

36. OTDK Biológia Szekció

***Aspergillus niger* konídiumok
denzitásfüggő viselkedése**

Szathmári Benedek

Biológia BSc III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem,
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezetők: dr. Nagy László és dr. Csernetics Árpád
Belső konzulens: dr. Kocsubé Sándor

2023.

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	1
2. Tartalmi összefoglaló	2
3. Irodalmi áttekintés	3
3.1. Élesztők és fonalas gombák	3
3.1.1. Dimorfizmus	3
3.1.2. Az élesztők jelentősége	5
3.1.3. Az élesztők evolúciója	6
3.1.3.1. Reduktív evolúció	6
3.1.3.2. Homológiaviszonyok	9
3.1.4. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség jelentősége	10
3.1.5. Konídiumképzés	11
3.2. Quorum sensing	13
3.2.1. A quorum sensingről általában	13
3.2.2. Quorum sensing élesztőgombáknál	14
3.2.3. Quorum sensing fonalas gombáknál	15
4. Célkitűzések	16
5. Anyagok és módszerek	17
6. Eredmények	21
6.1. Denzitásfüggés standard tápoldatban	21
6.2. Denzitásfüggés populációdensitásra normált koncentrációjú tápoldatban ..	22
6.3. Felülúszótranszfer-kísérlet – I. kísérleti elrendezés	24
6.4. Felülúszótranszfer-kísérlet – II. kísérleti elrendezés	26
7. Diskusszió	28
8. Köszönetnyilvánítás	30
9. Irodalomjegyzék	31
10. Tételes szerzői hozzájárulás	36

2. Tartalmi összefoglaló

Az élesztőgombák óriási gyakorlati jelentőséggel bírnak: amellet, hogy ebbe a csoportba több iparban hasznosított faj és modellorganizmus is tartozik, dimorf patogénként számos fajuk évente milliókat betegít meg. Gyakorlati jelentőségük ellenére azonban az élesztők morfogenetikai eredetéről méltatlanul keveset tudunk: jelenlegi tudásunk kimerül abban, hogy fonalas ősökől jöttek létre másodlagos egyszerűsödéssel. Célunk az élesztők evolúciójával kapcsolatos tudásunk bővítése. Hipotézisünk szerint az Ascomycota törzs sarjadzó élesztői állandó stressznek kitett konídiumokból (fonalas gombákra jellemző ivartalan szaporítóképletekből) eredeztethetők. Az én részprojektem arra épül, hogy amennyiben az élesztősejt és a konídium valóban homológok, úgy az utóbbira is jellemző lehet az élesztők vonatkozásában már ismert denzitásfüggő viselkedés, azaz a quorum sensing (QS). A QS a közegbe szekretált jelmolekulák (quorum sensing molekula, QSM) segítségével megvalósuló denzitásfüggő inger-válasz rendszer. Ismert egyes fonalas gombák másodlagosmetabolit-termelésének denzitásfüggése is, azonban a szakirodalomban nincs nyoma annak, hogy a konídiumok denzitásfüggésével kapcsolatban lettek volna kutatások. Eredményeim szerint a magasabb denzitás mellett inkubált *Aspergillus niger* konídiumok kisebb arányban duzzadnak, és a duzzadt konídiumok átmérője nagyobb, mint az alacsonyabb denzitások esetén. Egy szerves extrakcióval egybekötött ún. felülúszótranszfer-kísérlettel sikerült bizonyítanom a QSM jelenlétét az *Aspergillus niger* konídiumainak tápközegében. Azonos konídiumkultúrából származó, szerves extrakción átesett és át nem esett sejtmentes felülúszók közül az előbbiben inkubált konídiumok szignifikánsan nagyobb arányban duzzadnak. A szerves extraktum kémiai összetételének folyamatban lévő meghatározásával fény derülhet arra, hogy a konídiumokra jellemző QS független-e a gombafonalakra jellemző QS-től, valamint hogy mutat-e hasonlóságot az élesztőkre jellemző QS-gel. Reményeim szerint kutatásaimmal hozzájárulhatok egy, az élesztőkkel kapcsolatos hiánypótló evolúciós koncepció megszületéséhez. Az élesztők és a fonalas gombák morfogenetikai viszonyainak megértése, valamint a gombákra jellemző quorum sensing alaposabb megismerése a jövőben lehetővé teheti eredményesebb antifungális terápiák kidolgozását, illetve az ipar szempontjából releváns gombák hatékonyabb alkalmazását.

3. Irodalmi áttekintés

Óriási gyakorlati jelentőségük ellenére az élesztők morfogenetikai eredetéről méltatlanul keveset tudunk. A Lendület Gomba Genomika és Evolúció Csoportban szeretnénk egy hiánypótló evolúciós koncepciót kidolgozni az élesztőmorfológia eredetére vonatkozóan. Az alábbiakban összegzem a dimorfizmusról és az élesztők evolúciójáról fellelhető ismereteket, példákat hozok az élesztők relevanciájára; és mivel hipotézisünkben (ld. 4. Célkitűzések) a fonalas gombákkal hozzuk összefüggésbe az élesztőmorfológia kialakulását, tárgyalom ezen csoport néhány aspektusát is. Az én részprojektem céljaként a két csoport közötti további egy hasonlóság, a quorum sensing meglétének bizonyítását tűztük ki, melyhez a második alfejezetben összegzem a quorum sensing koncepcióját, annak fejlődését, előfordulását élesztőknél, valamint értelmezését fonalas gombákra.

3.1. Élesztők és fonalas gombák

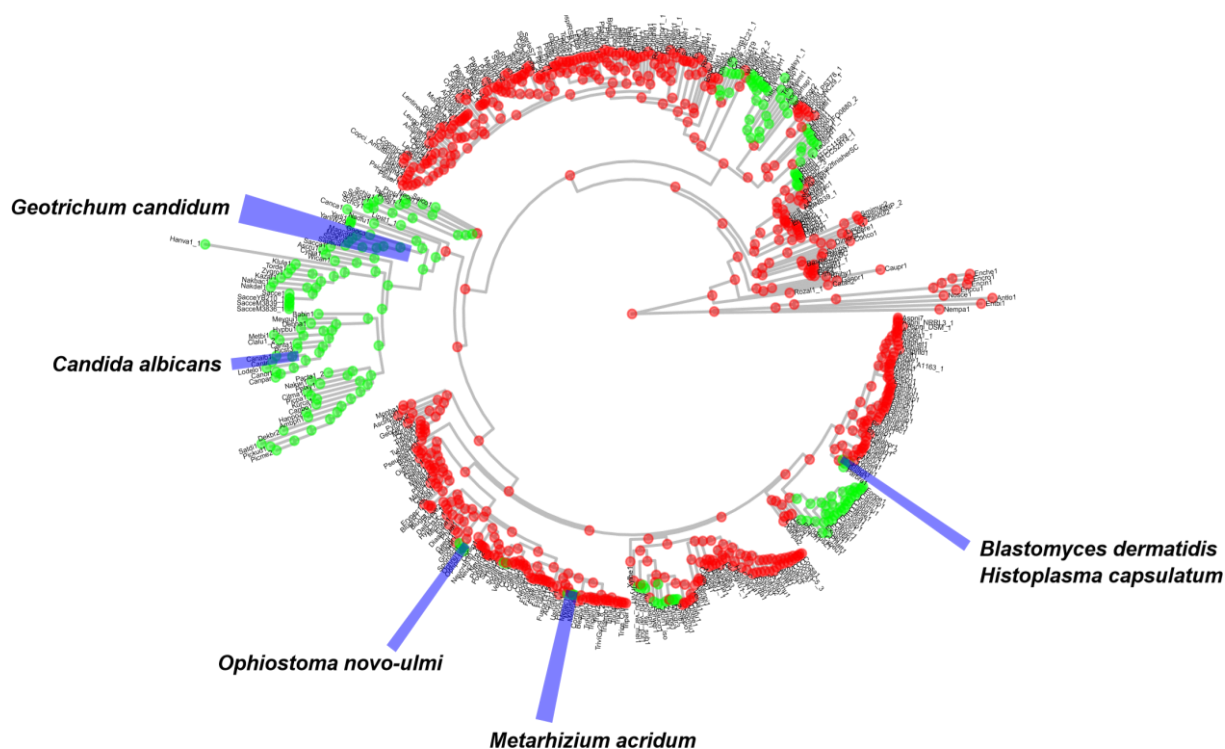
3.1.1. Dimorfizmus

Az élesztők polifiletikus csoportjába másodlagosan egyszerűsödött, a filogenezis során fonalas gombákból létrejött egysejtű és fakultatív soksejtű gombák tartoznak (Fisher és Regenber, 2019; Nagy és mtsai., 2014).

A dimorfizmus az egysejtű és fonalas formák közötti interkonverzióra, az ún. a dimorf tranzícióra való képesség (Stephen és mtsai., 2005), tehát azon gombákat tekintjük dimorfnak, melyek élesztőszerű és fonalas morfológiát is mutathatnak, azaz fakultatív soksejtűek. Az élesztőfajok többsége dimorf, a gyakoribb morfológia lehet a fonalas vagy az élesztőszerű is. A kétféle morfológia más-más gének kifejeződését igényli, más stresszútvonalak aktívak (Csernetics és mtsai., 2022). A dimorf tranzíció előidézésében szerepet játszhat a hőmérséklet (Gauthier, 2015), a tápanyagellátottság, illetve a quorum sensing (ld. 3.2.2. Quorum sensing élesztőgombáknál). Példaként, a *Schizosaccharomyces pombe* esetében a preferált morfológia az élesztőalak, nitrogénéhezés hatására azonban a táptalaj mélyebb rétegeibe hatoló hifákat képez (Amoah-Buahin és mtsai., 2005). A humán (és más emlősökre jellemző) patogéneknek a tranzíció a magas testhőmérséklet hatására történik meg, több kórokozónál a quorum sensing szerepét is kimutatták. A kétféle morfológia nagyon különböző niche-ek elfoglalását teszi lehetővé (pl. talaj – emberi test), és funkciófelosztás is megfigyelhető az alakok között. A humán patogének esetén a fonalas alak a gazdán kívüli fennmaradást szolgálja, elősegíti a

gazdák közötti terjedést, és fenntartja a genetikai diverzitást (Gauthier, 2015), emellett az anatómiai gáton való átjutás is fontos feladata lehet (pl. a *Candida albicans* esetében); az élesztőalak pedig lehetővé teszi a szervezetben való elterjedést. Azt az állapotot, melyben élesztősejtek vannak jelen a vérben, fungaemiának nevezzük. Egyes fajok (pl. *Histoplasma capsulatum*) élesztőalakjai képesek életben maradni és sarjadzással szaporodni a makrofágokban (Q. Shen és Rappleye, 2020).

Ősikarakterállapot-rekonstrukciós vizsgálatok szerint a dimorfizmus az evolúció során legalább tizennégy alkalommal alakult ki egymástól függetlenül (Csernetics és mtsai, 2022) (1. ábra).



1. ábra. A Dikarya kládba tartozó gombák rokonsági viszonyai morfológiai komplexitásuk és a rekonstruált ősi karakterállapotok jelölésével. A vörös szín fonalas, a zöld dimorf gombákat jelöl. Az ábrán szerepel a hat legáltalánosabban vizsgált dimorf patogén neve. (Forrás: Csernetics és mtsai, 2022)

Tágabb értelemben a kétféle élesztőalak előfordulását is dimorfizmusnak nevezzük. A *Trigonopsis variabilis* egy tágabb értelemben vett dimorf faj, mely képes háromszögletű, illetve ellipszoid morfológiájú sejtek kialakítására (Sasek és Becker, 1969).

Többféle morfológia kialakításának képességét a polimorfizmus fogalmával illetjük. Sok faj (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) képes ún. pseudohifákat képezni. A pseudohifa megnyúlt, szinkronban osztódó élesztősejtek rövid láncolata (Mukaremera és

mtsai., 2017), mintegy átmenet az élesztőszerű és a fonalas morfológiák között. A *Candida albicans* a fonalas forma mellett háromféle élesztőalakkal rendelkezik (white, gray, opaque), melyek mikro- és makromorfológiája is eltér, valamint eltérő hajlandóságot mutatnak az ivaros szaporodásra (Tao és mtsai., 2014).

3.1.2. Az élesztők jelentősége

Az élesztők óriási gyakorlati jelentőséggel bírnak az alapkutatás, a biotechnológia, az alkalmazott növénybiológia és az orvosbiológia területén is.

Olyan fontos modellorganizmusok kerülnek ki ebből a csoportból, mint a *Schizosaccharomyces pombe* (hasadó élesztő), melyet például a sejtciklussal és az ivaros szaporodással kapcsolatos kutatásokban használnak előszeretettel (van Werven és Amon, 2011), vagy a *Saccharomyces cerevisiae* (pékélesztő, sörélesztő), mely számtalan tudományterület kiemelkedő fontosságú modellorganizmusa. A pékélesztő megkerülhetetlenségét mi sem bizonyítja jobban, mint hogy számos Nobel-díjas felfedezés alanya volt. 2001-ben a sejtciklus szabályozómechanizmusainak megértését, 2006-ban az eukarióta transzkripció molekuláris alapjainak vizsgálatát, 2009-ben a telomer és telomeráz kutatását, 2013-ban a vezikuláris transzport, 2016-ban pedig az autofágia mechanizmusának feltérképezését ismerték el Nobel-díjjal. Az említett kutatások mindegyike részben vagy egészben *Saccharomyces cerevisiae* mint modellorganizmus használatával valósult meg (Hohmann és mtsai, 2016). Mindemellett a pékélesztő volt az első olyan eukarióta, melynek teljes genomját megszekvenálták, így a genomika fejlődéséhez is felbecsülhetetlen a hozzájárulása (Goffeau A és Barrel B. G., 1996).

A *Saccharomyces cerevisiae*-t évezredek óta használja az emberiség élelmiszerek és élvezeti cikkek előállítására. A tésztakelesztésen túl alkoholos italok készítésére is alkalmazzák kihasználva azt, hogy fakultatív anaerob organizmus lévén alkoholos fermentációra képes. A pékélesztőn kívül más, a biotechnológia szakirodalma által nem szokványos élesztőként (NCY, non-conventional yeast) hivatkozott fajokat is hasznosít az ipar (Geijer és mtsai., 2022): például a laktózmentes tejtermékeket korábban a *Kluyveromyces lactis* nevű élesztő segítségével állították elő, a *Yarrowia lipotycával* hidrolitikus enzimeket és különböző metabolitokat termeltetnek (Zieniuk és Fabiszewska, 2019), a *Phaffia rhodozýmát* pedig karotinoidek termeltetésére használják.

Az *Ustilago tritici* és *Ustilago maydis* nevű dimorf üszöggombák haszonnövényeken élőködnek először élesztőformában, majd fonalas morfológiára váltva a gazdanövény szöveteiből létrehoznak egy olyan tumoros elváltozást, mely alkalmas a spórák terjesztésére. Az *Ustilago tritici* akár 40%-os termés kiesést is okozhat (Quijano és mtsai., 2016). Az utóbbi időben nagy figyelem irányul az endofiton élesztőkre (Joubert és Doty, 2018). Az endofiton élesztők növényi szövetek között élnek; megértésük nagyon fontos az agrárium számára, mivel javíthatják a termés minőségét. Érzékenyek a fungicidekre, és bár a fungicid növényi testből való kiürülése után megváltozott fajösszetétellel rekolonizálhatják a gazdát, a niche időleges kiüresedése lehetőséget ad potenciális patogéneknek a bejutásra, így a növényvédőszer megválasztásánál az is egy fontos szempont kell, hogy legyen a jövőben, hogy a növény élesztőközössége ne sérüljön a kezelés hatására. A csoport egyes képviselői (pl. *Rhodotorula graminis*) a nehézfém szennyezés utáni bioremediációs célra való alkalmazás szempontjából is ígéretesek (Joubert és Doty, 2018).

A dimorf humán patogének főleg immunkompromittált embereket képesek megtámadni, és bár a humán mikózisok előfordulására vonatkozóan csak pontatlan adatok és becslések állnak rendelkezésre, azok arról tanúskodnak, hogy a dimorf patogének évente sokmillió embert betegítenek meg és százezrek halálát okozzák. Ebbe a csoportba tartozik többek között a *Candida albicans*, a *Cryptococcus neoformans* (*Filobasidiella neoformans*), a *Blastomyces dermatitidis*, a *Histoplasma capsulatum* és a *Paracoccidioides brasiliensis* (Fausto és mtsai., 2019; Gauthier, 2015). A *Candida albicans* a humán mikrobiom része, viszont kellemetlen bőrbetegség, illetve a véráramba való bejutásával egy, az egész szervezetet érintő, magas mortalitású kórkép, az invazív candidiasis kialakítására képes. A *Cryptococcus neoformans* leggyakrabban a tüdőben telepszik meg, de súlyos esetekben akár agyhártyagyulladást és központi idegrendszeri gyulladást is okozhat (Schmiedel és Zimmerli, 2016).

3.1.3. Az élesztők evolúciója

3.1.3.1. Reduktív evolúció

Közkeletű, de alapjaiban téves asszociáció az evolúcióval kapcsolatban, hogy az a komplexifikáció „irányába mutat”, magasabb összetettség felé tendál. Az evolúció ennél sokszínűbb. Nem magától értetődő, hogy komplexitás fenntartása sikeres evolúciós stratégia lenne. A testméret és a genom méret csökkenésével, génvesztésekkel, a morfológia és a

metabolikus repertoár egyszerűsödésével járó reduktív evolúció fajsúlyos alakítója a genomoknak (O'Malley és mtsai., 2016; Wolf és Koonin, 2013).

Az élesztőkre is jellemző a reduktív evolúció. Genomjuk igen kompakt a fonalas gombákhoz képest. Például a fonalas *Aspergillus niger* genomja 2,83-szor akkora, és 1,72-ször annyi gént tartalmaz, mint a *Saccharomyces cerevisiae* genomja. Az élesztőfajok genomjaiban kevés pszeudogén található, génjeik pedig kevesebb intront tartalmaznak, mint fonalas rokonaikéi (Dujon, 2010). A genomika kora előtt úgy vélték, hogy a fonalas növekedéshez szükséges génjeik (egy része) veszett el, ez azonban nem igaz általánosan, hiszen az élesztőfajok nagy részénél (a Saccharomycotina altörzsben a laboratóriumi *Saccharomyces cerevisiae* törzsek kivételével (Dickinson, 2008), melyek csak pseudohifákat tudnak képezni, minden faj esetén) kiváltható a fonalas növekedés, azaz dimorfok. A génvesztések például bizonyos metabolikus géneket érintenek (X. X. Shen és mtsai., 2018).

A reduktív evolúció legszemléletesebb példái az obligát intracelluláris paraziták (*Rickettsia* sp., *Chlamydia* sp.) és a másodlagos endoszimbiogenezissel létrejövő organellek nukleomorfjaiban található eukarióta genommaradványok. Ugyanakkor a genomredukció jelensége nem korlátozódik adott életmódokra. Különböző mértékben ugyan, de minden organizmus genomdinamikájában érvényesül egy olyan nyomás, ami a genomméret csökkentésére törekszik, mivel a nagyméretű genom fenntartása költséges. Ez a nyomás idővel változhat. Az utóbbi két évtizedben vált nyilvánvalóvá, hogy a redukció nemcsak hogy el nem hanyagolható tényezője a genomevolúciónak, hanem az egyik legfontosabb hajtóereje, mely a diverzifikációt is elősegítheti (O'Malley és mtsai., 2016; Wolf és Koonin, 2013). A törzsfejlődés rövid és intenzív genomexpansziós, komplexifikációs és hosszú redukciós fázisok egymásutánosságaként is interpretálható (Wolf és Koonin, 2013).

A reduktív evolúció lehet neutrális, mint a már említett intracelluláris paraziták esetén, vagy adaptív (darwini), mint a Földön a legabundánsabb életformák közé tartozó *Pelagibacter ubique* esetén (X. X. Shen és mtsai., 2018). A neutrális redukcióval megvalósuló génvesztés úgy értelmezhető, hogy az adott milióban nem esszenciális génekben szelekciós nyomás hiányában mutációk halmozódnak fel, így az érintett gének működésképtelenné válnak. Ez a mechanizmus hosszú távon specialista fajokat hoz létre, melyek sérülékenyek a környezet megváltozásával szemben. Adaptív redukcióról akkor beszélünk, ha a kisméretű és magas információsűrűségű genomhoz és a minimálisan szükséges génrepertoár fenntartásához szelekciós előny társul (Wolf és Koonin, 2013). Az élesztők redukciójának neutrális és

adaptív jellegére is találunk bizonyítékot a szakirodalomban (Lang és mtsai., 2009; Sliwa és Korona, 2005).

A Saccharomycotina altörzsbe tartozó élesztőfajok genomjainak azonban sajátos redundanciáik is vannak, ami arra utal, hogy törzsfejlődésüket expanziós epizódok is tarkították, a redundancia pedig nyersanyagot szolgáltat az evolúció számára. A Saccharomycotina altörzs egy, a *Saccharomyces sensu stricto* nemzetséget is magában foglaló kládjának közös őseben kb. 100 millió évvel ezelőtt genomduplikáció történt (Dujon, 2010). Az altörzs képviselőinek genomja általában is sok paralógot tartalmaz, emellett *de novo* keletkezett génjeik száma sem elhanyagolható. Változó számú, akár több száz tRNS-lokusszal rendelkezhetnek (Dujon, 2010; X. X. Shen és mtsai., 2018). A *Saccharomyces cerevisiae* kromoszómáinak végén elhelyezkedő metabolikus gének is redundanciát mutatnak (Goffeau A és Barrel B. G., 1996).

Olyan genetikai sajátosságokat is mutat ez a csoport, melyek a rokonsági viszonyok ismeretében igen meglepőek, és a felgyorsult evolúciójuk következményei, mely szintén összefügg a reduktív evolúcióval. Az evolúció sebességváltozását heterotachiának nevezzük. Ilyen meglepő sajátosságok az eukarióták körében elterjedt H3K9me3 epijel és az RNS-interferencia mechanizmusának hiánya, illetve hogy a Saccharomycotina altörzs egy, a *Candida albicans* is magában foglaló kládjában (CUG csoport) a CUG kodon szerint kódol (X. X. Shen és mtsai., 2018). A kompakt genom lehetővé teszi a gyors klonális szaporodást, így evolúciós skálán viszonylag rövid idő alatt is nagyobb változások mehetnek végbe. A Saccharomycotina altörzs utolsó közös őse (BYCA) 317-523 millió éve élhetett, azóta a gyors klonális szaporodásnak köszönhetően nagyságrendekkel több generáció váltotta egymást, mint a legalább kétszer annyi idős állatok vagy növények kládjában. Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a Saccharomycotina altörzs önmagában olyan genetikai sokszínűséget hordoz, amely összevethető az állatok vagy a növények országainak diverzitásával (még ha ez a morfológia tekintetében nem is nyilvánul meg) (Dujon, 2010).

Az élesztők olyan evolúciós stratégiára rendezkedtek be, mely előnyben részesíti a gyors szaporodást a komplexitással szemben.

3.1.3.2. Homológiaviszonyok

Homológnak nevezzük azon tulajdonságokat és struktúrákat, melyek a vizsgált fajok legközelebbi közös ősére is jellemzőek voltak; azon hasonlóságokat pedig, melyek a közös ősnél hiányoztak, homoplasztikusnak. A homoplázia leggyakrabban konvergencia eredményeként jön létre. Az élesztők fonalas ősekből alakultak ki többször egymástól függetlenül, filogenetikailag távoli rokon kládokban (Nagy és mtsai., 2014) (ld. 3.1.1. Dimorfizmus), így ezen távoli kládok összehasonlításában az egysejtű élesztőmorfológiát, a genom kompaktságát, a gyors klonális szaporodás előnyben részesítését, a metabolikus hasonlóságokat, jellemző sejtfalszerkezetet stb. is mind-mind homopláziáknak tekintjük.

Ugyanakkor többen felhívják a figyelmet arra, hogy a homoplázia koncepciója nem teljesen a homológia antitézise, és a két fogalom nem kizárólagos, valójában ugyanazon kontinuum határértékei; homológ gének bevethetők homológ és homoplasztikus struktúrák létrehozásához is (Hall, 2007). Az átmenet a mélyhomológia (deep homology) és a látens homológia fogalmán keresztül érzékeltethető leginkább. Mindkét esetben az egymástól függetlenül kialakult struktúrák fejlődésgenetikai alapja már jelen volt a közös ősben is. Mélyhomológiáról akkor beszélünk, ha a homoplasztikus struktúrák (pl. emlősök és lábasfejúk fejlett hólyagszeme) fejlődésgenetikai alapja (Pax6 transzkripciósfaktor) hasonló funkcióért felelt (fotorecepcióra alkalmas struktúra kialakítása) a közös ősben is (Shubin és mtsai., 2009). Látens homológia esetén azonban a homoplázia fejlődésgenetikai alapja eredetileg más funkciót töltött be. A látens homológia fogalma kapcsolatban áll a preadaptáció vagy exaptáció koncepciójával, melynek alapjaival már Darwin is foglalkozott. Az elmélet szerint a potenciál egy fenotípus kialakítására jóval hamarabb megjelenhet, mint maga a fenotípus. Természetesen erre a potenciálra szelekció kell, hogy hasson, ami a fenotípus megjelenése előtt úgy lehetséges, ha korábban más folyamatban vett részt. Példa az exaptációra, hogy a toll hamarabb jelent meg, mint a repülés képessége, eredetileg a hőszabályozásban vett részt (Gabora és mtsai., 2013; Hall, 2007).

Egy hipotézis szerint az élesztők konvergens evolúciója is jellemezhető a látens homológia fogalmával (Nagy és mtsai., 2014). Az élesztőszerű életmód megjelenése, az egysejtű morfológia fenntartása jóval később következhetett be, mint az ehhez szükséges gének (pl. alfa-glükánázt kódoló *agn1p*, glükán szintáz kódoló *cps1p*) kialakulása. Az élesztőkre jellemző legtöbb genetikai innováció leszármazási vonalra specifikus, kivéve egy élesztőfonalas átmenethez köthető transzkripciósfaktor-családot (Zn cluster), mely a hivatkozott

kutatásban vizsgált mind az öt élesztőkládban nagy kópiaszámmal van jelen. Ez a transzkripció faktor azonban szintén a fenotípus előtt jelent meg.

Tehát az élesztők egymástól függetlenül való többszöri megjelenése mögött az állhat, hogy ősi (közös) gének szabályozásának konvergens megváltozása révén, az eukarióta sejtciklusra szerveződve egymástól függetlenül jöhetett létre az a genetikai program, amely lehetővé teszi az egysejtű morfológia fenntartását (Nagy és mtsai., 2014).

3.1.4. Az *Aspergillus* nemzetség jelentősége

Az *Aspergillus* nemzetség az Dikarya klád Ascomycota törzsén belül az Eurotiomycetes osztály Eurotiales rendjébe sorolt Aspergillaceae családba tartozik (Houbraken és Samson, 2011). Korábban a mesterséges Deuteromycota (Fungi Imperfecti, konídiumos gombák) csoportba sorolták, mivel kizárólag az anamorf, vagyis az ivartalanul, konídiumokkal szaporodó alakok voltak ismertek, azóta azonban több faj ivaros formáját is leírták (Kwon-Chung és Sugui, 2009). A nemzetségbe körülbelül kétszáz faj tartozik (Scazzocchio, 2019). Az alábbiakban az *Aspergillus* nemzetség ökológiai, természetvédelmi, alapkutatásbeli, ipari biotechnológiai és orvosbiológiai relevanciájára hozok példákat.

A nemzetség tagjai túlnyomórészt szaprotrófok, elhalt növényi maradványokon tenyésznek, így fontosak az ökológia anyagkörforgásban. Egyes fajaik (pl. *A. niger*) képesek a faanyag bontására is, ún. lágykorhadást okoznak (Hamed, 2013). A lágykorhasztók jellemzően magas páratartalomra képesek megtámadni az alacsony lignintartalmú fát, és üregeket hoznak létre a növényi sejtfalban (Goodell és mtsai., 2008). További ökológiai relevancia, hogy az *A. sydowii* a *Gorgonia* szarukorallok tömeges pusztulását okozza (Scazzocchio, 2019).

Az *Aspergillus nidulans* a sejtbiológia és a molekuláris biológia fontos modellorganizmusa. Használják például genetikai eredetű metabolikus betegségek (pl. alkaptonúria) modelljeként (Scazzocchio, 2019). Genomja jól annotált, így rokon fajok genomikai vizsgálatakor kiindulópontként szolgálhat.

Az *A. sojae*-t és az *A. oryzae*-t előszeretettel alkalmazza a távol-keleti konyha erjesztett ételek (pl. koji) készítéséhez. Az *Aspergillus*-fajok extracelluláris enzimeket szekretálnak, melyek koncentrációja a médiumban a 20 g/l-t is meghaladhatja. Erre a célra az *A. niger*-t, az *A. sojae*-t, és az *A. oryzae*-t használják. Az első kereskedelembe kapható mikrobiális enzim

az *A. oryzae* amiláza volt, melyet 1894-ben hoztak forgalomba. Érdekes módon transzgenikus *Aspergillus*-törzsekkel heterológ enzimeket csak mg/l-es nagyságrendben lehet termeltetni. Az *Aspergillus niger* szerves savak termeltetésére is alkalmas. Citromsavat, glükonsavat, oxálsavat és itakonsavat is előállít az ipar az említett mikroorganizmus segítségével. Az előállított citromsavat, melynek mennyisége 2021-ben elérte a 2,7 millió tonnát, például üdítőitalok adalékaként vagy az oxálsavhoz hasonlóan fémfelületek kezelésére használják, az itakonsav polimerkémiailag alapanyag, a glükonsavat pedig egyebek mellett tisztítószer gyártásához használják (Scazzocchio, 2019).

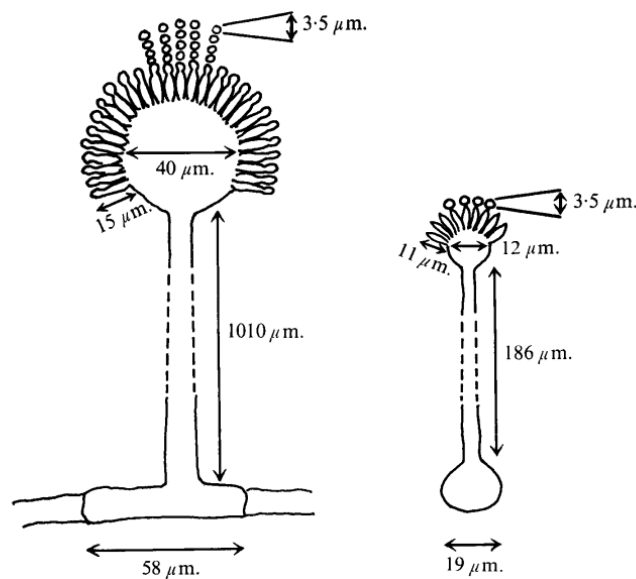
Az *Aspergillus*-fajok bizonyos törzsei ochratoxinokat és aflatoxinokat termelnek. Az ochratoxin A nefropátiát okoz, de sok kórképpel kapcsolatban felmerült már az ochratoxinok hozzájárulása, az aflatoxinok pedig erős karcinogén hatású vegyületek. Az *Aspergillus fumigatus* egy humán patogén. A kiváltott kórképet invazív aspergillozissal nevezzük, a gomba a tüdőben ún. aspergillómákat hoz létre. Immunkompromittált emberek körében kezeletlenül 100%-os, de kezelésekkal is legalább 60%-os mortalitást produkál (Scazzocchio, 2019). Az *Aspergillus terreus* lovastatint termel, melyet koleszterincsökkentő gyógyszerek hatóanyagként használnak (Boruta és Bizukojc, 2017).

3.1.5. Konídiumképzés

Az *Aspergillus*-fajok blasztikus konídiumokat termelnek, viszont nem tekinthetők sem holo-, sem enteroblasztikusnak, mivel az érés során a konídium eredetileg enteroblasztikusan létrejövő sejtfa le bomlik, és egy új sejtfa szintetizálódik a helyébe (Tiedt, 1993). A nemzetségre néhány mikrométeres átmérőjű, vastag falú, pigmentált, erősen hidrofób felszínű konídiumok jellemzőek, melyek elsődleges feladata a genom védelme és a terjesztés. A konídiumokat termelő, hordozó struktúrát konidiofórnak nevezzük. A konidiofór a következő képletekből áll: a lábsejthez szeptum nélkül kapcsolódik a nyél, melynek kiöblösödő végén, a vezikulán alakul ki a metulárium, melyből sarjadzásra emlékeztető aszimmetrikus osztódással jön létre a sporogén fialidréteg, mely a konídiumokat ugyancsak az élesztők bimbózására emlékeztető módon hozza létre (Sewall és mtsai., 1990; Yu, 2010).

A konidiáció a fonalas növekedés kiiktatásával is megvalósítható: mikrociklikus konidiációnak nevezzük azt a jelenséget, mely során a csírázó spórák rögtön ivartalan szaporítóképleteket fejlesztenek (Hanlin, 1994). Sok taxonban (pl. Ustilaginales, Entomophthorales) ez a jelenség a normál életciklushoz tartozik (Hanlin, 1994), egyes fonalas

gombáknál azonban az ivartalan életciklus ilyenemű leegyszerűsödése egy stresszelkerülő mechanizmus: a kedvezőtlen körülmények (pl. hőstressz, szárazság) közé kerülő konídiumok a fonalas növekedés energiaigényét megspórolva hozzák létre a genetikailag azonos másodlagos konídiumokat, melyek a szél vagy a víz révén kedvezőbb körülmények közé is kerülhetnek. Az *Aspergillus niger* mikrociklikus konidiációja esetén a normál konidiációhoz képest jóval kisebb méretű a konidiofór, hiányzik a metularéteg és a másodlagos konídiumok nagyrészt pigmentálatlanok (Anderson és Smith, 1971) (2. ábra, 3. ábra). A stressz növelésével egyre redukálódik a konidiofór.



2. ábra. Normál konidiációra (baloldalt) és mikrociklikus konidiációra (jobbaldalt) jellemző konidiofórok összehasonlítása. (Forrás: J. G. Anderson és J. E. Smith, 1971.)



3. ábra. Mikrociklikus konidiációról készített saját mikroszkópos felvétel.

3.2. Quorum sensing

3.2.1. A quorum sensingről általában

A quorum sensing (QS) mechanizmusának megismerése, mely az 1960-as években kezdődött, megcáfolta azt a nézetet, hogy az egysejtű organizmusok esetén a soksejtűekkel ellentétben a sejtek között nincs kommunikáció és együttműködés. A quorum sensing koncepciója hatvan év alatt sokat fejlődött: kezdetben a bakteriális kommunikációt jelölte, olyan tulajdonságként írták le, mely képessé teszi a baktériumokat arra, hogy a soksejtűekhez hasonlóan viselkedjenek (Waters és Bassler, 2005). Ma már tudjuk, hogy a QS nem csak baktériumokra, sőt, nem is csak egysejtűekre jellemző.

A quorum sensing egy denzitásfüggő inger-válasz rendszer, olyan sajátossága egyes mikrobiális populációknak, mellyel a környezeti paraméterekhez hasonlóan érzékelhetik önmagukat, és a populációdensitás megváltozására reagálni képesek (Poole, 2001). A sejtek kisméretű, diffuzibilis jelmolekulákat szekretálnak a környezetükbe, melyeket autoinducereknek vagy quorum sensing molekuláknak (QSM) nevezünk. A QSM-ek koncentrációja arányos a populációdensitással, és elérve egy küszöbdensitást, olyan jelutal indítanak be, mely képes bizonyos gének expresszióját megváltoztatni. A quorum sensing által szabályozott gének hálózatára QS-regulonként hivatkozik a szakirodalom (Poole, 2001; Waters és Bassler, 2005). A legrégebb óta ismert QSM-ek az N-acil-homoszerin laktonok. A regulon tartalmazhatja (nem minden esetben) a QSM szintéziséhez szükséges géneket is, így a küszöbdensitás felett a QSM a saját szintézisének serkentéséből származó pozitív visszacsatolás miatt felhalmozódik (Poole, 2001), így hirtelen váltás következhet be a fenotípusban.

A quorum sensing szabályozhat biolumineszcenciát, mint a tintahalakkal mutualista kapcsolatban élő *Vibrio fischeri* esetén, továbbá befolyásolja virulenciafaktorok és másodlagos metabolitok termelését, a sejtmotilitást és a biofilmképzést is (Poole, 2001). A biofilm mikroorganizmusok alkotta kompakt és komplex struktúra, mely lehetővé teszi a túlélést kedvezőtlen körülmények között, illetve egyes fajoknál a patogenezis folyamatában is szerepet játszik. Olyan bakteriális biofilmfosszília is ismert, melynek korát 3,25 milliárd évre becsülik (Hall-Stoodley és mtsai., 2004).

Különböző fajok egymással információs háborút viselhetnek, quorum sensing inhibitorokkal (QSI) beavatkozhatnak egymás populációszintű kommunikációjába. A

mechanizmust quorum quenchingnek (QQ) nevezik. A QSI-knek a jövőben nagy gyógyászati jelentősége lehet (Kalia, 2013; Padder és mtsai., 2018).

A quorum sensing bizonyítható felülúszótranszfer-kísérletekkel, melynek lényege, hogy quorum sensing esetén a sejtek a jelmolekulát a környezetükbe szekretálják, így az eredetileg magas sejtdenzitású kultúráról a sejtmentes felülúszóval (kondicionált médium, CM), a viselkedés átvihető alacsonyabb denzitású kultúrára, ahol a sejtek így nem a tényleges, hanem a QSM koncentrációja által indikált denzitásnak megfelelően fognak viselkedni.

3.2.2. Quorum sensing élesztőgombáknál

Hús évvel ezelőtt a *Candida albicans* denzitásfüggő viselkedésének leírása megreformálta a quorum sensing koncepcióját: azóta tudjuk, hogy eukariótákra is jellemző. A quorum sensing szerepe valószínűleg általános a dimorf tranzícióban (Nickerson és mtsai., 2006).

A *C. albicans* 10⁶/ml sejtdenzitás alatt fonalasan nő, afelett élesztőszerűen. Magas denzitás mellett egy izoprenoid alkohol, a parfümipar által is régóta alkalmazott E,E-farnézol gátolja a fonalas növekedést és a biofilmképzést, valamint ellenállóbbá teszi a sejteket az oxidatív stresszel szemben és az ABC multidrogranzsporterek működését is befolyásolja (Albuquerque és Casadevall, 2012; Nickerson és mtsai., 2006; Padder és mtsai., 2018). Mindemellett a farnézol sok más, farnézolt nem termelő fajnál apoptózist tud kiváltani, illetve az *Aspergillus niger* esetén gátolja a konidiációt (Lorek és mtsai., 2008). Egy farnézolt nem termelő *C. albicans* törzsben is megfigyelték a dimorfizmus denzitásfüggését, itt a farnézolsavat azonosították QSM-ként. Egy másik *C. albicans*-ra jellemző autoinducer a MARS (morphogenic autoregulatory substance), melynek szerkezete máig nem ismert. További QSM a tirozol, mely serkenti a fonalas növekedést, hatása azonban farnézol jelenlétében nem érvényesül; ez az antagonizmus finomszabályozásra ad lehetőséget. A tirozolhoz hasonlóan aromás aminosavszármazék a feniletanol és a triptofol, melyeket bár már a '60-as években felfedeztek, akkor még a fonalas növekedést gátló „autoantibiotikumok”-ként írták le őket (Albuquerque és Casadevall, 2012). Ez a két aromás alkohol a *Saccharomyces cerevisiae*-re is jellemző QSM, ott a párosodási (mating) faktorok és az ammónia mellett denzitásfüggő módon szabályozzák az apoptózist. Az ammóniához hasonlóan gáz halmazállapotú QSM a szén-dioxid, mely jellemző például a *C. albicans*-ra. *Histoplasma capsulatum* esetén a dimorf tranzíciót az α -1,3-glükán szabályozza. A *Neurospora crassa*-nál a konidiális anasztomóziscsővek képzésében nyilvánul meg a QS

hatása; a *Cryptococcus neoformans* bizonyos, TUP1 általános represszorgénre mutáns törzsei esetén pedig a QSP1 oligopeptid által szabályozva, alacsony denzitáson a növekedés hiányában (Padder és mtsai., 2018). (**1. táblázat**)

3.2.3. Quorum sensing fonalas gombáknál

A quorum sensing koncepciója soksejtű, fonalas morfológiára is kiterjeszthető. A fonalas gombák másodlagosmetabolit-termelése nő a populációdensitással. Ez egy kompetíciós stratégia, a tápanyagokért és az élőhelyért folytatott küzdelem eszköze. Ilyen allelopatikus metabolitok például az *Aspergillus terreus* által termelt antibakteriális és antifungális hatású lovasztatin (Barriuso, 2015; Boruta és Bizukojc, 2017) vagy a *Penicillium sclerotiorum* által termelt sclerotiorin. Előbbi esetben a linolsavat, oxilipineket (9(S)-HpODE, 13(S)-HpODE) és a γ -butirolaktont (ld. **1. táblázat**), utóbbi esetben a *multicolic acidet* (magyar neve nincs) azonosították QSM-ként (Affeldt és mtsai., 2012; Barriuso, 2015). Az *A. nidulans* penicillintermelése is denzitásfüggő, bár a jelmolekula nem ismert; emellett sok más metabolitot termel a γ -heptalakton mediációjával (Affeldt és mtsai., 2012; Barriuso, 2015).

1. táblázat. Ismert quorum sensing molekulák élesztőgombáknál, illetve az *Aspergillus* nemzetségben.

Ismert QSM-ek élesztőknél	Ismert micéliális QSM-ek az <i>Aspergillus</i> nemzetségben
E,E-farnezol	13(S)-HpODE oxilipin
farnezolsav	9(S)-HODE oxilipin
tirozol	linolsav
1-feniletanol	γ -heptalakton
triptofol	γ -butirolakton
NH ₃	
CO ₂	
QSP1 (NFGAPGGAYPW)	
α -1,3-glükán	
<i>S. cerevisiae</i> párosodási (mating) faktorok	

4. Célkitűzések

Gyakorlati jelentőségük ellenére az élesztőgombák morfogenetikai evolúciójáról méltatlanul keveset tudunk, célunk ezen tudás bővítése. A konídiumképzés és a sarjadzás mechanizmusának morfológiai hasonlóságaira, illetve a mikrociklikus konidiáció jelenségére (ld. 3.1.5. Konídiumképzés) alapozott hipotézisünk szerint az Ascomycota törzs sarjadzó élesztői folyamatos stressznek kitett konídiumokból jöttek létre. Tehát feltételezzük, hogy a konídium az élesztősejt látens homológja (ld. 3.1.3.2. Homológiaviszonyok), vagyis az az ősi struktúra, melyben más funkciót betöltve már létezett a potenciál az élesztőmorfológia kialakítására lehetővé téve, hogy az új morfológia egymástól függetlenül többször megjelenjen. Ez a potenciál vagy exaptációs karakter lehetett az életciklus lerövidítésére (mikrociklikus konidiáció) való képesség, mely a fenotípust mutató mai fonalas gombáknál egy stresszelkerülő mechanizmus, így elképzelésünk szerint az egysejtű élesztőmorfológia folyamatos stressz által végtelenített mikrociklikus konidiáció eredménye. A kutatócsoport más tagjai erre a feltételezett evolúciós kapcsolatra keresnek bizonyítékot komparatív genomikai és transzkriptomikai eszközökkel. A feltételezett evolúciós útvonalat azzal szeretnénk modellezni, hogy a mikrociklikus konidiáció egyszerűsödési tendenciáját molekuláris eszközökkel felerősítve élesztőmorfológiájú *Aspergillus niger*t hozunk létre, mely kezelhetőség szempontjából az ipar számára is rendkívül előnyös volna.

Az én részprojektem arra a munkahipotézisre épül, hogy amennyiben az élesztősejt és a konídium valóban látens homológok, úgy a konídiumokra is jellemző lehet az élesztőknél már ismert quorum sensing (ld. 3.2.2. Quorum sensing élesztőgombáknál). Tehát célom annak igazolása, hogy az *Aspergillus niger* konídiumaira is jellemző a denzitásfüggő viselkedés. A quorum sensinget eddig a konídiumok duzzadási mintázatában igyekeztem tetten érni. A quorum sensing konídiumoknál való meglétének bizonyítása és az élesztőkre jellemző QS-gel való összevetése (a befolyásolt fenotípusokat, QSM-ek szerkezetét és a jelátviteli utakat tekintve) megtámogathatja a fentebb ismertetett evolúciós hipotézist. A konídiumokra jellemző QSM(-ek) meghatározásával szeretnénk tisztázni, a konídiumokra jellemző QS független-e a gombafonalak másodlagosmetabolit-termelésében megnyilvánuló QS-tól (ld. 3.2.3. Quorum sensing fonalas gombáknál), illetve mutat-e a QSM-ek tekintetében kémiai hasonlóságot az élesztőkre jellemző QS-gel.

5. Anyagok és módszerek

Alkalmazott táptalaj: MEA (2% malátakivonat, 0,05% élesztőkivonat, 1,5% agar – a koncentrációk vegyesszázalékban (g/100 ml) értendők)

Alkalmazott tápoldatok: Na-L-glutamáttal kiegészített MM (1 g/l glükóz; 5 g/l Na-L-glutamát; 1,98 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 g/l KH_2PO_4 ; 0,1221 mg/l MgSO_4 ; 0,15 mg/l CuSO_4 ; 3,453 mg/l FeSO_4 ; 0,618 mg/l ZnSO_4 ; 2,369 mg/l MnSO_4 és 46,7 mg/l CaCl_2 ; pH=4,6); Na-L-glutamáttal kiegészített glükózmentes MM

Tenyésztési körülmények: Az *Aspergillus niger* ATCC1015 törzséből MEA táptalajra agarkockával oltok át, a tenyészeteket sötétben, 10-14 napig 37°C-on nevelem a konídiumszuszpenzió készítése előtt. A kiegészített MM tápoldatot konídiumszuszpenzióval oltom le, a konídiumkultúrákat üveglombikban 45,5°C-on, 160 rpm-en rázatom. 45,5°C-on a konídiumok nem csíráznak, csak duzzadnak. A QSM meghatározásához fonalas tenyészetet is készítek, ekkor az inkubáció hőmérsékletét 27°C-ra állítom be.

Konídiumszuszpenzió készítése: A konídiumokat MEA-val kiöntött csészékről Tween 20 0,05%-os vizes oldatával gyűjtöm le 40 μm pórusméretű sejtszűrőn keresztül Falcon csövekbe. A Tween 20 (polioxietilén(20)-szorbitán-laurát) egy felületaktív anyag, mely megakadályozza a konídiumok aggregációját. A Falcon csöveket 1700 g gyorsulással centrifugálom 15 percig, majd a felülúszó eltávolítása után a konídiumokat még egyszer átmosom: csövenként a pelletet 1,5 ml 0,2%-os Tween 20-oldatban veszem fel, és alapos vortexelés után Eppendorf csövekben 2000 g-n centrifugálom 5 percig. A felülúszó eltávolítása után a pelletet csövenként 400 μl 0,2%-os Tween 20-oldatban felvéve egyesítem azok tartalmát, és alapos vortexelést követően 500-szoros hígításban Bürker-kamra segítségével meghatározom a konídiumszuszpenzió sejtdenzitását.

Kísérleti elrendezések:

A denzitásfüggés bizonyításához 30-30 ml MM tápoldatot oltottam le 10^5 , 10^6 , 10^7 és 10^8 konídium/ml denzitású konídiumkultúrákat létrehozva, három technikai és két biológiai ismétléssel; kétnapi inkubáció után mikroszkóppal megvizsgáltam a mintákat. A denzitásfüggést két technikai és két biológiai ismétléssel ellenőriztem sejtdenzitásra normált tápanyagkoncentráción is, melyen sejtdenzitástól függetlenül minden mintában egy

konídiumra ugyanannyi tápanyag jutott: 10^6 konídium/ml denzitású kultúra készítéséhez tízszeres hígítású, 10^7 /ml denzitásúhoz hígítatlan, 5×10^7 /ml denzitásúhoz ötszörös, 10^8 /ml denzitású kultúra készítéséhez pedig tízszeres töménységű MM tápoldatot használtam. Ezen minták duzzadási viszonyait standard (azaz populációdensitástól független koncentrációjú) tápoldatba oltott azonos denzitású konídiumkultúrákéival hasonlítottam össze.

A QSM létének bizonyítására felülúszótranszfer-kísérleteket (ld. 3.2.1. A quorum sensingről általában) végeztem. Tapasztalataink szerint a duzzadási mintázat meghatározásában fontos szerepe van a rendelkezésre álló glükóznak, így két olyan kísérleti elrendezést dolgoztam ki a felülúszótranszfer megvalósítására, melyben a glükózellátottság nem szerepel változóként. Mindkét elrendezésnél először nagy térfogatú (I. elrendezés: 100 ml, II.: 200 ml), magas kondicionáló denzitású (10^8 vagy 2×10^8 konídium/ml) konídiumkultúrát inkubáltam 4 napig, majd 3200 g-n történő 10 perces centrifugálással és a felülúszó 0,1 μ m pórusméretű sejtszűrőn történő átjuttatásával eltávolítottam a konídiumokat. Az I. elrendezésnél kolorimetriás glükóزدetektáló kit (Thermo Fisher invitrogen Glucose Colorimetric Detection Kit) segítségével, a gyártó utasításait betartva meghatároztam a kondicionált médium (azaz a sejtmentes felülúszó) glükózkoncentrációját. A felülúszót 160-szorosan hígítottam a méréshez. A módszer azon az elven alapszik, hogy míg a glükóz-oxidáz a glükózból glükono- δ -laktont szintetizál, H_2O_2 szabadul fel, melyet a rendszerben lévő másik enzim, a tormaperoxidáz (HRP) elektrondonorként tud felhasználni a kromogén szubsztrát redukciójához, a rózsaszínű termék abszorbanciája pedig mikrotiter plate readerrel detektálható. A kondicionált médium mellé kétféle azonos glükózkoncentrációjú kontrollt mértem össze. Az (A) kontroll esetén a kondicionált médiumban mért glükózkoncentrációt úgy állítottam be, hogy friss, glükózmentes tápoldathoz megfelelő mennyiségű 500 g/l koncentrációjú glükózoldatot mértem, a (B) kontrollokat pedig glükózt is tartalmazó friss tápoldatból hígítottam ki desztillált vízzel. A kétféle kontrollban különbözik a nitrogénforrások és szerves ionok koncentrációja, valamint emiatt a kontrollok ozmózisnyomása is eltér. A kondicionált médiumból három lombikba 30-30 ml-t öntöttem, és melléjük három (A), illetve három (B) kontrollt mértem össze. A II. elrendezésnél az előállított sejtmentes kondicionált médium feléből extraháltam az apoláros molekulákat. Olyan szerves oldószereket választottam, melyek vízdékonysága elhanyagolható (petróleumbenzin és hexán); ez azért fontos, hogy a kondicionált médium az extrakció után is használható maradjon. 15 ml apoláris oldószert adtam a 100 ml sejtmentes felülúszóhoz. Alapos vortexelés után 20 percig rázóinkubátorban 200 rpm fordulatszámon inkubáltam, majd

20 percig állni hagytam, hogy a frakciók elváljanak egymástól. Lepipettáztam a szerves frakciót, majd az edény aljáról 90 ml kondicionált médiumot vettem ki, és három lombikba szétosztottam. Az extrakción át nem esett kondicionált médiumból is három lombikba 30-30 ml-t mértem. Így ebben az elrendezésben az extrakción átesett és át nem esett kondicionált médiumokban minden tápanyag koncentrációja megegyezik (nemcsak a glükózé), az extrakcióval csak a konídiumok által termelt apoláris molekulákat távolítottam el. Mindkét kísérleti elrendezés esetén a lombikokat frissen létrehozott konídiumszuszpenzióval oltottam le 5×10^6 konídium/ml denzitására, és két napig rázóinkubátorban neveltem. Az említett denzitás megválasztása optimalizációs előkísérletek eredménye. Olyan denzitást kellett választanom, mely lényegesen alacsonyabb a kondicionáló denzitásnál, hogy a „saját” QSM-ek mennyisége elenyésző legyen a kondicionált médiummal átvitt mennyiséghez képest; illetve amelyen centrifugálás nélkül is vizsgálhatók a sejtek, ugyanis a centrifugálás növeli az aggregáció valószínűségét, amely zavaró a sejtszámolásnál. A duzzadt konídiumok hajlamosabbak aggregátumok kialakítására, mint a nyugvók, így az optimális denzitás megválasztásánál azt is szem előtt kellett tartanom, hogy a konídiumok többsége nyugvó legyen, viszont ne az összes, hiszen akkor nem láthatnánk a kondicionált médium hatását. A kétnapos inkubáció után mikroszkóppal megvizsgáltam a mintákat, és beépített szoftver segítségével felvételeket készítettem 200-szoros névleges nagyításon. Az I. elrendezésű felülúszótranszfer-kísérletet az optimalizáció után kétszer, a II. kísérletet háromszor végeztem el 3-3 biológiai replikával.

A QSM meghatározása folyamatban van. Ehhez 40-40 ml térfogatban 8 lombikba 2×10^8 /ml, 5 lombikba 10^6 /ml és 5 lombikba 5×10^5 /ml denzitású konídiumkultúrákat hozok létre, előbbieket $45,5^\circ\text{C}$ -on inkubálom, utóbbi ötöt pedig 27°C -on növesztem fonalasan négy napig. A II. elrendezésben megvalósuló felülúszótranszfer-kísérlethez hasonlóan centrifugálás és szűrés után extrahálok 5-5 ml szerves oldószer felhasználásával a fonalas kultúrákból és a 10^6 /ml denzitású konídiumkultúrákból származó kondicionált médiumok mindegyikéből, a 2×10^8 /ml denzitású konídiumkultúrákból származó kondicionált médiumok közül pedig ötből. Mind a nyolc magas denzitáson kondicionált médiumot (5 extrahált, 3 nem extrahált) friss konídiumokkal leoltom ellenőrzés céljából. Amennyiben van különbség a duzzadási mintázatban, úgy a hipotetikus QSM átoldódott a szerves fázisba. A szerves extraktumok kémiai összetételét a Szegedi Tudományegyetemen egy kollaborációs partnerünk fogja meghatározni tömegspektrometriás eljárással.

Kiértékelés: A konídiumkultúrák duzzadási arányát, és a duzzadt konídiumok átlagos átmérőjét vizsgáltam. A denzitásfüggés bizonyításánál a mikroszkópos felvételeket manuálisan értékeltem ki, mintánként 20 konídium átmérőjét mértem meg. A felülúszótranszfer-kísérletek kiértékelésénél a Colony Counter bővítménnyel kiegészített ImageJ szoftverrel dolgoztam. A következő paramétereket állítom be: minimális átmérő: 130 pixel, maximális átmérő: 5000 pixel, minimális cirkularitás: 0,6. Mintánként kb. 1000-6000 konídiumot mérek le a szoftver segítségével. Az előállt adatsokaságra R-ben végeztem a statisztikai kiértékelést segítséggel. Az 5 μm feletti átmérővel rendelkező konídiumokat tekintem duzzadtnak. A minták duzzadási arányait az alkalmazhatóság feltételeinek teljesülése esetén Student-féle t-próbával hasonlítottam össze. A duzzadt konídiumokat vizsgálva megállapítottam, hogy a minták szignifikánsan különböznek-e egymástól; a többfaktoris ANOVA (varianciaanalízis) függvényt és a Tukey-féle post-hoc tesztet használtam erre a célra. A többfaktoris ANOVA úgy hasonlítja össze a biológiai replikák összevonásával létrejött populációkat, hogy figyelembe veszi a replikák közötti varianciát is.

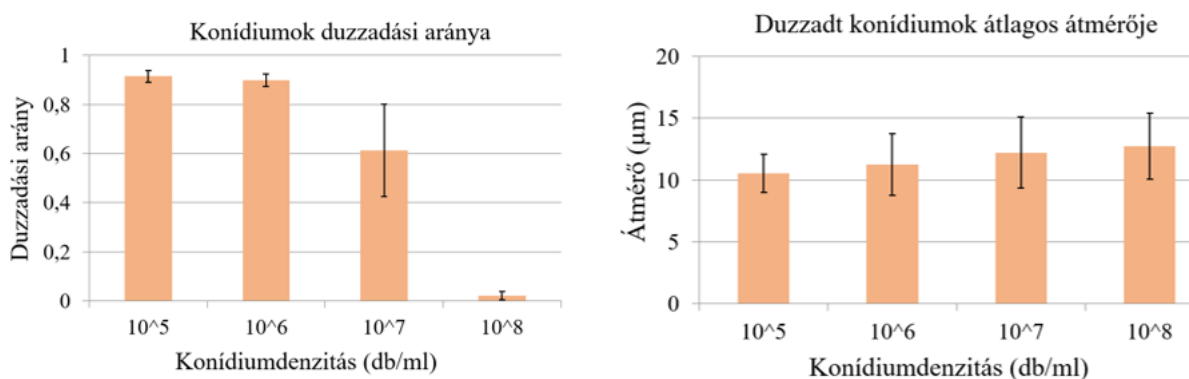
6. Eredmények

A quorum sensing *Aspergillus niger* konídiumok duzzadására gyakorolt hatásának igazolása céljából először a denzitásfüggést vizsgáltam meg standard, illetve populációdenzitásra normált tápanyagkoncentrációjú tápoldatban; majd a quorum sensing molekula (QSM) létének igazolására felülúszótranszfer-kísérleteket végeztem.

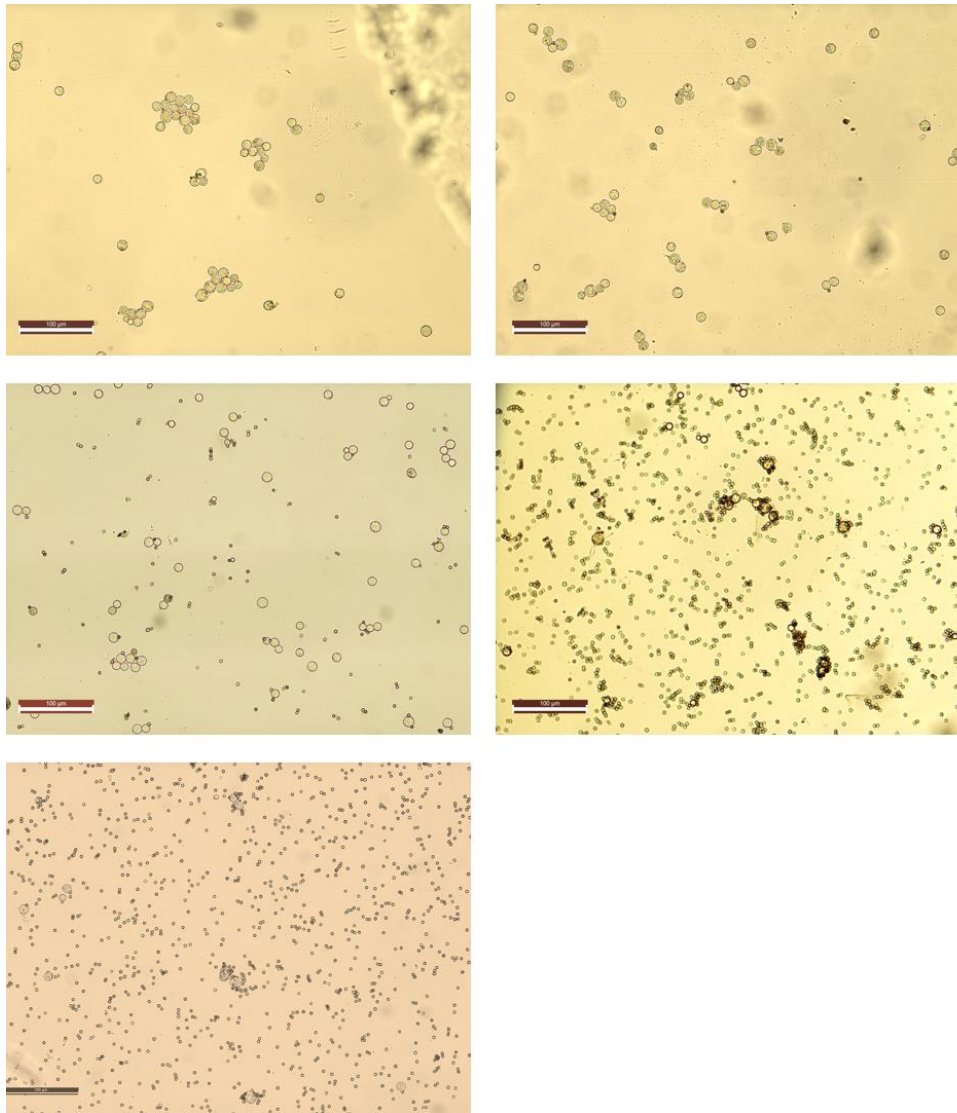
6.1. Denzitásfüggés standard tápoldatban

Standard, azaz populációdenzitástól független tápanyag-koncentrációjú tápoldat felhasználásával készített eltérő denzitású (10^5 , 10^6 , 10^7 és 10^8 /ml) konídiumkultúrákat inkubáltam három technikai és biológiai ismételében.

Megállapítottam, hogy a konídiumok populációdenzitásuktól függően duzzadtak (**5. ábra**). Minél nagyobb a populációdenzitás, a konídiumoknak annál kisebb hányada duzzad, viszont a duzzadt konídiumok átlagos átmérője annál nagyobb (**4. ábra**). 10^5 /ml, valamint 10^6 /ml denzitásokon a konídiumok többsége (~90%) duzzad; ezzel szemben 10^8 /ml denzitáson a duzzadási arány csak 1-2%. 10^7 /ml denzitáson a legnagyobb biológiai és technikai ismétlések duzzadási arányai között a szórás.



4. ábra. A duzzadt konídiumok aránya (baloldalt) és átlagos átmérője (jobb oldalt) különböző populációdenzitásokon standard tápoldatban. Az oszlopok három technikai ismétlés két-két biológiai párhuzamosának átlagát reprezentálják, feltüntetve a hat-hat érték szórását.



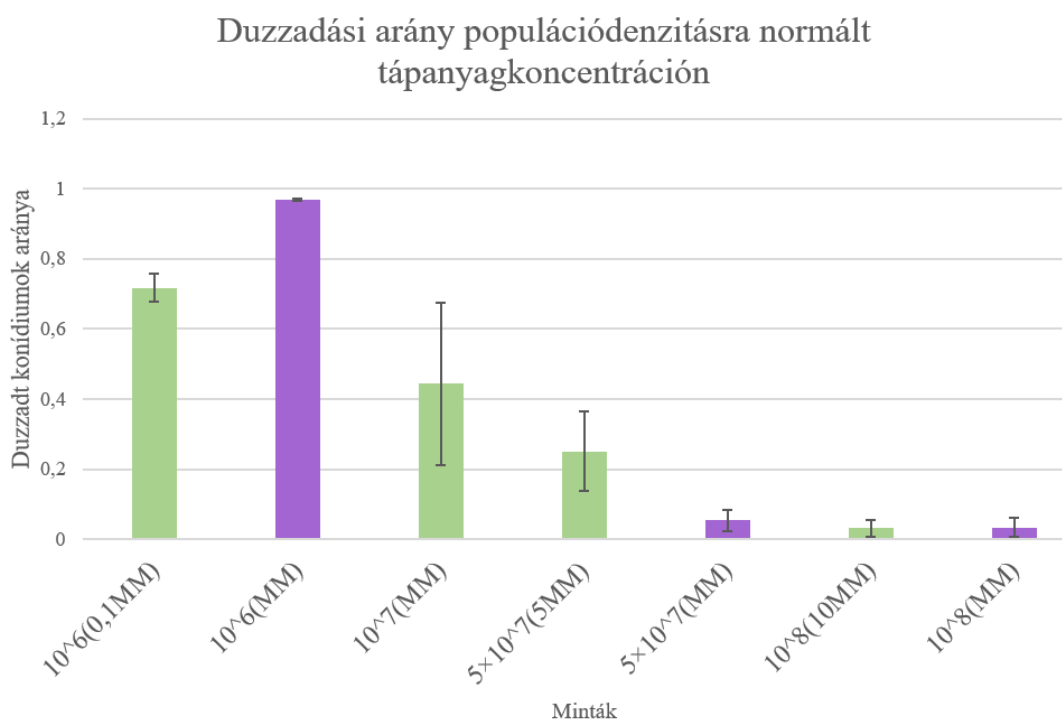
5. ábra. Populációdensitásra jellemző duzzadási mintázatok standard tápoldatban. A mikroszkópos felvételek 200-szoros névleges nagyítással készültek az alábbi denzitású kultúrákról (balról jobbra, majd fentről lefelé haladva): 10^5 , 10^6 , 10^7 , 5×10^7 és 10^8 konídium/ml. Valamennyi fényképen a lépték 100 μm -t jelöl.

6.2. Denzitásfüggés populációdensitásra normált tápanyag-koncentrációjú tápoldatban

A duzzadási arányok standard tápoldatban tapasztalható trendje magyarázható lehetne azzal is, hogy az alacsony denzitásokhoz képest magasabb denzitásokon összesen több sejtre jut ugyanannyi tápanyag, és emiatt képes arányaiban kevesebb sejt duzzadni. Annak eldöntésére, hogy az eltérő duzzadási mintázat mögött valóban csak az eltérő tápanyag-

ellátottság áll-e, populációdensitásra normált tápanyag-koncentrációjú tápoldatban inkubáltam a konídiumokat, melyben denzitástól függetlenül minden konídiumra ugyanannyi tápanyag jut. 10^6 konídium/ml denzitású kultúra készítéséhez tízszeres hígítású, 10^7 /ml denzitásúhoz hígítatlan, 5×10^7 /ml denzitásúhoz ötszörös, 10^8 /ml denzitású kultúra készítéséhez pedig tízszeres töménységű MM tápoldatot használtam. A kísérletet két technikai és három biológiai ismétléssel végeztem el.

10^6 /ml denzitás esetén a duzzadási arány alacsonyabb (96,93% helyett 71,77%), mint a standard tápoldatban tapasztalható; 5×10^7 /ml denzitáson pedig magasabb (5,34% helyett 25%), viszont a duzzadási arányokra a standard tápoldatban megállapított trend továbbra is fennáll: magasabb denzitáson a duzzadás aránya alacsonyabb (**6. ábra**). Fontos megjegyezni, hogy a magas tápanyag-koncentráció és az ezzel járó hiperozmotikus viszonyok, valamint az alacsony tápanyag-koncentráción jelentkező hipozmolaritás stresszt jelenthetnek a sejtek számára, mely szintén befolyásolhatja a duzzadási mintázatot.



6. ábra. A duzzadt konídiumok aránya populációdensitásra normált tápanyag-koncentráción. A zárójelben a tápoldat töménységét tüntettem fel (pl. 0,1MM tízszeres hígítású, 10MM tízszeres töménységű). A zöld oszlopok két technikai ismétlés két-két biológiai párhuzamosának átlagát jelölik. A lila oszlopok standard (hígítatlan) tápoldatban inkubált kontrollok, két technikai ismétlés egy-egy mintájának átlagát jelölik. A hibásávok a zöld oszlopok esetén négy, lila oszlopok esetén a két minta szórását jelöli.

6.3. Felülúszótranszfer-kísérlet – I. kísérleti elrendezés

Az két technikai és három biológiai ismétléssel megvalósult, I. elrendezésben végzett felülúszótranszfer-kísérletben (ld. 5. Anyagok és módszerek) a négynapos kondicionált médiumban (CM) inkubált konídiumokat kétféle, azonos glükózkoncentrációjú kontrollal hasonlítottam össze.

A négynapos kondicionált médiumban (CM) inkubált konídiumok eltérőbben viselkedtek a (B) kontrolltól, mint az (A)-tól. A vizsgált paramétereket tekintve a kétféle kontroll közötti eltérés legalább akkora, mint az (A) kontroll és a négynapos kondicionált médiumban inkubált konídiumpopulációk közötti eltérés (**2. táblázat, 3. táblázat, 7. ábra**). A két technikai ismétlést külön ábrázoltam és értékeltem ki, azokon belül a három-három replikát összevontam. A kétféle kontroll különbözik a nitrogénforrások és szerves ionok koncentrációjában, valamint emiatt az ozmózisnyomásuk is eltér. Nem tudjuk, melyik a megfelelőbb kontroll, mivel nem ismerjük a nitrogénforrások fogyási sebességét. Azt a következtetést vontam le, hogy ez a kísérleti elrendezés nem ad releváns információt a quorum sensing vonatkozásában, ugyanakkor megmutatta, hogy a glükóz mellett más tápanyagok is befolyással bírnak a duzzadásra.

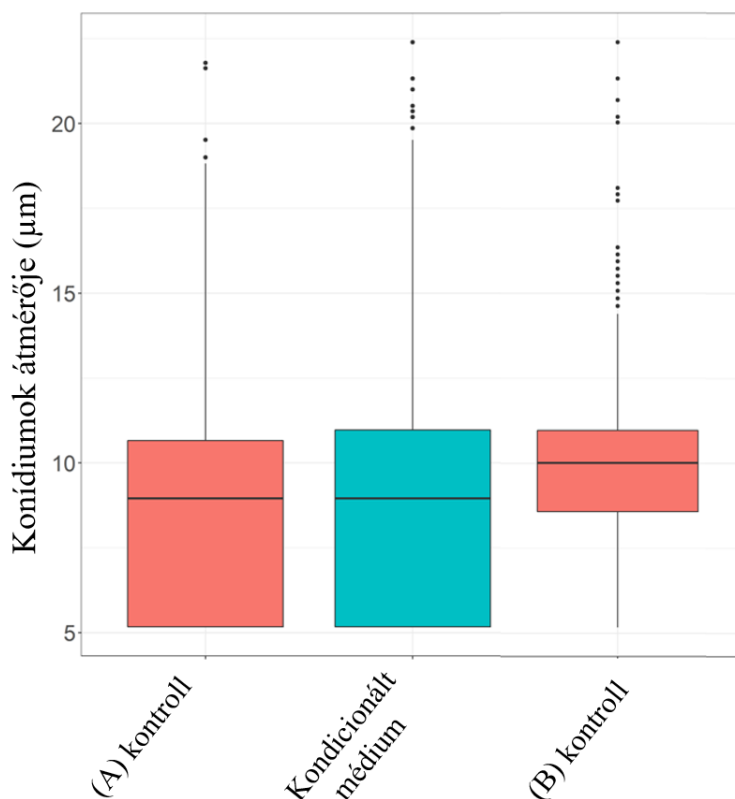
2. táblázat. Az I. elrendezésben megvalósuló felülúszótranszfer-kísérlet esetén a duzzadt konídiumok aránya és átlagos átmérője.

		1. kísérlet	2. kísérlet
Duzzadt konídiumok aránya	4 napos CM	0,37481	0,19875
	(A) kontroll	0,39974	0,22444
	(B) kontroll	0,66128	0,41218
Szórás a három replika duzzadási arányaiból	4 napos CM	0,04120	0,04714
	(A) kontroll	0,13241	0,09843
	(B) kontroll	0,1032	0,07151
Duzzadt konídiumok átlagos átmérője (μm)	4 napos CM	8,972	6,604
	(A) kontroll	8,531	6,897
	(B) kontroll	9,611	8,399
Szórás a három replika átlagos átmérőiből	4 napos CM	0,1839	0,5259
	(A) kontroll	0,9173	1,1772
	(B) kontroll	0,6117	0,1463

3. táblázat. Az I. elrendezésben megvalósuló felülúszótranszfer-kísérletben a kétféle kontroll és a négynapos kondicionált médiumban (CM) inkubált konídiumok átlagos duzzadási arányainak Student-féle t-próbával, valamint a duzzadt konídiumpopulációk többfaktoros ANOVA függvénnel és Tukey-féle post-hoc teszttel történő páronkénti összehasonlításának eredménye. Az 5%-os hagyományos szignifikanciaküszöb alatti p-értékeket *-gal jelölöm.

		1. kísérlet		2. kísérlet	
		(A) kontroll	(B) kontroll	(A) kontroll	(B) kontroll
Student-féle t-próba duzzadási arányokra	4 napos CM	p=0,3856	p=0,00561*	p=0,04888*	p=0,003861*
	(A) kontroll		p=0,02714*		p=0,04294*
Többfaktoros ANOVA duzzadt konídiumok populációira	4 napos CM	p=0,0001698*	p<10 ⁻¹⁶ *	p<10 ⁻¹⁶ *	p<10 ⁻¹⁶ *
	(A) kontroll		p<10 ⁻¹⁶ *		p<10 ⁻¹⁶ *

Duzzadt konídiumok átmérője
I. elrendezés, 1. kísérlet



7. ábra Az I. elrendezésben megvalósuló 1. felülúszótranszfer-kísérletben a duzzadt konídiumok átmérő szerinti eloszlását szemléltető dobozábra.

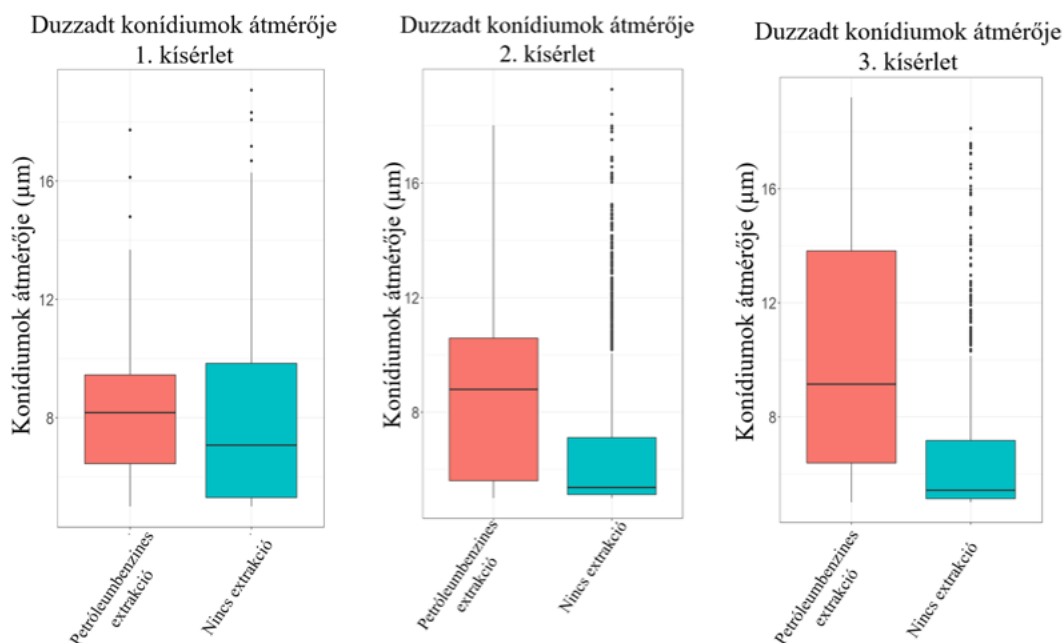
6.4. Felülúszótranszfer-kísérlet – II. elrendezés

A három technikai és három biológiai ismétléssel megvalósult, II. elrendezésben végzett felülúszótranszfer-kísérletek során szerves extrakción átesett és át nem esett kondicionált médiumban inkubált konídiumok duzzadási mintázatát hasonlítottam össze. Ezen elrendezésnek az az előnye a I.-höz képest, hogy az extrakción átesett és át nem esett felülúszókban a tápanyagok koncentrációja megegyezik, mivel ugyanabból a konídiumkultúrából származnak. A három technikai ismétlést külön ábrázoltam és értékeltem ki, azokon belül a három-három replikát összevontam.

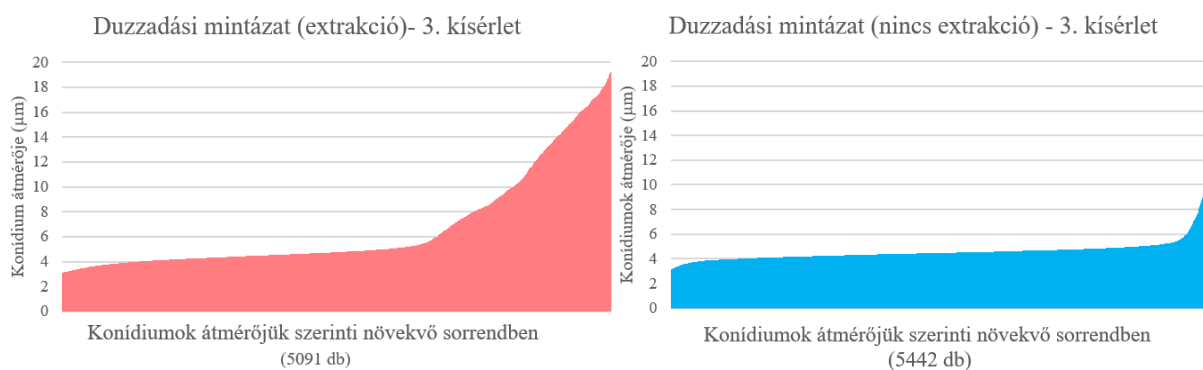
A Student-féle t-próba szerint az extrakción átesett és át nem esett felülúszókban inkubált konídiumok duzzadási arányai között szignifikáns eltérés tapasztalható, valamint a többfaktoros ANOVA és Tukey-féle post-hoc teszt tanúsága szerint a két csoport duzzadt konídiumpopulációi is szignifikánsan eltérnek (**4. táblázat, 8. ábra, 9. ábra**). Mind a duzzadási arány, mind a duzzadt konídiumok átlagos átmérője az extrakción átesett tápoldatban inkubált konídiumok esetén a magasabb. A 3. kísérletnél (technikai ismételés) az extrakción átesett felülúszóban inkubált konídiumok egy része csírázott is, míg az extrakción át nem esett felülúszóban inkubált konídiumokra ez nem volt jellemző.

4. táblázat. A II. elrendezésben megvalósuló felülúszótranszfer-kísérletben mért átlagos duzzadási arányok és a duzzadt konídiumok átlagos átmérője; valamint ezen jellemzők Student-féle t-próbával, többfaktoros ANOVA-val és Tukey-féle post-hoc teszttel történő összehasonlításának eredménye extrakción átesett és át nem esett felülúszóban inkubált konídiumpopulációk esetén. Az 5%-os hagyományos szignifikanciaküszöb alatti p-értékeket *-gal jelölöm.

	1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet
Duzzadt konídiumok aránya (extrakción átesett CM)	0,23633	0,32925	0,40935
Duzzadt konídiumok aránya (extrakción át nem esett CM)	0,16753	0,20127	0,14002
Student-féle t-próba duzzadási arányokra	p=0,02143*	p=0,00316*	p=0,01161*
Duzzadt konídiumok átlagos átmérője (extrakción átesett CM)	8,085 µm	8,622 µm	10, 157 µm
Duzzadt konídiumok átlagos átmérője (extrakción át nem esett CM)	7,843 µm	6,706 µm	6,707 µm
Többfaktoros ANOVA duzzadt konídiumok populációira	p=5,2×10 ⁻⁶ *	p<10 ⁻¹⁶ *	p<10 ⁻¹⁶ *



8. ábra. A II. elrendezésben megvalósuló felülúszótranszfer-kísérletben a duzzadt konídiumok átmérő szerinti eloszlását szemléltető dobozábrák.



9. ábra. A II. elrendezésben megvalósuló 3. felülúszótranszfer-kísérletben az összes konídium átmérő szerinti eloszlását szemléltető diagramok. A baloldali diagram a szerves extrakción átesett, a jobboldali az extrakción át nem esett felülúszóban inkubált konídiumokra vonatkozik. A konídiumokat 5 µm felett tekintem duzzadtnak.

7. Diszkusszió

Annak bizonyítását tűztük ki jelen kutatás céljaként, hogy az *Aspergillus niger* konídiumaira is jellemző a quorum sensing, azaz a denzitásfüggő viselkedés.

Az a megfigyelés, hogy a konídiumok mind standard, mind populációdenzitásra normált tápanyagkoncentrációjú tápoldatban populációdenzitásuktól függő duzzadási mintázatot mutatnak, bizonyítja a denzitásfüggő viselkedést. Annak igazolására, hogy a denzitásfüggés hátterében egy szekretált kismolekula áll, két kísérleti elrendezést dolgoztam ki. I. kísérleti elrendezésben megvalósított felülúszótranszfer-kísérletek csak arra vonatkozóan adtak információt, hogy a konídiumok duzzadásában a tápanyag-ellátottság is fontos tényező. A II. elrendezésben a felülúszó-transzfert szerves extrakcióval kötöttem össze, mely ötletemet arra alapoztam, hogy amennyiben a konídiumokra jellemző QSM is apoláros, mint az *Aspergillus* nemzetség tagjaira jellemző összes ismert QSM, és az élesztőknél megismert QSM-ek egy része, akkor szerves extrakcióval úgy távolíthatom el azt a felülúszóból, hogy semmilyen tápanyag koncentrációja nem változik. Ezzel áthidalom azt, az I. kísérleti elrendezésnél jelentkező problémát, hogy a duzzadási mintázat tápanyag-ellátottságtól való függése miatt nem tudtam megfelelő kontrollt létrehozni. Az extrakción átesett felülúszóban inkubált konídiumok esetén tapasztalt nagyobb duzzadási arány megfelel a várakozásaimnak: a QSM hiányában kevésbé érvényesül a duzzadás gátlása. A II. elrendezésben végzett felülúszótranszfer-kísérletekkel tehát bebizonyítottam, hogy a denzitásfüggés hátterében egy szekretált, apoláros molekula áll. Összegezve, igazoltam, hogy a konídiumok duzzadásában szerepet játszik a tápanyag-ellátottság mellett a quorum sensing általi szabályozás is, mely magas denzitásokon a konídiumok duzzadásának gátlásában nyilvánul meg.

A nyugvó konídiumok metabolikus és transzkripciók aktivitását az utóbbi években bizonyították (Novodvorska és mtsai., 2016; Wang és mtsai., 2021). A dormancia megtörésekor a konídiumok először duzzadnak, majd csíráznak, mialatt metabolikus és szintetikus aktivitásuk jelentősen megnő (D'enfert, 1997). Úgy gondoljuk, hogy a konídiumok esetén a duzzadás denzitásfüggésének evolúciós haszna és populációökológiai értelme az lehet, hogy a mechanizmus segítségével a konídiumok még azelőtt kommunikálhatnak egymással, hogy a rendelkezésre álló tápanyagmennyiség elfogy, és magas populációdenzitás esetén a konídiumpopuláció többségénél a duzzadás gátlásában megnyilvánuló válasznak köszönhetően lehetnek olyan konídiumok, melyek befejezhetik az

életciklusukat. Ezzel szemben, ha magas denzitáson minden konídium duzzadásnak indulna, elképzelhető, hogy a csírázás után egyik egyed sem lenne képes befejezni az életmenetét, mielőtt a tápanyagok elfogynának.

A szakirodalomban nem találkoztam olyan példával, ahol a quorum sensing által szabályozott fenotípusra a tápanyag-ellátottság is befolyással bírna, és annak sincs nyoma az irodalomban, hogy populációdenziásra normált tápanyagkoncentrációjú médiumban vizsgálták volna a denzitásfüggést. Azonban, ha igaz a feltételezésünk, hogy a konídiumok esetén a QS célja az éhezés elkerülése, úgy nem meglepő, hogy az optimális duzzadási mintázat kialakításához szükségesek a tápanyag-ellátottságból származó jelek is.

Az, hogy az *Aspergillus niger* konídiumokra jellemző a quorum sensing, amely egy másodlagosmetabolit-termeléstől eltérő folyamatban nyilvánul meg, támogatja az élesztők morfogenetikai eredetére vonatkozó elméletünket. A QSM azonosításával és a jelátviteli út feltérképezésével további hasonlóságokat kereshetünk a jövőben.

A szerves extraktumok kémiai összetételének meghatározása folyamatban van. Összehasonlítjuk a magas (2×10^8 konídium/ml) és alacsony (10^6 konídium/ml) denzitású konídiumkultúrák kondicionált médiumából származó extraktumok összetételét, a kapott QSM-jelöltek hatását pedig kísérletesen ellenőrizni fogjuk. A QSM-et összevetjük majd az ismert, élesztőkre jellemző QSM-ekkel. A konídiumkultúrák és a fonalas gombák extraktumainak összehasonlításával azt szeretnénk tisztázni, hogy a konídiumokra jellemző, valamint a gombafonalakra jellemző QS független-e egymástól.

Számos dimorf humán kórokozót ismerünk, melyek patogenezisében fontos szerepet játszik a dimorf tranzíció, mely egyes fajoknál a quorum sensing szabályozása alatt áll. Számos élesztőfajt és fonalas gombát hasznosít az ipar, mindkét csoportban ismert a quorum sensing jelensége (utóbbiak másodlagosmetabolit-termelésében játszik fontos szerepet). Ezen okokból kifolyólag úgy gondoljuk, hogy az élesztők és a fonalas gombák viszonyainak megértése, valamint a gombákra jellemző quorum sensing alaposabb megismerése a jövőben lehetővé teheti eredményesebb antifungális terápiák kidolgozását, illetve az ipar szempontjából releváns gombák hatékonyabb alkalmazását. Reményeim szerint kutatásaimmal hozzájárulhatok egy, az élesztők morfogenetikai eredetével kapcsolatos hiánypótló evolúciós koncepció megszületéséhez.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, dr. Nagy Lászlónak és dr. Csernetics Árpádnak a rengeteg segítségért és a hasznos tanácsokért. Hálás vagyok a Lendület Gomba Genomika és Evolúció Csoport minden tagjának, különösen dr. Varga Tordának a statisztikai kiértékelésben nyújtott segítségéért. Köszönetemet fejezem ki dr. Kocsubé Sándornak, aki belső konzulensként támogatta munkámat, és dr. Szekeres Andrásnak, aki a quorum sensing molekula meghatározásában nyújt segítséget. Szeretném kiemelni, hogy a jelen közlemény alapjául szolgáló kutatást a Nemzeti Orvosbiológiai Alapítvány Nemzeti Tudósképző Akadémia Programja támogatta a Kulturális és Innovációs Minisztérium pénzügyi hozzájárulásával.

9. Irodalomjegyzék

- Anderson, J. G., & Smith, J. E. (1971). The Production of Conidiophores and Conidia by Newly Germinated Conidia of *Aspergillus niger* (Microcycle Conidiation). In *Journal of General Microbiology* (Köt. 69).
- Affeldt, K. J., Brodhagen, M., & Keller, N. P. (2012). *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on G protein-coupled receptors. *Toxins*, 4(9), 695–717. <https://doi.org/10.3390/toxins4090695>
- Albuquerque, P., & Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi a review. In *Medical Mycology* (Köt. 50, Issue 4, o. 337–345). <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>
- Amoah-Buahin, E., Bone, N., & Armstrong, J. (2005). Hyphal growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 4(7), 1287–1297. <https://doi.org/10.1128/EC.4.7.1287-1297.2005>
- Barriuso, J. (2015). Quorum sensing mechanisms in fungi. *AIMS Microbiology*, 1(1), 37–47. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2015.1.37>
- Boruta, T., & Bizukojc, M. (2017). Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Köt. 33, Issue 2). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2206-9>
- D'enfert, C. (1997). REVIEW Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*.
- Dickinson, L. R. (2008). Filament Formation in *Saccharomyces cerevisiae*-a Review* Dedicated to the memoQ' of Anna Kocko\'a-Kratochvilo\'a. In *REVIEW Folia Microbiol* (Köt. 53). <http://www.biomed.cas.cz/mbu/fofia/>
- Csernetics, Á., Varga, T., Hegedüs, B., Szathmári, B., Sahu, N., Hegyi, H., Nagy, G. L. (2022). Comparative transcriptomics to study stress induced morphological changes in fungi. 31st Fungal Genetics Conference, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, CA Abstract book pp.151
- Dujon, B. (2010). Yeast evolutionary genomics. In *Nature Reviews Genetics* (Köt. 11, Issue 7, o. 512–524). <https://doi.org/10.1038/nrg2811>
- Fausto, A., Rodrigues, M. L., & Coelho, C. (2019). The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. In *Frontiers in Microbiology* (Köt. 10, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>
- Fisher, R. M., & Regenbreg, B. (2019). Multicellular group formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1910). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1098>

- Gabora, L., Scott, E. O., & Kauffman, S. (2013). A quantum model of exaptation: Incorporating potentiality into evolutionary theory. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Köt. 113, Issue 1, o. 108–116).
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2013.03.012>
- Gauthier, G. M. (2015). Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects. In *PLoS Pathogens* (Köt. 11, Issue 2). Public Library of Science.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004608>
- Geijer, C., Ledesma-Amaro, R., & Tomas-Pejo, E. (2022). Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology. *FEMS Yeast Research*, 22(1).
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foab071>
- Goffeau A, & Barrel B. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(25 Oct), 546–567.
- Goodell, B., Qian, Y., & Jellison, J. (2008). Fungal decay of wood: Soft rot-brown rot-white rot. *ACS Symposium Series*, 982, 9–31. <https://doi.org/10.1021/bk-2008-0982.ch002>
- Hall, B. K. (2007). Homoplasy and homology: Dichotomy or continuum? *Journal of Human Evolution*, 52(5), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2006.11.010>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. In *Nature Reviews Microbiology* (Köt. 2, Issue 2, o. 95–108). <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hamed, S. A. M. (2013). In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 78, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.013>
- Hanlin, R. T. (1994). Microcycle conidiation—A review. *Mycoscience*, 35(1), 113–123.
<https://doi.org/10.1007/BF02268539>
- Hohmann S. Nobel Yeast Research. *FEMS Yeast Res.* 2016 Dec;16(8):fow094. doi: 10.1093/femsyr/fow094. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27770011.
- Houbraken, J., & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70, 1–51.
<https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>
- Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2018). *Endophytic Yeasts: Biology, Ecology and Applications* (o. 3–14). https://doi.org/10.1007/978-3-319-89833-9_1
- Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. In *Biotechnology Advances* (Köt. 31, Issue 2, o. 224–245). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>
- Kwon-Chung, K. J., & Sugui, J. A. (2009). Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: why so fastidious? *Trends in Microbiology*, 17(11), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.004>

- Lang, G. I., Murray, A. W., & Botstein, D. (2009). The cost of gene expression underlies a fitness trade-off in yeast. In *PNAS April* (Köt. 7, Issue 14).
www.pnas.org/cgi/content/full/0901620106/DCSupplemental.[www.pnas.orgcgdoi10.1073pnas.0901620106](https://doi.org/10.1073/pnas.0901620106)
- Lorek, J., Pöggeler, S., Weide, M. R., Breves, R., & Bockmühl, D. P. (2008). Influence of farnesol on the morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Journal of Basic Microbiology*, 48(2), 99–103. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700292>
- Mukaremera, L., Lee, K. K., Mora-Montes, H. M., & Gow, N. A. R. (2017). *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. *Frontiers in Immunology*, 8(JUN).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00629>
- Nagy, L. G., Ohm, R. A., Kovács, G. M., Floudas, D., Riley, R., Gácsér, A., Sipiczki, M., Davis, J. M., Doty, S. L., de Hoog, G. S., Lang, B. F., Spatafora, J. W., Martin, F. M., Grigoriev, I. v., & Hibbett, D. S. (2014). Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *Nature Communications*, 5.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5471>
- Nickerson, K. W., Atkin, A. L., & Hornby, J. M. (2006). Quorum sensing in dimorphic fungi: Farnesol and beyond. In *Applied and Environmental Microbiology* (Köt. 72, Issue 6, o. 3805–3813). <https://doi.org/10.1128/AEM.02765-05>
- Novodvorska, M., Stratford, M., Blythe, M. J., Wilson, R., Beniston, R. G., & Archer, D. B. (2016). Metabolic activity in dormant conidia of *Aspergillus niger* and developmental changes during conidial outgrowth. *Fungal Genetics and Biology*, 94, 23–31.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.07.002>
- O'Malley, M. A., Wideman, J. G., & Ruiz-Trillo, I. (2016). Losing Complexity: The Role of Simplification in Macroevolution. In *Trends in Ecology and Evolution* (Köt. 31, Issue 8, o. 608–621). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.04.004>
- Padder, S. A., Prasad, R., & Shah, A. H. (2018). Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. In *Microbiological Research* (Köt. 210, o. 51–58). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.007>
- Poole, R. K. (2001). *Advances in microbial physiology*. Vol. 45. Academic Press.
- Quijano, C. D., Wichmann, F., Schlaich, T., Fammartino, A., Huckauf, J., Schmidt, K., Unger, C., Broer, I., & Sautter, C. (2016). KP4 to control *Ustilago tritici* in wheat: Enhanced greenhouse resistance to loose smut and changes in transcript abundance of pathogen related genes in infected KP4 plants. *Biotechnology Reports*, 11, 90–98.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.08.002>

- Sasek, V., & Becker, G. E. (1969). Effect of Different Nitrogen Sources on the Cellular Form of *Trigonopsis variabilis*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
<https://journals.asm.org/journal/jb>
- Scazzocchio, C. (2019). *Aspergillus*: A multifaceted genus. In *Encyclopedia of Microbiology* (o. 262–292). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20803-0>
- Schmiedel, Y., & Zimmerli, S. (2016). Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. In *Swiss medical weekly* (Köt. 146, o. w14281). <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14281>
- Sewall, T. C., Mims, C. W., & Timberlake, W. E. (1990). *abaA* Controls Phialide Differentiation in *Aspergillus nidulans*. In *Source: The Plant Cell* (Köt. 2, Issue 8).
http://www.jstor.orgURL:http://www.jstor.org/stable/3869172http://www.jstor.org/stable/3869172?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents
- Shen, Q., & Rappleye, C. A. (2020). Living Within the Macrophage: Dimorphic Fungal Pathogen Intracellular Metabolism. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Köt. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.592259>
- Shen, X. X., Opulente, D. A., Kominek, J., Zhou, X., Steenwyk, J. L., Buh, K. v., Haase, M. A. B., Wisecaver, J. H., Wang, M., Doering, D. T., Boudouris, J. T., Schneider, R. M., Langdon, Q. K., Ohkuma, M., Endoh, R., Takashima, M., Manabe, R. ichiroh, Čadež, N., Libkind, D., ... Rokas, A. (2018). Tempo and Mode of Genome Evolution in the Budding Yeast Subphylum. *Cell*, 175(6), 1533-1545.e20.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.023>
- Shubin, N., Tabin, C., & Carroll, S. (2009). Deep homology and the origins of evolutionary novelty. In *Nature* (Köt. 457, Issue 7231, o. 818–823).
<https://doi.org/10.1038/nature07891>
- Sliwa, P., & Korona, R. (2005). *Loss of dispensable genes is not adaptive in yeast*.
www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0505517102
- Stephen, J., Guus Bakkeren, H., Klosterman, S. J., Garcia-Pedrajas, M., & Gold, S. E. (2005). *Genetics of Morphogenesis in Basidiomycetes*.
- Tao, L., Du, H., Guan, G., Dai, Y., Nobile, C. J., Liang, W., Cao, C., Zhang, Q., Zhong, J., & Huang, G. (2014). Discovery of a „White-Gray-Opaque” Tristable Phenotypic Switching System in *Candida albicans*: Roles of Non-genetic Diversity in Host Adaptation. *PLoS Biology*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001830>
- Tiedt, L. R. (1993). An electron microscope study of conidiogenesis and wall formation of conidia of *Aspergillus niger*. *Mycological Research*, 97(12), 1459–1462.
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80217-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80217-7)

- van Werven, F. J., & Amon, A. (2011). Regulation of entry into gametogenesis. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Köt. 366, Issue 1584, o. 3521–3531). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0081>
- Wang, F., Sethiya, P., Hu, X., Guo, S., Chen, Y., Li, A., Tan, K., & Wong, K. H. (2021). Transcription in fungal conidia before dormancy produces phenotypically variable conidia that maximize survival in different environments. *Nature Microbiology*, 6(8), 1066–1081. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00922-y>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Köt. 21, o. 319–346). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Wolf, Y. I., & Koonin, E. v. (2013). Genome reduction as the dominant mode of evolution. *BioEssays*, 35(9), 829–837. <https://doi.org/10.1002/bies.201300037>
- Yu, J.-H. (2010). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, 38(4), 229. <https://doi.org/10.4489/myco.2010.38.4.229>
- Zieniuk, B., & Fabiszewska, A. (2019). *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Köt. 35, Issue 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2583-8>