

## BEVEZETÉS

*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 géneje (*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 működéséhez.

## CÉLKITŰZÉSEK

- 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.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### *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 transzkripciófaktor 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.

## 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 controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*.- FEMS Microbiology Letters (accepted)

**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 Nagygyűlése, (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 Nagygyűlése, 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-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Rhizomucor miehei*. (2002) 3<sup>rd</sup> 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) 1<sup>st</sup> FEMS Congress, Ljubjana (Slovenia)- Abstracts-with this work I won the congress junior attendance grant