

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**TOXINTERMELŐ *FUSARIUM*-FAJOK GENETIKAI ELEMZÉSE
MOLEKULÁRIS MARKEREKKEL**

Fekete Csaba



Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Növénybiotechnológiai Intézet
Gödöllő
1996

Az, hogy a *Fusarium*-kutatás nem szorult a tudományos érdeklődés perifériájára, sőt más gombacsoportokhoz képest szokatlanul nagyszámú kutatót vonzott, a nemzetség széles körű gazdasági jelentőségével magyarázható. Ökológiai niche-ük és élőhelyeik számos ponton átfednek a humán társadalom aktivitási területeivel és arra negatív vagy pozitív hatást gyakorolnak. A növénypatogén *Fusarium*-fajok kártételével a legkülönbözőbb klimatikus viszonyok között széles gazdaspektrumon a növények egyedfejlődésének minden stádiumában számolni kell. Az a felismerés, hogy a genusz betegség okozó képesség tekintetében alárendelt szerepet játszó ún. gyengültségi, másodlagos kórokozói is lehetnek humán és állategészségügyi szempontból egyaránt veszélyes mykotoxinok potenciális termelői, újabb gombák kényszerű megjelenését okozta a *Fusarium*-problémakör palettáján. A *Fusarium*-toxinok eltérő kémiai szerkezetük, biogenezisük és hatásmechanizmusuk révén diverz csoportot képeznek. A nemzetség által termelt mykotoxinok egyik legveszélyesebb csoportját a trichotecének alkotják. Kémiailag, ciklikus szeszkviterpének (12,13-epoxi-trichotecén-9), alapvázuk a trichodién, amely a koenzim-A-ból származtatható lipidek szintézisútján keletkezik a farnezil-pirofoszfát ciklizációja és izomerizációja révén. A *Fusarium*-fajok A és B típusú trichotecének termelésére egyaránt képesek. Az előbbi csoport természetben is gyakran előforduló képviselői a diacetoxiszcirpenol /DAS/

és a *T-2* toxin, az utóbbié pedig a nivalenol *(NIV)* és a dezoxinivalenol *(DON)*. A mykotoxinok előfordulásával a táplálékláncban mindenütt számolni kell. A növényi eredetű élelmiszer alapanyagok közvetlenül, az állati eredetűek közvetetten, takarmányok révén szennyeződhetnek. A mykotoxinok okozta egészségkárosodások megelőzésében ezért kiemelkedő fontosságú a terményeket fertőző, potenciálisan toxinogén gombák gyors és pontos azonosítása.

Munkánk célkitűzése az volt, hogy nukleinsavak vizsgálatára alapozva molekuláris markereket azonosítsunk, és segítségével jellemezzünk olyan növénykórokozó és veszélyes toxintermelő gombákat, melyek vizsgálhatósága hagyományos eszközökkel nem, vagy csak nehezen megoldható. Vizsgálataink egyaránt kiterjedtek fajok közötti és faj alatti rendszertani kategóriák filogenetikai kapcsolatainak, valamint az olykor misztikusnak tűnő toxintermelő képesség genetikai hátterének tisztázására.

Az eredmények összefoglalása

Az Arthrosporiella és a Sporotrichiella szekció fajai között elsőként tártunk fel interspecifikus kromoszóma polimorfizmusokat összehasonlító elektroforetikus karyotípus vizsgálataink révén. Megállapítottuk az illető fajok genomméreteit, melyek 27.0 Mbp-tól

29.9 Mbp-ig terjedtek. Kromoszómáik mérete 0.4 Mbp-tól 6.5 Mbp-ig változott, míg a különböző fajok kromoszómaszáma 6 és 9 között mozgott.

A *Fusarium sporotrichioides*-ből származó *Tox5* gén segítségével – azt heterológ génpróbaként használva – vizsgáltuk, hogy a trichodien szintáz enzimet kódoló struktúrgén megtalálható-e a különböző fajok genomjában és ha igen, az mely kromoszómán helyezkedik el.

Az *Aspergillus nidulans* *rRNS*-t kódoló génjét hibridizálva az elektroforetikusan elválasztott kromoszómákkal kiderült, hogy a klaszterbe rendeződött ismétlődő *rRNS* egység egynél több és eltérő méretű kromoszómákon is előfordulhat a különböző *Fusarium*-fajok esetén.

Közel hatvan, földrajzilag izolált *Fusarium poae* törzset vizsgáltunk molekuláris módszerekkel. A *PFGE* felhasználásával jelentős fajon belüli kromoszóma polimorfizmust észleltünk, amely kiterjedt a közepes méretű kromoszóma tartományra is.

Elkészítettük a *K21*-jelű *Fusarium poae* törzs részleges génkönyvtárát, mely klóntárból származó homológ génpróbák segítségével *RFLP* vizsgálatokat végeztünk.

Izoláltunk egy 1.2 Kbp nagyságú repetitív tulajdonsággal rendelkező DNS szakaszt, amely minden vizsgált törzs genomjában jelen volt, de kizárólag a polimorfizmust mutató kromoszómákkal hibridizált. A *ZIT-1*-nek nevezett repetitív elemet térképeztük, majd

megállapítottuk bázissorrendjét. A szekvencia számítógépes elemzése során, a D-leolvasási keret tartalmazott a retrotranszpozonokban karakterisztikus DNS-kötő motívumot (zinc-finger DNA-binding domain, C-X₂-C-X₉-C). A szekvencia pontos azonosítása érdekében további vizsgálatokat tervezünk.

Fusarium poae törzsek erős genetikai divergenciát mutattak a genomok finom összehasonlítását megengedő *RAPD* vizsgálatok tükrében. Húsz különböző primer felhasználásával több mint háromszáz *RAPD* markert azonosítottunk, melyek alapján szerkesztett dendrogram a csoportképzési hajlam hiányáról árulkodik.

Fusarium poae törzsekben nagy gyakorisággal azonosítottunk *dsRNS* természetű extrakromoszómális örökítő elemeket, melyek jelenlétével párhuzamosan fenotípusos anomáliákat nem tapasztaltunk. A *dsRNS* mintázatot – azok számát és elektroforetikus mobilitását – rendkívüli változatosság jellemezte, de annak az illető törzsre jellemző képe többszöri átoltás után is stabil maradt. Az *AI1*-jelzésű törzs S-szegmentjét *RNS-RNS* hibridizációban próbaként használva megállapítottuk, hogy az nem mutat homológiát sem saját, sem más törzsek eltérő mobilitású szegmentjeivel.

A *PO5*-jelzésű törzsből 30nm átmérőjű vírusszerű partikulumokat izoláltunk (*VLP-s*), melyekből kivonva az *RNS-t* bizonyítottuk, hogy ezen törzs esetében minden *dsRNS* szegment csomagolódot. A *dsRNS*-ek ilyen gyakori előfordulásáról a *Hyphomycetes* nemzetség köréből munkánk előtt nem volt közlés.

A *Fusarium poae* PO5-jelzésű törzsből izoláltuk a teljes a *Tox5* struktúrgént és meghatároztuk nukleotid sorrendjét, melyről megállapítottuk, hogy a 3'-vég közeli delécióval létrejött új evolúciós variánsnak tekinthető.

Az általunk izolált génre alapozva, kidolgoztunk egy olyan telephibridizációs eljárást, mellyel gyorsan és megbízhatóan azonosíthatóak a trichothecen-termelő gombaizolátumok.

A dolgozat témájában megjelent közlemények

- Fekete, C., Giczey, G. Papp, I., Szabó, L., Hornok, L. (1995):** High-frequency occurrence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in *Fusarium poae*. **FEMS Microbiology Letters** **131, 295-299.**
- Fekete, C., Nagy, R., Debets, A. J. M. and Hornok, L. (1993):** Electrophoretic karyotypes and gene mapping in eight species of the *Fusarium* sections *Arthrosporiella* and *Sporotrichiella*. **Current Genetics** **24, 500-504.**
- Fekete, C., Nagy, R., Hornok, L., and Szécsi, Á. (1992):** Electrophoretic karyotypes of *Fusarium* species. **Hodowla roślin aklimatyzacja i nasiennictwo** **37, 147-152.**
- Fekete, C., Papp, I. and Hornok, L. (1992):** Extrachromosomal DNA elements of *Fusarium* species of the section *Arthrosporiella* and *Sporotrichiella*. **Hodowla roślin aklimatyzacja i nasiennictwo** **37, 141-146.**
- Hornok, L. **Fekete, C., Giczey, G. (1996):** Molecular characterisation of *Fusarium poae*. **Sydowia** **48, (megjelenés alatt)**
- Hornok, L., **Fekete, C., Giczey, G., Nagy, R. (1995):** Karyotype polymorphisms in filamentous fungi. **Bulletin of the University of Agricultural Sciences, Gödöllő**, **105-111.**

Előadások, poszterek

- Fekete Cs.,** Hornok L. (1993): Az *Arthrosporiella* és *Sporotichiella* szekcióba sorolt hét *Fusarium* faj összehasonlító PFGE vizsgálata. Debreceni Beszélgetések a Sejt és Fejlődésbiológiáról, Debrecen.
- Fekete Cs.,** Papp I. Giczey G. Hornok L. (1993): Kettős-szálú RNS elemeket hordozó *Fusarium poae* törzsek jellemzése. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Győr.
- Fekete Cs.,** Papp I., Tóth A., Pomázi A., Hornok L. (1992): Új mitokondriális plazmidok azonosítása toxint nem termelő *Fusarium* törzsekben. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Székesfehérvár.
- Fekete, C.,** Szécsi, Á. Hornok, L. (1991): Preparation of mitochondrial DNA from *Fusarium* species. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Budapest.
- Hornok, L. and **Fekete, C.** (1996): Electrophoretic karyotype analysis in the genus *Fusarium*. 3rd European Conference on Fungal Genetics. Münster, March 27-30, 1996. Germany.
- Hornok, L. Papp, I. and **Fekete, C.,** (1996): A repetitive DNA sequence from *Fusarium poae*. 3rd European Conference on Fungal Genetics. Münster, March 27-30, 1996. Germany.

- Hornok, L., **Fekete, C.** (1995): Genetic control of toxin production in *Fusarium spp.* 9th Congress of Food Science and Technology, Budapest.
- Hornok, L., **Fekete, C.**, Nagy, R., Pomázi, A., Pesti, M. (1993): Use of molecular markers in *Fusarium* taxonomy. 6th International Congress of Plant Pathology, Montreal.
- Nagy R., Wittner A., **Fekete Cs.**, Hornok L. (1993): Kromoszómák, genomméretek és gének azonosítása *Fusarium* fajokban. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest.