

37. OTDK Biológia Szekció

A velvet regulátorok szerepének vizsgálata bazídiumos
gombák termőtestképzésében

Készítette: Szafián Dorottya Anna

Biológia BSc III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem - HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Dr. Virágh Máté

Dr. Nagy László

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
1.1 Komplex soksejtűség a gombákban	5
1.2. A termőtestképzés menete bazídiumos gombákban	5
1.3. A <i>Coprinopsis cinerea</i> termőtestképzése.....	5
1.4. A termőtestképzést meghatározó környezeti tényezők	6
1.5. A termőtestképzés genetikai háttere	7
1.6. A <i>velvet</i> fehérjék.....	9
1.7. A <i>velvet</i> fehérjék osztályozása	11
1.8. A <i>velvet</i> fehérjék szerepe a bazídiumos gombákban.....	11
2. Célkitűzés.....	13
3. Anyagok és Módszerek	14
3.1. Felhasznált mikroorganizmusok	14
3.2. Felhasznált tápközegek és oldatok.....	14
3.2.1. Mikrobiológiai tápközegek és tápoldatok	14
3.2.2. Felhasznált oldatok.....	14
3.3. Módszerek.....	15
3.3.1. CRISPR/Cas9 alapú génkiütés	15
3.4. A <i>vel3A</i> génre nézve mutáns <i>C. cinerea</i> törzsek fenotipizálása	20
3.5. Bioinformatikai módszerek.....	20
4. Eredmények és diszkusszió	22
4.1. A <i>velvet</i> fehérjecsalád filogenetikai analízise Ascomycota és Basidiomycota gombákban	22
4.2. A <i>C. cinerea velvet</i> fehérjék expressziós adatainak analízise	23
4.3. A <i>vel3A</i> gén deléciója <i>C. cinerea</i> -ban.....	26
4.3.1. A <i>C. cinerea vel3A</i> gén deléciós kazettájának összeszerelése.....	26
A <i>vel3A</i> deléciója <i>C. cinerea</i> -ban.....	27
4.3.2. A <i>Ccvel3A</i> deléciójának hatása az oídiumképzésre.....	27
4.3.3. A <i>Ccvel3A</i> deléciójának hatása a vegetatív növekedésre.....	28
4.3.4. A <i>Ccvel3A</i> deléciójának hatása a termőtestképzésre	29
4.3.5. A <i>Vel3A</i> hatása a termőtestkezdemény irányultságára	30
5. Tartalmi összefoglaló	31
6. Köszönetnyilvánítás	32
7. Irodalomjegyzék	33

Rövidítések jegyzéke

bp – bázispár

Cas - CRISPR asszociált fehérje (CCRISPR associated protein)

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

crRNS - CRISPR RNS

DNS - dezoxiribonukleinsav

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

LB - Luria-Bertani tápleves/táptalaj

PABA - para-amino-benzoésav (*para-amino-benzoicacid*)

PCR - polimeráz láncreakció (*Polymerase Chain Reaction*)

PEG - polietilén-glikol

RNP - ribonukleoprotein

RNS – ribonukleinsav

VT - vad típusú törzs

WC – *white collar*

YMG –élesztőkivonat-maltóz-glükóz táptalaj/tápleves (*yeast-malt-glucose*)

1. Bevezetés

1.1 Komplex soksejtűség a gombákban

Az evolúció egyik legjelentősebb eseménye a komplex soksejtűség megjelenése. Andrew Knoll megfogalmazása szerint azokat az élőlényeket nevezzük komplex soksejtűnek, melyek teste 3 dimenziós, ahol nem minden sejt érintkezik közvetlenül a külvilággal, genetikailag meghatározott fejlődési programmal rendelkeznek, és kialakult a sejtek közötti kommunikáció (Knoll, 2011). Összesen öt csoportban, a barna- és vörösmoszatok, növények, állatok és gombák között találunk komplex soksejtűeket. Ellentétben a többi csoporttal, gombák esetén nem csupán egyszer, hanem 8-11 alkalommal jelent meg egymástól függetlenül a komplex soksejtűség (Nagy és mtsai., 2018). Gombák esetében, ellentétben a növényekkel vagy állatokkal, gyakran egy egyed életciklusának különböző szakaszaiban figyelhetünk meg egyszerű és komplex soksejtűséget (Nagy és mtsai., 2018). A gombák komplex soksejtű struktúrái az esetek jelentős részében a szaporodásért felelősek és jellemzően az ivaros szaporodásban szerepet játszó képletek az legösszetettebbek.

1.2. A termőtestképzés menete bazídiumos gombákban

A gombák ivaros szaporodási ciklusuk során változatos méretű és morfológiájú szaporítóképleteket hoznak létre, ezek az úgynevezett termőtestek, melyek elsődleges célja a meiospórák terjesztésének segítése. A legkomplexebb termőtesttípusok a Basidiomycota törzs tagjainál figyelhetők meg. A legegyszerűbb termőtesttípus a reszupinátus, melynek legegyszerűbb változatai egy többé-kevésbé egybefüggő bazídiumrétegből állnak (Virágh és mtsai., 2022). A legkomplexebbnek tekinthető termőtestek az ún. “*pileo-stipitate*” típusúak, melyek már számos differenciált szövettípussal rendelkeznek, esetükben tönk, kalap és lemezek figyelhetők meg (Moore 1995). Ezek a szövetek egy előre determinált genetikai program révén jönnek létre, amelynek teljesülését belső és külső tényezők egyaránt befolyásolják. Az egyes hatásokra való reakciók pontos genetikai szabályozását számos kutatás vizsgálta, azonban még nagyon sok a feltáratlan mechanizmus, melyek megértése nem csak a komplex soksejtűség kialakulásának megértését segítené elő, hanem a gombák ipari jelentősége miatt gazdasági szempontból is fontos lenne (Royse és mtsai., 2017).

1.3. A *Coprinopsis cinerea* termőtestképzése

A trágyatintagomba (*Coprinopsis cinerea*) az egyik fő komplex soksejtű bazídiumos gomba modell, mely számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. A faj komplex, *pileo-stipitate* típusú termőtestet képez, amely akár több, mint 30 morfológiailag elkülöníthető sejttypusból áll,

életciklusa rövid időn belül lezajlik és jól szinkronizálható a termőtestképzés ideje (Kües, 2000). Fejlődése, a környezeti tényezők hatása részletesen ismert, illetve több törzs teljes genomszekvenciája is rendelkezésre áll. Számos, fejlődésben vagy szaporodásban mutáns *C. cinerea* törzset izoláltak, melyek egyrészt a szabályozás megismeréséhez vihetnek közelebb, másrészt modellként szolgálnak különböző kísérletekben (Pukkila, 2011).

Az eltérő, egymással kompatibilis párosodási típusba tartozó, egyszerű soksejtű vegetatív micéliumok találkozásával és fúziójával indul az ivaros ciklus. A Basidiomycota gombákra jellemző, hogy a hifák fúzióját nem követi kariogámia, a két szülői sejtmag szinkronizáltan osztódik létrehozva a dikariotikus hifát (Coelho és mtsai., 2017). A párosodás során kialakuló dikariotikus hifából komplex soksejtű növekedésre váltás, azaz a termőtestképzés az elsődleges hifacsomók kialakulásával kezdődik, melyek egymás irányába növekvő, sűrűn elágazó légmicéliumok laza szövédékből alakulnak ki. A szöveték sűrűsödésével (és a sejtek között egy mucinózus anyag megjelenésével) már másodlagos hifacsomók figyelhetők meg. Ha a körülmények megfelelőek, elkezdődik a primordiumok kialakulása, melyeket a védelmet adó vélum vesz körül, és belsejükben már differenciálódtak a különböző struktúrák, pl. a tönk és a kalap sejtszelei. Kialakulnak a lemezek és a himénium. A himéniumon találhatóak a spóratermelő sejtek, a bazídiumok. Ezekben megy végbe a kariogámia és a meiózis. A kariogámia és a meiózis végén kezdődik a termőtestek érése, mely nem új sejtek képződésével nő meg hirtelen, hanem a már meglévő sejtek turgor-vezérelt „felfúvódása” révén. Ezzel párhuzamosan kialakulnak a bazídiospórák. Az *C. cinerea* érett termőtestének a kalapja a spórák elengedésekor autolízisen megy keresztül, ezzel is segítve a spórák kedvező helyre jutását (Kües, 2000).

1.4. A termőtestképzést meghatározó környezeti tényezők

A termőtestképzés komplex szabályozás alatt áll, melyben számos környezeti tényező szerepet játszik. *C. cinerea*-ban a termőtestképzés fő kiváltói közé tartozik a talaj tápanyagtartalmának csökkenése, azaz az éhezés, illetve a fény jelenléte. A fény, főként a kék, illetve UV-közelbi tartomány (320-520 nm hullámhossz) elengedhetetlen a hifacsomók kialakulásához, a világos és sötét periódusok váltakozása pedig a termőtest megfelelő fejlődéséhez (Kües, 2000). Sötétben jellemző, hogy a termőtest alapi része, a *nodulus* erősen megnyúlik, felfelé, a fény felé törekszik, ezzel kiemelve a tönk- és kalapkezdeményt a sötétből. Ezek a képletek az úgynevezett etiolált tönkű termőtestek (angol nyelvű irodalomban *dark stipe*). Ez a megnyúlt fenotípus azonban nem csupán a fény hiányában alakul ki, több, a

termőtest- és spóráképzéshez kedvezőtlen feltétel (például túl magas CO₂ koncentráció) esetén szintén megfigyelhető a *nodulus* megnyúlása (Kües, 2000).

A fény nem csak az ivaros, hanem az ivartalan szaporodásban is kiemelt jelentőségű. A *C. cinerea* ivaros szaporítóképletei az oídiumok, melyek oídifórokon, illetve azok fragmentálódásával alakulnak ki (Polak és mtsai., 2001). A különböző, párosodási típust meghatározó gének aktivitása hatással lehet az oídiumképzésre is, ezáltal fajon belül is változhat a törzsek fényigénye az ivartalan szaporodási ciklusba lépéshez (Kües, 2000).

1.5. A termőtestképzés genetikai háttere

A termőtestek kialakulását szabályozó külső tényezők kiváltotta szignálok nem közvetlenül befolyásolják a szükséges fehérjék termelődését, hanem transzkripciós faktorokon keresztül.

A termőtestképzést befolyásoló külső tényezők hatásáról széleskörű tudás áll rendelkezésünkre, azonban a mögöttes genetikai szabályozásról az ismereteink még hiányosak. Meglévő információink két fő forrásból származnak, egyrészt genomikai és transzkriptomikai vizsgálatok adataiból, másrészt kísérletes eredményekből (Virágh és mtsai., 2022). Transzkriptomikai vizsgálatok jelentős mértékben segítettek megismerni a termőtestképzés során eltérő expressziót mutató géneket. *C. cinerea*-ban 7475 fejlődéshez köthető gént találtak, melyek közül 170 rendelkezik DNS-kötő motívummal, melyek feltételezhetően transzkripciós faktorok (Krizsán és mtsai., 2019). A transzkripciós faktorok és az általuk szabályozott folyamatok megismerésével közelebb kerülhetünk nem csak a termőtestképzés megértéséhez, de genetikai ismereteink gyakorlati alkalmazásához is.

Számos kísérletes munka vizsgálta a fejlődéshez köthető gének szerepét *C. cinerea*-ban. Leggyakrabban UV vagy egyéb DNS-károsító hatás révén spontán mutációkat hoznak létre, majd a fenotíusból következtetnek a gének szerepére. A fejlődési folyamat megakadásának ideje (a mutáció által érintett fejlődési stádium), illetve a fenotípus alapján csoportosíthatjuk a mutációkat (Muraguchi és mtsai., 1999).

Ezen felül, a genomszekvenciák elérhetősége, valamint a molekuláris biológiai eszköztár növekedése (pl.: transzformációs rendszer kidolgozása) (Binner és mtsai., 1987), és a CRISPR/Cas9 rendszer alkalmazása (Sugano és mtsai., 2017, Pareek és mtsai., 2022) jelentős mértékben hozzájárult a reverz genetikai munkák elterjedéséhez is. Például egy, a szövettípusnak nem megfelelő morfológiájú sejteket mutató törzsből azonosították a *cdc3* gént, az általa kódolt fehérje a tönkre és vélumra jellemző, hosszúkas sejtalak kialakításáért felel. A

fehérjét a tönk megnyúlása előtt rendezetlenül, a megnyúlás folyamán hosszú, kortikális filamentumokba rendeződve találjuk (Shioya és mtsai., 2013).

Egy másik, a kalap fejlődéséhez köthető gén az *ich1*, mely a kalap kialakulásában játszik szerepet, és két jellegzetes doménnel is rendelkezik: egy metiltranszferáz, és egy DNS-kötő doménnel, de pontosabb szerepe egyelőre feltáratlan (Muraguchi és mtsai., 1998).

A lemezek fejlődésében játszanak szerepet a *cag1* és *tupA* gének (Mashuda és mtsai., 2016), amelyek az élesztőből már ismert, szaporodásban szerepet játszó *tup1* génnek (Todd és mtsai., 2003) homológja (Tzamarias és mtsai., 1994) illetve paralógja, és valószínűleg egy komplex, konzervált szabályozási hálózat tagjai (Virágh és mtsai., 2022).

Ismerünk a sejtfal lebontásának és újraépítésének szabályozásában szerepet játszó, ezáltal mind a kalap kinyílásában, mind az autolízisben szerepet játszó géneket, mint az *expl*, illetve az *exp2*, melyek kölcsönösen szabályozzák egymás expresszióját (Sakamoto és mtsai., 2024). Ezen gének hatását látjuk többek között akkor is, amikor a leszedett gomba az asztalon „megöregszik” (Muraguchi és mtsai., 2008; Sakamoto és mtsai., 2009).

Mint azt az előző fejezetben is tárgyaltuk, a termőtest megfelelő fejlődéséhez a fény kulcsfontosságú. Az egyik, fényérzékelésben szerepet játszó gén a *dst1* (Terashima és mtsai., 2005), mely a *Neurospora crassa*-ból már ismert *wc-1* gén homológja. A WC-1 egy kék fényre érzékeny fényreceptor, amely a WC-2-vel együtt alkotja a WC (*white collar*) komplexet, és fényválaszhoz köthető fehérjék expresszióját befolyásolja (Corrochano és mtsai., 2007). A *dst2*, amely hiányában a $\Delta dst1$ -hez hasonlóan etiolált tönkű fenotípust látunk, egy eddig pontosan nem ismert szerepű FAD-kötő doménnel rendelkező, fényérzékelésben szerepet játszó fehérjét kódoló gén (Kuratani és mtsai., 2010). A *N. crassa wc-2*-nek szintén ismert a homológja *C. cinerea*-ban, *wc2* néven, amely deléciója szintén etiolált tönköt eredményez, megerősítve ezzel, hogy a WC komplex a *N. crassa*-hoz hasonlóan a fényérzékelésben játszik szerepet és kulcsfontosságú szereppel bír a termőtestképzés során. (Nakazawa és mtsai., 2011).

A fotomorfogenezisben fontos szerepe van az *nsdD2* GATA transzkripciós faktornak is, mely a *cfs1*, *cfs2*, *cgl1*, és *hyd1* expressziójának szabályozásán keresztül szabályozza az elsődleges hifacsomó primordiummá történő differenciálódását (Liu C. és mtsai., 2022).

A fényfüggő folyamatok, például a szaporodás irányításában a WC komplex mellett az Ascomycota törzsben az úgynevezett *velvet* transzkripciós faktorok is fontos szerepet játszanak (Bayram és mtsai., 2008). A *velvet* fehérjéről ismert, hogy képesek represszálni a szexuális szaporítóképletek differenciációját és feltételezhető róluk, hogy a környezeti szignálok és a szexuális ciklus szinkronizálásában játszanak szerepet (Bayram és mtsai., 2008). A *velvet*

fehérjék Basidiomycota gombákban is jelen vannak és egyes vizsgálatok szerint szerepük lehet a termőtestképzés szabályozásában is (Künzler és mtsai., 2014; Krizsán és mtsai., 2019).

1.6. A *velvet* fehérjék

Ascomycota gombákban már régóta ismertek a *velvet* fehérjék (Käfer, 1965), melyek nemcsak a fényfüggő ivaros és ivartalan szaporodás, hanem a másodlagos metabolitok termelésének szabályozásában is jelentős transzkripciós faktorok.

A *velvet* transzkripciós faktor család tagjait a DNS-kötő doménjük alapján ismerhetjük fel, amely erős konzerváltságot mutat a különböző, filogenetikailag távoli csoportok között is. A domén három jellegzetes motívumból áll, az első, N-terminálishoz legközelebb eső körülbelül 33 aminosav hosszú, és egy nagyobb, változó hosszúságú, nem konzervált szakasz választja el a második, 44 aminosav hosszú konzervált motívumtól. A harmadik motívum a másodikhoz közel helyezkedik el, és 36 aminosav hosszú. A domén fehérjén belüli elhelyezkedése nem egységes, előfordulhat a C és az N terminálishoz közelebb is, ez attól is függ, mely *velvet* csoport tagja (Chen és mtsai., 2024).

Egyes *velvet* fehérjéken a DNS-kötő domén mellett is számos változatos funkcionális domén található, emellett egy részük sejtmagi lokalizációs szignált is hordoz (*nuclear localisation signal*, NLS) (Chen és mtsai., 2024).

Térbeli szerkezetét tekintve a *velvet* domén az NF- κ B Rel homológia doménjével (RHD) nagy hasonlóságot mutató DNS-kötő motívum. A hasonlóság meglepő, mert az aminosavsorrend mindössze 13,7%-ban fed át (Ahmed és mtsai., 2013), ami arra enged következtetni, hogy nem filogenetikai kapcsolat, hanem konvergens evolúció eredménye. Az NF- κ B egy emlősből ismert transzkripciós faktor, amely folyamatos expressziót mutat a sejtekben, és a veleszületett és adaptív immunválaszban egyaránt szerepet vállal (Liu és mtsai., 2017).

A legtöbb kutatás az Ascomycota törzsbe tartozó fajokban, elsősorban *Aspergillus nidulans*-ban vizsgálta a *velvet* doménnel rendelkező transzkripciós faktorokat. A törzs képviselőiben néhány élesztő kivételével (Chen és mtsai., 2024) négy *velvet* doménnel rendelkező fehérjét ismerünk, *A. nidulans*-ban pl. VeA, VelB, VelC és VosA fehérjéket.

Ezen eredmények alapján a *veA* gén az ivaros szaporodás indukciójában, illetve az ivartalan szaporodás represszáálásában játszik szerepet, hiányában kedvező feltételek mellett is elmarad az ivaros termőtestképzés (Kim, 2002). A szaporodás mellett a másodlagos metabolitok, mint a penicillin és a sterigmatocisztin termelésére is serkentő hatással van. A *velB* gént érintő mutációt hordozó törzsek fenotípusa részben megegyezik a *veA* mutánsokkal. A gén

deléciója a szexuális termőtestek hiányát és csökkent másodlagos metabolit termelést eredményez, azonban az aszexuális szaporodásra is gátló hatással van. A gén hiányában csökken a konídiumtermelés, romlik a konídiumok életképessége. Túltermeltetés esetén a kleisztotéciumok száma nem mutat változást, míg az aszexuális spóratermelés megkétszereződik (Park és mtsai., 2012). A *velC* deléciója, illetve túltermeltetése *veA* mutánsához hasonló fenotípust eredményez, azonban itt nem tűnnek el teljesen az ivaros szaporítóképletek a gén hiányában, illetve a túltermeltetés hatására nem változik a konídiumszám (Park és mtsai., 2014). A *velC* valószínűleg nem vesz részt a másodlagos metabolitok termelésének szabályozásában. A *vosA* hiányában a konídiumok életképessége romlik, csökken a trehalóztartalmuk, érzékenyebbé válnak különféle stresszhatásokra, megnövekszik a bennük felhalmozott β -glükán mennyisége. Az ivartalanszaporodás ellenőrzés nélkül aktiválódik. Hasonlóképpen az ivaros struktúrák kialakulása is sérül, csökken az askospórák életképessége, trehalóztermelés hiányában a hő- és oxidatív stresszt kevésbé jól tűrik a spórák. A sterigmatocisztin-termelés enyhén emelkedik. A gén túltermeltetése gátolja az ivartalan spóráképzést (Kim és mtsai., 2020).

A legtöbb vizsgálat alapján a *velvet* transzkripció faktorok általában nem egyedül, hanem homo- és heterodimerek, illetve többtagú komplexek formájában fejtik ki hatásukat. Komplexek nem csak a *velvet* család tagjaiból, hanem más, *velvet* doménnel nem rendelkező fehérjék bevonásával is kialakulhatnak. Ilyen például az ivaros szaporodásra és másodlagos metabolit termelésre is ható VeA-VelB-LaeA komplex, amelyben a LaeA nem *velvet* fehérje (Bayram és mtsai., 2008).

Akárcsak a Basidiomycota gombák esetén, *Aspergillus* fajokban is ismert a szaporodás nagyfokú fényfüggése. A nemzetség fajai sötétben ivaros termőtestet képeznek, míg fényben az ivartalan szaporodás jellemző, megvilágítás hatására a VeA expressziója erősen lecsökken. A fény az egyes *velvet* fehérjék sejten belüli helyzetére is hatással van, például fényben a VelB főként a citoplazmában található, míg sötétben a sejtmagba transzportálódik, ez a folyamat a VeA segítségével nem megy végbe. Sötétben a magban kialakul a VeA-VelB-LaeA komplex, mely egyik fő szabályozó eleme az ivaros szaporodásnak, illetve a másodlagos metabolitok termelését is segíti. Fényben, mivel a VeA kisebb mennyiségben van jelen, a VelB sejtmagi transzportja csökken, ellehetetlenítve a megfelelő mennyiségű *velvet*-komplex kialakulását, ami által a másodlagos metabolitok termelése és az ivaros szaporodás is gátolt (Bayram és mtsai., 2008).

1.7. A *velvet* fehérjék osztályozása

A *velvet* motívummal rendelkező fehérjéket az Ascomycota törzsből ismerjük, azonban néhány kivételtől eltekintve alacsonyabb és magasabb rendű gombák szinte minden csoportjában megtalálhatók, és erős konzerváltságot mutatnak. A konzerváltságot alátámasztja, hogy a *veA* deléciót hordozó törzs fenotípusa sok esetben menekíthető más fajból származó *veA* gén bejuttatásával (Wiemann és mtsai., 2010).

Számuk széles határok között változik, egyes genomokban csak néhány, másokban akár 26 *velvet* gén is található. Mind a fehérjék mérete, mind a *velvet* DNS-kötő domén hossza szignifikáns eltérést mutat az egyes taxonokon belül, és a taxonok között is (Chen és mtsai., 2024).

Chen és mtsai. (2024) filogenetikai elemzéseik alapján két ősi *velvet* kládot különítenek el, ezek a VelB és VosA klád. Széleskörűen vizsgálták a *velvet* géneket a gombavilágban, 21 jellegzetesen elkülönülő csoportra osztották fel őket szerkezet, illetve előfordulás szerint. Eredményeik alapján bazídiumos gombákból teljesen hiányzik az Ascomycota gombákból ismert VeA, VelC és VosA klád, de találunk három más, csak itt jellemző *velvet* típust (Bas-velvet1, Bas-velvet2, Bas-velvet3 kládok). A négy nagyobb kládon belül is eltérően vannak jelen a különböző altörzsekbe tartozó fajok, például a Bas-velvet3 klád nagy többségét Agaricomycotina fajok *velvet* fehérjéi adják (Chen és mtsai., 2024).

1.8. A *velvet* fehérjék szerepe a bazídiumos gombákban

Ellentétben a tömlősgombákkal, a bazídiumos gombák *velvet* faktorainak szerepéről eddig kevés információ áll a rendelkezésünkre, és ezen adatok főként a gének patogenitásban betöltött szerepére vonatkoznak (Karakatt és mtsai., 2013, Liu H. és mtsai., 2022). Tudjuk, hogy a Basidiomycota-specifikus *velvet* gének sokszor teljesen más kládokba térképeződnek, mint a már ismert szerepű Ascomycota *velvetek*, az azonban ismert (főként RNA-seq vizsgálatok alapján), hogy a Basidiomycota gombák *velvet* faktorai is a fejlődéshez kapcsolhatóak és konzervált expressziós mintázatot mutatnak (Virágh és mtsai., 2022).

Az első bazídiumos faj, amelyben vizsgálták a *velvet* transzkripciós faktorok szerepét, az Ustilagomycotina altörzsbe tartozó növénypatogén *Ustilago maydis* volt. A fajban 3 ilyen gént azonosítottak, melyek közül kettő bizonyítottan fontos a virulenciában (Karakatt és mtsai., 2013). Karakatt és mtsai. (2013) szerint az *umv1* az Ascomycota *vosA* ortológja, hiányában fiatal kukoricanövényen az üszöggépzés nem történik meg, és a mutáns képtelen a teliospóráképzésre, így azt mondhatjuk, a szexuális szaporodásban bekövetkező gátlás okozza az erősen csökkent virulenciát. Az *umv2* gén az Ascomycota VelB fehérjét kódoló gén ortológja,

kiütése kevésbé drasztikus fenotípusváltozást eredményez. A mutánsok kevesebb üszögöt képeztek kukorica csíranövényen, és a vad típushoz képest később képeztek teliospórákat, azt mondhatjuk, az ivaros szaporodás sebességének csökkenése okozta a virulencia csökkenését. Érdekes módon, felnőtt kukoricán a vad típussal megegyező ütemben lezajlik a szexuális ciklus és a fertőzés mindkét deléciós mutáns esetében, összhangban a különböző fejlődési stádiumú kukoricán, illetve a növény eltérő szervein növekvő *U. maydis* génkifejeződésében ismert különbségekkel. A harmadik azonosított gén, az *umv3* deléciója nem mutatott jellegzetes fenotípust, azonban mivel a filogenetikai vizsgálatok alapján paralógja az *umv2*-nek, valószínűsíthető, hogy funkciójuk legalább részben átfed (Karakatt és mtsai., 2013).

Cryptococcus deneoformans-ban, mely egy jelentős tüdőgyulladást kiváltó humánpatogén faj, az *Aspergillus nidulans velB* génjéhez nagyon hasonló *cva1* fertőzésben betöltött szerepét vizsgálták, mely folyamatnak fontos része a szexuális szaporodás és filamentáció. A fajban a filamentációt két inger is kiválthatja, a párosodási szignál, vagy a glükózamin jelenléte, melyek egymástól függetlenül serkentik a folyamatot. A *cva1* gén delécióját hordozó mutáns csupán a párosodási jelre lesz érzéketlen, a gén a szexuális szaporodásra gyakorol hatást, nem a filamentációban van szerepe (Liu H. és mtsai., 2022).

Láthattuk, hogy a *velvet* transzkripciós faktorok feladata bazídiumos gombákban is a szaporodáshoz kapcsolható, azonban egyelőre nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre komplex termőtestet képző fajokban betöltött szerepükről.

2. Célkitűzés

A szakirodalmi és elérhető expressziós adatok alapján feltételezzük, hogy a *velvet* fehérjének szerepe van a bazídiumos gombák termőtestképzésének szabályozásában is. Jelen munka során azt a célt tűztük ki, hogy megismerjük a *velvet* fehérjék termőtestképzésre, valamint aszexuális spóráképzésre gyakorolt hatását egy termőtestképző modell gombában, a *Coprinopsis cinerea*-ban. Mindezek alapján a következő konkrét célokat fogalmaztuk meg:

1. *velvet* fehérjék azonosítása bazídiumos gombákban, különös tekintettel a termőtestképző fajokra.
2. A *C. cinerea velvet* fehérjék expressziós mintázatának vizsgálata publikus transzkriptomikai adatok használatával.
3. A *velvet* fehérjékre nézve deléciós törzsek létrehozása *C. cinerea*-ban *in vitro* összeszerelt ribonukleoprotein komplex alapú CRISPR/Cas9 rendszer segítségével.
4. A *velvet* fehérjékre nézve deléciós *C. cinerea* törzsek fenotipizálása, különös tekintettel a termőtestképzés folyamatára.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Felhasznált mikroorganizmusok

Felhasznált baktériumtörzsek:

Escherichia coli NEB5 α (New England Biolabs, USA)

Felhasznált gomba törzsek:

Coprinopsis cinerea AmutBmut^{pab1-1} #326

3.2. Felhasznált tápközegek és oldatok

3.2.1. Mikrobiológiai tápközegek és tápoldatok

Luria-Bertani tápleves/táptalaj (LB)

10 g/l tripton, 2 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, táptalaj esetében 20 g/l agar, steril desztillált víz

Élesztőkivonat-maltóz-glükóz táptalaj/tápleves (YMG):

4 g/l élesztőkivonat, 10 g/l maláta-kivonat, 4 g/l glükóz, táptalaj esetében 10 g/l agar, steril desztillált víz

Csökkentett glükóztartalmú élesztőkivonat-maltóz-glükóz táptalaj (YMG1/2):

4 g/l élesztőkivonat, 10 g/l maláta-kivonat, 2 g/l glükóz, 10 g/l agar, steril desztillált víz

Regenerációs táptalaj:

172 g/l szacharóz 5 g/l keményítő, 2 g/l L-aszparagin, 10 g/l agar, 4 g/l glükóz, 25 ml/l A oldat, 1 ml/l B oldat, 10 ml/l 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 x 7H₂O

Minimál táptalaj:

2 g/l L-aszparagin, 10 g/l agar, 10 g/l glükóz, 25 ml/l A oldat, 1 ml/l B oldat, 10 ml/l C oldat

3.2.2. Felhasznált oldatok

3.2.2.1. Baktérium transzformálás során alkalmazott oldatok:

5× Gibson Mix

NEBuilder HiFi DNA Assembly Molecular Cloning kit (New England Biolabs, USA), 5x Master Mix

SOC oldat

3,603 g/l dextróz, 0,186 g/l KCl, 4,8 g/l MgSO₄, 20 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat

Lízispufer baktérium kolónia PCR-hez

0,5 ml 1 M Tris, 100 µl 0,5 M EDTA, 25 µl 2 %-os TritonX-100, 49,4 ml desztillált víz

3.2.2.2. Gomba transzformálás során alkalmazott oldatok

Kétszeres töménységű protoplasztáló oldat:

13,7 ml 2M KCl oldat, 6,4 ml 1,1M KOH oldat, 480 mg citromsav, 3,2 g VinoTaste Pro enzim (Novogene, USA), desztillált vízzel 25 ml-re kiegészítve

Protoplasztáló oldat

YMG tápfolyadék és a kétszeres töménységű protoplasztáló oldat 1:1 arányú keveréke, sterilre szűrve

STC pufer

PEG/CaCl₂: 40 ml víz, 10 g PEG-4000, 400 µl 1 M Tris-HCl oldat (pH: 7,5), 2 ml 1M CaCl₂ oldat

Duplex pufer

IDT Duplex pufer (*IDTDNA*, Németország)

Cas9 reakció pufer:

20 mM HEPES (pH: 7,5), 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT

3.3. Módszerek

3.3.1. CRISPR/Cas9 alapú génkiütés

3.3.1.1. A crRNS tervezése

A crRNS tervezése során a *sgRNAs9* (verzió: 3.0.5.) (Xie és mtsai., 2014) szoftvert használtuk. A szekvencia adatokat a JGI Mycocosm adatbázisból (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) töltöttük le.

3.1.1.2. Javítótemplát kazetta tervezése

A kazettatervezéshez a szekvencia adatokat a JGI Mycocosm adatbázisból (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) töltöttük le.

A javító templát kazettához az 1000 bp hosszúságú homológ karokat a gRNS hasítóhelytől 10-10 bp-ra *upstream* és *downstream* irányba terveztük. A kazetta *Gibson Assembly*-vel történő összeszereléséhez szükséges átfedő indítószekvenciákat a *SnapGene* szoftver (v4.3.11.) *Gibson Assembly* funkciójával határoztuk meg.

3.3.1.3. A javítótemplát kazetta elkészítése

A homológ karokat a *C. cinerea* AmutBmut^{pab1-1} #326 törzsének genomi DNS-éről, a vad típusú *C. cinerea pab1* gént a PMA412 plazmidról amplifikáltuk fel PCR segítségével. A reakcióhoz *Phusion Plus* DNS polimerázt (*Thermo Scientific*) használtunk.

A PCR reakcióelegy összetétele (50 µl-re):

- 10 µl 5x *Phusion Plus* puffer
- 0,5 µl *Phusion Plus* DNS polimeráz enzim
- 0,5 µM forward primer
- 0,5 µM reverz primer
- 1 µl 10 mM dNTP keverék
- 25 ng templát DNS
- nukleázmentes steril desztillált víz

Felhasznált primerek

- 355684_KO_F1F 5' aagcttgcacgcctgcaggtcgactGTCCCGCGTTCGTTTTCAAG 3'
- 355684_KO_F1R 5' TTCAGTTGCTTCGAACCGCTCGTCTGGCGGAA 3'
- 355684_KO_F2F 5'AGACGAGCGGTTCGAAGCAACTGAAGGAGCGT 3'
- 355684_KO_F2R 5' GGTGTTCCAATGATTCTTCTGGCATCTTTCCTCCGAC 3'
- 355684_KO_F3F 5' ATGCCAGAAGAATCATTGGAACACCCCAGACTG 3'
- 355684_KO_F3R 5' agctcggtacccggggatcctctagAGTTCGGGTGAAGATGTCTGAAGAC 3'
- 355684_check_fwd 5' ACGAAGTCCTTCTGATCGTTCTGT 3'
- 355684_check_rev 5' GTACAATGGAGCGGCAGATCG 3'

A reakciókörülmények a következők voltak:

- | | | |
|--------------------|-----------------------|-------------|
| 1. elődenaturáció: | 98 °C 5 perc | |
| 2. denaturáció: | 98 °C 15 másodperc | } 33 ciklus |
| 3. hibridizáció: | 60 °C 15 másodperc | |
| 4. elongáció: | 72 °C 30 másodperc/kb | |
| 5. utóelongáció: | 72 °C 5 perc | |

3.3.1.4. A PCR fragmentek tisztítása

A PCR-rel felszaporított fragmentek tisztítása *NucleoSpin Gel and PCR cleanup* (Macherey-Nagel, Németország) kittel, a gyártó utasításai alapján történt. A tisztított fragmenteket 20 µl vízben vettük fel, a koncentrációt *NanoDrop UV/Vis* spektrofotométer (Thermo Fisher, USA) segítségével ellenőriztük.

3.3.1.5. Gibson reakció

A javítótempláthoz szükséges fragmentek összeszerelését a *NEBuilder HiFi Gibson Assembly Kit* segítségével végeztük a gyártó utasításai alapján, 3:1 inszert:vektor arányokat alkalmazva.

3.3.1.6. Baktérium transzformáció

Az elkészült *Gibson* reakcióelegyből 5 µl-t adtunk a gyártó által biztosított NEB5α kompetens sejtekhez. Tíz percig jégen inkubáltuk, majd 30 másodpercig 42 °C-os hőszekvénnyel kezeltük ki, ezután 2 percre újra jégre helyeztük. Végül 950 µl szobahőmérsékletű SOC oldatban szuszpendáltuk fel a sejteket, egy órán át 37 °C-on rázattuk, és ampicillintartalmú (100 µg/ml) LB táptalajra szélesztettük. 37 °C-on, 16 órán át növesztettük a telepeket, majd ampicillintartalmú (100 µg/ml) LB talajra oltottuk át. Újabb 16 órás 37 °C-on történő inkubáció után a transzformálás sikerességét kolónia PCR-rel és szekvenálással ellenőriztük.

3.3.1.7. Baktérium kolónia PCR

A javítótemplát összeszerelődését kolónia PCR segítségével ellenőriztük. A baktériumtelepeket lízispufferben 5 perc alatt 95°C-on feltártuk, majd PCR reakcióval és gélelektroforézissel ellenőriztük a javítótemplát beépülését. A PCR-hoz *Phire* polimerázt használtunk (*Thermo Scientific*).

A PCR reakcióelegy összetétele (20 µl-re):

- 10 µl 2x Phire Hot Star II Master Mix
- 0,5 µM forward primer (355684_KO_F1F)
- 0,5 µM reverz primer (355684_KO_F3R)
- 25 ng templát DNS
- nukleázmentes steril desztillált víz

A reakciókörülmények a következők voltak:

- | | | | |
|--------------------|-----------------------|---|-----------|
| 1. elődenaturáció: | 98 °C 5 perc | } | 33 ciklus |
| 2. denaturáció: | 98 °C 15 másodperc | | |
| 3. hibridizáció: | 60 °C 15 másodperc | | |
| 4. elongáció: | 72 °C 30 másodperc/kb | | |
| 5. utóelongáció: | 72 °C 5 perc | | |

Szekvenáláshoz a kolónia PCR alapján megfelelő vektort tartalmazó baktériumsejteket 3 ml ampicillintartalmú (100 µg/ml) LB tápfolyadékba oltottuk, majd 37 °C-on, 180 rpm-en rázatva 16 órán neveltük. A plazmidkivonáshoz a *Mini Plus Plasmid DNA Extraction Kit*-et (Viogene, Tajvan) használtuk a gyártó utasításait követve, a szekvenálást a Microsynth cég (Németország) végezte.

3.3.1.9 A DNS javítótemplát kazettát tartalmazó plazmid nagy mennyiségben történő tisztítása

A szekvenálással ellenőrzött plazmidot tartalmazó sejteket 200 ml ampicillintartalmú (100 µg/ml) LB tápfolyadékban 37 °C-on, 180 rpm-en történő rázás mellett 16 óra alatt felszaporítottuk, a plazmidkivonáshoz a *NucleoBond Xtra Midi Plus kit*-et (Macherey-Nagel, Németország) használtuk a gyártó utasításait követve.

3.3.1.10. RNP komplex összeállítása

1,2 µl crRNS-t, 1,2 µl tracrRNS-sel 9,6 µl Duplex pufferhez adtunk, az elegyet 5 percen át 95 °C-on inkubáltuk, majd hagytuk szobahőmérsékleten lehűlni. Ezután 0,5 µg-nyi tisztított Cas9 enzimet (IDTDNA, Németország), 1,5 µl Cas9 reakció puffert és 0,5 µl Duplex puffert (IDT) adtunk hozzá, 15 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd jégen lehűtöttük.

3.3.1.11. *C. cinerea* protoplasztálás

A protoplasztokat frissen növesztett micéliumból képeztettük. Ehhez celofánnal lefedett YMG táptalajt tartalmazó csészékre sokcsatornás pipetta segítségével pontokba oltottuk le a *C. cinerea*-t 10^8 sejt/ml oídiumszuszpenzióból, 16 órán át 37 °C-on sötétben neveltük a kolóniákat, majd steril csipesszel lekapartuk és protoplasztáló oldatban szuszpendáltuk fel. Ezt követően 3 órán keresztül 37 °C-on, 80 rpm-en ráztuk. A protoplasztokat 40 µm pórusméretű sejtszűrőn választottuk el (Falcon® 40 µm Cell Strainer, Corning) a megmaradt micéliumtöredékektől, majd centrifugálással gyűjtöttük össze. A protoplasztokat STC pufferben szuszpendáltuk fel, a koncentrációt 10^8 db/ml protoplasztra állítottuk be és 100 µl/reakció térfogatban alkalmaztuk.

3.3.1.12. *C. cinerea* protoplasztok transzformálása

100 µl 10^8 sejt/ml-es protoplaszt-suszpenzióhoz 15 µl RNP-komplexet, 1 µg javítótemplátot, és 25 µl PEG/CaCl₂ oldatot adtunk. Az elegyet 30 percig jégen inkubáltuk. Ezután 500 µl szobahőmérsékletű PEG/CaCl₂ oldatot adtunk hozzá, 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 1,5 ml STC puffert mértünk hozzá. Az elegyet csökkentett agartartalmú regenerációs táptalajhoz kevertük, majd regenerációs szelektív táptalajt tartalmazó csészék felszínére öntöttük.

3.3.1.13. *C. cinerea* transzformánsok PCR alapú ellenőrzése

A megjelenő telepeket minimál táptalajra oltottuk át, majd PCR segítségével ellenőriztük a vad típusú *C. cinerea pabl* gén szelekciós marker megfelelő helyre történő beépülését.

3.3.1.13.1. DNS-kivonás micéliumból

DNS-kivonáshoz a telepekről 2x2 mm-es micéliumdarabkát 100 µl desztillált vízbe helyeztünk, majd mikrohullámú sütőben 1 percig melegítettük. Rövid vortexelés után 30 másodpercig szobahőmérsékleten hagytuk, majd újabb egy percig melegítettük mikrohullámú sütőben, ezután 10 percre -20 °C-ra helyeztük. Felolvasztás után 5 percig 9300 g-n centrifugáltuk, és azonnal felhasználtuk a PCR templátjaként.

3.3.1.13.2. *C. cinerea* Vel3A transzformánsok ellenőrzésére használt PCR reakció

A reakcióelegy összetétele (20 µl-re):

- 10 µl 2x Phire Hot Star II Master Mix
- 0,5 µM forward primer (355684_KO_check_F)
- 0,5 µM reverz primer (PABA_inner40)
- 25 ng templát DNS

A reakciókörülmények a következők voltak:

- | | | |
|--------------------|-----------------------|-------------|
| 1. elődenaturáció: | 98 °C 5 perc | } 33 ciklus |
| 2. denaturáció: | 98 °C 15 másodperc | |
| 3. hibridizáció: | 60 °C 15 másodperc | |
| 4. elongáció: | 72 °C 30 másodperc/kb | |
| 5. utóelongáció: | 72 °C 5 perc | |

3.3.1.14. A Vel3A lókuszra nézve homokariotikus *C. cinerea* törzsek izolálása

A PCR alapján megfelelő lókuszba épült javítótemplátot tartalmazó törzseket oódiáltatással tisztítottuk tovább homokariotikus törzsek izolálása céljából. Ehhez a törzseket YMG táptalajon 37 °C-on állandó fényben neveltük 5 napig. Ezután a csészére steril desztillált vizet pipettáztunk, egy spatula segítségével lekapartuk az oódiókat, melyeket sejtszűrőn választottunk el a micéliumtörmelétől. 100 µl-nyi 10³/ml-es koncentrációjú oódiuszuszpenziót minimál táptalajra szélesztettünk. A csészéket sötétben 37 °C-on inkubáltuk, a megjelenő különálló telepeket minimál táptalajra oltottuk át, majd a 3.3.3.10.2 fejezetben leírt módon PCR-rel ellenőriztük a tisztaságukat.

3.4. A *vel3A* génre nézve mutáns *C. cinerea* törzsek fenotipizálása

3.4.1. Növekedési ráta meghatározása

Vizsgáltuk a vegetatív micélium növekedési sebességét különböző körülmények között. YMG táptalajt tartalmazó Petri-csésze közepére helyeztünk egy kis micéliummal borított agarkorongot, majd 24 óránként lemértük a telep átmérőjét. Kísérleteinkben 37 °C-on teljes sötétben, és állandó megvilágítás mellett, 28 °C-on teljes sötétben és 12 óránként váltakozó világos és sötét periódusokban vizsgáltuk a növekedést.

3.4.2. Termőtestképzés vizsgálata

A mutáns és vad típusú törzseket csökkentett glükóztartalmú YMG táptalajra oltottuk, 6,5 napon keresztül sötétben neveltük 28 °C-on, 80%-os páratartalom mellett. Ezután 2 órán át fényben tartva a csészéket indukáltuk a termőtestképzést. 24 órára újra sötétbe helyeztük őket, majd 12 óránként váltakozó fény-sötét periódusok mellett monitoroztuk a termőtestek megjelenését.

3.4.3. Oídiumszám vizsgálata

A fenotipizálás során vizsgáltuk az oídiumok mennyiségét. Az oídiumképzés vizsgálata során YMG táptalajon, 37 °C-on folytonos fényben 5 napig neveltük a gombát, amely ez idő alatt a teljes csészét benőtte, és oídiumokat hozott. Az oídiumokat desztillált vízbe lekaparva centrifuga (2500 rpm / 1300 g) segítségével gyűjtöttük össze, 1 ml steril desztillált vizet használva csészénként, a Bürker-kamrával történő számoláshoz igény szerint hígítottuk az oldatot. A statisztikát és az ábrákat az R programnyelv segítségével készítettük.

3.5. Bioinformatikai módszerek

3.5.1. A *C. cinerea* fehérjék domén alapú annotációja

A *C. cinerea* fehérjék funkcionális annotációját az InterProScan-5.47–82.0 szoftver (<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/9/1236/237988?login=true>) segítségével végeztük.

3.5.2. A *velvet* gének törzsfájának készítése

A bazídiumos gomba *velvet* fehérjéket a *velvet* domén Interpro azonosítóját (IPR037525) használva azonosítottuk. Az Ascomycota *velvet* fehérjék aminosav szekvenciáit a szakirodalmi adatok alapján (Chen és mtsai., 2024) a FungiDB adatbázisból (<https://fungidb.org/fungidb/app>) töltöttük le. Az illesztést a mafft szoftver L-INS-i funkciójával (<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3603318/>) (Katoh és Stanley, 2013) végeztük el. Az illesztett szekvenciákat a trimal szoftver segítségével trunkáltuk 0.3 GT threshold mellett. A maximum-likelihood fákat a RaxML-NG szoftver segítségével készítettük

el (<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/21/4453/5487384>) (Kozlov és mtsai., 2019)

3.5.3. A *velvet* gének expressziójának vizsgálata

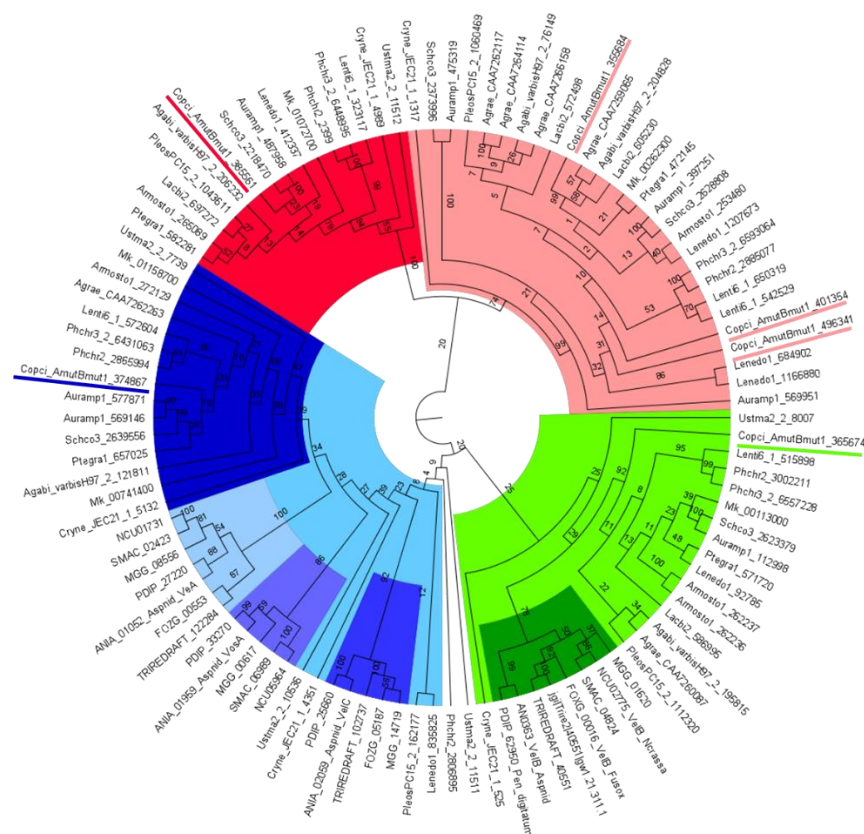
A *velvet* gének expressziós adatait a CopciDB (<https://mushroomdb.brc.hu/>) adatbázisból töltöttük le, az ábrákat a kutatócsoportunk által korábban készített saját R-programok segítségével készítettük.

4. Eredmények és diszkusszió

4.1. A *velvet* fehérjecsald filogenetikai analízise Ascomycota és Basidiomycota gombákban

Vizsgáltuk a *velvet* fehérjék eloszlását Ascomycota és Basidiomycota gombákban. Ehhez rendelkezésünkre állt egy 17 bazídiumos gombagenomjából és azok fehérje funkcionális domén annotációjából (Interpro (IPR) domén) álló adatsor.

Az általunk készített törzsfán (1. ábra) látható, hogy a *velvet* fehérjék jól elkülönülő kládokba rendeződnek.



1. ábra A *velvet* fehérjecsald filogenetikai törzsfája. 17 Basidiomycota és 7 Ascomycota faj *velvet* doménnel rendelkező génjeinek Maximum-likelihood törzsfája. Az ábrán késsel jelöltük a VosA/VeA/VelC kládot, zöld színnel jelöltük a VelB kládot (Cc.365674 - *Cc.velB*), pirossal a *velvet1* kládot (Cc.385561 - *Cc.vel1*), sötétkékkel a *velvet2* kládot (Cc.374867 - *Cc.vel2*) és rózsaszínnel a *velvet3* kládot (Cc.355684 - *Cc.vel3A*, Cc.543653 - *Cc.vel3B*, Cc.496341 - *Cc.vel3C*)

Az Ascomycota fajok *velvet* fehérjéi 4 monofiletikus kládba rendeződnek (VeA, VosA, VelC és VelB klád), az Ascomycota bazális node-ok nagy támogatottsággal bírnak (bootstrap

értékek: 78-100). A VelB kládban egyaránt jelen vannak az Ascomycota gombák és a Basidiomycota gombák fehérjéi is, míg a VeA, VosA, VelC kládok Ascomycota specifikusak. A Basidiomycota gombák *velvet* fehérjéi a VelB kládon kívül 3 monofiletikus, csak bazídiumos gombákra jellemző csoportba rendeződnek (*velvet1*, *velvet2*, *velvet3*).

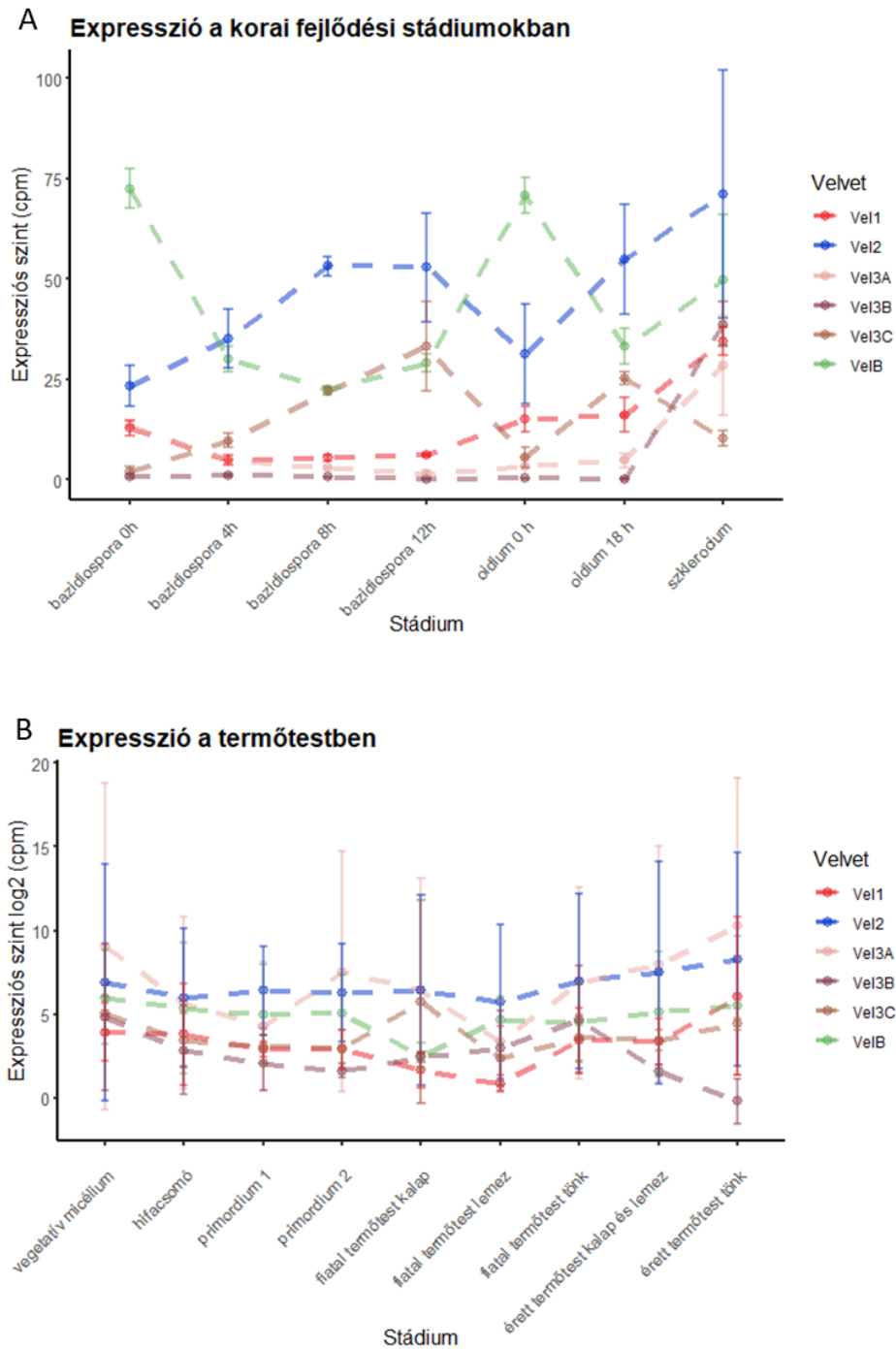
Az analízisünk alapján A *C. cinerea* genom 6 *velvet* fehérjét hordoz, melyek a VelB és a 3 Basidiomycota specifikus kládba térképeződnek.

Eredményeink megegyeznek a szakirodalmi adatokkal, amelyek egyértelműen elkülönülő Ascomycota és Basidiomycota gombákra jellemző kládokról számolnak be, ugyanakkor Chen és mtsai. (2024) eredményeivel ellentétben mi nem csak 4, hanem 6 *velvet* gént azonosítottunk *C. cinerea*-ban. A különbséget valószínűleg az eltérő azonosítási módszer okozza, a cikk szerzői BlastP segítségével azonosították a *velvet* géneket (Chen és mtsai., 2024), mi pedig InterPro funkcionális domén alapján, ami pontosabb azonosítást tesz lehetővé a kizárólag konzervált régiók összehasonlítása révén.

4.2. A *C. cinerea velvet* fehérjék expressziós adatainak analízise

A CopciDB publikus *C. cinerea*-ra vonatkozó expressziós adatsoraiban elemeztük a *velvet* fehérjék expresszióját különböző környezeti körülmények között és különböző ivaros és ivartalan fejlődési állapotok során (**2. és 3. ábra**). A VelB kládba tartozó 365674 azonosítójú fehérje a legmagasabb expressziót a csírázás előtt mutatja (**2.A ábra**), irodalmi adatokból ismert, hogy *Aspergillus* fajokban a VelB fehérje a spórák életképességére hatással van (Park és mtsai., 2012). A 374867 azonosítójú fehérje (Vel2) expressziója a csírázás során emelkedik meg látványosan, míg a többi *velvet* fehérje expressziója alacsonyabb szintű marad (**2.A ábra**). A termőtestképzés során a *velvet* fehérjék folyamatos magas expressziót mutatnak kis mértékű dinamikával (**2.B ábra**). A legmagasabb expressziót a 355684 (BasVel3) azonosítójú *velvet* fehérje mutatja az érett termőtest tönkjében és lemezében. A 365674 (VelB), 374867 (Vel2) és a 385561 (Vel1) azonosítójú *velvet* fehérjék expressziós mintázata nagyon hasonlít egymáshoz.

A *velvet* fehérjék gyakran homo- vagy heteropolimereket képezve fejtik ki a hatásukat (Bayram és mtsai., 2008), erre utalhat a hasonló expressziós mintázat a 3 *velvet* fehérje esetében termőtestképzés során.



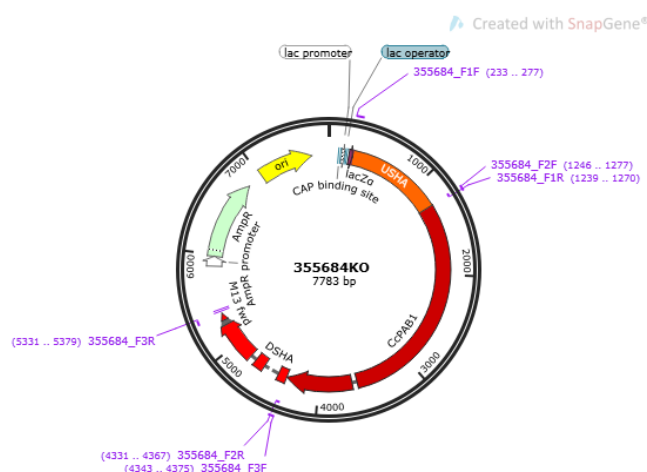
2. ábra Az expressziós szint változása a termőtestképzés során. **A:** Expressziós szint változása a korai fejlődési stádiumokban: a csírázó bazídióspórákban, illetve oídiumokban, és a szkleróciumban. **B:** Expresszió a termőtestképzés során vegetatív micéliumban, hifacsomóban, 1. és 2. stádiumú primórdiumban, fiatal és érett termőtestben. Fiatal termőtestben külön adat áll rendelkezésre a kalapban, lemezekben és a tönkben mért expresszióról, érett termőtestben a kalapban és lemezekben együtt, illetve a tönkben. (Ezen ábrán a jobb vizualizáció érdekében log₂ skálát használtunk).

4.3. A *vel3A* gén deléciója *C. cinerea*-ban

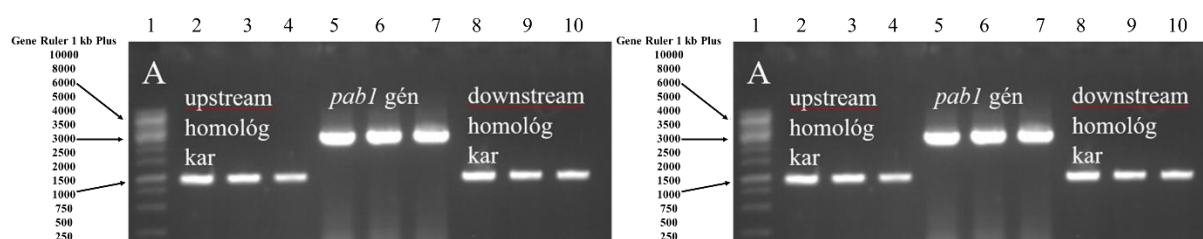
4.3.1. A *C. cinerea vel3A* gén deléciós kazettájának összeszerelése

A *velvet* doménnel rendelkező gének szerepének megismerése érdekében mind a hat, általunk azonosított *velvet* doménnel rendelkező fehérjét kódoló génre nézve szeretnénk deléciós mutáns törzseket létrehozni. Az expressziós adatok alapján a legmagasabb érték általában a *vel3A*, így jelen dolgozat a továbbiakban erre fókuszál. .

A kazetta (4. ábra) összeszereléséhez linearizált pUC19 plazmidot használtunk és felamplifikáltuk a homológ karokat, valamint a szelekciós markert (5.A ábra). A tisztított fragmenteket *Gibson Assembly kit* segítségével összeszereltük, *E. coli* NEB5 α -ba transzformáltuk. Az összeszerelt kazettát tartalmazó plazmidot hordozó baktériumkolóniát kolónia PCR segítségével választottuk ki (5.B ábra). A megfelelő kolóniából plazmidot tisztítottunk, majd Sanger szekvenálattal ellenőriztük a megfelelő összeszerelődést.



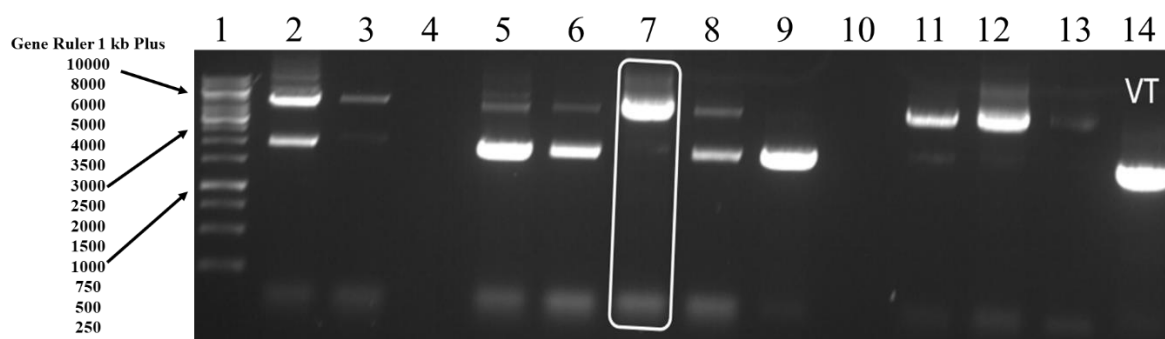
4. ábra: A *vel3A* deléciós kazettája. A tervezést és a térképet a *Snapgene 4.3.11* verziójával készítettük.



5. ábra: A: a javító templát kazetta fragmentjeinek ellenőrzése PCR segítségével. 1: GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder. 2-4: az *upstream* homológ kar (1000 bp), 5-7: a *pab1-1* gén (3000 bp), 8-10: a *downstream* homológ kar (1000 bp). **B:** a plazmid összeszerelődésének és a javítótemplát beépülésének

A *vel3A* deléciója *C. cinerea*-ban

A 3.3.1.5 fejezetben leírtak alapján az összeszerelt javítótemplátot hordozó plazmiddal és az összeszerelt ribonukleoprotein komplex-szel transzformáltuk a 3.3.1.12 fejezetben leírtak alapján a *vel3A* deléciója érdekében. A transzformálást követően 13 PABA prototróf telepet izoláltunk, amelyekben kolónia PCR segítségével ellenőriztük a javítótemplát megfelelő lókuszbba történő integrációját.

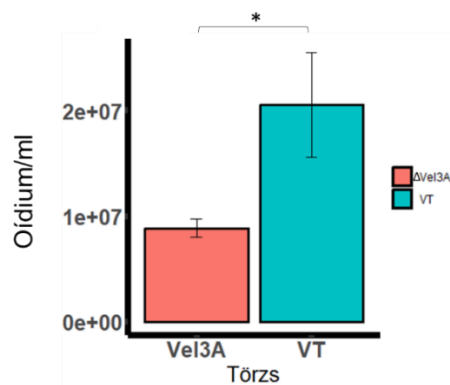


6. ábra: A *vel3A* deléciós törzsek ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel. 1.: *GeneRuler 1kb Plus DNA ladder*. 2-13: A *vel3A* deléciója után felnövő vad típusú *pab1-1* génnel komplementált transzformáns törzsek Vel3 kolónia PCR során kapott termékek. 14: A vad típusú kontroll templáttal kapott termék. A kolónia PCR során a vad típus esetében várt termék 2497 bp, a sikeres transzformáns törzsek esetén 5497 bp.

A PCR kép alapján megfelelően beépült javítótemplátot hordozó törzset a *vel3A* génre nézve homokariotikus törzs izolálása érdekében oídialtattuk, az oídiumokról felnövő, tisztának bizonyuló törzset Sanger szekvenálással ellenőriztük. A transzformáns a vad típusú *pab1* gént (promóter és terminátor régióval együtt) a várt lókuszban tartalmazta, 20 bázispárt deletálva a *vel3A* kódoló régiójából. Mindezek után megkezdtük a $\Delta vel3A$ *C. cinerea* törzs fenotipizálását.

4.3.2. A *Ccvel3A* deléciójának hatása az oídiumképzésre

Első lépésként vizsgáltuk a *vel3A* deléciójának hatását az ivartalan szaporodásra, amihez a 3.4.3 fejezetben leírtak alapján oídiumokat gyűjtöttünk vad típusú és a *vel3a* génre nézve deléciós *C. cinerea* törzsekből és összehasonlítottuk az oídiumszámot. Ezek során megállapítottuk, hogy a $\Delta vel3A$ törzs szignifikánsan kevesebb oídiumot termel, mint a vad típusú törzs (*Welch two-sample t-test*, $p=0,05076$) (7. ábra).

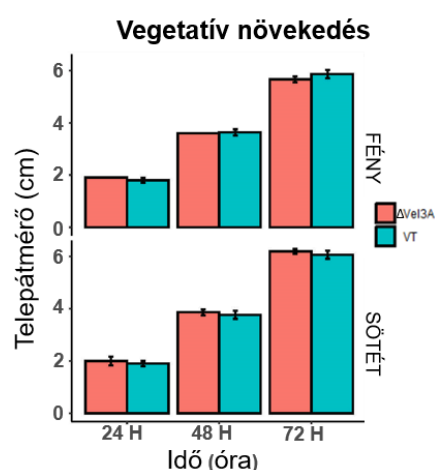


7. ábra: A *vel3A* gén deléciójának hatása az oídiumképzésre. Az ábrán a vad típusú (kék oszlop) és a *Δvel3A* (piros oszlop) törzsek 10 ml desztillált vízzel izolált csészénkénti oídiumkoncentrációját mutatják

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a *velvet* transzkripciós faktoroknak fontos szerepe van az ivartalan szaporodás szabályozásában (Kim, 2002, Park és mtsai., 2012, Park és mtsai., 2014), az általunk kiütött gén a kísérleteink alapján befolyásolja az oídiumtermelést, azonban az Ascomycota gombáknál megfigyelttel ellentétben nem növekedést, hanem csökkenést tapasztaltunk. A folyamat hátterének tisztázása további vizsgálatokat igényel.

4.3.3. A *Ccvel3A* deléciójának hatása a vegetatív növekedésre

Vizsgáltuk a *vel3A* gén deléciójának vegetatív növekedésre gyakorolt hatását sötétben és fényben. Mindehhez a 3.4.1. fejezetben leírtak alapján növesztettük a vad típusú és a *Δvel3A* *C. cinerea* törzset és naponta monitoroztuk a kolóniák átmérőjét. Egyik körülmény esetén sem találtunk különbséget a vad típusú és a *Δvel3A* *C. cinerea* törzs között **(8. ábra)**



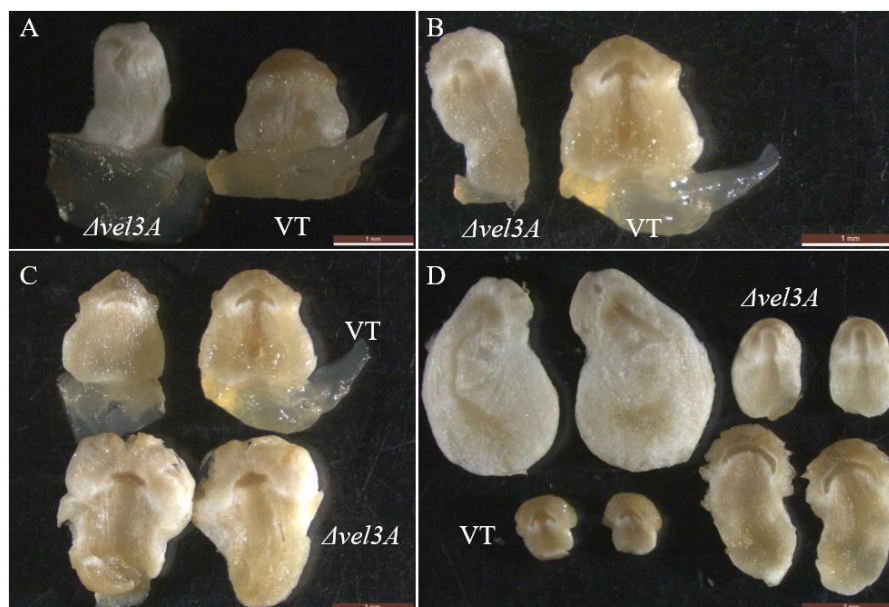
8. ábra: A *vel3A* deléciójának hatása a vegetatív növekedésre. Az oszlopdiagramok a vad típusú (kék) és a *Δvel3A* (piros) *C. cinerea* törzsek növekedési sebességét mutatja 37 C-on fényben és sötétben. A gén deléciója nem befolyásolja szignifikáns mértékben a vegetatív növekedést.

Az általunk ismert szakirodalom alapján a *velvet* fehérjének nincs hatása a vegetatív növekedésre, a mi eredményeink is ezt erősítik meg.

4.3.4. A *Ccvel3A* deléciójának hatása a termőtestképzésre

Az expressziós adatok vizsgálatából származó adatok alapján feltételeztük, hogy a *vel3A* génnek szerepet lehet a termőtestképzés szabályozásában, így a vegetatív növekedés és az ivartalan szaporodás vizsgálata után vizsgáltuk a *vel3A* hatását a termőtestképzésre. Azt tapasztaltuk, hogy a $\Delta vel3A$ *C. cinerea* törzs szinkronizált termőtestképző körülmények között is megnyúlt, úgynevezett etiolált tönkű termőtestkezdeményeket (*dark stipe*) képez. A vad típusra ez a fajta, nodulusból induló megnyúlás, egyenesen felfelé törekvés akkor jellemző, ha a termőtestképzéshez kedvezőtlenek a feltételek, például nincs elegendő fény, vagy túl magas a szén-dioxid koncentráció a környezetben. A *dark stipe* fenotípusra jellemző, hogy a tönk és a kalapkezdemény nem fejlődnek tovább (Kües, 2000). Érdekes megjegyeznünk, hogy a $\Delta vel3A$ mutáns törzs esetén megfigyelhető *dark stipe*-ok nem egyenesek, sokszor elgörbülnek, akár visszafordulnak a szubsztrát felé (9. ábra).

A megfelelő minőségű és mennyiségű fény jelenléte ellenére sötétre jellemző fenotípus alapján feltételezzük, hogy a már ismert, fényfüggő szabályozásban résztvevő gének, a *dst1* (Terashima és mtsai., 2005), *dst2* (Kuratani és mtsai., 2010) és a *wc* (Nakazava és mtsai., 2011) komplex tagjai mellett a *vel3A* szerepet játszhat a termőtestképzés fényfüggő folyamatainak szabályozásában. Ez összeeseng az irodalomból (Bayram, 2008) már ismert adatokkal, miszerint a *velvet* fehérjének szerepe van a fényfüggő folyamatok szabályozásában.



9. ábra A *vel3A* gén deléciójának hatása a termőtestképzésre. A: vad típusú (VT) és $\Delta vel3A$ primordium, B, C, D: keresztmetszeti képek a primordiumról.

4.3.5. A Vel3A hatása a termőtestkezdemény irányultságára

A $\Delta vel3A$ *C. cinerea* törzs fény jelenlétében képződött görbült *dark stipe*-jai nem egyeznek meg a vad típusra sötétben jellemző egyenes *dark stipe*-okkal, ami arra enged következtetni, hogy a fényérzékelés mellett a Vel3A-nak egyéb szerepe is lehet a termőtest morfológiájának kialakításában. Ezért vizsgáltuk a $\Delta vel3A$ törzset *dark-stipe*-ot indukáló körülmények között, teljes sötétben történő nevelés mellett. A törzset teljes sötétben nevelve (10. ábra) a termőtestek nem egyenesen felfelé nyúltak meg, hanem sok esetben vízszintesen nőttek, vagy elkanyarodtak, visszafordultak, akár fel is tekeredtek.



10. ábra Sötétben nevelt telepek. A vad típussal ellentétben a mutáns törzs nem egyenes, felfelé megnyúló képleteket hoz.

A görbült *dark stipe* arra enged következtetni, hogy a Vel3A-nak szerepe lehet a termőtest irányultságának a meghatározásában is. A gombák termőtestjeinek irányultságát a fototropizmus mellett a negatív geotropizmus határozza meg (Kües, 2000). Mindezek alapján a továbbiakban vizsgálni fogjuk a Vel3A hatását a foto- és geotropizmusra.

5. Tartalmi összefoglaló

A *velvet* fehérjecsaládba tartozó transzkripciós faktorok szinte minden gombataxonban jelen vannak, számuk tág határok között változhat, más élőlényekből azonban teljesen hiányoznak. Aminosav-szekvencia tekintetében erősen konzervált DNS-kötő motívummal rendelkeznek és térbeli szerkezetük alapján nagyfokú hasonlóságot mutatnak az emlősökre jellemző, immunválaszokban szerepet játszó NF- κ B transzkripciós faktor Rel doménjével.

Már több mint ötven éve, hogy az első *velvet* doménnel rendelkező fehérjét felfedezték, jelenlegi információink nagy része Ascomycota gombákból származik, e fajokban a *velvet* fehérjék főként fényfüggő folyamatok irányításában játszanak szerepet, mint a szexuális és aszexuális szaporodás, illetve a másodlagos metabolitok termelésének szabályozása. Gyakran nem egyedül, hanem homo- és heterodimerek, vagy több tagból felépülő komplexek formájában, esetenként nem csak *velvet* doménnel rendelkező fehérjékkel összekapcsolódva fejtik ki hatásukat.

A Basidiomycota gombákban ismert *velvet* fehérjék nagy része az Ascomycota gombák *velvet* fehérjétől egyértelműen elkülönülő kládokba térképeződik, azonban szerepüket komplex termőtestképző bazídiumos gombákban eddig kevés tanulmány vizsgálta, így célul tűztük ki szerepük megismerését ebben a gombacsoportban. Modellünkben, a trágyatintagombában (*Coprinopsis cinerea*) hat *velvet* doménnel rendelkező fehérjét azonosítottunk. CRISPR-Cas9 technikát használva elsőként deléciós törzsek létrehozásával és fenotipizálásával kezdtük meg a transzkripciós faktorok szerepének vizsgálatát. Sikeresen létrehoztunk egy, a *Ccvel3A* génre nézve deléciós törzset, amely a termőtestképzés során szinte minden stádiumban a legmagasabb expressziót mutató *velvet* gén. A *ΔCc.vel3A* törzs vegetatív növekedésében nem tapasztaltunk szignifikáns változást a vad típushoz képest, azonban a termőtestek még termőtestképzést indukáló körülmények között is a vad típusra csak fény hiányában jellemző megnyúlt, úgynevezett etiolált tönkű fenotípust mutatnak, ami arra enged következtetni, hogy a *Cc.vel3A* fényfüggő folyamatok szabályozásában játszik szerepet. Azonban ezek a struktúrák a vad típusútól jelentősen eltérnek.

A szabályozás teljes megértéséhez az összes *velvet* fehérje feladatának feltárása szükséges.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Nagy Lászlónak a mentorálásért, és a lehetőségért, hogy szakdolgozóként a kutatócsoportjában dolgozhatok.

Köszönet illeti Dr. Virágh Mátét, akitől a legtöbbet tanultam, és akihez mindig fordulhattam tanácsért, támogatásért, és aki végig nagy türelemmel segített.

Köszönöm Dr. Virágh-Homa Mónikának a segítségét, és hogy vállalta a belső konzulensi szerepet.

Köszönettel tartozom a teljes Lendület Gomba Genomika és Evolúció Csoportnak a befogadásért, és mert bizalommal fordulhattam hozzájuk segítségért.

Külön köszönet illeti a Nemzeti Orvosbiológiai Alapítvány Nemzeti Tudósképző Akadémia programját a támogatásért.

7. Irodalomjegyzék

- Ahmed, Y. L., Gerke, J., Park, H. S., Bayram, Ö., Neumann, P., Ni, M., ... & Ficner, R. (2013). The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- κ B. *PLoS biology*, 11(12), e1001750.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., ... & Braus, G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320(5882), 1504-1506.
- Binninger, D. M., Skrzynia, C., Pukkila, P. J., & Casselton, L. (1987). DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *The EMBO Journal*, 6(4), 835-840.
- Chen, W., Son, Y. E., Cho, H. J., Choi, D., Park, H. S., & Yu, J. H. (2024). Phylogenomics analysis of velvet regulators in the fungal kingdom. *Microbiology Spectrum*, 12(2), e03717-23.
- Coelho, M. A., Bakkeren, G., Sun, S., Hood, M. E., & Giraud, T. (2017). Fungal sex: the Basidiomycota. *The fungal kingdom*, 147-175.
- Corrochano, L. M. (2007). Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(7), 725-736.
- Käfer, E. (1965). Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52(1), 217.
- Karakkat, B. B., Gold, S. E., & Covert, S. F. (2013). Two members of the *Ustilago maydis* velvet family influence teliospore development and virulence on maize seedlings. *Fungal Genetics and Biology*, 61, 111-119.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kim M-J., Lee M-K., Pham H. Q., Gu M. J., Zhu B., Son S-H., Hahn D., Shin J-H, Yu J-H, Park H-S, Han K-H. 2020. The velvet regulator VosA governs survival and secondary metabolism of sexual spores in *Aspergillus nidulans*. *Genes (Basel)*, 11(1):103.
- Kim, H. S., Han, K. Y., Kim, K. J., Han, D. M., Jahng, K. Y., & Chae, K. S. (2002). The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 37(1), 72-80.

- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 35(21), 4453–4455.
- Knoll, A. H. (2011). The multiple origins of complex multicellularity. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 39(1), 217-239.
- Kuratani, M., Tanaka, K., Terashima, K., Muraguchi, H., Nakazawa, T., Nakahori, K., & Kamada, T. (2010). The *dst2* gene essential for photomorphogenesis of *Coprinopsis cinerea* encodes a protein with a putative FAD-binding-4 domain. *Fungal Genetics and Biology*, 47(2), 152-158.
- Kües, U. (2000). Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(2), 316-353.
- Künzler, M., Aebi, M., van der Velden, N. S. J., Lin, C. W., & Plaza, D. F. (2014). Comparative transcriptomics of the model mushroom *Coprinopsis cinerea* reveals tissue-specific armories and a conserved circuitry for sexual development.
- Liu, C., Kang, L., Lin, M., Bi, J., Liu, Z., & Yuan, S. (2022). Molecular mechanism by which the GATA transcription factor CcNsdD2 regulates the developmental fate of *Coprinopsis cinerea* under dark or light conditions. *MBio*, 13(1), e03626-21.
- Liu, H., Yao, X., Ke, W., Ding, H., He, G. J., Ma, S., ... & Wang, L. (2022). A velvet transcription factor specifically activates mating through a novel mating-responsive protein in the human fungal pathogen *Cryptococcus deneoformans*. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e02653-21.
- Masuda, R., Iguchi, N., Tukuta, K., Nagoshi, T., Kemuriyama, K., & Muraguchi, H. (2016). The *Coprinopsis cinerea* Tup1 homologue Cag1 is required for gill formation during fruiting body morphogenesis. *Biology open*, 5(12), 1844-1852.
- Moore, D. (1998). *Fungal morphogenesis* (No. 35). Cambridge University Press.
- Muraguchi, H., & Kamada, T. (1998). The *ich1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting. *Development*, 125(16), 3133-3141.
- Muraguchi, H., Fujita, T., Kishibe, Y., Konno, K., Ueda, N., Nakahori, K., ... & Kamada, T. (2008). The *expl* gene essential for pileus expansion and autolysis of the inky cap mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) encodes an HMG protein. *Fungal Genetics and Biology*, 45(6), 890-896.

- Muraguchi, H., Takemaru, T., & Kamada, T. (1999). Isolation and characterization of developmental variants in fruiting using a homokaryotic fruiting strain of *Coprinus cinereus*. *Mycoscience*, 40(3), 227-233.
- Nagy, L. G., Kovács, G. M., & Krizsán, K. (2018). Complex multicellularity in fungi: evolutionary convergence, single origin, or both?. *Biological Reviews*, 93(4), 1778-1794.
- Nakazawa, T., Ando, Y., Kitaaki, K., Nakahori, K., & Kamada, T. (2011). Efficient gene targeting in $\Delta Cc. ku70$ or $\Delta Cc. lig4$ mutants of the agaricomycete *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(10), 939-946.
- Park, H. S., Nam, T. Y., Han, K. H., Kim, S. C., & Yu, J. H. (2014). VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PloS one*, 9(2), e89883.
- Park, H. S., Ni, M., Jeong, K. C., Kim, Y. H., & Yu, J. H. (2012). The role, interaction and regulation of the velvet regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE*, 7(9), e45935.
- Polak, E., Aebi M., & Kües, U. (2001). Morphological variations in oidium formation in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mycological Research*, 105(5), 603-610.
- Polak, E., Hermann, R., Kües, U., & Aebi, M. (1997). Asexual sporulation in *Coprinus cinereus*: structure and development of Oidioídiophores and Oidioídia in an AmutBmut homokaryon. *Fungal Genetics and Biology*, 22(2), 112-126.
- Pukkila, P. J. (2011). *Coprinopsis cinerea*. *Current Biology*, 21(16), R616-R617.
- Royse, D. J., Baars, J., & Tan, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*, 5-13.
- Sakamoto, Y., Nakade, K., & Sato, T. (2009). Characterization of the post-harvest changes in gene transcription in the gill of the *Lentinula edodes* fruiting body. *Current Genetics*, 55(4), 409-423.
- Sakamoto, Y., Sato, S., Yoshida, H., Takahashi, M., Osakabe, K., & Muraguchi, H. (2024). The *exp2* gene, which encodes a protein with two zinc finger domains, regulates cap expansion and autolysis in *Coprinopsis cinerea*. *Microbiological Research*, 283, 127695.
- Shioya, T., Nakamura, H., Ishii, N., Takahashi, N., Sakamoto, Y., Ozaki, N., ... & Muraguchi, H. (2013). The *Coprinopsis cinerea* septin Cc. Cdc3 is involved in stipe cell elongation. *Fungal Genetics and Biology*, 58-59, 80-90.

- Sugano, S. S., Suzuki, H., Shimokita, E., Chiba, H., Noji, S., Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2017). Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system. *Scientific reports*, 7(1), 1260.
- Terashima, K., Yuki, K., Muraguchi, H., Akiyama, M., & Kamada, T. (2005). The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics*, 171(1), 101-108.
- Todd R. B., Greenhalgh J. R., & Hynes M. J., & Andrianopoulos A. 2003. TupA, the *Penicillium marneffei* Tup1p homologue, represses both yeast and spore development. *Mol Microbiol* 48(1):85–94.
- Tzamarias, D., & Struhl, K. (1994). Functional dissection of the yeast Cyc8–Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, 369(6483), 758-761.
- Virágh, M., Merényi, Z., Csernetics, Á., Földi, C., Sahu, N., Liu, X. B., ... & 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.
- Wiemann, P., Brown, D. W., Kleigrew, K., Bok, J. W., Keller, N. P., Humpf, H. U., & Tudzynski, B. (2010). FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Molecular microbiology*, 77(4), 972-994.