

37. OTDK Biológia Szekció

**Yap1 ortológ FvnapA bZIP-típusú
transzkripciós faktor vizsgálata *Fusarium
verticillioides*ben**

Boros Bence

Biotechnológia BSc

2. évfolyam

Témavezetők:

Mondok Ágnes Kata PhD hallgató

Dr. Leiter Éva egyetemi docens



**DEBRECENI
EGYETEM**

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar

Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Debrecen

2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Témafelvetés, célkitűzés	4
3. Szakirodalmi áttekintés	5
3.1. Transzkripciós faktorok, a génexpresszió regulátorai	5
3.1.1. bZIP típusú transzkripciós faktorok	5
3.1.2. bZIP típusú transzkripciós faktorok fonalas gombákban.....	6
3.2. A <i>Fusarium</i> nemzetség jellemzése	8
3.2.1. <i>Fusarium verticillioides</i>	8
4. Anyag és módszer	10
4.1. Deléciós kazetta elkészítése double joint PCR-rel	10
4.2. Transzformálás előkészítése protoplasztálással.....	15
4.3. Transzformálás	17
4.4. Lehetséges $\Delta FvnapA$ mutánsok izolálása.....	19
4.4.1. Egyedi telepek létrehozása szelekciós táptalajon	19
4.4.2. Genomi DNS izolálása	19
4.4.3. Ellenőrző PCR.....	20
4.4.4. Ellenőrző emésztés.....	21
4.5. Stresszagar kísérletek előkészítése.....	22
4.6 Stresszagar kísérletek eredményeinek statisztikai elemzése	24
5. Eredmények és értékelésük	25
5.1. Joint PCR.....	25
5.2. Ellenőrző PCR.....	26
5.3. Ellenőrző emésztés.....	26
5.4. Stresszkísérlet eredményeinek értékelése	27
5.4.1. Kadmium-klorid érzékenység	27
5.4.2. Hidrogén-peroxid érzékenység	28
5.4.3. <i>t</i> BOOH érzékenység.....	29
5.4.4. Szorbit érzékenység	30
5.4.5. Nátrium-klorid érzékenység	30
6. Összefoglalás	32
7. Köszönetnyilvánítás	33
8. Irodalomjegyzék	34

1. Bevezetés

A *Fusarium* nemzetségbe olyan fonalas gombák tartoznak, amelyek jelentős szereppel bírnak az élővilágban. Lehetnek például az ipar számára fontos enzimek vagy antibiotikumok termelői, de kontaminálhatnak élelmiszereket, takarmányt és számos törzsük toxintermelés miatt veszélyt jelenthet az élő szervezetekre is (Kun és mtsai., 2019).

A *Fusarium* fajok számos képviselője növénypatogén, elsősorban emiatt folynak velük kapcsolatban kutatások (Suga és mtsai, 2004). Fontos tulajdonságuk, hogy mikotoxinokat, ezen belül is fumonizineket termelnek, mely fertőzött élelmiszer vagy takarmány útján emberbe vagy haszonállatba is bekerülhet (Zeece, 2020). A legveszélyesebb és egyben leggyakoribb ilyen metabolit a fumonizin B1, ami állatokban vese- és májelégtelenséget okoz és potenciálisan az emberre is káros lehet (Liu és mtsai., 2019). A *Fusarium* fajok által okozott fertőzést fuzáriózisnak hívjuk. Egészséges egyének komplikációk nélkül átvészelik a betegséget, azonban az immunszuppresszált személyek esetén gyakran halálhoz vezethet (Batista és mtsai., 2020). Emberben a fertőzések kb. 50%-át a *Fusarium solani* faj okozza, ami elsősorban a légutakon keresztül jut be a szervezetbe (Douglas és mtsai., 2016).

A *Fusarium* fajok a kukoricaféléket támadják, hervadást és rothadást eredményeznek. Kiterjedt termőföldeket megtámadva jelentős mezőgazdasági károkat okozhatnak. Többnyire sebzési ponton fertőzik a vetőmagot, de a növényen, szárazság vagy egyéb mechanikai sérülés útján keletkezett fertőzési kapun keresztül is fertőznek (Omotayo és Babalola, 2023).

A felsorolt valószínűsíthető veszélyek miatt érdemes gondolni a gombafertőzés elleni védekezés lehetőségeire. A fonalas gombák kiválóan adaptálódnak a környezeti stresszhatásokhoz, és kiváló stratégiaként a korábban alkalmazott antifungális szerek ellen is toleranciát építhetnek ki. Ennek okán szükséges új támadáspontokat keresnünk metabolikus útvonalaikban. Ezt megtehetjük például a genom vizsgálatával, amely segíthet kiválasztani, hogy mely gének játszanak szerepet például a toxintermelésben vagy a környezeti stressz elleni védekezésben. *Fusarium verticillioides*ben ilyen gén lehet az *FvnapA*, ami egy bZIP típusú transzkripciós faktort kódol, mely fonalas gombákban, élesztőkben és emberben is egyaránt szerepet játszik az oxidatív stressz elleni védekezésben, ezért jelen dolgozat témáját is képezi (Zheng és mtsai., 2015; Toone és mtsai, 2021; Ferguson és mtsai, 2001).

2. Témafelvetés, célkitűzés

A globális felmelegedés miatti klímaváltozás kedvezőbb környezetet alakíthat ki a gomba patogének számára. A gombabetegségek terjedésének a hosszú, száraz időszakokat követő bőséges esőzés kedvez, mely jelenség hazánkban a klímaváltozással egyre inkább megfigyelhető (Mshelia és mtsai., 2020). Magyarország legfontosabb haszonnövényei közé tartozik a kukorica (*Zea mays*), termesztése és védelme tehát gazdasági érdek. Kártevőinek vizsgálata, és az azok elleni védekezés új módszereinek kidolgozása szükséges a minőségi növénytermesztés, takarmányozás és élelmezés fennmaradásához.

Számos gombában a bZIP típusú transzkripciós faktorok funkciója már bizonyított, mint a *Saccharomyces cerevisiae* modellorganizmusban a Yap1 vagy *Aspergillus nidulans* fonalas gombában a Yap1 ortológ NapA. Ezen fehérjéket kódoló gének deléciós mutánsai érzékenyebbnak bizonyultak a hidrogén-peroxidra (Kuge és Jones, 1994; Mendoza-Martínez és mtsai., 2017). Korábbi tanulmányok alapján érdemesnek tartottuk olyan *Fusarium verticillioides* deléciós mutánsok létrehozását, amikből hiányzik a *YAP1* ortológ *FvnapA*. Így azt kívántuk megvizsgálni, vajon ebben a fajban is ugyanaz-e a gén feladata, esetleg találhatunk-e más, új fenotípusokat, melyek további stresszérzékenységet bizonyíthatnak.

3. Szakirodalmi áttekintés

3.1. Transzkripció faktorok, a génexpresszió regulátorai

A transzkripció során DNS-ről RNS íródik át. Ez a génexpresszió első lépése, amelynek végeredménye fehérjeszintézis lesz. A transzkripció elsődleges célpontja a génexpresszió szabályozásának. A transzkripció regulációját transzkripciós faktorok szabályozzák (Latchman, 1993).

A transzkripciós faktorok általában két, egy kötő és egy reguláló doménből állnak, ezek segítségével fokozhatják vagy gátolhatják egy adott gén transzkripcióját. A DNS-en egy specifikus szekvenciájú kötőhely található, amely alapján a promóter régiójukban ezen szekvenciával rendelkező célgénjeik azonosíthatóvá válnak (Slack, 2014). Elengedhetetlenek az élőlények alapvető celluláris működéséhez. Fehérje komplexek formájában működnek, ilyen szerkezeti egységként kötődnek vagy a promóter régióhoz vagy az RNS polimerázhoz. Először az eukariótákban jelentek meg, segítségükkel sokkal hatékonyabban kontrollálható a génexpresszió (Pabo és Sauer, 1992).

3.1.1. bZIP típusú transzkripciós faktorok

A bZIP, vagy bázikus leucin cipzár (*basic leucine zipper*) transzkripciós faktorok minden eukariótában megtalálhatók. Dimer formában aktív fehérjék, gyakran fajspecifikusak, fontos szerepet játszanak az egyedfejlődésben (Yin és mtsai., 2012). Minden ide sorolható transzkripciós faktorban található egy egységes, 60-80 aminosav hosszú bázikus leucin cipzár domén (Zhang és Zhou., 2022).

Egy bZIP típusú transzkripciós faktor két fő strukturális részre osztható, egy 16 aminosavas bázikus régióra és egy kevésbé konzervált leucin-cipzár szakaszra, ami leucin vagy más hidrofób aminosavak ismétlődéséből áll minden 7. helyen (Chouhan és mtsai., 2023). Ez a szakasz amfipatikus, itt az adott, 7. helyen álló aminosavak cipzárszerű struktúrát képeznek egy partner fehérjével, így alkotnak dimert. A bázikus régióban rengeteg lizin és arginin található, ezzel kötődik a fehérje a DNS-hez (Landschulz és mtsai., 1988). Ezek a fehérjék a DNS-hez homo- és heterodimer formában is képesek kapcsolódni, ami a fehérje flexibilitását növeli (Fernando, 2020).

3.1.2. bZIP típusú transzkripciós faktorok fonalas gombákban

A bZIP típusú transzkripciós faktoroknak élesztő és fonalas gombákban is elsősorban az oxidatív stressz elleni védelem és másodlagos metabolitok előállításának szabályozása a feladatuk, emellett van szerepük a micélium növekedésében, aszexuális spórák képzésében és tápanyag felhasználás szabályozásában is. A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben a stressz elleni védekezésben központi szerepet tölt be a 8 különböző Yap bZIP transzkripciós faktor, melyek közül az oxidatív stressz hatására a Yap1 aktiválódik (Rodrigues-Pousada és mtsai., 2019; Zhao és mtsai., 2022). A sejt állapotától függően a Yap1 lokalizációja eltérhet. Kedvező életkörülmények között a citoplazmában található redukált formában, oxidatív stressz hatására pedig oxidálódik és a sejtmagban lokalizálódik. Szabályozza az antioxidáns enzimeket kódoló gének, és a tiol-redukáló útvonal bizonyos elemeit kódoló gének átírását (Cartwright és Scott, 2013). Az ortológ megnevezése és feladatai a következő gombafajokban:

*Aspergillus flavus*ban a Yap1 ortológ Afap1 transzkripciós faktor az aflatoxinképzést is szabályozza (Guan és mtsai., 2019).

*Aspergillus nidulans*ban a NapA negatívan szabályozza az intracelluláris reaktív gyökök termelését, és serkenti a kataláz aktivitást az oxidatív stresszre adott válaszként (Bákány és mtsai., 2021).

*Aspergillus fumigatus*ban az Afyap1 transzkripciós faktor deléciója a mutánsokat érzékenyebbé tette az oxidatív stresszt okozó hidrogén-peroxidra és a menadionra. Ugyanakkor a deléciós mutánsok virulenciája nem csökkent a vad típushoz képest (Lessing és mtsai., 2007).

A *Magnaporthe oryzae* egy rizs patogén gombafaj, Yap1 ortológja a MoAP1. A gén deléciója más gombafajokhoz hasonlóan növelte a H₂O₂-ra való érzékenységet, emellett csökkent a virulenciája is, így képtelen volt megfertőzni a tesztelt növényeket. RNS szekvencia analízissel bizonyított, hogy a transzkripciós faktor több gént is szabályoz, amelyek a fertőzésben játszanak szerepet. Fehérjekomplexet alkot, miután a sejt érzékeli a H₂O₂ jelenlétét a környezetében. A MoAP1 koncentrációja magas a konídiumban és az invazív hifa növekedésekor. Emellett a deléciós mutánsokban megfigyelhető a konídium fejlődésének, micélium elágazásának és a fertőzött szövetből kinövő hifa növekedésének zavara, illetve csökkent a peroxidáz, a lakkáz és a melanin termelés is (Guo és mtsai., 2011).

A *Verticillium dahliae* növénypatogén fonalas gombában a Yap1 transzkripciós faktornak antioxidáns válasz szabályozó szerepe van. A *yap1* deléciója a konídium és mikroszklerócium

fejlődésének zavarát okozza, növeli az oxidatív stresszel szembeni érzékenységet, emellett csökkenti az antioxidáns gének aktivitását is (Vangalis és mtsai., 2021).

Az *Alternaria alternata* növény- és opportunistá humánpatogén fajban az *AaAPI* Yap1 ortológ funkcióvesztése a gomba H_2O_2 érzékenységet és virulenciájának elvesztését eredményezte, növényfertőzés során nekrotikus elváltozásokat nem lehetett kimutatni. A vad törzshöz képest kisebb kataláz, peroxidáz és szuperoxid-dizmutáz aktivitást lehetett kimutatni (Lin és mtsai., 2009).

Beauveria bassiana rovarpatogén gombában a *BbYap1* gén delécioja befolyásolta a lipid homeosztázist (az olajsav szintézise 95%-kal csökkent), csökkent a vegetatív növekedés és a virulencia, nőtt az érzékenység a kémiai stresszre, viszont olajsav adásával helyreálltak az említett fiziológiai eltérések. A mutánsokkal fertőzött egyedek humorális immunválaszban részt vevő gégeinek aktivitása csökkent, olajsav biztosításával viszont megnőtt. Tehát a BbYap1 transzkripciós faktornak a humorális immunválasz elkerülésében van szerepe, amit a lipidszintézis befolyásolásával szabályoz, így játszik közre a virulencia változásában (Wang és mtsai., 2024).

A humán patogén *Cryptococcus neoformans* esetén a YAP1 termelődése megnőtt nemcsak oxidatív (H_2O_2 , diamid, tBOOH és menadion stresszorok), hanem ozmotikus stressz (NaCl, KCl és szorbit stresszorok) és membrán károsító stressz (SDS, fludioxonil, flukonazol és amfotericin B stresszorok) hatására is. A fehérje a sejtplazmában és a sejtmagban lokalizálódik, diamid stresszor alkalmazása esetén viszont csak a nukleuszban koncentrállódik. Transzkriptomikai analízissel 162 gént találtak, melyeket a YAP1 szabályoz, például aktiválódtak a transzmembrán transzportot befolyásoló, oxidoreduktáz aktivitású, fémion kötő és membránkomponenst kódoló gének. Ezenkívül segíti a glikolízis alatt termelődő toxinok, például metilglioxál elleni védekezést, illetve szerepe lehet a gomba patogenitásban is, ugyanis a mutánsok által megfertőzött egerek agya és tüdeje kisebb károsodást szenvedett a vad típusú törzs okozta fertőzéssel összehasonlítva (So és mtsai., 2019).

3.2. A *Fusarium* nemzetség jellemzése

A *Fusarium* nemzetség tagjai fonalas gombák, kozmopoliták. Kutatás szempontjából növénypatogén tulajdonságuk miatt érdekesek, de immungyenge emberekre is veszélyesek (Suga és Hyakumachi, 2004). Főleg talajban élnek, de megtalálhatók lebomló szerves anyagokban is (Santos és mtsai., 2019).

Európában és az USA-ban a 2. leggyakoribb nem *Aspergillus* patogén nemzetség. Elsősorban a *Fusarium solani*, de a *Fusarium oxysporum* és a *Fusarium verticillioides* is képesek embereket fertőzni. A légutakon keresztül bejutva, immunszupresszált egyénekben súlyos betegséget okozhatnak (Douglas, 2016).

A nemzetség szinte minden faja termel különböző mikotoxinokat, közülük kiemelkedő a fumonizin (Thrane, 2014). A toxin emberekbe juthat közvetlen, spórával való fertőződést követően, vagy takarmány által fertőzött állat húsának és tejének fogyasztásával. Növényekbe szintén kerülhet toxin fertőzés során, elsősorban *F. verticillioides* és *F. proliferatum* által. A fumonizin toxinokat több csoportba soroljuk (A, B, C, P), ezen belül a B1 toxin a legelterjedtebb és legveszélyesebb (Kamle és mtsai., 2019). A toxinok közül egyszerre több is jelen lehet egy fertőzött szervezetben, akár más típusúakkal, például aflatoxinnal együtt (Qu és mtsai., 2022).

A fumonizin toxinok hatásai változatosak. Sejtméregként az akkumulált toxinféherje a makromolekulák bioszintézisét és a lipidek peroxidációját akadályozza. A felhalmozódó toxin ugyanakkor képes a korai endoplazmatikus retikulum stressz szignalizációját is aktiválni, amely programozott sejthalálhoz vezet (Kim és mtsai., 2018). Emberben nyelőcső- és májrák okozója lehet hosszú távú kitettség hatására. Ez magyarázható a lipid anyagcsere megzavarásával, amely elsősorban a ceramid szintetáz gátlása miatt alakul ki (Marroquín-Cardona, 2014).

3.2.1. *Fusarium verticillioides*

A *F. verticillioides* gabonaféléket, főleg kukoricát támadó patogén, rothadást és hervadást okoz. A növény megfertőződhet bármelyik fejlődési stádiumban, akár aratás után is. Egyes tanulmányok kimutatták, hogy a konídiumok a betakarítást követően meghagyott növényi részekben legalább 630 napig fennmaradnak a talaj felszínén és a talajban is. Elsősorban

a talajban szemtermésen keresztül jut a növénybe a spóra, valamint virágzáskor a bibén keresztül, amit a meleg és szárazság elősegít. A rothadásnak kedvez a szárazság által okozott stressz, és az utána történő öntözés. Ugyanakkor a *F. verticillioidea* kozmopolita, kedveli a magas páratartalmú és mérsékelt régiókat is, ezért több földrészen is elterjedt (Deepa és Sreenivasa, 2017).

A fumonizin toxin mellett fuzarin C, és moniliformin is a másodlagos metabolitjai közé sorolható. A metabolitokat kódoló gének általában közel helyezkednek el az őket szabályozó transzkripciós faktor génjéhez, gyakran közvetlen egymás mellett. A toxintermelést stimulálja az amilopektin és dextrin, amelyek megtalálhatók a gabonafélékben, továbbá függ a pH értékétől és a tápanyag mennyiségétől. Fertőzés után kialakuló lúgos pH represszálja a fumonizin termelést. A *F. verticillioidea* ugyanakkor képes endofitonként tünetmentesen is fertőzni, ekkor a növény növekedésének és a sejtfalban történő lignin tárolásának- így a mechanikai védekezőképesség gátlásában jelentkeznek a fertőzés tünetei (Blacutt, 2017).

4. Anyag és módszer

4.1. Deléciós kazetta elkészítése double joint PCR-rel

F. verticillioides FGSC 7600 számú törzs transzformálását végeztük el double joint PCR-rel elkészített génkazetta segítségével. A folyamat során a *FvnapA* gént cseréltük le a higromicin rezisztencia génre homológ rekombinációval. A transzformáció sikerességét szelekciós táptalajjal ellenőriztük, a mi esetünkben ez higromicint tartalmazott. Ezáltal csak azok a sejtek maradtak életben és alkottak telepet a táptalajon, amelyekbe a rezisztencia gén beépült.

Első lépés a gént körül határoló homológ szakaszok felsokszorosítása. Ehhez primerpárra van szükségünk, amelyek 10-20 bázispár hosszúságú oligonukleotidok, specifikus helyen kötődnek a DNS-hez, behatárolva annak egy szakaszát. Ezt követően kötődik be a polimeráz, ami a behatárolt szakaszt sokszorosítja. A primerek létrehozásánál fontos, hogy az egyes párok közel azonos hőmérsékleten tapadjanak a kijelölt DNS szakaszhoz.

Alább láthatók a felhasznált primerek nukleotid sorrendjei. A primereket 2 ml-es csövekben, liofilizált állapotban kaptuk meg a gyártótól (IDT, USA). Ezeket először 100 μ M koncentrációban oldottuk be, majd 10 μ M-ra hígítottuk.

upstream forward primer: AGAACATCAGTTTTGCCTCAATTCCACGACAT

upstream reverse primer:

GGGATCCCGTAATCAATTGCCCCCGGATGATAGCGAGAGACGAGGTGGAGGTCTG

downstream forward primer:

CAAGAGCGGCTCATCGTCACCCCCATTTAGGCAGTTCAGTTCCTGAACCTGCG

downstream reverse primer: TGATATCGTGATTCCGCACAATATAGGAAACA

higromicin forward primer: TTGTAAAACGACGGCCAGTGA

higromicin reverse primer: CAGGAAACAGCTATGACCATG

A hosszabb, kiméra primerek a double-joint PCR legfontosabb elemei, segítségükkel lehet a szelekciós marker gént a két homológ szakasz közé beépíteni. A kiméra primerek egyike túlnyúló, nukleotid sorrendje hosszú szakaszon megegyezik a higromicin primerekkel. Ez biztosítja a különálló darabok összeépülését.

PCR reakcióhoz szükséges anyagok: Puffer, dH₂O, polimeráz enzim, primerek, genomi DNS, dNTP.

PCR protokoll az upstream homológ szakasz felszaporítására	
dH ₂ O	32,5 µL
5x GC puffer	10 µL
dNTP	1 µL
upstream forward primer	2,5 µL
upstream reverse primer	2,5 µL
genomi DNS	1 µL
Phusion polimeráz	0,5 µL

1. táblázat: Első PCR protokoll az upstream homológ szakasz felszaporítására

Az upstream és downstream szakaszok genomi DNS-e a *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsből, a higromicin szelekciós marker pedig a pB15 plazmidból származik.

A PCR elegy összemérése 0,5 mL-es PCR csövekben, jégen történik a polimeráz enzim aktivitásának csökkentése érdekében. A csövet a PCR gépbe helyezzük és a használt polimerázhoz kidolgozott protokollt beállítjuk.

Homológ szakaszok felszaporítására szolgáló PCR program	
elsődleges denaturáció: 98 °C	30 mp
denaturáció: 98 °C	10 mp
annealing: 61-70 °C	30 mp
elongáció: 72 °C	2 p
ismételjük 34x	
végző elongáció: 72 °C	7 p
12 °C	∞

2. táblázat: A homológ szakaszok felszaporítására szolgáló PCR program

T_a (annealing) pont az a hőmérséklet, amelyen a primerek képesek kötődni a specifikus DNS szakaszukhoz. Ezt az értéket online kalkulátor használatával kapjuk meg, ahova a primerpárok nukleotid sorrendjét másoljuk be, és kiválasztjuk a használni kívánt polimerázt is (<https://tmcaculator.neb.com/#!/main>). Ezt követően kapunk egy ideális T_a értéket.

Az upstream homológ szakasz primerjeinek T_a pontja: 61°C.

A downstream homológ szakasz primerjeinek T_a pontja: 70°C.

A higromicin marker primerjeinek Ta pontja: 70°C.

Az elkészült PCR termékeket agaróz gélen futtattuk, majd gélből visszaizoláltuk. Az ellenőrzéshez ismerni kell a primerek által közrefogott DNS szakasz hosszát, ugyanis ezt hasonlítjuk össze egy ismert DNS-létrával, ami meghatározott, ismert hosszúságú DNS darabokat tartalmaz. Ezek a darabok adott távolságra jutnak el a gélben az elektroforézis elvei alapján. A DNS darabokat gélből izoláltuk a Nucleospin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Németország) segítségével. A kithez mellékelt protokoll gyűjteményből az 5.2-es, DNA extraction from agarose gels protokoll szerint jártunk el.

1. UV asztalon a gélből előzetesen alkohollal fertőtlenített és gondosan megszáritott szikével kimetsszük a láthatóan elkülönülő sávot. Ügyeljünk arra, hogy a szükséges legrövidebb UV-besugárzást alkalmazzuk. A géldarabokat eppendorf mikrocsőbe rakjuk
2. A géldarabokra kb. 500 µL NT1 Binding puffert töltünk, és a géldarabokat 50 °C-on felolvasztjuk 5-10 perc alatt, időnként vortexelünk.
3. A kapott folyadékot 700 µL-ként Nucleospin csőbe töltjük át, 30 másodpercig 11000 g-n centrifugáljuk. Amennyiben több folyadékunk van, mint 700 µL, úgy centrifugálást követően a Nucleospin cső aljából kiöntjük az átszűrt folyadékot, és a tetejébe töltjük a szűretlent. Így maximalizálhatjuk a megkötött DNS mennyiségét.
4. A csőbe 700 µL NT3 etanolos mosópuffert töltünk és 30 másodpercig 11000 g-n centrifugálunk.
5. A csövekből kiöntjük a puffert, majd óvatosan visszahelyezzük a szilika töltetet tartalmazó részt úgy, hogy ne érintkezzen az alkoholos pufferrel.
6. 1 percig úgynevezett „szárítást” végzünk, hogy megszabaduljunk az esetlegesen nyomokban a tölteten maradt alkoholos pufferből. 1 percig 11 000 g-n centrifugálunk.
7. A szilika töltetet egy új, steril eppendorf csőbe rakjuk át, és 15 µL 70 °C-os dH₂O-t mérünk a szilikatöltetre, amellyel a tisztított PCR terméket eluáljuk. 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 1 percig 11000 g-n centrifugáljuk.
8. A PCR termék koncentrációját NanoDrop-al ellenőrizzük.

A gélből visszaizolált szakaszokat a második PCR során (3. és 4. táblázat) fuzionáltatjuk. A reakció során az Expand Long Template polimeráz enzimet (Roche, USA) alkalmazzuk, ami hosszú DNS darabokat is tud amplifikálni nagy hűséggel.

<i>ΔFvnapA</i> deléciós kazetta joint PCR protokoll	
dH ₂ O	14,8 μL
Expand Long 1 Puffer	2,5 μL
dNTP	2 μL
UP homológ szakasz	1 μL
DOWN homológ szakasz	1 μL
higromicin szakasz	3 μL
Expand Long polimeráz	0,7 μL

3. táblázat: joint PCR *ΔFvnapA* deléciós kazetta létrehozásához

<i>ΔFvnapA</i> deléciós kazetta joint PCR program	
elsődleges denaturáció: 94 °C	2 p
denaturáció: 93 °C	30 mp
annealing: 58 °C	10 p
elongáció: 68 °C	12 p
ismétlés 15x	
végző elongáció: 68 °C	15 p
12 °C	∞

4. táblázat: joint PCR program *ΔFvnapA* deléciós kazetta létrehozásához

Utolsó lépés a nested PCR (5. és 6. táblázat), aminek a célja, hogy a DNS darab két végétől bentebb található úgynevezett belső primerpárral felsokszorozzuk a joint PCR során létrejött kevés terméket. Ebben az esetben a PCR-ben használt DNS nem genomi DNS, hanem az előzőleg elkészített joint PCR termék.

Nested forward szekvencia: GCATAAGTGGCTATGCCGTTGAACGGG

Nested reverse szekvencia: CGAATTGAACATGTCCGTTATAACCGACTGCC

Nested szakasz hossza: 4680 bp

<i>ΔFvnapA</i> deléciós kazetta nested PCR protokoll	
dH ₂ O	36,6 μL
Expand Long 1 Puffer	5 μL
dNTP mix	1,75 μL
nested forward primer	1,5 μL
nested reverse primer	1,5 μL
joint PCR	3 μL
Expand Long Polimeráz	0,7 μL

5. táblázat: Nested PCR protokoll

<i>ΔFvnapA</i> deléciós kazetta nested PCR program	
elsődleges denaturáció: 94 °C	2 p
denaturáció: 93 °C	45 mp
annealing: 68 °C	45 mp
elongáció: 68 °C	4 p
ismétlés 34x	
végző elongáció: 68 °C	15 p
12 °C	∞

6. táblázat: Nested PCR program

A nested PCR reakcióhoz az összes joint PCR terméket felhasználjuk, mert a lehető legtöbb termék elérése a cél. A joint PCR reakcióelegye 25 μL volt, ebből egy nested PCR reakcióhoz 3 μL szükséges, így összesen 7-8 nested PCR reakcióelegy készíthető el egy joint PCR elegyből. A létrejött terméket gélen futtattuk és abból tisztítottuk a korábban leírt módon.

4.2. Transzformálás előkészítése protoplasztálással

Protoplasztok létrehozásához fonalas gombánk fiatal sejtjeinek sejtfalát emésztjük meg. Ennek eléréséhez használhatunk az éticsiga (*Helix pomatia*) emésztőnedvéből kivont enzimkeveréket, vagy borászatban használt enzimeket, a mi esetünkben ez az Extralyse®.

A protoplasztálás és transzformálás megkezdése előtt előkészítjük a regeneráltató tápagart (12. táblázat) és a regeneráltató YG tápfolyadékot (13. táblázat), melyeket a folyamat legvégén fogunk használni. A regeneráltató tápagarhoz 175 mL YPG tápfolyadékból 140 mL-hez 1,4 g agart és 50 µg/mL (összesen 70 µL-t 100mg/mL-es stockból) higromicint adunk. A fennmaradó 35 mL tápfolyadékhoz 0,21 g agart adunk. A 140 mL-nyi tápagart kiöntjük 6-7 db petricsészére, és hűtőben tároljuk felhasználásig, a 35 mL-nyi tápagart hagyjuk megszilárdulni bórszilikát üvegben, és a transzformálás utolsó lépéseként használjuk fel, ekkor 50 µg/mL (17,5 µL) higromicint adunk hozzá. Előzetes kísérleteink folyamán azt tapasztaltuk, hogy bár a protokoll szerint 100 µg/mL higromicin koncentráció minősül kellő szelekciós nyomásnak a vad típusok ellen, már 50 µg/mL koncentráció mellett is erősen gátolt a növekedésük, konídiumokat pedig egyáltalán nem képeznek. Emiatt alkalmaztuk a regeneráltató tápagarban és folyadékban az alacsonyabb higromicin koncentrációt.

A protoplasztálás lépései:

1. A protoplasztálást megelőző délután 100 mL YPG folyékony táptalajt (7. táblázat) mérünk ki 250 mL-es lombikba, 1×10^6 számú spórát oltunk bele, papírkupakkal lefedjük, és 28 °C-on 180 rpm-en 16-18 óra alatt felnevesztjük. *Fusarium*-nál nagyon fontos, hogy beállítsuk azt a lehető legkevesebb spóraszámot, melynél a protoplasztálási eljáráshoz elegendő micéliumot kapunk, de csírázatlan spórák nem maradjanak oldatban, melyek zavarhatják a transzformálást.

2. A felnevesztett micéliumokat két réteg Miraclothon (Millipore, USA) keresztül leszűrjük, vízzel mossuk. A micéliumokat spatulával 50 mL-es lombikba töltjük át 20 mL CaCl_2 KCl oldatba (9. táblázat), amelyhez 1,5 gr Extralyse-t adunk, ez lesz a protoplasztáló oldatunk (10. táblázat).

3. Óránként ellenőrizzük mikroszkóp alatt a képződő protoplasztokat. Ehhez az oldatból 10 µL-t veszünk ki, ideálisan egy micéliumcsomóval együtt, hogy lássuk, a gombafonalak emésztése mennyire előrehaladott.

4. Amikor az oldatunk már kellően telített protoplasztokkal, a lombik tartalmát 50 mL-es falcon csőbe szűrjük miraclothon keresztül, a protoplasztok ekkor a szűrt oldatba kerülnek.

5. A falcon csövet 10 percig 4 °C-on 1500 g-n centrifugáljuk úgy, hogy a centrifuga fékezését 0-ra vesszük (deceleration = 0), ezzel védve a sejtfal nélküli protoplasztokat.

6. A falcon csőben a centrifugálást követően pelletet figyelhetünk meg a cső aljára tapadva, erről leszívjuk a folyadékot, majd 10 mL KCl-al mossuk (8. táblázat), és ismét centrifugálunk.

7. A pelletről ismét leszívjuk a felülúszót, majd feloldjuk 2 mL KCl-ban óvatos szuszpendálással, és 1-1 mL-ként 1,5 mL-es eppendorf csőbe töltjük.

8. 1500 g-n 25 °C-on 3 percig centrifugálunk. Centrifugálást követően a pelletről leszívjuk a felülúszót, újabb 1 mL KCl-ot mérünk rá, szuszpendálunk, és ismét centrifugálunk. Ezt a tisztítási lépést 3x ismételjük meg.

9. A pelletet 500 µL KCl CaCl₂ oldatban vesszük fel, majd 2400 g-n 3 percig 25 °C-on centrifugáljuk.

10. A pellethez végül 110 µL KCl CaCl₂ oldatot adunk, melyből 10 µL-t a protoplasztok számolásához használjuk fel, a fennmaradó 100 µL a transzformáláshoz szükséges.

A protoplasztok ideális száma: 2×10^7

YPG (1L)	
mikológiai pepton	20 g
élesztőkivonat	10 g
glükóz	20 g
dH ₂ O	1000 mL-re

7. táblázat: YPG összetétele

0,6 M KCl oldat	
KCl	4,47 g
dH ₂ O	100 mL

8. táblázat: 0,6 M KCL oldat összetétele

0,6 M KCl, 50 mM CaCl₂ oldat	
KCl	4,47 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,74 g
dH ₂ O	100 mL

9. táblázat: 0,6 M KCl és 50 mM CaCl₂ oldat összetétele

Protoplasztáló oldat	
0,6 M KCl, 50 mM CaCl ₂ oldat	20 mL
Extralyse	1,5 g

10. táblázat: Protoplasztáló oldat összetétele

4.3. Transzformálás

1. A nested PCR-ből legfeljebb 10 µL-t adunk a protoplasztokat tartalmazó oldathoz, és 6-8x 1-1 másodpercig pulzálva vortexeljük.
2. Az elegyhez 50 µL fecskendőszűrőn átszűrt 4000 PEG oldatot (11. táblázat) adunk, és ismét 4-5x 1 másodpercig vortexelünk.
3. Az elegyet 25 percig jégen inkubáljuk.
4. 25 perc elteltével 1 mL 4000 PEG oldatot adunk hozzá, és pipettával 10x óvatosan szuszpendáljuk.
5. 25 percig szobahőmérsékleten hagyjuk.
6. 25 perc elteltével a mintánkat 8 mL YG tápfolyadékhoz adjuk, és 28°C-on 60 rpm-en egy éjszakán át inkubáljuk a protoplasztok regeneráltatása céljából.

7. Másnap a korábban elkészített 35 mL-nyi agart 43°C-ra melegítjük, majd hozzákeverjük a lombik 8 mL-nyi tartalmát. Hozzáadjuk a higromicint 50 µg/mL végkoncentrációban, és a korábban kiöntött szelekciós csészék tetején elosztjuk.

8. A Petri-csészéinket 25 °C-on inkubáljuk az első, spórázó transzformáns telepek megjelenéséig.

PEG 4000 oldat	
TRIS	0,12 g
CaCl ₂	0,11 g
PEG 4000	60 w/v%

11. táblázat: PEG 4000 oldat összetétele

Regeneráltató tápagar (175 mL)	
1M szacharóz	68,46 gr
0,02% élesztőkivonat	0,04 gr
dH ₂ O	175 mL

12. táblázat: Regeneráltató tápagar összetétele

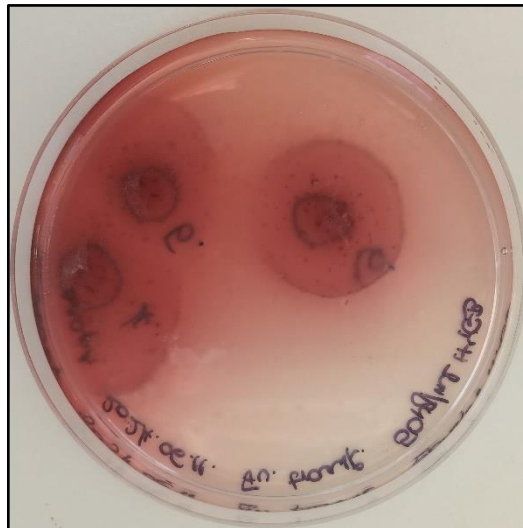
YG Regeneráltató tápfolyadék (100 mL)	
élesztőkivonat	0,02 g
szacharóz	34,23 g
dH ₂ O	100 mL

13. táblázat: Regeneráltató tápfolyadék összetétele

4.4. Lehetséges *ΔFvnapA* mutánsok izolálása

4.4.1. Egyedi telepek létrehozása szelekciós táptalajon

A regeneráltató tápagaros Petri-csészéinken már 4 nap után láttunk kezdetleges, spórázó telepeket (1. ábra). A különálló telepekről külön-külön Petri-csészére oltottunk le a transzformánsokból származó spórákat, és szélesztéssel egyedi telepek létrehozására törekedtünk. Ennél a folyamatnál már 100 µg/mL koncentrációban alkalmaztuk a higromicint Czapek-Dox táptalajhoz adva (17. táblázat).



1. ábra: Transzformánsok szelekciós regeneráltató tápagaron (saját fotó)

4.4.2. Genomi DNS izolálása

Az egyedi telepekből származó spórákból rázatott kultúrát hoztunk létre, ezeket 28 °C-on két napon át YPG tápfolyadékban növesztettük. A felnövekedett micéliumokból genomi DNS-t izoláltunk, ezeket használtuk fel mutánsaink igazolására.

Minták előkészítése és DNS izolálás:

1. A leoltáshoz előkészítünk félkémcsőben 2 ml folyékony YPG táptalajt.
2. Glicerín stockról (-80 °C-on glicerines oldatban tárolt spórák) vagy szilárd táptalajon felnövesztett törzsről oltókaccsal inokulálunk spórát a félkémcsővekbe.
3. A spórákból micéliumokat növesztünk egy éjszaka alatt 28 °C-on 220 rpm-en
4. Feltárási csővekbe mérünk 100 µL üveggyöngyöt, 300 µL Lízispuffert (10 mM TRIS-HCl pH7.5, 0.5M NaCl, 1 % SDS), 3 µL 10 mg/mL-es RNáz A-t, és az előzetesen felnövesztett micéliumokat.
5. A sejtfeltárást Magnalyzerrel végezzük el 4500 rpm-en 45 másodpercig. A feltárást megelőzően és azt követően a következő lépésig a mintákat jégen tartjuk.

6. 65 °C-os vízfürdőben 15 percig hőkezeljük a mintáinkat, hogy inaktiváljuk a sejtek természetes DNázait, ezzel egyidőben az általunk a mintákhoz adott RNáz A-t is aktiváljuk. Hőkezelés közben 3-5 percenként vortexelünk
7. Mintáinkhoz 250 µL PCIA (fenol:kloroform:izoamil alkohol 25:24:1 arányú elegyét)-t mérünk, és alaposan átvortexeljük az elegyet, hogy tejszerű folyadékot kapjunk.
8. 4°C-ra előhűtött centrifugában 13000 rpm-en 15 percig centrifugáljuk a feltárócsöveket
9. A centrifugálás során keletkezett felső, vizes fázist 1,5 mL-es eppendorf csövekbe pipettázzuk.
10. A felülúszóhoz 0,54 térfogat izopropanolt adunk, majd megismételjük a 8. lépést
11. A centrifugálást követően apró pelletünk fog keletkezni az eppendorfbok alján. Ezekről egy határozott mozdulattal leöntjük az izopropanolt, és 500 µL 70%-os jéghideg etanolt adunk a mintákhoz.
12. 4°C-ra előhűtött centrifugában 13000 rpm-en 5 percig centrifugálunk.
13. A fennmaradt pelletről vákuummal szívjuk le az etanos felülúszót, majd a mintákat 5-10 percig szárítjuk, hogy az etanol teljesen elpárologjon az eppendorfbokból.
14. A pelletet 10-12 µL dH₂O-ban vesszük fel, és felhasználásig -20°C-on tároljuk.

4.4.3. Ellenőrző PCR

A korábban izolált gDNS mintákat ellenőrző PCR protokollhoz (14. és 15. táblázat) használtuk fel, hogy ellenőrizzük, a deléciós kazettánk beépült-e a protoplasztált sejtekbe. A mutánsok mellett kontrollként a vad típusú (FGSC 7600) törzset használtuk.

Az ellenőrző PCR-hez használt primer szekvenciák:

upstream forward primer: AGAACATCAGTTTTGCCTCAATTCCACGACAT

downstream reverse primer: TGATATCGTGATTCCGCACAATATAGGAAACA

PCR protokoll (LongAmp polimerázhoz)	
LongAmp MasterMix (NEB, USA)	25 µL
upstream fwd primer	2 µL
downstream reverse primer	2 µL
genomi DNS	1 µL
dH ₂ O	20 µL

14. táblázat: Transzformánsokat ellenőrző PCR protokoll

PCR Program	
elsődleges denaturáció: 94°C	30 mp
denaturáció: 94°C	30 mp
annealing: 62°C	40 mp
elongáció: 65°C	4 p
ismétlés 29x	
végso elongáció: 65°C	10 p
4°C	∞

15. táblázat: Transzformánsokat ellenőrző PCR program

4.4.4. Ellenőrző emésztés

A PCR termékkel ellenőrző emésztést is végeztünk. Ehhez olyan restrikciós endonukleázokat használtunk fel, amelyek csak a transzformáns géndarabot hasítják, a kontroll törzsből származó génszakaszt nem.

Ellenőrző emésztés protokoll	
Puffer (Green buffer)	2 µL
NdeI illetve ScaI enzim	0,5 µL
PCR termék	6 µL
dH ₂ O	11,5 µL

16. táblázat: Lehetséges *ΔFvnapA* transzformánsokból származó PCR termék emésztési protokollja

Az enzimeket külön-külön használtuk fel az egyes mintákhoz, azaz minden mintából két emésztést készítettünk el, mintánként egy enzimmal. Az elegyet jégen készítettük elő,

majd 30 percig 37°C-on aktiváltuk az endonuklázoikat. Az emésztési mintázatot gélelektroforézissel ellenőriztük.

4.5. Stresszagar kísérletek előkészítése

Az általunk vizsgált és deletált *FvnapA* gén ortológjai más fajokban bizonyítottan az oxidatív stresszválaszt és toxintermelést szabályozzák, így a transzformánsok várhatóan érzékenyek lesznek a táptalajban található bizonyos oxidatív stresszt okozó ágensekre.

A stresszkísérletek során 6 napos tenyészetekről izolált spórákat használtunk. FGSC 7600 kontroll törzséből és $\Delta FvnapA$ mutánsokból Czapek-Dox agaron spóráztattunk. A kísérlet során CdCl_2 , H_2O_2 , *t*BOOH (*tert*-butyl-hidroperoxid), NaCl és szorbit stresszorokat alkalmaztunk.

Czapek-Dox (1L)	
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g
KCl	0,5 g
szacharóz	20 g
NaNO_3	2 g
Vogel's ME	200 μL
agar	18 g
dH_2O	1000 mL-re

17. táblázat: 1L Czapek-Dox összetétele

NaCl és szorbit stresszorok esetén közvetlenül a lombikba mérjük azokat és a táptalajjal együtt sterilizzük. A többi stresszorból törzsoldatot készítettünk, melyeket az 50 °C-ra lehűtött táptalajhoz adtuk.

- CdCl_2 (50 mL-nyi 100 mM-os törzsoldatot készítettünk, amihez 50 mL dH_2O -ben 0,915 g CdCl_2 -ot oldottunk fel)
 - 0,05 mM koncentráció: 100 μL CdCl_2 + 200 mL táptalaj
 - 0,1 mM koncentráció: 200 μL CdCl_2 + 200 mL táptalaj
 - 0,15 mM koncentráció: 300 μL CdCl_2 + 200 mL táptalaj
 - 0,2 mM koncentráció: 400 μL CdCl_2 + 200 mL táptalaj

- H₂O₂ (30%-os oldatból 10 mL 10x hígítású törzsoldatot készítettünk)
 - 0,5 mM koncentráció: 102,2 µL H₂O₂ + 200 mL táptalaj
 - 1 mM koncentráció: 204,4 µL H₂O₂ + 200 mL táptalaj
 - 2,5 mM koncentráció: 511 µL H₂O₂ + 200 mL táptalaj
 - 3,5 mM koncentráció: 715,4 µL H₂O₂ + 200 mL táptalaj

- *t*BOOH (A rendelkezésre álló oldatból 10 mL 10x hígítású törzsoldatot készítettünk)
 - 0,1 mM koncentráció: 28,3 µL *t*BOOH + 200 mL táptalaj
 - 0,25 mM koncentráció: 70,75 µL *t*BOOH + 200 mL táptalaj
 - 0,5 mM koncentráció: 141,5 µL *t*BOOH + 200 mL táptalaj
 - 0,75 mM koncentráció: 212,25 µL *t*BOOH + 200 mL táptalaj

- szorbit
 - 0,5 M koncentráció: 18,215 g szorbit + táptalaj 200 mL-re
 - 1 M koncentráció: 36,43 g szorbit + táptalaj 200 mL-re
 - 1,5 M koncentráció: 54,65 g szorbit + táptalaj 200 mL-re
 - 2 M koncentráció: 72,86 g szorbit + táptalaj 200 mL-re

- NaCl
 - 0,5 M koncentráció: 5,844 gr NaCl + táptalaj 200 mL-re
 - 1 M koncentráció: 11,688 gr NaCl + táptalaj 200 mL-re
 - 1,5 M koncentráció: 17,532 gr NaCl + táptalaj 200 mL-re
 - 2 M koncentráció: 23,376 gr NaCl + táptalaj 200 mL-re

- Kontroll (200 mL)
 - 200 mL táptalajt szétosztunk hozzáadott stresszorok nélkül

A 200 mL mennyiségű táptalajt 8 Petri csészébe osztottuk szét. A spórák számlálása 1 mL spóraszuszpenzióban történt, amelyet Bürker-kamrában számoltunk meg, majd 1×10^7 db/mL koncentrációjúra hígítottuk, spóramosó folyadék (18. táblázat) segítségével. A hígítás 500 µL végtérfogóban történt

A hígított szuszpenziókból 5 µL-t pipettáztunk a tápagar közepére, ez a pontinokulálás. A módszernek köszönhetően a spórák sugár irányban növesztenek hifákat, tehát kerek telepet fogunk kapni, így az átmérőjük mérhető és összehasonlítható.

Spóramosó folyadék	
NaCl	0,9 g
Tween 80	50 µL
dH ₂ O	100 mL

18. táblázat: Spóramosó folyadék összetétele

4.6 Stresszagar kísérletek eredményeinek statisztikai elemzése

A stresszkísérleteket jelen dolgozat elkészültéig H₂O₂ és *t*BOOH stresszorokkal háromszor, CdCl₂, szorbit és NaCl stresszorokkal kétszer ismételtük meg egymástól függetlenül, stresszoronként 2 biológiai ismétléssel minden kísérletsorozatban. Ez elegendő adatnak bizonyult statisztikai kimutatás elkészítéséhez, melyet Excel-táblázatban végeztük el.

Az egyes kísérletsorozatok eredményeiből átlagot, szórást számítottunk, ezt követően a kezelt kontroll és kezelt mutáns telepátmérők közötti eltérések közötti különbségeket szignifikancia szint meghatározásával, Student-féle t-próba használatával igazoltuk. A szignifikancia szintet csillagokkal (*) jelöltük a 20-24. táblázatban. 0,1% esetében „***”, 1% esetében „**”, 5% esetében „*” jelölést alkalmaztunk.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Joint PCR

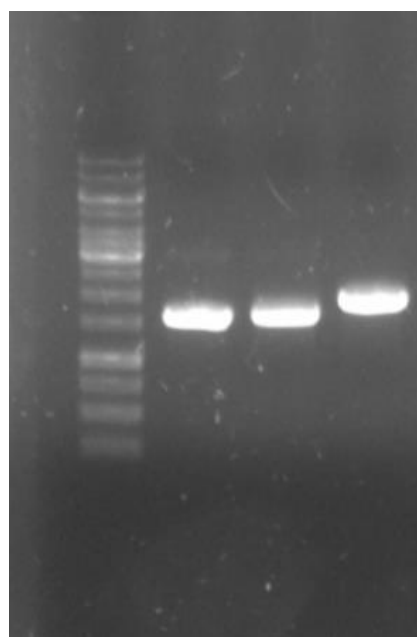
A homológ és marker szakaszok, illetve a joint PCR reakciók során sikeresen hoztunk létre PCR termékeket. Az elkészült termék koncentrációját és méretét gélelektroforézissel, illetve Nanodroppal ellenőriztük (19. táblázat) (2. ábra).

PCR reakciók koncentrációi	
PCR termék és mérete	PCR termék koncentrációja
upstream homológ szakasz 1633 bp	399 ng/ μ L
downstream homológ szakasz 1878 bp	308 ng/ μ L
higromicin marker 1437 bp	229/ μ L

19. táblázat: PCR termékek hossza és koncentrációja gélből való izolálást követően

A DNS szakaszok összeillesztését követően készült el a 4906 bp hosszúságú nested PCR géndelécións kazetta, amit közvetlenül felhasználtunk a transzformáláshoz. Bár a transzformálási protokoll nem határoz meg szükséges minimális DNS koncentrációt, amit fel kell használnunk, mi 800-1100 ng/ μ L koncentrációjú terméket tartottunk ideálisnak.

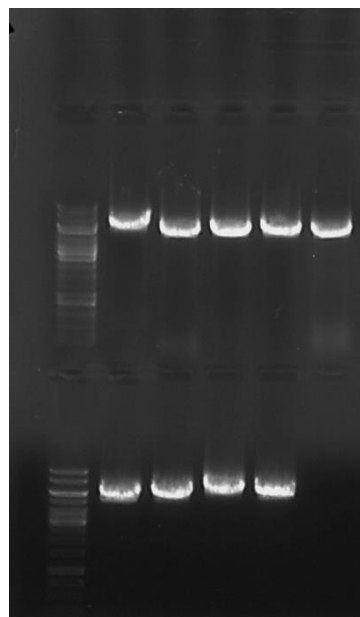
A nested PCR-ünk koncentrációja 1153 ng/ μ L lett, melyet 900 ng/ μ L-re hígítva alkalmaztunk az eljárás során.



2. ábra: $\Delta FvnapA$ delécións kazetta összeállításához szükséges PCR termékek balról sorban: 1kb DNS létra, upstream homológ szakasz, downstream homológ szakasz, higromicin marker (saját fotó)

5.2. Ellenőrző PCR

Az ellenőrző gélelektroforézis célja azon mutánsok azonosítása, amelyekben az *FvnapA* gén helyére a higromicin rezisztencia gén épült be. Az upstream forward és downstream reverse primerek segítségével sokszorozítottuk azt a DNS szakaszt, amellyel ellenőrizhető a homológ rekombináció. A képen az első minta a kontroll törzs, amelyben biztosan tudjuk, hogy a *FvnapA* gén jelen van. Tekintve, hogy a kontroll törzsből származó DNS szakasz 5718 bp, a mutánsból amplifikált DNS szakasz 4906 bp hosszúságú, ez a különbség már jól látható megfelelő ideig történő futtatás esetén. A gélképen láthatjuk, ahogyan a jól elkülönülő, kompakt sávok közül a kontroll, illetve a $\Delta FvnapA$ 8. minta magasabban helyezkednek el a többi sávhoz képest (3. ábra).



3. ábra: Gélelektroforézis a deléciós mutánsok igazolására. A gélképen látható minták sorrendben: (felső sor) 1 kb DNS létra, kontroll, $\Delta FvnapA1$, $\Delta FvnapA2$, $\Delta FvnapA3$, $\Delta FvnapA4$, (alsó sor) 1 kb DNS létra, $\Delta FvnapA5$, $\Delta FvnapA6$, $\Delta FvnapA8$, $\Delta FvnapA9$

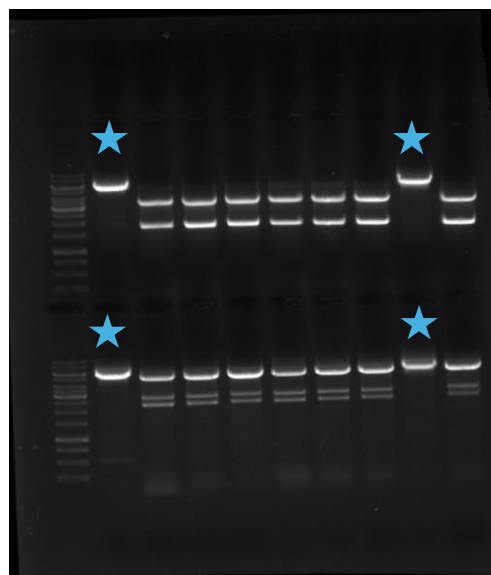
5.3. Ellenőrző emésztés

A kontroll törzsből származó amplifikált PCR termék 5718 bp, a mutáns törzsből származó 4906 bp hosszúságú (5.1 fejezet).

Az *ScaI* enzim a kontroll törzs PCR termékét nem hasítja, a mutáns törzs PCR termékét 1689 bp és 3217 bp szakaszokra emészt. A 4. ábrán látható a felső sorban a kontroll törzs (1. minta), illetve a 8. minta, amelyben a géndeléción nem történt meg. A többi mintában a várt mintázatot kaptuk.

Az *NdeI* enzim sem hasítja a kontroll törzs PCR termékét, a mutáns törzs esetén

pedig 2207 bp és 2699 bp szakaszokra emészt. Az 1. és a 8. minta szintén a kontroll



4. ábra: Emésztési kép az $\Delta FvnapA$ mutánsok azonosítására. A felső sorban az *ScaI*, az alsó sorban az *NdeI* által emésztett minták láthatók

törzsre jellemző emésztési mintázatot adja (a képen kék csillaggal jelöltek) (4. ábra). A többi minta emésztési mintázata a deléción sikerességét igazolta.

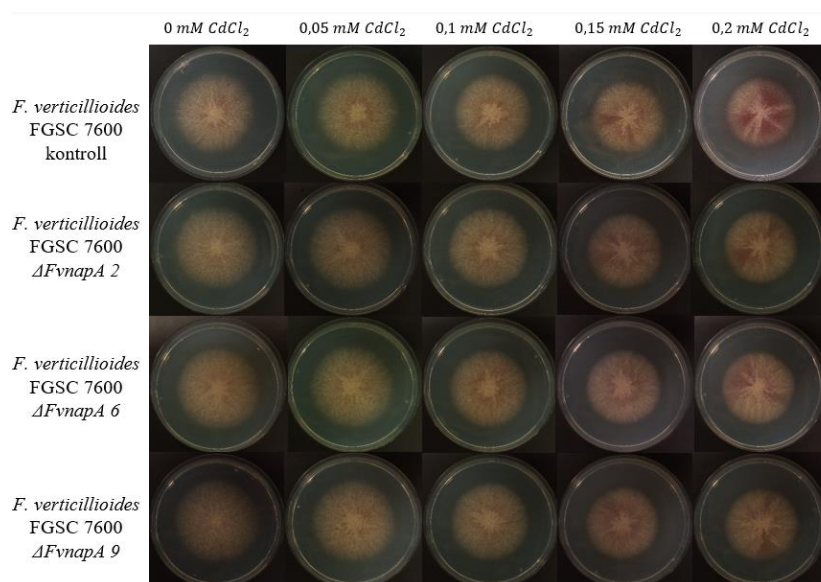
5.4. Stresszkísérlet eredményeinek értékelése

5.4.1. Kadmium-klorid érzékenység

A kadmium egy nehézfém, szabadgyökök termelődését indukálja, így végső soron oxidatív stresszt is okoz. Károsítja az egyszálú DNS-t és megzavarja a nukleinsav-és fehérjeszintézist (Tchounwou és mtsai., 2012). A mérések alapján nem jelentkezett eltérés a mutáns törzsekben a kontrollhoz képest, így a deléciós mutánsokat nem tekintjük érzékenynek a kadmiumra (20. táblázat, 5. ábra).

Telepátmérők CdCl ₂ stresszoron (cm)					
	Kontroll	0,05 mM CdCl ₂	0,1 mM CdCl ₂	0,15 mM CdCl ₂	0,2 mM CdCl ₂
FGSC 7600	6,40±0,1	6,08±0,2	5,46±0,05	5,00±0,2	4,66±0,4
$\Delta FvnapA$ 2	6,38±0,2	6,33±0,2	5,48±0,15	5,03±0,3	4,70±0,3
$\Delta fvnepA$ 6	6,48±0,2	6,33±0,2	5,46±0,1	4,99±0,3	4,68±0,3
$\Delta fvnepA$ 9	6,53±0,3	6,30±0,08*	5,49±0,1	5,10±0,2	4,63±0,3

20. táblázat: Telepátmérők CdCl₂-t tartalmazó táptalajon



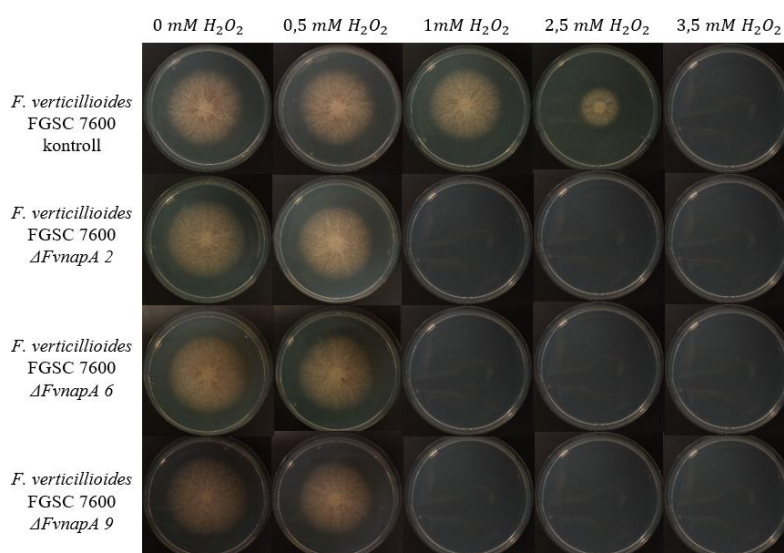
5. ábra: *F. verticillioides* kontroll és $\Delta FvnapA$ mutánsok fenotípusos megjelenése CdCl₂ stresszor különböző koncentrációit alkalmazva

5.4.2. Hidrogén-peroxid érzékenység

A sejtekben nagy mennyiségben akumulálódó H_2O_2 felboríthatja a sejtek redox homeosztázisát, így károsíthatja a sejtek DNS, fehérje és lipid állományát, így sejthalált indukálhat (Enomoto és mtsai., 2013). A kontroll törzs esetében a növekvő H_2O_2 egyre kisebb telepátmérőket eredményezett. A deléciós mutánsok esetében 1 mM vagy nagyobb koncentrációnál a spórák képtelenek voltak hifafonalak növesztésére. Ez bizonyítja, hogy a mutánsok érzékenyebbek a H_2O_2 -ra. A három független kísérletet három külön tenyészetből származó spórák leoltásával végeztük, melyek kataláz aktivitása eltérhetett egymástól, ezzel magyarázhatóak a magas szórási értékek a táblázatban (21. táblázat, 6. ábra).

Telepátmérők H_2O_2 stresszoron (cm)					
Törzs	Kontroll	0,5 mM H_2O_2	1 mM H_2O_2	2,5 mM H_2O_2	3,5 mM H_2O_2
FGSC 7600	6,40±0,1	6,17±0,3	5,90±0,3	2,55±1,5	0
$\Delta FvnapA$ 2	6,38±0,2	6,00±0,59	3,50±2,9	0***	0
$\Delta FvnapA$ 6	6,48±0,2	6,15±0,20	3,69±2,9	0***	0
$\Delta FvnapA$ 9	6,53±0,3	6,27±0,35	3,70±2,9	0***	0

21. táblázat: Telepátmérők H_2O_2 -t tartalmazó táptalajon



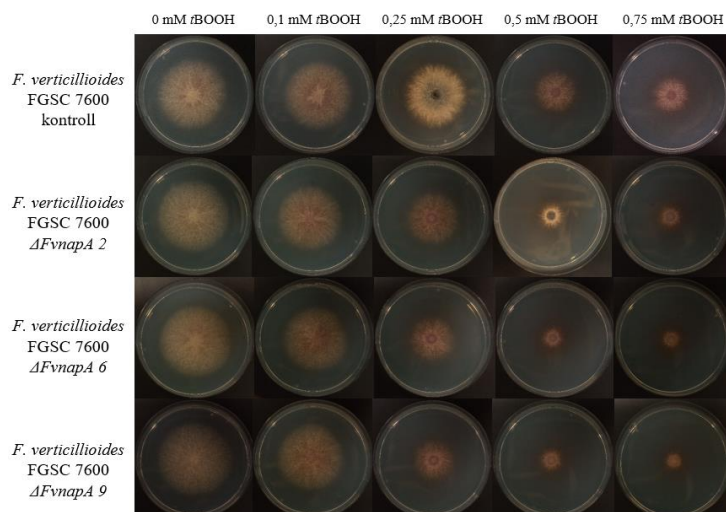
5. ábra: *F. verticillioides* kontroll és $\Delta FvnapA$ mutánsok fenotípusos megjelenése H_2O_2 stresszor különböző koncentrációit alkalmazva

5.4.3. *t*BOOH érzékenység

A *t*BOOH leállítja a sejtek növekedését és apoptózist indukál (Kanupriya és mtsai., 2007). Lipidperoxidációt is okoz, így szabadgyököket hoz létre, ami oxidatív stresszt indukál (Király és mtsai., 2020). Az alkalmazott koncentrációk mellett a kontroll és a mutáns törzs is életben maradt, de a *t*BOOH növekedést gátló hatása nagyobbak bizonyult a mutáns törzsek esetében, 0,5 mM *t*BOOH esetén már szignifikáns eltérést tapasztaltunk a növekedésben a kontroll és mutáns törzsek között (22. táblázat, 7. ábra).

Telepátmérők <i>t</i> BOOH stresszoron (cm)					
Törzs	Kontroll	0,1 mM <i>t</i> BOOH	0,25 mM <i>t</i> BOOH	0,5 mM <i>t</i> BOOH	0,75 mM <i>t</i> BOOH
FGSC 7600	6,40±0,1	5,63±0,06	4,81±0,08	4,00±0,2	3,52±0,04
$\Delta FvnapA$ 2	6,38±0,2	5,62±0,03	4,40±0,2***	2,63±0,2***	2,38±0,3***
$\Delta FvnapA$ 6	6,48±0,2	5,61±0,06	4,34±0,2***	2,77±0,15***	2,27±0,3***
$\Delta FvnapA$ 9	6,53±0,3	5,69±0,09	4,27±0,3***	2,82±0,07***	2,53±0,2***

22. táblázat: Telepátmérők *t*BOOH-t tartalmazó táptalajon



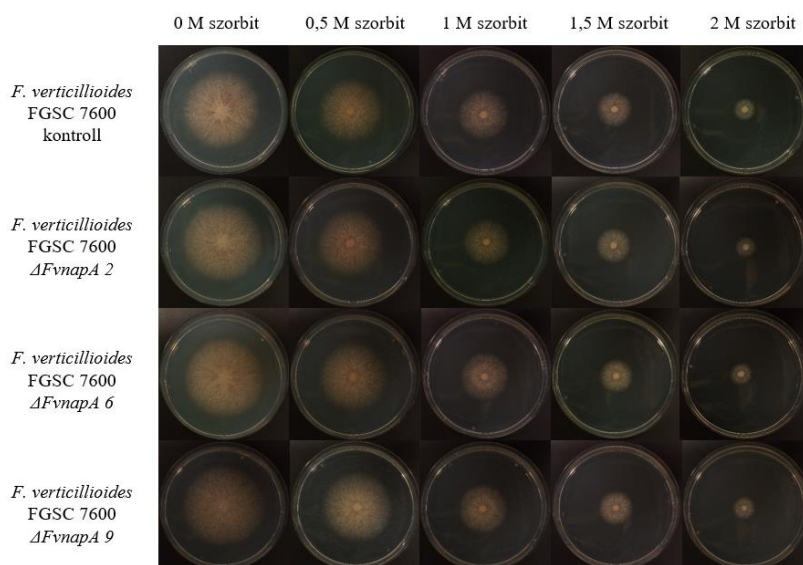
7. ábra: *F. verticillioides* kontroll és $\Delta FvnapA$ mutánsok fenotípusos megjelenése *t*BOOH stresszor különböző koncentrációit alkalmazva

5.4.4. Szorbit érzékenység

A szorbit ozmotikus stresszt kiváltó ágens, így hozzájárulhat a sejtek metabolizmusának megváltozásához (Górka-Nieć és mtsai., 2010). Az általunk deletált *FvnapA* gén előzetes kutatások alapján, a virulenciát és az oxidatív stresszválaszt befolyásolja, viszont előfordulhat, hogy az általa szabályozott géntermékek egyéb metabolikus útvonalakban is részt vesznek. Az eredmények alapján a mutáns törzsek nem érzékenyebbek az alkalmazott koncentrációjú szorbitra (23. táblázat, 8. ábra).

Telepátmérők szorbit stresszoron (cm)					
Törzs	Kontroll	0,5 M Sz	1 M Sz	1,5 M Sz	2 M Sz
FGSC 7600	6,40±0,1	4,58±0,11	3,16±0,05	2,59±0,02	1,58±0,13
$\Delta FvnapA$ 2	6,38±0,2	4,98±0,10	3,06±0,8	2,53±0,03**	1,55±0,01
$\Delta FvnapA$ 6	6,48±0,2	5,00±0,08	3,05±0,10	2,56±0,05	1,51±0,05
$\Delta FvnapA$ 9	6,53±0,3	5,03±0,05	3,06±0,08	2,51±0,02	1,54±0,03

23. táblázat: Telepátmérők szorbitot tartalmazó táptalajon



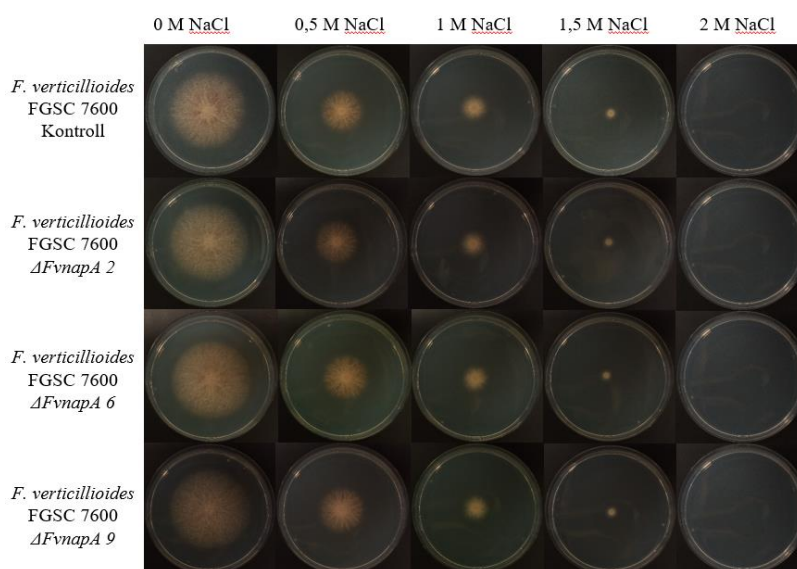
8. ábra: *F. verticillioidea* kontroll és $\Delta FvnapA$ mutánsok fenotípusos megjelenése szorbit stresszor különböző koncentrációit alkalmazva

5.4.5. Nátrium-klorid érzékenység

A NaCl nagy mennyiségben megzavarhatja a citoszol természetes működését, illetve hiperozmotikus stresszt okozhat (Nguyen Van Long és mtsai., 2017). Szuprafiziológiás koncentrációban adtuk a NaCl-ot a táptalajhoz, a szorbithoz hasonlóan nem tapasztaltunk a növekedésgátlásban eltérést a kontroll és a mutáns törzsek között (24. táblázat, 9. ábra).

Telepátmérők NaCl stresszoron (cm)					
Törzs	Kontroll	0,5 M NaCl	1 M NaCl	1,5 M NaCl	2 M NaCl
FGSC 7600	6,40±0,1	3,43±0,09	2,28±0,05	1,10±0,08	0
$\Delta FvnapA$ 2	6,38±0,2	3,55±0,04	2,31±0,03	1,13±0,05	0
$\Delta FvnapA$ 6	6,48±0,2	3,54±0,02	2,28±0,05	1,05±0,06	0
$\Delta FvnapA$ 9	6,53±0,3	3,51±0,02	2,28±0,05	1,08±0,1	0

24.



25. táblázat: Telepátmérők NaCl-t tartalmazó táptalajon

9. ábra: *F. verticillioides* kontroll és $\Delta FvnapA$ mutánsok fenotípusos megjelenése NaCl stresszor különböző koncentrációit alkalmazva

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a szakirodalomból ismert, más fajokban vizsgált ortológok deléciós mutánsainál tapasztalt fenotípusokat azonosítani tudtuk. *F. verticillioides* $\Delta FvnapA$ mutánsaink érzékenységet mutattak H_2O_2 és *tBOOH* oxidatív stresszorok jelenlétében, mely fenotípust *Aspergillus nidulans* $\Delta napA$, *Aspergillus flavus* $\Delta Afap1$, *Aspergillus fumigatus* $\Delta Afyap1$ vonalak esetében is azonosították (Guan és mtsai., 2019, Lessing és mtsai., 2007, Bákány és mtsai., 2021). Bár az $CdCl_2$ közvetetten oxidatív stresszt okoz, a nehézfém stresszre érzékeny fenotípusok inkább élesztőkben figyelhetők meg, mint a *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta yap1$ mutánsban, ezt kísérletes eredményeink is alátámasztották (Rodrigues-Pousada és mtsai., 2019).

6. Összefoglalás

A fonalas gombák egyik meghatározó faja a *Fusarium verticillioides*. Növénykártévőként és toxintermelése miatt is kutatása kiemelkedő jelentőséggel bír. Éghajlatunk változása miatt az élelmiszerek szennyeződése a gomba spóráival és toxinjaival egyre nagyobb kockázatot jelent, így sejtszintű működésének megértése kulcsfontosságú.

A kutatás során a *F. verticillioides* genomjából egy bZIP típusú transzkripciósfaktort az *FvnapA*-t deletáltunk, mely más fonalas gombafajokban bizonyítottan oxidatív stresszválaszt és virulenciát befolyásoló gének expresszióját irányítja.

A sikeresen létrehozott *FvnapA* mutáns törzseket különféle vizsgálatoknak vetettük alá, hogy azonosíthassuk a várt fenotípusokat. A kísérletek alapján kijelenthető, hogy az *FvnapA* deléciós mutánsok előállítása sikeres volt és a mutánsok mutatták a várt fenotípust, érzékenyek bizonyultak a H₂O₂-re és tBOOH-ra.

A Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken több éve folynak kutatások Yap1 ortológ és más bZIP típusú transzkripciósfaktorokkal kapcsolatban, többféle kísérleti szervezeten. Jelen munka folytatásaként a bemutatott stresszorok koncentrációit tovább finomítjuk, így olyan gátlási koncentrációkat határozzunk meg, ami mellett eredményes transzkriptomikai analízis végezhető a kontroll és a deléciós mutánsok összehasonlításával. Mivel a vizsgált transzkripciósfaktor más fonalas gombákban a toxintermelés szabályozásában is részt vesz, nyomon fogjuk követni a deléciós, $\Delta FvnapA$ mutánsok mikotoxin szintézisében bekövetkező változásokat és az eredményeket összevetjük a kontroll törzsszel.

Eredményeinkkel bővíteni kívánjuk a fonalas gombák stresszbiológiájáról rendelkezésre álló tudástárat, ezzel segítve gyógyszerek és mezőgazdasági biokontroll ágensek fejlesztését.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető Úrnak, aki lehetőséget biztosított arra, hogy részt vegyek a tanszéken folyó kutatási munkában, és felajánlotta nekem a TDK lehetőségét, ösztönzött és megerősített a munkám során.

Köszönetemet nyilvánítom Dr. Leiter Éva egyetemi docensnek, aki lehetőséget adott a munkacsoportban való tevékenységre, szaktudásával végig kísérte, támogatta a munkámat és biztosította a tárgyi feltételeket.

Hálával tartozom Mondok Ágnes Kata PhD hallgatónak, aki bevezetett a tudományos labormunkába, és folyamatos támogatást nyújtott a kutatás során, tanácsokkal látott el, nem csak a TDK, hanem az egyetemi tanulmányokkal kapcsolatban is.

Utoljára, de nem utolsó sorban köszönöm a családom feltétel nélküli támogatását, biztatását és hozzájárulását egy olyan környezet megteremtéséhez, amelyben elmélyedhettem a kutatási témámban.

8. Irodalomjegyzék

1. Kun RS, Gomes ACS, Hildén KS, Cerezo SS, Makela MR, de Vries RP. 2019. Developments and opportunities in fungal strain engineering for the production of novel enzymes and enzyme cocktails for plant biomass degradation. *Biotechnology Advances* 37:107361. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.017>
2. Suga H, Hyakumachi M. 2004. Genomics of Phytopathogenic *Fusarium*. *Applied Mycology and Biotechnology* 4:161-189. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(04\)80009-1](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(04)80009-1)
3. Zeece M, 2020. Introduction the the Chemistry of Food, Chapter 7: Food Additives, pp 251-311. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809434-1.00007-4>
4. Liu X, Fan L, Yin S, Chen H, Hu H. 2019. Molecular mechanisms of fumonizin B1-induced toxicities and its applications in the mechanism-based interventions. *Toxicon* 167:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.009>
5. Batista BG, de Chaves MA, Reginatto P, Saraiva OJ, Fuentefria AM. 2020. Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 53:e20200013 <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0013-2020>
6. Douglas AP, Chen SC-A, Slavin MA. 2016. Emerging infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi. *Clinical Microbiology and Infection* 22:670-680 <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.011>
7. Omotayo OP, Babalola OO. 2023. *Fusarium verticillioides* of maize plant: Potentials of propitious phytomicrobiome as biocontrol agents. *Frontiers in Fungal Biology* 4:1095765 <https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1095765>
8. Zheng H, Kim J, Liew M, Yan JK, Herrera O, Bok JW, Kelleher NL, Keller NP, Wang Y. 2015. Redox metabolites signal polymicrobial biofilm development via the NapA oxidative stress cascade in *Aspergillus*. *Current Biology* 25:29-37 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.018>
9. Toone WM, Morgan BA, Jones N. 2001. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* 20:2336-46. doi: 10.1038/sj.onc.1204384.
10. Ferguson HA, Goodrich JA. 2001. Expression and purification of recombinant human c-Fos/c-Jun that is highly active in DNA binding and transcriptional activation in vitro. *Nucleic Acids Research* 29:e98 <https://doi.org/10.1093/nar/29.20.e98>

11. Mshelia LP, Selamat J, Samsudin NIP, Rafii MY, Mutalib N-AA, Nordin N, Berthiller F. 2020. Effect of temperature, water activity and carbon dioxide on fungal growth and mycotoxin production of acclimatised isolates of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Toxins* 12:478 <https://doi.org/10.3390/toxins12080478>
12. Kuge S, Jones N. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO Journal* 13:655-64. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06304.x.
13. Mendoza-Martínez AE, Lara-Rojas F, Sánchez O, Aguirre J. 2017. NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers Microbiology* 8:516. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00516>
14. Latchman DS. 1993. Transcription factors: an overview. *International Journal of Experimental Pathology* 74:417-422
15. Slack JMW. 2014. Principles of Tissue Engineering (4th ed.), Part 1: The Basis of Growth and Differentiation, Chapter 7-Molecular Biology of the Cell, p 129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00007-0>
16. Pabo CO, Sauer RT. 1992. TRANSCRIPTION FACTORS: Structural families and principles of DNA recognition. *Annual Reviews in Biochemistry* 61:1053-1095 <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.005201>
17. Yin W-B, Reinke AW, Szilágyi M, Emri T, Chiang Y-M, Keating AE, Pócsi I, Wang CCC, Keller NP. 2013. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159:77-88 <https://doi.org/10.1099/mic.0.063370-0>
18. Zhang T, Zhou Y. 2022. Plant transcription factors, contribution in development, metabolism, and environmental stress. Section IV: Plant TFs and stress, Chapter 18- Plant transcription factors and salt stress. pp 369-381. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90613-5.00010-8>
19. Chouhan R, Rai G, Gandhi SG. 2023. Plant transcription factors, contribution in development, metabolism, and environmental stress. Section III: Plant TFs and metabolism, Chapter 10-Plant transcription factors and flavonoid metabolism. pp 219-231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90613-5.00001-7>
20. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764. doi: 10.1126/science.3289117

21. Fernando VCD. 2020. Transcription factors for abiotic stress tolerance in plants. Chapter 7-Major transcription factor families involved in salinity stress tolerance in plants. pp 99-109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819334-1.00007-1>
22. Rodrigues-Pousada C, Devaux F, Caetano SM, Pimentel C, da Silva S, Cordeiro AC, Amaral C. 2019. Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview. *Microbial Cell* 6:267-285 doi: 10.15698/mic2019.06.679.
23. Zhao Q, Pei H, Zhou X, Zhao K, Yu M, Han G, Fan J, Tao F. 2022. Systematic characterization of bZIP transcription factors required for development and aflatoxin generation by high-throughput gene knockout in *Aspergillus flavus*. *Journal of Fungi* 8:356 <https://doi.org/10.3390/jof8040356>
24. Cartwright GM, Scott B. 2013. Redox regulation of an AP-1-like transcription factor, YapA, in the fungal symbiont *Epichloe festucae*. *Eukaryotic Cell* 12:10 <https://doi.org/10.1128/ec.00129-13>
25. Guan X, Zhao Y, Liu X, Shang B, Xing F, Zhou L, Wang Y, Zhang C, Bhatnagar D, Liu Y. 2019. The bZIP transcription factor Afap1 mediates the oxidative stress response and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Revista Argentina de Microbiología* 51:292-301 <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.07.003>
26. Bákány B, Yin W-B, Dienes B, Nagy T, Leiter É, Emri T, Keller NP, Pócsi I. 2021. Study on the bZIP-type transcription factors NapA and RsmA in the regulation of intracellular reactive species levels and sterigmatocystin production of *Aspergillus nidulans*. *International Journal of Molecular Sciences* 22:11577 <https://doi.org/10.3390/ijms222111577>
27. Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA. 2007. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator Afap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryotic Cell* 6:12 <https://doi.org/10.1128/ec.00267-07>
28. Guo M, Chen Y, Du Y, Dong Y, Guo W, Zhai S, Zhang H, Dong S, Zhang Z, Wang Y, Wang P, Zheng X. 2011. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLOS Pathog.* 7:e1001302 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001302>
29. Vangalis V, Papaioannou IA, Markakis EA, Knop M, Typas MA. 2021. The NADPH oxidase A of *Verticillium dahliae* is essential for pathogenicity, normal development,

- and stress tolerance, and it interacts with Yap1 to regulate redox homeostasis. *J. Fungi* 7:740. <https://doi.org/10.3390/jof7090740>
30. Lin C-H, Yang SL, Chung KR. 2009. The YAP1 homolog-mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:942-952. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0942>
 31. Wang G, Chen B, Zhang X, Du G, Han G, Liu J, Peng Y. 2024. The basic leucine zipper domain (bZIP) transcription factor *BbYap1* promotes evasion of host humoral immunity and regulates lipid homeostasis contributing to fungal virulence in *Beauveria*. *mSphere* 9:e00351-24. <https://doi.org/10.1128/msphere.00351-24>
 32. So Y, Maeng S, Yang D, Kim H, Lee K, Yu S, Tenor JL, Giri VK, Toffaletti DL, Arras S, Fraser JA, Perfect JR, Bahn Y. 2019. Regulatory mechanism of the atypical AP-1-like transcription factor Yap1 in *Cryptococcus neoformans*. *mSphere* 4:10.1128/msphere.00785-19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00785-19>
 33. Suga H, Hyakumachi M. 2004. Genomics of phytopathogenic *Fusarium*, *Applied Mycology and Biotechnology* 4:161-189. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(04\)80009-1](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(04)80009-1)
 34. da Silva Santos AC, Diniz AG, Tiago PV, de Oliveira NT. 2020. Entomopathogenic *Fusarium* species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. *Fungal Biology Reviews* 34:41-57 <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.12.002>
 35. Douglas AP, Chen SCA, Slavin MA. 2016. Emerging infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi. *Clinical Microbiology and Infection* 22:670-680 <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.011>
 36. Thrane U. 2014. Encyclopedia of Food Microbiology. *Fusarium* pp 76-81 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00141-5>
 37. Kamle M, Mahato DK, Devi S, Lee KE, Kang SG, Kumar P. 2019. Fumonizins: impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins* 11:328 <https://doi.org/10.3390/toxins11060328>
 38. Qu L, Wang L, Ji H, Fang Y, Lei P, Zhang X, Jin L, Sun D, Dong H. 2022. Toxic mechanism and biological detoxification of fumonizins. *Toxins* 14:182 <https://doi.org/10.3390/toxins14030182>
 39. Kim SH, Singh MP, Sharma C, Kang SC. 2018. Fumonizin B1 actuates oxidative stress-associated colonic damage via apoptosis and autophagy activation in murine model.

- Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 32:e22161
<https://doi.org/10.1002/jbt.22161>
40. Marroquín-Cardona AG, Johnson NM, Phillips TD, Hayes AW. 2014. Mycotoxins in a changing global environment – A review. *Food and Chemical Toxicology* 69:220-230
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>
 41. Deepa N, Sreenivasa MY. 2017. *Fusarium verticillioides*, a globally important pathogen of agriculture and livestock: a review. *Journal of Veterinary Medicine and Research* 4:1084
 42. Blacutt AA, Gold SE, Voss KA, Gao M, Glenn AE. 2018. *Fusarium verticillioides*: advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. *Phytopathology* 108:312-316
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW>
 43. Enomoto J, Matharu Z, Revzin A. 2013. *Methods in Enzymology*, Volume 526, Chapter Six-Electrochemical biosensors for on-chip detection of oxidative stress from cells. pp 107-121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405883-5.00006-5>
 44. Kanupriya, Prasad D, Ram MS, Sawhney RC, Ilavazhagan G, Banerjee PK. 2007. Mechanism of *tert*-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicology in Vitro* 21:846-854 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.02.007>
 45. Király A, Hámori Cs, Gyémánt Gy, Kövér KE, Pócsi I, Leiter É. 2020. Characterization of *gfdB*, putatively encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology* 121:352-360 <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.011>
 46. Górka-Nieć W, Perlińska-Lenart U, Zembek P, Palamarczyk G, Kruszewska JS. 2010. Influence of sorbitol on protein production and glycosylation and cell wall formation in *Trichoderma reesei*. *Fungal Biology* 114:855-862
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.07.010>
 47. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *Experimentia Supplementum* 101:133-164.
https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
 48. Van Long NN, Rigalma K, Coroller L, Dadure R, Debaets S, Mounier J, Vasseur V. 2017. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology* 68:7-15 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>