella phage P22 with its O-antigen receptor studied by X-ray crystallography; Biol Chem, 378 (3-4): 337-43
- Stewart A, Eade K, Rabeendran N, Ridgway HM (2001) - Mechanisms of biological control of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* – more than just sclerotial parasitism – Biological control of fungal and bacterial plant pathogens IOBC wprs Bulletin vol.24: 1 – 4
- Strauss J, Horvath HK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL, Kubicek CP (1999) – The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans* is regulated at the transcriptional and post- transcriptional level; Mol. Microbiol. 32: 169-178
- Strauss J, Mach RL, Zeilinger S, Marcher G, Stoffler G, Wolschek M, Kubicek CP (1995) – Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*; FEMS Lett. 376: 103-107
- Sweigard JA, Chumley FG, Valent B (1992) – Disruption of *Magnaporthe grisea* cutinase gene; Mol. Gen. Genet. 232 (2): 183-190
- Takashima S, Nakamura A, Iikura H, Masaki H, Uozumi J (1996) – Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from Trichoderma reesei; Biosci. Biotech. Biochem. 60: 173-176
- Talbot NJ, Kershaw MJ, Wakley GE, de Vries OMH, Wessels JGH, Hamer JE (1996) – MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface intercations during infection related development of *Magnaporthe grisea*; The Plant Cell 8 (6):985-999
- ten Have A (2000) – The Botrytis cinerea endoploygalacturonase gene family; PhD Dissertation (No.: 2791) University Wageningen
- ten Have A, Mulder W, Visser J, van Kan JAL (1998) – The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*; Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 1009-1016
- ten Have A, Breuil WO, Wubben JP, Visser J, van Kan JAL (2001) - *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues; Fungal Genetics and Biology 33: 97-105

- Thines E, Weber RWS, Talbot NJ (2000) - MAP kinase and protein kinase A–dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*; Plant Cell 12: 1703-1718
- Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Walton JD (2000) - The *Cochliobolus carbonum SNF1* gene is required for cell wall–degrading enzyme expression and virulence on maize; The Plant Cell 12: 237-247
- Treitel MA, Kuchin S, Carlson M (1998) - Snf1 Protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*; Mol. Cell. Biol.18: 6273-6280
- Tudzynski B, Liu S, Kelly JM (2000) - Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea* creA genes; FEMS Microbiol Lett, 184(1): 9-15
- Turpin P, Ossareh-Nazari B, Dargemont C (1999) – Nuclear transport and transcriptional regulation; FEBS Lett. 452: 82-86
- Van der Cruyssen G, De Meester E, Kamoen O (1994) – Expression of polygalacturonases of *Botrytis cinerea* in vitro and in vivo; Meded Fac Landbouwkd Toegep Biol Wet Univ Gent 59: 895-905
- van Santen Y, Benen JAE, Schröter KH, Kalk KH, Armand S, Visser J, Dijkstra BW (1999) - 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis; J. Biol. Chem. 274: 30474-30480
- Varma A, Kwong-Chung KJ (1999) - Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene [correction of glyceraldehyde-3-phosphate gene] and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogen; Gene 232 (2): 155-163
- Vautard-Mey G, Fevre M (2000) - Mutation of a putative AMPK phosphorylation site abolishes the repressor activity but not the nuclear targeting of the fungal glucose regulator CRE1; Curr. Genet. 37 (5):328-332
- Vautard-Mey G, Cotton P, Fevre M (1999) – Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotina sclerotiorum*, Eur. J. Biochem. 266: 252-259
- Vautard G, Cotton P, Fevre M (1999) - The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*; FEBS Lett. 453 (1-2): 54-58

- Verdoes JC, Wery J, Boekhout T, van Ooyen AJ (1997) - Molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Phaffia rhodozyma*; Yeast 13 (13): 1231-42
- Vitali J, Schick B, Kester HCM, Visser J, Jurnak F (1998) - The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å resolution; Plant Physiology, 116: 69 – 80
- Wakefield EN (1924) – On the names Sclerotinia sclerotiorum (Lib) Massee, and S. libertiana Fuckel; Phytopathology 14: 126-127
- Waksman G, Keon JP, Turner G (1991) Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*; Biochim Biophys Acta 1073(1): 43-8.
- Wang CH, Hseu TH, Huang CM (1988) – Induction of cellulase by cello-oligosaccharides in *Trichoderma koningii* G-39; J. Biotechnol. 9: 47-60
- Watanabe H, Hasumi K, Fukushima Y, Sakai K, Endo A (1993) - Cloning of two isozymes of *Trichoderma koningii* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with different sensitivity to koningic acid; Biochim. et Biophys. Acta 1172 (1-2): 43-48
- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM (1997) - Isolation of the Pichia pastoris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter; Gene 186 (1): 37-44
- Willetts HJ, Bullock S (1992) – Developmental biology of sclerotia; Mycol. Res. 96 (10): 801-816
- Williams HL, Tang Y, Hintz WE (2002) - Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete Chondrostereum purpureum; Fungal Genetics and Biology 36 (1): 71-83
- Wolff AM, Arnau (2002) - Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production; Fungal Genetics and Biology 35 (1): 21-29
- Wubben JP, Mulder W, Ten Have A, van Kan JAL, Visser J (1999) – Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*; Appl. Environ. Microbiol. 65: 1596-1602
- Wubben JP, Ten Have A, van Kan JAL, Visser J (2000) – Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression; Curr. Genet. 37: 152-157

- Yoder MD, Keen NT, Jurnak F (1993) - New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor; Science, 260 (5113): 1503-7
- Zándoki E (2001) - Európai *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary törzsek összehasonlító vizsgálata; Diplomadolgozat, Gödöllő 2001

8. SZERZŐ PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉGE

PUBLIKÁCIÓK

Vastag, M., Papp, T., **Kasza, Zs.**, and Vágvölgyi, Cs. (1998) Differentiation of *Rhizomucor* species by means of carbon source utilization and isoenzyme analysis. - J. Clin. Microbiol. 36, 2153-2156.

Vastag, M., Papp, T., **Kasza, Zs.** and Vágvölgyi, Cs. (2000) Intraspecific variation in two species of *Rhizomucor* assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. - J. Basic Microbiol. 40, 269-277.

Vágvölgyi, Cs., **Kasza, Zs.**, Nyilasi, I., Ács, K., and Papp, T. (2001). Variability of isozyme and RAPD markers among isolates of *Mucor genevensis*. - Acta Biol. Hung. 52, 365-373.

Ács, K., **Kasza, Zs.**, Lukács, Gy., Schwab, H. and Vágvölgyi, Cs. (2002) Cloning and sequence analysis of *Mucor* circinelloides glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. - Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49, 305-312.

Kasza Zs., Cotton P., Bruel C., Rascle C., Fevre M. (2003) Ambient pH contols the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*.- FEMS Microbiology Lettres 227 (2): 163-169

Kasza Zs., Vágvölgyi, Cs., Fevre M, Cotton P. (2003) Molecular characterization and *in planta* detection of *Sclerotinia sclerotiorum* endopolygalacturonase genes - Current Microbiology (accepted)

Kasza Zs., Cotton P. and Fevre M. (2003) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a marker of fungal growth during the interaction of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* with its plant hosts.(in preparation)

POSZTEREK

Vágvölgyi, Cs. Papp, T., **Kasza, Zs** (1998)- IMC6 Jerusalem –Intraspecific variability of *Mucor genevensis* assessed by isoenzyme analysis and random amplification of polymorphic DNA

Ács. K., **Kasza, Zs.**, Vastag, M. and Vágvölgyi, Cs. (2000) Cloning and sequence analysis of *Mucor circinelloides* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. MMT 2000. évi Nagygyûlése, (Meeting of the Hungarian Society for Microbiology) Keszthely, Abstracts.

Ács, K., Vastag, M., **Kasza, Zs.**, and Vágvölgyi, Cs. (2001) Cloning of *Rhizomucor miehei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. MMT 2001. évi Nagygyûlése, Balatonfüred, Abstracts.

Lukács, Gy., Ács, K., Vastag, M., Nyilasi, I., **Kasza, Zs.** and Vágvölgyi, Cs. (2002) Cloning and partial sequence analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methilglutharyl coenzyme A reductase of *Rhizomucor miehei*.(2002) 3 rd Joint Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary. Abstracts.

Vágvölgyi Cs, Vastag, M., **Kasza, Zs.**, Ács, K., (2002) Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Rhizomucor miehei*. IMC7, Oslo, Abstracts

Kasza Zs, Cotton P., Vágvölgyi Cs, Fevre M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a marker of fungal growth during the interaction of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* with its plant hosts (2003) 1st FEMS Congress, Ljubjana (Slovenia)- Abstracts-with this work I won the congress junior attendance grant

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Kevei Ferenc Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetővé tette munkám elkészítését a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológia Tanszékén. Halála mind emberileg, mind tudományos szempontból pótolhatatlan veszteség.
Köszönettel tartozom Dr. Vágvölgyi Csabának, aki témavezetőként pályafutásom szakdolgozó korom óta irányította és tanácsokkal segítette.
Köszönettel tartozom Dr. Varga Jánosnak és Dr. Manczinger Lászlónak is, akikhez mindig fordulhattam kérdéseimmel, problémáimmal.
Köszönetem fejezem ki a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológia Tanszékének összes dolgozójának, akik munkájukkal segítettek dolgozatom elkészítésében.
Hálával tartozom Michel Fevre Professzornak, aki lehetővé tette munkám a lyoni Claude Bernard Egyetem „Biologie Cellulaire Fongique" Tanszékén.
Külön hálával és köszönettel tartozom Dr. Pascale Cottonnak, aki témavezetőként mind emberi, mind szakmai tanácsaival segítette munkám, töretlenül hitt és bízott bennem számos nehézségen és hullámvölgyön átsegítve így.
Köszönettel tartozom Dr. Christophe Bruelnek, aki barátságával, rendkívül hasznos és érdekes szakmai szemléletmódjával segítette munkámat.
Köszönöm Stéphan Rolland és Sebastien Vacher őszinte barátságát, tanácsait, aki nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy sikeres és felejthetetlen éveket töltöttem Lyonban.
Továbbá köszönetem fejezem ki a lyoni tanszék összes munkatársának, akik szeretettel fogadtak, s akik munkám mindig segítették.
Hálámat fejezem ki családom összes tagjának és kedvesemnek, akik határtalan szeretetükkel mindig minden körülmények között mellettem, mögöttem álltak.