

**Bazídiumos gombák termőtestfejlődésében szerepet játszó és
biotechnológiai jelentőséggel bíró konzervált, annotálatlan gének
azonosítása**

Ph.D. értekezés

Földi Csenge Anna

Témavezetők:

Dr. Nagy G. László

Dr. Galgóczi László Norbert

Szegedi Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet,

Szintetikus- és Rendszerbiológiai Egység

2024

Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1. A bazídiumos gombák biotechnológiai jelentősége	6
1.1.1. A bazídiumos gombák ipari jelentősége	6
1.1.2. A bazídiumos gombák élelmezési szerepe	7
1.2. A bazídiumos gombatermesztés ipari kihívásai.....	8
1.2.1. Élelmiszeripari szempontból hátrányos tulajdonságok.....	9
1.2.2. A tömegesen jelenlévő bazidiospórák okozta kockázat	9
1.2.3. Ipari igényeknek megfelelő bazídiumos gomba törzsek molekuláris technikákkal történő fejlesztési lehetőségei.....	11
1.3. A termőtestképzés genetikai háttere	12
1.3.1. <i>Coprinopsis cinerea</i> , a bazídiumos gomba modellorganizmus	13
1.3.2. A termőtestképzés legfontosabb eseménye, a bazidiospórák kialakulása	13
1.4. Funkcionálisan ismeretlen és annotálatlan gének.....	16
1.4.1. A termőtestfejlődés során felülexpresszáldó konzervált funkcionálisan ismeretlen és annotálatlan gének	17
1.4.2. Prediktált 7-transzmembrán fehérjék lehetséges szerepe a termőtestképzésben	17
2. Célkitűzések.....	19
3. Anyagok és Módszerek.....	20
3.1. Használt tápközegek, törzsek és tenyésztési körülmények.....	20
3.1.1. Tápközegek és pufferek	20
3.1.2. Törzsek.....	22
3.2. CRISPR-Cas9 alapú génkiütés	23
3.2.1. A gRNS tervezése	23
3.2.2. A javító-templát és RNP-komplex létrehozása.....	23
3.2.3. PEG-alapú transzformálás <i>C. cinerea</i> -ban.....	26
3.2.4. A mutáns gombatörzsek azonosítása és izolálása	27
3.2.5. Génkomplementálás.....	28
3.3. Mutáns fenotipizálás	29
3.3.1. Szinkronizált termőtestképzés	29
3.3.2. Termőtestképzés szulfátos táptalajon	29
3.3.3. Micélium növekedési ráta meghatározása komplett, szén- és nitrogénhiányos táptalajon.....	29
3.3.4. Micélium tömegének meghatározása komplett táptalajon.....	29
3.3.5. LiCl-kezelés okozta termőtestképzés-gátlás	30
3.3.6. Bazídiumok vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal	30
3.3.7. Spóraszám meghatározása	30
3.4. <i>C. cinerea</i> mintázása RNS-szekvenáláshoz és transzkriptomikai kiértékelése	31

3.4.1. Fényindukciót követő fejlődési stádiumok meghatározása és mintázása $\Delta snb1$ és vad típusú törzsekben	31
3.4.2. A spóráképzés stádiumainak meghatározása és mintázása RNS-szekvenáláshoz.....	31
3.4.3. RNS kivonás és RNS-szekvenálás.....	32
3.4.4. Az RNS-szekvenálási eredmények előkészítése.....	32
3.4.5. Az SNB1 gén filogenetikai analízise	34
3.4.6. A vizsgált gének funkcionális annotációja	34
4. Eredmények	35
4.1. A <i>C. cinerea</i> termőtestfejlődésben részt vevő p7TMP-ek karakterizálása reverz genetikai analízissel	35
4.1.1. A <i>C. cinerea snb1</i> deléciós törzs fenotipizálása	39
4.1.2. Az SNB1 szerkezeti elemzése és filogenetikai analízise.....	42
4.1.3. A $\Delta snb1$ termőtestfejlődésének korai stádiumaiban bekövetkező génexpressziós változások jellemzése transzkriptomikai adatok alapján.....	45
4.1.4. A $\Delta snb1$ termőtestfejlődésének korai stádiumaiban bekövetkező génexpressziós változások jellemzése konzervált funkcionális kategóriák alapján.....	48
4.2. A sporulációban résztvevő gének transzkriptóm vizsgálata és reverz genetikai analízise	55
4.2.1. A spóráképzés során szerepet játszó gének csoportosítása és jellemzése expressziós dinamikájuk alapján	55
4.2.2. A spóráképzés transzkriptomikai eredményeinek meiotikus eseményekhez való illesztése	57
4.2.3. Az expressziós profilok dúsulást mutató génontológiai kifejezésekkel történő részletes jellemzése	59
4.2.4. Spóramentes <i>C. cinerea</i> törzsek morfológiai jellemzése és mikroszkópos vizsgálata	66
4.2.5. Konzervált funkcionálisan ismeretlen és annotálatlan génjelöltek kiválasztása, spóramentes törzsek létrehozása.....	68
4.2.6. Spóramentes <i>C. cinerea</i> törzsek morfológiai jellemzése és mikroszkópos vizsgálata	70
5. Diskusszió	75
6. Köszönetnyilvánítás.....	890
7. Szakirodalmi hivatkozások	91
8. Saját publikációk jegyzéke	106
9. Magyar nyelvű összefoglaló	107
10. Angol nyelvű összefoglaló	110
11. Társszerzői nyilatkozat	113
12. Függelékek.....	114

Rövidítések jegyzéke

Δ – deléciós mutáns

7TM - 7-transzmembrán

A - adenin

bp - bázispár

Cas - CRISPR asszociált fehérje (*CRISPR associated protein*)

cDNS - komplementer DNS (*Complementary DNA*)

CRISPR - halmozottan szabályos közőkkel elválasztott rövid palindromikus ismétlődések (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

crRNS - CRISPR RNS (*CRISPR RNA*)

d - átmérő (*diameter*)

DEG - szignifikánsan eltérő expressziót mutató gént (*Differentially Expressed Gene*)

devreg - termőtestfejlődés során szabályozott (*Developmentally Regulated*)

DNS - dezoxiribonukleinsav

DUF - ismeretlen funkciójú domén (*Domain of Unknown Function*)

FB - érett termőtest (*Fruiting Body*)

FB-init - termőtest iniciáció (*Fruiting body initiation*)

FC - stádiumok/törzsek közti expressziós szorzóváltozó értéke (*fold-change*)

FPKM - leolvasások száma 1000 bázisonként, egy millió térképezett leolvasásra vetítve (*Fragments per Kilobase per Million mapped reads*)

G - guanin

gDNS - genomi DNS

GDP – guanozin-difoszfát

GMO - genetikailag módosított organizmus (*Genetically Modified Organism*)

GO - gén ontológia (*Gene Ontology*)

GPCR - G-fehérje kapcsolt receptor (*G-Protein Coupled Receptor*)

gRNS - vezető RNS (*guide RNA*)

GSK-3 - glikogén-szintáz kináz 3

GTP – guanozin-trifoszfát

HR - homológ rekombinációs hibajavító mechanizmus (*Homologous Recombination*)

indel - inszerció, delécio mutációk

KOG - eukarióta ortocsoportok szerinti osztályozási rendszer (*Eukaryotic Orthologous Groups*)

mRNS - hírvivő RNS (*messenger RNA*)
N - nukleotid (adenin, guanin, citozin vagy timin)
nGMs - újgenerációs génmódosítási technikák (*New Genetic Modification techniques*)
NGS - új-generációs szekvenálás (*Next Generation Sequencing*)
NHEJ - nem homológ végillesztés hibajavító mechanizmus (*Non-Homologous End Joining*)
p7TMP - prediktált 7-transzmembrán receptor
pabI - para-amino-benzoésav szintáz kódoló gén
PABA - para-amino-benzoésav
PAM - protospacer melletti szekvencia (*Protospacer-Adjacent Motif*)
PCR - polimeráz láncreakció (*Polymerase Chain Reaction*)
PEG - polietilén-glikol
Pr - primordium
pSL - “feltehetően spóramentes” génjelölt (*“putative SporeLess” gene candidate*)
RNP - ribonukleoprotein (*Ribonucleoprotein*)
RNS - ribonukleinsav
ROS - reaktív oxigén gyök (*Reactive Oxygen Species*)
rpm - percenkénti fordulatszám (*Revolutions Per Minute*)
SPD - poláris orsótest (*Spindle Pole Body*)
SSB fehérje - egyszálú DNS-kötő fehérje (*Single Strand Binding protein*)
tracrRNS - transzaktiváló CRISPR RNS (*trans-activating CRISPR RNA*)
VM - vegetatív micélium
vt - vad típusú törzs
YFB - fiatal termőtest (*Young Fruiting Body*)

1. Bevezetés

1.1. A bazídiumos gombák¹ biotechnológiai jelentősége

A gombák a növények és az állatok mellett a szabad szemmel látható világ harmadik, diverz csoportja. A mikroszkopikus gombák biotechnológiai alkalmazása már évezredekre nyúlik vissza (pl. tészta kelesztése, borászat és sörfőzés), azonban a makroszkopikus, termőtest² létrehozni képes gombákkal való kapcsolatunk talán még régebbre tehető, mivel már a paleolitikori ember is gyűjtötte és fogyasztotta őket. Mostanra, a bazídiumos gombák élelmiszer-, textil- és gyógyszeripari alkalmazása is kezd egyre nagyobb teret nyerni. A nagyrészt bazídiumos gombák (Basidiomycota) termőtesteire épülő gombatermesztés a becslések szerint 2023-ban 62,4 milliárd USA-dollár (\$) értékű élelmiszeripari ágazattá nőtt (Market Report, 2023), amelyre a közeljövőben további, jelentős növekedést prognosztizálnak. Ennek oka, hogy a gomba termőtest és -micélium sokrétűen felhasználható és alternatív nyersanyagként hasznosítható több ipari területen, kiváltva pl. az állati húst és bőrt, csomagolásra használt műanyagokat, faanyagot és építőipari kompozitokat (Hyde és mtsai., 2019; Niego és mtsai., 2023). A gomba termőtestek hasznos élettani-, beltartalmi és strukturális tulajdonságaik mellett további nagy ipari előnyük, hogy termesztésük körkörös gazdaságba is beilleszthető (Grimm és Wösten, 2018; Zou és mtsai., 2023), mindez alacsony CO₂ kibocsátás mellett (Vinci és mtsai., 2023).

1.1.1. A bazídiumos gombák ipari jelentősége

A gombafonalak (hifák) összességét micéliumnak hívjuk, ami egy sokoldalúan felhasználható, természetes nyersanyag, kivételes mechanikai és bioaktív tulajdonságokkal. Ez lehetővé teszi, hogy alapjául szolgáljon innovatív termékek fejlesztésének, mindezt alacsony előállítási költségek és környezeti terhelés mellett (Haneef és mtsai., 2017; Meyer és mtsai., 2020). A micéliumból hidrofób, tűzálló, könnyű, nagy szakítószilárdsággal bíró és komposztálható kompozitok állíthatók elő (Hyde és mtsai., 2019). A micélium mechanikai sajátosságai a gombasejtfal összetételében keresendők, ami alapvetően kitinből és glükánból áll. A kitozán

¹ A dolgozatban a *bazídiumos gomba* kifejezés alatt a komplex termőtestet létrehozni képes fajokat értjük, és külön jelezni fogjuk, ha ezeknél alacsonyabb morfológiai komplexitású fajok kerülnek tárgyalásra.

² A dolgozatban termőtestként a bazídiumos gombák által létrehozott, szabad szemmel látható, komplex soksejtű ivaros struktúrákra hivatkozunk.

biokompatibilitása és biológiai úton való lebonthatósága mellett vérzéscsillapító és antibakteriális tulajdonságokkal is rendelkezik, ezért a gyógyászatban is alkalmazható szövetek hozhatók létre belőle (Abo Elsoud és El Kady, 2019; Benltoufa és mtsai., 2020; Hu és mtsai., 2018). A micélium közvetlenül textilként vagy “bőr” szövetként is felhasználható. Kinézetében és tapintásában a gombabőr nagyon hasonló az állati bőrhöz, azonban annál rugalmasabb, tartósabb és erősebb. Napjainkra a gombabőr a kísérleti és luxus divatirányzatok nélkülözhetetlen kiegészítőjévé vált, amihez elsősorban a pecsétviaszgomba (*Ganoderma lucidum*) micéliumát használják fel (Deeg és mtsai., 2017; Vandeloock és mtsai., 2021).

A hidrofobin fehérjék vízlepergetővé teszik a micéliumot és a termőtestet. A hidrofobinok amfifil tulajdonságaik révén a gyakorlatban is felhasználhatóak, például sebészeti eszközök vagy implantátumok felületi kezelésére, növelve ezek biokompatibilitását és adhezió tulajdonságait (Erjavec és mtsai., 2012; Linder és mtsai., 2005). A micéliumok mechanikai tulajdonságai genetikai módosítással javíthatók. Például a hasadtlemező gomba (*Schizophyllum commune*) *sc3* hidrofobint kódoló gént kiütve olyan deléciós mutáns törzset hoztak létre, aminek sűrű micéliuma a hőre lágyuló műanyagokéhoz hasonló szakítószilárdsággal rendelkezett (Appels és mtsai., 2018).

A fehérkorhasztó bazídiumos gombák unikális képessége a ligninbontás (Rodríguez-Couto, 2017), ami sokrétűen kihasználható az iparban, köztük a bioetanolgyártásban, valamint a textil- és papíriparban a faanyag előkezelésekor (Andlar és mtsai., 2018; Bajpai, 2018). Továbbá a bazídiumos gombák széles enzimatikus arzenálja bevethető számos területen, például a bioremediációban a xenobiotikumok lebontására (Kulshreshtha és mtsai., 2014), a gyógyászatban antibiotikumok és bioaktív anyagok gyártására (erre példa a keserű tobozfülökéből kivont strobulin, ami az egyik legnagyobb mennyiségben forgalmazott, növényvédelemben használt antifungális szer (Anke és mtsai., 1977)), vagy a mezőgazdasági hulladék lebontására (El-Gendi és mtsai., 2021; Hyde és mtsai., 2019).

1.1.2. A gombák ételmezési szerepe

A világ növekvő népességének megfelelő mennyiségű és minőségű ételmezése, kiváltképp a kiegyensúlyozott fehérjebevitel megteremtése egyre sürgetőbb kihívást jelent. Ezt az állati hús nem tudja kielégíteni fenntartható keretek között, ezért olyan alternatív, egészséges fehérjeforrások bevezetése szükséges, amik biztonságosak, nem ütköznek etikai aggályokba és nagyipari termelésük hosszútávon is megoldható

környezetbarát módon (Henchion és mtsai., 2017). Számos ilyen alternatív fehérjeforrás jelenleg fejlesztés alatt áll vagy már kereskedelmi forgalomban is elérhető. Ezek többsége növényi- vagy rovaralapú termék. A gombaalapú készítmények kiegyensúlyozott aminosav-profillal rendelkező vegán húspótlók. Ezek beltartalmi értékét és gazdaságos előállíthatóságát figyelembe véve több szempontból előnyösebbek és versenyképesebbek mint az állati húsok (Ayimbila és Keawsompong, 2023). A gombaalapú húspótló készítményeket a legtöbbször nem termőtestből készítik, hanem fermentorban növesztett micéliumból. Az első micéliumalapú húspótló készítmény QuornTM néven került forgalomba még az 1960-as évek második felében, amit a *Fusarium venetatum* penészgombából állítottak elő (Wiebe, 2004). Azonban hiába jelentenek a mikroba-alapú készítmények fenntartható és magas minőségű fehérjeforrást, a rovaralapú készítményekhez hasonlóan a társadalmi elfogadottságuk alacsony, ezért egyelőre nem tudtak elterjedni a piacon (Bonny és mtsai., 2015).

Élelmezési célra így elsősorban bazídiumos gombákat termesztene. A gomba termőtest gazdaságosan megtermelhető, alacsony kalóriatartalma mellett kimagasló tápértékkel bír, jelentős rost-, fehérje- és ásványianyag tartalma miatt, ezért fontos fehérjeforrás a kiegyensúlyozott vegyes, a vegetáriánus és vegán étrendekben egyaránt (Bell és mtsai., 2022). A mintegy kétezer ehető gombafaj fogyasztási arányának 85 %-át mindössze öt faj teszi ki világviszonylatban, köztük a shiitake (*Lentinus edodes*), a kései laska (*Pleurotus ostreatus*), júdásfülgomba (*Auricularia auricula*), a kétspórás csiperke (*Agaricus bisporus*) és a téli fülőke (*Flammulina velutipes*) (Royse és mtsai., 2017). Ezek közül Magyarországon a két legnépszerűbb termesztett faj a kései laska és a kétspórás csiperke. Becslések szerint az átlagos gombafogyasztás évi 4,7 kg fejenként világszinten (Royse és mtsai., 2017), míg itthon az egy főre eső éves fogyasztás mértéke jóval alacsonyabb, 1 kg körül mozog (Bringye és mtsai., 2021; *Központi Statisztikai Hivatal, 2010-2020*).

1.2. A bazídiumos gomba termesztés ipari kihívásai

A termesztésbe bevont bazídiumos gomba törzsek nemesítése mind a mai napig a hagyományos technológiákkal zajlik. A hagyományos nemesítési eljárás során a vad típusú, egysejtmagvas szülői törzsek, ún. monokarionok keresztezése mellett mutáns törzseket is használnak. Ezeket random mutagenézissel mesterségesen hozzák létre, vagy a természetből izolálják, majd pedig egy donor monokarionnal való ismételt

viSSzakeresztezéssel, ún. introgresszív hibridizáltatással hozzák létre a kívánt genetikai variánst hordozó dikarion törzset (Lavrijssen és mtsai., 2020). A random mutagenézis történhet fizikai (pl. UV-besugárzás, He-Ne lézer) és kémiai (pl. etil-metil-szulfonát) úton, amivel véletlenszerűen lehet bevinni mutációkat a gomba genomjába (Dong és mtsai., 2022). Ez a folyamat azonban rendkívül munka- és időigényes. További hátrányt jelent, hogy a gombatörzseket könnyű vegetatív szövetkultúrából szaporítani, így az új hibrid fajtákat szinte lehetetlen oltalom alatt tartani (Sonnenberg és mtsai., 2008). Ezek eredményeképpen kevés a termesztett hibrid törzs, és az ezek közti genetikai változatosság is igen alacsony (Sonnenberg és mtsai., 2008). Emiatt egyre sürgetőbbé vált új molekuláris technikák fejlesztése és alkalmazása, amikkel célzottan és gyorsabban lehet megoldást találni a jelenleg fennálló, iparban használt törzseket érintő kihívásokra.

1.2.1. Élelmiszeripari szempontból hátrányos tulajdonságok

A jelenleg ismert, termesztésbe bevont gombafajok olyan tulajdonságokkal rendelkezhetnek, amik jelentősen csökkenthetik a piaci értéküket vagy a velük történő munka egészségügyi kockázatot jelent. Ilyen, élelmiszeriparilag jelentős tulajdonságok a gyors romlandóság, barnulás, illetve a laskagomba esetében a spórák tömeges jelenléte. A termőtestek micéliumtól való elválasztást követően viszonylag gyorsan romlásnak indulnak, az eltarthatósági idejük 1-3 napra korlátozódik. A termőtest barnulása az öregedés és mechanikai sérülés természetes velejárója, azonban ez a fogyasztók által egy kifogásolható szempont. A barnulás hátterében polifenol-oxidáz enzimek állnak, amik aromás vegyületeket alakítanak át barna színű melaninná (Lin és Sun, 2019).

1.2.2. A tömegesen jelenlévő bazídiospórák okozta kockázat

A meiózis útján keletkezett bazídiospórák a különböző szülői sejtmagokból származó allélok rekombinációja által lehetővé teszik a genetikai változatosságot (Wallen és Perlin, 2018), ami alapvető a sikeres adaptációhoz, pl. új élőhelyeken (Pringle és Taylor, 2002), így a bazídiumos gombák elsődleges szaporítóképletei. A kisméretű spórák a szél útján messzire eljutva távoli területeket is képesek kolonizálni (Halbwachs, 2015). Egyetlen termőtest akár napi egy milliárd spórát is szabadjára képes engedni (Money, 2016). Azonban egyes bazídiumos gombafajok termesztőházakban történő kultiválása esetén a spórák tömeges jelenlétének nem kívánt hatásai érvényesülhetnek.

A bazídiumos gombafajok, kiváltképp a laskagomba termesztésében kockázatot jelent a termesztők egészségére a spórák tömeges jelenléte, amik belégzésével allergiás

reakciókat és tüdőgyulladással súlyosbított tünetegyüttest, az ún. “gombatermesztők betegségét” idézhetik elő, ami akár maradandó károsodásokat is okozhat (Van Loon és mtsai., 1992). Ezen kívül, a spórák eltömíthetik a termesztőházak szellőzőrendszerét, és előidézik a későbbi termőhullámok minőségbeli romlását, mivel a spórák vektorként szolgálhatnak különböző gombapatogéneknek és -vírusoknak. Ezek a jelenségek spóramentes törzsek esetében nem jelentkeztek (Baars és Heszen, 2008). További megfontolandó szempont, hogy a nem őshonos vagy hibrid gombák termesztése magában rejti a spórák természetbe való kijutásának az esélyét, ami az adott terület ökoszisztémájára kockázatot jelenthet (Monteiro és mtsai., 2023). Ilyen például az őshonos gombákkal való versengés, növénybetegségek hordozása, és egyéb, egyelőre nem ismert negatív hatások (Monteiro és mtsai., 2023). Erre kiváló példa az Ázsiában őshonos arany laskagomba (*Pleurotus citrinopileatus*), ami az első dokumentált nem őshonos gombafaj, ami az amerikai piacokra való bevezetését követő években kiszabadult az ipari termesztésből és azóta is megállíthatatlanul terjed az Egyesült Államokban (Bruce, 2018).

Jelenleg három bazídiumos gombafajnak, a kései laskának (*P. ostreatus*), az ördögszekér-laskagombának (*P. eryngii*) és a déli tökegombának (*Cyclocybe cylindracea*) érhetőek el spóramentes hibridjei kereskedelmi forgalomban (Lavrijssen és mtsai., 2020; Okuda és mtsai., 2013). A kései laska spóramentes törzsét, a SPOPPO-t a Sylvan Inc. védette le, amit introgresszív keresztezés útján fejlesztettek ki (Baars és mtsai., 2000). A SPOPPO esetében a spóramentesség együtt jár a termőtestek deformitásával, ami csökkenti az eladhatóságát (Baars és Heszen, 2008). Molekuláris biológiai vizsgálatokkal azonosítani tudták a spóramentesség hátterében álló mutációt, ami az *msh4* meiotikus gént érinti. A mutáció következtében a spóráképződést megelőző számfelező sejtosztódás a metafázis I-ben elakadt (Lavrijssen és mtsai., 2020). Érdekes módon a mutáns *msh4* gén komplementálása nem csak a sporuláció folyamatát állította vissza, de a génmentett SPOPPO törzsek termőtestének morfológiáját is (Lavrijssen és mtsai., 2020). Az *msh4* mellett további meiotikus gének, mint pl. a *mer3* kiütése is spóramentes, vagy spóraszegény fenotípushoz vezetett (Okuda és mtsai., 2013; Yamasaki és mtsai., 2022). A meiotikus gének nagyfokú konzerváltságot mutatnak, így jól ismertek a bazídiumos gombákban. Azonban a spóráképzés meiózist követő lépései és az abban részt vevő gének még kevésbé ismertek. Ezek feltérképezésével és a spóráképzésben betöltött szerepük meghatározásával lehetőség nyílhat olyan génjelöltek azonosítására, amik deléciójával akár olyan spóramentes törzsek is létrehozhatók, amik a spórák

hiányán kívül nem mutatnak további morfológiai elváltozásokat. Ez a termesztésbe bevont törzsek fejlesztésénél kifejezetten kívánatos lenne, hogy a spóramentesség ne társuljon ipari vagy piaci szempontból hátrányos tulajdonságokkal.

1.2.3. Ipari igényeknek megfelelő bazídiumos gomba törzsek molekuláris technikákkal történő fejlesztési lehetőségei

A munka- és időigényes hagyományos nemesítési eljárásokkal szemben az újgenerációs génmódosítási technikák (*New Genetic Modification techniques*, nGMs) jelentősen előremozdíthatják a gombatörzsek fejlesztését. Az irányított mutagenézisen alapuló molekuláris eszközök gyorsak és precízek, amikkel nukleotid-pontosan lehet mutációt létrehozni, a tradicionális nemesítési eljárásokhoz szükséges idő és munka töredéke alatt. A leghatékonyabb génszerkesztési eszköz, a genetikai ollóként is ismert CRISPR/Cas9 (Halmazottan szabályos közökkel elválasztott rövid palindromikus ismétlődések - CRISPR asszociált nukleáz 9, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated nuclease 9*) rendszer. A CRISPR/Cas9-t a bakteriális adaptív immunrendszer részeként fedezték fel, aminek feladata az idegen eredetű (pl. vírusfertőzés során bekerült) DNS inaktiválása (Barrangou és mtsai., 2007). Röviden ez úgy történik, hogy az idegen vírus DNS-ből a Cas9 nukleáz *protospacer*-eknek nevezett rövid szekvenciákat épít be a gazda prokarióta genomjába. A beépült *spacer* szekvenciákat határolja a CRISPR. Egy újabb vírustámadás esetén ezekről a szakaszokról fognak átíródni a *crRNS*-ek (CRISPR RNS), amik a *tracrRNS*-sel (transzaktiváló CRISPR RNS) együtt egy RNS-duplexet hoznak létre, az ún. vezető RNS-t (*guide RNA*, gRNS), amit felismer és köt a Cas9 nukleáz, együttesen létrehozva a ribonukleoprotein-komplexet (RNP-komplex). A *crRNS* specifikus módon képes kötődni az idegen célszekvenciával komplementer DNS szálhoz. Az idegen célszekvencia felismeréséhez szükség van egy konzervált, ún. PAM szekvenciára (*protospacer* melletti szekvencia (*Protospacer-Adjacent Motif*, PAM)), ami három nukleotidból (NGG) áll. A Cas9 a PAM szekvenciától *upstream* irányban kettősszálú hasítást végez, ezzel hatástalanítva a támadót. Ez a molekuláris rendszer adta az alapját a célzott genetikai módosításnak, ami az elmúlt években forradalmasította a molekuláris biológiát (Doudna és Charpentier, 2014) és az utóbbi években sikerrel adaptálták az iparban elterjedt gombatörzsek módosítására is (Zhang és mtsai., 2023).

A CRISPR/Cas9 rendszer nagy előnye a korábban használt restrikciós enzimeken alapuló, fehérje-DNS kötésen alapuló eljárásokkal (pl. TALEN vagy cink-ujj nukleáz) szemben az, hogy a módosítandó DNS felismerése RNS-DNS kötésen alapul, emiatt

kísérletenként csak a crRNS-t szükséges módosítani (Schulze és Lammers, 2020). Ez lehetővé teszi a természetazonos mutációk egyszerű és célzott bevitelét, a génszerkesztést, ami társadalmi és jogi szinteken is elfogadottabb lehet a más élőlényekből származó, transzgenikus DNS szakaszok bevitelén alapuló génmódosításnál (Koralesky és mtsai., 2023). Azonban, génszerkesztés esetén csupán néhány bázispárt érintő mutáció történik, ezért a mutáns törzsek azonosításához szükséges - általában transzgenikus - szelekciós marker nem épül be a kiütött génbe. Emiatt az alap kutatásban a funkcionális vizsgálatokhoz továbbra is génmódosítást használnak. A génmódosítás a CRISPR/Cas9 alapú transzformálással pontosabbá és könnyebben kivitelezhetővé vált, amit sikerrel adaptáltak bazídiomos gombákra (Sugano és mtsai., 2017), azonban ennek technikai lépései még további fejlesztést igényelnek, amivel hatékonyabbá lehet tenni a génszerkesztett mutánsok létrehozását és azonosítását bazídiomos gombákban, hiszen egy folyamatosan táguló piac várja az új törzseket. Az USA-ban és Ázsia egyes országaiban már régóta engedélyezett a génmódosított (*Genetically Modified Organisms*, GMO) és génszerkesztett élőlények alkalmazása. Tavaly, 2023 júliusában az Európai Unióban is elkezdődtek a tárgyalások a génszerkesztett organizmusok GMO-któl való jogi megkülönböztetésével kapcsolatban, ezáltal tiltásuk felülbírálásáról és jövőbeli termesztésbe történő bevonásukról (Dima és mtsai., 2023; „*EU Rethinks Genome Editing*”, 2023).

1.3. A termőtestképzés genetikai háttere

A gombák országában a legösszetettebb szerveződési szintet az Agaricomycetes osztály tagjai érték el. Ezek szexuális szaporítóképlete a termőtest, ami az egymáshoz szorosan kapcsolódó, módosult morfológiájú hifákból felépülő pszeudoparenchimákból, ún. álszövetekből épül fel (Moore, 1995). A gomba álszövetek nagy hasonlóságot mutatnak az állati és növényi szövetekkel, valamint a bazídiomos gombákkal foglalkozó angol nyelvű szakirodalomban is elterjedt a “szövet” használata (Kües, 2000; Moore, 1995), ezért a differenciálódott, komplex soksejtű struktúrákra mi is szövetként fogunk hivatkozni a dolgozatban. A termőtest morfogenezise egy térben és időben szigorúan szabályozott fejlődési program szerint történik. Számos kutatás igyekezett már feltárni a termőtest fejlődését meghatározó fiziológiai és genetikai tényezőket (Clémenton és Emmett, 2004; Kües és Navarro-Gonzalez, 2015; Moore, 2005), azonban ennek

részfolyamatai és a mögöttük meghúzódó komplex genetikai hálózat ismerete még erősen hiányos (Nagy és mtsai., 2023).

1.3.1. *Coprinopsis cinerea*, a bazídiumos gomba modellorganizmus

A bazídiumos gombák termőtest fejlődésének vizsgálatának legfőbb modellorganizmusa a trágyatintagomba (*Coprinopsis cinerea*) (Kües, 2000; Stajich és mtsai., 2010; Kües és mtsai., 2016), amely faj már több mint egy évszázada áll a tudomány szolgálatában (Bensaude, 1918). A *C. cinerea* a porhanyósgombafélék (Psathyrellaceae) családjába tartozó, hazánkban is gyakori szaprotróf faj. A tintagombák sajátossága, hogy az érett kalap autolízisen megy keresztül és tintaszerűvé folyósodva teszi lehetővé a spórák terjesztését. Ez a faj hamar a legelterjedtebb bazídiumos modellorganizmussá nőtte ki magát a fejlődésbiológia terén, mivel laborkörülmények között is könnyen fenntartható, szaporítható mesterséges táptalajon, életciklusa mindössze két hét alatt lejátszódik és eközben a termőtestképzés indukálható és szinkronizálható (Kües és mtsai., 2016). A klasszikus hisztológiai kísérleteken túl (Clémenton és Emmett, 2004) úttörő modellt vált a reverz genetikai vizsgálatokhoz is, ugyanis egyike volt az első bazídiumos gombafajoknak, amit sikerrel transzformáltak (Binner és mtsai., 1991). A transzformánsok szűrését a auxotróf mutáns törzsek létrehozása tette könnyebbé (Kües, 2000). A *C. cinerea* volt az egyik első gombafaj, aminek elérhetővé vált a teljes genomszekvenciája (Stajich és mtsai., 2010), amit további átfogó genomikai és transzkriptomikai analízisek egészítettek ki (Krizsán és mtsai., 2019; Muraguchi és Kawagishi, 2015; Plaza és mtsai., 2014). A genetikai vizsgálatokhoz az AmutBmut #326-os homokarion törzs terjedt el, ami mutációkat hordoz a párosodáshoz kompatibilis törzs felismeréséhez szükséges ún. *A*-, és *B*-faktorokon (Pardo és mtsai., 1996; Muraguchi és mtsai., 2015). Ez lehetővé teszi, hogy az AmutBmut #326 homokarion törzs önmagában képes legyen a termőtestképzésre, további kompatibilis homokarion törzsszel való párosodás nélkül is, emiatt egyedül a AmutBmut #326 törzsben történő módosítással meg lehessen figyelni a termőtestben bekövetkező fenotípus-változásokat.

1.3.2. A termőtestképzés legfontosabb eseménye, a bazidiospórák kialakulása

A bazidiospórák a bazídiumos gombák elsődleges szaporítóképletei, így létrehozásuk a termőtestképzés végső, egyben legfontosabb állomása. A himeniális típusú termőtestek esetében a különféle szerkezetű (pl. lemezes, csöves) hifaszerveződés, a tréma felületén

található a termőréteget. A trámák különböző típusai akár húszszorosára is növelhetik a termőréteg felületét (Fischer és Money, 2010).

A termőréteg a bazídiumok összessége, amiket a dikarion hifák csúcsi részén található sejtek hoznak létre. A probazídiumban megtörténik a két szülői sejtmag összeolvadása, a kariogámia, majd ezt követi a haploid utódmagokat eredményező meiózis a metabazídiumban. A meiózist levezénylő molekuláris apparátus rendkívül konzervált és a legfőbb komponensei már több, mint fél milliárd éve is jelen voltak a gombákban (Burns és mtsai., 2010). A sporuláció részfolyamatait elsősorban aszkuszos gombákban vizsgálták, de bazídumos gombákban, köztük a *C. cinerea*-ban is részletesen dokumentált (Anderson és mtsai., 2012; Burns és mtsai., 2010; Many és mtsai., 2009). A *C. cinerea* meiózisa nagy hasonlóságot mutat más, soksejtű eukariótáékkal, beleértve a szinaptonémás komplex létrejöttét a rekombináció során, az Mre11-független kettős DNS-szállhasítást és a kromoszómakaronként átlagosan egy kiazma meglétét, ami mentén a nem-testvérkromatidák a kereszteződés közben összekapcsolódnak (Burns és mtsai., 2010).

Citológiai szempontból a meiózis I. fázisát a következő lépésekre oszthatjuk: profázis (a kromoszómák kondenzálódnak, párba állnak és létrehozzák a szinaptonémás komplexet), metafázis (a testvérkromatidák az osztódási orsó egyenlítői síkjában rendeződnek), anafázis (a testvérkromatidák elválnak egymástól és a sejtek pólusai felé vándorolnak) és telofázis (a két sejtmag szeparálódik). A meiózis I. fázisát követően a két testvérsejtmagban megkezdődik az osztódás II. fázisa, ami *C. cinerea*-ban körülbelül egy óra alatt zajlik le, hasonlóan az I. fázishoz. A kromatidok szeparálódását követően a sejtmag tetrad a bazídium csúcsi része felé vándorol, amin már megjelentek a szarvszerű kitüremkedések, a sterigmák, amik csúcsain megkezdődik a spórák felfúvódása. *C. cinerea*-ban a haploid utódmagok a felfúvódó spórákba történő vándorlásukat követően még keresztülmennek egy végső, posztmeiotikus mitózison (Kües, 2000). A *C. cinerea* bazídiumokon, hasonlóan a legtöbb bazídumos gombafajhoz, négy spóra jön létre, de ez más fajokban jelentősen eltérhet (pl. kétspórás csiperkénél (*A. bisporus*) kettő, míg *Phallus* fajokban akár kilenc). A *C. cinerea* ideális modellnek bizonyult a spóráképzés vizsgálatára is, mivel a sporuláció fejlődési stádiumai pontosan nyomonkövethetőek és részletesen dokumentáltak korábbi publikációkban (Boulianne és mtsai., 2000; Kües és mtsai., 2016), valamint egyetlen kalapjának lemezein mintegy 10^7 - 10^8 darab bazídium helyezkedik el (Raju és Lu, 1973), amik 60-85 %-a teljes szinkronban fejlődik (Kües,

2000), ezért az egyes stádiumokban lejátszódó folyamatok viszonylag jól elválaszthatók egymástól időben.

1.3.2. A bazídiumos gombák termőtestfejlődésében szerepet játszó gének vizsgálatának eszközei

Az egyedfejlődés hátterében meghúzódó genetikai folyamatok feltárásának számos elterjedt módja van. Egy-egy gén funkciójának meghatározása történhet pl. génkiütéssel, amit a deléciós mutáns fenotipizálása követ (*reverz* genetikai vizsgálat), vagy a vad típustól eltérő fenotípust okozó mutációt hordozó gén visszatérképezésével (*forward* genetikai vizsgálat). Az egyes gének közötti kapcsolatot különböző interakciós vizsgálatokkal lehet feltárni (pl. élesztő két-hibrid rendszer, bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció). Azonban, ha egy folyamatban résztvevő valamennyi gént egyszerre akarjuk vizsgálni, akkor nagy áteresztőképességű eszközökhöz kell folyamodnunk, különböző, ún. “omikai” eszközöket használva.

A rendszerbiológia által felölelt “omikák” egy organizmus vagy biológiai hálózat átfogó, nagyléptékű elemzését lehetővé tevő technikák gyűjtőfogalma, amik elterjedése és a belőlük származó óriási adatbázisok forradalmasították a fejlődésbiológiai vizsgálatokat. A bioinformatikai eszközök segítségével a hipotézis-vezérelt megközelítés helyett lehetőség nyílt a nagy mennyiségű adatok alapján a biológiai folyamatok közötti összefüggések és mintázatok vizsgálatára (Vailati-Riboni és mtsai., 2017).

Az egyedfejlődésben résztvevő gének azonosításának egyik legkorszerűbb és egyben leghatékonyabb módja az új-generációs RNS-szekvenálás alapú transzkriptomikai analízis. A mintázott stádiumban található teljes hírvivő RNS (*messenger RNA*, mRNS) állomány leolvasásával egy pillanatképet kaphatunk a vizsgált szövetben aktív génekről, amik szerepet játszhatnak az adott fejlődési stádiumban. A leolvasott szakaszokat (*read*-eket) a genomi DNS-re térképezve megmondható, hogy egy adott gén milyen szinten expresszálódik, fejeződik ki.

Ezek az analízisek ezres nagyságrendű gént azonosítottak bazídiumos gombákban, amik expressziós dinamikájuk alapján szerepet játszhatnak ebben a folyamatban (Almási és mtsai., 2019; Cheng és mtsai., 2013; Krizsán és mtsai., 2019; Nagy és mtsai., 2023). Azokat a géneket, amik legalább kétszeres expressziószintet mutatnak valamely, komplex soksejtű fejlődési stádiumban az egyszerű soksejtű vegetatív micélium stádiumhoz képest, “*devreg*” (*developmentally regulated*) géneknek nevezzük Krizsán és mtsai. (2019) alapján. Azonban kísérletes úton nagyságrendekkel

kevesebb *devreg* gén funkciója került leírásra. Egy gén lehetséges funkciója elsősorban reverz genetikai vizsgálatokkal határozható meg, aminek egyik módja, ha a gént “kiütik”, vagyis olyan mutációt hoznak létre benne, ami végső soron az általa kódolt fehérje hiányát okozza. Ez akár jelentős fenotípusváltozással is járhat a mutáns organizmusban, amiből következtetni lehet a kiütött gén funkciójára. A precíz, újgenerációs genomszerkesztési technikákkal nagy hatékonysággal és célzottan lehet új géneket kiűtni a genomból, azonban a mutáns törzsek szelekciója mind a mai napig egy viszonylag nehéz, munkaigényes folyamat a bazídiumos gombák esetében (Jan Vonk és mtsai., 2019). Ennek oka az, hogy az tömlősgombákhoz képest a bazídiumos gombákban a homológ rekombináció (HR)-alapú DNS-javító útvonal nagyon alacsony aktivitást mutat a nem-homológ végillesztés (NHEJ, *non-homologous end-joining*) útvonalhoz képest (Ohm és mtsai., 2010). A HR során, a DNS láncban történt sérülést a hibajavító enzimek állítják helyre. A javításhoz a sérült régiót egy templátról, a homológ DNS szárlól másolják át. Ez a működési elv kihasználható új genetikai elemek célzott bevitelére. Ha a genomi DNS-ben történő célzott kettős száltörést (pl. Cas9 endonukleáz által) megelőzően egy homológ karokat, illetve egy szelekciós markert tartalmazó javító-templátot viszünk be, akkor HR esetén a kiütendő gén szekvenciájában történt sérülés a javító-templát szerint kerül helyreállításra és a kiütendő gén helyére a szelekciós marker épül be. Ez végső soron lehetővé teszi a génkiütött mutáns törzsek szelekcióját. Azonban, mivel a HR-hibajavítás egy ritka esemény bazídiumos gombákban, így a szelekciós körülmények között felnövő transzformánsok csak egy kis része valódi mutáns (Ohm és mtsai., 2010).

1.4. Funkcionálisan ismeretlen és annotálatlan gének

Az annotálatlan gének kódolják a “sötét proteomot”, ami új funkcióval bíró, még ismeretlen géncsaládokat rejthet (Durairaj és mtsai., 2023). Annotálatlan alatt azokat a géneket értjük, amik nem rendelkeznek semmilyen jellemző konzervált doménszerkezettel, míg funkcionálisan ismeretlennek azokat a géneket tekintjük, amik ugyan homológiamodellezés alapján rendelkeznek valamilyen konzervált doménnel vagy motívummal, de ezek még nem adnak elégséges információt a pontos funkciójukra vonatkozóan. Utóbbira példa az ismeretlen funkciójú doménnel (DUF = *Domain of Unknown Function*) rendelkező fehérjék (Bateman és mtsai., 2010). Míg a *Protein Families* (Pfam, 33.1-es verzió) adatbázisban található fehérjecsaládok 23 %-a karakterizálatlan vagy DUF-ot tartalmaz (Mistry és mtsai., 2020), addig az *InterPro*

domén adatbázisban (97.0-ás verzió) az összes leírt doménstruktúra 7.42 %-a DUF (InterPro, 2023; Paysan-Lafosse és mtsai., 2023). A genomszekvenálás első évtizede robbanásszerű növekedést hozott a ismeretlen fehérjék jellemzésében, amivel az ún. unknowmika (az angol *unknown* és *omika* szavak összevonásából származtatva) foglalkozik (Rocha és mtsai., 2023). Mostanra ezeknek a géneknek a funkcionális feltérképezésének üteme lelassult, így még a jól tanulmányozott modellszervezetekben is a fehérjék mintegy 20 %-a teljesen annotálatlan, így nincs információnk a lehetséges biológiai szerepükről (Wood és mtsai., 2019). A funkcionálisan ismeretlen és annotálatlan gének aránya a gombagenomokban még magasabb, pl. növénypatogénekénél a 70 %-ot is meghaladhatja (Huberman, 2021), de még a legismertebb gomba modellorganizmus, a pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) génjeinek is körülbelül 15 %-a funkcionálisan karakterizálatlan (Peña-Castillo és Hughes, 2007; Tantoso és mtsai., 2023). Ahhoz, hogy teljesen megértsük a biológiai rendszereket, fontos, hogy ezek minden elemét feltérképezzük, kiváltképp az egyes élőlénycsoportokban konzervált, funkcionálisan ismeretlen és annotálatlan géneket, amik eddig nem ismert életfolyamatokban vehetnek részt.

1.4.1. A termőtestfejlődés során felülexpresszáldó konzervált funkcionálisan ismeretlen és annotálatlan gének

Az Agaricomycetes osztály recens képviselőinek közös őse már feltehetően rendelkezhetett a termőtestképzéshez szükséges, magasan konzervált alap genetikai eszköztárral. Nagy és mtsai. (2023) 12 bazídiumos gomba genomját és termőtestfejlődési transzkriptomikai adatsorát összevetve összesen 1410 konzervált, a termőtestfejlődés során felülexpresszáldó *devreg* gént találtak a *C. cinerea* genomjában. Ezek között 176 funkcionálisan ismeretlen és 158 annotálatlan ortocsoport volt (Nagy és mtsai., 2023). Ezek a konzervált annotálatlan *devreg* gének kifejezetten érdekesek, mert olyan általános folyamatokban és jelátviteli útvonalakban vehetnek részt a termőtestképzés során, amik eddig még nem ismertek.

1.4.2. Prediktált 7-transzmembrán fehérjék lehetséges szerepe a termőtestképzésben

Az egyedfejlődés során a termőtestek kialakulásának pontos idő- és térbeli lefutásához elengedhetetlen a sejtek közötti kommunikáció, az egyedfejlődés szabályozása és a környezet komplex érzékelése, ami sejtfelszíni receptorok és sejten belüli jelátviteli útvonalakon keresztül valósul meg. A legnagyobb sejtfelszíni receptorcsaládot a G-

fehérje kapcsolt receptorok (*G-protein coupled receptor*, GPCR) alkotják. Strukturálisan a GPCR-ek hét transzmembrán (7TM) doménből épülnek fel. Az extracelluláris ligand bekötődve a GPCR ligand-kötő zsebébe előidézi a GPCR intracelluláris, C-terminális végéhez kötődő heterotrimer G-fehérje komplex α -alegységében a GDP GTP-re való cseréjét, ami az α -alegység disszociációját idézi elő a β/γ -dimertől, ami által az egyes transzdukciós útvonalak aktiválódnak vagy inaktíválódnak (Hilger és mtsai., 2018). Szekvencia és funkcionális hasonlóságuk alapján több csoportosítási rendszer is létezik a GPCR-ek osztályozására, amik közül a legelterjedtebb a GRAFS rendszer (a GRAFS mozaikszó az általa magába foglalt GPCR-családok kezdőbetűiből tevődött össze: Glutamát-, Rodopszin-, Adhéziós-, *Frizzled*-, Szekréciós-receptorok) (Bjarnadóttir és mtsai., 2010). A GPCR-eknek alapvető szerepük lehetett a komplex struktúrák kialakulásában, mivel a soksejtű állatok törzsfajlódásával párhuzamosan a genomjaikban kódolt GPCR-gének száma is megsokszorozódott (de Mendoza és mtsai., 2014). Ez alól kivételt képeznek a soksejtű gombák, amiknél a jelenlegi osztályozási rendszerekbe becsportosítható GPCR-ek száma csupán a töredéke az állatok gazdag receptorrepertoárjának. Míg állatokban a GPCR-ek száma százas nagyságrendű, addig gombákban, – még a legkomplexebb szerveződésű fajokban is, – 20 alatti, amik közül egyedül a gomba párosodási feromonreceptorok mutatnak konzerváltságot a gombák csoportjában (Kiss és mtsai., 2019). Mivel a komplex soksejtű struktúrákból álló termőtestek szerveződési szintje összemérhető az egyszerűbb testfelépítéssel rendelkező állatokéval, így valószínű, hogy a gombák az eddig ismertnél sokkal gazdagabb sejtfelszíni receptor-diverzitással bírnak, amire Brown és mtsai. (2018) mutattak rá. Munkájuk során osztályozták a gomba GPCR-eket és az általuk klasszikus GPCR-eknek definiált receptorok mellett [STE2 (csak tömlősgombáknál) és STE3 feromon-, szénforrás-, nitrogénforrás-, cAMP- és mikrobiális opszin-receptorok] további, akár százas nagyságrendű prediktált hét transzmembrán fehérje (p7TMP) repertoár meglétét mutatták ki a hifás szerveződésű tömlősgomba-fajokban, amik szekvenciamodellezés alapján nem sorolhatóak a klasszikus GPCR-ek közé, így ezeket nem-klasszikus GPCR-ekként jellemezték a szerzők. Ellenben, a szerkezeti becslésekkel az élesztőgombák genomjaiban nem találtak további, érdemi számú p7TMP-t kódoló gént a klasszikus GPCR párosodási feromon-receptorokon túl (Brown és mtsai., 2018). Ebből kiindulva felmerül az eddig nem vizsgált kérdés, hogy a hifás tömlősgombákhoz hasonlóan a bazídiumos fajok is rendelkeznek-e egy hasonló nagyságrendű, p7TMP repertoárral?

2. Célkitűzések

A doktori munkám fő célja volt a termőtest-iniciáció és spóráképzés transzkriptóm-alapú vizsgálata, valamint a feltárt expressziós dinamikák alapján az ezekben a folyamatokban résztvevő, magas szinten konzervált annotálatlan és ismeretlen funkciójú gének karakterizálása reverz genetikai analízissel *Coprinopsis cinerea* modell gombában. A dolgozat két nagy részre tagolódik, amiken belül a konkrét célkitűzések a következők voltak:

1. Prediktált 7- transzmembrán fehérjéket kódoló konzervált gének vizsgálata:

- ❖ A p7TMP repertoár meghatározása a *C. cinerea* bazídiumos modellgombában.
- ❖ Három termőtest-specifikus, konzervált p7TMP karakterizálása reverz genetikai analízissel.
- ❖ A differenciálatlan termőtesteket képző egyik p7TMP deléciós mutáns, a $\Delta snb1$ részletes fenotipizálása, valamint a termőtestiniciációban és szöveti differenciációban résztvevő gének meghatározása az *snb1* deléciós mutáns és vad típusú törzsek transzkriptóm-alapú összehasonlítása által.

2. A spóráképzésben részt vevő gének vizsgálata:

- ❖ A spóráképzés meiotikus és posztmeiotikus folyamatait egyaránt lefedő fejlődési stádiumok időbeni vizsgálata és az egyes stádiumokban szignifikáns expressziós különbséget mutató gének meghatározása RNS-szekvenálással.
- ❖ Az ipari termesztésbe bevont fajokban is jelenlévő, a spóráképzés során felülexpresszálandó konzervált, annotálatlan vagy ismeretlen funkciójú gének karakterizálása reverz genetikai analízissel.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Használt tápközegek, törzsek és tenyésztési körülmények

3.1.1. Tápközegek és pufferek

3.1.1.1. Mikrobiológiai tápközegek:

- ❖ **Luria-Bertani tápleves/táptalaj** (*Luria-Bertani broth/agar*, **LB**): 10 g/l tripton, 2 g/l élesztő kivonat (Molar), 10 g/l NaCl (Molar), táptalaj esetében 20 g/l agar.
- ❖ **Szalma-korpa tápközeg**: 19,5 g ledarált szalma, 6,5 g búzakorpa, 60 ml desztillált víz. A szalmát és a búzakorpát összekeverve, a desztillált vízzel benedvesítettük és főzőpohárban sterilre klávoztuk.
- ❖ **Élesztőkivonat-maltóz-glükóz táptalaj/tápleves** (*Yeast Extract-Maltose-Glucose medium*, **YMG**): 4 g/l élesztő kivonat (Molar), 10 g/l maláta kivonat (Biolab), 4 g/l glükóz (Molar), táptalaj esetében 10 g/l agar (Molar), desztillált vízzel 1 literre kiegészítettük.
- ❖ **Csökkentett glükóz tartalmú élesztőkivonat-maltóz-glükóz táptalaj/tápleves** (*Yeast Extract-Maltose-halved Glucose medium*, **YMG_{1/2}**): 4 g/l élesztőkivonat, 10 g/l maláta kivonat (Biolab), 2 g/l glükóz (Molar), 10 g/l agar (Molar), desztillált vízzel 1 literre kiegészítettük.
- ❖ **Szulfátos csökkentett glükóz tartalmú élesztőkivonat-maltóz-glükóz táptalaj/tápleves** (*Yeast Extract-Maltose-halved Glucose medium*, **YMG_{1/2} with sulphates**): 1 liter **YMG_{1/2}**-hez szükséges szárazanyaghoz 10 ml 20 mM réz-szulfátot (3,19 g/l CuSO₄) és 10 ml 20 mM magnézium-szulfátot (2,41 g/l MgSO₄) adunk, majd desztillált vízzel 1 literre kiegészítjük.
- ❖ **Malátás tápleves/táptalaj** (*Malt Extract Agar medium*, **MEA**): 20 g/l maláta kivonat (Biolab), 0,5 g/l élesztőkivonat (Molar), táptalaj esetében 15 g/l agar (Molar).
- ❖ **Regenerációs táptalaj**: 172 g/l szukróz, 5 g/l keményítő (Molar), 2 g/l L-aszparagin, 10 g/l agar, 25 ml A oldat, 1 ml B oldat, 10 ml C oldat.
 - **A oldat**: 40 g/l KH₂PO₄, 90 g/l Na₂HPO₄, 11,6 g/l Na₂SO₄, 20 g/l ammónium-tartarát.
 - **B oldat**: 40 g/l tiamin, sterilre szűrve.
 - **C oldat**: 25 g/l MgSO₄·7H₂O (Molar).

- ❖ **Fries táptalaj:** 760 ml Fries A oldat, 40 ml Fries B oldat, 10 g/l agar, 200 ml 10 %-os glükóz oldat

- **Fries A oldat:** 2 g/l L-aszparagin, 0,5 g/l NH_4 -tartarát, 1 g/l KH_2PO_4 , 2,25 g/l NaHPO_4 , 0,28 g/l Na_2SO_4 , 100 $\mu\text{g/L}$ tiamin-HCl, 5 mg/l PABA³
- **Fries B oldat:** 100 mg/l CaCl_2 , 410 mg/l $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 5,31 mg/l vas-citrát, 5,31 mg/l citromsav, 4,43 mg/l MnSO_4 , 4,05 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- **10 %-os glükóz oldat:** 100 g/l glükóz, külön hővel sterilizálva.

3.1.1.2. Mikrobiológiai pufferek:

- ❖ **Spóra szuszpendáló puffer:** 100 $\mu\text{l/l}$ Tween 20 (Gerbu).
- ❖ **Bakteriális lízis puffer:** 0,5 ml 1 M Tris, 100 μl 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich), 25 μl 2 %-os TritonX-100 (Molar), 49,4 ml desztillált víz.

3.1.1.3. Gomba transzformálás során alkalmazott oldatok:

- ❖ **MM-oldat:** 10 ml 1 M mannitol oldat, 5 ml 0,2 M Na-maleát oldat, 5 ml desztillált víz.
- ❖ **MMC-oldat:** 10 ml 1 M mannitol oldat, 5 ml 0,2 M Na-maleát oldat, 4,5 ml víz, 0,5 ml 1 M CaCl_2 oldat.
- ❖ **PEG/ CaCl_2 :** 40 ml víz, 10 g PEG-4000 (Sigma-Aldrich), 400 μl 1 M Tris-HCl oldat (pH: 7,5), 2 ml 1M CaCl_2 oldat.

3.1.1.4. További, a gombaszövetek fixálásához, mosásához és festéséhez alkalmazott oldatok

- ❖ **Kongóvíörös oldat:** 50 ml 0,25 M NaOH (1 %), 50 mg Kongóvíörös
- ❖ **Farmer's fixáló oldat:** 25 ml jégcet, 74 ml abszolút etanol, 1 ml β -merkapto-etanol (Sigma-Aldrich).
- ❖ **PBS-oldat:** 1 M KH_2PO_4 , 1 M K_2HPO_4 , 9 g NaCl, kiegészítés 1000 ml desztillált vízre.

3.1.1.5. Molekuláris biológiai pufferek és reakcióelegyek:

- ❖ **5× Gibson Mix:** 3 ml 1 M Tris-HCl (pH: 7,5), 300 μl 1 M MgCl_2 , 600 μl 10 mM dNTP mix (Thermo Scientific), 46,3 mg DTT (Thermo Scientific), 20 mg NAD (Sigma-Aldrich), 1,5 g PEG-8000 (Sigma-Aldrich), steril desztillált vízzel 6 ml végtérfogatra kiegészítettük.

³ PABA auxotróf vad típusú *C. cinerea* AmutBmut1 törzs esetén szükséges

- ❖ **1,33x Gibson Assembly Mix:** 320 µl 5× Gibson Mix, 80 µl (40 U) Phusion (NEB), 1,2 µl (12 U) T5 exonukleáz (NEB), 160 µl (6400 U) Taq ligáz (NEB), 10 µl ET SSB (*single-strand binding protein*, egyszálú DNS-kötő fehérje) (NEB), steril desztillált vízzel való kiegészítés 1,2 ml végtérfogatra. Felhasználási térfogat: 7,5 µl.
- ❖ **Cas9 reakció puffer:** 20 mM HEPES (pH: 7,5), 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT (Thermo Scientific)

3.1.2. Törzsek

A *C. cinerea* AmutBmut1 gombatörzsben történő génkiütéshez szükséges javító-templátot hordozó vektorokat *E. coli* NEB5α bakteriális törzsben szelektáltuk, tartottuk fenn és szaporítottuk fel. A használt törzseket, illetve ezek fenntartásához szükséges körülményeket alább ismertetjük.

3.1.2.1. *Escherichia coli* - A klónozási lépésekhez és a vektor fenntartására - és felszaporításához az *E. coli* NEB5α törzset használtuk, amit LB táptalajon növesztettünk fel 37 °C-on. A bakteriális transzformálás részletes protokollját a 3.2.2.1. fejezetben ismertetjük. A transzformáns *E. coli* sejteket 100 µg/ml ampicillin-tartalmú LB táptalajon növesztettük 37 °C-on, 16 órán át.

3.1.2.2. *Coprinopsis cinerea* - A munkánk során a p-aminobenzoát (PABA) auxotróf homokarion *C. cinerea* AmutBmut1 *pab1-1* #326 törzset használtuk. Azért választottuk ezt a törzset modellül, mert a párosodási faktorokban történt mutáció miatt kompatibilis homokarion törzsszel való keresztezés nélkül is képes termőtestet hozni, így a géndelációs kísérleteket elegendő egyetlen törzsön elvégezni. További előnye, hogy a PABA auxotrófia miatt, a vad típusú törzsek nem növekednek PABA nélküli minimál táptalajon, azonban a *pab1* gént használva szelekciós markerként a mutánsok minimál táptalajon is fenntarthatóak. A *C. cinerea* törzseket YMG táptalajon növesztettük és tartottuk fent, 28 °C-on sötétben nevelve a kultúrákat.

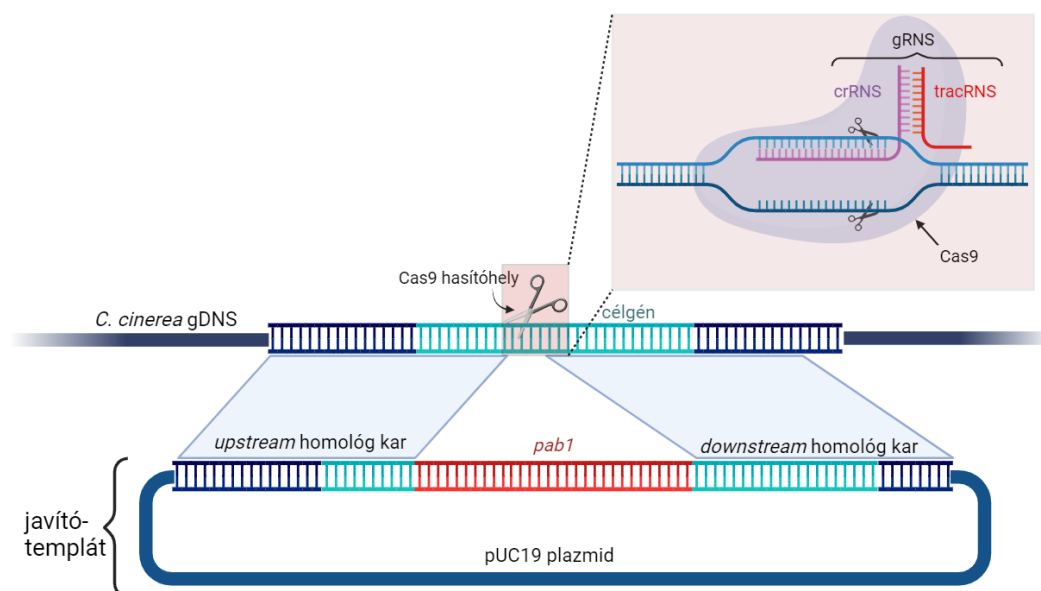
3.2. CRISPR-Cas9 alapú génkiütés

3.2.1. A gRNS tervezése

A crRNS tervezéséhez az sgRNAcas9 (verzió: 3.0.5.) (Xie és mtsai., 2014) szoftvert használtuk. A *C. cinerea* AmutBmut1⁴ törzs referencia genomját a JGI adatbázisból töltöttük le (Copci_AmutBmut1_GeneModels_FrozenGeneCatalog_20160912.fasta) (Muraguchi és mtsai., 2015). A kiütendő gén exon régióra specifikus PAM (*protospacer adjacent motif*) szekvencia (NGG: bármilyen nukleotid, guanin, guanin) és az azt megelőző protospacer (20 bp) szekvencia úgy lett kiválasztva, hogy a lehető legkisebb eséllyel tudjon a genom más részeibe bekötődni, ezáltal minimalizálva a célzott génen kívüli hasítás lehetőségét.

3.2.2. A javító-templát és RNP-komplex létrehozása

A tervezett javító-templát minden esetben tartalmazta a Cas9 hasítóhely körüli genomi régiókat (*upstream* és *downstream* homológ karok) és a pozitív szelekciós marker gént (*pab1*), ami lehetővé teszi a homológ rekombináns mutánsok későbbi szelekcióját (1. ábra).



1. ábra: A CRISPR-Cas9 mediálta kettős DNS-száltörés és a sérült szakasz helyére homológ rekombináció által beépülő javító-templát sematikus ábrája. Az ábrán az RNP-komplexet olló jelképezi. Az ábra a BioRender.com oldal segítségével készült.

3.2.2.1. A javító-templátot hordozó vektor építése, baktériumba való transzformálása és ellenőrzése - A javító-templát alapjaként a pUC19 vektor szolgált.

⁴ A *C. cinerea* AmutBmut1 törzshöz tartozó JGI fehérjeazonosítókat a dolgozatban „CopciAB”-ként tüntetjük fel.

A homológ karokként a Cas9 hasítóhelytől -10 bp és +10 bp távolságra eső, körülbelül ezer bázispár hosszú gDNS-szakaszok szolgáltak. Pozitív szelekciós markerként a vad típusú *C. cinerea pabI* gént alkalmaztuk, amit a pMA412-es plazmidról amplifikáltunk fel (Schmieder és mtsai., 2019). A javító-templátot tartalmazó vektort *Gibson Assembly* reakcióval építettük fel (Gibson és mtsai., 2009), az ehhez szükséges, fragmentumok közötti átfedő szakaszokat tartalmazó Gibson-primereket a SnapGene (verzió: 4.3.11) szoftverrel terveztük meg. Az alkalmazott primerek és ezek szekvenciái a **1. függelékben** találhatóak. A fragmentumokat magas átírási hűségű *Phusion Plus Hot Start II* polimerázzal (Thermo Scientific) amplifikáltuk a gyártó utasításait követve. A *Phusion Plus-t* 2x *Green Master Mix* tartalmazta. Az 50 µl végtérfogatú PCR reakcióelegy esetében a 10 µM *forward* és *reverz* primerekből 2,5 µl-t adtunk, és < 10 ng plazmidot vagy < 100 ng genomi DNS-t (gDNS) használtunk templátként.

A PCR körülményei a következők voltak:

98 °C - 30 mp	1 ciklus	elődenaturálás
98 °C - 10 mp	38 ciklus	denaturálás
60 °C - 10 mp		primer-kötődés
72 °C - 30 mp/1 kb		láncszintézis
72 °C - 5 p	1 ciklus	végző láncszintézis

Az amplikonokat gélelektroforézissel választottuk el (110 V, 35 perc). 100 ml 1 % (m/v) agaróz gélhez 10 µl SYBR Safe (Thermo Scientific) interkaláló festéket adtunk. Molekulasúly markerként 1 kb DNS létrát (GeneRuler 1kb, Thermo Scientific) alkalmaztunk. Az elválasztott amplikonokat Uvidoc HD6 (Uvitec, Cambridge) géldokumentáló rendszer segítségével tettük láthatóvá.

A fragmentumokat *QIAquick Gel Extraction Kit*-tel izoláltuk (Qiagen) és *NanoDrop 2000*-vel (Thermo Scientific) kvantifikáltuk. A Gibson-reakcióhoz szükséges módosított enzimmixtúrákat Rabe és Cepko (2020) által leírt módszer alapján készítettük el. A reakcióhoz szükséges linearizált vektort és a fragmentumokat 1:6 moláris arányban, összesen maximum 30 fmol mennyiségben adtuk 2,5 µl végtérfogatban a 7,5 µl *Gibson Assembly Mix*-hez, majd pedig 1 órán keresztül 50 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a Gibson reakcióelegyet rögtön felhasználtuk az *E. coli*-ba történő transzformáláshoz. Ennek során 50 µl, jégen tartott *E. coli* kompetens sejtkultúrához 5 µl Gibson reakcióelegyet adtunk, majd 10 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 2 percig

42 °C-on hűsököltük, majd fél percre visszahelyeztük jégre. Ezt követően a sejteket 950 µl SOC folyadékba (New England Biolabs) szuszpendáltuk és 100 µg/ml ampicillin-tartalmú LB táptalajt tartalmazó Petri-csészére szélesztettük ki, amit 37 °C-on, 16 órán keresztül inkubáltunk. A megjelenő telepeket 100 µg/ml ampicillin-tartalmú LB táptalajt tartalmazó Petri-csészére oltottuk át, amiket 37 °C-on, 16 órán keresztül inkubáltunk. Az inkubációs idő letelte után kolónia-PCR-t végeztünk a sikeres transzformálás és vektor-összeszerelődés ellenőrzésére: Az *E. coli* telepeket bakteriális lízispufferben feltártuk (95 °C, 5 perc), majd PCR-t mértünk össze az *upstream* homológ kar *forward* és *downstream* homológ kar reverz primereivel, *Phire Hot Start II* polimerázzal (Thermo Scientific) a gyártó utasításait követve. A *Phire* polimerázt 2× *Green Master Mix* formájában használtuk. A 16 µl végtérfogatú PCR reakcióelegy esetében 10 µM-ra kihígított *forward* és *reverz* primerekből 0,5 µl, és < 10 ng plazmidot használva vagy < 100 ng gDNS-t használva templatként. A primer-kötődési hőmérséklet primer páronként változott, a primerek becsült bekötődési hőmérsékletéhez (T_m) képest 3 °C-kal magasabb volt. Az alkalmazott primerek és ezek szekvenciái az **1. függelékben** találhatóak.

A PCR körülményei a következők voltak:

98 °C - 30 mp	1 ciklus	elődenaturálás
98 °C - 5 mp	38 ciklus	denaturálás
T _m +3 °C - 5 mp		primer-kötődés
72 °C - 15 mp/1 kb		láncszintézis
72 °C - 1 p	1 ciklus	végso láncszintézis

Az ampikonok elválasztása a korábban leírtak szerint történt. A kolónia-PCR alapján megfelelően felépült vektorokat tartalmazó *E. coli* telepeket 10 ml LB tápfolyadékban növesztettük fel (37°C, 16 óra, 110 rpm) plazmid kivonáshoz. A plazmid kivonás a *Mini Plus Kit*-tel (Viogene) a gyártó utasításainak megfelelően történt. *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific) spektrofotométerrel történő minőségi és mennyiségi ellenőrzést követően a javító-templátot hordozó vektort szekvenálással ellenőriztük (Eurofins Genomics; Ebersberg, Németország).

3.2.2.2. A javító-templát előkészítése a transzformáláshoz - A *C. cinerea* transzformáláshoz lineáris vagy cirkuláris javító-templátot alkalmaztunk. Lineáris templát esetén a *Mini Plus Kit*-tel (Viogene) izolált plazmidról történt az amplifikáció

Phusion Plus polimerázzal, a 3.2.2.1. fejezetben leírt PCR körülmények szerint, az *upstream* homológ kar *forward*, illetve a *downstream* homológ kar *reverz* primereivel. A fragmentumokat *QIAquick Gel Extraction Kit*-tel izoláltuk (Qiagen) és *NanoDrop 2000* spektrofotométerrel (Thermo Scientific) kvantifikáltuk.

Cirkuláris javító-templát esetében az összeszerelt plazmidot tartalmazó *E. coli* törzset 200 ml 100 µg/ml ampicillin-tartalmú LB táplevesben szaporítottuk fel (37 °C, 16 óra, 110 rpm) plazmid izoláláshoz. A nagy mennyiségű plazmidkivonás a *NucleoBond Xtra Midi Kit*-tel (Macherey-Nagel) a gyártó utasításainak megfelelően történt.

3.2.2.3. Az RNP-komplex létrehozása – Az RNP-komplex létrehozásához szükséges tracrNS és a crNS szintézisét az Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, Egyesült Államok) végezte. Ennek során, a gyártó utasításainak megfelelően 1,2 - 1,2 µl, 20 µM tracrNS-t és crNS-t 9,6 µl duplex pufferhez (Integrated DNA Technologies) adtuk hozzá, amit 5 percen keresztül 95 °C-on inkubáltunk, majd szobahőmérsékletűre hűtöttünk le. Ezt követően további 0,5 µl duplex puffert, 1 µg *TrueCut HiFi Cas9* enzimet (Invitrogen) és 1,5 µl Cas9 reakciópuffert (Liang és mtsai., 2018 alapján, összetételt lásd 3.1.1.3. fejezet) adtunk az elegyhez, amit 15 percig 37 °C-on inkubáltunk. Ezután az elegyet jégen tartottuk felhasználásig.

3.2.3. PEG-alapú transzformálás *C. cinerea*-ban

3.2.3.1. Protoplasztképzés - *C. cinerea* protoplasztok képzéséhez oidiumból csíráztatott fiatal micéliumot használtunk. Az oidiáltatáshoz a *C. cinerea*-t YMG táptalajon tenyésztettük 37 °C-on, 6 napon keresztül folyamatos megvilágítás mellett. A tenyészetre 2 ml 0,01 % Tween 20 oldatot mértünk, majd spatula segítségével lekapartuk az oidiumokat a micélium felszínéről. Az egy csészéről származó oidiumszuszpenziót 40 µm pórusátmérőjű sejtszűrővel (VWR) választottuk el a micéliumtörmelétől. Az így nyert tiszta oidiumszuszpenziót 50 ml YMG táplevesbe oltottuk. A tenyészetet 120 rpm-en rázatva, 37 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül. A csírázó oidiumokat 5 perc 2600 x g-n történő centrifugálással gyűjtöttük össze. A friss micéliumot sterilre szűrt, 2 %-os *VinoTaste Pro* (Novozymes) tartalmú MM-pufferbe szuszpendáltuk és 60 rpm-en rázatva 37 °C-on inkubáltuk 3-4 órán keresztül a protoplasztok megjelenéséig. A protoplasztok megjelenését fénymikroszkóppal ellenőriztük. A protoplasztképzést 25 mM CaCl₂ oldattal állítottuk le. A protoplasztokat 40 µm pórusátmérőjű sejtszűrőn (VWR) eresztettük át annak érdekében, hogy megszabaduljunk a micéliumtörmelétől. Az így

nyert tiszta protoplasztokat centrifugálással gyűjtöttük össze (10 perc, 4 °C, 640 x g) és 5 ml MMC pufferben óvatosan felfuszpendáltuk. Egy újabb centrifugálási lépést követően (10 perc, 4 °C, 640 x g) az összegyűjtött protoplasztokat MMC pufferbe vettük fel és a transzformáláshoz $10^6 - 10^7/100 \mu\text{l}$ sejtszámra hígítottuk ki MMC pufferben. Az így előkészített protoplasztokat a transzformálási folyamat megkezdéséig jégen tartottuk.

3.2.3.2. Transzformálás - A protoplasztok transzformálásához egy PEG/CaCl₂-alapú módszert alkalmaztunk, Dörnte és Kües (2012) alapján. Ennek során 100 μl protoplaszt-szuszpenzióhoz 25 μl PEG/CaCl₂ oldatot, 1 μg DNS javító-templátot és 15 μl RNP-komplexet adtunk. Kiegészítve Dörnte és Kües eredeti protokollját, utolsó lépésként 1 μl 1 %-os Triton X-100-et adtunk az elegyhez, ami a sejtmembrán-permeabilitást növelve elősegíti az RNP-komplex és a javító-templát sejtbe való bejutását (Zou és mtsai., 2021). A transzformáló elegyet 30 percig jégen tartottuk, majd 500 μl PEG/CaCl₂ oldatot adtunk hozzá és 10 percen keresztül 25 °C-on inkubáltuk. Az így kezelt protoplasztokat óvatosan összekevertük 5 ml MM-pufferrel és 40 °C-os PABA-nélküli regenerációs táptalajhoz adtuk. Ebből az oldatból 2,5 - 2,5 ml-t négy PABA-nélküli regenerációs táptalajra rétegeztük, amiket 37 °C-on, 3-4 napon át inkubáltunk a transzformáns telepek megjelenéséig. A PABA prototróf transzformáns telepeket PABA-nélküli minimál táptalajra oltottuk tovább.

3.2.4. A mutáns gombatörzsek azonosítása és izolálása

3.2.4.1. Gomba kolónia-PCR - A génkiütés sikerességét kolónia-PCR-rel ellenőriztük. A gDNS-kivonást Dörnte és Kües (2013) által leírt módszer alapján végeztük el. Ehhez egy gombostűnyi micéliumot 100 μl steril vízbe szuszpendáltuk, amit mikrohullámú sütőben melegítettünk (700 W, 1 perc), majd vortex segítségével homogenizáltuk. Az előbb leírt folyamat megismétlése után a gDNS kivonatot -20 °C-ra helyeztük 20 percre. A PCR összemérése előtt a mintát felolvasztottuk és a PCR elegyhez 0,3 μl -t adtunk a gDNS kivonatból templátként. A kolónia-PCR-t *Phire* polimerázzal (Thermo Scientific) végeztük el, a homológ karok végeitől 100-300 bp-ral kívül elhelyezkedő külső ellenőrző primerekkel és a javítótempláton belül elhelyezkedő *pabI* génre specifikus primerekkel, a 3.2.2.1. fejezetben leírt reakciókörülmények szerint. Homológ rekombináció vagy a javító-templát Cas9 hasítóhelyére történő beépülése esetén csak a mutáns kolóniákból kivont gDNS-ről vártunk PCR-terméket. Azért választottuk ezt az ellenőrző stratégiát a két külső ellenőrző primer helyett, mert utóbbiak használatával a mutánsok esetében a

PCR-termék mérete túl nagy lehet és nem minden esetben működik ezek amplifikálása. Az ellenőrzéshez használt primerek és ezek szekvenciái az **1. függelékben** találhatóak.

3.2.4.2. Tiszta törzsek izolálása oidiáltatással - A PCR alapján mutáns és vad típusú, kevert törzseket oidiáltatással izoláltuk. Az oidiáltatáshoz a kevert *C. cinerea*-t törzset előtenyésztettük YMG táplemezen 37 °C-on, 6 napon keresztül, folyamatos megvilágítás mellett. Az inkubációs idő letelte után 2 ml spóra szuszpendáló puffert mértünk a tenyészet felszínére amibe egy spatulával lekapartuk az oidiumokat a micélium felszínéről. Tiszta törzsek izolálása érdekében az oidiumszuszpenziót olyan mértékben hígítottuk ki, hogy minimál táptalajra leoltva csészénként maximum 10 telep legyen képes felnőni. A telepek inkubálást (2 nap, 37 °C) követően váltak láthatóvá és izolálhatóvá. A felnőtt telepek tisztaságát kolónia-PCR-rel ellenőriztük a 3.2.2.1. fejezetben leírtak alapján.

3.2.5. Génkomplementálás

Génkomplementáláshoz először a komplementáló-vektort építettük fel a 3.2.2.1 fejezet alapján annyi változtatással, hogy a kiűtött gén végeitől számított, körülbelül 1000-1000 bp-ra elhelyezkedő primerekkel a vad-típusú gDNS-ről szaporítottuk fel a natív gént, továbbá annak promóterét és terminátorát tartalmazó homológ karokat. Az alkalmazott primerek és ezek szekvenciái az **1. függelékben** találhatóak. A fragmentumokat pUC19 linearizált vektorba építettük össze *Gibson Assembly*-vel. Az ellenőrző és vektorszaporítási lépéseket követően a mutáns törzset a 3.2.3.2.-es fejezetben leírtak szerint transzformáltuk annyi változtatással, hogy RNP-komplexet nem adtuk a transzformáló elegyhez, csak a komplementáló-vektort. A hősokkot követően, a transzformált protoplasztokat 2 ml MM pufferbe vettük fel, majd 500-500 µl szuszpenziót szélesztettünk PABA-nélküli regenerációs táptalemezre, amit 37 °C-on inkubáltuk 16 órán keresztül. Az inkubációt követően 5 ml 600 µl/ml higromicin B-tartalmú kézmeleg regenerációs táptalajt rétegeztünk a táptalemezre, amit 37 °C-on 3-4 napig tovább inkubáltunk a transzformáns telepek megjelenéséig. A megjelent telepeket PABA-nélküli minimál táptalajra oltottuk tovább.

3.3. Mutáns fenotipizálás

3.3.1. Szinkronizált termőtestképzés

Szinkronizált termőtestképzéshez a *C. cinerea* kultúrákat *YMG_{1/2}* agar lemezen növesztettük 6 napon keresztül 28 °C-on sötétben, amíg a telep széle közel el nem érte a Petri-csésze peremét, majd pedig 2 óra időtartamra fényre helyezve indukáltuk a termőtestképzést. Ezt követően 12 órás fény/sötét ciklusokat alkalmazva növesztettük tovább a tenyészetet 28 °C-on, 80 %-os páratartalom mellett.

3.3.2. Termőtestképzés szulfátos táptalajon

A *C. cinerea* kultúrákat 250 ml-es Erlenmeyer lombikban lévő, 0,2 mM CuSO₄-val és 0,2 mM MgSO₄-val kiegészített 50 ml *YMG_{1/2}* agar lemezekre oltottuk le és neveltük a szinkronizált termőtestképzéshez szükséges körülmények mellett (lásd a fenti 3.3.1 fejezetet) nagyobb számú termőtestet tudunk képezetni (Navarro González, 2008).

3.3.3. Micélium növekedési ráta meghatározása komplett, szén- és nitrogénhiányos táptalajon

A vad típusú és a mutáns törzsek micéliumának növekedési rátájának meghatározására komplett YMG-t, komplett Fries táptalajt és szénforrás (glükóz) vagy nitrogénforrás (ammónia-tartarát, aszparagin) nélküli Fries táptalajokat használtunk. Minden táptalaj-típus szerint törzsenként 6-6 párhuzamos, ismételt leoltást végeztünk el. A táplemez közepére egy 5 mm átmérőjű micélium korongot helyeztünk, amit 28 °C-on 6 napon át növesztettünk. A telepátmérőt 24 óránként lemértük, amiből meghatároztuk a micélium növekedési rátáját. A vad típusú és mutáns törzsek különböző táptalajokon megfigyelt növekedési rátái közti különbség mértékét kétszemponos-varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg a JASP (verzió: 0.17.1) szoftver alkalmazásával (JASP, 2023).

3.3.4. Micélium tömegének meghatározása komplett táptalajon

A vad típusú és a mutáns törzsek micéliumtömegének meghatározásához 5 mm átmérőjű micélium korongot helyeztünk rá előzetesen lemért tömegű, celofánnal borított YMG táplemezre, majd 28 °C-on növesztettük 6 napon át. Törzsenként 5-5 párhuzamos ismétlést végeztünk el. Ezt követően lemértük a micélium nedves tömegét a celofánnal együtt, levonva belőle a celofán előzetesen lemért tömegét. A micélium száraz tömegének meghatározásához a nedves micéliumot kilyukasztott parafilmmel fedett

Eppendorf-csövekbe helyeztük, majd 16 órán keresztül 2 Pa vákuum nyomáson, -60 °C-on liofilizáltuk (Benchtop K, VirTis). A vad típusú és mutáns törzsek tömege között fennálló esetleges szignifikáns különbséget egyszempontos-varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg a JASP (verzió: 0.17.1) szoftver alkalmazásával (JASP, 2023).

3.3.5. LiCl-kezelés okozta termőtestképzés-gátlás

A LiCl termőtest-gátló hatásának vizsgálatára a vad típusú és a mutáns törzseket eltérő LiCl-koncentrációjú (0 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l, 2 g/l, 3 g/l) YMG_{1/2} táptalajokra oltottuk és a 3.3.1. fejezetben leírtak szerint inkubáltuk őket. Minden törzsre és LiCl-koncentrációra 5-5 párhuzamos ismétlést végeztünk el.

3.3.6. Bazídiumok vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal

A fiatal termőtestek lemezeiből történő mintavételezést a fényciklus 12. órájában végeztük el és ezzel párhuzamosan egy részét fluoreszcens festésnek vetettük alá. A sejtmagok jelöléséhez szikével kivágott középrészi lemezmintákat 15 percig sötétben inkubáltuk 100 µl, 10 µg/ml Hoechst 33342 oldatban (Thermo Scientific), amit az inkubálást követően kétszer mostunk 200 µl PBS oldattal. A mintákat Zeiss LSM 800 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Mivel a Hoechst 33342 extinkciós csúcsa: 361 nm és az emissziós csúcsa: 497 nm, ezért ultraibolya tartományban gerjesztettük és vizsgáltuk a mintákat.

A kapott fluoreszcens és fénymikroszkópos képeket ezt követően a ImageJ/Fiji (verzió: 1.54f) szoftverrel hoztuk átfedésbe (Schindelin és mtsai., 2012; Schneider és mtsai., 2012). A több metszeti síkban készült fluoreszcens képeken a jelölt sejtmagokat az egyes metszeti síkok szerint színkóddal jelöltük. A különböző metszeti síkokban készült fénymikroszkópos képeket is egymásra vetítettük a maximális intenzitásukat megtartva.

3.3.7. Spóraszám meghatározása

A spóraszám meghatározásához 100 mg érett kalapszövetet vettünk, amit 1 ml spóra szuszpendáló pufferben 1 percen át alapos vortexeléssel maceráltunk. Ezt követően a spórákat 40 µm-es sejtszűrő segítségével választottuk el a törmeléktől. A spórák számát Bürker-kamra segítségével határoztuk meg. A számlálást törzsenként minimum öt

párhuzamos mintán végeztük el és ezek átlagából határoztuk meg a 100 mg kalapszövetre vetített átlagos spóraszámot.

3.4. *C. cinerea* mintázása RNS-szekvenáláshoz és transzkriptomikai kiértékelése

Az alábbi alfejezetekben a vad típusú és $\Delta snb1$ *C. cinerea* törzsek termőtest iniciációja során jelentkező expressziós különbségek feltárására, valamint a spóráképzés folyamatának megértésére irányuló transzkriptomikai vizsgálatokhoz szükséges protokollokat és technikai részleteket fogjuk ismertetni.

3.4.1. *Fényindukciót követő fejlődési stádiumok meghatározása és mintázása $\Delta snb1$ és vad típusú törzsekben*

A korai termőtestfejlődés vizsgálatához szükséges mintázáshoz a törzseket a szinkronizált termőtestképzés során leírt módszer alapján növesztettük a 3.3.1. fejezet alapján. A fényindukciót követő 24. és 48. órában a kolóniákat 10 ml Farmer's oldattal fixáltuk és 30 percig vákum-pumpa alá helyeztük. A fixálást követően a hifacsomókat és a primordiumokat tüvel gyűjtöttük össze egy Eppendorf-csőbe, minden stádiumból 3-3 mintát. A mintákat folyékony nitrogénnel fagyasztottuk és RNS-kivonásig -80°C -on tároltuk. Az RNS-kivonást megelőzően a mintákat háromszor mostuk 1 ml dietil-pirokarbonát (DEPC)-kezelt desztillált vízzel. Az RNS-kivonást és szekvenálást a 3.4.3. fejezet szerint végeztük el a.

3.4.2. *A spóráképzés stádiumainak meghatározása és mintázása RNS-szekvenáláshoz*

A spóráképzés vizsgálatához a vad típusú *C. cinerea* termőtestképzését a 3.3.1.-es fejezetben leírtak szerint szinkronizáltuk. A vizsgálatához a fényciklus 7., 8. és 9. órájában járó lemezeket mintáztuk. Ehhez szikével eltávolítottuk a kalap széléhez közeli lemezeket és a kalap csúcsát, és a középső régió lemezeit egy steril mikrocentrifuga csőbe helyeztük, amit folyékony nitrogénnel lefagyasztottunk és további felhasználásig -80°C -on tároltunk. A mintázott stádium fejlettségi állapotát minden esetben Leica DM2500 fénymikroszkóppal ellenőriztük, ami során a tárgylemezen a szövetek láthatóságát 10 μl , 0,1 %-os kongóvörös oldat hozzáadásával növeltük. A mintákat folyékony nitrogénnel történő fagyasztás után mikropisztilussal homogenizáltuk, majd pedig a 3.4.3. fejezet alapján végeztük el az RNS-kivonást és szekvenálást.

3.4.3. RNS-kivonás és RNS-szekvenálás

A homogenizátumból teljes RNS-t vontunk ki *Quick-RNA Mini-Prep Kit*-tel (Zymo Research), a gyártó utasításait követve. Az RNS minták koncentrációját *NanoDrop 2000* spektrofotométerrel (Thermo Scientific), a fragmentálódás mértékét pedig gélelektroforézissel és *Bioanalyzer 2100* készülékkel (Agilent Technologies) határoztuk meg. A szekvenálásra küldés feltétele a minimum 7,8 feletti RNS integritás érték volt. Az RNS-szekvenálást a Novogene cég (Cambridge, Egyesült Királyság) végezte el: A szélspecifikus cDNS könyvtár poly(A)-végű RNS átírásával történt *Illumina TruSeq Stranded RNA-Seq* könyvtárkészítő kit-tel. A szekvenálás *Illumina Novaseq 6000 (S4)* berendezéssel történt, páros-végű (150 bp) szekvenálással.

3.4.4. Az RNS-szekvenálási eredmények előkészítése

A nyers leolvasások (*read*-ek) feldolgozását és a transzkriptomikai adatsor felállítását Merényi Zsolt, Hegedüs Botond és Bálint Balázs (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet) végezték. A nyers leolvasások ellenőrzése, ami magába foglalta az adaptorok, bizonytalan nukleotidok és a leolvasások alacsony minőségű végeinek levágását, a BBDUK szoftver (BBMap/BBTools; <http://sourceforge.net/projects/bbmap/>) segítségével történt, megkövetelve, hogy a levágás minőségi pontszáma minimum 30, és a leolvasási hossz minimum 50 bp legyen. Két körös STAR illesztést (Veeneman és mtsai., 2016) végeztünk el a referencia genommal szemben követve Merényi és munkatársai (2022) által meghatározott paramétereket. Az expressziós értékek FPKM-ben lettek számolva (*Fragments per Kilobase per Million mapped reads*, leolvasások száma 1000 bázisonként, egymillió térképezett leolvasásra vetítve). A szignifikánsan eltérő expressziót mutató géneknek (*Differentially Expressed Gene*, DEG) azokat a géneket tekintettük, amik expressziója 5 FPKM feletti legalább az egyik minta három biológiai replikáinak átlaga alapján, és a Benjamini-Hochberg-módszerrel korrigált T-teszt *p*-értéke a minták között kisebb vagy egyenlő 0,05-nél, valamint adatsortól függően teljesítették az összehasonlított stádiumok közti expressziós különbségre vonatkozó kritériumokat (lásd 3.4.4.1. és 3.4.4.2. fejezetek).

3.4.4.1. Vad-típusú és *snb1* mutáns törzsek összehasonlító transzkriptomikai eredményeinek kiértékelése - A DEG-ek meghatározása a 3.4.4. fejezet szerint történt, kiegészítve azzal a megkövetéssel, hogy a vad típusú és $\Delta snb1$ törzsek korai fejlődési

stádiumainak összehasonlításában a DEG-ek FPKM értékeinek \log_2 stádiumközi szorzóváltozójának (*fold-change*, *FC*) alacsonyabbnak kellett lennie, mint -1 vagy nagyobb, mint 1.

3.4.4.2. A spóráképzés stádiumainak transzkriptomikai eredményeinek kiértékelése

A DEG-ek meghatározása a 3.4.4. fejezet szerint történt, kiegészítve azzal a megkötéssel, hogy a spóráképzés stádiumainak összehasonlításában a DEG-ek FPKM értékeinek \log_2 FC-ének alacsonyabbnak kellett lennie, mint -1,5, vagy nagyobb, mint 1,5. A DEG definíció szigorítására azért volt szükség a spóráképzés adatsorban, hogy kezelhetőbb számú és dinamikusabb expresszióváltozást mutató génekkel tudjuk tovább folytatni az analízist.

A DEG-eket az expressziós mintázatuk szerint öt profilba csoportosítottuk a *Short Time-series Expression Miner* (STEM) szoftverrel (verzió: 1.3.13) (Ernst és Bar-Joseph, 2006) az alapbeállításokat alkalmazva. Ezek közül azokat a profilokat tekintettük szignifikánsnak, amik a várt génszámhoz képest $p \leq 0,05$ valószínűséggel magasabb számú DEG-et foglaltak magukba.

A DEG-ekhez tartozó “eukarióta ortológ csoportok” (*EuKaryotic Orthologous Groups*, KOG) annotációkat a JGI oldaláról töltöttük le. A KOG egy génannotáció alapú osztályozási rendszer, ami az eukarióta ortológ géncsoportokat alapul véve funkcionális kategóriákat állít fel (Tatusov és mtsai., 2003). Az egyes profilokban előforduló szignifikánsan dúsuló KOG-osztályokat hipergeometriai teszttel határoztuk meg az R statisztikai alap programnyelvben használt `phyper()` függvény alkalmazásával.

A DEG-ek funkcionális analízise, ami a konzervált domének azonosítását és génontológiai kifejezések (*gene ontology*, GO) dúsulásának vizsgálatát foglalta magába, Merényi Zsolt és Hegedüs Botond (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet) végezték el. A konzervált doméneket InterProScan-nel (verzió: 5.61-93.0) határoztuk meg (Jones és mtsai., 2014). A GO-kategóriák dúsulási analízisét a „topGO” (verzió: 2.44.0) R-programcsomaggal végeztük el (Alexa és Rahnenfuhrer, 2016).

A szövetspecifikus kifejeződés meghatározásához Krizsán és mtsai. (2019) újraszámolt transzkriptomikai eredményeit használtuk fel, ami során a vegetatív micéliumból, valamint a fiatal termőtest állapotban megtalálható három elkülöníthető szövetféleségből (tönk-, lemez- és a lemezt nem tartalmazó kalapszövet) származó expressziós eredményeket hasonlítottuk össze egymással a “TissueEnrich”

programcsomag segítségével R programnyelvi környezetben (Jain és Tuteja, 2019) az alapértelmezett paramétereket használva és az expressziós FC küszöbértékét 4-re emelve.

3.4.5. Az SNB1 filogenetikai analízise

Az SNB1 filogenetikai analízisét Merényi Zsolt (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet) végezte. Az SNB1 konzerváltsági szintjének meghatározásához egy korábban publikált filogenetikai adatsort használtunk, ami többnyire Agaricomycotina, de Pucciniomycotina és Ustilaginomycotina, valamint tömlősgomba fajokat is magába foglaló, 109 faj tartalmazó filogenetikai fát tartalmazott (Merényi és mtsai., 2022). A 109 faj fehérje-kódoló génjei az OrthoFinder2 (verzió: v2.4.1) szoftverrel (Emms és Kelly, 2019) kerültek klaszterezésre, rögzített fajfa topológiát és az alap beállításokat használva. A *Sistotremastrum suecicum* (Sissu1), *Sistotremastrum niveocremaum* (Sissni1) és *Scleroderma citrinum* (Sclici1) fajokban az OrthoFinder2 nem talált ortológokat, így ezekben az SNB1 homológok meglétét manuálisan ellenőriztük BLAST-tal, függetlenül a fent leírt klaszterezéstől. Az SNB1-t tartalmazó klaszter tagjaival többszörös szekvenciaillesztést végeztünk el a MAFFT szoftverrel (verzió: v6.864b) (Katoh és Standley, 2013) és a minták több mint 80 %-ban “gap”-t (indel következtében létrejött mutáció) tartalmazó részeit a TrimAL (gt -0.2) (verzió: 1.2) szoftverrel vágtuk le (Capella-Gutiérrez és mtsai., 2009). Az LG+G modellel becsült maximum likelihood génfa ágainak támogatottsága 1000 ultrafast bootstrap ismétléssel lett kiszámítva az IQ-TREE (verzió: 1.6.12) szoftver segítségével (Minh és mtsai., 2020). A génfa gyökereztetése, illetve a fajfa/génfa összeegyeztetése (*reconciliation*) a NOTUNG (verzió: 2.9) szoftverrel történt (Darby és mtsai., 2017). Végezetül, a génfán belüli ortocsoportok meghatározásához és megjelenítéséhez, valamint a klaszterekben történt génduplikációk és génvesztések becslésére a COMPARE (<https://github.com/zsmerenyi/compaRe>) (Merényi és mtsai., 2023; Nagy és mtsai., 2014) eszközt alkalmaztuk.

3.4.6. A vizsgált gének funkcionális annotációja

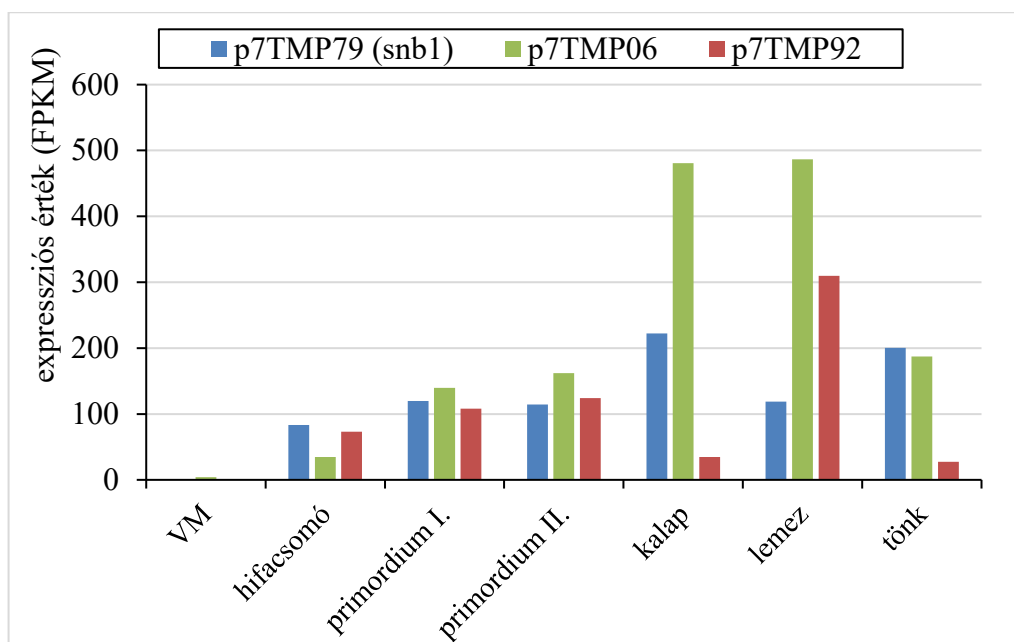
A vizsgált gének által kódolt fehérjék prediktált sejten belüli lokalizációját WoLF PSORT-tal határoztuk meg (Horton és mtsai., 2007). A fehérjék transzmembrán hélixekinek számát és irányultságát a DeepTMHMM-mel (verzió: 1.0.24) (Hallgren és mtsai., 2022), a prediktált harmadlagos szerkezeti struktúrát pedig az AlphaFold-val (verzió: 2022-11-01) (Jumper, 2021; Varadi, 2021) határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. A *C. cinerea* termőtestfejlődésben részt vevő p7TMP-ek jellemzése reverz genetikai analízissel

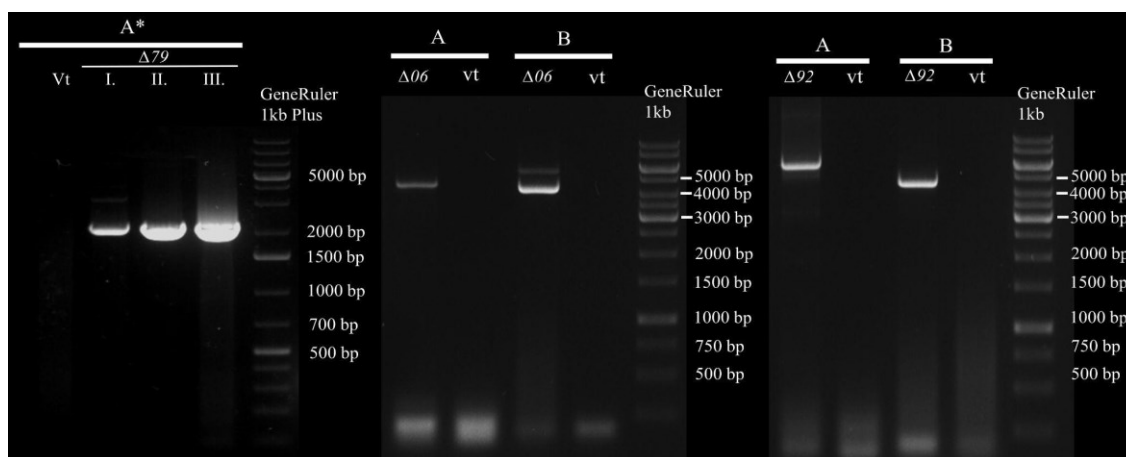
Annak érdekében, hogy a bazídiumos modellgomba *C. cinerea*-ban meghatározzuk a klasszikus GPCR-ekre szerkezetileg hasonlító p7TMP-repertoárt, első lépésként megbecsültük azoknak a géneknek a számát, amik 7-transzmembrán fehérjét kódolnak. A transzmembrán szerkezeti becslést DeepTMHMM szoftverrel végeztük el. Ennek eredményeképpen összesen 374 olyan fehérjét kódoló gént találtunk, amelyek 7-transzmembrán doménnel rendelkezhetnek. Mivel a klasszikus GPCR-ek N-terminális része a sejten kívülre, míg a G-fehérjékkel kölcsönható C-terminális része pedig a sejtplazma felé néz, ezért vizsgálatainkat a 332, szerkezetileg extracelluláris N-terminussal és intracelluláris C-terminussal rendelkező prediktált fehérjéket kódoló génekkel folytattuk tovább. InterPro doménpredikációs eszközzel meghatároztuk a p7TMP-k konzervált motívumaihoz tartozó annotációkat, amik alapján 32 p7TMP kizárásra került. Ezek az InterPro annotációk szerint más receptorcsaládba tartoztak (pl. ABC-transzporterek). Ez alapján a *C. cinerea* genomja összesen 12 klasszikus GPCR-t kódol, köztük öt Git3 glükóz-receptort és hét STE3 gomba feromon-receptort, míg a további 289 p7TMP strukturálisan nagy hasonlóságot mutat a GPCR-ekkel, de nem rendelkeznek a klasszikus GPCR-ekre jellemző motívumokkal. Ezek közül 115 mutatott legalább kétszeres expressziószint-emelkedést a termőtestképzés során a vegetatív micéliumhoz képest, amik közül 14 rendelkezett ortológokkal legalább négyben az összehasonlításba bevont további 11 Agaricomycetes fajból (Nagy és mtsai., 2023). A 14 konzervált p7TMP közül kilenc nem rendelkezett ismert funkcióhoz köthető annotációval, így a reverz genetikai analízishez ezek közül választottuk ki a kiütendő génjelölteket.

Három, ismeretlen funkciójú konzervált p7TMP-kódoló gént választottuk ki funkcionális analízisre, amik Krizsán és mtsai. (2019) termőtestfejlődést vizsgáló transzkriptomikai adatai alapján elhanyagolható mértékű kifejeződést mutattak a vegetatív micéliumban, azonban a konzervált p7TMP-ek között a legnagyobb expressziós különbséget mutatták a vegetatív micélium és a másodlagos hifacsomó vagy a első stádiumú primordium között. Ezek a CopciAB_493979 = p7TMP79 (*snb1*), CopciAB_499106 = p7TMP06 és CopciAB_478792 = p7TMP92 azonosítójú gének voltak (2. ábra).



2. ábra: Reverz genetikai vizsgálatra kiválasztott p7TMP kódoló gének expressziós értékei a *C. cinerea* egyedfejlődésének egyes stádiumaiban, Krizsán és mtsai. (2019) adatai alapján. VM: vegetatív micélium.

A három génjelöltet RNP-komplex alapú CRISPR /Cas9 rendszerrel ütöttük ki abból a célból, hogy megfigyelhessük a gén hiányában fellépő morfológiai változásokat a termőtestképzés során. A gének deléciójának sikerességét PCR-rel ellenőriztük (**3. ábra**).



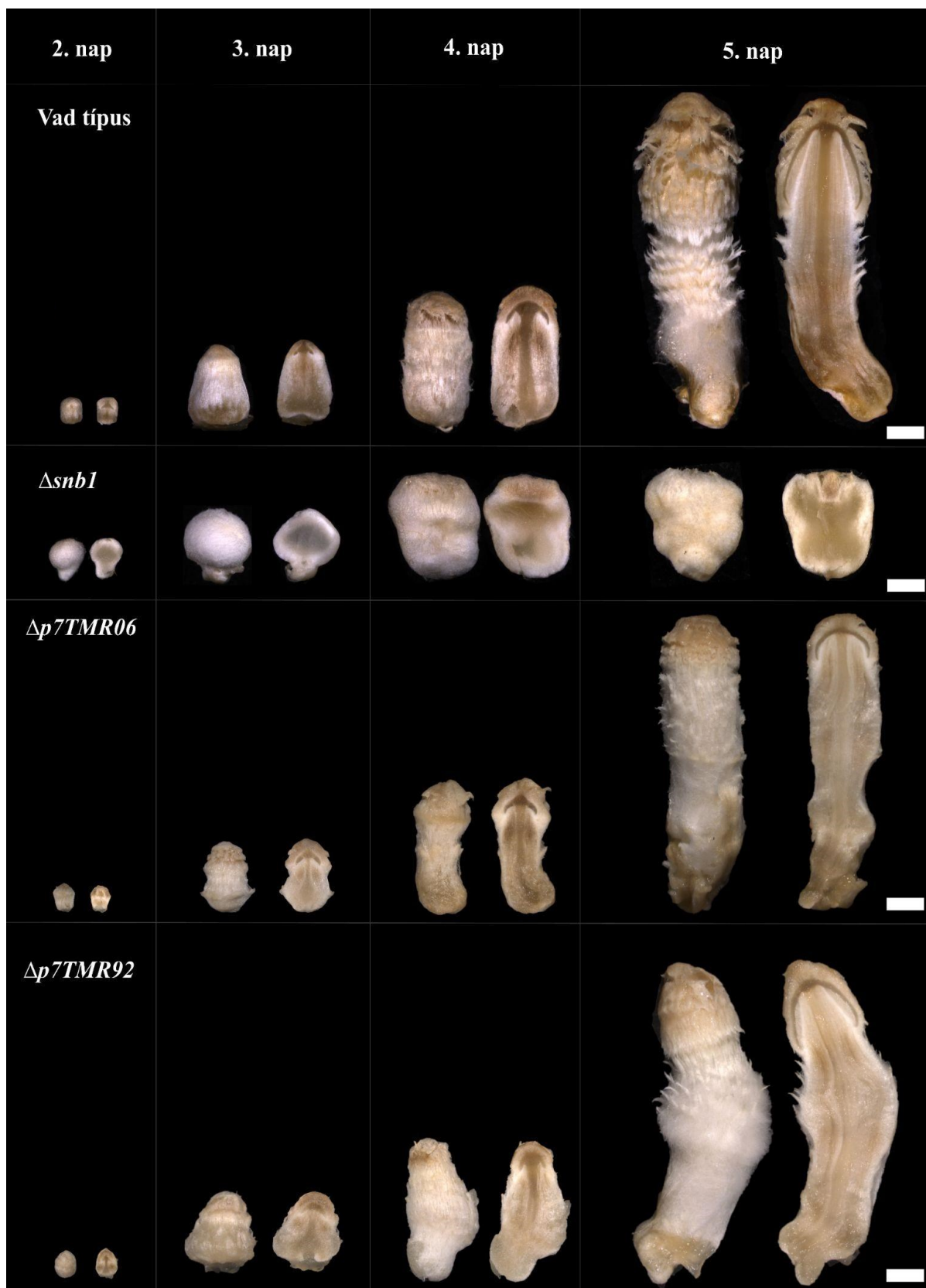
3. ábra: A p7TMP mutánsok PCR-ellenőrzése. A p7TMP mutánsokhoz tartozó mintákat a következő rövidítésekkel jelöltük: $\Delta 79$ = p7TMP79, $\Delta 06$ = p7TMP06, $\Delta 92$ = p7TMP92. A p7TMP79 esetében három független mutáns törzset kaptunk (I., II. és III.). Az ellenőrzéshez külső, a javítótempláton található homológ karokon kívülre eső ellenőrző primereket (“checking”) és a szelekciós markerre (*pab1*) specifikus primereket belső primereket (“PABA”) használtuk. A*: p7TMP79_checking_fwd/PABA_inner_250bp_rev (javítótemplátnak a Cas9 hasítóhelybe való integrációjakor várt ampikonméret 2090 bp); A: checking_fwd/PABA_rev (homológ rekombinációkor várt méret a p7TMP06 esetén: 4443bp, p7TMP92 esetén: 4901bp), B: PABA_fwd/checking_rev (homológ rekombinációkor várt méret a p7TMP06 esetén: 4282bp, p7TMP92 esetén: 4245bp). Vad típusú törzsből izolált gDNS-t használva templátként egyik esetben sem vártunk PCR-terméket. Az ellenőrzéshez használt primerek az 1. függelék táblázatában találhatóak.

A p7TMP06 független deléciós törzsek esetében tömegesen jelentek meg a vad típushoz morfológiailag hasonló primordiumok. Többszöri leoltást követően sem tapasztaltuk azt, hogy a fiatal termőtestek be tudták volna fejezni az érésüket (**4. ábra**).



4. ábra: A p7TMP06 mutáns törzs által hozott primordiumok morfológiája a fényindukciót követő harmadik, negyedik, illetve ötödik napon.

A p7TMP06 és p7TMP92 deléciós mutánsok termőtestei nem mutattak jelentős eltérést a vad típusú morfológiától (**5. ábra**). A legsúlyosabb morfológiai elváltozásokat az p7TMP79 deléciós mutánsnál figyeltük meg, amelyek esetében a primordiumokban elmaradt a szöveti differenciáció, így a struktúrák hiánya miatt ezek belseje teljesen homogén maradt. Mind a három független *p7TMP79* deléciós mutáns törzs ugyanazt a fenotípust mutatta. A Δ p7TMP79 törzs hógolyó-szerű morfológiai jellegzetességei miatt a CopciAB_493979 azonosítójú gént az angol “snowball” után *snb1*-nek neveztük el. Mivel a Δ *snb1* törzsnél látott fenotípushoz hasonlót a legjobb tudásunk szerint a szakirodalomban még nem írtak le, ezért ezt a törzset részletes vizsgálatnak vetettük alá annak érdekében, hogy ellenőrizzük, vajon az *snb1* hiánya milyen fejlődési folyamatokra lehet kihatással.

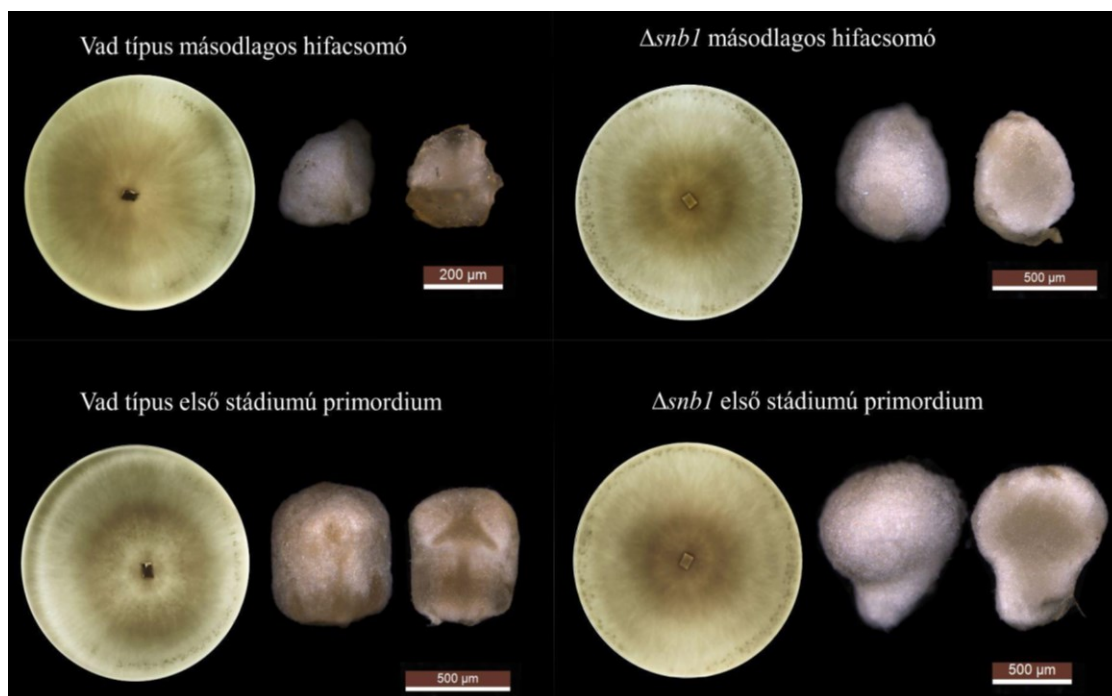


5. ábra: A kiválasztott prediktált 7-transzmembrán receptort kódoló gén deléciós mutánsainak egyedfejlődésének stádiumai a fényindukciót követő 2.-5. napokon. A legsúlyosabb morfológiai elváltozásokat a $\Delta snb1$ esetében figyeltük meg. Méretskála: 1 mm. Az összes fejlődési stádium a méretskálával arányosan került ábrázolásra. Mivel a $p7TMR06$ sajátos, sereges növekedést mutató fenotípusa nem megjeleníthető az ezen az ábrán, ezért ezt a 4. ábrán külön helyeztük el.

4.1.1. A *C. cinerea* *snb1* deléciós törzs morfológiai vizsgálata

4.1.1.1. Micélium - Korábbi transzkriptomikai eredmények alapján az *snb1* expressziója a micéliumban a detekciós szint alatt van (Krizsán és mtsai., 2019), ezért feltételeztük, hogy csak a termőtest fejlődésére van hatással. Ellenőriztük a $\Delta snb1$ törzsek micéliumának növekedési ütemét és tömegét a vad típusú törzsszel összehasonlítva. A növekedési ütemet tápanyaggazdag és éhezési körülmények között is jellemeztük, amihez komplett (YMG és Fries), továbbá szén- és nitrogénforrást nem tartalmazó Fries táptalajokra oltottuk le a törzseket. A vad típusú és a három független $\Delta snb1$ törzs növekedési rátái között nem találtunk szignifikáns különbséget (kéttényezős ANOVA, $p = 0,460$) **(2. függelék)**. A vad típusú és $\Delta snb1$ mutáns törzsek micéliumainak tömege között sem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget (egytényezős ANOVA, száraz micéliumtömegek: $p = 0,353$; nedves micéliumtömegek: $p = 0,993$) **(3. függelék)**. Ezen adatok alapján megállapítható, hogy az *snb1* hiánya a micélium növekedését és morfológiáját nem befolyásolta, azonban a termőtest megfelelő fejlődéséhez és a szöveti differenciációhoz nélkülözhetetlen **(5. ábra)**.

4.1.1.2. Termőtest - A $\Delta snb1$ mutánsok hifacsomói fényindukció hatására a vad típushoz hasonlóan a micélium szélén, körben jelentek meg, azonban fényindukció hiányában, a micéliumon szétszórva is növekedtek. Már a fényindukciót követő 24. órában megjelenő másodlagos hifacsomók is jelentősen nagyobb méretbeli különbséget mutattak a vad típushoz képest. Az ezek között tapasztalt méretbeli különbség a fényindukciót követő 48. órában, az első stádiumú primordium állapotot elérve mérséklődött **(6. ábra)**. Míg a vad típusú primordiumok hosszirányba növekedtek és enyhén sárgásbarna színűek voltak, addig a $\Delta p7TMP79$ primordiumok gömbölyded alakúak és teljesen fehér színűek maradtak egészen a második stádiumig. Négy nappal a fényindukciót követően a primordiumok csúcsi részén megjelent egy csökevényes kalapkezdemény, ami később besüllyedt a primordiumba, annak oldalirányú növekedése miatt **(5. ábra)**. Azonban, a belső struktúrálódás még ennél a kései stádiumban sem kezdődött meg, így a termőtestek belseje továbbra is homogén maradt, látható szöveti differenciáció nélkül **(5. ábra)**.



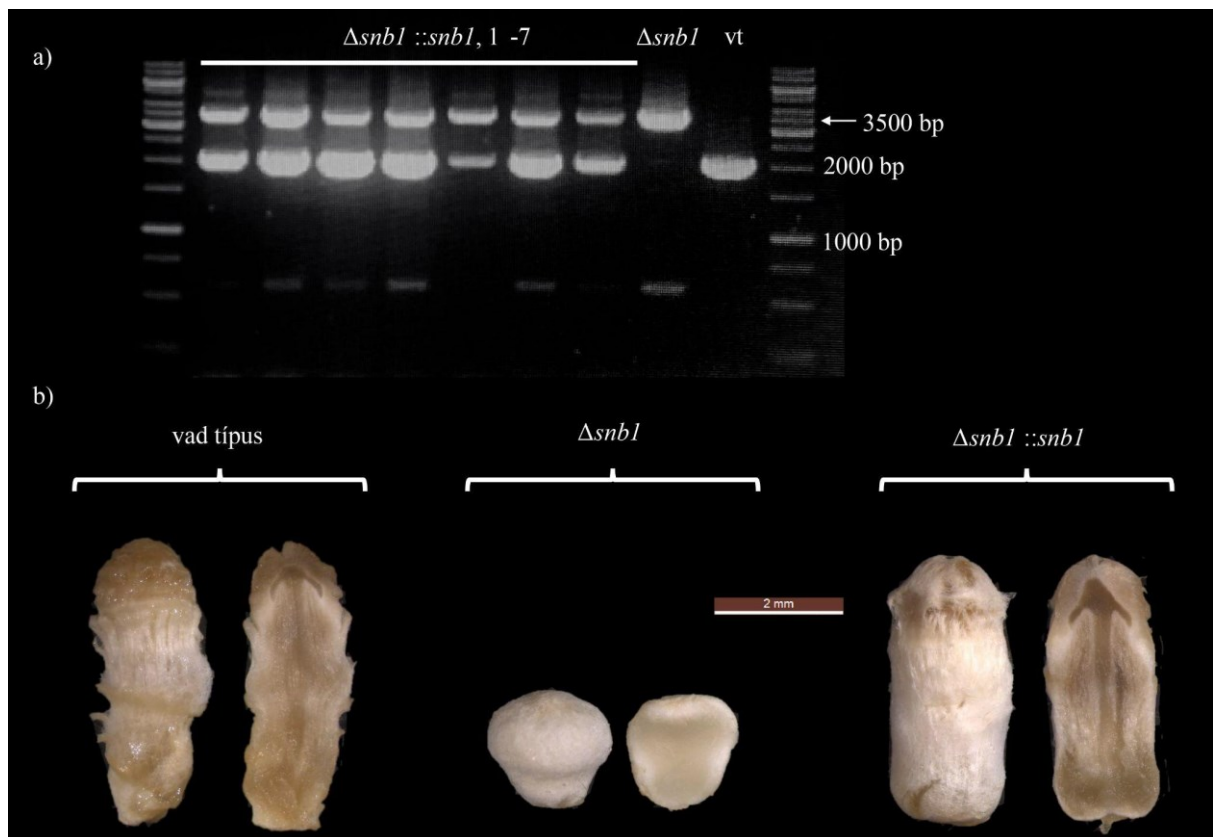
6. ábra: A vad típusú és $\Delta snb1$ törzsek által hozott másodlagos hifacsomók (vad típus: $d = \sim 200 \mu m$, $\Delta p7TMP79$: $d = \sim 550 \mu m$) és első stádiumú primordiumok (vad típus: $d = \sim 500 \mu m$, $\Delta p7TMP79$: $d = \sim 750-900 \mu m$) a fényindukciót követő 24. és 48. órában.

4.1.1.3. „Dark-stipe” - Fényindukció hiányában a vad típusú *C. cinerea* a primordiumból kinövő és a nodulusz megnyúlásával létrejövő csökevényes kalappal és tönkkel rendelkező képletet, ún. “dark stipe”-ot hoz létre (Tsusué, 1969). A $\Delta snb1$ törzs által növesztett primordiumok azonban folyamatos sötétség mellett is gömb alakúak maradtak, és nem voltak képesek létrehozni a “dark stipe”-ot (**7. ábra**).



7. ábra: A vad típusú és $\Delta snb1$ törzsek által létrehozott képletek két hét sötétben történő növesztést követően. A vad típusú törzs erősen megnyúlt, ún. “dark stipe”-okat hozott létre (az ábrán a képletek 90°-kal elforgatva), a $\Delta snb1$ törzs által képzett képletek nem nyúltak meg, hanem oldalirányba növekedtek és szférikusak maradtak. Méretskála = 2 mm.

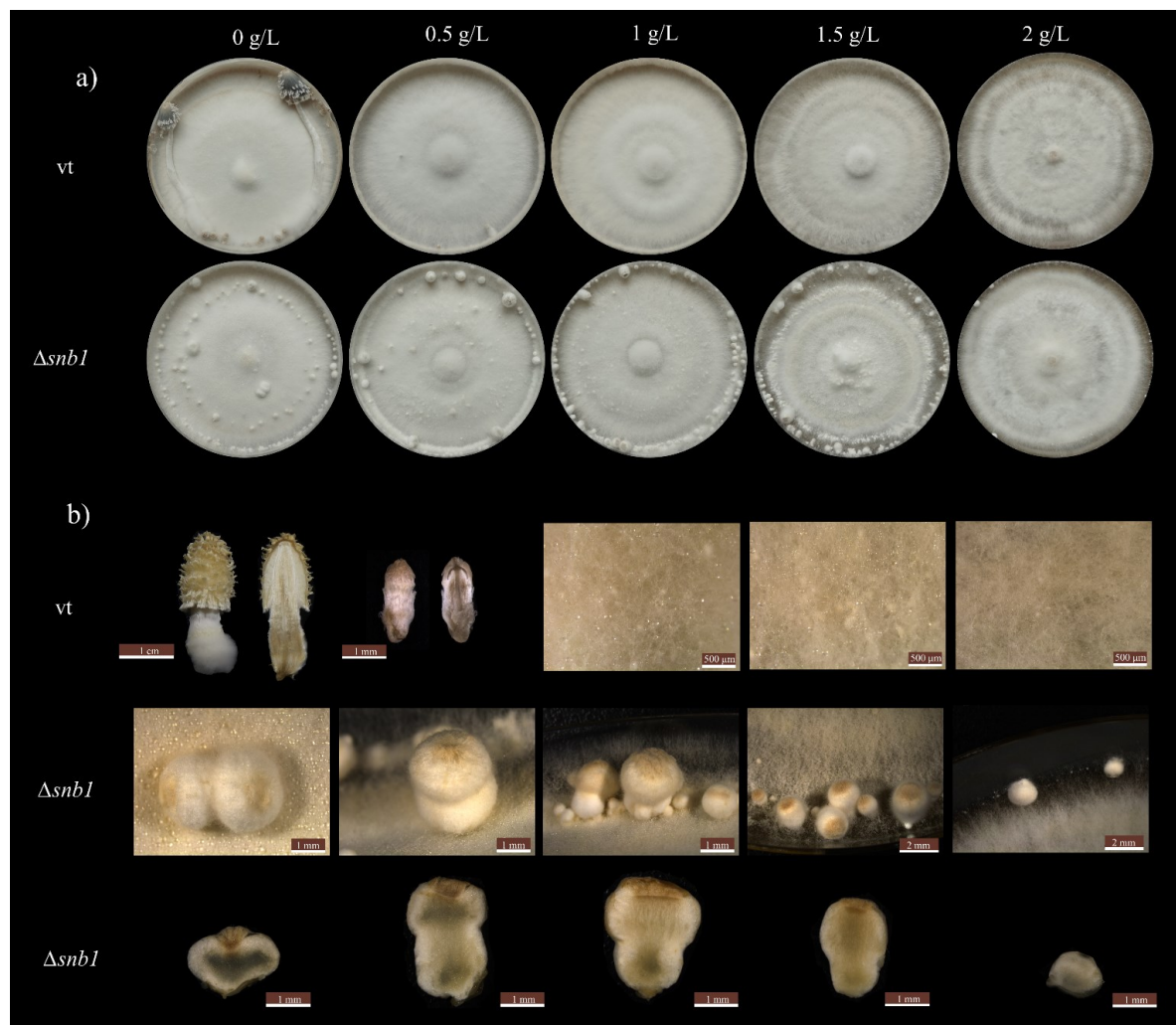
4.1.1.4. A $\Delta snb1$ komplementálása - A vad típusú *snb1* gén deléciós törzsbe való ektopikus reintegrációja képes volt komplementálni az elrontott *snb1*-t. A komplementált $\Delta snb1$ törzs által létrehozott termőtestek a vad típusúhoz hasonlóan vertikálisan növekedtek és a belső szövetek differenciációja is megfelelő módon történt meg. A sikeresen komplementált független $\Delta snb1$ törzsekből származó genomi DNS-ről mindkét várt PCR-terméket fel tudtuk szaporítani (**8. ábra**).



8. ábra: A $\Delta snb1$ törzs vad típusú *snb1* génnel történő komplementálása. a) A komplementált $\Delta snb1$ törzsek PCR-alapú ellenőrzése. A vad típusú *snb1* integrációját a $\Delta snb1$ törzsbe PCR-rel ellenőriztük a Cas9 hasítóhelyen kívül eső két, *snb1*-specifikus belső primer párral (*snb1_inner_fwd*/*snb1_inner_rev*, lásd **1. függelék**). Vad típusú törzsnél a várt amplikon mérete 2122 bp volt, míg a $\Delta snb1$ törzs esetében nagyobb amplikont várunk (3602 bp), a javító-templát *snb1* Cas9 hasítóhelybe való beépülése miatt. b) A vad típusú, a $\Delta snb1$ és a sikeresen komplementált $\Delta snb1$ törzsek által hozott termőtestek keresztmetszeti képe. Méretskála = 2mm.

4.1.1.5. A LiCl hatásának vizsgálata - A LiCl koncentráció-függő módon képes a termőtest kialakulását gátolni, feltehetően a glikogén-szintáz kináz 3 (GSK-3) működésének gátlása által (Chang és mtsai., 2019). Mivel a $\Delta snb1$ törzsek fényindukció nélkül is képesek voltak termőtesteket létrehozni, megvizsgáltuk a LiCl-érzékenységüket a vad típusú törzsszel összehasonlítva. Míg a kezeletlen vad típusú törzs képes volt érett termőtesteket hozni, addig a 0,5 g/l koncentrációjú LiCl-dal kiegészített YMG-n

növesztve a termőtest fejlődése megállt a harmadik stádiumú primordium állapotban és nem volt képes befejezni a fejlődési ciklusát. Magasabb LiCl koncentrációknál csak hifacsomók jelentek meg, amik nem voltak képesek tovább differenciálódni. Ezzel szemben a $\Delta snb1$ törzs által növesztett termőtestek fejlettségi szintjében csak 2 g/l LiCl koncentrációnál történt változás a kezletlen kontrollhoz képest. A 0,5-1,5 g/l LiCl koncentráció tartományban a $\Delta snb1$ termőtestek nodulusának alsó régiója megnyúlt (9. ábra). Ez alapján azt a következtetést tudtuk levonni, hogy a $\Delta snb1$ törzs kevésbé érzékeny a LiCl termőtestképzést gátló hatásával szemben a vad típushoz képest.

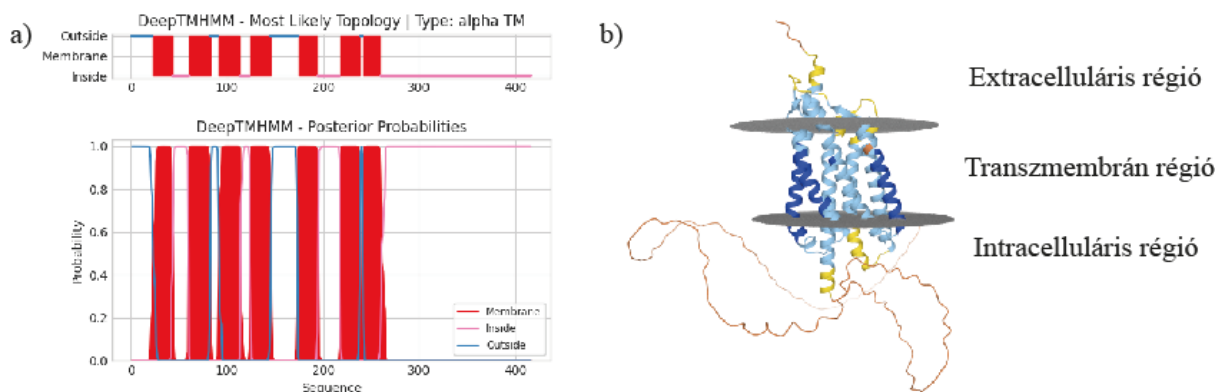


9. ábra: A LiCl hatása a vad típusú és a $\Delta snb1$ törzs termőtestképzésére. A képeken kéthetes kolóniák láthatóak. Ekkorra, LiCl hiányában a vad típusú törzs képes volt termőtestet hozni. a) A vad típusú és a $\Delta snb1$ törzsek felülnézetből. b) A vad típusú és a $\Delta snb1$ törzsek által hozott termőtestek egész és keresztmetszeti képei.

4.1.2. Az *SNB1* szerkezeti elemzése és filogenetikai analízise

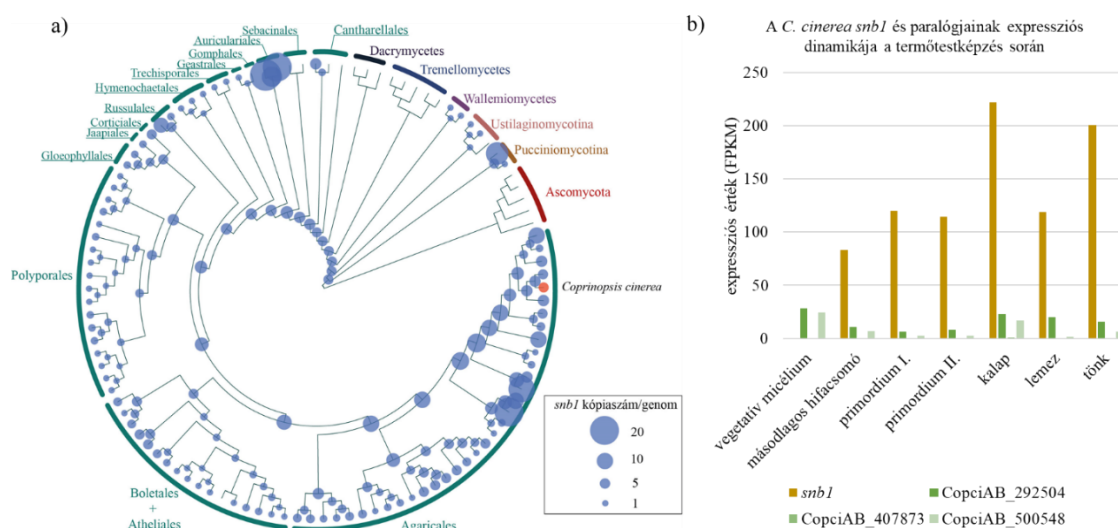
4.1.2.1. Az *SNB1* hipotetikus fehérje domén-összetétele és prediktált strukturális tulajdonságai - Az *SNB1* az InterPro doménbecslése alapján két rendezetlen hurokrégió

mellett egy ismeretlen funkciójú domént is tartalmaz (DUF6533, IPR045340), ami kizárólag a bazídiumos gombákban előforduló rövid, konzervált integráns sejtmembrán fehérjékre jellemző. Ezt alátámasztotta a WoLF PSORT becslése is, ami alapján az SNB1 a sejtmembránban helyezkedik el (Horton és mtsai., 2007). A DeepTMHMM szerkezetbecslése szerint az SNB1 7-transzmembrán hélixet tartalmaz, és míg a fehérje N-terminálisa a membrán extracelluláris, addig a C-terminálisa az intracelluláris oldal felé néz (**10. ábra/a**) (Hallgren és mtsai., 2022). Az SNB1 harmadlagos szerkezetét AlphaFold-dal becsültük meg (Jumper, 2021; Varadi, 2021) (**10. ábra/b**).



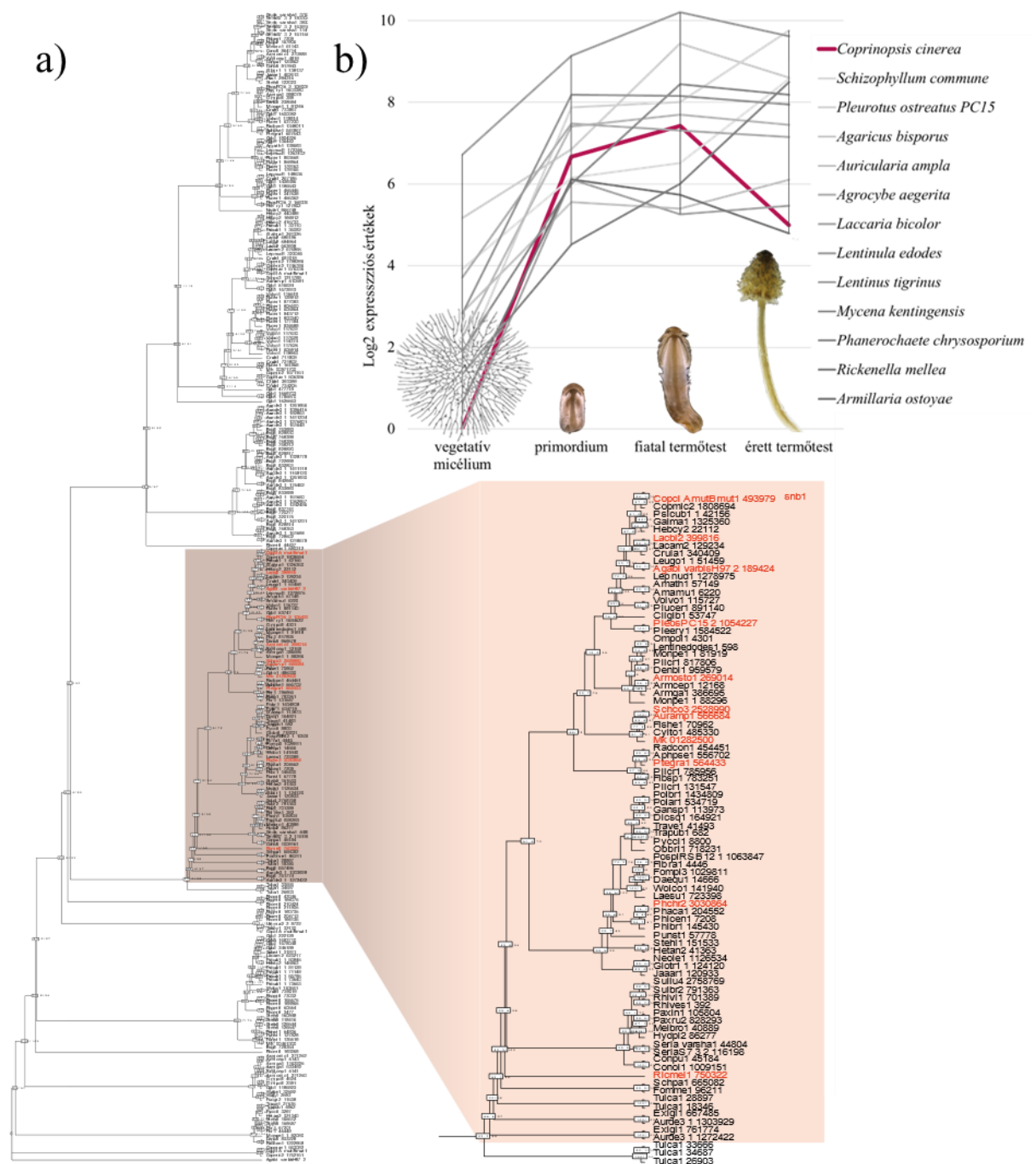
10. ábra: a) Az SNB1 transzmembrán héliceinek számának és topológiájának DeepTMHMM-alapú becslése. b) Az SNB1 AlphaFold által becsült harmadlagos szerkezete.

4.1.2.3. Az SNB1 ortocsoport meghatározása és homológjainak filogenetikai analízise - Az SNB1 homológjainak meghatározására egy korábban publikált 109 gombafajt magába foglaló adatsort használtunk (Merényi és mtsai., 2023). A filogenetikai analízis alapján a bazídiumos gombákban az SNB1 magasan konzervált, míg a tömlősgomba fajokból (Ascomycota) teljesen hiányoztak az SNB1 homológjai. Az SNB1 homológokat tartalmazó, fejlődéstörténetileg a legidősebb vizsgált fajok a Pucciniomycotina és Ustilaginomycotina altörzsekbe tartoztak. A génfa-fajfa rekonziliációs analízis alapján az ősi nóduszokban becsült génkópiaszámok szerint az SNB1 kópiaszáma nem mutatott nagyobb fluktuációt a bazídiumos gombák evolúciója során. Más nagyobb taxonokban sem tapasztaltuk az SNB1 kópiaszámának jelentős növekedését vagy csökkenését, kivéve a Tremello- és Dacrymycetesben, ahol nem találtunk SNB1 homológokat (**11. ábra**).



11. ábra: a) Az *snb1* homológjainak becsült száma a 109 fajoz törzsfán a génfa-fajfa rekonziliáció analízis alapján. A recens génkópiák száma a fajok mellett található, a becsült ősi génkópiák száma pedig a fa nóduszaiban láthatóak. A *C. cinerea* *snb1* kópiaszáma 4, ami pirossal lett jelölve a fán. A génfa-rekonstrukciós analízis és ennek az ábrának alapjául szolgáló filogenetikai fa Merényi Zsolt munkája. **b)** A *C. cinerea* *snb1* és paralógjainak expressziós dinamikája a termőtestképzés különböző stádiumaiban (Krizsán és mtsai. 2019 eredményei alapján).

A *C. cinerea*-t is magába foglaló porhanyósgombafélékbe (Psathyrellaceae) tartozó fajok 4-5 SNB1 homológot tartalmaztak. A *C. cinerea* genom az *snb1* géncsalád négy tagját kódolja (*snb1*, CopciAB_292504, CopciAB_407873 és CopciAB_500548), azonban ezek közül csak az *snb1* mutatott jelentős expressziós növekedést a termőtest fejlődésének korai stádiumaiban. Ezért azt feltételezzük, hogy az *snb1* paralógjai más funkciót töltenek be. Emiatt megvizsgáltuk a filogenetikai fán az *snb1*-t tartalmazó ortocsoportot. Azt tapasztaltuk, hogy már a korai Agaricomycetes leszármazási vonalak, úgy mint az Auriculariales és Tulasnellales rendek tagjai is rendelkeztek az *snb1* ortológjaival (**12. ábra/a**). Korábban publikált transzkriptomikai adatsorokban (Almási és mtsai., 2019; Gehrman és mtsai., 2018; Ke és mtsai., 2020; Krizsán és mtsai., 2019; Merényi és mtsai., 2022; Ruytinx és mtsai., 2021; Sipos és mtsai., 2017) megvizsgáltuk az *snb1* ortológjainak a termőtestfejlődés során mutatott expressziós dinamikáját és azt figyeltük meg, hogy valamennyi vizsgált ortológ hasonló expressziós mintázatot mutatott a termőtest fejlődése során, mint az *snb1* a *C. cinerea*-ban (**12. ábra/b**). Ezek alapján azt feltételezzük, hogy az *snb1* ortológjai dinamikus expressziót mutatnak a termőtest fejlődése során más termőtestképző bazídiumos gombafajokban is és meghatározó szerepük lehet a szöveti differenciációban.



12. ábra: a) Az SNB1 homológokból álló filogenetikai fa. Barna háttérrel jelöltük azt az ortocsoportot, ami a *C. cinerea* SNB1-t tartalmazza. Az ortocsoport külön kiemelésre került. A rövidítéseknek megfelelő fajnevek listája a **5. függelékben** található. **b)** Az a) ábrán vörössel jelölt *snb1* ortológok expressziós dinamikája a termőtestfejlődés során.

4.1.3. A $\Delta snb1$ termőtestfejlődésének korai stádiumaiban bekövetkező génexpressziós változások jellemzése transzkriptomikai adatok alapján

Korábbi termőtestfejlődési transzkriptomikai adatsor alapján az *snb1* a kimutatási szint alatti expressziót mutatott a vegetatív micéliumban, majd ehhez képest a termőtestképzés

iniciációja során nagyságrendekkel megnőtt (másodlagos hifacsomóban 144-szeres, az első stádiumú primordiumban 240-szeres expressziószint-növekedés) (Krizsán és mtsai., 2019). Ez alapján azt feltételeztük, hogy kiemelt szerepe lehet a termőtest korai fejlődési stádiumaiban, amit a $\Delta snb1$ deléciós mutáns törzs által hozott primordiumok differenciálatlanságával kapcsolatos megfigyeléseink is megerősítettek (ld. 4.1.1.2. fejezet).

A $\Delta snb1$ és vad típusú törzsek fényindukciót követő 24. és 48. órás stádiumait (másodlagos hifacsomó és első stádiumú primordium) összehasonlítva az RNS-szekvenálás eredményeképpen összesen 1299 gén mutatott szignifikáns expressziós különbséget ($p \leq 0,05$; FC: 2 <) (**6. függelék**). A $\Delta snb1$ másodlagos hifacsomóiban 177 alulexpresszáldó (*downregulated*) és 218 felulexpresszáldó (*upregulated*) DEG-et találtunk⁵, amik száma a vad típusú termőtest differenciációjának előrehaladtával és ennek nyomán a két törzs közti különbségek halmozódásával együtt nőtt, így az első stádiumú primordiumban már 516 alulexpresszált és 650 felulexpresszált DEG-et figyeltünk meg. A két stádium összehasonlítása összesen 574 alul- és 727 felulexpresszáldó DEG-et eredményezett, amelyek legalább az egyik fejlődési stádiumban szignifikáns expressziós különbséget mutattak. Ezek közül 267 DEG mutatott szignifikáns ($p \leq 0,05$) expressziós különbséget mindkét stádiumban, amik közül konzekvensen 119 DEG alul-, és 141 DEG felulexpresszáldott, míg kettő DEG az egyik stádiumban alul-, míg a másikban felulexpresszáldott.

Megvizsgáltuk, hogy mely gének játszhatnak jelentős szerepet a termőtest-iniciáció során az expressziós dinamikájuk alapján. A Krizsán és mtsai. (2019) által bevezetett definíciót követtük, vagyis azokat a géneket, amik vegetatív micéliumban mutatott expressziós szintje legalább négyszeresére nőtt a másodlagos hifacsomó vagy az egyes stádiumú primordium állapotban, azt az ún. “FB-init” (*fruiting body initiation*) kategóriába soroltuk. Az alulexpresszált DEG-ek 41 %-a (236 DEG), míg a felulexpresszált géneknek csupán a 4 %-a (31 DEG) volt “FB-init” (**13. ábra/a**). Ez alapján feltételezzük, hogy a $\Delta snb1$ -ben alulexpresszált gének valóban relevánsak a korai termőtestfejlődési stádiumokban és a szöveti differenciációban.

Újraértékeljük Krizsán és mtsai. (2019) transzkriptomikai adatait a szövetspecifikus gének azonosításához. Ehhez a fiatal termőtest állapotában külön

⁵ A dolgozatban a DEG-ek expressziós irányultságát (lásd: alul- és felulexpresszált) mindig a $\Delta snb1$ törzsben értjük, a vad típusú törzs ugyanazon fejlődési stádiumával történő összehasonlítás eredményeként.

mintázott kalap, lemez és tönk szövetekhez, valamint vegetatív micéliumhoz tartozó expressziós adatokat használtuk fel. Azokat a géneket tekintettük szövetspecifikusnak, amik a vegetatív micéliumhoz képest legalább négyszeres expressziószint-emelkedést mutattak csak az egyik szövetben. A *C. cinerea*-ban található összes, 13617 génje közül 5,64 %-a (768 gén) mutatott szövet-specifitást (355 kalap-, 280 lemez-, 133 tönk-specifikus gén).

Ezek közül a *Δsnb1*-ben 193 DEG mutatott szövet-specifitást, amik 11,7 %-a (152 DEG, 108 kalap-, 30 lemez-, 14 tönk-specifikus) volt alulexpresszált és 3,2 %-a (41 DEG, 17 kalap-, 11 lemez-, 14 tönk-specifikus) volt felülexpresszált.

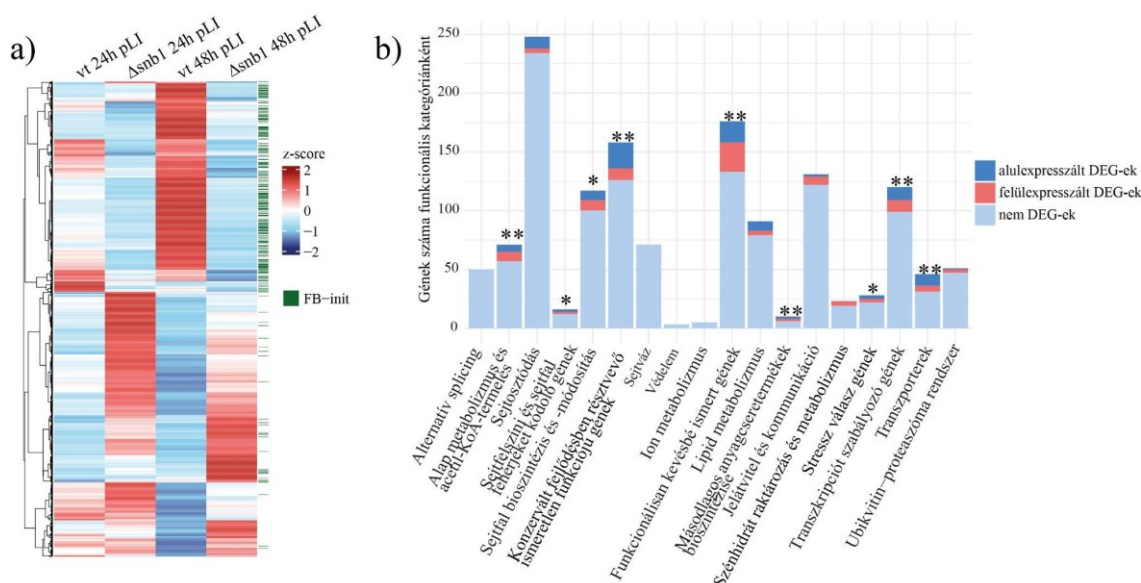
Az adatsorban összesen 87 alulexpresszált, szövetspecifitást (62 kalap-, 14 lemez, 11 tönk-specifikus) mutató „*FB-init*” gént tudtunk azonosítani, amiknek kifejezett szerepe lehet a termőtest-iniciációt követő szöveti differenciációban. A legnagyobb expressziós különbséget egy sejtfal mannoprotein mutatta (CopciAB_457639, FC_{vt/Δsnb1}: 22,16). Mivel doménstruktúrájuk alapján ezek a gének változatos funkciókat töltenek be, ezért a dolgozatban való részletes tárgyalásuk nem lehetséges.

Nagyszámú gén *in silico* funkcionális profilozásának egyik legelterjedtebb módja a génontológiai kifejezések dúsulásának (*Gene Ontology* (GO) *term enrichment*) vizsgálata. Egy génkészletet vizsgálva (esetünkben az alul- és felülexpresszáldó DEG-eket az egyes fejlődési stádiumokban) a GO dúsulási analízis elvégzésével képet kaphatunk róla, hogy az *snb1* hiányának következtében milyen molekuláris folyamatokban történhetett jelentős változás és ennek milyen következményei lehetnek a fejlődésben. A GO dúsulási analízis során összesen 93 szignifikánsan ($p \leq 0,05$) felülreprezentált GO kifejezést azonosítottunk (**4. függelék**) amik legtöbbje nagyon általános biológiai folyamatot írt le. Ennek oka az, hogy a GO kifejezéseket olyan modellorganizmusok génkészletei alapján alkották meg, amik élettani funkciói már jól ismertek (*The Gene Ontology Consortium*, 2023). A GO kifejezések megalkotásához használt gomba modellorganizmusok élesztőgombák (*Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae*, *Candida albicans*), és a komplex morfológiájú termőtesteket (pl. pilotécium) létrehozni képes bazídiumos gombákétól sokkal egyszerűbb soksejtű ivaros struktúrával bíró bazídiumos gomba (*Ustilago maydis*) fajok génkészletei voltak. Emiatt a dúsult kifejezések csak olyan általános funkcionális kategóriákat fedtek le, amiket nem lehetett értelmezni a komplex termőtestfejlődés kontextusában, mint amelyet a *C. cinerea* mutat. Ezen oknál fogva a DEG-ek jellemzésekor elsősorban egy alapjaiban más megközelítésű csoportosításra támaszkodtunk és a GO-dúsulási analízis eredményeit csak

kiegészítésként használtuk. A GO-dúsulási analízis eredményei a **4. függelékben** találhatóak.

4.1.4. A $\Delta snb1$ termőtestfejlődésének korai stádiumaiban bekövetkező génexpressziós változások jellemzése konzervált funkcionális kategóriák alapján

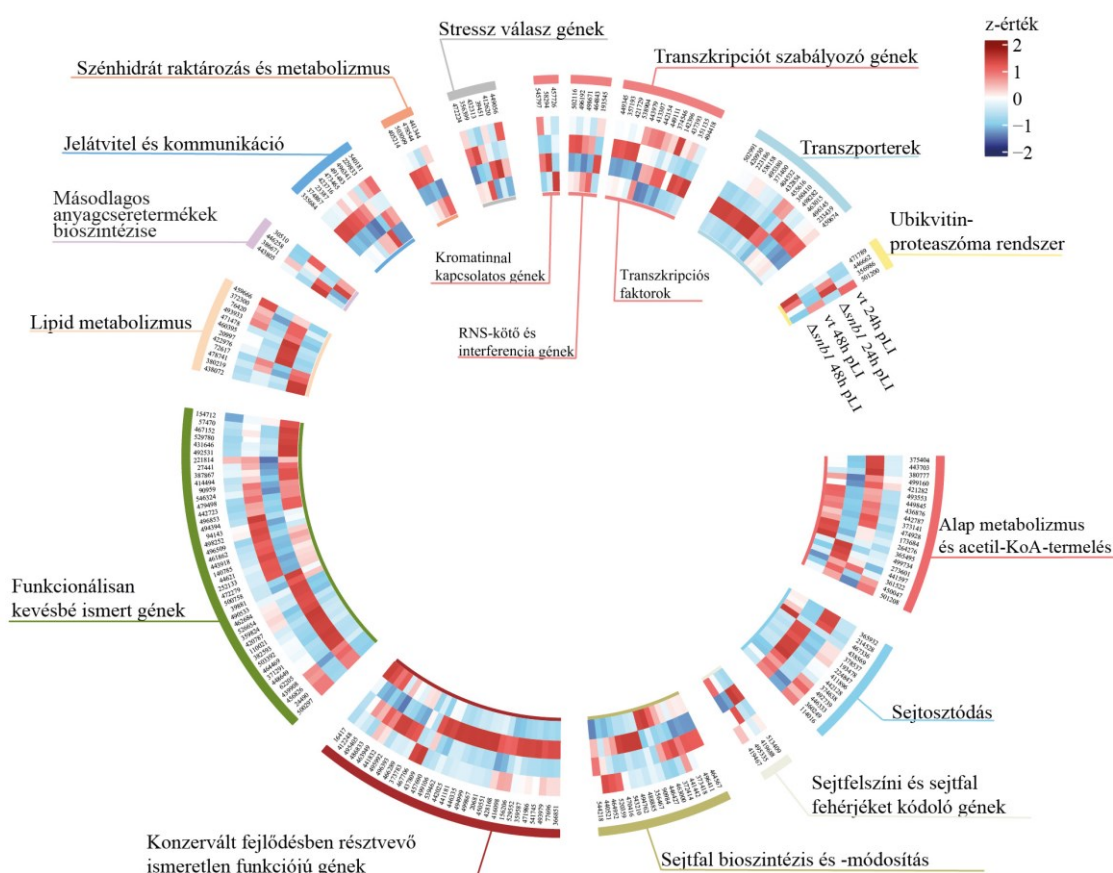
A termőtestiniciációban és szövettendifferenciációban potenciálisan részt vevő gének jellemzésére egy alternatív funkcionális csoportosítást alkalmaztunk, ami képes lehet jobban leírni a bazídiumos gombákban bekövetkező molekuláris változásokat. Ehhez Nagy és mtsai. (2023) áttekintő analízisét vettük alapul, ami összegyűjtötte és jellemezte a *C. cinerea* modellorganizmus összes konzervált, “devreg” génjét korábban publikált transzkriptomikai adatok alapján. Ez a manuálisan összeállított és kiértékelt lista összesen 1410 gént fedett le, amiket 18 fő kategóriába lehetett csoportosítani (**13. ábra/b**).



13. ábra: a) A $\Delta snb1$ és vad típusú törzsek fényindukciót követő 24. és 48. órai stádiumainak összehasonlításából származó 1299 DEG-ek kifejeződésének hőtérképe, jobb oldalt sötétzölddel jelöltük a termőtestiniciációkor (FB-init) felulexpresszált, legalább négyszeres expressziós szorzóváltozást mutató géneket. **b)** Az egyes konzervált funkcionális kategóriákba sorolható összes *C. cinerea* gén, Nagy és mtsai. (2023) alapján. Sötétkéssel jelöltük a $\Delta snb1$ -ben alulexpresszált, vörössel pedig a $\Delta snb1$ -ben felulexpresszált DEG-eket. Csillaggal jelöltük a szignifikáns dúsulást mutató konzervált funkcionális kategóriákat (hipergeometriai teszt alapján; *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$).

A $\Delta snb1$ és vad típusú törzsek korai termőtestfejlődési stádiumainak összehasonlításából származó DEG-ek szignifikáns dúsulást (p -érték = 0,001, hipergeometriai teszt) mutattak a konzervált “devreg” génkészletben. Összesen 205 DEG-et lehetett 14 különböző konzervált funkcionális kategóriába sorolni (**14. ábra**). Ez azt jelenti, hogy a DEG-ek funkcionális kategóriák szerinti jellemzése jó alapot adhat a $\Delta snb1$ -ben bekövetkező

változások leírására, amiket ha szükséges volt, kiegészítettünk további jelentős expressziószint-változást mutató *C. cinerea*-specifikus génekkel.



14. ábra: Az egyes konzervált funkcionális kategóriákba sorolható 205 DEG kifejeződésének hő térképe.

Alap metabolizmus és acetyl-KoA-szintézis - Ez a funkcionális kategória azokat a metabolikus útvonalakban résztvevő konzervált géneket foglalja magába, amik közvetlen vagy közvetett úton hozzájárulnak az acetyl-KoA szintéziséhez. Az acetyl-KoA-nak alapvető szerepe van az energiatermelésben, a zsírsav-, szénhidrát- és fehérje-anyagcserében (Strijbis és Distel, 2010). Feltételezhető, hogy az ebbe a kategóriába tartozó gének biztosítják azt az acetyl-KoA szintet, ami a termőtestfejlődés során a gyors osztódásban és növekedésben lévő sejtek membránjának képzéséhez szükséges. A kategóriába tartozó 20 DEG-ből öt volt alulexpresszált a $\Delta snb1$ -ben. Az oxálecetsavból oxálsavat és ecetsavat előállító oxálecetsav hidroláz (CopciAB_499734, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 3,20) alulexpressziója és az oxálsav alternatív degradációs útvonalában résztvevő oxalil-KoA szintetáz (CopciAB_474928, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 4,30) megnövekedett expressziója feltételezhetően csökkentheti a $\Delta snb1$ sejtekben az oxálsav szintjét. Az oxálsavat hangyasavvá és CO_2 -vá lebontó, szekréciós szignálszekvenciával rendelkező oxálsav-

dekarboxiláz transzkriptjének szintje lecsökkent (CopciAB_361522, $FC_{vt/\Delta snbI}$: 4,58), hasonlóképpen a karbonát-dehidratázhoz (CopciAB_450047, $FC_{vt/\Delta snbI}$: 2,49), ami víz és CO₂ jelenlétében katalizálja a bikarbonát és proton létrejöttét (Elleuche és Pöggeler, 2010).

Sejtfal bioszintézis és -módosítás - A termőtest fejlődésének egyik, ha nem a legfontosabb folyamata a sejtfal bioszintézis és -módosítás (Krizsán és mtsai., 2019; Kües, 2000). A gomba sejtfala főként kitinből, β -1,6-glükánból, β -1,3-glükánból és α -1,3-glükánból és egyéb poliszacharidokból áll (Gow és Lenardon, 2023). Ennek megfelelően a gomba sejtfallal és kitinkötéssel kapcsolatos GO kifejezések mutatták a legnagyobb dúsulást a DEG-ek között (**4. függelék**). Összesen 17 konzervált DEG-et mutattunk ki ebben a kategóriában, amelyek főleg kitin és glükán-módosító géneket tartalmaztak. Az eredmények alapján azt láttuk, hogy általában a kitin-módosító enzimeket kódoló gének expressziója csökkent, míg a kitinszintázokat és glükánázokat kódoló gének a $\Delta snbI$ -ben felülexpresszáldtak. Kilenc kitin-módosító enzimet kódoló gén közül négy volt alulexpresszált ($FC_{vt/\Delta snbI}$: 2,76 és 2,11 között), amelyek mindegyike tartalmazza a glikozil-hidroláz 18-as enzimesaládokra jellemző domént. Ezek közé tartozik a ChiEn3 endokitináz (CopciAB_470416, $FC_{vt/\Delta snbI}$: 2,60), amely feltehetően a tönk megnyúlásában vesz részt a sejtfal átszervezésével (Zhou és mtsai., 2019). Továbbá ide tartoztak a kitin-deacetilázokat kódoló CopciAB_464952 és CopciAB_440521 gének, amik szintén szerepet játszhatnak a tönk fejlődésében és -megnyúlásában (Liu és mtsai., 2021). Azonban több, kitinszintézisben részt vevő gén (CopciAB_372414, CopciAB_356467) mutatott magasabb expressziószintet további két glikozil-hidroláz 20 enzimesaládba tartozó génnel (CopciAB_464567 és CopciAB_446427) együtt, amiknek a termőtest fejlődésében betöltött funkciója jelenleg még nem ismert (Nagy és mtsai., 2023). Továbbá három, glükán-módosításban résztvevő DEG mutatott megemelkedett expressziós szintet a $\Delta snbI$ -ben.

Meg kell említenünk még két, alulexpresszált poliszacharid liázt (CopciAB_494762, $FC_{vt/\Delta snbI}$: 2,27 és CopciAB_543210, $FC_{vt/\Delta snbI}$: 5,91). A gomba liázok fejlődésben betöltött szerepével kapcsolatos ismereteink még korlátozottak, de az eddigiek alapján hatással lehetnek a sejtfal poliszacharid összetételére (Krizsán és mtsai., 2019).

Sejtfelszíni és sejtfal fehérjéket kódoló gének - Számos sejtfalhoz kapcsolódó géncsoport, mint például a lektinek, hidrofobinok és cerato-plataninok nagy expressziós

különbségeket mutattak a $\Delta snb1$ mutánsban. Ebben a funkcionális csoportban négy DEG-et azonosítottunk. Mivel ezek a gének gyorsan változtak az evolúció során és jellemzően nem alkottak konzervált ortocsoportokat, emiatt hiányoznak a konzervált funkcionális kategóriákból. Ezért úgy döntöttünk, hogy a *C. cinerea* összes sejt felszín-asszociált DEG-jét számba vesszük.

A MycoLec (Lebreton és mtsai., 2021) és az InterPro adatbázis találatok kombinálásával összesen 95 lektint kódoló gént azonosítottunk a *C. cinerea* genomjában, amiből 20 DEG a $\Delta snb1$ törzsben. A ricinB-szerű (β -trefoil) *ccl1* (CopciAB_456849) és *ccl2* (CopciAB_408852) lektinek expressziója több mint 150-szeresére nőtt a primordium fejlődése során a vad típusú *C. cinerea*-ban (Sabotič és mtsai., 2016), azonban a $\Delta snb1$ törzsben az expressziós szintjük jelentősen elmarad a vad típustól ($FC_{vt/\Delta snb1}$: 6,15 és 5,69). További két, a hifacsomóban rendkívül magas expressziót mutató galektin (Boulianne és mtsai., 2000; Krizsán és mtsai., 2019), a *cgl1* (CopciAB_473274, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 4,69) és a *cgl2* (CopciAB_488611, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 2,94) expressziója csökkent a $\Delta snb1$ -ben. A legmagasabb expressziószint-változást a $\Delta snb1$ -ben egy ricin-B lektin (CopciAB_442572, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 11,9) mutatta. Számos lektin expressziója dinamikus változáson megy keresztül a termőtestfejlődés során (Bleuler-Martínez és mtsai., 2011; Sabotič és mtsai., 2016), amik közül több demonstrált megváltozott mintázatot a $\Delta snb1$ -ben.

A 34 *C. cinerea* hidrofobin gén közül 19 mutatott szignifikáns expressziós eltérést a $\Delta snb1$ -ben. A 11 alulexpresszált hidrofobin DEG közül nyolc tartozott az „*FB-init*” kategóriába.

A *C. cinerea* öt cerato-platanint kódoló génjéből három DEG volt alulexpresszált a $\Delta snb1$ -ben. Szerkezetileg a cerato-plataninok az RlpA szupercsalád kettős Ψ - β -hordó topológiáját mutatják. További, Ψ - β -hordó-szerkezettel bíró, de cerato-platanin vagy egyéb ismert domént nem tartalmazó szekretált fehérjét kódoló DEG-re példa a CopciAB_421450. Érdekes módon, ennek az ismeretlen funkciójú génnek az expressziója nagyon alacsony végig a vad típusú törzs termőtestfejlődése során (Krizsán és mtsai., 2019), azonban a $\Delta snb1$ törzsben a legmagasabb expressziós növekedést ($FC_{\Delta snb1/vt}$: 21,86) mutató DEG-ként tűnt fel.

Az összehasonlító expressziós adatsorokban felfigyeltünk egy géncsoportra, amik nagy expressziós különbségeket mutattak a $\Delta snb1$ törzsben és ismeretlen funkciójú, szekretált, DUF4360 domént hordozó fehérjéket kódoltak. Ezek közül öt DEG

felülexpresszált (pl. CopciAB_116193, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 18,9), míg az egyik a $\Delta snb1$ -ben (CopciAB_464561; $FC_{vt/\Delta snb1}$: 6,98) alulexpresszált volt.

A primordiumban és fiatal termőtestekben indukálódó (Fu és mtsai., 2017; Krizsán és mtsai., 2019; Nagy és mtsai., 2023) konzervált PriA nagymértékben alulexpresszált a $\Delta snb1$ törzsben (CopciAB_419688, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 8,22).

Másodlagos anyagcseretermékek bioszintézise – A bazídiumos gombák másodlagos metabolomjának legtipikusabb komponensei a poliketidek, terpének és aminosavszármazékok (Gressler és mtsai., 2021; Keller, 2019; Schöffler, 2018). Négy, a terpén-szintézishez köthető enzimet kódoló DEG tartozott ebbe a kategóriába, amik mindegyike felülexpresszáldik a vad típusú törzs termőtest iniciációja során („FB-init”). Ezek közül kettő alulexpresszált, kettő pedig felülexpresszált a $\Delta snb1$ törzsben. Két szeszkviterpén szintézisben szerepet játszó enzim enzim eltérő expressziót mutatott: a Cop2 (CopciAB_443805, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 7,64) alul-, míg a Cop4 (CopciAB_30510, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 3,53) felülexpresszált (73) a $\Delta snb1$ törzsben. Ezen kívül egy fenilalanin ammónia-liáz (CopciAB_386671, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 2,46) alul-, míg egy feltételezett poliketid-szintáz (CopciAB_446258, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 6,61) erősen felülexpresszált a $\Delta snb1$ -ben.

Transzkripciót szabályozó gének – Ebbe a kategóriába tartoznak a fejlődési folyamat eseménysorát irányító és szabályozó legfontosabb gének, beleértve a kromatin-szabályozáshoz kapcsolódó géneket, valamint az RNS-kötő fehérjéket és transzkripciósfaktorokat (TF) kódoló géneket (Nowrousian, 2022; Sun és mtsai., 2023). Ezek közül több TF szignifikánsan eltérően expresszáldott a $\Delta snb1$ törzsben. A *C. cinerea* 47 konzervált, termőtestképzés során felülexpresszáldó TF-a közül nyolc alul-, öt pedig felülexpresszált volt. Ezek közül öt, a $\Delta snb1$ törzsben alulexpresszált TF a vad típus korai termőtestfejlődési stádiumaiban expressziós csúcsot mutatott, így feltehetően részt vesznek a termőtest inicializáció és szöveti differenciáció folyamataiban („FB-init”, Krizsán 2019). A leginkább alulexpresszált TF a *Schizophyllum commune fst1* (CopciAB_437393, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 7,35) ortológja volt. Ezzel szemben, a HMG-box doménnel rendelkező *exp1* transzkripciósfaktor (CopciAB_421729) a $\Delta snb1$ termőtestekben felülexpresszált ($FC_{\Delta snb1/vt}$: 3,26). A termőtestfejlődés szempontjából egy további érdekes géncsoport a Velvet-komplex, aminek a *C. cinerea*-ban megtalálható öt tagjából három (CopciAB_355684, 374867, 496341; $FC_{\Delta snb1/vt}$: 2,09-3,73) volt felülexpresszált a $\Delta snb1$ -ben.

A *S. pombe* RNS-kötő fehérje Mei2 (CopciAB_193545, FC_{vt/ Δ snb1}: 3,96) ortológia alulexpresszált a Δ snb1 mutánsban. A Mei2 a meiózis konzervált szabályozója, ami megvédi a meiózis-specifikus transzkripteket a lebomlástól (Plaza és mtsai., 2014). Hasonlóan a többi, kalapban felulexpresszált meiotikus génhez (Liu és mtsai., 2020), a *mei2* is expressziós csúcsot mutat számos bazídiumos gomba primordiumában és a fiatal termőtesteiben (Plaza és mtsai., 2014).

A funkcionális kategóriába tartozó 48 konzervált kromatinhoz kapcsolódó gén közül csak kettő, metiltranszferázokat kódoló DEG-et azonosítottunk a Δ snb1-ben, amik jelentősen alulexpresszáltak a mutánsban. Ezek az *ich1* (CopciAB_545797, FC_{vt/ Δ snb1}: 13,34) (Muraguchi és Kamada, 1998) és a CopciAB_501966 (FC_{vt/ Δ snb1}: 4,84), amik a kromatin szabályozásában vehetnek részt (Liu és mtsai., 2022).

Transzporterek - A GO-dúsulási analízis eredményeivel (**4. függelék**) összhangban azt tapasztaltuk, hogy a konzervált transzportereket kódoló gének jelentős része eltérő expressziós dinamikát mutatott a Δ snb1 törzsben. A 15 DEG transzporter közül 10 alulexpresszált a mutánsban. Ezek közül négy tartozik a “*Major Facilitator Superfamily*” géncsaládhoz (MFS), amik közül a legnagyobb expressziós változást a CopciAB_371400 mutatta (FC_{vt/ Δ snb1}: 10,16). Az MFS az egyik legnagyobb, sokrétű funkciót betöltő transzporter család (Perlin és mtsai., 2014). További jelentősen alulexpresszált DEG-ek többek között cink-szabályozott transzceptort (CopciAB_455616, FC_{vt/ Δ snb1}: 3,32) és karbamid/ammónium transzportert (CopciAB_538158, FC_{vt/ Δ snb1}: 3,91) kódolnak. A transzporterek elősegítik a különböző típusú anyagok, köztük ionok, jelzőmolekulák, ozmolitok és tápanyagok átjutását a termőtestbe és a sejtek között. Azonban a transzporterek gyors evolúciója és a pontosabb funkcionális adatok hiánya miatt nehéz következtetni a sejtek életében betöltött konkrét szerepükre.

Funkcionálisan ismeretlen gének – Ebbe a kategóriába főleg azok a gének tartoznak, amiket a prediktált annotációjuk alapján nem tudunk egy bizonyos életfolyamathoz kötni, ezért funkcionálisan ismeretlennek tekintjük őket (Nagy és mtsai., 2023). Ez a kategória 43 DEG-et foglal magába, amiből 18 alul- és 25 felulexpresszált. A leginkább alulexpresszált DEG-ek között egy nitronát-monooxigenázt kódoló gén található (CopciAB_110021, FC_{vt/ Δ snb1}: 11,75), amit főként patogén tömlősgombákban írtak le, ahol a nitro-oxidatív stresszhez kapcsolódó nitroalkánok denitrifikációját katalizálja (Nguyen és mtsai., 2022). Ezen kívül két, citokróm P450 kódoló gén (CopciAB_456826 és CopciAB_24490; FC_{vt/ Δ snb1}: 9,47 és FC_{vt/ Δ snb1}: 4,54) szintén alulexpresszált a Δ snb1-

ben. Ezek az enzimek részt vesznek a különböző vegyületek oxidatív, peroxidatív és redukzív metabolizmusában. Egy másik citokróm P450 gén, az *eln2* deléciója rövid tönkű termőtestek kialakulását eredményezte a *C. cinerea*-ban (Muraguchi és Kamada, 2000), ami arra utal, hogy más citokróm P450 enzimek is hozzájárulhatnak a sejtmorfogenezishez. A következő alfejezetekben külön kiemelve tárgyalunk pár funkcionálisan ismeretlen géncsoportot, amik több tagja is DEG, így szerepük lehet a differenciálódásban és morfogenezisben.

A reaktív oxigéngyökökhöz (ROS) kapcsolódó gének - A ROS elleni védelmet biztosító enzimek megváltozott expressziót mutatnak a $\Delta snb1$ törzsben. Míg a tioredoxin gének (CopciAB_412620 és CopciAB_39451, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 5,25 és 2,42) alulexpresszáltak, egy kataláz gén (CopciAB_472224, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 3,13) magasabb expressziót mutatott a mutáns törzsben a vad típusához képest.

Az antioxidánsokat termelő enzimek felulexpresszáltak a $\Delta snb1$ törzsben. Ezekre példa az ergotionein bioszintézis fehérje 1-t kódoló *egt1* (CopciAB_356399, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 2,57) és a D-arabinono-1;4-lakton-oxidázt kódoló *alo1* (CopciAB_432313, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 4,61). További, az oxidatív károsodás elleni védekezésben részt vevő nem konzervált gének szintén megemelkedett expressziót mutatnak a mutánsban, mint amilyen a szuperoxid-diszmutáz (CopciAB_420887, $FC_{\Delta snb1/vt}$: 3,10), és a hét glutation-S-transzferáz DEG-ből hat ($FC_{\Delta snb1/vt}$: 2,08-3,92).

Proteáz inhibitorok – A MEROPS I66 családba tartozó, kalap-specifikus szerin-proteáz-inhibitorok “*mycospin*” néven ismertek, amelyek a *C. cinerea* esetében *cospin*-ként kerültek leírásra (Sabotič és mtsai., 2016). A $\Delta snb1$ -ben két paralóg *cospin* alulexpresszált (CopciAB_497809 és CopciAB_367957, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 6,73 és 3,69). Mindkettő felulexpresszált a termőtestiniciáció során („*FB-init*” csoport) és dúsulást mutatnak a kalapszövetben (Krizsán és mtsai., 2019; Plaza és mtsai., 2014).

Izoprenilcisztein O-metiltranszferázok – A GO analízis egyik legmagasabb dúsulást mutató kifejezése (4. függelék), ami két izoprenilcisztein O-metiltranszferázt kódoló alulexpresszált DEG-hez kapcsolódott (CopciAB_354499, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 6,27 és CopciAB_445523, $FC_{vt/\Delta snb1}$: 9,71). Ezek a transzferázok felelősek a CaaX (C: cisztein, a: alifás aminosav, X: bármilyen aminosav) motívummal végződő fehérjék karboxil-metilációjáért, ami szükséges például a párosodási feromonok és kis GTPázok sejtmembránhoz történő lokalizálódásához (Raudaskoski és mtsai., 2012; Romano és Michaelis, 2001). A $\Delta snb1$ -ben nem találtunk feromon prekursor DEG-eket, azonban a poszttranszlációs módosításukban szerepet játszó enzimek csökkent expressziója miatt

elképzhető, hogy a funkcionálisan érett állapotukat nem, vagy csak korlátozott mértékben tudták elérni.

Viasz-szintázok – Külön kiemelnénk a viasz-szintázokat, mivel a nyolc *C. cinerea* viasz-szintáz gén közül három szignifikánsan csökkent a $\Delta snb1$ mutánsban, amik közül a CopciAB_478454 mutatta a legnagyobb expressziós különbséget ($FC_{vt/\Delta snb1}$: 6,49).

4.2. A sporulációban részt vevő gének transzkriptóm vizsgálata és reverz genetikai analízise

Annak érdekében, hogy betekintést nyerhessünk a spóráképzés posztmeiotikus folyamataiba, a lemezek három egymást követő fejlődési stádiumaiból RNS-t vontunk ki és szekvenáltunk meg. Mivel a kalap szélén elhelyezkedő bazídiumok általában előrehaladottabbak a fejlődésben, mint a kalap csúcsi részén elhelyezkedők (Kües, 2000), ezért a mintákat minden esetben a kalapközépi lemezekből vettük. Az első stádium mintázását a fényciklus 7. órájában végeztük el, a sterigma kialakulását megelőzően, amikor szakirodalmi adatok alapján a bazídiumokban a meiózis I. fázisa lecsengőben van és felváltja a meiózis II. fázisa (Celerin és mtsai., 2000; Kües, 2000). A második stádium mintázását a fényciklus 8. órájában végeztük el, mikorra a meiózis II. fázisa is nagyrészt befejeződik, ami miatt a bazídiumokban már négy sejtmag található és fénymikroszkóp alatt láthatóvá válnak a sterigmák. A harmadik stádium mintázása a fényciklus 9. órájában történt, amikor a sterigmákon megkezdődött a spórák felfúvódása. A 10. órában a legtöbb spóra eléri érett állapotát, majd az azt követő órában elkezdődik a spórák elválása. A transzkriptomikai analízisbe a fényindukciót követő 7., 8. és 9. órában lejátszódó fejlődési stádiumokat vontuk be.

A három stádium RNS-szekvenálásból kapott eredmények szűrését követően ($p \leq 0,05$, $FC: 3 <$) összesen 2077 DEG-et tartalmazó, ún. “*time-series*” transzkriptomikai adatsort kaptunk, amiben az egymást követő stádiumokban megfigyelhető génexpressziós dinamika is nyomonkövethetővé vált (**8. függelék**). Az adatsor összetettsége miatt többféle megközelítést is alkalmaztunk annak érdekében, hogy a lehető legátfogóbb módon tudjuk jellemezni a spóráképzés folyamatát.

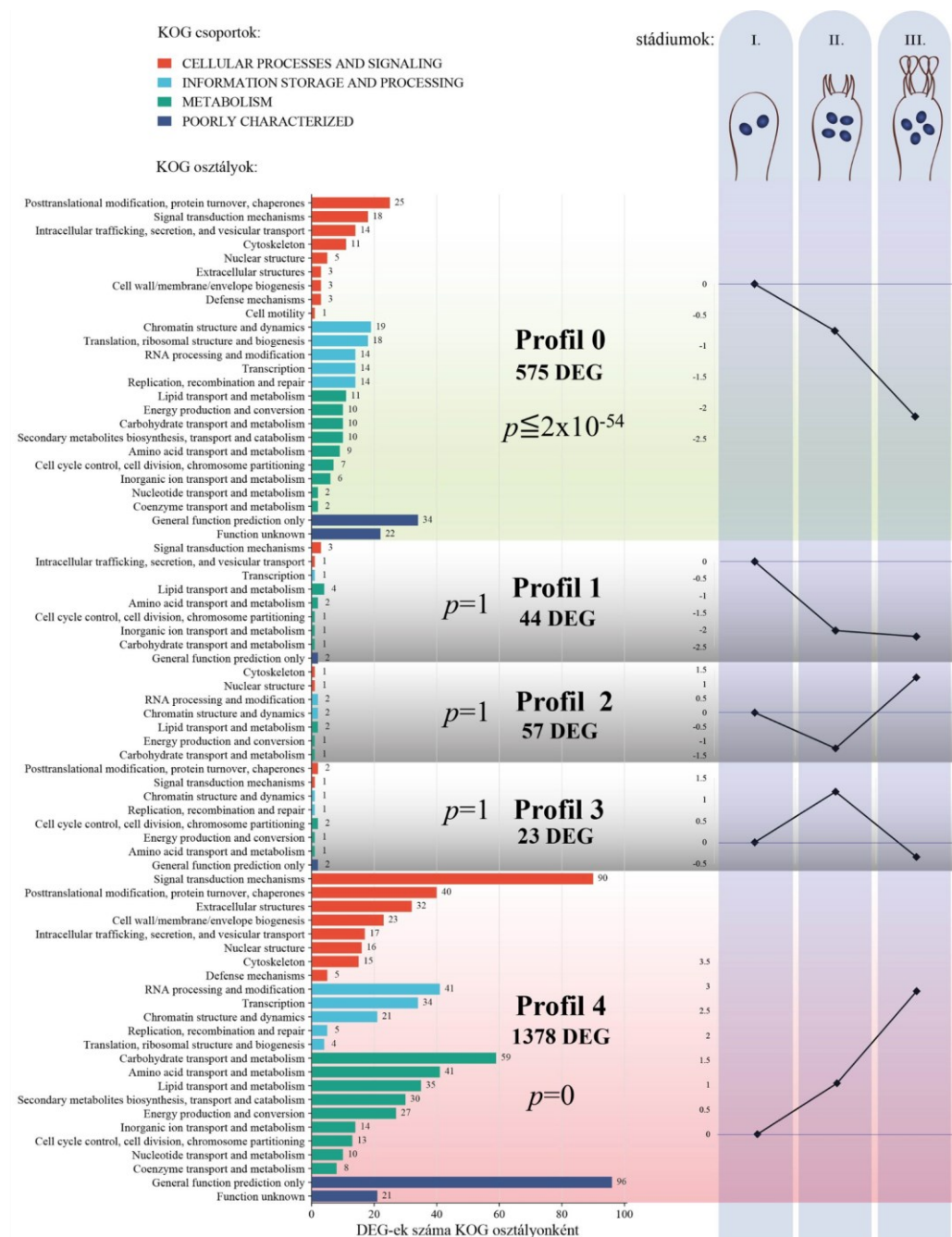
4.2.1. A spóráképzésben szerepet játszó gének csoportosítása és jellemzése expressziós dinamikájuk alapján

Legelső lépésként a DEG-eket expressziós mintázatuk alapján profilokba csoportosítottuk a STEM szoftver segítségével, így a hasonló dinamikájú géneket

egységesen tudtuk jellemezni. Összesen öt profilt tudtunk elkülöníteni. A Profil 1, 2 és 3-mal ($p = 1$) szemben a Profil 0 és 4 a várt génszámhoz képest szignifikánsan több gént foglaltak magukba ($p \leq 0,01$) (**15. ábra**). A Profil 0-ba az expressziós csökkenést mutató 575 DEG tartozott. A Profil 1-be tartozó 44 DEG expressziója az I. stádiumban volt a legmagasabb, és már a II. stádiumban hirtelen lecsökkent. A Profil 2-be a II-es stádiumban expressziós mélypontot (57 DEG), míg a Profil 3-ba az expressziós csúcsot (23 DEG) mutató DEG-ek tartoztak. A Profil 4 az I.-től a III. stádiumig expressziós növekedést mutató, összesen 1378 DEG-et tartalmazta (**15. ábra**).

Az egyes profilokba tartozó DEG-ek általános jellemzéséhez először ellenőriztük a dúsulást mutató KOG osztályokat. A DEG-ek 49 %-ához lehetett eukarióta ortocsoport annotációt rendelni. Mivel a Profil 1, 2 és 3 a DEG-ek csak egy kis hányadát tartalmazták, ezért a KOG osztályok dúsulását csak a két legnagyobb profilban, a Profil 0-ban és 4-ben vizsgáltuk. Azokat a KOG osztályokat tekintettük dúsultnak, amik a hipergeometriai teszt alapján szignifikánsan ($p \leq 0,05$) nagyobb arányban fordultak elő az adott profilban található DEG-ekben, mint a teljes *C. cinerea* genomban (**15. ábra**).

A Profil 0-ban dúsulást mutató KOG-osztályok (*“Replication, recombination and repair”*, *“Chromatin structure and dynamics”* és *“Cell motility”*) alapján az I. stádiumban expressziós csúcsot mutató DEG-ek egy jelentős része a sejtosztódás folyamatában vehet részt. Itt meg kell jegyeznünk, hogy a *“Cell motility”* KOG-osztály csupán öt gént foglalt magába, amiből egy DEG eredményezte ennek a KOG osztálynak a statisztikai dúsulását, ezért a *“Cell motility”* osztályt nem vettük be a jellemzésbe. A Profil 4-ben dúsulást mutató KOG osztályok alapján (*“Cell wall/membrane/envelope biogenesis”*, *“Carbohydrate transport and metabolism”*, *“Amino acid transport and metabolism”*, *“Extracellular structures”*, *“Signal transduction mechanisms”*) a III. stádiumban expressziós csúcsot mutató DEG-ek jelentős hányada a sejtfal-szintézisben és annak módosításában, az aminosav transzportban és -metabolizmusban, valamint a jelátvitelben játszhatnak szerepet.



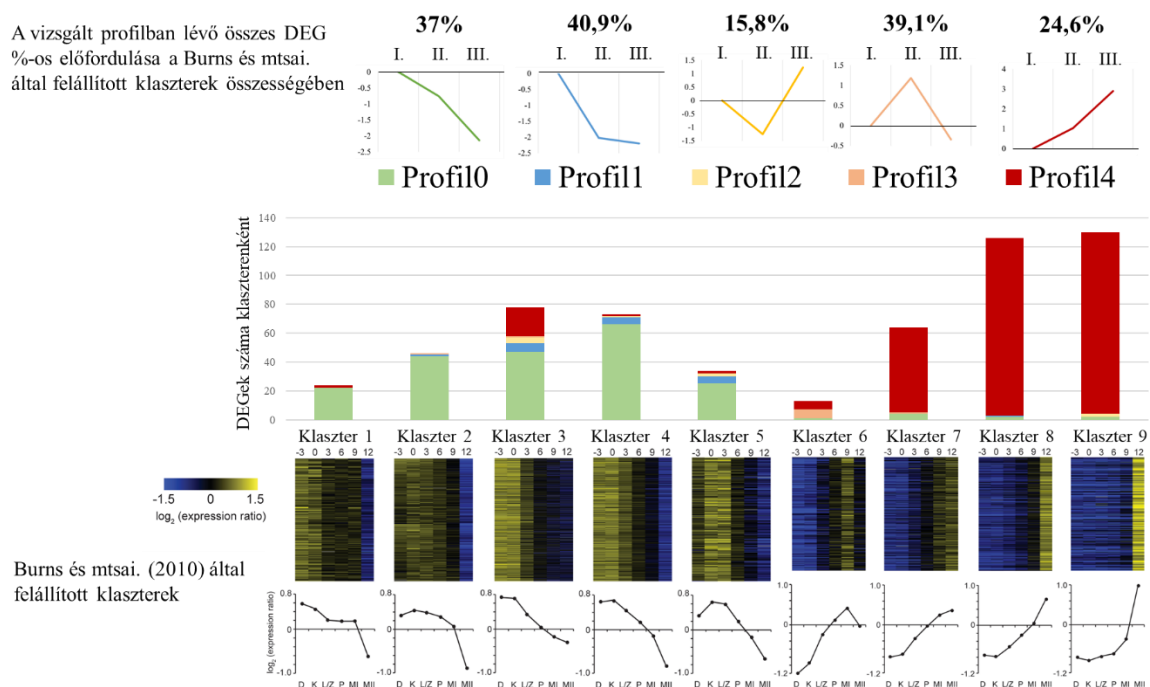
15. ábra: A spóráképzés során a meiózis és a posztmeiotikus lépések során különböző expressziós mintázatot mutató DEG-eket összefoglaló profilok, és ezek KOG-alapú jellemzése. Az ábra jobb oldalán a profilokra jellemző expressziós lefutás látszódik a stádiumok közti normalizált, \log_2 expressziós különbségek átlaga alapján. Az ábra:bal oldalán az egyes KOG csoportok és azokon belül a KOG osztályok általános leírást nyújtanak az egyes profilokba tartozó DEG-ek lehetséges funkciójáról.

4.2.2. A spóráképzés transzkriptomikai eredményeinek meiotikus eseményekhez való illesztése

A *C. cinerea* meiotikus lépéseinek legrészletesebb transzkriptomikai profilozását Burns és mtsai. (2010) állították fel. Az adatsorunkból származó DEG-eket a Burns-féle adatsorhoz való illesztésével időben pontosabban el tudtuk helyezni a spóráképzés során

lejátszódó molekuláris folyamatokat. Míg Burns és mtsai. (2010) a spóráképzés folyamatát a gametogenezist megelőző lépésektől a meiózis II. fázisának végéig vizsgálták, addig mi a meiózis I. fázisának végétől a spóraérést megelőző, posztmeiotikus lépésekre koncentráltunk. Emiatt, a várakozásaink szerint a mi adatsorunkban az I. és II. stádiumban expressziós csúcsot mutató DEG-ek fognak nagyobb arányban illeszkedni a korábbi adatsorral. Itt fontos kiemelni, hogy az általunk mintázott termőtestek alacsonyabb hőmérsékleten növekedtek (25 °C), így a termőtest érése is lassabban mehetett végbe.

Burns és mtsai. oligonukleotid *microarray* technikával határozták meg a spóráképzés valamely fázisa során felülexpresszáldó géneket, amiket expressziós mintázatuk alapján kilenc klaszterbe csoportosítottak. Összesen hat stádiumot vontak be az analízisbe, három órás időközönként mintázva a kariogámiát (sejtmag-fúzió) megelőző dikarion állapotot (klaszter 1), a kariogámiát (klaszter 2), majd az ezt követő sejtosztódási lépéseket egészen a meiózis II. fázisával bezárólag (klaszter 3-6) (16. ábra).



16. ábra: Az általunk felállított expressziós profilokba tartozó DEG-ek eloszlása a Burns és mtsai. (2010) által felállított klaszterekben, amik a meiózist megelőző és közbülső stádiumait fedik le. A hő térképek a klaszterekben sorolt gének átlagolt log₂ expressziós értékeit ábrázolják. Az alsó ábrán található rövidítések: D: dikarion állapot, K: kariogámia, L/Z: leptotén/zigotén szakasz (meiózis I. fázis), P: pachitén szakasz (meiózis I. fázis), MI: meiózis I. fázis vége, MII: meiózis II. fázis vége.

Az általunk vizsgált 2077 DEG-nek a 85 %-a volt megtalálható a Burns és mtsai. által vizsgált összes gén között, amik közül 588 mutatott szignifikáns expressziószint-

változást. A Profil 0-ba tartozó DEG-ek 35,5 %-a a klaszter 1-5-ben, a Profil 1-be tartozó DEG-ek 38,6 %-a pedig a klaszter 3-5-ben voltak reprezentálva. A Profil 3 DEG-ei elsősorban a klaszter 6-ba tömörültek. A Profil 4 DEG-einek 22,8 %-a a klaszter 6-9-be csoportosult, tehát a meiózis II. fázisában mutattak magasabb expressziót (**16. ábra**).

Összességében azt láttuk, hogy a két adatsor jól illeszkedett egymással, azonban tapasztaltunk némi elcsúszást, amit a legegységesebben a Profil 3-ba tartozó DEG-ek klaszter 6-ban való felülreprezentáltsága mutat. Burns és mtsai. ebbe a klaszterbe azokat a géneket csoportosították, amik a meiózis I. fázisának végén mutattak expressziós csúcsot. Ezzel szemben a Profil 3-ba tartozó DEG-ek a II-es stádiumban mutattak expressziós csúcsot, amikor a sterigmák megjelenésével párhuzamosan a bazídiumban már négy sejtmag található (Hammad és mtsai., 1993; Kües, 2000), tehát ekkorra a meiózis II. fázisának már be kellett fejeződnie. A Profil 0-ba és Profil 1-be tartozó DEG-ek a meiózis közben mutattak expressziós csúcsot. A Profil 4-be tartozó DEG-ek 24,6 %-a volt reprezentálva a Burns-féle adatsorban, ami jelzi, hogy ezeknek a géneknek a nagy része még nem mutatott szignifikáns expressziós különbséget a meiózis befejeződését megelőzően, tehát megfelelnek eredeti célkitűzésünknek és alkalmasak lehetnek a posztmeiotikus folyamatok leírására.

4.2.3. Az expressziós profilok dúsulást mutató génontológiai kifejezésekkel történő részletes jellemzése

Annak érdekében, hogy részletesebb képet kapjunk a spóráképzés során eltérő expressziós dinamikát mutató gének lehetséges biológiai szerepéről, megvizsgáltuk a génontológiai kifejezések dúsulását és ha szükségesnek találtuk, kiegészítettük ezek leírását további, magas expressziós változást mutató gének és géncsoportok kiemelésével és jellemzésével. A GO egy hierarchikus klasszifikációs rendszerbe sorolja a géneket a becsült funkciójuk alapján: minden génhez egy génontológiai kifejezést társít, ezáltal leírást nyújt ezek lehetséges funkciójáról és biológiai szerepéről. A GO három fő csoportba kategorizálja a géneket a becsült doménösszetételük (InterPro) alapján: molekuláris funkciók (*Molecular Function*), sejttösszetételi funkciók (*Cellular Component*) és biológiai folyamatok (*Biological Process*). A dúsulást mutató GO-kifejezések összesen 422 DEG-et foglaltak magukba (**9. függelék**). Az egyes profilokon belül csak a legnagyobb dúsulást mutató GO-kifejezések kerülnek tárgyalásra a dolgozatban. Külön kiemeljük azokat a dúsult géncsoportokat, amiknek a genomban kódolt számához képest kifejezetten nagy hányaduk vagy mindegyikük DEG az

adatsorunkban. Fontos megemlíteni, hogy a GO hierarchikus rendszere miatt egy adott DEG-hez több GO-kifejezés is társulhat, ami miatt a dúsult kifejezések átfedhetnek egymással. A Profil 1, Profil 2 és Profil 3 nagyon kevés DEG-et foglaltak magukba, ezért jellemző volt, hogy a dúsulást mutató GO-kifejezések nagyon magas háttér génszámmal (a kifejezéshez tartozó, de nem DEG gének) rendelkeztek, vagy egy-egy DEG jelenléte miatt több GO-kifejezés is dúsulást mutatott. A profilonkénti alacsony DEG-szám torzult interpretációhoz vezethet, emiatt ezeket a profilokat csak a spóráképzés kontextusában releváns GO-kifejezések mentén jellemezzük.

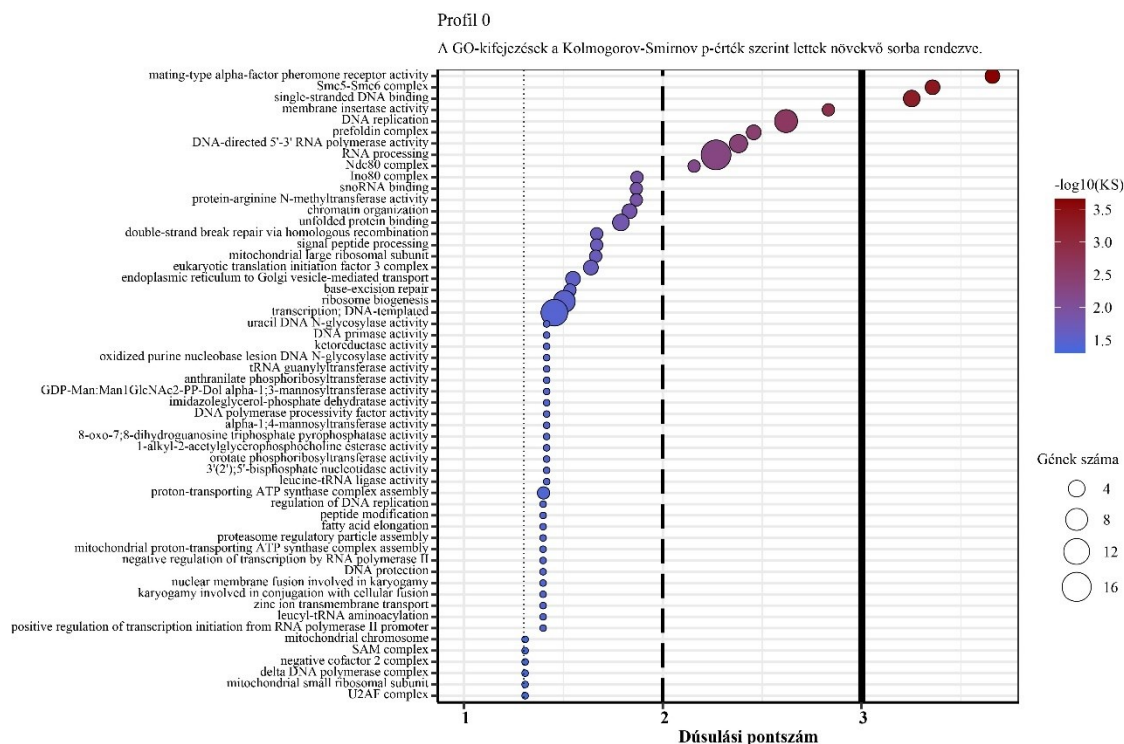
Profil 0:

A Profil 0-ba az expressziós csökkenést mutató DEG-ek tartoztak. A legnagyobb dúsulást (17. ábra) az “ α -faktor feromon-receptorok” mutatták, amibe három STE3-homológ GPCR-t kódoló DEG tartozott. A *C. cinerea* genomja négy párosodási-, és két nem-párosodási típusú feromon-receptort kódol (Kües, 2015), amik közül az előbbi típusból kettő (CopciAB_394943 és CopciAB_465723), az utóbbi típusból egy DEG (CopciAB_356637).

A várakozásaink szerint számos, a sejtosztódáshoz köthető GO-kifejezés mutatott dúsulást, amik közül a legjelentősebb csoportokat tárgyaljuk. A legjelentősebb dúsulást az “Smc5/6 komplex” mutatta (CopciAB_412693, CopciAB_366401 és CopciAB_25048). Az “egyszálú DNS-kötés” GO-kifejezés olyan transzkripcióban szerepet játszó DEG-eket gyűjt magába, mint a Rad18 E3 ubikvitin-ligáz (CopciAB_468197) és RNS polimeráz III alegység (CopciAB_454673). Az “NDC80” egy kinetokor fehérje komplex (CopciAB_453581 és CopciAB_450001). További, a sejtosztódáshoz kötődő általánosabb, magasan dúsult GO-kifejezések a “DNS-replikáció”, “5’-3’ RNS polimeráz aktivitás”, “kromatin-szervezés”, “homológ-rekombináció mediálta kettős DNS száltörés” voltak (17. ábra).

A negyedik legnagyobb dúsulást mutató GO-kifejezés a “membrán inszertáz aktivitás”, aminek oka, hogy a *C. cinerea* genom mindkét inszertáza DEG-nek bizonyult (CopciAB_489308 és CopciAB_385864). Ezt követi a már korábban említett „DNS-replikáció”, és a „prefoldin komplex” (17. ábra).

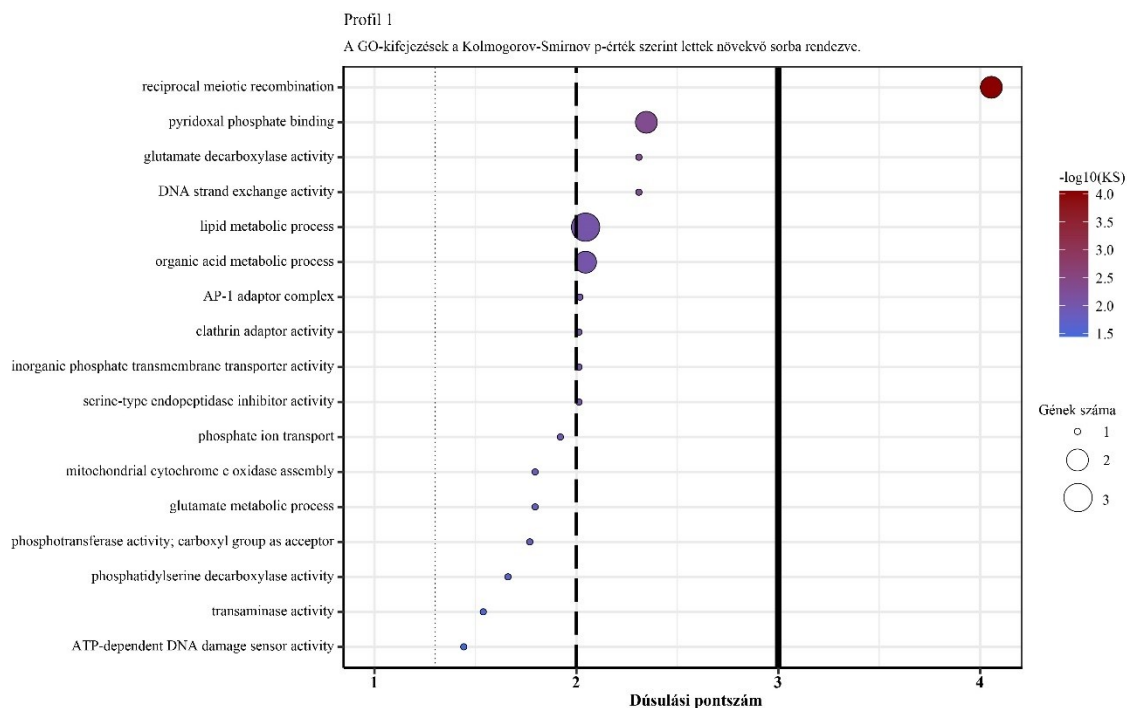
A riboszomális fehérjékhez kapcsolódó kifejezések, mint “RNS-feldolgozás”, “riboszóma biogenezis”, “RNS-érés”, “kis sejtmagi RNS kötés (*snoRNA binding*)” szintén dúsulást mutattak. (17. ábra).



17. ábra: A Profil 0-ba sorolható, expressziós csökkenést mutató DEG-ek alapján dúsulást mutató géntonológiai kifejezések. A dúsulási pontszámok tengelyén lévő vonalak a Kolmogorov-Smirnov p -értékeknek felel meg (balról jobbra: $p = 0,05$, $p = 0,01$, $p = 0,001$). A géntonológiai kifejezések a Kolmogorov-Smirnov p -értékek szerint növekvő sorrendben lettek feltüntetve. A körök átmérője a GO-kifejezéshez tartozó DEG-ek számával arányos.

Profil 1:

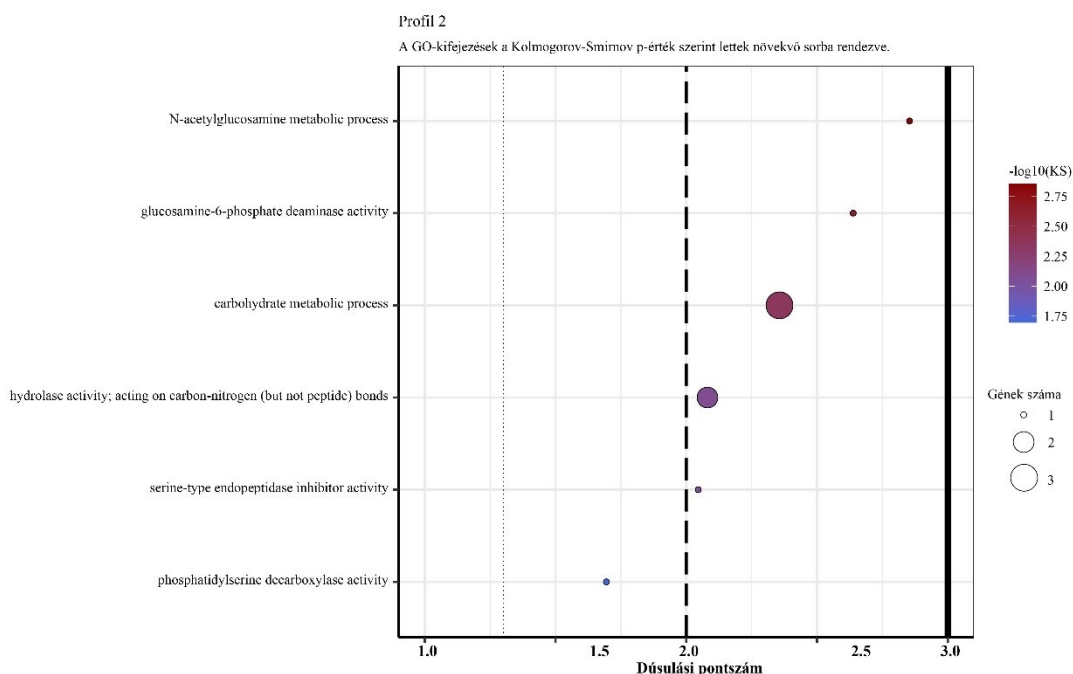
Az ebbe a profilba tartozó DEG-ek a Profil 0-ához hasonlóan az I. stádiumban mutatnak expressziós csúcsot, azonban a kifejeződésük szintje a II. stádiumban jelentősen csökken. A legmagasabb dúsulást mutató GO-kifejezés (**18. ábra**) a “reciprok meiotikus rekombináció”, ami két magasan konzervált DEG-et foglal magába: egy, a rekombinációban szerepet játszó RecA géncsalád tagját (CopciAB_1000139) (Shinohara és Shinohara, 2004) és a meiotikus sejtmegosztódásban szerepet játszó Mnd1-t (CopciAB_446459) (Tsubouchi és Roeder, 2002). A többi GO-kifejezés elsősorban a metabolizmushoz kötődik és nagyon magas háttér génszámmal rendelkeznek, ezért ezek nem kerülnek tárgyalásra a dolgozatban.



18. ábra: A Profil 1-be sorolható, az I. stádiumban expressziós csúcspontot mutató DEG-ek alapján dúsulást mutató génontológiai kifejezések. A dúsulási pontszámok tengelyén lévő vonalak a Kolmogorov-Smirnov p -értékeknek felel meg (balról jobbra: $p = 0,05$, $p = 0,01$, $p = 0,001$). A génontológiai kifejezések a Kolmogorov-Smirnov p -értékek szerint növekvő sorrendben lettek feltüntetve. A körök átmérője a GO-kifejezéshez tartozó DEG-ek számával arányos.

Profil 2:

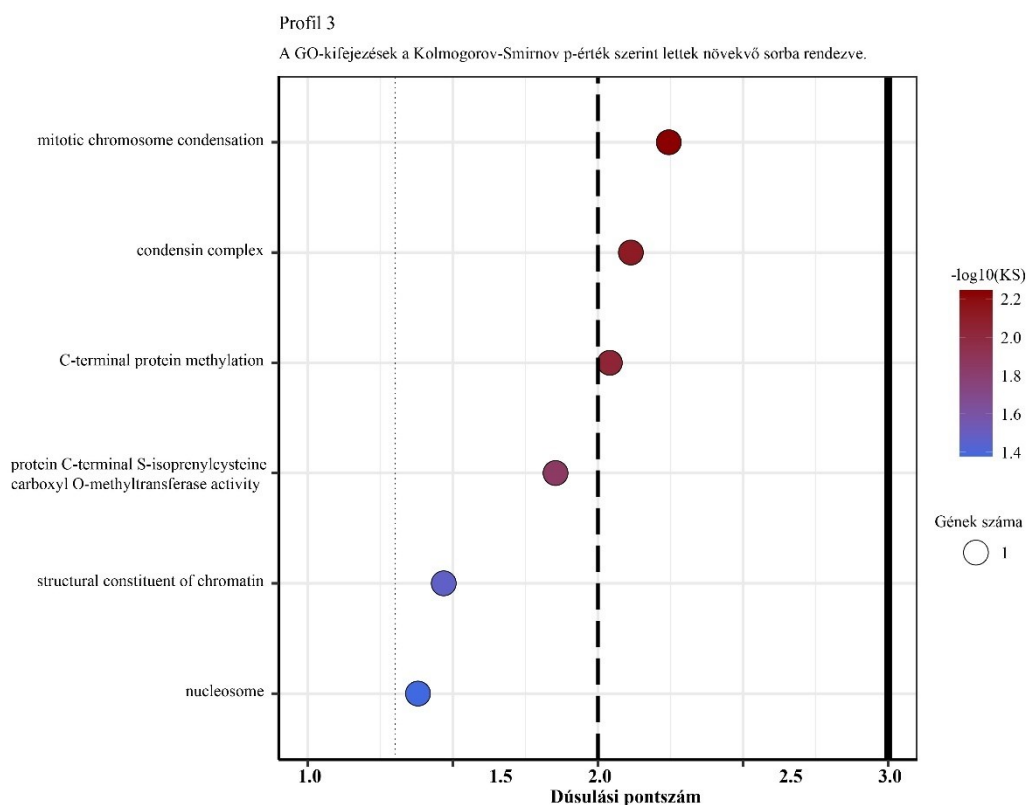
A Profil 2-be a II. stádiumban expressziós mélypontot mutató DEG-ek tartoztak. A hat dúsulást mutató GO-kifejezést (19. ábra) öt DEG határozta meg, ezért ezek nehezen értelmezhetőek. Két DEG-et érdemes megemlíteni (CopciAB_440521 és CopciAB_396895), amik mindegyike NodB domént tartalmazó kitoooligoszacharid-deacetiláz enzimet kódolnak, amik a sejtfal egyik építőelemeinek, a kitinnek és kitozánnak a módosításában vehetnek részt (Vaaje-Kolstad és mtsai., 2019).



19. ábra: A Profil 2-be sorolható, a II-es stádiumban expressziós mélypontot mutató DEG-ek alapján dúsulást mutató génontológiai kifejezések. A dúsulási pontszámok tengelyén lévő vonalak a Kolmogorov-Smirnov p -értékeknek felel meg (balról jobbra: $p = 0,05$, $p = 0,01$, $p = 0,001$). A génontológiai kifejezések a Kolmogorov-Smirnov p -értékek szerint növekvő sorrendben lettek feltüntetve. A körök átmérője a GO-kifejezéshez tartozó DEG-ek számával arányos.

Profil 3:

A Profil 3-ba a II. stádiumban expressziós csúcspontot mutató DEG-ek tartoznak. Funkció alapján valamennyi, dúsult kifejezésbe tartozó DEG jelentőséggel bírhat a spóráképzés folyamatában, azonban a dúsult hat GO-kifejezést csak 3 DEG határozta meg (**20. ábra**). Ezek a kondenzin komplex alegység 3 (CopciAB_371091), aminek meghatározó szerepe van a sejtosztódás során a kromoszómák kondenzálásában majd szegregációjában (Freeman és mtsai., 2000). A hiszton H3 (CopciAB_473916) a kromatin strukturális eleme, ami nélkülözhetetlen a genom stabilitásának fenntartásában (Antczak és mtsai., 2006). Az *S*-izoprenilcisztein karboxil *O*-metiltranszferázt kódoló CopciAB_152667-nek pedig szerepe lehet a C-terminális CaaX-végű fehérjék poszttranszlációs módosításában. Ilyen fehérjék lehetnek pl. a párosodási feromonok prekursor molekulái vagy a kis GTPázok (Raudaskoski és mtsai., 2012; Romano és Michaelis, 2001).



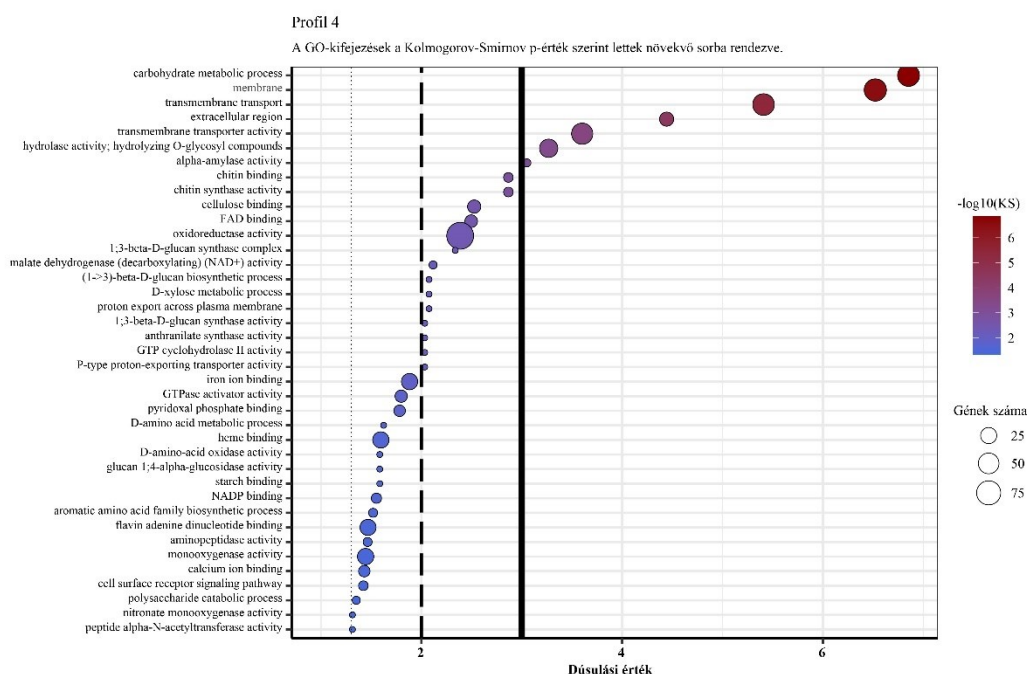
20. ábra: A Profil 3-ba sorolható, a II. stádiumban expressziós csúcspontot mutató DEG-ek alapján dúsulást mutató génontológiai kifejezések. A dúsulási pontszámok tengelyén lévő vonalak a Kolmogorov-Smirnov p -értékeknek felel meg (balról jobbra: $p = 0,05$, $p = 0,01$, $p = 0,001$). A génontológiai kifejezések a Kolmogorov-Smirnov p -értékek szerint növekvő sorrendben lettek feltüntetve. A körök átmérője a GO-kifejezéshez tartozó DEG-ek számával arányos.

Profil 4:

A Profil 4 a III. stádiumra expressziós csúcsot elérő DEG-eket foglalta magába. A 39 dúsulást mutató GO-kifejezést 607 DEG határozta meg. A legnagyobb dúsulást mutató GO-kifejezések (**21. ábra**) elsősorban a sejtfal-szintézisben és -módosításban részt vevő DEG-eket tartalmazták. Erre példák a “kitin-kötés”, “kitinszintézis aktivitás”, “cellulóz-kötés”, “hidroláz aktivitás”, “ α -amiláz aktivitás” és “1-3- β -D-glükán szintáz” kifejezések (**21. ábra**). Itt a “cellulóz-kötés” kifejezés félrevezető lehet, ezért meg kell jegyeznünk, hogy az ehhez kapcsolódó DEG-ek főként olyan szénhidrátkötő modullal rendelkeznek (CBM1 enzimesalád), amik a cellulózhoz való affinitásuk mellett kitinhez is kötődnek (Nagy és mtsai., 2023). A legmagasabb dúsulást a “szénhidrát-anyagcserében” résztvevő gének tették ki, ami hierarchikusan felette áll a legtöbb, feljebb említett GO-kifejezésnek, ezért a magába foglalt DEG-ek nagy átfedést mutattak a többi sejtfal-aktivitáshoz kötődő kifejezéssel. A *C. cinerea* genomja összesen 496 szénhidrát-módosító enzimet kódoló gént tartalmaz a CAZy (*Carbohydrate Active enZymes*) adatbázis alapján (Drula és

mtsai., 2022). A Profil 4-be tartozó DEG-ek közül összesen 121-hez lehetett valamilyen szénhidrát-aktivitással bíró enzimesaládot társítani, ami a *C. cinerea* összes CAZy-ének 24,4 %-át jelenti. A Profil 4 DEG-einek CAZy annotációi szerint 17 vehet részt a sejtfal szintézisben (pl. kitin-szintáz, β -1,6-glükán-szintáz), míg 37 a sejtfal átalakításban és bontásában (pl. kitinázok, kitin deacetilázok, lítikus poliszacharid monooxigenázok) játszhat közre (de Groot és mtsai., 2009; Nagy és mtsai., 2023). Ezek között találjuk az α -amilázhoz hasonló aktivitást mutató glikozid-hidroláz 13 családot, aminek az összes, *C. cinerea*-ban megtalálható tagja DEG.

A további, magasan dúszult kifejezések a membrán-asszociált és transzmembrán fehérjéket kódoló géneket fedték le, mint például a “membrán”, “extracelluláris régió”, “transzmembrán transzport”, “plazmamembránon keresztül történő proton-export”, “P-típusú protonexportáló transzporter aktivitás” és “sejtfelszíni receptor jelátviteli útvonal” (21. ábra). Az ezek által lefedett gének közül a legmagasabb szorzóváltozást elérő DEG-ek MFS-, cukor-, urea-transzporteket és protonpumpákat kódoltak, amik többek között részt vehetnek különböző ozmolitok és tápanyagok transzportjában, vagy fenntarthatják az egyes sejtalkotók közötti pH-gradienst.



21. ábra. A Profil 4-be sorolható, expressziós csökkenést mutató DEG-ek alapján dúszulást mutató géntonológiai kifejezések. A dúszulási pontszámok tengelyén lévő vonalak a Kolmogorov-Smirnov p -értékeknek felel meg (balról jobbra: $p = 0,05$, $p = 0,01$, $p = 0,001$). A géntonológiai kifejezések a Kolmogorov-Smirnov p -értékek szerint növekvő sorrendben lettek feltüntetve. A körök átmérője a GO-kifejezéshez tartozó DEG-ek számával arányos.

Érdekes módon számos, a vas-ionokhoz kötődő kifejezés is dúsulást mutatott, mint az “oxidoreduktáz aktivitás”, “vas-ion-kötés” és “hem-kötés” (**21. ábra**). Ezekért részben 22, citokróm P450-t kódoló DEG volt a felelős, amik aktív centrumában egy vastartalmú kofaktor található és rendkívül változatos biológiai funkciókat látnak el (Durairaj és mtsai., 2016; Mori és Abe, 2023). Ezek közül többnek az expressziós szintje több tízszeres növekedést ért el a III. stádiumban.

4.2.4. További, dinamikus expressziós mintázatot mutató gének és géncsoportok

Ebben a fejezetben a GO-analízisből kimaradt, de jelentős stádiumközi expressziós különbségeket mutató annotációval rendelkező géneket vagy géncsoportok kerülnek tárgyalásra, amik szintén fontos szerepet játszhatnak a spóráképzés folyamatában.

Konzervált, sejtosztódásban szerepet játszó gének

Vizsgálataink során a spóráképzés későbbi, meiózist követő szakaszának feltárása volt a célunk, azonban nem mehetünk el szó nélkül a sejtosztódásban szerepet játszó gének tárgyalása mellett. *C. cinerea*-ban a legátfogóbb meiózissal kapcsolatos kutatást Burns és mtsai. (2010) végezték el, akik összesen 97 konzervált meiotikus gént azonosítottak, amik ortológjai a pékélesztőben (*S. cerevisiae*) vagy a hasadó élesztőben (*S. pombe*) is jelen voltak. Ezeket kiegészítettük Nagy és mtsai. (2023) által összegyűjtött további, bazídiumos gombákban magasan konzervált, sejtosztódáshoz köthető funkcióval rendelkező génekkel, mivel a sejtmagok a meiózist követően egy posztmeiotikus mitózison mennek keresztül (Kües, 2000). Összesen 45 DEG tartozott a konzervált sejtosztódásban szerepet játszó génekhez (**22. ábra**).

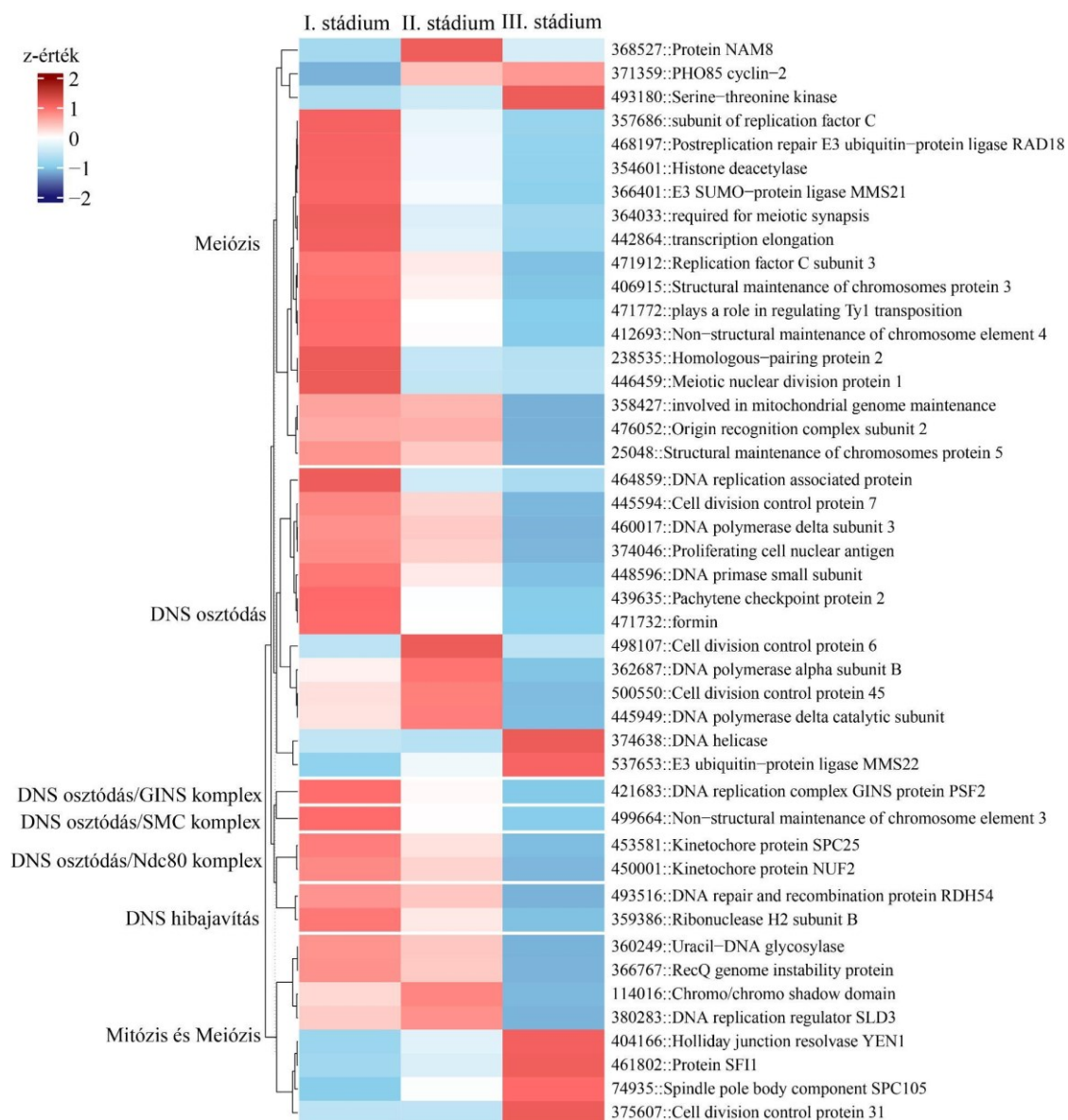
Számos konzervált sejtosztódásban résztvevő DEG-et tudtunk megfigyelni, amik az I. stádiumban mutattak expressziós csúcsot (32 DEG a Profil 0-ba, két DEG pedig a Profil 1-be tartozott) és kifejeződésük a meiózis befejeztével, a II. és III. stádiumra jelentősen lecsökkent (**22. ábra**). Ezek a gének elsősorban a rekombinációban és a homológ kromoszómák párba állításában játszhatnak szerepet, mint például a meiózis során a testvérkromatidákat összetartó kohezin komplex tagjai (*smc3* (CopciAB_406915) és *smc5* (CopciAB_25048)) (Copsey és mtsai., 2013), a DNS szálcserét végző *rdh54* (CopciAB_493516), a homológ kromoszómákat párba rendező *hop2* (CopciAB_238535) (Burns és mtsai., 2010), vagy a meiózis I. fázisának iniciációjakor a DNS-szál átrendezésében résztvevő *cdc45* (CopciAB_500550) (Szambowska és mtsai., 2013).

A II. stádiumban csúcsot mutató, Profil 3-ba sorolható sejtosztódásban szerepet játszó három DEG közül a *nam8* (CopciAB_368527) részt vesz a meiotikus mRNS megfelelő kivágódásában (*splicing*) (Qiu és mtsai., 2011), a *cdc6* (CopciAB_498107) által kódolt fehérje pedig a pre-replikatív komplex tagja, ami ATP-függő módon vesz részt a sejtosztódás szabályozásában (Weinreich és mtsai., 1999). A *pol12* (CopciAB_362687) a DNS-polimeráz α -primáz komplex alegységét kódoló gén, ami nélkülözhetetlen a DNS-osztódás iniciációjához (Grossi és mtsai., 2004).

A II.-III. stádiumokban növekvő expressziót mutató, Profil 4-be tartozó sejtosztódásban résztvevő nyolc DEG a meiózis II. fázisának lezárásában játszhatnak szerepet. Ezekre példák a sejtpolaritást meghatározó ciklint kódoló *pho85* (CopciAB_371359) (Carroll és mtsai., 2001; Jiménez és mtsai., 2013), a metazoa centroszómákkal homológ ún. poláris orsótest (*spindle pole body*, SPD) komponense, az *spc105* (CopciAB_74935) (Kim és mtsai., 2018), az SPD duplikációját és szegregációját szabályozó *sfi1* (CopciAB_461802) és *cdc31* (CopciAB_375607) (Bouhrel és mtsai., 2015), vagy az E3 ubikvitin-ligázt kódoló *mms22* (CopciAB_537653), ami nélkülözhetetlen a pontos kromoszóma szegregációhoz (Zhang és mtsai., 2017) (**22. ábra**).

Ferritinek

A Profil 4 GO-dúsulás eredményeiből kitűnt, hogy a vas-ion kötéséhez, vagy az azt felhasználó fehérjéket kódoló gének expressziója folyamatosan nő a spóráképzés előrehaladtával (**21. ábra**). Ezeken felül a ferritinek figyelemreméltó, több ezerszeres expressziós növekedést értek el a III. stádiumban az I. és II. stádiumhoz képest (CopciAB_547137 (FC_{III/I}: 3495), CopciAB_51853 (FC_{III/I}: 3048) és CopciAB_202468 (FC_{III/I}: 287)).



22. ábra: A sejtosztódásban résztvevő konzervált DEG-ek normalizált expressziójának hő térképe a spóráképzés során mintázott stádiumokban.

4.2.5. Konzervált funkcionálisan ismeretlen és annotálatlan génjelöltek kiválasztása, spóramentes törzsek létrehozására

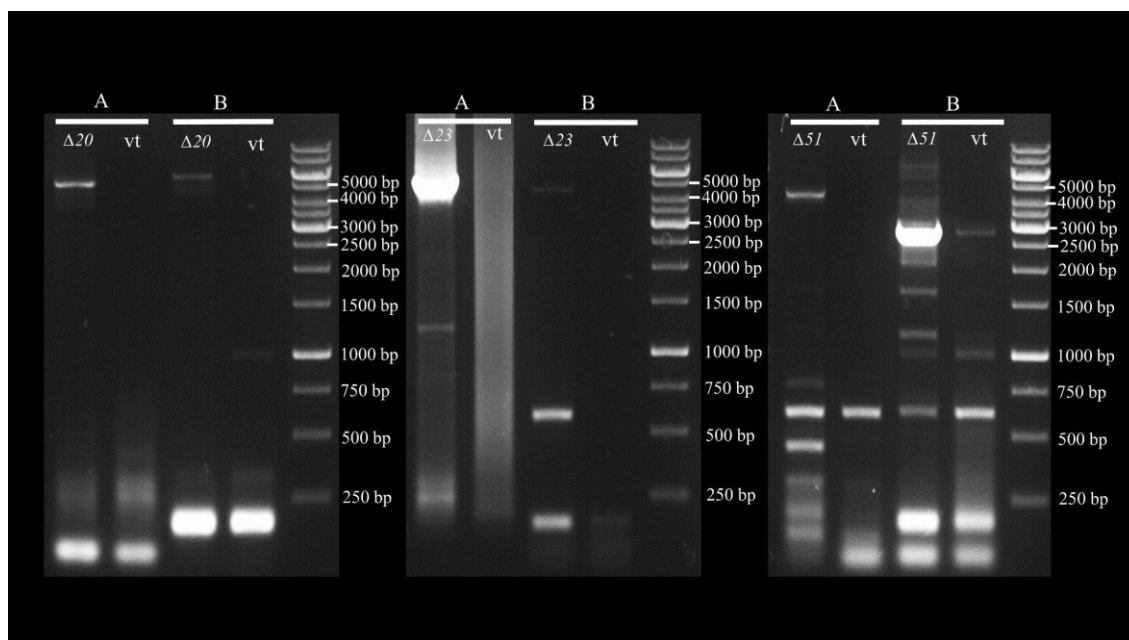
Célunk volt olyan géneket bevonni a reverz genetikai analízisbe, amik csak a spóráképzésben vesznek részt és deléciójuk várhatóan nem lesz kihatással más fejlődésbeli folyamatra, valamint ortológjaik jelen vannak más termőtestképző bazídiumos gombákban, köztük az ipari szempontból kiemelkedő jelentőséggel bíró *P. ostreatus*-ban. Krizsán és mtsai. (2019) *C. cinerea* fejlődésmenet transzkriptomikai adatsorát felhasználva azonosítottuk a lemez-specifikus kifejeződést mutató géneket. Összesen 218 gén mutatott szignifikáns expressziós különbséget a három mintázott stádium között, amik kizárólag a lemezekben expresszálódtak. Ezek közül 18 konzervált

DEG nem rendelkezett semmilyen annotációval, vagy olyan InterPro domén annotációjuk volt, ami alapján nem lehet következtetni a lehetséges funkciójukra. Ezek közül választottunk ki három génjelöltet, amik expressziós dinamikája és nagyfokú konzerváltsága miatt várhatóan fontos szereppel bírnak a spóráképzés folyamatában.

A fenti követelményeket szigorítottuk oly módon, hogy elvártuk, hogy a 12 összehasonlított bazídiomos gomba fejlődés-transzkriptómja alapján legalább tízben legyen jelen ortológ, ami legalább négyszeres expressziószint-változást mutat valamely komplex soksejtű struktúrában a vegetatív micéliumhoz képest, valamint a *C. cinerea* spóráképzése során a meiózist követő II. és/vagy III. stádiumban mutassanak expressziós csúcsot. A szigorú követelményeknek csupán hat DEG felelt meg. Ezeket rangsoroltuk olyan módon, hogy a *C. cinerea* fejlődésmenet-transzkriptomikai adatsorban a lemezben mutatott expressziós szintet elosztottuk a lemez kivételével az összes további struktúrában és stádiumban mért expressziójának az átlagával. Ez alapján a lemezben az egyéb szövetekhez képest a legmagasabb expressziós különbséget mutató géneket pSL-nek (“feltehetően spóramentes”, “*putative SporeLess*”) neveztük el. A legnagyobb különbséget mutató és egyben legkonzerváltabb pSL géneket választottuk ki a reverz genetikai vizsgálathoz: CopciAB_461720 = pSL20, CopciAB_482223 = pSL23 és CopciAB_450751 = pSL51.

A három génjelölt által kódolt fehérjék egyike sem rendelkezett szekréciós szignálszekvenciával a SignalP-6.0 becslése alapján. A WoLF PSORT sejtlokalizációt becselő szoftver alapján a pSL20 és pSL23 a legnagyobb valószínűséggel a sejtmagban és sejtmagvacskában, míg a pSL51 a mitokondriumban lokalizálódik. Az InterPro doménpredikciós szoftver becslése alapján a pSL20 és pSL23 nem rendelkeznek semmilyen ismert konzervált fehérjedoménnel, míg a pSL51 esetében egy IPR041588, integráz cink-kötő domén meglétét jósolta, amihez nem tudtunk funkciót társítani.

A három génjelöltet *in vitro* összeszerelt RNP-komplex alapú CRISPR/Cas9 rendszerrel üttöttük ki abból a célból, hogy megfigyelhessük a gén hiányában fellépő morfológiai változásokat a termőtestképzés során. A gének deléciójának sikerességét PCR-rel ellenőriztük (23. **ábra**).

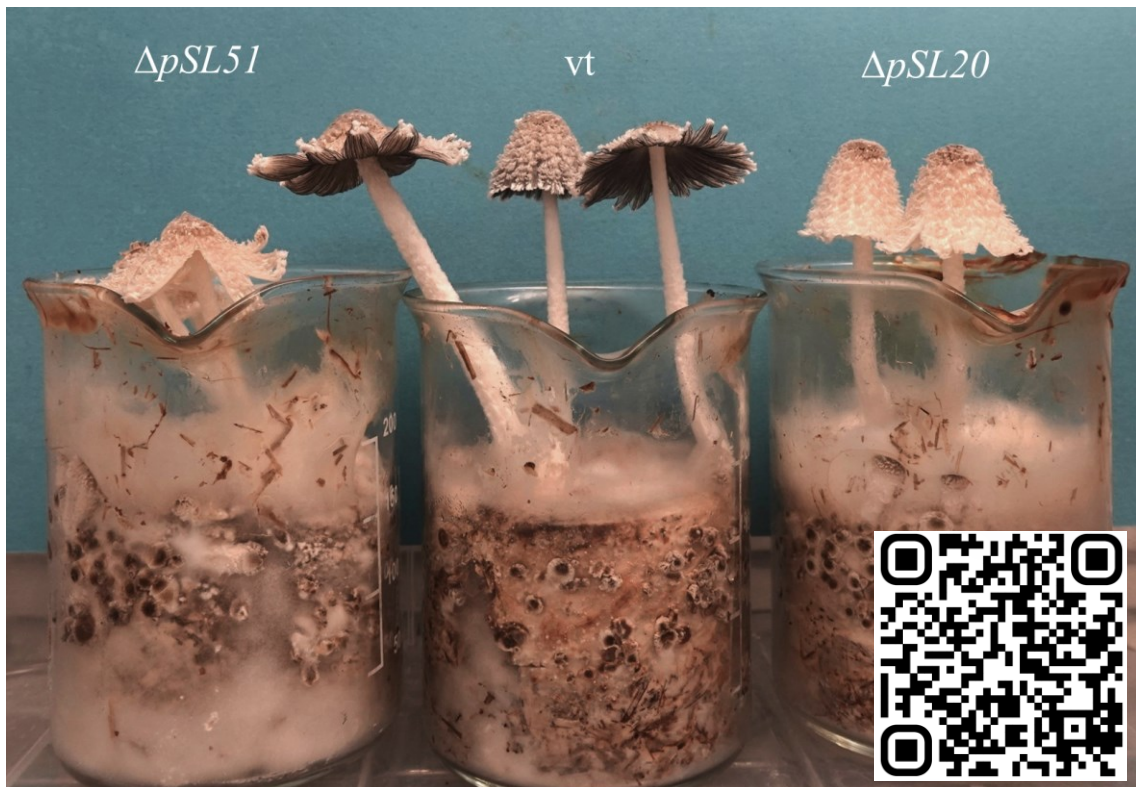


23. ábra: A pSL mutánsok PCR-ellenőrzése. A pSL mutánsokhoz tartozó mintákat a következő rövidítésekkel jelöltük: $\Delta 20$ = pSL20, $\Delta 23$ = pSL23, $\Delta 51$ = pSL51. Az ellenőrzéshez külső, a javítótempláton található homológ karokon kívülre eső ellenőrző primereket (“checking”) és a szelektációs markerre (pab1) specifikus primereket (“PABA”) használtuk.

A: checking_fwd/PABA_rev (homológ rekombinációkor várt méret a pSL20 esetén: 4207bp, pSL23 esetén: 4221bp, pSL51 esetén: 4247bp), B: PABA_fwd/checking_rev (homológ rekombinációkor várt méret a pSL20 esetén: 4207bp, pSL23 esetén: 4351bp, pSL51 esetén: 3997bp). Vad típusú törzsből izolált gDNS-t használva templátként egyik esetben sem vártunk PCR-terméket, azonban a pSL51 ellenőrzésekor mind a $\Delta 51$, mint a vt esetén láttunk több, nem várt amplikont, ami az atipikusan bekötődő primereknek tudható be. Az ellenőrzéshez használt primerek az **1. függelék** táblázatában találhatóak.

4.2.6. *Spóramentes C. cinerea* törzsek morfológiai jellemzése és mikroszkópos vizsgálata

A vad típusú termőtestek lemezei az autolízist követően a sötét színű spórák tömeges jelenléte miatt elfekedtek (**24. ábra**). A Δ pSL23 deléciós mutáns érett termőtestei esetében barnás árnyalatot figyeltünk meg (**25. ábra**). A fentiekkel szemben a Δ pSL20 és Δ pSL51 törzsek érett termőtestei teljesen fehérek maradtak (**24. ábra**).

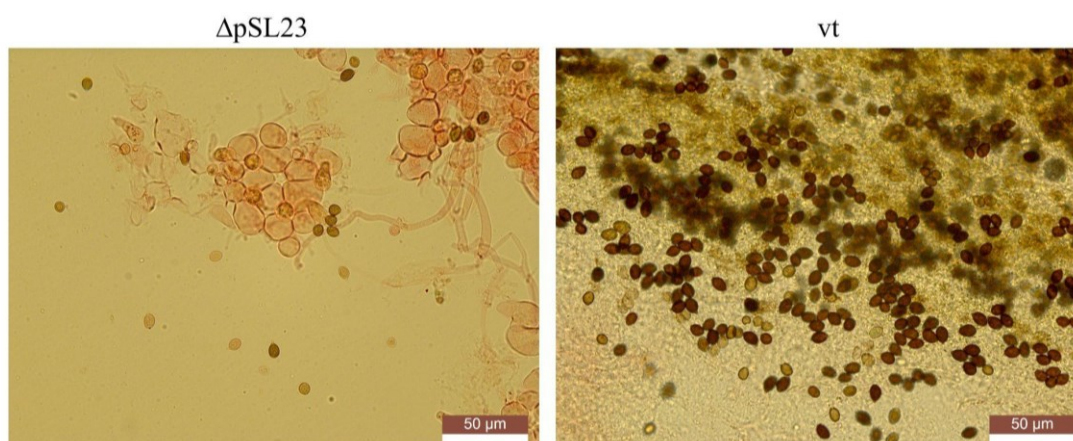


24. ábra: A két spóramentes mutáns ($\Delta pSL20$ és $\Delta pSL51$) és vad típusú *C. cinerea* törzsek termőtestképzése. A törzsek szalma-korpa tápközegen növekedtek. A videó egy 16 órás éjszakai periódust fed le. A felvételek rögzítésekor a $\Delta pSL23$ mutánst még nem tudtuk létrehozni. A fejlődésükről készült videó az ábrán látható QR-kód beolvasásával vagy az alábbi linken érhető el: <https://youtu.be/ZCY4q4ffbus>, illetve a **10. függelékben** is megtekinthető a repozitóriumba feltöltve.



25. ábra: A három pSL mutáns *C. cinerea* törzs érett termőtestei az autolízist megelőző stádiumokban. A törzsek szulfátos YMG_{1/2}-n nőttek fel. A $\Delta pSL51$ törzs éppen a kinyílás fázisában járt a felvétel készítésekor. A $\Delta pSL20$ és $\Delta pSL51$ törzseknél a spórák nem értek meg és a termőtest autolízisét követően nem tudtuk kimutatni a jelenlétüket. A vad típusú törzsre jellemző fenotípus az **24. ábrán** látható.

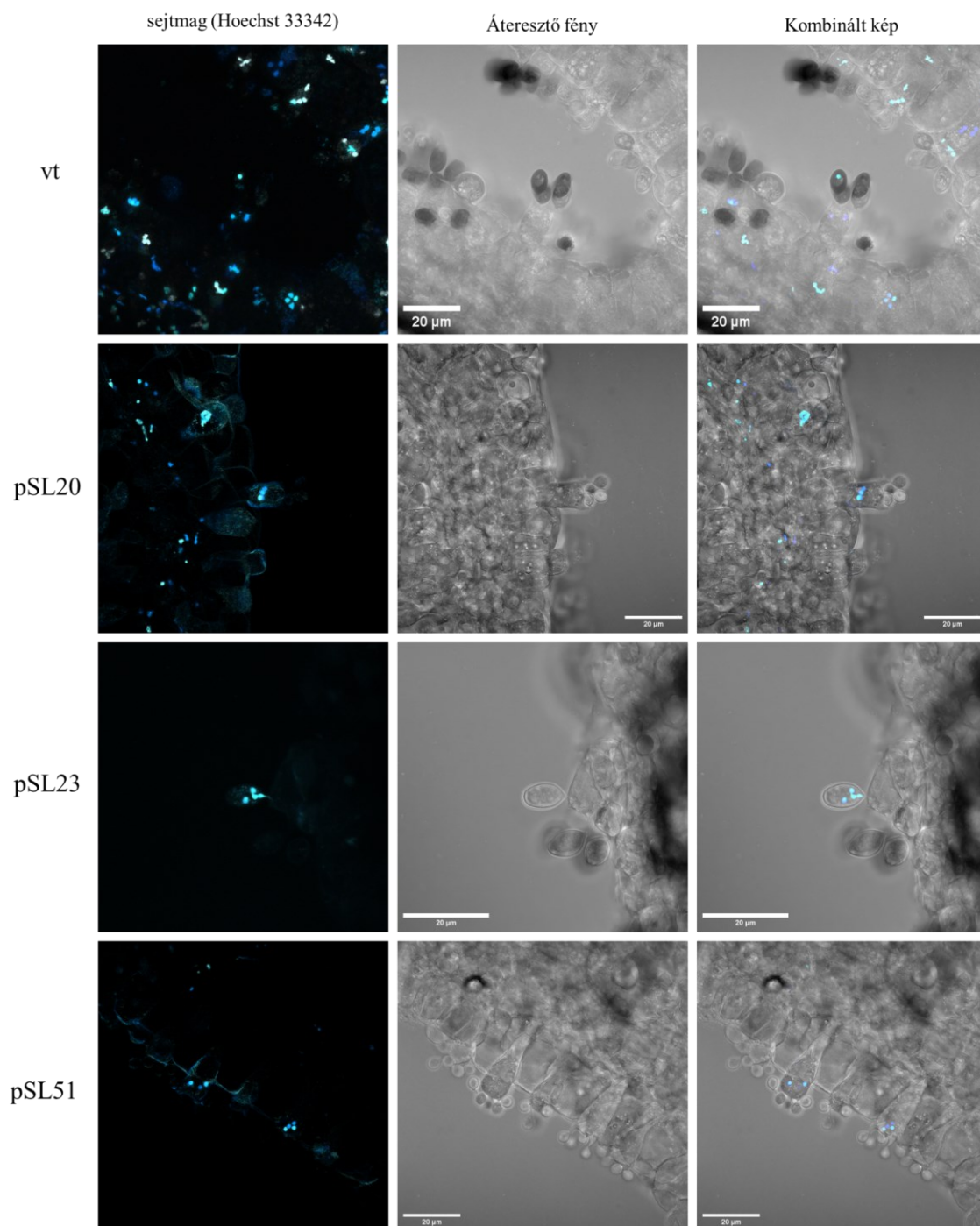
Fénymikroszkóp alatt is megvizsgáltuk a szinkronizált törzsek érett termőtesteit, mikor a vad típusú törzs esetében már véget ért a spóraérés és a spórák elkezdtek leválni a sterigmákról, de az autolízis folyamata még nem kezdődött meg. Egy bazídiumon négy sterigma nőtt ki amik végein egy-egy spóra fejlődött. Fénymikroszkóp alatt vizsgálva a vad típusú törzsek lemezeit azt figyeltük meg, hogy a tojásdad-alakú, sötétbarna spórák $11-12 \times 6,5-7 \mu\text{m}$ méretűek és festés nélkül is jól láthatóak. A teljesen fehér termőtesteket képző mutáns törzseknél is láthatóak voltak a felfúvódott spórák, de azok pigmentációja és leválása elmaradt. A ΔpSL20 törzsek lemezein szinte csak csupasz bazídiumok voltak láthatóak, csak egy kis részükön voltak sterigmák és felfúvódó spórák. A ΔpSL51 törzsnél a vad típushoz nagyságrendileg hasonló arányban tudtunk megfigyelni sterigmákkal és felfúvódó spórákkal rendelkező bazídiumokat. A ΔpSL23 termőtestek a vad típusú törzshöz képest jóval kevesebb spórát hoztak. A spórák halványbarna színűek és csepp alakúak voltak, és méretük is kisebb volt a vad típusú spórákhoz képest ($7,9-8,6 \times 5,5-5,9 \mu\text{m}$) (26. ábra). Az egyes törzsek által termelt spórák tömegességének összehasonlításához meghatároztuk 100-100 mg érett, már autolizált kalapszövet-macerátumban jelenlévő spórák számát. A vad típusú törzs 100 mg kalapszöveve átlagosan 3,5 millió spórát tartalmazott, amihez képest a ΔpSL23 törzsben ennek töredéke ~133 ezer volt (3,8 %). A ΔpSL20 és ΔpSL51 mutáns törzsek termőtesteiből nem tudtunk spórákat izolálni. Ennek feltehetően az lehet az oka, hogy a ΔpSL20 és ΔpSL51 mutáns törzsek éretlen spórái nem voltak képesek lelökődni a sterigmákról és a termőtestérést követő autolízis során a bazídiumokkal együtt lebomolhattak.



26. ábra: A ΔpSL23 és a vad típusú törzsek spórái fénymikroszkóp alatt, $40\times$ nagyításban. A minták láthatóságát kongóvörös oldattal növeltük. Méretskála: $50 \mu\text{m}$.

A meiózis folyamatának ellenőrzése és az utódsejtmagok sorsának vizsgálatához a bazídiumokat fluoreszcens mikroszkóp alatt is megvizsgáltuk. A sejtmagok jelölésére

a DNS kis árkába kötődni képes, de a sejtek fixálását nem igénylő Hoechst 33342 fluoreszcens festéket használtuk. Mind a három mutáns törzs esetében a meiózis II. fázisát követően láthatóvá vált a négy sejtmag a bazídiumokban (**27. ábra**), tehát már nem vesznek részt a sejtosztódásban, így a kiűtött géneket nem tekinthetjük meiotikusnak. Vad típusú törzsnél a meiózis II. fázisát követően a sejtmagok átvándorolnak a felfűvódó spórákba. A már teljesen melanizált, érett spórákban a Hoechst excitációs jele nem detektálható. A $\Delta pSL20$ és $\Delta pSL51$ törzsek esetében a spóráképzés kései stádiumait vizsgáltuk, amikor a vad típusú törzsben a spórák egy jelentős része már érett és elkezdődött a sterigmákról való lelökődésük. A $\Delta pSL20$ és $\Delta pSL51$ törzseknél is láthatóak voltak a sterigmákon felfűvódó spórák, azonban a sejtmagok spórákba történő migrációját nem tudtuk megfigyelni. A $\Delta pSL23$ törzsnél egy igen rendhagyó jelenséget véltünk felfedezni. Az egyes sejtmagok ahelyett, hogy külön-külön spórákba vándoroltak volna, koordinálatlanul egyetlen felfűvódó spórában helyezkedtek el. Ez magyarázhatja azt, hogy a még nem melanizált spórák csak egy részében tudunk sejtmagot detektálni (**27. ábra**).



27. ábra: A vad típusú *C. cinerea* törzs és a három, spóráképzést érintő deléciós mutáns törzs lemezei fluoreszcens konfokális mikroszkóp alatt vizsgálva. A sejtmagokat kék Hoechst 33342 fluoreszcens festékkel jelöltük. Az egyes árnyalatok a különböző metszeti síkokban készült képeknek felelnek meg. A vizsgált síkon kívül eső sejtekben a sejtmagok nem látszódnak. Méretskála: 20 μ m.

5. Diszkusszió

A gombák országában látott legösszetettebb szerveződési szintet az Agaricomycotina tagjai érték el a termőtestek létrehozása által (Nagy és mtsai., 2023). Ezek az ivaros képletek azon túlmenően, hogy helyet adnak a meiotikus spórák kialakulásának, fontos szereppel bírhatnak azok védelmében és terjesztésében, ami hozzájárul a gyors fajképződéshez, ami elvezetett ahhoz a rendkívüli faj- és morfológiai gazdagsághoz, ami ma a bazídiumos gombákat jellemzi (Varga és mtsai., 2022). A termőtest egy differenciált szövetekből álló komplex soksejtű képlet, aminek kialakulását szabályozó genetikai hálózat jó része még feltáratlan. Köszönhetően a klasszikus hisztológiai (Cléménçon és Emmett, 2004) és különböző genetikai vizsgálatoknak (Kües, 2000), számos olyan gén ismerünk, amik befolyásolják a termőtest szerkezeti felépítését (pl. hidrofobinok (Sunde és mtsai., 2008)), részt vesznek a sejtfal-szintézisben és -módosításban (Chen és mtsai., 2012; Liu és mtsai., 2021; Zhou és mtsai., 2019), valamint a termőtest differenciációjának szabályozásában (pl. transzkripciós faktorok (Liu és mtsai., 2022; Ohm és mtsai., 2011; Pelkmans és mtsai., 2017; Sun és mtsai., 2023; Wang és mtsai., 2019), kromatin szabályozók (Muraguchi és Kamada, 1998; Vonk és Ohm, 2021), kinázok (Szeto és mtsai., 2007) és a jelátvitelben szerepet játszó gének (Palmer és Horton, 2006; Wirth és mtsai., 2021)). Azonban, az elmúlt évtizedekben felhalmozott tudásunk még mindig csak egy kis részét fedi le a teljes fejlődési programnak, és az egyes fajokban végzett tanulmányok jelenleg még nem teszik lehetővé olyan folyamatok leírását, amik a legtöbb bazídiumos gomba termőtestképzése során bekövetkezik (Merényi és mtsai., 2022). Ennek egyik oka, hogy a termőtest fejlődése során a szignifikánsan felülexpresszált, ún. “devreg” gének jelentős részéhez nem tudunk lehetséges funkciót társítani (annotáció) pusztán hasonlóság és szerkezeti becslések alapján. Ezek az ún. annotálatlan gének nagy számban vannak jelen a gombagenomokban, és potenciálisan eddig még fel nem tárt, új géncsaládok tagjai lehetnek (Nagy és mtsai., 2023). Az eddig feltárt annotálatlan gének jó része fajspecifikus effektorokat vagy kis szekretált fehérjéket kódolnak. Ilyenek például a mikorrhiza-képzés során indukált kis szekretált fehérjék (Plett és Plett, 2022), a *C. neoformans*-ban leírt “*quorum sensing*”-ben résztvevő rövid peptid (Tian és mtsai., 2018), a *P. ostreatus*-ból származó effektorszerű Ssp1 (Feldman és mtsai., 2020), vagy az *Ustilago* sejtfelszíni effektorkomplexe (Ludwig és mtsai., 2021). Kísérletesen funkcióhoz társított konzervált, korábban annotálatlan génekből még kevesebbet, csupán pár példát ismerünk, mint a szeptációban részt vevő *spc* gének (Van Peer és mtsai., 2010),

a tönk megnyúlásában szerepet játszó *ctg1* (Nakazawa és mtsai., 2008) vagy az *Armillaria*-ban nemrég leírt kis szekretált fehérjét kódoló gének (Sahu és mtsai., 2023).

A termőtest, mint komplex soksejtű struktúra kialakulásának kontextusában a GPCR-ekhez szerkezetileg hasonló, de klasszikus GPCR-osztályokba be nem sorolható p7TMP-ket kódoló gének kifejezetten érdekes csoportot jelentenek, amiket eddig még nem vizsgáltak átfogóan bazídiumos gombákban. Állatokban a klasszikus GPCR-eket kódoló gének száma erős összefüggést mutat az élőlény testfelépítésének komplexitási szintjével (de Mendoza és mtsai., 2014), azonban a gombagenomokban nagyságrenddel kevesebb klasszikus GPCR-t kódoló gén található, ezért ez az összefüggés nem állítható fel (Kiss és mtsai., 2019). Azonban, a nem-klasszikus p7TMP-ket vizsgálva Brown és mtsai. (2018) rámutattak arra, hogy az egysejtes élesztő fajok nem, de a tömlősgomba fonalas fajok genomjai akár százánál is több p7TMP-t kódoló gént tartalmaz, amik akár eddig le nem írt, gombaszpecifikus GPCR-ek is lehetnek. A komplex soksejtű gombák által kódolt, a jelenleg ismertnél kiterjedtebb GPCR-repertoárt támasztja alá a heterotrimer G-fehérje alegységek száma is. Például, *C. cinerea* genomja 16 α -, egy β - és két γ heterotrimer G-fehérje alegységet kódol, ami sokkal több kölcsönható receptor jelenlétét sejteti, mint a jelenleg ismert 12 klasszikus GPCR. Összehasonlításképpen, az emberi genom 826 GPCR mellett 23 α -, öt β - és 12 γ heterotrimer G-fehérje alegységet kódoló gént tartalmaz (McCudden és mtsai., 2005; Yang és mtsai., 2021).

Munkánk során a *C. cinerea* modellen keresztül bizonyítottuk azt a feltételezésünket, miszerint a komplex morfológiájú termőtesteket létrehozni képes bazídiumos gombák is rendelkeznek a fonalas tömlősgombafajokban leírt p7TMP-repertoárral, sőt, számukban meg is haladhatják azokat. Ez párhuzamba vonható az állatoknál megfigyelt jelenséggel, miszerint a testszerveződés összetettségének növekedésével a GPCR-repertoár is expandált. Szerkezetpredikciós vizsgálataink alapján a *C. cinerea* összesen 289 p7TMP-vel rendelkezik, amik potenciálisan a klasszikus GPCR-ekhez hasonló funkcióval bírhatnak. Megvizsgálva ezek egyedfejlődés során mutatott expressziós dinamikáját (Krizsán és mtsai. adatait felhasználva, 2019) azt találtuk, hogy ezek közül több mint száz felülexpresszálódik a termőtesttestképzés során, így szerepük lehet a soksejtűség kialakításában és a szöveti differenciációban. Három konzervált, a termőtestiniciáció során jelentősen felülexpresszálódó gént reverz genetikai analízisbe vontunk be, amik közül két deléciós mutáns számottevő morfológiai elválásokat mutatott a termőtestképzés során.

A p7TMP06 mutáns esetében a primordiumok sereges növekedését figyeltük meg. Ez a jelenség azért érdekes, mert a vad típusú törzs esetében fényindukció hatására rengeteg hifacsomó jelenik meg, azonban ezeknek csak egy kis része tud differenciálódni, majd primordiummá és érett termőtestté továbbfejlődni. A gomba csak néhány preferált hifacsomóba csoportosítja át a termőtestfejlődéshez szükséges tápanyagokat, azonban a “választást” befolyásoló tényezők és ennek mechanizmusa még ismeretlen (Kües és Liu, 2000). A p7TMP06 mutánsban feltételezhetően ez a mechanizmus sérült, így a legtöbb hifacsomó primordiummá fejlődik, ezzel elvonva a termőtest teljeséréséhez szükséges erőforrásokat. Összehasonlító genomikai és transzkriptomikai vizsgálatok alapján, az élesztő *C. neoformans*-ból, a reszupinátus (kéreg) termőtestet hozó *Phanerochaete chrysosporium*-ból és a koralloid *Pterula gracilis* genomjából hiányzik a p7TMP06 ortológja, azonban valamennyi, az összehasonlításba bevett komplex termőtestet képezni képes bazídiumos fajban jelen van és legalább négyszeres expressziós változást mutatnak a termőtestfejlődés valamely stádiumában a vegetatív micéliumhoz képest. A p7TMP06 mutánsnál tapasztalt tömeges primordiumképződés az egyik legnépszerűbb, élelmezési célra termesztett gombafajnál, a kétspórás csiperkénél (*A. bisporus*) is megfigyelhető, ahol négyzetméterenként több tízezer primordium fejlődik ki, de ezeknek csak 3,5 %-a képes végül termőtestté érni (Noble és mtsai., 2003). Ez a jelenség önmagában is rendkívül érdekes és további kutatásra érdemes, hiszen a primordiumszám csökkentésével hatékonyabb lehet az erőforrások célzott allokációja, ami végső soron javíthatja a várt termőtest-hozamot.

Részletes vizsgálatokat egy, még a p7TMP06 mutánsnál is érdekesebb fenotípust eredményező, súlyos fejlődésbeli defektust hordozó törzzsel végeztünk el. A CopciAB_493979 azonosítójú gén mutatta a legnagyobb expressziós dinamikát a korai fejlődési állapotokban. Hiánya nem volt hatással a vegetatív micélium növekedésére, azonban a termőtestek differenciációja elmaradt és az egyedi morfológiai elváltozások következtében hógolyóra emlékeztettek, ezért a megfigyelt hógolyó-szerű fenotípus (*snowball*) után a gént *snb1*-nek neveztük el.

A $\Delta snb1$ által létrehozott termőtesteink belül a struktúrák hiánya jó viszonyítási alapként szolgált a szövetek kialakulását befolyásoló gének azonosítására. A termőtestképzés egészen korai stádiumainak transzkriptomikai vizsgálatával számos olyan gént tudtunk azonosítani, amik részt vehetnek a szöveti differenciáció elindításában és szabályozásában.

Az azonosított gének komplex soksejtű struktúrák kialakításában és differenciációjában betöltött lehetséges szerepét támasztja alá az a megfigyelésünk is, miszerint a *Δsnb1* törzs másodlagos hifacsomóiban és elsődleges primordiumaiban szignifikánsan alulexpresszáldó gének jelentős része „*FB-init*”, ami azt jelenti, hogy ezek a gének a vad típusú törzs termőtestfejlődésének kezdeti stádiumaiban felulexpresszáldnak. Továbbá, az alulexpresszált gének között magas arányban találtunk szövetspecifikus géneket. Külön említésre érdemes, hogy a *C. cinerea* összes kalap-specifikus génjének közel harmada szignifikánsan alulexpresszáldott a *Δsnb1* törzsben. Az „*FB-init*”, szövetspecifikus, 48. órában jelentősen alulexpresszált gének akár alkalmas jelöltek lehetnének a szöveti differenciálódás nyomonkövetésére, marker-génként alkalmazva jövőbeni funkcionális vizsgálatok során. Például, egy szövetspecifikus marker-génhez egy fluorofór fehérjét (pl. GFP) fuzionáltatva nyomonkövethető lehet bizonyos szövettípusok differenciációja, vagy a marker-gén promóterét felhasználva szövetspecifikusan lehetne kifejeztetni egy másik vizsgált gént. Az összehasonlító transzkriptomikai eredmények számos olyan génre rámutattak, amik feltételezhetően részt vesznek a szöveti differenciáció kezdeti lépéseiben, azonban a rendelkezésünkre álló adatsor nem alkalmas a differenciációs folyamatok leképezésére. A limitáló tényezők közé tartozik, hogy csupán két fejlődési stádium került bele az összehasonlításba, így későbbi fejlődési stádiumokban mérhető génexpressziós értékekre csak más adatsorokkal való összevetéssel következtethetünk. Erre alkalmas lehetne Krizsán és mtsai. (2019) által közölt transzkriptomikai adatsor, ami a későbbi termőtestfejlődési stádiumokat is lefedi. Ezt felhasználva meg tudtuk határozni a szövetspecifitást mutató géneket. Azonban az általuk mintázott másodlagos hifacsomó és első stádiumú primordiumokban meghatározott génexpressziós értékek sok esetben jelentős eltérést mutattak az általunk mintázott vad típusú törzs ezen fejlődési stádiumaiban, emiatt a két adatsort csak korlátozottan lehet egymással összevetni.

A transzkriptomikai adatsorunk alkalmasnak bizonyult arra, hogy valamilyen szinten képet kapjunk arról, hogy milyen molekuláris folyamatok érintettek az *snb1* hiányában. Összesen több mint ezer szignifikánsan eltérő expressziót mutató gént azonosítottunk, amik közül 206 konzervált és más bazídiumos gombafajok termőtestképzése során is felulexpresszáldik. Az ezekből felállított funkcionális kategóriákkal jellemeztük azokat a molekuláris folyamatokat, amikre hatással lehetett az *snb1* hiánya. Mindez alapján számos olyan enzimet kódoló DEG-et tudtunk azonosítani, amik a gombasejt alap metabolizmusában játszhatnak szerepet. Itt hangsúlyoznunk kell

azt, hogy kizárólag a génexpressziós különbségeket vizsgálva nem becsülhetjük meg a sejten belüli metabolikus változásokat, de feltételezhetjük, hogy a fenti enzimeket kódoló gének expressziójában bekövetkező változások valószínűleg hatással lehetnek egyes részfolyamatokra, kiváltképp az oxálsav-katabolizmusra, ami befolyásolhatja a *Δsnb1* sejtek pH-homeosztázisát is. Az oxálsav egy általánosan előforduló, a gombák által is kiválasztott szerves sav (Jarosz-Wilkolazka és Gratz, 2006), amit elsősorban növénypatogén gombák virulenciafaktoraként írtak le (Cheng és mtsai., 2007), míg fakorhasztó bazídiumos gombafajokban a lignin- és cellulózbontást segíti elő, mivel az oxálsav protonforrásként szolgálhat a faanyag különböző szénhidrátjainak enzimatis és nem-enzimatis hidrolíziséhez (Shimada és mtsai., 1997). Egy nemrég közölt tanulmány szerint az oxálsav a β -glükánhoz nem-kovalensen kötődve olyan hidrogélt képezhet az extracelluláris mátrixban, ami befolyásolhatja a metabolitok szekrécióját (Perez-Gonzalez és mtsai., 2023). Noha a soksejtűség kontextusában még nem írták le az oxálsavat, feltételezzük, hogy szerepe lehet a szöveti differenciációban, mivel több DEG is az oxálsavval kapcsolatos metabolikus útvonalakban részt vevő enzimeket kódolnak. Ezt erősítheti, hogy az élesztő *S. cerevisiae*-ben nem ismert, hogy képes lenne oxálsavat termelni vagy felhasználni (Cheng és mtsai., 2007), ellenben az oxálsav sejtkárosító hatása a számára, így az oxálsavat lebontó, az *Δsnb1*-ben felülexpresszáldó oxalil-KoA szintetáznak sejtprotektív hatása van élesztőben (Foster és Nakata, 2013). Több DEG kihatással lehetett az oxaloacetát katabolizmusra is, ami fontos prekursor molekulája az acetyl-KoA-nak és más metabolitoknak, amelyek részt vesznek különféle vegyületek, például az ergoszterol és a membránlipidek bioszintézisében.

A sejtfal és sejtfelszín számos szempontból érintett a *Δsnb1* törzsben, mivel számos kitináz és további sejtfalmódosító enzim, valamint szekretált fehérjét kódoló gén DEG. A sejtfal átszervezése (*remodeling*) egy dinamikus folyamat, ami elengedhetetlen a szöveti differenciációhoz. A sejtfal-módosító enzimek szerepet játszanak a sejt morfogenezisében a megvastagodott sejtfal fellazításával, valamint olyan specifikus sejtfelszíni módosításokat eredményezhetnek, amik kulcsszerepet játszhatnak a differenciációban (Vetchinkina és mtsai., 2017). Ezek a sejtfal-asszociált és sejtfelszíni fehérjék azért is kiemelendők, mivel az extracelluláris mátrixban lévő szekretált fehérjék felelősek a hifák aggregációjáért, ami a szöveti differenciáció előfeltétele, ami során a sejtfal is intenzív átrendeződésen megy keresztül (Walser és mtsai., 2003). A *C. cinerea*-ban található lektineket kódoló gének több mint 21%-a DEG. A lektinek olyan szekretált sejtfelszíni fehérjék, amik specifikusan képesek felismerni és kötni különféle szénhidrát

részleteket, ezért nagyon változatos funkciókat láthatnak el. A lektineknek szerepe lehet a termőtest fejlődésében, azonban az ebben a folyamatban betöltött pontos funkciójuk ismeretlen (Künzler, 2015; Sabotič és mtsai., 2016).

A hidrofobinokat kódoló gének még nagyobb arányban voltak éritettek, mivel közel felük volt DEG. A hidrofobinok kizárólag a soksejtes gombákban előforduló sejtfelszíni fehérjék, amik egyrétegű amfipatikus réteggé összeállva víztaszító felületet hoznak létre a gomba különböző szöveteiben (Bayry és mtsai., 2012). Mivel a hidrofobinok gyakran mutatnak termőtest-specifikus expressziót (Chum és mtsai., 2008), emiatt lehetséges, hogy a hidrofobin gének expressziójának jelentős változása a mutáns törzs egyes szöveteinek hiányából eredhet.

Az RlpA szupercsaládra jellemző Ψ - β -hordó-szerkezettel bíró szekretált fehérjéket kódoló gének magas expressziós különbségeket mutattak. Ide tartoznak többek között a cerato-plataninok. A *C. cinerea* öt cerato-platanint kódoló génjéből három alulexpresszált. A cerato-plataninok kisméretű, cisztein-gazdag szekretált fehérjék (Luti és mtsai., 2020), amiket először növénypatogén gombákban írtak le (Baccelli, 2015). Azonban a bazídiumos gombák fejlődése során mutatott expressziós dinamikájuk alapján a soksejtű struktúrák kialakításában is részt vehetnek (Krizsán és mtsai., 2019; Nagy és mtsai., 2023). Az adatsorban a $\Delta snb1$ törzsben leginkább felülexpresszált gén is RlpA doménnel rendelkezik. Gombákban ezt a fehérjeszerkezet leírták az expanzinokban (Narváez-Barragán és mtsai., 2020; Oliveira és mtsai., 2011), bizonyos endoglukanázokban (Hirvonen és Papageorgiou, 2003) és további növénypatogén gombák virulenciafaktoraiban is (Charova és mtsai., 2020; Sarkar és mtsai., 2023). A cerato-plataninok az expanzinokkal mutatott szerkezeti és funkcionális hasonlóságaik alapján szerepet játszhatnak a gombák növekedésének és fejlődésének különböző szakaszaiban, valószínűleg a sejtfalhoz kapcsolódva (Gaderer és mtsai., 2014; Krizsán és mtsai., 2019; Nagy és mtsai., 2023). Ezt a hipotézist támasztják alá a Ψ - β -hordó-szerkezetet mutató effektorokon végzett korábbi vizsgálatok, amelyek bizonyították ezek kitinkötő képességét (Dölfors és mtsai., 2019).

A tíz, $\Delta snb1$ törzsben leginkább felülexpresszált gén közül négy DUF4360 doménnel rendelkező szekretált fehérjét kódoló gén. A DUF4360 doménnel rendelkező fehérjékkel kapcsolatos szakirodalom korlátozott, elsősorban növényi patogén tömlősgombák feltételezett effektoraiként írták le őket (Wang és mtsai., 2020). Bazídiumos gombákban való előfordulásukról eddig csak egy tanulmány számolt be (Doré és mtsai., 2017), amiben egy fakógomba faj (*Hebeloma cylindrosporum*)

ektomikorrhizájában azonosítottak két, felülexpresszált paralóg gént, amik DUF4360 doménnel rendelkező kis szekretált fehérjéket kódolnak. Ezek *C. cinerea*-ban megtalálható ortológja a $\Delta snb1$ -ben szintén nagyon magas expresszióval bírt (CopciAB_545612, FC $\Delta snb1/vt$: 17,69). Az ektomikorrhizában és a $\Delta snb1$ -ben mutatott eltérő expressziós dinamikájuk alapján feltételezhető, hogy a DUF4360-tartalmú fehérjék befolyásolhatják a komplex soksejtű struktúrák fejlődését.

Külön kiemelnénk a PriA gént, amivel több korábbi tanulmány is foglalkozott, mivel számos faj termőtestképzés iniciációja során felülexpresszáldódik, azonban a $\Delta snb1$ -ben alulexpresszált. A korábbi eredmények alapján a PriA által kódolt szekretált fehérje a cink homeosztázisban vesz részt, de pontos funkciója még tisztázatlan (Ishizaki és Shishido, 2000; Kajiwara és mtsai., 1992). A bazídiumos gombák korai fejlődési stádiumaiban mutatott emelkedett kifejeződése és ennek elmaradása a $\Delta snb1$ mutánsban tovább erősíti a termőtest iniciációban betöltött lehetséges szerepét.

A sejtfelszíni fehérjéken túl számos transzkripciós regulátort kódoló gén DEG, mint például a $\Delta snb1$ -ben jelentősen alulexpresszált *fst1* transzkripciós faktor, aminek *S. commune*-ben való deléciója következtében a mutáns törzs által hozott termőtestek nem voltak képesek elérni érett állapotukat, fejlődésük már a primordium stádiumban elakadt (Vonk és Ohm, 2021). Ezzel szemben a $\Delta snb1$ -ben leginkább felülexpresszált transzkripciós faktor az *expl* volt, ami a termőtest morfogenezisének végső stádiumainak a szabályozásában vesz részt (Muraguchi és mtsai., 2008). A *C. cinerea* deléciós mutáns *expl* törzs által létrehozott termőtest kalapja nem képes teljesen kinyílni és autolízise elmarad (Muraguchi és mtsai., 2008). Ezen túlmenően a Velvet-komplex több tagja is felülexpresszált. Ezek szerepe a tömlősgombák fejlődésében jól dokumentált, és ezek ortológjai bazídiumos gombafajokban is expressziós csúcsot mutattak a termőtestfejlődés korai szakaszaiban, ami arra utalhat, hogy a bazídiumos gombákban is fontos fejlődést szabályozó szerepük lehet (Plaza és mtsai., 2014). Két metiltranszferázt kódoló gén mutatott jelentős alulexpressziót a $\Delta snb1$ törzsben, köztük az *ich1* gén. Az *ich1* pontmutációja *C. cinerea*-ban az *ichijiku* fenotípust okozta, ami által létrehozott primordiumok emlékeztetnek a $\Delta snb1$ -re (Muraguchi és Kamada, 1998). Mindkét mutáns differenciálatlan termőtesteket hozott létre, de a $\Delta snb1$ primordiumok gömb alakúak maradtak, míg az *ichijiku* mutánsok vertikálisan megnyúltak. Az *ich1* több, mint 13-szor alacsonyabb kifejeződést mutatott a $\Delta snb1$ -ben a vad típushoz képest, valamint egy másik, még le nem írt metiltranszferáz is hasonlóképpen alulexpresszált volt a mutánsban, így nem kizárt, hogy az *snb1* közvetve részt vesz ezek szabályozásában.

A reaktív oxigéngyökök semlegesítésében közre játszó enzimek közül több mutatott megváltozott expressziót a *Δsnb1* törzsben. Példaképpen, a kataláz felülexpresszált a mutánsban. Ez egybeesik a tioredoxin deléciós mutáns *Aspergillus nidulans* tömlősgombában megfigyelt megnövekedett kataláz aktivitással, ami együtt járt a mutáns törzs növekedési defektusával és differenciálatlan reproduktív struktúrák képzésével (Thön és mtsai., 2007). A külső behatások vagy a normál anyagcsere eredményeként keletkező ROS káros lehet a különböző sejtösszetevőkre, ezért a sejteken belüli redoxireakciók kiegyenlítésére a gombákban komplex stresszválasz útvonalak jöttek létre (Yaakoub és mtsai., 2022). Amellett, hogy a ROS az aerob anyagcsere káros mellékterméke, egyre több bizonyíték utal arra, hogy egy meghatározott szintjük sejt differenciálódást válthat ki (Aguirre és mtsai., 2005; Hansberg és mtsai., 2008; Scott és Eaton, 2008). A NADPH-oxidázok (NOX) által generált ROS részt vehet a sejt differenciálódást elősegítő jelátviteli folyamatokban (Takemoto és mtsai., 2007). Azonban, az adataink alapján a NOX gének expressziója nem változott meg a *Δsnb1* mutánsokban, ellenben a *Δsnb1*-ben a ROS-semlegesítő enzimeket kódoló gének megnövekedett expressziós szintje a celluláris oxidatív környezet felborulásához vezethet, ami közvetve szerepet játszhat a *Δsnb1* termőtestekben a differenciálódás elmaradásában.

A proteáz-inhibitorok közé sorolt, kalap-specifikus cospinek alulexpresszáltak a *Δsnb1* törzsben. A proteáz inhibitorok alapvető élettani szerepet töltenek be a gombasejtek életében, például a védekezésben és a tápanyagok újrahasznosításában (Sabotič és mtsai., 2012). A cospineket kezdetben úgy jellemezték, mint a ragadozók és paraziták elleni védelemben résztvevő fehérjék (Sabotič és mtsai., 2012). Lehetséges azonban, hogy a sejten belüli szerin-proteázok aktivitásának szabályozásával kettős biológiai funkciót látnak el és részt vesznek a termőtestfejlődés regulációjában is (Sabotič és Kos, 2016).

A *C. cinerea* viasz-szintázok közül több is jelentősen alulexpresszált a *Δsnb1* törzsben. Ezek az enzimek olyan viasz-észterek előállításában vesznek részt, amik a növények hidrofób kutikula rétegének fontos alkotói, ami védőgátként szolgál a biotikus és abiotikus stresszel szemben (Li és mtsai., 2018). Gombákban még nem végeztek a viasz-szintázokkal kapcsolatos funkcionális vizsgálatokat, de feltételezhetően a növényekéhez hasonló szerepet játszhatnak a gombákban is.

A transzkriptomikai adatsorban azonosított gének egy része már korábban is leírásra került a szakirodalomban, mint hogy szerepük lehet a termőtestképzés folyamatában, azonban az eredményeink számos olyan további génre is rámutattak, amik szerepét korábban még nem hozták összefüggésbe a soksejtű struktúrák kialakításával és szöveti differenciációval, vagy csupán közvetett bizonyítékok voltak erre (mint például lektinek, hidrofobinok). Arra számítunk, hogy ezek a gének ígéretes célpontjai lehetnek további, a termőtestfejlődést és -differenciációt vizsgáló kutatásoknak. Ezen túlmenően, a jelen, *Δsnb1* és vad típusú törzsek összehasonlításán alapuló transzkriptomikai adatsort kiegészítve további, későbbi termőtest-fejlődésbeli stádiumokkal, az egyes szövetspecifikus géneket markerként használva akár a szöveti differenciáció folyamata is lemodellezhetővé válhatna.

A filogenetikai elemzés rámutatott arra, hogy az SNB1 homológjait szinte az összes, a vizsgálatba bevont bazídiumos gombafaj tartalmazza (ami alól csak a *Dacrymycetes* és *Tremellomycetes* fajok jelentettek kivételt), azonban a *C. cinerea snb1* homológok termőtestképzés során mutatott expressziós mintázata nem mutatott hasonlóságot az *snb1*-vel, emiatt a fókuszunk a *C. cinerea snb1*-t is magába foglaló ortocsoportra irányult. A szakirodalomból elérhető transzkriptomikai adatsorokat felhasználva összevetettük az ortocsoport több tagjának a termőtestképzés során mutatott expresszis dinamikáját, amik nagyfokú hasonlóságot mutattak a *C. cinerea snb1*-nél leírtakkal: Az összes vizsgált *snb1* ortológ nagymértékű expressziós növekedést mutatott a termőtest korai stádiumaiban, ami sokszor végigkísérte a későbbi fejlődési stádiumokat is. Mivel az *snb1* termőtestfejlődés során mutatott expressziós mintázata nagyon pontos indikátora volt az egyedfejlődésben betöltött szerepének, ezért azt a következtetést tudtuk levonni, hogy az azonosított “*snb*” ortocsoport tagjai alapvetően szükségesek lehetnek a termőtestfejlődéshez és a szövetdifferenciációhoz. A nagyfokú konzerváltság ellenére az SNB1 nem tartalmaz ismert funkciójú, konzervált doméneket.

Az SNB1 filogenetikai konzerváltsága, szerkezeti tulajdonságai és a hiányában tapasztalt fenotípusbéli elváltozások egyértelműek, azonban a sejtekben betöltött funkciójára sokkal nehezebb következtetni. Szerkezeti becslések alapján az SNB1 egy 7-transzmembrán hélixből álló sejtmembrán fehérje (10. ábra). Ez alapján transzporterként, csatornaként vagy receptorként funkcionálhat, azonban pontos szerepének meghatározása további kutatásokat igényel, mivel a tipikus transzporterek és ioncsatornák általában ennél több transzmembrán doménnel rendelkeznek, míg a G-fehérje kapcsolt receptorok 7-transzmembrán doménből állnak, de klasszikus

osztályozási rendszerükbe az SNB1 nem illeszthető be. Az SNB1 pontosabb funkcióját és a G-fehérjével való kapcsoltságát a jövőben fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatokkal lehet részletesen feltárni, mint amilyen pl. a bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció.

További vizsgálataink a primordium iniciációjának és differenciációjának kérdésköréről a termőtestfejlődés végső, egyben legfontosabb állomására, a spóráképzés vizsgálatára irányultak, amelyek során célunk a spórageneziskor lejátszódó folyamatok transzkriptóm-alapú jellemzése volt. Míg a magasan konzervált meiotikus gének jól ismertek és széles szakirodalommal bírnak (pl. Anderson és mtsai., 2012; Burns és mtsai., 2010), addig a meiózist követő genetikai folyamatok alig ismertek a bazídiumos gombákban. Emiatt a spóráképzés vizsgálatára irányuló transzkriptomikai adatsor megalkotásánál különös hangsúlyt fektettünk a poszt-meiotikus folyamatokra, mivel ezek jellemzése a szakirodalomban korlátozott. Ehhez három egymást követő stádiumot vontunk be, ahol az I. és II. stádiumban a meiózis megy végbe, illetve fejeződik be, míg a III. stádiumban azonban már a poszt-meiotikus folyamatok érvényesülnek.

A meiotikus gének időrendi kifejeződése szigorúan szabályozott. Ezért egy részletesebb, a gametogenezisre fókuszáló adatsorhoz (Burns és mtsai., 2010) illesztettük a saját transzkriptomikai eredményeinket, hogy egy részletesebb felbontású képet kapjunk az egyes folyamatok időrendiségéről. Várakozásaink szerint a Burns-féle transzkriptomikai adatsor meiózis II. fázisát lefedő klaszterei nagy átfedést mutattak az általunk meghatározott I. és II. stádiumban expressziós csúcsot mutató DEG-ekkel, míg a legkisebb átfedést az I.-től a III. stádiumig folyamatos expressziós növekedéssel jellemezhető DEG-ek mutatták, ami jó indikátora annak, hogy ezek jelentős része már valóban csak a meiózis végét követően kezd el expresszálni, így jellemzésükkel átfogó képet kaphatunk a spóráképzés posztmeiotikus lépéseit meghatározó molekuláris eseményekről.

A DEG-eket a spóráképzés során mutatott expressziós mintázatuk alapján öt profilba csoportosítottuk, ezzel megkönnyítve a génontológiai kifejezésekkel történő funkcionális leírásukat.

Az I. stádiumban expressziós csúcsot mutató DEG-ek a Profil 0-ba és Profil 1-be rendeződtek, amelyeknél a várt szerint a sejtosztódáshoz köthető kifejezések teljes garmadája mutatott szignifikáns dúsulást ($p \leq 0,05$). Különösképpen nagymértékű dúsulást mutattak a feromon-receptorok (köztük két párosodási és két nem-párosodási

STE3 feromon receptor) - amiknek a kariogámia létrejöttében és az azt követő események szabályozásában lehet szerepük (Jones és Bennett, 2011; Raudaskoski és Kothe, 2010). A feromon-receptorok alapvető szerepet játszanak a kompatibilis monokarion felismerésében, a dikarion fenntartásában, valamint a monokarion hifák egyesülését követő molekuláris események szabályozásában (Jones és Bennett, 2011; Raudaskoski és Kothe, 2010). A bazidiospóra-képződés során a párosodási típusú feromon-receptorok felülszabályozottságát a *Pisolithus microcarpus*-ban is leírták már (de Freitas Pereira és mtsai., 2017). A nem-párosodási típusú feromon-receptorok szerepe a bazídiumos termőtestképző gombákban még tisztázatlan (James és mtsai., 2011), de jelenlétük szükséges lehet a meiózisban és spóráképzésben, hasonlóképpen a bazídiumos élesztő *Cryptococcus neoformans* CPR2-höz vagy a tömlősgomba *Fusarium graminearum* GIA1 nem-párosodási típusú receptorokhoz, amikről már bizonyították, hogy szükségesek a meiózishoz és spóráképzéshez (Ding és mtsai., 2023; Hsueh és mtsai., 2009). Ezek alapján elképzelhető, hogy a *C. cinerea*-ban található nem-párosodási receptorok is hasonló szerepet töltenek be. Az smc5/6 komplex tagjai is felülexpresszáldtak az I. stádiumban. Ez a komplex elengedhetetlen a kromoszómák stabilitásának fenntartásában, valamint részt vesz a testvérkromatidák homológ rekombinációval történő DNS-javításában (Gong és mtsai., 2021). Olyan transzkripcióval kapcsolatos GO-kifejezések is dúsulást mutattak, amik elválaszthatatlanok a sejtosztódástól. Ezekre példák azok a DEG-ek, amik a Rad18 E3 ubikvitin-ligázt, RNS-polimeráz alegységeket vagy az „NDC80 kinetokor fehérje komplex” tagjait kódolják. A riboszomális fehérjékhez köthető kifejezések dúsulása egybeesik a megfigyeléssel, miszerint a riboszomális fehérjéket kódoló gének expressziója jellemzően a meiózist megelőzően megemelkedik, majd fokozatosan csökken a spóráképzés későbbi lépései során (Burns és mtsai., 2010; Chu és mtsai., 1998). A *C. cinerea* genom mindkét membrán inszertáza DEG-nek bizonyult. A membrán inszertázok konzervált enzimek, amik a sejtfelszíni fehérjék membránba való beágyazásáért felelnek (Vögtle és mtsai., 2022) és feltehetően a II. és III. stádiumban kifejeződő transzmembrán fehérjék sejtmembránba juttatását segítik. Ennél a profilnál még ki kell emelnünk a “prefoldin komplexet”, ami a citoszkeleton összetevőinek transzportjában vesz részt a sejtosztódás során, valamint szerepük van a fehérjekonformáció kialakításában, a fehérje-homeosztázis szabályozásában és annak fenntartásában (Millán-Zambrano és Chávez, 2014) (**17. ábra**).

Szakirodalmi adatok alapján a sejtosztódásban résztvevő konzervált gének expressziós dinamikáját külön-külön is ellenőriztük. Ezek közül számos, az irodalom

alapján a meiózishoz nélkülözhetetlen gén már nem mutatott szignifikáns expressziós változást az általunk vizsgált stádiumokban [pl. az Mre11 komplex tagjai (*mre11*, *rad50* és *nbs1*), a DNS szátkeresésben (*strand invasion*) részt vevő *dmcl* és *rad51*, vagy további meiózis-asszociált fehérjéket kódoló gének (pl. *spo11*, *rec8*, *hop1*)] (Burns és mtsai., 2010). Azonban 45 konzervált, sejtosztódáshoz köthető gén szignifikáns expressziószint-változást mutatott az adatsorunkban. Ezek több, mint 71 %-a a Profil 0-ba tartozott, ami alátámasztja a sejtosztódáshoz köthető KOG- és GO-kifejezések reprezentáltságát. A II. és III. stádiumban expressziós csúcsot mutató sejtosztódásban szerepet játszó DEG-ek egy része a meiózis befejezésében vesz részt (pl. poláris orsótest duplikációja és szegregációja, kromoszóma-szegregáció), míg feltehetően egy részük már a posztmeiotikus mitózis lebonyolításában fog részt venni.

A III. stádiumban felülexpresszáldó, poszt-meiotikus DEG-eket a Profil 4 foglalta magába. A legmagasabb dúsulást a “szénhidrát-anyagcserében” résztvevő gének tették ki. A *C. cinerea*-ban prediktálható összes CAZy negyede szignifikánsan felülexpresszáldott a spóráképzés valamely stádiumában. Ennek a GO-kifejezésnek a dúsulása egybecseng korábbi, a spóráképződést vizsgáló kutatások eredményeivel, amik a szénhidrát-anyagcseréhez tartozó gének funkcióját elsősorban a tápanyag raktározáshoz kötötték (Burns és mtsai., 2010; Cai és mtsai., 2021). Ezzel szemben a mi eredményeink alapján a DEG-ek leginkább a sejtfa-l módosításban vesznek részt. Ilyenek az α -amilázhoz hasonló aktivitást mutató glikozid-hidroláz 13 család, aminek az összes, *C. cinerea*-ban megtalálható tagja DEG. Korábban bizonyították szerepüket a gomba sejtfa-lának szerkezeti átszervezésében az α -glükán szintézis és módosítás által (de Groot és mtsai., 2009; van der Kaaij és mtsai., 2007). A sejtfa-l szintézisben és bontásában, átalakításában résztvevő enzimeket kódoló gének nagyarányú szignifikáns felülexpressziójának biológiai magyarázatául szolgálhat, hogy ebben a stádiumban olyan folyamatok játszódnak le, amik a sejtfa-l intenzív szerkezeti átszerveződésével és szintézisével jár. Ezekre példák a bazídiumok közti térkitöltő és tartófunkcióval bíró specializált sejtek (cisztidák és pszeudoparafízisek) felfúvódása (Rosin és Moore, 1985; Virágh és mtsai., 2022), a sterigmaképződés, spórafelfúvódás és ezt követően a spóra sejtfa-lának megvastagodása.

A transzporttal kapcsolatos, membrán-asszociált kifejezések is magasan dúsultak. A spóráképzés során mindenképp szükség van a membránt felépítő új komponensekre, illetve membránfehérjékre. Ezek közül a transzporterek és receptorok kulcsfontosságú szerepet játszanak a fiziológiai reakciók sorozatában, például tápanyagok felvételében

vagy a sejtek közötti kommunikációban (Barata-Antunes és mtsai., 2021). Ezekhez a kifejezéshez nagyon változatos funkcióval bíró DEG-ek tartoznak, amik közül a legmagasabb expressziós különbséget proton-pumpák, MFS-transzporterek, cukor-transzporterek és urea-transzporterek mutatták. Számos bazídiumos gombánál, így a *C. cinerea* esetében is a spórák az ún. Buller-csepp mechanizmussal lökődnek le (Money, 2016). Ehhez, a spóráképzés során a bazídium alsó felén egy vakuólum alakul ki, ami az érés során folyamatosan folyadékkal töltődik fel, míg a sejtplazma a többi sejtalkotóval a felfúvódó spórákezdeményekbe vándorol. Amikorra a spórák megérnek, a bazídiumot szinte teljesen kitölti a vakuólum (Weber, 2002). A vakuólumból kiáramló folyadék a spórák alatt felgyűve hozza létre a Buller-cseppet, amin a felületi feszültség megszűnésével mechanikailag lökődik ki az érett spóra (Money, 1998). Feltehetően a vakuólum gyors, folyadékkal való feltöltésére lehet szükség az ozmolitokat aktívan átjuttató urea- és cukor-transzporterekre (Ewaze és mtsai., 1978), a vakuólum és a sejtplazma közti pH-gradiens fenntartásáért pedig a proton-pumpák lehetnek felelősek (Weber, 2002).

További magas dúsulást mutató kifejezéscsoport tagjai a vas-ionnal voltak kapcsolatosak, amikbe elsősorban a citokróm P450 enzimsalád tagjai tartoztak. A gombák citokróm P450 enzimsalád diverzitása meghaladja az állatokét, növényekét és prokariótákét (Shin és mtsai., 2018). Ezeknek az enzimeknek az aktív centrumában egy hem kofaktor található, és a legváltozatosabb fiziológiai funkciókat látják el a sejt életében, beleértve a belső sejtkomponensek szintézisét, metabolikus melléktermékek lebontását, ergoszterol és másodlagos metabolitok szintézisét (Durairaj és mtsai., 2016; Mori és Abe, 2023) és szerepük lehet a melanin előállításában is, ami később a sejtfalba beépülve a spórák jellegzetes színét adja (Reyes-Fernández és mtsai., 2021). A vas-ionok feltehetően felhalmozódnak a spórákban. Erre utal, hogy az egyik legmagasabb expressziószint változást mutató DEG-ek ferritinek kódolnak. A ferritinek jelentős mennyiségű vas-iont képesek lekötni, tárolni és szükség esetén felszabadítani, így a vashomeosztázis fenntartásának egyik legfontosabb elemei (Wang és mtsai., 2016). Más eukarióta fajokkal szemben a gombákban kevés ferritint kódoló gén található, feltehetően amiatt, mert a felesleges vasionok a gombasejtekben lévő vakuólumokban rakódnak le (Arosio és mtsai., 2017). A vas-ionok már a legősebb szervezetekben is nélkülözhetetlen kofaktorként szolgálnak számos enzimatis reakcióban, így a vas felhalmozásához szükséges molekulák már ezekben is megtalálhatók, azonban a vas újrafelhasználásához szükséges molekuláris apparátussal már csak az eukarióta soksejtűsek rendelkeznek

(Wade és mtsai., 2021). A ferritinek spórákban való felhalmozódását már kimutatták korábbi kísérletek (Carrano és mtsai., 1996; David és Easterbrook, 1971), azonban a vas-ionok ilyen formában történő felhalmozásának oka még tisztázatlan, valószínűleg a csírázás során a bioszintézisben résztvevő enzimek kofaktoraként szolgálhatnak (David és Easterbrook, 1971).

A korábbi, bazídiumos gombák sporulációjára fókuszáló kutatások vagy kizárólag a meiózis lépéseit vizsgálták (Anderson és mtsai., 2012; Burns és mtsai., 2010), vagy a mintavételezés olyan távoli stádiumokban történt, hogy a fent tárgyalt, posztmeiotikus lépések és spórafelfűvódás során gyorsan lezajló molekuláris folyamatok részletei láthatatlanok maradtak (Cai és mtsai., 2021; Chen és mtsai., 2020; de Freitas Pereira és mtsai., 2017; Liu és mtsai., 2022).

A spóráképzés során lejátszódó folyamatok jellemzésén túl célul tűztük ki három, annotációval nem rendelkező vagy funkcionálisan ismeretlen gén reverz genetikai analízisét. Azon túlmenően, hogy bizonyítani akartuk ezeknek a géneknek a sporulációban betöltött szerepét, arra is törekedtünk, hogy magasan konzerváltak legyenek és ipari termesztésbe bevont fajokban is rendelkezzenek ortológokkal. Annak érdekében, hogy csökkentsük annak esélyét hogy a sporuláció-defektuson túl további, nem kívánt morfológiai elváltozás is történjen, kizárólag a lemezekben expresszálandó géneket vizsgáltuk. A három génjelölt mindegyikét sikeresen kiűtöttük a *C. cinerea* genomjából. A sporulálni képes, vad típusú törzs elfeketedő kalapjával szemben a Δ pSL23 mutáns barna, míg a Δ pSL20 és Δ pSL51 mutánsok fehér kalapú termőtesteket hoztak létre. A Δ pSL23 törzs 96,2 %-kal kevesebb spórárt tudott létrehozni a vad típushoz képest. A legtöbb spóra alaktanilag a vad típushoz hasonlított, de azoknál világosabbak voltak és egy részük abnormális morfológiát mutatott. A Δ pSL51 esetében a spórafelfűvódásig zajló események megegyeztek a vad típuséval, azonban a spórák nem voltak képesek megérni, és a kalap autolízisét követően nem lehetett kimutatni a jelenlétüket. Mind a pSL23, mind a pSL51 a III. stádiumban érte el az expressziós csúcsát. Szemben az előző két génnel, a pSL20 a II. stádiumban mutatott expressziós csúcsot. A Δ pSL20 mutáns lemezeit vizsgálva szinte csak csupasz, vagy sterigmákkal rendelkező bazídiumokat láttunk, és csupán elszórva tudtunk megfigyelni pár bazídiumot, ahol már megkezdődött a spórafelfűvódás. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a Δ pSL20 mutánsban már a spórafelfűvódást megelőzően elakadhatott a sporuláció, amit a gomba képes lehetett kompenzálni bizonyos esetekben. A kalap autolízisét követően a

Δ pSL20 mutánsokban sem tudtunk érett spórákat kimutatni. További morfológiai elváltozást egyik mutáns esetében sem láttunk.

A kései laska termesztésénél a tömeges sporuláció többek között kifejezetten súlyos egészségügyi és ökológiai kockázattal járhat, ezért a *P. ostreatus* termőtestfejlődés-transzkriptómjában is megvizsgáltuk ennek a két génnek az expressziós mintázatát. Mindkét gén kizárólag a lemezekben mutatott detektálható expressziót (Merényi és mtsai., 2022). Ez alapján azt feltételezzük, hogy szemben az *msh4*-mutáns *SPOPP0* törzzsel, a pSL20 és pSL51 gének kiütése laskában sem okozna további morfológiai defektust a sporuláción túl, ezért ideális jelöltek lehetnének spóramentes ipari törzsek fejlesztésére.

A gombák sokoldalúsága miatt számos, az életünket megnehezítő kihívásra jelenthetnek megoldást, azonban a bennük lévő lehetőségek feltárásához nélkülözhetetlen az evolúciójukat és biológiájukat meghatározó genetikai hálózat átfogó megértése, aminek kulcsfontosságú elemei a még felfedezésre váró konzervált gének lehetnek. A dolgozat eredményei jól szemléltetik, hogy a konzervált, annotálatlan gének olyan alapvető biológiai folyamatokban vehetnek részt, mint pl. a szöveti differenciáció. Mivel nincs előzetes tudásunk az annotálatlan gének lehetséges funkciójáról, ezért biológiai szerepükre legfeljebb csak konzerváltságuk, expressziós mintázatuk, és az általuk kódolt fehérje szerkezeti becslése alapján (pl. szignálszekvencia, transzmembrán domének megléte) vázolhatunk fel egy előzetes képet. Vizsgálatuk emiatt nem könnyű, azonban a pontos szerepük feltárására irányuló kutatásokra ösztönzőleg hathat, hogy ezek a gének jelenleg még ismeretlen molekuláris folyamatokban és jelátviteli útvonalakban vehetnek részt, és akár komplett, új géncsaládok tagjai lehetnek (Durairaj és mtsai., 2023).

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Nagy Lászlónak** és **Galgóczi Lászlónak**, akik lehetőséget biztosítottak a doktori munkám elvégzésére. Együttes témavezetésüknek köszönhetően rálátást kaphattam, hogy ugyanazt a területet mennyire különböző aspektusból lehet megközelíteni és körbejárni. A biztos alapok mellett teret engedtek arra, hogy kipróbálhassak új dolgokat, ezáltal értékes tapasztalatokat szerezhsek. Mindig hálás leszek nekik, amiért bizalommal, türelemmel és folytonos támogatással mutattak utat a szakmai fejlődésem során és segítettek eljutni ehhez a mérföldköhöz.

Nagy köszönettel tartozok a Gomba Genomika és Evolúció kutatócsoport valamennyi jelenlegi és volt tagjának, akik szakmai és baráti támogatására bármikor számíthattam.

Köszönettel tartozok **Merényi Zsoltnak**, **Bálint Balázsnak** és **Hegedüs Botondnak** a bioinformatikai analízisekben nyújtott munkájukért, valamint lelkes, készséges és türelmes tanítgatásukért.

Hálás vagyok iroda- és labortársaimnak, **Neha Sahunak**, **Xiao-Bin Liunak**, **Csernetics Árpádnak**, **Virágh Máténak** és **Zhihao Hounak**, amiért befogadtak, befűszerezték a mindennapokat és még a nehezebb időszakokban is mellettem ültek. Máténak külön köszönöm, hogy a csoporthoz csatlakozásomkor segített elsajátítani a kísérletes munkák alapjait és utána is számíthattam a tanácsaira. Zhihaonak köszönöm a *time-lapse* felvételek felállításában nyújtott segítségét, valamint neki és Neha-nak, hogy sorsközösséget vállaltak velem a doktoranduszi évek során.

Köszönöm **Ábrahám Editnek** a kedvességét és segítségét a fluoreszcens mikroszkópiás felvételek készítésénél.

Végezetül, nagy köszönettel tartozok **családomnak**, köztük Anyukámnak és Simonnak feltétlen szeretetükért és folyamatos biztatásukért, **barátaimnak**, amiért velem együtt lelkesedtek, valamint **Áron** páromnak, aki mindig végtelen kedvességgel és megértéssel kísért végig.

Több részből felépülő doktori kutatásom az innovációs és technológiai minisztérium Kooperatív Doktori Program doktori hallgatói ösztöndíj programjának és Új Nemzeti Kiválósági Programjának a nemzeti kutatási, fejlesztési és innovációs alapról finanszírozott szakmai támogatásával készült (KDP-17-4/PALY-2021, ÚNKP-19-3/2019).

7. Irodalomjegyzék

1. Abo Elsoud, M. M. és El Kady, E. M. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bull. Natl. Res. Cent.* 43, 59 (2019).
2. Aguirre, J. és mtsai. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 111–118 (2005).
3. Alexa, A. és Rahnenfuhrer, J. Gene set enrichment analysis with topGO. *Bioconductor* (2016).
4. Almási, É. és mtsai. Comparative genomics reveals unique wood-decay strategies and fruiting body development in the Schizophyllaceae. *New Phytol.* 224, 902–915 (2019).
5. Anderson, E., Burns, C. és Zolan, M. E. Global Gene Expression in *Coprinopsis cinerea* Meiotic Mutants Reflects Checkpoint Arrest. *G3 GenesGenomesGenetics* 2, 1213–1221 (2012).
6. Andlar, M. és mtsai. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.* 18, 768–778 (2018).
7. Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W. és Schramm, G. The strobilurins--new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 30, 806–810 (1977).
8. Antczak, A. J., Tsubota, T., Kaufman, P. D. és Berger, J. M. Structure of the yeast histone H3-ASF1 interaction: implications for chaperone mechanism, species-specific interactions, and epigenetics. *BMC Struct. Biol.* 6, 26 (2006).
9. Appels, F. V. W. és mtsai. Hydrophobin gene deletion and environmental growth conditions impact mechanical properties of mycelium by affecting the density of the material. *Sci Rep* 8, 4703 (2018).
10. Arosio, P., Elia, L. és Poli, M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life* 69, 414–422 (2017).
11. Ayimbila, F. és Keawsompong, S. Nutritional Quality and Biological Application of Mushroom Protein as a Novel Protein Alternative. *Curr. Nutr. Rep.* 12, 290–307 (2023).
12. Baars, J. J. P. és Heslen, H. Experience with Sporeless Strains of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Commercial Production. (2008).
13. Baars, J. J. P., Sonnenberg, A., Mikosch, T. és Van Griensven, L. Development of a Sporeless Strain of Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus*. (2000).
14. Baccelli, I. Cerato-platanin family proteins: one function for multiple biological roles? *Front. Plant Sci.* 5, 769 (2015).
15. Bajpai, P. Biopulping. in *Biotechnology for Pulp and Paper Processing* (ed. Bajpai, P.) 113–147 (Springer, Singapore, 2018). doi:10.1007/978-981-10-7853-8_8.
16. Barata-Antunes, C. és mtsai. Endocytosis of nutrient transporters in fungi: The ART of connecting signaling and trafficking. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 1713–1737 (2021).
17. Barrangou, R. és mtsai. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712 (2007).

18. Bateman, A., Coghill, P. és Finn, R. D. DUFs: families in search of function. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66, 1148–1152 (2010).
19. Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M. és Latgé, J.-P. Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. *PLoS Pathog.* 8, e1002700 (2012).
20. Bell, V., Silva, C. R. P. G., Guina, J. és Fernandes, T. H. Mushrooms as future generation healthy foods. *Front. Nutr.* 9, (2022).
21. Benltoufa, S., Miled, W., Trad, M., Slama, R. B. és Fayala, F. Chitosan hydrogel-coated cellulosic fabric for medical end-use: Antibacterial properties, basic mechanical and comfort properties. *Carbohydr Polym* 227, 115352 (2020).
22. Bensaude, M. Research on the life cycle and sexuality in Basidiomycetes. (1918).
23. Binninger, D. M. és mtsai. Targeted transformation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 227, 245–251 (1991).
24. Bjarnadóttir, T. K. és mtsai. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* 88, 263–273 (2006).
25. Bleuler-Martínez, S. és mtsai. A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites. *Mol. Ecol.* 20, 3056–3070 (2011).
26. Bonny, S. P. F. és mtsai. What is artificial meat and what does it mean for the future of the meat industry? *J. Integr. Agric.* 14, 255–263 (2015).
27. Bouhlel, I. B. és mtsai. Cell cycle control of spindle pole body duplication and splitting by Sfi1 and Cdc31 in fission yeast. *J. Cell Sci.* 128, 1481–1493 (2015).
28. Boulianne, R. P., Liu, Y., Aebi, M., Lu, B. C. és Kües, U. Fruiting body development in *Coprinus cinereus*: regulated expression of two galectins secreted by a non-classical pathway. *Microbiology* 146, 1841–1853 (2000).
29. Bringye, B., Fekete-Farkas, M. és Vinogradov, S. An Analysis of Mushroom Consumption in Hungary in the International Context. *Agriculture* 11, 677 (2021).
30. Brown, N. A., Schrevers, S., van Dijck, P. és Goldman, G. H. Fungal G-protein-coupled receptors: mediators of pathogenesis and targets for disease control. *Nat. Microbiol.* 3, 402–414 (2018).
31. Bruce, A. L. Population genomic insights into the establishment of non-native golden oyster mushrooms (*Pleurotus citrinopileatus*) in the United States. (2018).
32. Burns, C. és mtsai. Analysis of the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea* reveals conservation of the core meiotic expression program over half a billion years of evolution. *PLoS Genet.* 6, e1001135 (2010).
33. Cai, M. és mtsai. Transcriptional Dynamics of Genes Purportedly Involved in the Control of Meiosis, Carbohydrate, and Secondary Metabolism during Sporulation in *Ganoderma lucidum*. *Genes* 12, 504 (2021).
34. Campos, A. N. da R. és Costa, M. D. Basidiosporogenesis, meiosis, and post-meiotic mitosis in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 477–483 (2010).
35. Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M. és Gabaldón, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinforma. Oxf. England*, 25, 1972–1973 (2009).

36. Carrano, C. J., Böhnke, R. és Matzanke, B. F. Fungal ferritins: The ferritin from mycelia of *Absidia spinosa* is a bacterioferritin. *FEBS Lett.* 390, 261–264 (1996).
37. Carroll, A. S., Bishop, A. C., DeRisi, J. L., Shokat, K. M. és O'Shea, E. K. Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12578–12583 (2001).
38. Celerin, M., Merino, S. T., Stone, J. E., Menzie, A. M. és Zolan, M. E. Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behavior. *EMBO J.* 19, 2739–2750 (2000).
39. Chang, J. és mtsai. Modified recipe to inhibit fruiting body formation for living fungal biomaterial manufacture. *PLoS One* 14, e0209812 (2019).
40. Charova, S. N. és mtsai. The RsRlpA effector is a protease inhibitor promoting *Rhizoctonia solani* virulence through suppression of the hypersensitive response. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8070 (2020).
41. Chen, F.-C., Shimomura, N., Yamaguchi, T. és Aimi, T. Spore formation and karyological characterization of basidiosporogenesis, meiosis, post-meiotic and nuclear migration mitosis in *Coprinus comatus*. *Mycoscience* 61, 122–127 (2020).
42. Chen, L., Zhang, B. B. és Cheung, P. C. Comparative proteomic analysis of mushroom cell wall proteins among the different developmental stages of *Pleurotus tuber-regium*. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6173–6182 (2012).
43. Cheng, C. K. és mtsai. 5'-Serial Analysis of Gene Expression studies reveal a transcriptomic switch during fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. *BMC Genomics* 14, 1–17 (2013).
44. Cheng, V., Stotz, H. U., Hippchen, K. és mtsai. Bakalinsky, A. T. Genome-Wide Screen for Oxalate-Sensitive Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5919–5927 (2007).
45. Chu, S. és mtsai. The Transcriptional Program of Sporulation in Budding Yeast. *Science* 282, 699–705 (1998).
46. Chum, W. W. Y., Ng, K. T. P., Shih, R. S. M., Au, C. H. és Kwan, H. S. Gene expression studies of the dikaryotic mycelium and primordium of *Lentinula edodes* by serial analysis of gene expression. *Micol. Res.* 112, 950–964 (2008).
47. Clémenton, H. és Emmett, V. Cytology and Plectology of the Hymenomycetes. *Bibl. Mycol.* (2004).
48. Copsey, A. C. és mtsai. Smc5/6 Coordinates Formation and Resolution of Joint Molecules with Chromosome Morphology to Ensure Meiotic Divisions. *PLoS Genet.* 9, (2013).
49. Darby, C. A., Stolzer, M., Ropp, P. J., Barker, D. és Durand, D. Xenolog classification. *Bioinforma. Oxf. England*, 33, 640–649 (2017).
50. David, C. N. és Easterbrook, K. Ferritin in the Fungus *Phycomyces*. *J. Cell Biol.* 48, 15–28 (1971).
51. de Freitas Pereira, M. és mtsai. The transcriptional landscape of basidiosporogenesis in mature *Pisolithus microcarpus* basidiocarp. *BMC Genomics* 18, 157 (2017).
52. de Groot, P. W. J. és mtsai. Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 46, S72–S81 (2009).

53. de Mendoza, A., Sebé-Pedrós, A. és Ruiz-Trillo, I. The Evolution of the GPCR Signaling System in Eukaryotes: Modularity, Conservation, and the Transition to Metazoan Multicellularity. *Genome Biol. Evol.* 6, 606–619 (2014).
54. Deeg, K., Gima, Z., Smith, A., Stoica, O. és Tran, K. Greener Solutions: Improving performance of mycelium-based leather. (2017).
55. Dima, O., Custers, R., De Veirman, L. és Inzé, D. EU legal proposal for genome-edited crops hints at a science-based approach. *Trends Plant Sci.* 28, 1350–1353 (2023).
56. Ding, M. és mtsai. A non-pheromone GPCR is essential for meiosis and ascosporeogenesis in the wheat scab fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120, e2313034120 (2023).
57. Dörfors, F., Holmquist, L., Dixelius, C. és Tzelepis, G. A LysM effector protein from the basidiomycete *Rhizoctonia solani* contributes to virulence through suppression of chitin-triggered immunity. *Mol. Genet. Genomics* 294, 1211–1218 (2019).
58. Dong, Y. és mtsai. Edible and medicinal fungi breeding techniques, a review: Current status and future prospects. *Curr. Res. Food Sci.* 5, 2070–2080 (2022).
59. Doré, J. és mtsai. The ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* undergoes early waves of transcriptional reprogramming prior to symbiotic structures differentiation. *Environ. Microbiol.* 19, 1338–1354 (2017).
60. Dörnte, B. és Kües, U. Fast microwave-based DNA extraction from vegetative mycelium and fruiting body tissues of Agaricomycetes for PCR amplification. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 7, 825–836 (2013).
61. Dörnte, B. és Kües, U. Reliability in transformation of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 6, 340–355 (2012).
62. Doudna, J. A. és Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096 (2014).
63. Drula, E. és mtsai. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res.* 50, D571–D577 (2022).
64. Durairaj, J. és mtsai. Uncovering new families and folds in the natural protein universe. *Nature* 1–3 (2023).
65. Durairaj, P., Hur, J.-S. és Yun, H. Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microb. Cell Factories* 15, 125 (2016).
66. El-Gendi, H. és mtsai. A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. *J. Fungi* 8, 23 (2021).
67. Elleuche, S. és Pöggeler, S. Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology* 156, 23–29 (2010).
68. Emms, D. és Kelly, S. OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol.* 20, (2019).
69. Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T. és Sabotič, J. Proteins of higher fungi – from forest to application. *Trends Biotechnol.* 30, 259–273 (2012).
70. Ernst, J. és Bar-Joseph, Z. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinformatics* 7, 191 (2006).
71. EU rethinks genome editing. *Nat. Plants* 9, 1169–1170 (2023).

72. Ewaze, J. O., Moore, D. és Stewart, G. R. Co-ordinate Regulation of Enzymes Involved in Ornithine Metabolism and its Relation to Sporophore Morphogenesis in *Coprinus cinereus*. *Microbiology* 107, 343–357 (1978).
73. Feldman, D., Yarden, O. és Hadar, Y. Seeking the roles for fungal small-secreted proteins in affecting saprophytic lifestyles. *Front. Microbiol.* 11, 455 (2020).
74. Fischer, M. W. F. és Money, N. P. Why mushrooms form gills: efficiency of the lamellate morphology. *Fungal Biol.* 114 1, 57–63 (2010).
75. Foster, J. és mtsai. Nakata, P. A. An oxalyl-CoA synthetase is important for oxalate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 588, 160–166 (2014).
76. Freeman, L., Aragon-Alcaide, L. és Strunnikov, A. The Condensin Complex Governs Chromosome Condensation and Mitotic Transmission of Rdna. *J. Cell Biol.* 149, 811–824 (2000).
77. Fu, Y. és mtsai. Comparative transcriptome analysis identified candidate genes related to Bailinggu mushroom formation and genetic markers for genetic analyses and breeding. *Sci. Rep.* 7, 9266 (2017).
78. Gaderer, R., Bonazza, K. és Seidl-Seiboth, V. Cerato-platanins: a fungal protein family with intriguing properties and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4795–4803 (2014).
79. Gehrman, T. és mtsai. Nucleus-specific expression in the multinuclear mushroom-forming fungus *Agaricus bisporus* reveals different nuclear regulatory programs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 4429–4434 (2018).
80. Gibson, D. G. és mtsai. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345 (2009).
81. Gong, W. és mtsai. Landscape of meiotic crossovers in *Herichium erinaceus*. *Microbiol. Res.* 245, 126692 (2021).
82. Gow, N. A. R. és Lenardon, M. D. Architecture of the dynamic fungal cell wall. *Nat. Rev. Microbiol.* 21, 248–259 (2023).
83. Gressler, M. és mtsai. Mind the mushroom: natural product biosynthetic genes and enzymes of Basidiomycota. *Nat. Prod. Rep.* 38, 702–722 (2021).
84. Grimm, D. és Wösten, H. A. B. Mushroom cultivation in the circular economy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7795–7803 (2018).
85. Grossi, S., és mtsai. Pol12, the B subunit of DNA polymerase α , functions in both telomere capping and length regulation. *Genes Dev.* 18, 992–1006 (2004).
86. Halbwachs, H. Gone with the wind – a review on basidiospores of lamellate agarics. *Mycosphere* 6, 78–112 (2015).
87. Hallgren, J. és mtsai. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. (2022).
88. Hammad, F., Ji, J., Watling, R. és Moore, D. Cell population dynamics in *Coprinus cinereus*: co-ordination of cell inflation throughout the maturing basidiome. *Mycol. Res.* 97, 269–274 (1993).
89. Haneef, M. és mtsai. Advanced Materials From Fungal Mycelium: Fabrication and Tuning of Physical Properties. *Sci Rep* 7, 41292 (2017).

90. Hansberg, W. és mtsai. Cell differentiation as a response to oxidative stress. in British Mycological Society Symposia Series (eds. Avery, S. V., Stratford, M. és Van West, P.) vol. 27 235–257 (Academic Press, 2008).
91. Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M. és Tiwari, B. Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods* 6, 53 (2017).
92. Hilger, D., Masureel, M. és Kobilka, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 4–12 (2018).
93. Hirvonen, M. és Papageorgiou, A. C. Crystal structure of a family 45 endoglucanase from *Melanocarpus albomyces*: Mechanistic implications based on the free and cellobiose-bound forms. *J. Mol. Biol.* 329, 403–410 (2003).
94. Horton, P. és mtsai. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, 585–587 (2007).
95. Hsueh, Y., Xue, C. és Heitman, J. A constitutively active GPCR governs morphogenic transitions in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* 28, 1220–1233 (2009).
96. Hu, Z., Zhang, D.-Y., Lu, S.-T., Li, P.-W. és Li, S.-D. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Mar Drugs* 16, (2018).
97. Huberman, L. B. Developing Functional Genomics Platforms for Fungi. *mSystems* 6, 10.1128/msystems.00730-21 (2021).
98. Hyde, K. D. és mtsai. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Divers* 97, 1–136 (2019).
99. InterPro. (2023).
100. Ishizaki, T. és Shishido, K. Decreased zinc ion accumulation by the basidiomycete *Lentinus edodes* over-expressing *L. edodes priA* gene. *FEMS Microbiol Lett* 193, 111–5 (2000).
101. Jain, A. és Tuteja, G. TissueEnrich: Tissue-specific gene enrichment analysis. *Bioinformatics* 35, 1966–1967 (2019).
102. James, T. Y. és mtsai. A Single Mating-Type Locus Composed of Homeodomain Genes Promotes Nuclear Migration and Heterokaryosis in the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Eukaryot. Cell* 10, 249–261 (2011).
103. Jan Vonk, P., Escobar, N., Wösten, H. A. B., Lugones, L. G. és Ohm, R. A. High-throughput targeted gene deletion in the model mushroom *Schizophyllum commune* using pre-assembled Cas9 ribonucleoproteins. *Sci. Rep.* 9, 7632 (2019).
104. Jarosz-Wilkolazka, A. és Graż, M. Organic acids production by white rot Basidiomycetes in the presence of metallic oxides. *Can. J. Microbiol.* 52, 779–785 (2006).
105. Jiménez, J., Ricco, N., Grijota-Martínez, C., Fadó, R. és Clotet, J. Redundancy or specificity? The role of the CDK Pho85 in cell cycle control.
106. Jones, P. és mtsai. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30, 1236–1240 (2014).
107. Jones, S. K. és Bennett, R. J. Fungal mating pheromones: Choreographing the dating game. *Fungal Genet. Biol.* 48, 668–676 (2011).

108. Jumper, J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* (2021).
109. Kajiwar, S. és mtsai. Isolation and sequence of a developmentally regulated putative novel gene, *priA*, from the basidiomycete *Lentinus edodes*. *Gene* 114, 173–178 (1992).
110. Katoh, K. és Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780 (2013).
111. Ke, H. M. és mtsai. *Mycena* genomes resolve the evolution of fungal bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 31267–31277 (2020).
112. Keller, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 167–180 (2019).
113. Kim, J. ook és mtsai. Role of the Spc105 Complex in Organization and Microtubule-Binding Activity of the Budding Yeast Kinetochore. *FASEB J.* 32, 533.105-533.105 (2018).
114. Kiss, E. és mtsai. Comparative genomics reveals the origin of fungal hyphae and multicellularity. *Nat. Commun.* 10, 4080 (2019).
115. Koralesky, K. E. és mtsai. Social acceptance of genetic engineering technology. *PLOS ONE* 18, e0290070 (2023).
116. Központi Statisztikai Hivatal, 2010-2020. 14.1.2.11. Az egy főre jutó éves élelmiszer-fogyasztás mennyisége régió és a települések típusa szerint https://www.ksh.hu/stadat_files/jov/hu/jov0051.html.
117. Krizsán, K. és mtsai. Transcriptomic atlas of mushroom development reveals conserved genes behind complex multicellularity in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 7409–7418 (2019).
118. Kües, U. és Liu, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 141–152 (2000).
119. Kües, U. és mtsai. Regulation of fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. *Mushroom Sci* 19, 318–322 (2016).
120. Kües, U. és Navarro-Gonzalez, M. How do Agaricomycetes shape their fruiting bodies? 1. Morphological aspects of development. *Fungal Biol. Rev.* 29, 63–97 (2015).
121. Kües, U. From two to many: Multiple mating types in Basidiomycetes. *Fungal Biol Rev* 29, 126–166 (2015).
122. Kües, U. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 316–353 (2000).
123. Kulshreshtha, S., Mathur, N. és Bhatnagar, P. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express* 4, 29 (2014).
124. Künzler, M. Hitting the sweet spot: glycans as targets of fungal defense effector proteins. *Molecules* 20, 8144–8167 (2015).
125. Lavrijssen, B. és mtsai. Interruption of an MSH4 homolog blocks meiosis in metaphase I and eliminates spore formation in *Pleurotus ostreatus*. *PLoS One* 15, e0241749 (2020).

126. Lebreton, A. és mtsai. A comprehensive phylogenetic and bioinformatics survey of lectins in the fungal kingdom. *J. Fungi* 7, 453 (2021).
127. Li, C. és mtsai. The β -Ketoacyl-CoA Synthase HvKCS1, Encoded by Cer-zh, Plays a Key Role in Synthesis of Barley Leaf Wax and Germination of Barley Powdery Mildew. *Plant Cell Physiol.* 59, 811–827 (2018).
128. Liang, Z. és mtsai. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. *Nat. Protoc.* 13, 413–430 (2018).
129. Lin, X. és Sun, D.-W. Research advances in browning of button mushroom (*Agaricus bisporus*): Affecting factors and controlling methods. *Trends Food Sci. Technol.* 90, 63–75 (2019).
130. Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T. és mtsai. Penttilä, M. E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 29, 877–896 (2005).
131. Liu, C. és mtsai. Molecular Mechanism by Which the GATA Transcription Factor CcNsdD2 Regulates the Developmental Fate of *Coprinopsis cinerea* under Dark or Light Conditions. *Mbio* 13, 03626–21 (2022).
132. Liu, C. és mtsai. The molecular mechanism of stipe cell wall extension for mushroom stipe elongation growth. *Fungal Biol. Rev.* 35, 14–26 (2021).
133. Liu, D. és mtsai. Comparative transcriptome analysis revealed candidate genes involved in fruiting body development and sporulation in *Ganoderma lucidum*. *Arch. Microbiol.* 204, 514 (2022).
134. Liu, X. B. és mtsai. Transcriptome data reveal conserved patterns of fruiting body development and response to heat stress in the mushroom-forming fungus *Flammulina filiformis*. *PLoS One* 15, 0239890 (2020).
135. Ludwig, N. és mtsai. A cell surface-exposed protein complex with an essential virulence function in *Ustilago maydis*. *Nat. Microbiol.* 6, 722–730 (2021).
136. Luti, S., Sella, L., Quarantin, A., Pazzagli, L. és Baccelli, I. Twenty years of research on cerato-platanin family proteins: clues, conclusions, and unsolved issues. *Fungal Biol. Rev.* 34, 13–24 (2020).
137. Many, A. M. és mtsai. Meiotic localization of Mre11 and Rad50 in wild type, spo11-1, and MRN complex mutants of *Coprinus cinereus*. *Chromosoma* 118, 471–486 (2009).
138. McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P. és mtsai. Willard, F. S. G-protein signaling: back to the future. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 62, 551–577 (2005).
139. Merényi, Z. és mtsai. Gene age shapes the transcriptional landscape of sexual morphogenesis in mushroom-forming fungi (Agaricomycetes). *Elife* 11, 71348 (2022).
140. Merényi, Z. és mtsai. Genomes of fungi and relatives reveal delayed loss of ancestral gene families and evolution of key fungal traits. *Nat. Ecol. Evol.* 7, 1221–1231 (2023).
141. Meyer, V. és mtsai. Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol. Biotechnol.* 7, 5 (2020).
142. Miles, P. G. és Chang, S. *Mushroom Biology: Concise Basics and Current Developments.* (World Scientific, 1997).

143. Millán-Zambrano, G. és Chávez, S. Nuclear functions of prefoldin. *Open Biol.* 4, 140085 (2014).
144. Mims, C. W. Ultrastructure of basidiospores of the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Bot.* 58, 1525–1533 (1980).
145. Minh, B. Q. és mtsai. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1530–1534 (2020).
146. Mistry, J. és mtsai. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D412–D419 (2020).
147. Money, N. P. Chapter 3 - Spore Production, Discharge, and Dispersal. in *The Fungi* (Third Edition) (eds. Watkinson, S. C., Boddy, L. és Money, N. P.) 67–97 (Academic Press, Boston, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-382034-1.00003-7.
148. Money, N. P. More g's than the Space Shuttle: Ballistospore Discharge. *Mycologia* 90, 547–558 (1998).
149. Monteiro, M. és mtsai. Negative and positive impacts of alien macrofungi: a global scale database. *NeoBiota* 85, 23–42 (2023).
150. Moore, D. Principles of mushroom developmental biology. *Int. J. Med. Mushrooms* 7, 79–102 (2005).
151. Moore, D. Tissue Formation. in *The Growing Fungus* (eds. Gow, N. A. R. és Gadd, G. M.) 423–465 (Springer Netherlands, Dordrecht, 1995).
152. Mori, T. és Abe, I. Chapter Seven - Functional analysis of a fungal P450 enzyme. in *Methods in Enzymology* (ed. Renata, H.) vol. 693 171–190 (Academic Press, 2023).
153. Muraguchi, H. és Kamada, T. A mutation in the *eln2* gene encoding a cytochrome P450 of *Coprinus cinereus* affects mushroom morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 29, 49–59 (2000).
154. Muraguchi, H. és Kamada, T. The *ich1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting. *Development* 125, 3133–3141 (1998).
155. Muraguchi, H. és mtsai. Strand-specific RNA-seq analyses of fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. *PLoS ONE* 10, 0141586 (2015).
156. Muraguchi, H. és mtsai. The *exp1* gene essential for pileus expansion and autolysis of the inky cap mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) encodes an HMG protein. *Fungal Genet. Biol.* 45, 890–896 (2008).
157. Mushroom Global Market Report 2023 - Research and Markets. <https://www.researchandmarkets.com/reports/5766651/mushroom-global-market-report>
158. Nagy, L. G. és mtsai. Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *Nat. Commun.* 5, 4471 (2014).
159. Nagy, L. G. és mtsai. Lessons on fruiting body morphogenesis from genomes and transcriptomes of Agaricomycetes. *Stud. Mycol.* 104, 1–85 (2023).
160. Nakazawa, T. és mtsai. Basidiomycete *Lentinula edodes* CDC5 and a novel interacting protein CIPB bind to a newly isolated target gene in an unusual manner. *Fungal Genet. Biol.* 45, 818–828 (2008).

161. Narváez-Barragán, D. A., Tovar-Herrera, O. E., Segovia, L., Serrano, M. és Martinez-Anaya, C. Expansin-related proteins: biology, microbe–plant interactions and associated plant-defense responses. *Microbiology* 166, 1007–1018 (2020).
162. Navarro González, M. Growth, fruiting body development and laccase production of selected coprini. (Georg-August-University Göttingen, 2008). doi:10.53846/goediss-3631.
163. Nguyen, P. T., Wacker, T., Brown, A. J. P., da Silva Dantas, A. és Shekhova, E. Understanding the Role of Nitronate Monooxygenases in Virulence of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi* 8, 736 (2022).
164. Niego, A. G. T. és mtsai. The contribution of fungi to the global economy. *Fungal Divers.* 121, 95–137 (2023).
165. Noble, R. és mtsai. Primordia initiation of mushroom (*Agaricus bisporus*) strains on axenic casing materials. *Mycologia* 95, 620–629 (2003).
166. Nowrousian, M. The Role of Chromatin and Transcriptional Control in the Formation of Sexual Fruiting Bodies in Fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 86, 00104–22 (2022).
167. Ohm, R. A. és mtsai. An efficient gene deletion procedure for the mushroom-forming basidiomycete *Schizophyllum commune*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1919–1923 (2010).
168. Ohm, R. A., Jong, J. F., Bekker, C., Wösten, H. A. és Lugones, L. G. Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. *Mol. Microbiol.* 81, 1433–1445 (2011).
169. Okuda, Y., Murakami, S., Honda, Y. és Matsumoto, T. AnMSH4Homolog,stppl, from *Pleurotus pulmonarius* Is a “Silver Bullet” for Resolving Problems Caused by Spores in Cultivated Mushrooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4520–4527 (2013).
170. Oliveira, A. L. és mtsai. The structure of the elicitor cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double $\psi\beta$ -barrel fold and carbohydrate binding. *J. Biol. Chem.* 286, 17560–17568 (2011).
171. Palmer, G. E. és Horton, J. S. Mushrooms by magic: making connections between signal transduction and fruiting body development in the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol Lett* 262, 1–8 (2006).
172. Pardo, E. H., O’Shea, S. F. és Casselton, L. A. Multiple Versions of the A Mating Type Locus of *Coprinus cinereus* are Generated by Three Paralogous Pairs of Multiallelic Homeobox Genes. *Genetics* 144, 87–94 (1996).
173. Paysan-Lafosse, T. és mtsai. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* 51, D418–D427 (2023).
174. Pelkmans, J. F. és mtsai. Transcription factors of *Schizophyllum commune* involved in mushroom formation and modulation of vegetative growth. *Sci. Rep.* 7, 310 (2017).
175. Peña-Castillo, L. és Hughes, T. R. Why Are There Still Over 1000 Uncharacterized Yeast Genes? *Genetics* 176, 7–14 (2007).
176. Perez-Gonzalez, G., Tompsett, G. A., Mastalerz, K., Timko, M. T. és Goodell, B. Interaction of oxalate with β -glucan: Implications for the fungal extracellular matrix, and metabolite transport. *Iscience* 26, (2023).

177. Perlin, M. H., Andrews, J. és San Toh, S. Essential letters in the fungal alphabet: ABC and MFS transporters and their roles in survival and pathogenicity. *Adv. Genet.* 85, 201–253 (2014).
178. Plaza, D. F. és mtsai. Comparative transcriptomics of the model mushroom *Coprinopsis cinerea* reveals tissue-specific armories and a conserved circuitry for sexual development. *BMC Genomics* 15, 1–17 (2014).
179. Plett, J. M. és Plett, K. L. Leveraging genomics to understand the broader role of fungal small secreted proteins in niche colonization and nutrition. *ISME Commun.* 2, 49 (2022).
180. Pringle, A. és Taylor, J. The fitness of filamentous fungi. *Trends Microbiol.* 10, 474–481 (2002).
181. Qiu, Z. R., Schwer, B. és Shuman, S. Determinants of Nam8-dependent splicing of meiotic pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 39, 3427–3445 (2011).
182. Rabe, B. A. és Cepko, C. A Simple Enhancement for Gibson Isothermal Assembly. (2020).
183. Raju, N. B. és Lu, B. C. Meiosis in *Coprinus*. IV. Morphology and behaviour of spindle pole bodies. *J. Cell Sci.* 12, 131–141 (1973).
184. Raudaskoski, M. és Kothe, E. Basidiomycete Mating Type Genes and Pheromone Signaling. *Eukaryot. Cell* 9, 847–859 (2010).
185. Raudaskoski, M., Kothe, E., Fowler, T. J., Jung, E.-M. és Horton, J. S. Ras and Rho small G proteins: insights from the *Schizophyllum commune* genome sequence and comparisons to other fungi. *Biotechnol Genet Eng Rev* 28, 61–100 (2012).
186. Reyes-Fernández, E. Z., Shi, Y.-M., Grün, P., Bode, H. B. és Bölker, M. An Unconventional Melanin Biosynthesis Pathway in *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e01510-20 (2021).
187. Rocha, J. J. és mtsai. Functional unknowomics: Systematic screening of conserved genes of unknown function. *PLOS Biol.* 21, e3002222 (2023).
188. Rodríguez-Couto, S. Industrial and environmental applications of white-rot fungi. *Mycosphere* 8, 456–466 (2017).
189. Romano, J. D. és Michaelis, S. Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Ste14p, founding member of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase family. *Mol. Biol. Cell* 12, 1957–1971 (2001).
190. Rosin, I. V. és mtsai. Moore, D. Differentiation of the hymenium in *Coprinus cinereus*. *Transactions of the British Mycological Society* 84, 621–628 (1985).
191. Royse, D. J., Baars, J. és Tan, Q. Current Overview of Mushroom Production in the World. in *Edible and Medicinal Mushrooms* (eds. Diego, C. Z. és Pardo-Giménez, A.) vol. 7 5–13 (John Wiley és Sons, Ltd, Chichester, UK, 2017).
192. Ruytinx, J. és mtsai. A transcriptomic atlas of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microorganisms* 9, 2612 (2021).
193. Sabotič, J. és Kos, J. Fungal Protease Inhibitors. in *Fungal Metabolites* (eds. Mérillon, J.-M. és Ramawat, K. G.) 1–33 (Springer International Publishing, Cham, 2016). doi:10.1007/978-3-319-19456-1_10-1.

194. Sabotič, J. és mtsai. Structural basis of trypsin inhibition and entomotoxicity of cospin, serine protease inhibitor involved in defense of *Coprinopsis cinerea* fruiting bodies. *J. Biol. Chem.* 287, 3898–3907 (2012).
195. Sabotič, J., Ohm, R. A. és Künzler, M. Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 91–111 (2016).
196. Sahu, N. és mtsai. Vertical and Horizontal Gene Transfer Shaped Plant Colonization and Biomass Degradation in the Fungal Genus *Armillaria*. *Nat. Microbiol.* 9, 1668-1681 (2023).
197. Sarkar, D., Majumder, S., Giri, K. és Sabnam, N. In silico characterization, molecular docking, and dynamic simulation of a novel fungal cell-death suppressing effector, MoRlpA as potential cathepsin B-like cysteine protease inhibitor during rice blast infection. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 41, 9039–9056 (2023).
198. Schindelin, J. és mtsai. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682 (2012).
199. Schmieder, S. S. és mtsai. Bidirectional Propagation of Signals and Nutrients in Fungal Networks via Specialized Hyphae. *Curr. Biol.* 29, 217-228.e4 (2019).
200. Schneider, C. A., Rasband, W. S. és Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675 (2012).
201. Schöffler, A. Secondary metabolites of basidiomycetes. in *Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects* 231–275 (2018).
202. Schulze, S. és Lammers, M. The development of genome editing tools as powerful techniques with versatile applications in biotechnology and medicine: CRISPR/Cas9, ZnF and TALE nucleases, RNA interference, and Cre/loxP. *ChemTexts* 7, 3 (2020).
203. Scott, B. és Eaton, C. J. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 488–493 (2008).
204. Shimada, M., Akamtsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K. és Hattori, T. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *J. Biotechnol.* 53, 103–113 (1997).
205. Shin, J., Kim, J.-E., Lee, Y.-W. és Son, H. Fungal Cytochrome P450s and the P450 Complement (CYPome) of *Fusarium graminearum*. *Toxins* 10, 112 (2018).
206. Shinohara, A. és Shinohara, M. Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenet. Genome Res.* 107, 201–207 (2004).
207. Sipos, G. és mtsai. Genome expansion and lineage-specific genetic innovations in the forest pathogenic fungi *Armillaria*. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1931–1941 (2017).
208. Slot, J. C. és Gluck-Thaler, E. Metabolic gene clusters, fungal diversity, and the generation of accessory functions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 58, 17–24 (2019).
209. Sonnenberg, A., Baars, J. J. P. és Kerrigan, R. W. Mushroom breeding: hurdles and challenges. (2008).
210. Stajich, J. E. és mtsai. Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11889–11894 (2010).

211. Strijbis, K. és Distel, B. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryot. Cell* 9, 1809–1815 (2010).
212. Sugano, S. S. és mtsai. Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system. *Sci. Rep.* 7, 1260 (2017).
213. Sun, X., Liu, D. és Zhao, X. Transcription factors: switches for regulating growth and development in macrofungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–13 (2023).
214. Sunde, M., Kwan, A. H., Templeton, M. D., Beever, R. E. és Mackay, J. P. Structural analysis of hydrophobins. *Micron* 39, 773–784 (2008).
215. Szambowska, A. és mtsai. DNA binding properties of human Cdc45 suggest a function as molecular wedge for DNA unwinding. *Nucleic Acids Res.* 42, 2308–2319 (2013).
216. Szeto, C. Y. Y., Leung, G. S. és Kwan, H. S. Le.MAPK and its interacting partner, Le.DRMIP, in fruiting body development in *Lentinula edodes*. *Gene* 393, 87–93 (2007).
217. Takemoto, D., Tanaka, A. és Scott, B. NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genet. Biol.* 44, 1065–1076 (2007).
218. Tantoso, E., Eisenhaber, B., Sinha, S., Jensen, L. J. és Eisenhaber, F. Did the early full genome sequencing of yeast boost gene function discovery? *Biol. Direct* 18, 46 (2023).
219. Tatusov, R. L. és mtsai. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4, 41 (2003).
220. Team, J. A. S. P. JASP (Version 0.17.1. (Computer software, 2023).
221. The Gene Ontology Consortium és mtsai. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics* 224, iyad031 (2023).
222. Thön, M. és mtsai. The Thioredoxin System of the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*: Impact on Development and Oxidative Stress Response. *J. Biol. Chem.* 282, 27259–27269 (2007).
223. Tian, X. és mtsai. *Cryptococcus neoformans* sexual reproduction is controlled by a quorum sensing peptide. *Nat. Microbiol.* 3, 698–707 (2018).
224. Tsubouchi, H. és Roeder, G. The Mnd1 Protein Forms a Complex with Hop2 To Promote Homologous Chromosome Pairing and Meiotic Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3078–3088 (2002).
225. Tsusué, Y. M. Experimental control of fruit-body formation in *Coprinus macrorhizus*. *Dev. Growth Differ.* 11, 164–178 (1969).
226. Vaaje-Kolstad, G., Tuveng, T. R., Mekasha, S. és Eijsink, V. G. H. Enzymes for Modification of Chitin and Chitosan. in *Chitin and Chitosan* 189–228 (John Wiley és Sons, Ltd, 2019). doi:10.1002/9781119450467.ch8.
227. Vailati-Riboni, M., Palombo, V. és Loor, J. J. What Are Omics Sciences? in *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach* doi:10.1007/978-3-319-43033-1_1.

228. van der Kaaij, R. M., Janeček, Š., van der Maarel, M. J. E. C. és Dijkhuizen, L. Phylogenetic and biochemical characterization of a novel cluster of intracellular fungal α -amylase enzymes. *Microbiology* 153, 4003–4015 (2007).
229. Van Loon, P. C. C., és mtsai. Mushroom Worker's Lung: Detection of Antibodies against Shii-take (*Lentinus edodes*) Spore Antigens in Shii-take Workers. *J. Occup. Med.* 34, 1097–1101 (1992).
230. Van Peer, A. F. és mtsai. The septal pore cap is an organelle that functions in vegetative growth and mushroom formation of the wood-rot fungus *Schizophyllum commune*. *Environ. Microbiol.* 12, 833–844 (2010).
231. Vandeloos, S. és mtsai. Current state and future prospects of pure mycelium materials. *Fungal Biol. Biotechnol.* 8, 20 (2021).
232. Varadi, M. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* (2021).
233. Varga, T. és mtsai. Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 668–678 (2019).
234. Varga, T., Földi, C., Bense, V. és Nagy, L. G. Radiation of mushroom-forming fungi correlates with novel modes of protecting sexual fruiting bodies. *Fungal Biol.* 126, 556–565 (2022).
235. Veeneman, B. A., Shukla, S., Dhanasekaran, S. M., Chinnaiyan, A. M. és Nesvizhskii, A. I. Two-pass alignment improves novel splice junction quantification. *Bioinformatics* 32, 43–49 (2016).
236. Vetchinkina, E. és mtsai. Alteration in the ultrastructural morphology of mycelial hyphae and the dynamics of transcriptional activity of lytic enzyme genes during basidiomycete morphogenesis. *J Microbiol.* 55, 280–288 (2017).
237. Vinci, G., Prencipe, S. A., Pucinischi, L., Perrotta, F. és Ruggeri, M. Sustainability assessment of waste and wastewater recovery for edible mushroom production through an integrated nexus. A case study in Lazio. *Sci. Total Environ.* 903, 166044 (2023).
238. Virágh, M. és mtsai. Evolutionary Morphogenesis of Sexual Fruiting Bodies in Basidiomycota: Toward a New Evo-Devo Synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 86, e00019-21 (2022).
239. Vögtle, F.-N., Koch, H.-G. és Meisinger, C. A common evolutionary origin reveals fundamental principles of protein insertases. *PLOS Biol.* 20, e3001558 (2022).
240. Vonk, P. J. és Ohm, R. A. H3K4me2 ChIP-Seq reveals the epigenetic landscape during mushroom formation and novel developmental regulators of *Schizophyllum commune*. *Sci. Rep.* 11, 8178 (2021).
241. Wade, J., Byrne, D. J., Ballentine, C. J. és mtsai. Drakesmith, H. Temporal variation of planetary iron as a driver of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2109865118 (2021).
242. Wallen, R. M. és Perlin, M. H. An Overview of the Function and Maintenance of Sexual Reproduction in Dikaryotic Fungi. *Front. Microbiol.* 9, (2018).
243. Walser, P., Velagapudi, R., Aebi, M. és mtsai. Kües, U. Extracellular matrix proteins in mushroom development. in *Rec Res Dev Microbiol* vol. 7 381–415 (2003).

244. Wang, D. és mtsai. Functional analyses of small secreted cysteine-rich proteins identified candidate effectors in *Verticillium dahliae*. *Mol. Plant Pathol.* 21, 667–685 (2020).
245. Wang, H. és mtsai. Iron Overload Coordinately Promotes Ferritin Expression and Fat Accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 203, 241–253 (2016).
246. Wang, W. és mtsai. Characterization and expression pattern of homeobox transcription factors in fruiting body development of straw mushroom *Volvariella volvacea*. *Fungal Biol.* 123, 95–102 (2019).
247. Weber, R. W. S. Vacuoles and the fungal lifestyle. *Mycologist* 16, 10–20 (2002).
248. Weinreich, M., Liang, C. és Stillman, B. The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading Mcm proteins onto chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 441–446 (1999).
249. Wiebe, M. G. Quorn™ Myco-protein - Overview of a successful fungal product. *Mycologist* 18, 17–20 (2004).
250. Wirth, S., Freihorst, D., Krause, K. és Kothe, E. What role might non-mating receptors play in *Schizophyllum commune*? *J. Fungi* 7, 399 (2021).
251. Wood, V. és mtsai. Hidden in plain sight: what remains to be discovered in the eukaryotic proteome? *Open Biol.* 9, 180241 (2019).
252. Xie, S., Shen, B., Zhang, C., Huang, X. és Zhang, Y. sgRNACas9: a software package for designing CRISPR sgRNA and evaluating potential off-target cleavage sites. *PloS One* 9, 100448 (2014).
253. Yaakoub, H., Mina, S., Calenda, A., Bouchara, J.-P. és Papon, N. Oxidative stress response pathways in fungi. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 333 (2022).
254. Yamasaki, F. és mtsai. Gene targeting of dikaryotic *Pleurotus ostreatus* nuclei using the CRISPR/Cas9 system. *FEMS Microbiol. Lett.* 369, fnac083 (2022).
255. Yang, D. és mtsai. G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Sig Transduct Target Ther* 6, 1–27 (2021).
256. Zhang, J. és mtsai. Rtt101-Mms1-Mms22 coordinates replication-coupled sister chromatid cohesion and nucleosome assembly. *EMBO Rep.* 18, 1294–1305 (2017).
257. Zhang, Y., Chen, S., Yang, L. és Zhang, Q. Application progress of CRISPR/Cas9 genome-editing technology in edible fungi. *Front. Microbiol.* 14, (2023).
258. Zhou, J. és mtsai. Chitinases play a key role in stipe cell wall extension in the mushroom *Coprinopsis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, 00532–19 (2019).
259. Zou, G. és mtsai. Efficient genome editing in filamentous fungi via an improved CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein method facilitated by chemical reagents. *Microb. Biotechnol.* 14, 2343–2355 (2021).
260. Zou, G., Nielsen, J. B. és Wei, Y. Harnessing synthetic biology for mushroom farming. *Trends Biotechnol.* 41, 480–483 (2023).

8. Saját publikációk jegyzéke

MTMT azonosító: 10068006

A doktori eljárás alapját képező közlemények:

1. Földi, C., Merényi, Z., Balázs, B., Csernetics, Á., Miklovics, N., Wu, H., ... és Nagy, L. G. (2024). Snowball: a novel gene family required for developmental patterning of fruiting bodies of mushroom-forming fungi (Agaricomycetes). *mSystems*, e01208-23. **IF: 7,324**
2. Varga, T., Földi, C., Bense, V., és Nagy, L. G. (2022). Radiation of mushroom-forming fungi correlates with novel modes of protecting sexual fruiting bodies. *Fungal Biology*, 126(9), 556-565. **IF: 2,91**

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

1. Varga, T., Krizsán, K., Földi, C., Dima, B., Sánchez-García, M., Sánchez-Ramírez, S., és Nagy, L. G. (2019). Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nature Ecology és Evolution*, 3(4), 668-678. **IF: 19,1**
2. Hernansaiz-Ballesteros, R. D., Földi, C., Cardelli, L., Nagy, L. G., és Csikász-Nagy, A. (2021). Evolution of opposing regulatory interactions underlies the emergence of eukaryotic cell cycle checkpoints. *Scientific Reports*, 11(1), 11122. **IF: 4,6**
3. Virágh, M., Merényi, Z., Csernetics, Á., Földi, C., Sahu, N., Liu, X. B., és Nagy, L. G. (2022). Evolutionary morphogenesis of sexual fruiting bodies in basidiomycota: toward a new evo-devo synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(1), e00019-21. **IF: 13,044**
4. Nagy, L. G., Vonk, P. J., Künzler, M., Földi, C., Virágh, M., Ohm, R. A., és Merényi, Z. (2023). Lessons on fruiting body morphogenesis from genomes and transcriptomes of Agaricomycetes. *Studies in Mycology*. **IF: 25,731**
5. Bálint, B., Merényi, Z., Hegedüs, B., Grigoriev, I., Hou, Z., Földi, C., Nagy, L. G. (2024) ContScout: sensitive detection and removal of contamination from annotated genomes. *Nature Communication*. 15, 936. **IF: 16,6**

Kumulatív impakt faktor: **89,309**

9. Magyar nyelvű összefoglaló

A mikroszkopikus gombák mellett a bazídiumos gombák is rendkívül nagy ipari potenciállal bírnak, és sokoldalúságuk miatt megoldást jelenthetnek a jelen kor számos kihívására. Azonban ennek kiaknázásához elengedhetetlen a fejlődésbiológiájukat meghatározó genetikai hálózat minél alaposabb ismerete, ami jelenleg még hiányos, részben a genomokban található ismeretlen funkcióval bíró, sok esetben teljesen annotálatlan gének magas aránya miatt. Jelen doktori munka során a termőtestfejlődés kezdeti és végső fejlődési lépéseit vizsgáltuk, különös tekintettel a konzervált, ismeretlen funkcióval bíró és annotálatlan génekre.

Két különböző aspektusból vizsgáltuk meg a termőtestfejlődésben résztvevő géneket. Egyfelől megvizsgáltuk a feltehetően sejtfelszíni receptorokat kódoló, a termőtest iniciációja során felülexpresszált géneket, másfelől RNS-szekvenálással feltártuk a spóráképzés posztmeiotikus lépéseit.

A termőtest differenciációjának szempontjából érdekes célcsoportnak tűntek a sejtfelszíni receptorok, mivel az állatok genomjában kódolt G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) száma korrelál a testszerveződésük komplexitásával. Ez a tendencia azonban nem figyelhető meg a komplex soksejtű termőtesteket létrehozni képes gombák és a jelenleg ismert, kisszámú GPCR között. Ezért megvizsgáltuk a bazídiumos gombákban konzervált, prediktált 7-transzmembrán doménnel rendelkező fehérjéket (p7TMP), amik szerkezetileg nagy hasonlóságot mutatnak a GPCR-ekkel és kifejeződési mintázatok alapján fontos szereppel bírhatnak a termőtestiniciációban és -differenciációban. Korábbi szakirodalmi adatok és saját expressziós adatsorokat kombinálva kiválasztottunk három, a termőtest-iniciáció során felülexpresszáladó konzervált p7TMP-t, amik biológiai szerepét reverz genetikai vizsgálattal határoztuk meg. Ehhez az egyik legkorszerűbb és legpontosabb génszerkesztési eszközt, a CRISPR/Cas9-t alkalmaztuk a bazídiumos modellorganizmusként használt tintagomba fajban, a *C. cinerea*-ban.

A háromból két p7TMP deléciós (p7TMP06 és p7TMP79) mutáns kifejezetten érdekes morfológiai elváltozásokat mutatott. A p7TMP06-os mutáns esetében a primordiumok tömegesen növekedtek. Ebben a mutánsban feltehetően nem érvényesült az a gátló mechanizmus, ami lehetővé tenné, hogy csupán pár primordium fejlődhessen

tovább. Ennek következményeképpen ez a törzs nem tudott érett termőtesteket létrehozni, feltehetően a tápanyagok primordiumok közti elaprózódása miatt.

Egy további, a p7TMP79 deléciós mutáns törzs a szakirodalomban eddig le nem írt morfológiai jellegekkel rendelkező termőtesteket hozott létre. A fehér, szférikus primordiumokban a differenciáció szinte teljes egészében elmaradt. A deléciós mutáns hógolyó-szerű fenotípusa miatt a kiűtött gént az angol *snowball* (hógolyó) után *snb1*-nek neveztük el. A $\Delta snb1$ törzs belső szövetekkel nem rendelkező termőtesteinek lehetővé tették a szöveti differenciációban résztvevő gének azonosítását. Ehhez a vad típusú és a $\Delta snb1$ törzsek korai termőtestfejlődési stádiumait, a szöveti differenciáció előtt álló másodlagos hifacsomókat és a vad típusú törzsben a differenciáció kezdeti lépéseinek átesett első stádiumú primordiumokat hasonlítottuk össze transzkriptomikai eszköztár segítségével. Ezernél is több szignifikánsan különböző expressziót mutató gént (*Differentially Expressed Gene*, DEG) tudtunk azonosítani, amik közül több, mint 200-nak az ortológia más bazídiumos gomba fajokban is megtalálható és felülexpresszálódik a termőtestképzés során. A $\Delta snb1$ -ben alulexpresszált DEG-ek egy jelentős része a termőtestiniciációban vett részt, és egy részük termőtestfejlődésben betöltött szerepét szakirodalmi eredmények is alátámasztották. A DEG-ek vizsgálatával számos olyan géncsoportot tudtunk azonosítani, amiknek jelentős szerepe lehet a termőtestképzés során lezajló biológiai folyamatok lebonyolításában és szabályozásában. Filogenetikai vizsgálatok eredményeképpen azt láttuk, hogy az SNB1 magasan szinten konzervált más bazídiumos gomba fajokban is, és az SNB1 ortocsoport egy eddig nem ismert, új géncsaládot alkot. Az *snb* géncsalád más tagjai is nagyon hasonló expressziós dinamikát mutattak más bazídiumos gombafajok termőtestfejlődése során, ami alapján feltételezzük, hogy elengedhetetlen szereppel bírnak a bazídiumos gombák termőtestképzésének iniciációjában és differenciációjában.

További kutatásaink fókuszja a termőtestfejlődés végső, egyben legfontosabb állomására, a spóráképzés vizsgálatára irányult, amely során a sporuláció során lejátszódó folyamatok transzkriptóm-alapú jellemzése volt a célunk. Korábbi, a sporulációval kapcsolatos kutatások elsősorban a haploid magokat létrehozó meiózis lépéseit vizsgálták. A jelenleg forgalomba hozható spóramentes ipari laskatörzsben (*SPOPO*) a sporuláció elmaradásának hátterében is egy meiotikus gén (*msh4*) mutációja áll, azonban a spórák hiánya mellett más, az értékesítést kedvezőtlenül befolyásoló morfológiai elváltozások is megfigyelhetők. Emiatt, kutatásunk során célunk volt a spóráképzés meiotikus lépései mellett a posztmeiotikus folyamatok jellemzése is. Ehhez

szintén a *C. cinerea*-t választottuk modellorganizmusnak, mivel laboratóriumi körülmények között viszonylag könnyen fenntartható és gyorsan növekedő faj, aminek a bazídiumai magas arányban mutatnak szinkront a spóraféjlődés során. Mindezek miatt egészen nagy felbontásban tanulmányozhatóak az egyes fejlődési stádiumok. Összesen három fejlődési stádiumot vontunk be a transzkriptomikai analízisbe, a meiózis I. fázisának végétől egészen a spórakezdemények felfűvódásáig. Ezáltal le tudtuk fedni a már ismert meiózis folyamatának egy részét és betekintést nyerhettünk az azt követő molekuláris eseményekbe is. A magas dúsulást mutató génfunkciók alapján többek között azt láttuk, hogy a sterigmaképződés és spórafelfűvódás során intenzív sejtfal-szintézis és -átszervezés történik. A megfigyelt sok transzportert kódoló gén valószínűleg a bazídiumon belül növekvő vakuólum létrehozásában vehet részt, amiből származó folyadék a spórákat mechanikailag leválasztó Buller-cseppet fogja létrehozni. Transzkriptomikai szinten is meg tudtuk erősíteni azt a korábbi megfigyelést, miszerint a spórákban nagy mennyiségű vas-ion halmozódik fel, amit feltehetően a hem-kofaktorrall rendelkező enzimek fognak felhasználni a csírázás során.

Az adatsorunk alkalmasnak bizonyult olyan génjelöltek azonosítására, amik deléciójával a spóraképzés elakadhat, így értékes forrása lehet ipari spóramentes gombatorzsek fejlesztésére is. Ezt az elképzelésünket kísérletesen is bizonyítottuk, ami során azonosítottunk három olyan ismeretlen funkciójú vagy annotálatlan gént, amik jelentős expressziószint-növekedést mutattak a posztmeiotikus stádiumokban és magasan konzerváltak más bazídiumos gombákban is. Ezek deléciójával spóraszegény és teljesen spóramentes *C. cinerea* törzseket tudtunk előállítani, amik nem szenvedtek más, látható morfológiai defektusoktól. A mikroszkópos vizsgálatok bizonyították, hogy a mutációk nem érintették a meiózist. Az egyik mutáns törzs esetében jelentősen kevesebb spóra termelődött, míg a másik két deléciós törzs esetében megkezdődött a spórák felfűvódása, de végül nem tudták befejezni az érésüket és a kalap autolízisét követően nem lehetett spórákat kimutatni a lemezben. Ezeknek a géneknek az ortológjai jelen vannak olyan más, ipari termesztésbe bevont bazídiumos gomba fajok genomjában is, mint pl. a kései laska. Ennél a fajnál a tömeges sporuláció nagy gondokat okoz a beltéri termesztés során, valamint súlyos egészségügyi és ökológiai következményekhez vezethetnek. Ezért, a spóramentes *C. cinerea* törzsek előállításához választott gének ortológjai ígéretes jelöltek lehetnek ipari spóramentes gombatorzsek célzott előállításához is.

10. Summary in English

Beside microscopic fungi, basidiomycete macrofungi also have extraordinary industrial potential, and due to their versatility, they could offer solutions to many recent challenges. However, to realize this potential, a thorough understanding of the genetic networks that determine their developmental biology is essential. This understanding is currently incomplete, partly due to the high proportion of genes in their genomes with unknown functions that are often completely unannotated.

In this PhD thesis, we investigated the initial and final steps of fruiting body development, with special attention to conserved, unannotated genes and genes without known function. We studied genes involved in fruiting body development from two different aspects. First, we investigated genes encoding putative cell surface receptors that are overexpressed during fruiting body initiation, and second, we used RNA sequencing to uncover the post-meiotic steps of sporulation.

Cell surface receptors seemed to be a particularly promising target for studying the differentiation of fruiting bodies, since in animals the complexity of body organization correlates with the number of G protein-coupled receptor (GPCRs) genes in their genomes. However, this trend is not observed in fungi that are capable of forming complex multicellular fruiting bodies, as we currently know only a handful of GPCRs from fungi. Therefore, we investigated conserved proteins in macrofungi with predicted 7-transmembrane domains (p7TMP), which are structurally similar to GPCRs and may play a crucial role in the initiation and differentiation of fruiting bodies. By combining previous literature data with our own expression datasets, we selected three conserved p7TMPs that are overexpressed during fruiting body initiation and attempted to determine their possible role by reverse genetic analysis. For this purpose, we have used one of the most advanced and precise gene editing tools, CRISPR/Cas9, in the ink cap mushroom species *Coprinopsis cinerea*, which has long been used as a basidiomycete model organism.

Two out of the three p7TMP deletion mutants showed morphological alterations. In the p7TMP06 mutant, primordia grew in abundance, suggesting that the inhibitory mechanism allowing the development of only a few primordia may not have been effective. Consequently, no mature fruiting bodies could be formed probably due to the

incorrect nutrient distribution. Another deletion mutant, the $\Delta p7TMP79$ strain produced fruiting bodies with previously undescribed morphological characteristics. Differentiation was almost completely absent in the white, round primordia. Due to the striking phenotype of the deletion mutant, we have named the deleted gene “*snb1*”, after “*snowball*”. The $\Delta snb1$ strain produced fruiting bodies without internal tissue, which allowed us to identify genes involved in tissue differentiation. By comparing the transcriptomes of very early developmental stages of fruiting bodies, of secondary hyphal knots prior to tissue differentiation, and of first-stage primordia undergoing initial differentiation in the wild-type strain, we identified more than a thousand significantly differentially expressed genes (DEGs), of which more than 200 had developmentally regulated orthologs in other Basidiomycetes. The study of DEGs allowed us to identify several groups of genes that probably play an important role in the processes underlying the formation and regulation of fruiting bodies. Phylogenetic analyses revealed that *snb1* is highly conserved in other Basidiomycetes, and the *snb1* orthogroup forms a previously unknown, new gene family. Further members of the *snb* gene family in other macrofungi also showed very similar expression dynamics to *C. cinerea snb1* during fruiting body development, suggesting an essential role in the initiation and differentiation of macrofungal fruiting bodies.

Our further research focused on the last and most important phase of fruiting body development, the study of sporulation processes, with the aim of a transcriptome-based characterization of spore formation. Previous research on sporulation primarily investigated the steps of meiosis that produce haploid gametes. In the commercially available sporeless industrial strain (SPOPPO), the lack of sporulation is due to a mutation in the meiotic gene *msh4*, but in addition to the lack of spores, other morphological defects unfavorable for commercialization are also observed. Our aim was therefore to investigate not only the meiotic steps during spore formation but also the post-meiotic processes. Again, we chose *C. cinerea* as a model organism because it is relatively easy to maintain and grows rapidly under laboratory conditions, with basidia showing high synchrony during spore development, allowing detailed study of individual developmental stages.

We have included three developmental stages in the transcriptomic analysis, ranging from the end of meiosis I to the inflation of spore initials. This allowed us to cover part

of the known meiotic process and gain insight into the subsequent molecular events. Based on the highly enriched gene functions, we were able to determine that intensive cell wall synthesis and restructuring takes place during sterigma formation and spore inflation. Genes encoding numerous transporters are probably involved in the formation of vacuoles in the basidia, from which the fluid forms the Buller's drop that mechanically discharges the spores. Furthermore, at the transcriptomic level, we were able to confirm the earlier observation that a considerable amount of iron ions accumulate in the spores, which is potentially utilized by enzymes with heme cofactors during germination.

In addition, our dataset proved to be suitable for identifying gene candidates whose deletion could hinder spore formation, providing a valuable resource for the development of industrial sporeless strains. In testing this concept experimentally, we identified three genes with unknown functions that are not yet annotated, whose expression levels increase significantly in post-meiotic stages and that are highly conserved in other Basidiomycetes. By disrupting them, we have successfully generated *C. cinerea* strains with reduced or completely absent spore production that have no other visible morphological defects. Microscopic examinations confirmed that the mutations did not affect meiosis. In one mutant strain, significantly fewer spores were produced, while in the other two deletion strains, spore inflation began but they could not complete their maturation, and no spores were detectable in the cap after autolysis. The orthologs of these genes are present in the genomes of other Basidiomycetes used in industrial cultivation, such as the oyster mushroom. The massive spore formation of this species is a major problem when grown indoors and can lead to serious health and ecological consequences. Therefore, the orthologs of the genes selected for sporeless *C. cinerea* strains may be promising candidates for the targeted development of industrial sporeless mushroom strains.

11. Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy ismerem **Földi Csenge Anna** PhD fokozatra pályázó doktorjelölt „**Bazídiumos gombák termőtestfejlődésében szerepet játszó és biotechnológiai jelentőséggel bíró konzervált, annotálatlan gének azonosítása**” című disszertációját. Felelős szerzőként kijelentem, hogy **Földi Csenge Anna** jelentősen hozzájárult az alább felsorolt tudományos publikációk eredményéhez.

1. Földi, C., Merényi, Z., Balázs, B., Csernetics, Á., Miklovics, N., Wu, H., ... és Nagy, L. G. (2024). Snowball: a novel gene family required for developmental patterning of fruiting bodies of mushroom-forming fungi (Agaricomycetes). mSystems, e01208-23.

2. Varga, T., Földi, C., Bense, V., és Nagy, L. G. (2022). Radiation of mushroom-forming fungi correlates with novel modes of protecting sexual fruiting bodies. Fungal Biology, 126(9), 556-565.

Igazolom, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket egyetlen más PhD dolgozat sem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez

Szeged, 2024.04.04.



Dr. Nagy G. László



Dr. Galgóczi László Norbert

12. Függelékek

1. függelék: A kísérletek során használt primerek és gRNS-ek listája:

Gibson Assembly során használt primerek	Primer szekvencia
p7TMP06_DHA_fwd	TCGTCGGAGGAAAGATGCCAGAAGAATGGTGAAGACAGTGACGAACTTTCCTTCTCTCT
p7TMP06_DHA_rev	GGCTGCCCCGTGAAGCCGTTTAAATGAAGTTGGAAACATGGAATTCTTCTGCAGACTGTGG
p7TMP06_UHA_fwd	CTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTTCTGTGAGTTACAGCCGCTTGGAACCTCT
p7TMP06_UHA_rev	GGCACAGAGTCCAGAAATTACTGAGAACAAGTAATACCAGGTCTGAACGCAAGAAACTGG
p7TMP79_DHA_fwd	AGGTCTTCGTCGGAGGAAAGATGCCAGAAGAAAGACGGTGAACCCCTTTCTGATTCGG
p7TMP79_DHA_rev	CTGCCCCGTGAAGCCGTTTAAATGAAAGCCCGCCTTTACCATAAATACTCTTCTTGAGTG
p7TMP79_UHA_fwd	CTTGCATGCCTGCAGGTCGACTGCAGTTGGTCAAAACCCGTCAAGTGATGG
p7TMP79_UHA_rev	TGGCACAGAGTCCAGAAATTACTGAGAACCGGCATCTAAAGAGCCAGGAAGACAGC
p7TMP92_DHA_fwd	TCTTCGTCGGAGGAAAGATGCCAGAAGAACGACACTATGCCCCACCATTACACAC
p7TMP92_DHA_rev	GCTGCCCCGTGAAGCCGTTTAAATGAAGATGACTCTGCAGTGAACGATGTCATTACGGTAG
p7TMP92_UHA_fwd	CTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCGAAGAGTGGCTGCAAGTTTATTTCAAAAGACACTCC
p7TMP92_UHA_rev	TCCTGGCACAGAGTCCAGAAATTACTGAGAACAAAGGCGGCCTAAGTCAGGACTTTCG
p7TMP92_UHA_rev	TCGCTGCTCTCAACGCTCCTTCAGTTGCTTCGAAAGGCGGCCTAAGTCAGGACTTTTCG
PABA_fwd	GTTCTCAGTAATTTCTGGACTCTGTGCCAGGA
PABA_rev	TTCTTCTGGCATCTTTCCTCCGACGAA
pSL450751_DHA_fwd	TCGTCGGAGGAAAGATGCCAGAAGAAACAAGAAACAGTGGGACCACACTCCTCT
pSL450751_DHA_rev	GGCTGCCCCGTGAAGCCGTTTAAATGAAGTTCATGTCGGACGCTCCGTCGT
pSL450751_UHA_fwd	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTTGCCTCTCGCGTTTCTGTGACACT
pSL450751_UHA_rev	GCTCTCAACGCTCCTTCAGTTGCTTCGGCCGTCTCGAAGTCGTCGTGGC
pSL461720_DHA_fwd	TTCGTCGGAGGAAAGATGCCAGAAGAACGACTGTGCGAAAGTCGCTTAAAAAGCTGGG
pSL461720_DHA_rev	GGGCTGCCCCGTGAAGCCGTTTAAATGAATGTGATCCTGAATAGCTTTGGCTCCGTC
pSL461720_DHA_rev	AACGAAGAAAGAAGACGGTGAAAGGAAATGTGATCCTGAATAGCTTTGGCTCCGTC
pSL461720_UHA_fwd	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTGGTTTTGAAGTGCAGATTAACTGGACGCTCG
pSL461720_UHA_rev	GCACAGAGTCCAGAAATTACTGAGAACAAACGCCTTTTGTGACTCTGGTTCACCTGG
pSL482223_DHA_fwd	CCAGGGATCACTCGGGAAGTGGCTACTCAGCTGAGAAATTTGGAGACATTGTC

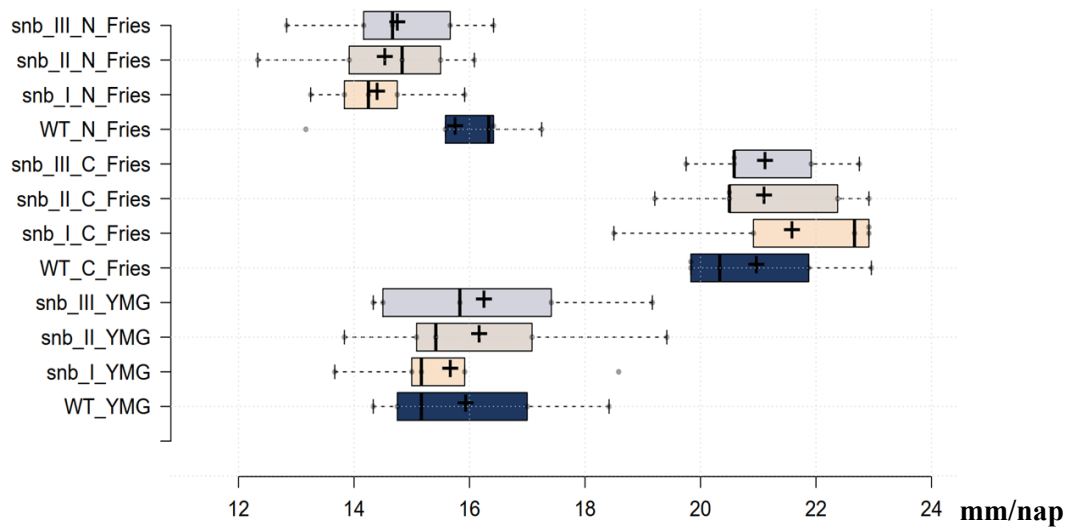
	CCCGACA
pSL482223_DHA_rev	TACAACGAAGAAAGAAGACGGTGAAAGGAAATGGAGGGTACGGTAGCCTCCGAG
pSL482223_UHA_fwd	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTATGTTGGGACGCTGTGACGGATTTGG
pSL482223_UHA_rev	AGTGCCATACTGTCTGTACGGAGCAGCCACTGAAGTCGGACCCTCTACGTTGTC
	CCC
pUC19_linear_fwd	CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAG
pUC19_linear_rev	AGTCGACCTGCAGGCATGCAAG
Mutáció ellenőrzésére szolgáló primerek	Primer szekvencia
PABA_inner_250bp_rev	AAGCTCGATTTGGTCGAATGACAAACAAACGAG
PABA_fwd	GTTCTCAGTAATTTCTGGACTCTGTGCCAGGA
PABA_rev	TTCTTCTGGCATCTTTCCTCCGACGAA
p7TMP06_checking_fwd	CTCTTTTAGTGTCCATTTCTAGACGTCCAAGATATGTCCAATTT
p7TMP06_checking_rev	TGAGTTTGTGCGAAAGACCTTCAATAAAGCAAATTCATTCAAGTTAG
p7TMP79_checking_fwd	TGGCCGTAAAAGCAACTGTGAGATAGTACCTTGTCA
p7TMP79_checking_rev	TCTAACAAGACGGAAGGCATGTTCACAACTGTGCA
p7TMP92_checking_fwd	TCAAAATCGAAAATTGTTCCCCCTGTCGCCAATAG
p7TMP92_checking_rev	CCAAACTTGACCCCATCAAGTATTGGTTTAAGCAGAAAC
pSL20_checking_fwd	CAAATTCAATTGGCAGTAAAATAAGGGTTGGTTAACTTGCGT
pSL20_checking_rev	AGGTGTCGCTATCGGCTGATAATAGGTTGGA
pSL23_checking_fwd	GGCTCAACCCAAGGACATGGTTGTCTGTCGTGAAGG
pSL23_checking_rev	CGGTAGATACCGGCGTAGTACCAGGTCCCTTCG
pSL51_checking_fwd	ACATCTACAGTTGGAACCAAGTGTCGCACG
pSL51_checking_rev	TCTCGACTTCCTGGAGCTCCCCATGG
gRNS	gRNS szekvencia
p7TMP06_gRNS	UUACUUAACCAUUACCGGA
p7TMP79_gRNS	AUGCCGUGGUACUCUGGGAU
p7TMP92_gRNS	AUACCUACGUGGUCACGGAU
pSL20_gRNS	GCGUUUACUACGCAUUAUACC
pSL23_gRNS	CCGACUGUAGACCAACUCAU
pSL51_gRNS	GACGGCUCAUACAGAGUUA

2. függelék: A $\Delta snbl$ és vad típusú törzsek micéliumának növekedési rátájának statisztikai kiértékelése kéttényezős ANOVA alapján, a JASP szoftver kiemenete alapján.

ANOVA

Összehasonlított tényezők	Négyzetek összege	Szabadsági fokok száma	Négyzetek átlaga	F-érték	<i>p</i> -érték	η^2
Törzs	8,906	3	2,969	0,873	0,46	0,012
Táptalaj	484,185	3	161,395	47,457	$2,894 \times 10^{-16}$	0,664
Törzs * Táptalaj	18,18	9	2,02	0,594	0,797	0,025
Reziduális	217,657	64	3,401			

Vizsgált törzsek	Táptalaj	Replikák száma	Átlag	Szórás	Standard hiba	Szóródási együttható
$\Delta snbl_I$	C_Fries	5	21,583	1,916	0,857	0,089
	Fries	5	14,88	2,296	1,027	0,154
	N_Fries	5	14,4	1,011	0,452	0,07
	YMG	5	15,667	1,821	0,814	0,116
$\Delta snbl_II$	C_Fries	5	21,1	1,519	0,679	0,072
	Fries	5	15,1	3,197	1,43	0,212
	N_Fries	5	14,533	1,47	0,658	0,101
	YMG	5	16,167	2,155	0,964	0,133
$\Delta snbl_III$	C_Fries	5	21,117	1,198	0,536	0,057
	Fries	5	16,9	2,317	1,036	0,137
	N_Fries	5	14,75	1,382	0,618	0,094
	YMG	5	16,25	2,048	0,916	0,126
vt	C_Fries	5	20,967	1,393	0,623	0,066
	Fries	5	17	1,245	0,557	0,073
	N_Fries	5	15,75	1,56	0,698	0,099
	YMG	5	15,933	1,721	0,77	0,108



A különböző táptalajokon (YMG, C_Fries: szénforrás nélküli Fries, N_Fries: nitrogénforrástól megvont Fries) nevelt *Asn1* és vad típusú törzsek micéliumának naponkénti növekedési rátája. A boxplot-okon belüli belső vonal jelzi az értékek mediánját, a kereszt az átlagát. A különböző táptalajokon szignifikánsan különbözően növekedtek az egyes törzsek ($p < 0,01$), azonban a törzsek között nem találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,797$).

3. függelék: A $\Delta snb1$ és vad típusú törzsek micélium tömegének nyomonkövetése 6 nap 28°C-on való növesztést követően

	nedves micélium (mg)			
n	vt	$\Delta snb1_I$	$\Delta snb1_II$	$\Delta snb1_III$
1	1444	1284	1433	1408
2	1422	1295	1239	1313
3	1436	1593	1386	1414
4	1334	1189	1237	1359
5	1298	1212	1326	1280
6	1074	1364	1317	1256
átlag (mg)	1327.933	1316.512	1321.083	1336.973

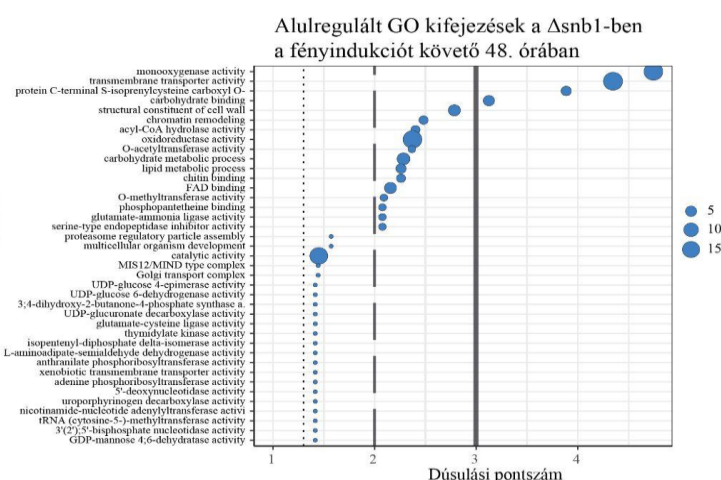
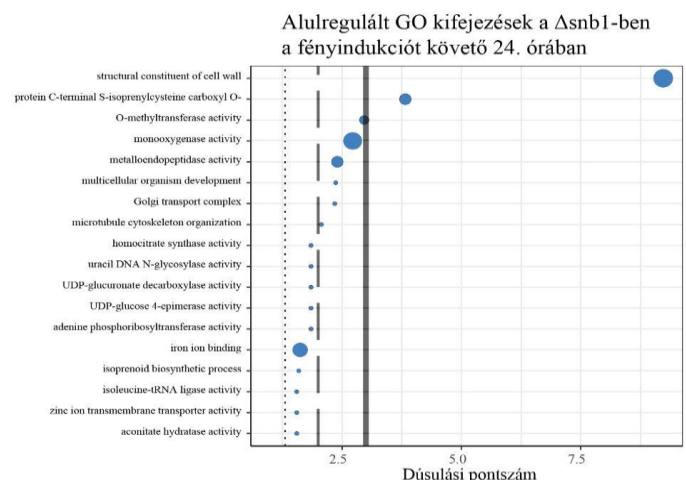
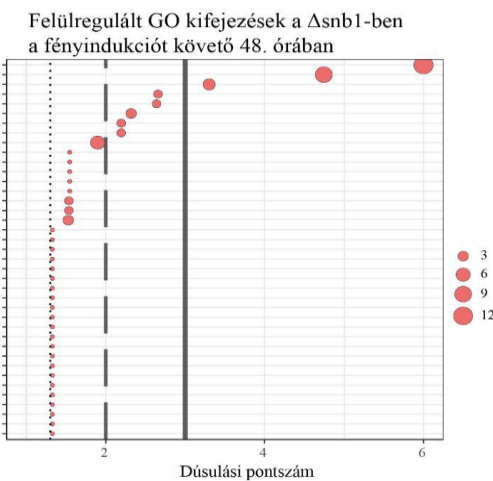
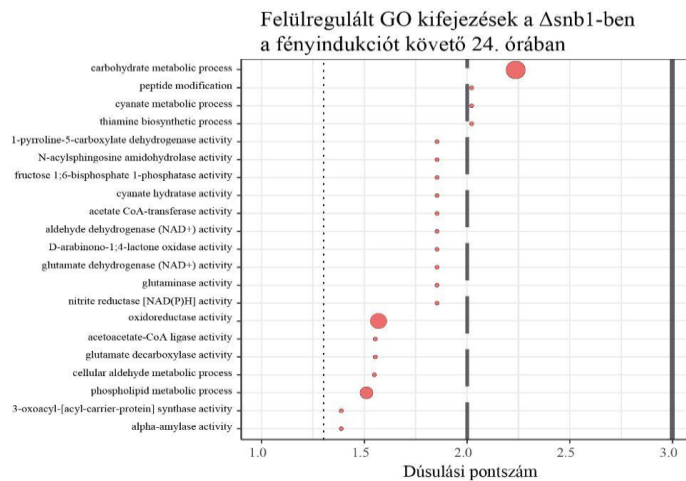
ANOVA – A különböző törzsek nedves micéliumának tömege közti különbség

Tényező	Négyzetek összege	Szabadsági fokok száma	Négyzetek átlaga	F-érték	p-érték
Törzs	1147,458	3	382,486	0,03	0,993
Reziduális	258699,5	20	12934,975		

	száraz micélium (mg)			
n	vt	$\Delta snb1_I$	$\Delta snb1_II$	$\Delta snb1_III$
1	126	161	161	147
2	140	117	117	131
3	117	148	148	150
4	119	117	126	133
5	112	115	133	121
6	115	135	125	129
átlag (mg)	121,1596	131,0434	134,1944	134,788

ANOVA – A különböző törzsek száraz micéliumának tömege közti különbség

Tényező	Négyzetek összege	Szabadsági fokok száma	Négyzetek átlaga	F-érték	p-érték
Törzs	749,792	3	249,931	1,151	0,353
Reziduális	4341,167	20	217,058		



4. függelék: A *Δsnb1* és vad típusú törzsek fényindukciót követő 24. és 48. órai stádiumainak összehasonlításából származó dúsulást mutató génontológiai kifejezések. A dúsulási pontszámok tengelyén lévő vonalak Kolmogorov-Smirnov p -értékeknek felel meg (balról jobbra: $p = 0,05$, $p = 0,01$, $p = 0,001$). A génontológiai kifejezések a Kolmogorov-Smirnov p -értékek szerint növekvő sorrendben lettek feltüntetve. A körök átmérője a GO-kifejezéshez tartozó DEG-ek számával arányos. A dúsulást mutató génontológiai kifejezésekhez tartozó DEG-ek listája a **7. függelék**ben található.

5. függelék: A 11. és 12. ábrán látható filogenetikai fákban feltüntetett fajok és azok taxonómia besorolása, Merényi és mtsai. 2023 munkája alapján.

Rövidített fajnév	Teljes fajnév	Altörzs	Osztály	Rend	Család
Psicub1_1	<i>Psilocybe cubensis</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae
Galma1	<i>Galerina marginata</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae
Hebcy2	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Cortinariaceae
Copmar1	<i>Coprinopsis marcescibilis</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae
Copci_AmutBmut1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae
Copmic2	<i>Coprinellus micaceus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae
Lacbi2	<i>Laccaria bicolor</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Hydnangiaceae
Lacam2	<i>Laccaria amethystina</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Hydnangiaceae
Crula1	<i>Crucibulum laeve</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Nidulariaceae
Leugo1_1	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae
Agabi_varbisH97_2	<i>Agaricus bisporus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae
Lepnud1	<i>Lepista nuda</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Tricholomataceae
Cligib1	<i>Clitocybe gibba</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Tricholomataceae
Volvo1	<i>Volvariella volvacea</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Pluteaceae
Plucer1	<i>Pluteus cervinus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Pluteaceae
Amath1	<i>Amanita thiersii</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Amanitaceae
Amamu1	<i>Amanita muscaria</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Amanitaceae
Ompol1	<i>Omphalotus olearius</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Omphalotaceae
Lentinedodes1	<i>Lentinula edodes</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Omphalotaceae
Denbi1	<i>Dendrothele bisporea</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Lachnellaceae
Monpe1_1	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Marasmiaceae
Armga1	<i>Armillaria gallica</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Physalacriaceae
Armcep1	<i>Armillaria cepistipes</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Physalacriaceae
Armosto1	<i>Armillaria ostoyae</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Physalacriaceae
Cylto1	<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Physalacriaceae
Schco3	<i>Schizophyllum commune</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Schizophyllaceae
Auramp1	<i>Schizophyllum commune</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Schizophyllaceae
Fishe1	<i>Fistulina hepatica</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Fistulinaceae
Mk	<i>Mycena kentingensis</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Mycenaceae
Radcon1	<i>Radulomyces confluens</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Pterulaceae
Aphpse1	<i>Aphanobasidium pseudotsugae</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Pterulaceae
Ptegra1	<i>Pterula gracilis</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Pterulaceae
PleosPC15_2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Pleurotaceae

Pleery1	<i>Pleurotus eryngii</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Pleurotaceae
Paxru2	<i>Paxillus adelphus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Paxillaceae
Paxin1	<i>Paxillus involutus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Paxillaceae
Melbro1	<i>Melanogaster broomeianus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Melanogastraceae
Hydpi2	<i>Hydnomerulius pinastri</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Paxillaceae
Sclici1	<i>Scleroderma citrinum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Sclerodermataceae
Pismi1	<i>Pisolithus microcarpus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Pisolithaceae
Suillu4	<i>Suillus luteus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Suillaceae
Suibr2	<i>Suillus brevipes</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Suillaceae
Rhivi1	<i>Rhizopogon vinicolor</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Rhizopogonaceae
Rhives1	<i>Rhizopogon vesiculosus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Rhizopogonaceae
Conpu1	<i>Coniophora puteana</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Coniophoraceae
Conol1	<i>Coniophora olivacea</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Coniophoraceae
SerlaS7_3_2	<i>Serpula lacrymans</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Serpulaceae
Serla_varsha1	<i>Serpula himantoides</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Boletales	Serpulaceae
Pilcr1	<i>Piloderma croceum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Atheliales	Atheliaceae
Fibsp1	<i>Fibulorhizoctonia sp.</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Atheliales	Atheliaceae
Plicr1	<i>Plicaturopsis crispa</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Atheliales	Atheliaceae
Polbr1	<i>Polyporus brumalis</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae
Polar1	<i>Polyporus arcularius</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae
Gansp1	<i>Ganoderma sp.</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Ganodermataceae
Dicsq1	<i>Dichomitus squalens</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae
Trave1	<i>Trametes versicolor</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Coriolaceae
Trapub1	<i>Trametes pubescens</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Coriolaceae
Pycci1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae
Fompi3	<i>Fomitopsis pinicola</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Fomitopsidaceae
Daequ1	<i>Daedalea quercina</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Fomitopsidaceae
Laesu1	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Laetiporaceae
PosplRSB12_1	<i>Postia placenta</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Dacrybolaceae
Fibra1	<i>Fibroporia radiculosa</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Incertae sedis
Wolco1	<i>Wolfiporia cocos</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Laetiporaceae
Obbri1	<i>Obba rivulosa</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Incertae sedis
Phlcn1	<i>Phlebia centrifuga</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Meruliaceae
Phlbr1	<i>Phlebia brevispora</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Meruliaceae
Phchr2	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae
Phaca1	<i>Phanerochaete carnosa</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae
Neole1	<i>Neolentinus lepideus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Gloeophyllales	Gloeophyllaceae
Glotr1_1	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Gloeophyllales	Gloeophyllaceae
Jaar1	<i>Jaapia argillacea</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Jaapiales	Jaapiaceae
Punst1	<i>Punctularia strigosozonata</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Corticiales	Punctulariaceae
Stehi1	<i>Stereum hirsutum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Russulales	Stereaceae
Hetan2	<i>Heterobasidion annosum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Russulales	Bondarzewiaceae

Schpa1	<i>Schizopora paradoxa</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Hymenochaetales	Schizoporaceae
Fomme1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Hymenochaetales	Hymenochaetaceae
Ricmel1	<i>Rickenella mellea</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Hymenochaetales	Repetobasidiaceae
Sissu1	<i>Sistotremastrum suecicum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Trechisporales	Trechisporaceae
Sisni1	<i>Sistotremastrum niveocreum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Trechisporales	Trechisporaceae
Sphst1	<i>Sphaerobolus stellatus</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Geastrales	Sphaerobolaceae
Ramac1	<i>Ramaria rubella</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Gomphales	Gomphaceae
Exigl1	<i>Exidia glandulosa</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Auriculariales	Exidiaceae
Aurde3_1	<i>Auricularia subglabra</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Auriculariales	Auriculariaceae
Sebve1	<i>Sebacina vermifera</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Sebacinales	Sebacinaceae
Pirin1	<i>Piriformospora indica</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Sebacinales	Sebacinaceae
Tulca1	<i>Tulasnella calospora</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Cantharellales	Tulasnellaceae
Botbo1	<i>Botryobasidium botryosum</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Cantharellales	Botryobasidiaceae
Rhiso1	<i>Rhizoctonia solani</i>	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae
Calvi1	<i>Calocera viscosa</i>	Agaricomycotina	Dacrymycetes	Dacrymycetales	Dacrymycetaceae
Calco1	<i>Calocera cornea</i>	Agaricomycotina	Dacrymycetes	Dacrymycetales	Dacrymycetaceae
Dacsp1	<i>Dacryopinax primogenitus</i>	Agaricomycotina	Dacrymycetes	Dacrymycetales	Dacrymycetaceae
Treen1	<i>Naematella encephala</i>	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae
Kocim1	<i>Kockovaella imperatae</i>	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales	Incertae sedis
Cryne_JEC21_1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales	Incertae sedis
Triol1	<i>Trichosporon oleaginosus</i>	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales	Incertae sedis
Trias2479	<i>Trichosporon asahii</i>	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales	Incertae sedis
Walse1	<i>Wallemia mellicola</i>	Agaricomycotina	Wallemiomycetes	Wallemiales	Wallemiaceae
Walic1	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	Agaricomycotina	Wallemiomycetes	Wallemiales	Wallemiaceae
Ustma2_2	<i>Ustilago maydis</i>	Ustilaginomycotina	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Ustilaginaceae
Tescy1	<i>Testicularia cyperi</i>	Ustilaginomycotina	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Cintractiellaceae
Tilan2	<i>Tilletiaria anomala</i>	Ustilaginomycotina	Exobasidiomycetes	Georgefischeriales	Tilletiariaceae
Rhomi1	<i>Cystobasidium minutum</i>	Pucciniomycotina	Cystobasidiomycetes	Cystobasidiales	Cystobasidiaceae
Pucgr2	<i>Puccinia graminis</i>	Pucciniomycotina	Pucciniomycetes	Pucciniales	Pucciniaceae
Neucr2	<i>Neurospora crassa</i>	Pezizomycotina	Sordariomycetes	Sordariales	Sordariaceae
Fusgr1	<i>Fusarium graminearum</i>	Pezizomycotina	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae
Aspnid1	<i>Aspergillus nidulans</i>	Pezizomycotina	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae
Sacce1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae
Schpo1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Taphrinomycotina	Schizosaccharomycetes	Schizosaccharomycetales	Schizosaccharomycetaceae

A 6., 7., 8., 9. és 10. függelék táblázatainak terjedelme és jellege miatt nem alkalmasak nyomtatásra, ezért ezek a függelék a repozitóriumban kerültek feltöltésre, ahonnan szabadon letölthetők.

6. függelék: A vad típusú (vt) és $\Delta snb1$ törzsek fényindukciót követő 24. és 48. órájában járó termőtest-kezdemények RNS-szekvenálási eredményei.

7. függelék: A vad típusú (vt) és $\Delta snb1$ törzsek közötti dúsulást mutató gén ontológiai kifejezések és a hozzájuk tartozó DEG-ek listája.

8. függelék: A spóráképzés RNS-szekvenálási eredményei.

9. függelék: A spóráképzés során dúsulást mutató génontológiai kifejezések és a hozzájuk tartozó DEG-ek listája.

10. függelék: A 24. ábrán látható két spóramentes mutáns ($\Delta pSL20$ és $\Delta pSL51$) és vad típusú *C. cinerea* törzsek termőtestképzésének 16 órás éjszakai periódusát lefedő *time-lapse* videója.