

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

XXXI. OTDK Biológia Szekció
***Tolypocladium* fajok fumonizintermelő-
képességének és rokonsági viszonyainak
vizsgálata**

Tudományos Diákköri Dolgozat

Brankovics Balázs
Biológus MSc szakos II. éves hallgató

Témavezetők: Dr. Varga János és
Kocsubé Sándor

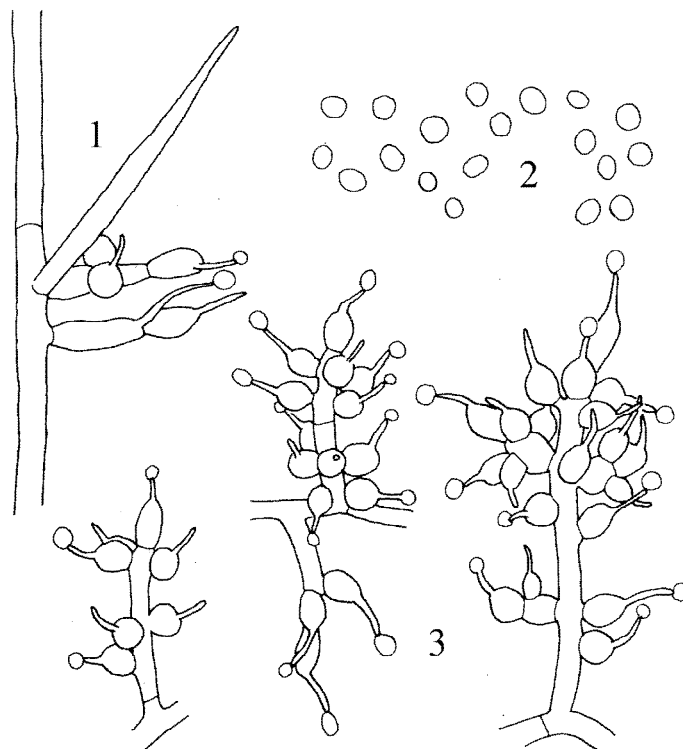
2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezető	4
1.1. Tolypocladium fajok jelentősége és taxonómiája	4
1.2. Mikotoxinok.....	6
1.2.1. Fumonizinek.....	6
1.2.1.1. Fumonizinek jelentősége, termelők	7
1.2.1.2. Fumonizinek bioszintézise	8
1.2.1.3. A fumonizin bioszintézis génklaszter felépítése	10
2. Célkitűzések.....	12
3. Anyagok és módszerek.....	13
3.1. Táptalajok	13
3.2. Gomba törzsek	13
3.3. A micélium felszaporítása és a sejtek feltárása.....	14
3.4 Molekuláris vizsgálatok.....	15
3.4.1. DNS-kivonás	15
3.4.2. Gélelektroforézis	15
3.4.3. DNS-szakaszok amplifikálása PCR segítségével.....	16
3.4.4. Az amplifikált DNS-szakaszok szekvencia-meghatározása	17
3.4.5. Szekvenciák feldolgozása	18
3.5. Mikotoxin-kimutatás	19
3.5.1. Fumonizin-kivonás	19
3.5.2. Fumonizin-tartalom meghatározása	19
4. Eredmények és értékelés	21
4.1. A törzsek fumonizintermelő-képessége.....	21
4.2. A DNS alapú vizsgálatok eredményei.....	22
4.2.1. A FUM1 génre tervezett PCR-teszt, és a fumonizintermelő-képesség	22
4.2.2. A FUM1 gén filogenetikai vizsgálata.....	24
4.2.3. Az ITS-régió filogenetikai vizsgálata.....	26
5. Összefoglalás	28
6. Irodalomjegyzék	30
7. Köszönetnyilvánítás	36
8. Függelék	37
9. "Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez"	39

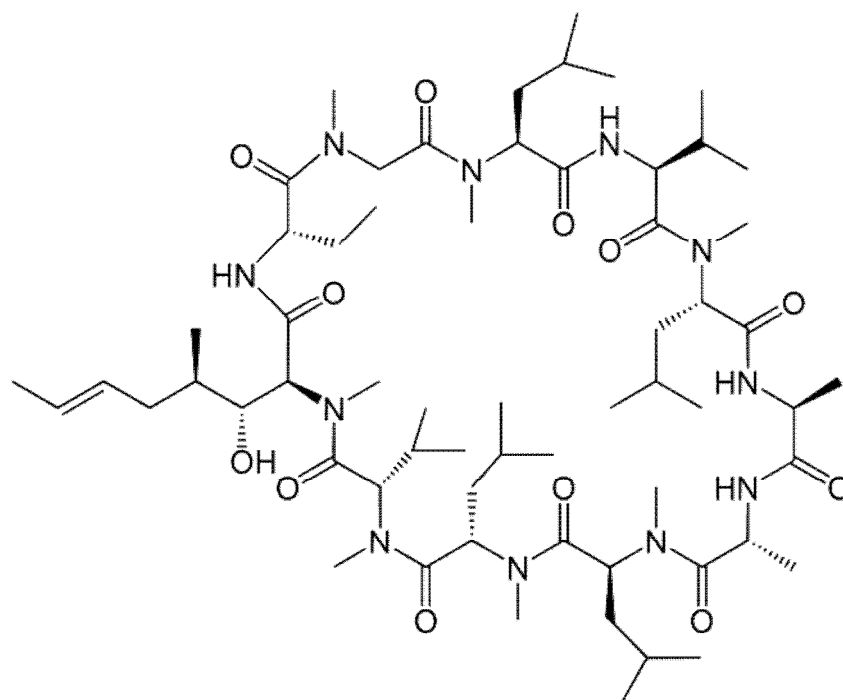
1. Bevezető

1.1. *Tolypocladium* fajok jelentősége és taxonómiája



1. ábra. *Tolypocladium inflatum* morfológiája: 1. *Acremonium*-szerű fialid, 2. konídiumok és 3. konidiofór (Hodge és mtsi, 1996)

A nemzetségbe tartozó fajok világszerte előforduló talajlakó szaprofita illetve rovarpatogén gombák. Az idetartozó fajok közül kiemelkedő jelentőségű a *T. inflatum* (= *T. niveum*, = *Beauveria nivea*, teleomorf: *Cordyceps subsessilis*; 1. ábra), mely az első számú ciklosporin A termelő szervezet (Survase és mtsi, 2011). A ciklosporin A (2. ábra) fontos immunszuppresszív hatású vegyület, a T-sejtek immunválaszát képes gátolni, melyet a gyógyászatban alkalmaznak szervátültetéseket követően illetve autoimmun-betegségek kezelésénél. A ciklosporinok mellett efraeptineket is képes ez a faj termelni, melyek hatásos bakteriális ATPáz gátlók (Gupta és mtsi, 1991). Az efraeptinek valódi jelentőségét a rovarölő-képességük adja (Krasnoff és Gupta, 1991).



2. ábra. Ciklosporin A szerkezete

A *Tolypocladium* nemzetséget először Gams írta le 1971-ben, és három fajt sorolt ide: *T. cylindrosporum*, *T. geodes* és *T. inflatum* (korábban *Pachybasium niveum*, Rostrup írta le 1916-ban). A 80-as években a nemzetséget további fajokkal bővítették. Barron három új fajt írt le: *T. parasiticum* (Barron, 1980), *T. trigonosporum* és *T. lignicola* néven (Barron, 1983). 1983-ban Bissett két újabb fajt írt le (*T. nubicola* és *T. tundrense*), valamint a *T. inflatum*-ot *T. niveum*-ra “keresztelte”. Emellett két, már korábban leírt, fajt sorolt a nemzetségbe: a *Verticillium balanoides*-t *T. balanoides* néven (2001-ben Gams és Zare a *Haptocillium balanoides* nevet javasolta), míg a *Sesquicillium microsporum*-ot *T. microsporum* megnevezéssel. Samson és Soares (1984) egy új fajt, a *T. extinguens*-t, írta le. Von Arx (1986) úgy találta, hogy a *Tolypocladium* és *Beauveria* nemzetség tagjai között nincs kellően nagy morfológiai különbség, ezért javasolta, hogy csak a *Beauveria* nemzetségnevet tartsák meg, és ebbe sorolják át a *Tolypocladium* fajokat. Ugyanezen cikkben a *T. microsporum* nevét *Gliocladium microsporum*-ra változtatta.

A 90-es években több cikk is született, melyek a *Tolypocladium* és *Beauveria* nemzetségek újbóli szétválasztása mellett érveltek. Ezen tanulmányok már nem a morfológiai vizsgálatok alapján kívánják elkülöníteni a két taxont, hanem molekuláris illetve fiziológiai vizsgálatok alapján, mint például rRNS szekvencia vizsgálatok (Rakotonirainy és mtsi, 1991), mitokondriális DNS próbák (Hegedus és Khachatourians, 1993) illetve szénhidrát-hasznosítási vizsgálatok (Todorova és mtsi, 1998).

1.2. Mikotoxinok

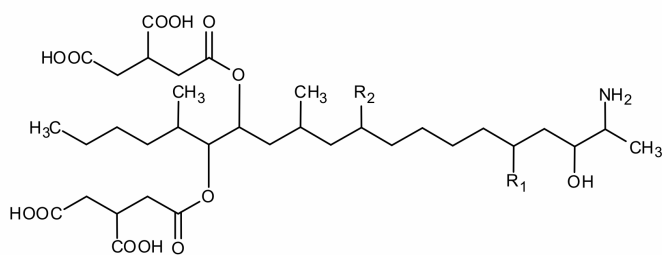
A mikotoxinok a fonalas gombák által termelt, általában másodlagos anyagcseretermékek, melyek az embert és/vagy az állatokat valamilyen módon károsítják. Általában nem sorolják közéjük a „kalapos gombák” toxinjait, a gombák által termelt antibiotikumokat és a növénykárosító toxinokat (fitotoxinok) (Varga és mtsi, 2009).

Egyes mikotoxinok kisebb mennyiségben fogyasztva is képesek azonnali hatásokat kiváltani, míg más mikotoxinok csak lassan fejtik ki hatásukat, karcinogenitásuk révén (Hansen, 2010). A mikotoxin mérgezéseket mikotoxikózisoknak nevezzük. A mikotoxikózisok szempontjából elsősorban a penészgombák jelentősek (főleg az Ascomycota törzs tagjai, pl.: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachybotrys* és *Claviceps* fajok) (Varga és mtsi, 2009).

A mikotoxinok vagy közvetlen szennyezésként vagy a mikotoxinnal szennyezett takarmánnyal táplált állatokból származó élelmiszerek révén, közvetve jutnak a táplálékunkba (Varga és mtsi, 2009).

1.2.1. Fumonizinek

A fumonizinek a poliketidek, ezen belül a nonaketidek közé tartoznak, mivel az alapvázat kilenc acetyl-KoA-ból (ebből nyolc malonil-KoA formájában lép be a reakcióba) állítja elő egy poliketid szintáz (Varga és mtsi, 2009).



	R ₁	R ₂	Összegképlet
Fumonizin B ₁	OH	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅
Fumonizin B ₂	OH	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄
Fumonizin B ₃	H	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄
Fumonizin B ₄	H	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃

3. ábra. Fumonizinek szerkezete

Több mint ötvenféle fumonizint azonosítottak már, ezek közül a B sorozatúak (3. ábra) a legfontosabbak (Gelderblom és mtsi, 1993, Bartók és mtsi, 2006), hiszen

tanulmányok kimutatták, hogy az idetartozó toxinok több fajra is toxikus hatásúak, valamint kukoricaminták fumonizinszennyezettségének jelentős hányadát is ők képviselték (Musser és mtsi, 1996). A legtöbb *Fusarium* faj esetén a legnagyobb mennyiségben a fumonizin B₁ (FB₁) termelődik. A teljes fumonizintartalom 70-80%-át teszi ki a FB₁, a FB₂ 15-25%-át adja, a FB₃ 3-8%-át, míg a FB₄ csupán elhanyagolható mennyiségben szokott jelen lenni rizs, kukorica vagy folyékony táptalajon nevelt tenyészetekben (Branham és Plattner, 1993, Marín és mtsi, 1995a, Marín és mtsi, 1995b).

A FB₁ egy diészter jellegű vegyület (a propán-1,2,3-trikarbonsav és a 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxiikozán diészterje) (Bezuidenhout és mtsi, 1988). A B sorozatú fumonizinek szerkezete csak az alapvázon található hidroxil csoportok számában és azok pozíciójában különböznek egymástól. 2010-ben felfedeztek egy új, a B sorozatba tartozó fumonizint, a FB₆-ot, mely a propán-1,2,3-trikarbonsav és a 2-amino-12,16-dimetil-3,4,5,14,15-pentahidroxiikozán diészterje (Månsson és mtsi, 2010).

1.2.1.1. Fumonizinek jelentősége, termelők

A fumonizineket *Fusarium verticillioides*-ből (= *Fusarium moniliforme*, teleomorfa: *Gibberella moniliformis*) izolálták, mely a kukorica elterjedt szántóföldi patogénje (Gelderblom és mtsi, 1988).

A fumonizinek több állati megbetegedés és kórkép kialakításában igazolt szerepet játszanak, ezek mellett epidemiológiai vizsgálatok szerint, emberi megbetegedések kialakításáért is felelősek lehetnek.

Elsőként a lovak agylágyulásánál (ELEM=equine leukoencephalomalacia) sikerült igazolni, hogy valóban a FB₁ felelős a betegségért (Marasas és mtsi, 1988, Kellerman és mtsi, 1990). A második betegség, melynél sikerült a FB₁ szerepét igazolni, a sertések tüdőödémája (PPE= porcine pulmonary edema) volt (Harrison és mtsi, 1990). A kérődző állatok viszonylag rezisztensek a toxinra, a magas FB₁-tartalmú takarmány etetése májelfajulást idézhet elő (Varga és mtsi, 2009).

A Dél-Afrika és Kína egyes régióiban relatíve nagy gyakorisággal észlelt nyelöcsőrák kialakulásában is valószínűleg szerepet játszanak a fumonizinek (Sydenham és mtsi, 1990, Chu és Li, 1994). 2002-ben a Nemzetközi Rákkutató Intézet (IARC) a FB₁-et lehetséges humán karcinogénnek (2B csoport) nyilvánította. További kutatások szerint, melyeket Kínában (Moore és mtsi, 1997), Dél-Afrikában (Ncayiyana, 1986) valamint

Texas és Mexikó határvidékén (Missmer és mtsi, 2006) folytattak, a nyelőcsőrák mellett velőcsőzáródási-rendellenességek kiváltásában is szerepet játszhatnak a fumonizinek.

A fumonizinek szerkezete hasonló a szfingolipid intermedierekéhez, ezáltal képesek gátolni a ceramid szintáz (Wang és mtsi, 1991), minek következtében a szfingolipid-anyagcsere felborul, megemelkedik a szfinganin és szfingozin mennyisége, és a szfingolipidek képződése gátolt. A szabad szfingoid bázisok feldúsulása apoptózist vált ki (Schmelz és mtsi, 1998), ezzel magyarázható a hepato- és nefrotoxikus hatás, valamint lehetséges, hogy ez a hatás felelős a daganatok kialakításáért (Howard és mtsi, 2001).

Fusarium fajok közül tizenötöt bizonyították, hogy fumonizintermelő (Rheeder és mtsi, 2002), ezek közül igazán kiemelkedő jelentőséggel két faj bír, a *F. verticillioides* és a *F. proliferatum*. Mind a *F. verticillioides*, mind a *F. proliferatum* izolátumok képesek nagy mennyiségben fumonizint termelni, világszerte ismert és gyakori kórokozói a kukoricának, valamint bizonyított szerepük van állatok mikotoxikózisában (Ross és mtsi, 1990). Általában a fumonizintermelő fajok izolátumainak kevesebb, mint 50%-a képes fumonizint termelni, kivéve a *F. verticillioides* és *F. proliferatum* izolátumokat, ahol a termelő izolátumok aránya magasabb (Nelson és mtsi, 1992).

A *Fusarium* fajok mellett *Aspergillus* fajok (*A. niger* és *A. awamori*) is képesek fumonizint termelni. Az *A. niger* fumonizintermelő-képességére úgy derült fény, hogy a genomjának vizsgálata során felfedeztek egy vélt fumonizin bioszintetikus génklasztert (Baker és mtsi, 2006, Pel és mtsi, 2007), ezt követően kísérletekkel is bizonyították, hogy ez a faj képes fumonizint termelni (Frisvad és mtsi, 2007).

2001-ben három *Tolypocladium* fajról is kiderült, hogy képes fumonizineket termelni, ezek a *T. inflatum*, a *T. geodes* és a *T. cylindrosporum*. A termelőképesre ciklosporint termelő törzsek különböző toxinokra történő ellenőrzőszűréskor derült fény (Mogensen és mtsi, 2011).

1.2.1.2. Fumonizinek bioszintézise

Ebben a fejezetben először egy áttekintő képet kívánok adni a fumonizinek bioszintézisééről, majd részletesebben jellemzem a hús szénatomos alapváz létrehozásában szerepet játszó enzimeket.

A bioszintézis első lépéseként egy 10,14-dimetil-oktadekánsavat (fumonizinben a két metil csoport 12. és 16. szénatomnál található) hoz létre a FUM1 által kódolt poliketid szintáz (Proctor és mtsi, 1999), melyhez egy oxoamin oxidáz (FUM8) kapcsol további két

szénatomot és egy aminocsoportot, melyek alaninból származnak (Branham és Plattner, 1993), így kialakítva az alapvázként szolgáló 2-amino-3-oxo-12,16-dimetil-ikozánt.

Az ezt követő redukciós lépés és oxidációs lépések sorrendiségét, ha egyáltalán van ilyen, még nem sikerült megállapítani. A redukciós lépés során egy dehidrogenáz a 3. szénatomnál található karbonil csoportot redukálja hidroxil csoporttá (Butchko és mtsi, 2003). Az oxidációs lépések során oxigenázok létrehozzák a hidroxil csoportokat (5., 10., 14. és 15. C-atomnál) molekuláris oxigén felhasználásával (Caldas és mtsi, 1998). Az oxigenázok közül egyet fontos kiemelni, a FUM2 (FUM12) gén által kódolt citokróm P450 monoxigenázt, mivel ez az enzim felelős a 10. szénatom hidroxil csoportjának létrehozásáért (Proctor és mtsi, 2006, Desjardins és mtsi, 1996). Ennek a hidroxil csoportnak megléte különbözteti meg a FB₁-et a FB₂-től (illetve a FB₃-at a FB₄-től).

Végül három enzim felelős a 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxiikozán és a két trikarbalilsav közötti észterkötés létrehozásáért, valamint egy trikarbalilsav transzporter enzim is fontos a megfelelő fumonizintermelésben (Butchko és mtsi, 2006).

A szintézisben az első lépést a FUM1 gén (2003-ig FUM5 névre hallgatott, ekkor nevezték át) által kódolt enzim katalizálja. A FUM1 gén egy I-es típusú iteratív poliketid szintázt kódol, ez a típus a gerincesek zsírsavszintázaival analóg, ezek nagy multidomén enzimek, melyek a szintézis során szükséges összes aktívhelyet tartalmazzák (Proctor és mtsi, 1999). A szintáz a következő hét doménből épül fel (Proctor és mtsi, 1999):

- Keto-szintáz (KS), mely a lánchosszabítási lépéseket katalizálja
- Acil-transzferáz (AT), mely a kezdő és intermedier acilegységek kötéséért felelős
- Keto-reduktáz (KR), mely a keto csoportot hidroxil csoporttá redukálja
- Dehidratáz (DH), mely dehidratálja a hidroxil csoportot enoil csoporttá
- Enoil-reduktáz (ER), mely a kettős kötést redukálja
- Metil-transzferáz (MeT), mely a két metil csoport kialakításáért felelős (Yu és mtsi, 2005)
- Acilszállító protein (ACP), mely a növekvő terméket tartja kötve tioészterként.

A kellő hosszúságú lánc szintézise úgy valósul meg, hogy a fentebb említett domének egymás után több ciklusban is katalizálják a reakciókat, iteratív módon. Az enzimből hiányzik a tioészteráz/cikláz (TE/CYC) domén, mely más poliketid szintázok esetén a termék hosszát illetve leválását szabályozza, így ebben az esetben szükség van egy újabb fehérjére, mely katalizálja ezen folyamatokat (Du és mtsi, 2008).

A lánchosszat szabályozó és leválást katalizáló fehérje, mely második a bioszintézisben, a FUM8 gén által kódolt enzim, mely egy α -oxoamin szintáz (II-es típusú aminosztransferáz). Ezen enzimek csoportja katalizálja aminosavak és acil-KoA szubsztrátok kondenzációját (Seo és mtsi, 2001). A FUM8 esetében a szubsztrátok az acil-S-ACP és az alanin. A reakció végterméke egy 2-amino-3-oxo-12,16-dimetil-ikozán.

1.2.1.3. A fumonizin bioszintézis génklaszter felépítése

A bioszintézisért felelős génklasztert *Fusarium verticillioides*-ben fedezték fel, mikor a FUM1 gén sikeres klónozása után a génnel szomszédos 75kb-os régió szekvenciáját meghatározták (Proctor és mtsi, 1999). A korai vizsgálatok során tizennégy, a FUM1 génnel határos gént találtak, melyek közösen fejeződnek ki (Proctor és mtsi, 2003). Későbbi vizsgálatok során további két gént (FUM20 és FUM21) fedeztek fel (Brown és mtsi, 2005, Brown és mtsi, 2007), mivel ezen géneket azután írták le, hogy más fajokban is azonosították volna a klasztert (Waalwijk és mtsi, 2004), ezért az összehasonlítások a 15 génes FUM génklaszterről szólnak.

A *Fusarium verticillioides* FUM génklasztert alkotó gének és az általuk kódolt enzimek: FUM1 (FUM5) egy iteratív poliketid szintáz (Proctor és mtsi, 1999), FUM2 (FUM12) egy citokróm P450 monooxygenáz (Proctor és mtsi, 2003), FUM3 (FUM9) egy dioxigenáz, FUM6 egy citokróm P450 monooxygenáz, FUM7 egy dehidrogenáz, FUM8 egy aminosztransferáz (Seo és mtsi, 2001), FUM10 egy zsírsav acil-KoA szintetáz, FUM11 egy trikarbalsav transzporter, FUM13 egy dehidrogenáz/reduktáz, FUM14 egy NRPS-szerű kondenzációs domén, FUM15 egy citokróm P450 monooxygenáz, FUM16 egy zsírsav acil-KoA szintetáz, FUM17 és FUM18 két ceramid szintáz, FUM19 ABC-transzporter (Proctor és mtsi, 2003), FUM 20 egy rövid fehérje, ismeretlen funkcióval, FUM21 egy transzkripciós faktor (Brown és mtsi, 2005, Brown és mtsi, 2007).

A fumonizin bioszintézis génklasztert felépítő tizenhét gén közül nem szükséges valamennyi a fumonizintermeléshez. A FUM16 olyan enzimet kódol, mely által katalizált reakciót más enzim is képesek katalizálni, ezért e gén kiütése nem változtat a fumonizintermelésen (Butchko és mtsi, 2006). Míg a FUM17 és a FUM18 által kódolt ceramid szintázok egyáltalán nem is vesznek részt a szintézis folyamatában, és kiütésük esetén nem változik a termelt fumonizin mennyiség (Proctor és mtsi, 2003). Ezek a géntermékek valószínűleg a termelőgomba fumonizin rezisztenciáért felelősek. Itt kell megemlítenünk a FUM20 gént, mely ismeretlen funkciójú és szintén nem hat a termelésre.

Ezek mellett a FUM11 és a FUM19 olyan gének, melyek ugyan nem esszenciálisak a fumonizin szintézisben, de kiütésük megváltoztatja a termelt fumonizin izomerek arányát. (Butchko és mtsi, 2006, Proctor és mtsi, 2003)

Az *A. niger* FUM génklaszteréből hiányoznak a FUM2, a FUM11, a FUM16, a FUM17 és a FUM18 gének (ezek a források nem említik a FUM20 és a FUM21 gének meglétét vagy hiányát) (Pel és mtsi, 2007). A FUM2 gén hiánya egyértelmű magyarázatot ad arra, hogy az *Aspergillus* fajok, miért nem képesek FB₁ és FB₃ termelésére (a Fum2p felelős a 10-hidroxil csoport létrehozásáért) (Proctor és mtsi, 2006). A másik négy gén hiánya igazolja, hogy nem szükségesek a fumonizintermelésben, mint ahogy az már említésre került. Érdekes módon olyan ORF-ek (nyitott leolvasási keretek) is találhatók az *Aspergillus* fumonizin génklaszterben, melyek a *Fusarium* fajokéban nincsenek meg. Tartalmaz egy második poliketid szintáz gént, egy 3-ketoreduktáz gént, egy alkalikus fitoceramidáz gént, egy MFS transzporter génjét és négy ismeretlen funkciójú gént (Baker és mtsi, 2006).

2. Célkitűzések

Első célunk törzsgyűjteményekből származó *Tolypocladium* izolátumok fumonizintermelő-képességének vizsgálata HPLC-MS technikával. Az eddig végzett kutatások három faj (*T. cylindrosporum*, *T. geodes* és *T. inflatum*) esetében számoltak be pozitív eredményről. Munkánk során a három, már igazoltan fumonizineket termelő fajon kívül öt másik *Tolypocladium* faj (*T. extinguens*, *T. lignicola*, *T. nubicola*, *T. parasiticum* és *T. tundrense*) törzseit is vizsgálni kívánjuk. Munkánk során a termelt toxinok jelenléte mellett azok mennyiségét is meghatározzuk.

Második célunk annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a FUM1 génre, mint a fumonizin bioszintézis esszenciális enzimjének génjére, tervezett PCR-vizsgálat eredménye tükrözi-e az adott törzs fumonizintermelő-képességét.

Harmadik célunk a *Tolypocladium* izolátumokból származó FUM1 génszakaszok összevetése korábban vizsgált *Aspergillus* és *Fusarium* fajokból nyert FUM1-szekvenciákkal. Itt leginkább arra vagyunk kíváncsiak, hogy ez a gén alkalmas-e a fumonizintermelő gombák nemzetség- illetve fajsztípus elkülönítésére.

Végül a kapott törzsfát összevetjük az ITS-szekvenciák alapján felállított törzsfával, hogy megállapíthassuk, mennyire hűen tükrözi a FUM1-szekvenciákon alapuló filogenetikai törzsfá a rokonsági kapcsolatokat a *Tolypocladium* nemzetségen belül.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Táptalajok

YPD tápoldat: 1%, élesztő kivonat, 1% pepton, 1% glükóz

YPD táptalaj: 1%, élesztő kivonat, 1% pepton, 1% glükóz, 2% agar

YES agar táptalaj: 2%, élesztő kivonat, 15% szacharóz, 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,0005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% agar

3.2. Gomba törzsek

A vizsgált *Tolypocladium* törzseket törzsgyűjteményekből rendeltük (1. táblázat).

1. táblázat. Felhasznált *Tolypocladium* törzsek

Fajnév	Törzsszám
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 614.80
	CBS 719.70
	CCF 1450/95
	CCF 2531/94
	CCF 3237/01
<i>T. extinguens</i>	CBS 345.77
<i>T. geodes</i>	CBS 721.70
	CCF 2548/93
	CCF 2579/93
	CCF 3299/03
<i>T. inflatum</i>	CBS 670.83
	CCF 3896/09
<i>T. lignicola</i>	CBS 489.83
<i>T. nubicola</i>	CBS 944.72
<i>T. parasiticum</i>	CBS 300.83
<i>T. tundrense</i>	CBS 569.84

A kísérletekben használt *Fusarium verticillioides* és *F. proliferatum* törzseket (Ég Fig, Fus1, Fus33, Fus46, Fus47, Fus60) magyarországi kukoricáról izolálták, kivéve a

Fus139 törzset, melyet törzsgyűjteményből rendeltünk (CBS 139.40). A vizsgálatba bevont *Aspergillus niger* és *A. awamori* törzseket mazsoláról izolálták (Varga és mtsi, 2010). A mazsola minták különböző országokból (Törökországból, az USA-ból, illetve Hollandiában kereskedelmi forgalomban kapható ismeretlen származási helyű mazsolákról) származtak.

3.3. A micélium felszaporítása és a sejtek feltárása

A. niger és *A. awamori* (valamint az Ég FIG törzs) micéliumokat 40 ml YPD tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikokban kettő napig 25 °C-on rázatva (120-150 rpm) tenyésztettük. A tiszta *Fusarium verticillioides* (kivéve Ég FIG) micéliumokat 20 ml YPD tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikokban ugyanilyen eljárással tenyésztettük.

A. niger és *A. awamori* minták esetén a micéliumokat szűrővel választottuk el a tápoldattól. Az Ég FIG törzs esetén a tenyészetet centrifuga-félkémcsőbe áthelyeztük, és 3000 rpm fordulaton 5 percen keresztül centrifugálva különítettük el a micéliumot a tápoldattól, ezután a felülúszót leszívtuk, és a tömény micélium szuszpenziót kipipettáztuk. A micéliumokat fagyasztottuk (-20 °C), majd egy éjszakán át liofilizáltuk, és folyékony nitrogén adagolásával dörzsmozsárban finomporrá dörzsöltük.

Tolypocladium fajok esetén a törzseket YPD táptalajra szélesztettük és néhány hétig 25 °C-on tenyésztettük. Ezt követően spatulával micéliumot gyűjtöttünk Eppendorf csövekbe a csészék felszínéről. A csövekbe 500-500 µl bidesztillált vizet mértünk. Majd 70 °C-ra melegítettük, és vártunk, amíg az agar felolvadt, ezután vortexeltük a mintákat. Végül 10 percen keresztül 13000 rpm fordulaton centrifugáltuk a mintákat és a felülúszót pipetta segítségével eltávolítottuk.

3.4 Molekuláris vizsgálatok

3.4.1. DNS-kivonás

Felhasznált oldatok, eszközök:

Epicentre Biotechnologies® MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit

TAE: 40mM Tris, 20mM ecetsav, 1 mM Na₂EDTA pH 8,0

Agaróz (SeaKem LE)

Mintafelvivő puffer: 6X DNA Loading Dye™ (Fermentas)

GelGreen™ fluoreszcens nukleinsav-jelölő festék (Biotium)

Steril bidesztillált víz: Millipore Milli-Q plus 185

A DNS-kivonáshoz az Epicentre Biotechnologies® MasterPure™ Yeast DNA Purification készletet használtuk. A protokollban (<http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/masterpure-yeast-dna-purification-kit.pdf>) javasoltaktól eltértünk abban, hogy a DNS-t nem TE pufferben, hanem 50 µl steril bidesztillált vízben vettük fel. Mintáinkat nem kezeltük RNázsal. Kivonatainkat mélyhűtőben tároltuk -20 °C-on. A DNS-kinyerés sikerességét gélelektroforézis segítségével igazoltuk.

3.4.2. Gélelektroforézis

A DNS-mintákat 1 %-os agaróz gélen futtattuk meg horizontális gélelektroforézis készülék segítségével. Az agarózt a hígított TAE pufferhez adtuk, és mikrohullámú sütőben addig melegítettük, amíg az agaróz teljesen fel nem oldódott. A fragmentumok láthatóvá tételéhez 3 µl GelGreen™ nukleinsav festéket (Biotium) használtunk 100ml gélben. A mintáinkat 90 V feszültséggel futtattuk 10-15 percig. A fluoreszcens festékkel festet fragmentumok láthatóvá tételéhez, UV fény helyett, a Clare Chemical Research által gyártott Dark Reader® transilluminatort használtuk.

3.4.3. DNS-szakaszok amplifikálása PCR segítségével

Felhasznált oldatok, eszközök

Kétszeres töménységű PCR Master Mix (Fermentas)

100 mM-os dNTP oldat (Sigma-Aldrich)

Tízszeres töménységű DreamTaq Buffer (includes 20 mM MgCl₂) (Fermentas)

DreamTaq DNA Polymerase (5 U/μl) (Fermentas)

Steril bidesztillált víz: Millipore Milli-Q plus 185

FUM1-F2 és FUM1-R2 indítószekvenciák

FUM1-F2: 5'-YCNGGYRGNCAYGACTTTGC-3'

FUM1-R2: 5'-DGARCTDGGCATNGACATDCC-3'

A FUM1 PCR reakcióelegy összetétele

4 μl FUM1-F2 indítószekvencia

4 μl FUM1-R2 indítószekvencia

11 μl kétszeres töménységű PCR Master Mix (Fermentas)

1 μl hígított templát DNS

A FUM1 PCR-program

A kívánt génszakasz sokszorozására a Bio-Rad cég MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler készülékét használtuk. A reakciót harmincöt ciklusban (2-4. lépések) hajtottuk végre, lépései a következők voltak:

1. elődenaturáció: 2 perc, 94 °C
2. denaturáció: 10 másodperc, 94 °C
3. hibridizáció: 15 másodperc, 54 °C
4. polimerizáció: 20 másodperc, 72 °C
5. utópolimerizáció: 1 perc, 72 °C

ITS4 és ITS5 indítószekvenciák

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

A ITS PCR reakcióelegy összetétele

4 µl ITS4 indítószekvencia

4 µl ITS4 indítószekvencia

4 µl dNTP oldat

2 µl tízszeres töménységű DreamTaq Buffer (includes 20 mM MgCl₂)

0,2 µl DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)

5 µl steril bidesztillált víz

1 µl hígított templát DNS

A ITS PCR-program

A kívánt génszakasz sokszorozására a Bio-Rad cég MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler készülékét használtuk. A reakciót harmincöt ciklusban (2-4. lépések) hajtottuk végre, lépései a következők voltak:

1. elődenaturáció: 2 perc, 94 °C
2. denaturáció: 10 másodperc, 94 °C
3. hibridizáció: 15 másodperc, 58 °C
4. polimerizáció: 20 másodperc, 72 °C
5. utópolimerizáció: 1 perc, 72 °C

3.4.4. Az amplifikált DNS-szakaszok szekvencia-meghatározása

A PCR-reakció segítségével felsokszorozott DNS-szakaszok szekvenciáit a Bay Zoltán Intézet határozta meg számunkra.

3.4.5. Szekvenciák feldolgozása

A szekvenciákat a BioEdit nevű programmal jelenítettük meg. A szekvencia illesztéseket a MUSCLE (**M**ultiple **S**equences **C**omparison by **L**og-**E**xpectation) programmal végeztük, a tapasztalt szekvencia-eltéréseket a BioEdit programmal megtekintett kromatogramokkal hitelesítettük. A törzsfák elkészítéséhez MEGA5 nevű programot használtuk (Tamura és mtsi, 2011).

A törzsfákat neighbor-joining módszer segítségével állítottuk fel, bootstrap értékek kiszámításához ezer ismétlést állítottunk be. Az összes általunk vizsgált FUM1-szekvenciát tartalmazó fánál az *Alternaria alternata* (ALT1 gén, AB465680.1) volt a kulcsoport, míg a másik két fa esetén *Fusarium verticillioides* CBS 139.40-as törzsét használtuk kulcsoportként.

3.5. Mikotoxin-kimutatás

3.5.1. Fumonizin-kivonás

A vizsgált törzseket YES agar táptalajon tenyésztettük. A törzseket 25 °C-on inkubáltuk két hétig. Dugófúróval hat darab 12 mm átmérőjű agarkorongokat vágunk ki csészénként. Ezeket 15 ml-es centrifugacsövekbe helyeztük, majd metanol és víz (3:1) elegyből 6 ml-t mértünk rá. A mintákat 2 percen keresztül UltraTurrax nagysebességű homogenizátor (IKA, Staufen, Germany) segítségével homogenizáltuk 20000 rpm fordulaton. A mintákat kétszer 5 percig ultrahanggal kezeltük. Ezt követően minden mintához újabb 4 ml metanol és víz (3:1) elegyet adtunk és 2 órán keresztül átfordulós rázógéppel ráztuk. Majd 5 percig 9000 rpm fordulaton centrifugáltuk a mintákat. Végül a felülúszóból 1 ml-t átmértünk mikrocentrifuga csövekbe.

3.5.2. Fumonizin-tartalom meghatározása

A meghatározás HPLC-MS (tömegspektrometriával kapcsolt nagy teljesítményű folyadékkromatográfia) módszerrel történt, Agilent 1100 Series HPLC Quaternary pump, well-plate autosampler, column thermostat, vacuum degasser (Waldbronn, Germany) készülékkel.

A HPLC elválasztást Phenomenex, Kinetex C18 (Torrance, California, USA) (50 mm x 4,6 mm, 2,6 µm) HPLC oszlopokon 0,8 µl/perc áramlási sebességgel végeztük. 1-1 µl befecskendezett mintával végeztük el a vizsgálatot. A 2. táblázat tartalmazza az oldószergrádiens tulajdonságait.

2. táblázat. Oldószergrádiens

Idő (perc)	desztillált víz + 0,1 % HCOOH (%)	MeCN + 0,1 % HCOOH (%)
0	76	24
3	47,5	52,5
5	0	100
9	0	100
11	76	24

Az elválasztott vegyületeket Agilent 1946 MSD (Waldbronn, Germany) készülékkel detektáltuk, melyhez egy ESI forrás volt csatlakoztatva. Az ESI-MS paraméterei: a szárítógáz (N₂) sebessége 12 l/perc, a szárítógáz hőmérséklete 350 °C, a porlasztógáz (N₂) nyomása 35 psi, az iontranszfer-kapilláris feszültsége 3000 V, a fragmentor feszültség 70 V volt. A méréseket kiválasztott ionfigyelés (SIM) mellett végeztük, és az 1x-esen pozitívtöltésű molekulaikat ([M+H]⁺) detektáltuk. A kiválasztott ionok: *m/z* 690 (FB₄), *m/z* 706 (FB₂₋₃), *m/z* 722 (FB₁).

A különböző fumonizin-izomerek mennyiségének meghatározásához tizennégy pontos kalibrációt készítettünk a FB₂-re a 25-500000 pg tartományban. A kalibrációs görbe a 25-25000 pg tartományban volt lineáris. Az egyenes egyenlete a következő volt: $Y = 17,043149 X + 1636,5548$ (Y = csúcsterület, X = injektált mennyiség). A korreláció értéke 0,99964 volt.

Az eredményeket µg/kg-ban tüntettük fel a dolgozatban, a számítás illetve az eredeti mennyiségek a függelékben találhatóak.

A FB₂ tekintetében a LOD („limit of detection”) és a LOQ („limit of quantitation”) értéke 6 ng/ml illetve 13 ng/ml volt.

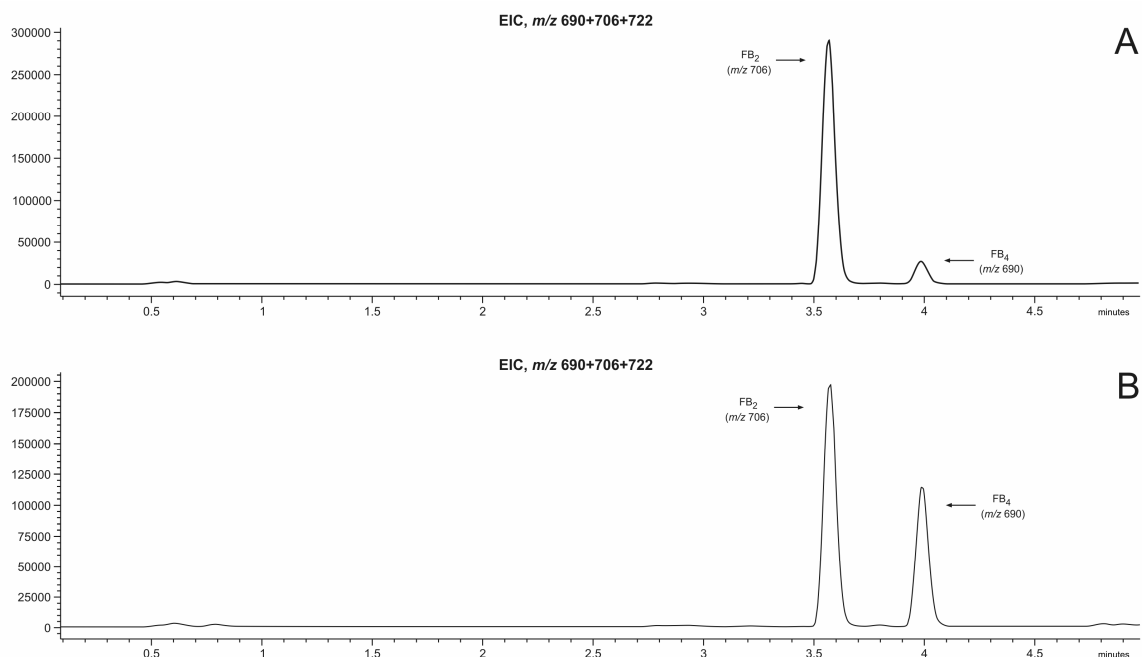
4. Eredmények és értékelés

4.1. A törzsek fumonizintermelő-képessége

A munkánk során tanulmányozott tizenhat *Tolypocladium* törzs (nyolc faj) közül tizenkettőnek (öt faj) vizsgáltuk a fumonizintermelő-képességét (2. táblázat). Két törzs által termelt fumonizin-izomerekről készített HPLC kromatogram a 4. ábrán látható. Korábbi eredményeknek megfelelően három faj bizonyult fumonizintermelőnek: a *T. cylindrosporum*, a *T. geodes* és a *T. inflatum* (Mogensen és mtsi, 2011). A *T. extinguens* és *T. tundrense* fajoknál nem sikerült fumonizineket kimutatni. Azonban további három faj (*T. lignicola*, *T. nubicola* és *T. parasiticum*) illetve egy *T. cylindrosporum* törzs vizsgálata még folyamatban van.

3. táblázat. Tolypocladium törzsek által termelt fumonizinek (n/a: nincs adat)

Fajnév	Törzsszám	A detektált fumonizin-izomerek mennyisége (µg/kg)		
		FB ₂	FB ₄	Teljes FB-tartalom
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 614.80	52442,35	14641,18	67083,53
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 719.70	1052,94	1097,06	2150,00
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 1450/95	n/a	n/a	n/a
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 2531/94	42309,41	29264,12	71573,53
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 3237/01	39512,35	16538,82	56051,18
<i>T. extinguens</i>	CBS 345.77	-	-	-
<i>T. geodes</i>	CBS 721.70	1468,82	487,06	1955,88
<i>T. geodes</i>	CCF 2548/93	9557,65	629,41	10187,06
<i>T. geodes</i>	CCF 2579/93	12176,47	2013,53	14190,00
<i>T. geodes</i>	CCF 3299/03	687,65	80,59	768,24
<i>T. inflatum</i>	CBS 670.83	308145,29	164636,47	472781,76
<i>T. inflatum</i>	CCF 3896/09	507151,18	34692,35	541843,53
<i>T. lignicola</i>	CBS 489.83	n/a	n/a	n/a
<i>T. nubicola</i>	CBS 944.72	n/a	n/a	n/a
<i>T. parasiticum</i>	CBS 300.83	n/a	n/a	n/a
<i>T. tundrense</i>	CBS 569.84	-	-	-



4. ábra. *T. inflatum* CCF 3896/09-es törzs (A) illetve *T. cylindrosporum* CBS 614.80-as törzs (B) által termelt fumonizin-izomerek

Korábbi eredményekkel ellentétben, vizsgálataink során minden FB₂-termelő törzs FB₂ mellett FB₄-et is képes volt termelni. A három faj közül a *T. inflatum* képes legnagyobb mennyiségben fumonizineket termelni.

4.2. A DNS alapú vizsgálatok eredményei

4.2.1. A FUM1 génre tervezett PCR-teszt, és a fumonizintermelő-képesség

A FUM1 génre tervezett PCR-reakció tizenkettő törzs esetében adott pozitív eredményt (3. táblázat), azonban ezek közül csak tizenegy törzsből nyert génszakasz szekvenciáját sikerült meghatározni (egyik *T. cylindrosporum* génszakasza még meghatározásra vár). A három fumonizintermelő faj minden izolátuma (tizenegy törzs) hordozta a FUM1 gént, továbbá sikerült kimutatni ezt a gént *T. tundrense* esetében is (3. táblázat).

A PCR-teszt eredményei jórészt összhangban vannak az analitikai vizsgálatok eredményeivel, kivéve a *T. tundrense* fajt. Előfordulhat, hogy a *T. tundrense* faj valójában fumonizintermelő, mivel a termelőfajok esetén is vannak olyan törzsek, melyek nem képesek fumonizineket termelni, és lehetséges, hogy munkánk során egy ilyen törzset

vizsgáltunk. A fumonizintermelő *Fusarium* fajok, kivéve a *F. proliferatum* és *F. verticillioides* fajok, esetén is az izolátumok kevesebb, mint fele képes fumonizinek termelésére (Nelson és mtsi, 1992). Az sem zárható ki, hogy az általunk vizsgált törzs képes fumonizineket termelni, ugyanis különböző fajok nem azonos körülmények hatására termelnek toxinokat (Frisvad és mtsi, 2007). Végül az is lehetséges, hogy a *T. tundrense* faj egyáltalán nem képes fumonizinek termelésre, annak ellenére, hogy genomjában megtalálható a FUM1 gén általunk vizsgált szakasza. A PCR-teszt eredménye nem jelenti, hogy ez egy működőképes gén, lehetséges, hogy csak pszeudogén vagy géntöredék. A működőképes FUM1 gén jelenléte önmagában még szintén nem elégséges a fumonizintermeléshez, ugyanis csak a kezdőlépést katalizálja a hosszú bioszintézisláncban. Annak eldöntésére, hogy a fentiek közül melyik feltételezés a helyes, további vizsgálatokra van szükség több *T. tundrense* törzs bevonásával, illetve különböző körülmények között is meg kell vizsgálni a termelőkéességet.

4. táblázat. A törzsek fumonizintermelő-képessége és a FUM1 génre tervezett PCR-tesztek eredménye (n/a: nincs adat)

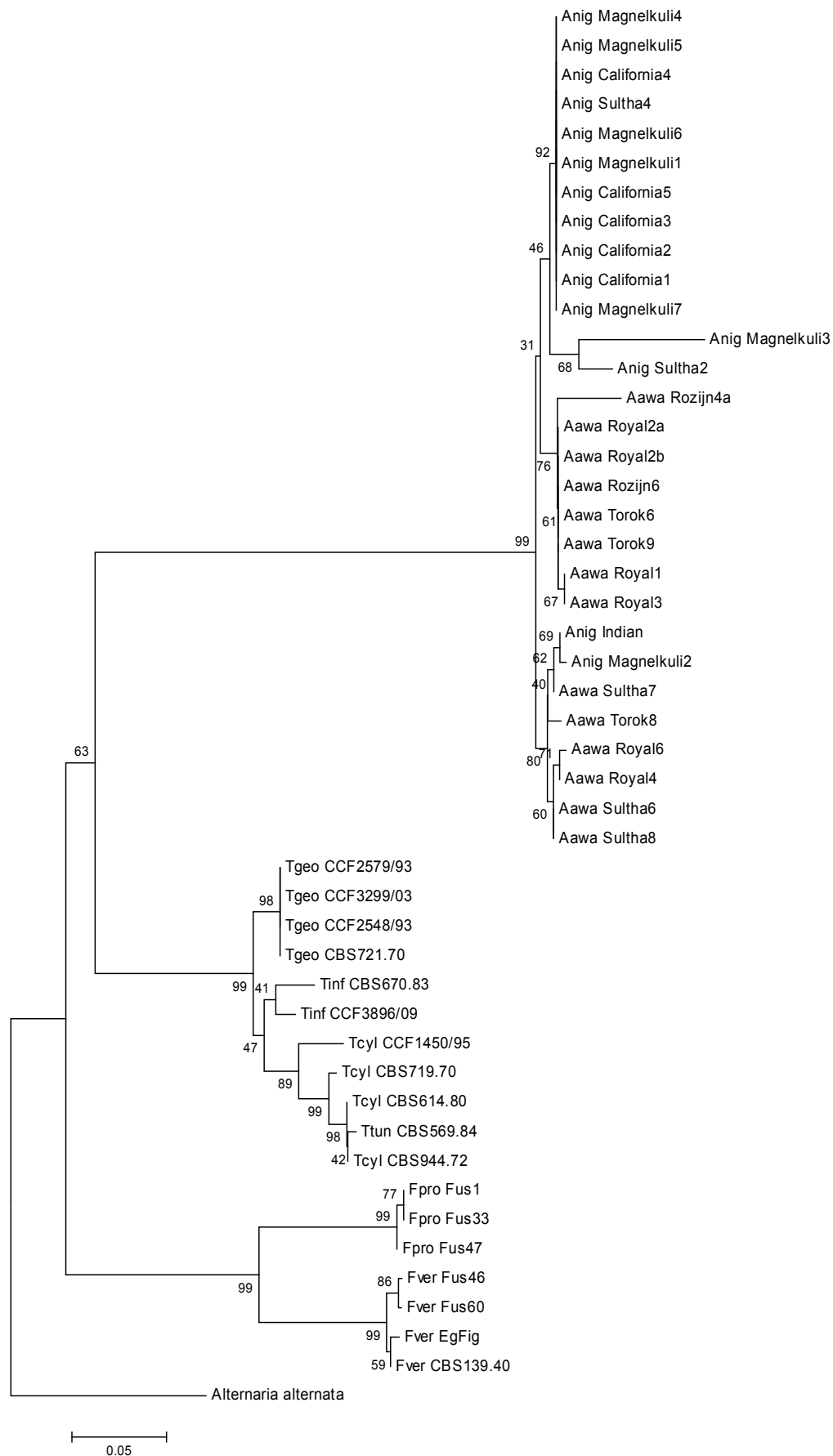
Fajnév	Törzsszám	Fumonizintermelés	FUM1
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 614.80	Van	+
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 719.70	Van	+
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 1450/95	n/a	+
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 2531/94	Van	+
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 3237/01	Van	+
<i>T. extinguens</i>	CBS 345.77	Nincs	-
<i>T. geodes</i>	CBS 721.70	Van	+
<i>T. geodes</i>	CCF 2548/93	Van	+
<i>T. geodes</i>	CCF 2579/93	Van	+
<i>T. geodes</i>	CCF 3299/03	Van	+
<i>T. inflatum</i>	CBS 670.83	Van	+
<i>T. inflatum</i>	CCF 3896/09	Van	+
<i>T. lignicola</i>	CBS 489.83	n/a	-
<i>T. nubicola</i>	CBS 944.72	n/a	-
<i>T. parasiticum</i>	CBS 300.83	n/a	-
<i>T. tundrense</i>	CBS 569.84	Nincs	+

4.2.2. A FUM1 gén filogenetikai vizsgálata

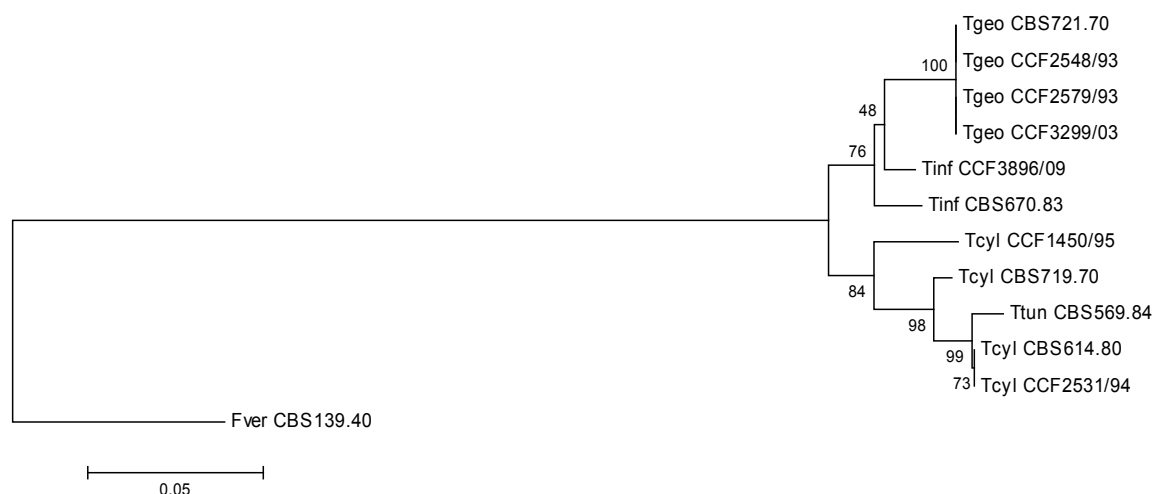
Jelenlegi munkánk során tizenegy *Tolypocladium* törzsből sikeresen meghatároztuk a FUM1 gén egy szakaszát, melyeket PCR segítségével nyertünk. Ezek mellett tizennégy *Aspergillus awamori*, tizenöt *A. niger*, három *Fusarium proliferatum* illetve négy *F. verticillioides* törzsből is izoláltuk és megszekvenáltuk a vizsgált génszakaszt.

A rendelkezésünkre álló FUM1-szekvenciák alapján felállított törzsfán (5. ábra) mind a három nemzetség jól elkülönült egymástól. Ezen a fán a *Fusarium* fajok jól elkülönülnek egymástól, azonban ez nem volt elmondható az *Aspergillus* izomátumokról. A *Tolypocladium* fajok közül a *Tolypocladium geodes* törzsek és a többi *Tolypocladium* törzs is határozottan elválnak. A *T. inflatum* törzsek is elkülönülnek a *T. cylindrosporum* illetve a *T. tundrense* törzsektől, de ennek csupán alacsony támogatottsága volt (47% bootstrap, 5. ábra).

Amennyiben a *Tolypocladium* fajokból nyert szekvenciákat illetve kulcsoportként egy *F. verticillioides* szekvenciáját használtuk fel törzsfá számításához (6. ábra), csak a *T. geodes* törzsek különültek el a többi *Tolypocladium* fajtól. Azonban a *T. tundrense* és a *T. cylindrosporum* fajok csoportja mindkét fán monofiletikus.



5. ábra. A FUM1 génszakasz alapján felállított filogenetikai fa

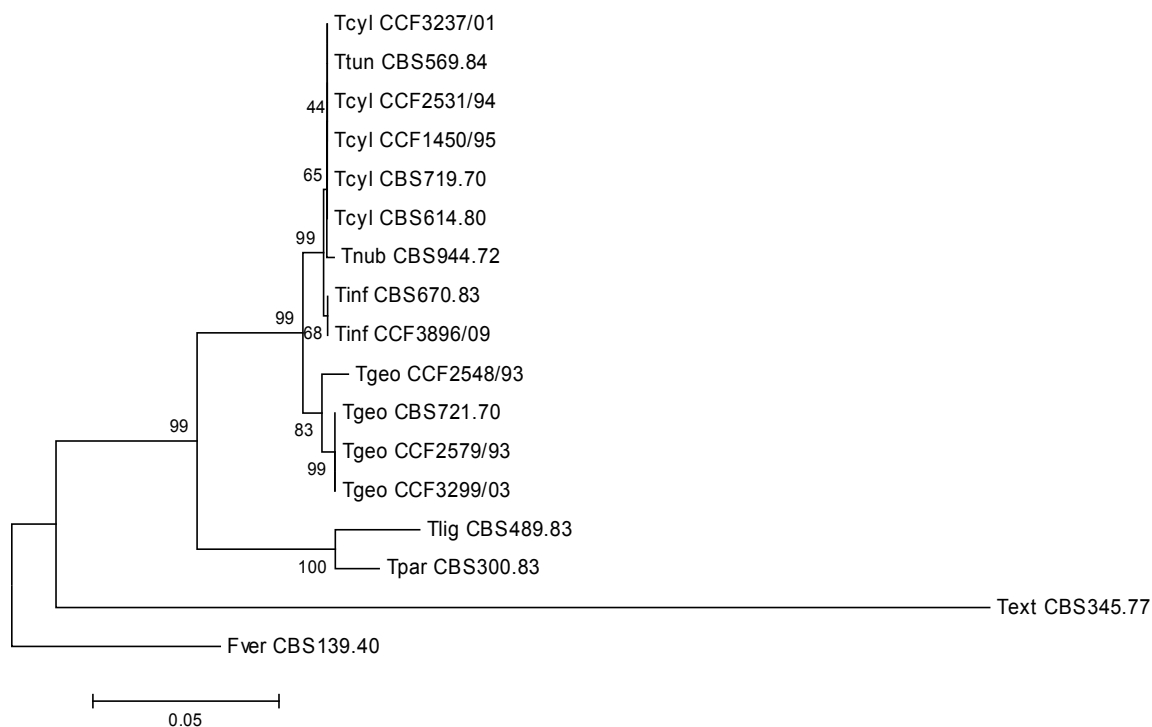


6. ábra. A *Tolypocladium* törzsek FUM1 génszakasza alapján felállított filogenetikai fája

4.2.3. Az ITS-régió filogenetikai vizsgálata

Az ITS-régióra tervezett PCR-reakció mind a tizenhat törzs esetében pozitív eredményt adott, és minden törzsből nyert DNS-szakasz szekvenciáját sikerült meghatározni.

Az ITS-szekvenciák alapján felállított törzsfán (7. ábra) egymástól jól elkülönülnek a különböző *Tolypocladium* fajok, kivétel a *T. tundrense*, amely a *T. cylindrosporum* izolátumokkal azonos kládba került. A *T. extinguens* látványosan elkülönül a többi fajtól. Ez az eredmény megfelel a korábbi rRNS génszakasz felhasználásával végzett kutatásoknak, melyek szintén úgy találták, hogy a *T. extinguens* túlságosan nagy eltérést mutat a többi *Tolypocladium* fajhoz képest (Rakotonirainy és mtsi, 1991).



7. ábra. A *Tolypocladium* törzsek ITS-szekvencia adatai alapján felállított filogenetikai fája

A *T. parasiticum* illetve a *T. lignicola* is határozottan elkülönült a többi fajtól, ez az eredmény szintén megfelel korábbi kutatási eredményeknek. Stensrud és munkatársai (2005) is úgy találták, hogy a *T. parasiticum* ITS-régiója nagyban eltér a többi általuk vizsgált *Tolypocladium* faj (*T. cylindrosporum*, *T. geodes*, *T. inflatum*, *T. nubicola* és *T. tundrense*) ITS-régiójától. Egy másik cikkben javasolták, hogy a *T. parasiticum*-ot nevezzék át *Pochonia parasitica* névre (Sung és mtsi, 2007). Ezen eredmények alapján érdemes a *T. lignicola* filogenetikai hovatartozását is mélyebben tanulmányozni.

5. Összefoglalás

Az általunk vizsgált tizenhat *Tolypocladium* törzs közül tizenkettőnek megvizsgáltuk HPLC-MS technikával a fumonizintermelő-képességét. A vizsgált öt faj közül három bizonyult termelőnek: *T. cylindrosporum*, *T. geodes* és *T. inflatum*. A három termelőfaj közül a *T. inflatum* képes legnagyobb mennyiségben fumonizeneket termelni. Ez az eredmény megfelel a korábbi kutatások eredményeinek (Mogensen és mtsi, 2011). Az általunk mért *T. inflatum* törzsek által termelt teljes fumonizin mennyiségek ($118,44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ és $135,74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) jóval meghaladták az említett kutatás során mért maximális termelést ($30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), ami valószínűleg a hosszabb (14 napos) tenyésztési időnek tudható be. Az általunk vizsgált fumonizintermelő törzsek mindegyike képes volt mind FB₂, mind FB₄ termelésére. Míg az említett kutatásban több *T. geodes* törzs esetében csak FB₂-t mutattak ki.

A FUM1 génre tervezett PCR vizsgálatok és a törzsek fumonizintermelő-képességének összevetése alapján elmondhatjuk, hogy pozitív PCR teszt nem jelenti, hogy az adott törzs képes fumonizineket termelni, de az összes vizsgált termelőfaj összes vizsgált törzse pozitív eredményt adott a PCR tesztre. Az általunk vizsgált *Aspergillus* törzsek mindegyikéből sikerült kimutatnunk a FUM1 gént, még a nem termelőkből is. Ezek alapján a FUM1 génre tervezett PCR teszt nem alkalmas a törzsek fumonizintermelő-képességének előrejelzésére. Azonban, mivel a termelőfajok minden törzse, még a nem termelők is, pozitív eredményt ad, ezért alkalmas lehet potenciálisan fumonizintermelő fajok azonosítására. Az ilyen módon azonosított fajok termelőképességét viszont analitikai vizsgálatoknak is alá kell támasztani.

A munkánk során a *T. tundrense* esetében is sikerült kimutatni a FUM1 gén jelenlétét, azonban fumonizintermelő-képességet nem sikerült igazolnunk. További vizsgálatokat tervezünk további *T. tundrense* törzsek bevonásával, hogy kizárjuk azt az eshetőséget, hogy egy termelőfaj nem termelő törzsét vizsgáltuk meg.

A FUM1 génszakaszának szekvenciája alapján csak a *T. geodes*-t lehetett egyértelműen elkülöníteni a nemzetség többi fajtól. Lehetséges, hogy a többi *Tolypocladium* faj esetében a FUM1 génre egyensúlyozó szelekció (balancing selection) hat, mely még fajok között is képes fenntartani a gének polimorfizmusát. *Fusarium graminearum* esetében a trichotecének bioszintézisében szerepet játszó génklaszter

esetében bizonyították már, hogy a gének polimorfizmusát egyensúlyozó szelekció tartja fent (Ward és mtsi, 2002).

A FUM1 gén és az ITS-régió szekvenciaadatai alapján felállított törzsfák nem mutatnak teljes egyezést, azonban a *T. geodes* faj mindkettőn jól elkülönül a többi fajtól és a *T. cylindrosporum* és a *T. tundrense* mindegyiken monofiletikus kládot alkotot. Korábbi tanulmányok és a jelenlegi ITS-szekvencia adatok alapján kérdéses, hogy a *T. extinguens*, *T. parasiticum* valamint *T. lignicola* fajok valóban a *Tolypocladium* nemzetségbe tartoznak-e. Ezzel egybevág az a tény is, hogy az említett fajokból nem sikerült kimutatni a FUM1 gént, míg a többi *Tolypocladium* fajból, a *T. nubicola* kivételével, sikerült.

Az általunk vizsgált *Tolypocladium* fajok filogenetikai viszonyainak tisztázásának érdekében a transzlációs elongációs faktor alfa (TEF α) szekvenciájának vizsgálata jelenleg folyamatban van.

6. Irodalomjegyzék

- Arx JA von. *Tolypocladium*, a synonym of *Beauveria*. Mycotaxon. 1986;25:153-158
- Baker SE. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. Med Mycol. 2006;44 Suppl 1:S17-21.
- Bandani AR, Khambay BPS, Faull JL, Newton R, Deadman M, Butt TM. Production of efrapeptins by *Tolypocladium* species and evaluation of their insecticidal and antimicrobial properties. Mycological Research. 2000 May;5:537-544
- Barron GL. Fungal parasites of rotifers: a new *Tolypocladium* with underwater conidiation. Canadian Journal of Botany. 1980;58:439-442
- Barron GL. Structure and biology of a new *Tolypocladium* attacking bdelloid rotifers. Canadian Journal of Botany. 1983;61(10):2566-2569
- Barron GL. Two new fungal parasites of bdelloid rotifers. Canadian Journal of Botany. 1981;59(8):1449-1455
- Bartók T, Szécsi A, Szekeres A, Mesterházy A, Bartók M. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2006;20(16):2447-2462.
- Bartók T, Tölgyesi L, Szekeres A, Varga M, Bartha R, Szécsi Á, Bartók M, Mesterházy Á. Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B1 (FB1) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2010;24:35-42.
- Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, Vleggaar R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J Chem Soc Chem Comm 1988;11:743-745.
- Bissett J. Notes on *Tolypocladium* and related genera. Canadian Journal of Botany. 1983;61(5):1311-1329
- Branham BE, Plattner RD. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia. 1993;124(2):99-104.
- Brown DW, Butchko RA, Busman M, Proctor RH. The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. Eukaryot Cell. 2007;6(7):1210-8.

Brown DW, Cheung F, Proctor RH, Butchko RA, Zheng L, Lee Y, Utterback T, Smith S, Feldblyum T, Glenn AE, Plattner RD, Kendra DF, Town CD, Whitelaw CA. Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. Fungal Genet Biol. 2005;42(10):848-61.

Butchko RA, Plattner RD, Proctor RH. Deletion analysis of FUM genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. J Agric Food Chem. 2006;54(25):9398-404.

Butchko RA, Plattner RD, Proctor RH. FUM13 encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. J Agric Food Chem. 2003;51(10):3000-6.

Caldas ED, Sadilkova K, Ward BL, Jones AD, Winter CK, Gilchrist DG. Biosynthetic Studies of Fumonisin B and AAL Toxins. J Agric Food Chem 1998;46:4734-4743.

Chu FS, Li GY. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. Appl Environ Microbiol. 1994;60(3):847-52.

Desjardins AE, Plattner RD, Proctor RH. Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* mating population A. Appl Environ Microbiol. 1996;62(7):2571-6.

Du L, Zhu X, Gerber R, Huffman J, Lou L, Jorgenson J, Yu F, Zaleta-Rivera K, Wang Q. Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins. J Ind Microbiol Biotechnol. 2008;35(6):455-64.

Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem. 2007;55(23):9727-32.

Gams W. *Tolypocladium*, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen Phialiden. Persoonia. 1971;6:185-191

Gams W, Zare R. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. Nova Hedwigia. 2001;72:329-337

Gelderblom WC, Cawood ME, Snyman SD, Vleggaar R, Marasas WF. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. Food Chem Toxicol. 1993;31(6):407-14.

Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WF, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NP. Fumonisins--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl Environ Microbiol. 1988;54(7):1806-11.

Gupta S, Krasnoff SB, Roberts DW, Renwick JAA, Brinen L, Clardy, J. Structures of the efraeptins--potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolypocladium niveum*. J. Am. Chem. Soc. 1991;113:707-709

Hansen CC. The characterization of fumonisin B6 biosynthesis in *Aspergillus niger*. Master's thesis. 2010, Technical University of Denmark

Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JR Jr. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J Vet Diagn Invest. 1990;2(3):217-21.

Hegedus DD, Khachatourians GG. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Metarhizium*. Applied and Environmental Microbiology 1993;59:4283-4288

Hodge KT, Krasnoff SB, Humber RA. *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis*. Mycologia. 1996;88(5):715-719

Howard PC, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Thurman JD, Kovach RM, Bucci TJ. Compensatory regeneration as a mechanism for renal tubule carcinogenesis of fumonisin B1 in the F344/N/Nctr BR rat. Environ Health Perspect. 2001;109Suppl 2:309-14.

IARC Fumonisin B1. 2002. IARC Monogr. 82: 301.

Kellerman TS, Marasas WF, Thiel PG, Gelderblom WC, Cawood M, Coetzer JA. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. Onderstepoort J Vet Res. 1990;57(4):269-75.

Krasnoff, SB, Gupta, S. (1991) Identification and directed Biosynthesis of Efraeptins in the fungus *Tolypocladium geodes* Games (Deut. Hyphomycetes). Journal of Chemical Ecology. 1991;17:1953-1962

Månsson M, Klejnstrup ML, Phipps RK, Nielsen KF, Frisvad JC, Gotfredsen CH, Larsen TO. Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonizin B6 from *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem. 2010;58(2):949-53.

Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG, van der Lugt JJ. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort J Vet Res. 1988;55(4):197-203.

Marín S, Sanchis V, Magan N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. Can J Microbiol. 1995a;41(12):1063-70.

Marín S, Sanchis V, Vinas I, Canela R, Magan N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. Lett Appl Microbiol. 1995b;21(5):298-301.

Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill AH Jr, Rothman KJ, Hendricks KA. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. Environ Health Perspect. 2006;114(2):237-41.

Mogensen JM, Moller KA, von Freiesleben P, Labuda R, Varga E, Sulyok M, Kubatova A, Thrane U, Andersen B, Nielsen KF (2011) Production of fumonisins B2 and B4 in *Tolypocladium* species. J Ind Microbiol Biotechnol. 2011;38(9):1329-35.

Moore CA, Li S, Li Z, Hong SX, Gu HQ, Berry RJ, Mulinare J, Erickson JD. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in northern China. Am J Med Genet. 1997;73(2):113-8.

Musser SM, Gay ML, Mazzola EP, Plattner RD. Identification of a new series of fumonisins containing 3-hydroxypyridine. J Nat Prod. 1996;59(10):970-2.

Ncayiyana DJ. Neural tube defects among rural blacks in a Transkei district. A preliminary report and analysis. S Afr Med J. 1986;69(10):618-20.

Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins AE. Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. Appl Environ Microbiol. 1992;58(3):984-9.

Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JA, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EG, Debets AJ, Dekker P, van Dijk PW, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJ, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GS, de Groot PW, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JP, van den Hondel CA, van der Heijden RT, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJ, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NN, Ram AF, Rinas U, Roubos JA, Sagt CM, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJ, Wedler H, Wösten HA, Zeng AP, van Ooyen AJ, Visser J, Stam H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. Nat Biotechnol. 2007;25(2):221-31.

Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins AE. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. Fungal Genet Biol. 2003;38(2):237-49.

Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD, Hohn TM. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. Fungal Genet Biol. 1999;27(1):100-12.

Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busman M, Butchko RA. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. J Agric Food Chem. 2006;54(6):2424-30.

Rakotonirainy MS, Dutertre M, Brygoo Y, Riba G. rRNA Sequence comparison of *Beauveria bassiana*, *Tolypocladium cylindrosporum*, and *Tolypocladium extinguens*. Journal of Invertebrate Pathology. 1991 Jan;57(1):17–22

Rheeder JP, Marasas WF, Vismer HF. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. Appl Environ Microbiol. 2002 May;68(5):2101-5.

Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Osweiler GD, Rice LG, Plattner RD, Wilson TM. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. Appl Environ Microbiol. 1990;56(10):3225-6.

Samson RA, Soares GG. Entomopathogenic species of the hyphomycete genus *Tolypocladium*. Journal of Invertebrate Pathology. 1984 March;43(2):133–139

Schmelz EM, Dombrink-Kurtzman MA, Roberts PC, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Merrill AH Jr. Induction of apoptosis by fumonisin B1 in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. Toxicol Appl Pharmacol. 1998;148(2):252-60.

Seo JA, Proctor RH, Plattner RD. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. Fungal Genet Biol. 2001;34(3):155-65.

Stensrud O, Hywel-Jones NL, Schumacher T. Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly. Mycol Res. 2005 Jan;109(1):41-56

Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Stud Mycol. 2007;57:5-59

Survase SA, Kagliwal LD, Annapure US, Singhal RS. Cyclosporin A--a review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. Biotechnol Adv. 2011 Jul-Aug;29(4):418-35

Sydenham EW, Theil PG, Marasas WFO, Shephard GS, van Schalkwyk DJ, Koch KR. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. J Agric Food Chem. 1990;38:1900–1903.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol. 2011;28:2731-2739.

Todorova SI, Côté JC, Coderre D. Distinction between *Beauveria* and *Tolypocladium* by carbohydrate utilization. Mycological Research. 1998 Jan;102(1):81-87

Varga J, Kocsubé S, Suri K, Szigeti G, Szekeres A, Varga M, Tóth B, Bartók T. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. Int J Food Microbiol. 2010;143(3):143-9.

Varga J, Téren J, Rigó K, Tóth B, Kocsubé S. Gombák másodlagos anyagcseretermékei: mikotoxinok, gombamérgek. JATE Press, Szeged. 2009.

Waalwijk C, van der Lee T, de Vries I, Hesselink T, Arts J, Kema GH. Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. Eur J Plant Patho. 2004;110:533-544.

Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E, O'Donnell K. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(14):9278-83.

Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH Jr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. J Biol Chem. 1991;266(22):14486-90.

Yu F, Zhu X, Du L. Developing a genetic system for functional manipulations of FUM1, a polyketide synthase gene for the biosynthesis of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. FEMS Microbiol Lett. 2005;248(2):257-64.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Varga Jánosnak és Kocsubé Sándornak, a rám fordított időt és figyelmet, valamint az értékes szakirodalmat és a hasznos tanácsokat.

Köszönettel tartozom Szigeti Gyöngyinek és Baranyi Nikolettnek, akik a laboratóriumi jártasságukkal segítették a munkámat, valamint dr. Bartók Tibornak, aki a HPLC-MS vizsgálatokat végezte.

Köszönetet mondok Dr. Vágvölgyi Csaba tanszékvezetőnek, hogy lehetővé tette számomra az SZTE Mikrobiológiai Tanszéken dolgozatom elkészítését.

Továbbá köszönet illeti a Mikrobiológiai Tanszék minden dolgozóját segítőkészségükért.

8. Függelék

A fumonizin tartalom HPLC-MS módszerrel lett meghatározva. A készülék az injektált extraktumok tömegkoncentrációját adta meg, melyeket az 5. táblázatban láthatóak. Azonban a fumonizinek mennyiségét nem térfogatra, hanem tömegre vonatkoztatva szokás megadni, ugyanis a határértékek is $\mu\text{g/kg}$ -ban vannak meghatározva. Ezért a toxin szintet a dolgozatban ennek megfelelően $\mu\text{g/kg}$ -ban adtuk meg.

Minden törzs esetén hat darab agardugót, melyek együttes tömeg 1,7 g volt, vágunk ki, majd 10 ml metanol víz (3:1) eleggyel végeztük a kivonást.

Számításmenete: $Y = X \cdot 10 \text{ ml} / 1,7 \text{ g}$ [X = fumonizin izomer mennyisége (ng/ml), Y = fumonizin izomer mennyisége (ng/g); $1 \text{ ng/g} = 1 \mu\text{g/kg}$]

5. Táblázat. HPLC-MS által mért fumonizin-izomerek tömegkoncentrációi

Fajnév	Törzsszám	A detektált fumonizin-izomerek mennyisége (ng/ml)	
		FB ₂	FB ₄
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 614.80	8915,20	2489,00
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 719.70	179,00	186,50
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 1450/95	n/a	n/a
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 2531/94	7192,60	4974,90
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 3237/01	6717,10	2811,60
<i>T. extinguens</i>	CBS 345.77	-	-
<i>T. geodes</i>	CBS 721.70	249,70	82,80
<i>T. geodes</i>	CCF 2548/93	1624,80	107,00
<i>T. geodes</i>	CCF 2579/93	2070,00	342,30
<i>T. geodes</i>	CCF 3299/03	116,90	13,70
<i>T. inflatum</i>	CBS 670.83	52384,70	27988,20
<i>T. inflatum</i>	CCF 3896/09	86215,70	5897,70
<i>T. lignicola</i>	CBS 489.83	n/a	n/a
<i>T. nubicola</i>	CBS 944.72	n/a	n/a
<i>T. parasiticum</i>	CBS 300.83	n/a	n/a
<i>T. tundrense</i>	CBS 569.84	-	-

Mogensen és munkatársai (2011) cikkükben a *Tohypocladium* fajok által termelt fumonizin-izomerek mennyiségét $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ -ben adták meg, ezért az összevethetőség érdekében az eredményeinket ebbe a formába is átszámítottuk (6. táblázat).

Számításmenete: $Y = X \cdot 10 \text{ ml} / (r^2 \cdot 6 \cdot \pi)$ [X = fumonizin izomer mennyisége (ng/ml), Y = fumonizin izomer mennyisége (ng/cm^2), r = az agardugó sugara (0,6 cm); $1 \text{ ng}/\text{cm}^2 = 0,001 \mu\text{g}/\text{cm}^2$]

6. Táblázat. HPLC-MS által mért fumonizin-izomerek mennyisége

Fajnév	Törzsszám	A detektált fumonizin-izomerek mennyisége ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
		FB ₂	FB ₄
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 614.80	13,14	3,67
<i>T. cylindrosporum</i>	CBS 719.70	0,26	0,27
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 1450/95	n/a	n/a
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 2531/94	10,60	7,33
<i>T. cylindrosporum</i>	CCF 3237/01	9,90	4,14
<i>T. extinguens</i>	CBS 345.77	-	-
<i>T. geodes</i>	CBS 721.70	0,37	0,12
<i>T. geodes</i>	CCF 2548/93	2,39	0,16
<i>T. geodes</i>	CCF 2579/93	3,05	0,50
<i>T. geodes</i>	CCF 3299/03	0,17	0,02
<i>T. inflatum</i>	CBS 670.83	77,20	41,25
<i>T. inflatum</i>	CCF 3896/09	127,05	8,69
<i>T. lignicola</i>	CBS 489.83	n/a	n/a
<i>T. nubicola</i>	CBS 944.72	n/a	n/a
<i>T. parasiticum</i>	CBS 300.83	n/a	n/a
<i>T. tundrense</i>	CBS 569.84	-	-

9. "Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez"

Alulírott Brankovics Balázs a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- genomi DNS-kivonást,
- PCR-reakciókat,
- fumonizin-kivonást,
- a szekvenciaadatok *in silico* feldolgozását

végeztem el.

.....

aláírás

Szeged, 2012. december 30.