

Bevezetés

A saját-idegen felismerés az élő szervezetek általános tulajdonsága. Magasabb rendű eukarióták esetében kiemelkedő szerepe van a szövetek, szervek identitásának fenntartásában, valamint a kórokozók elleni védekezésben. A fonalas gombák anasztomózisok által alakítják ki a hifák bonyolult hálózatát, a micéliumot. Abban az esetben, ha az anasztomózis nem az adott egyeden belül, hanem egy gombafaj különböző törzsei között alakul ki, eltérő eredetű sejtmagok kerülhetnek közös citoplazmába, azaz heterokariótikus állapot jön létre.

A heterokariózis számos előnnyel jár, lehetővé teszi a funkcionális diploid állapotot, megteremti a paraszexuális folyamat és ezzel együtt a mitotikus rekombináció feltételeit. Továbbá az így megnövekedett biomassza lehetőséget nyújt a külső környezet tápanyagainak hatékonyabb felhasználására, illetve az ivaros szaporodásra. Számos haszna ellenére a heterokariótikus állapot sokkal ritkábban fordul elő a természetes populációkban, mint azt gondolnánk. Létezik ugyanis egy genetikai rendszer, ami csak meghatározott esetekben teszi lehetővé a stabil heterokarióta állapot fennmaradását eltérő genetikai állományú egyedek között. Ez a heterokariótikus vagy másnéven vegetatív inkompatibilitás.

A vegetatív inkompatibilitás során a közreműködő telepek fonalai egymás felé nőnek, az érintkező hifasejtek összeolvadnak, és így az eltérő eredetű sejtmagok közös citoplazmába kerülnek. A fúziós sejtkben döntés születik arról, hogy a kialakult heterokariótikus állapot stabilizálódik-e (kompatibilis kapcsolat), vagy a sejt elpusztul (inkompatibilis kapcsolat). Genetikai analízissel a vegetatív inkompatibilitás jelenségét több, egymástól független lókuszbba térképezték. E lókuszkokat *het* vagy *vic* lókuszkoknak nevezzük. Az így nyert információk alapján felállítottak egy hipotézist, mely szerint két egyed abban az esetben kompatibilis vegetatíven, ha megegyező alléleket hordoznak a vegetatív inkompatibilitási lókuszaikban.

Vic lókuszkok molekuláris szintű azonosítása kevés gombafaj esetében valósult meg, többnyire csak genetikai információink vannak. Molekuláris biológiai adatok főleg a *Neurospora crassa* és a *Podospora anserina* esetében lelhetők fel a vonatkozó szakirodalomban. A klónozott gének különböző, már ismert funkciókkal bírnak (pl. párosodási típus gén, glicinben gazdag sejtfali protein, glikolipid transzfer protein, stb.). A kutatási terület egyik kiemelkedően fontos kérdése, hogy vajon a vegetatív inkompatibilitást meghatározó molekuláris rendszer mennyire általános. Amennyiben a folyamatért felelős gének konzerváltak, akkor a modellszervezetek vizsgálatai során elért eredmények egyszerűen vonatkoztathatóak más, gazdasági szempontból is jelentős fonalas gombákra is.

A legtöbbet vizsgált fonalas gomba eredetű *vic* gén a *N. crassa het-C* génje. E gén egy 966 aminosav hosszúságú glicinben gazdag transzmembrán fehérjét kódol, amely valószínűleg jelátviteli folyamatban játszik szerepet. A *het-C* lókuszbán három allél valamelyike található (*het-C^{OR}*, *het-C^{PA}*, *het-C^{GR}*); ha két különböző *het-C* allél kerül heterokarióta állapotba, akkor a vegetatív inkompatibilitási reakció apoptózis által elpusztítja a heterokarióta sejteket. A három *het-C* gén főleg egy ún. hipervariábilis szakaszon különbözik egymástól, a legrövidebb *het-C^{GR}* génhez képest a *het-C^{OR}* 15 bp a *het-C^{PA}* 30 bázispár inszerciót hordoz, bizonyítottan ez a különbség a felelős a vegetatív inkompatibilitási reakció beindításáért. Ezen allélikus különbségek jól azonosíthatók voltak a vizsgálatokba bevont közeli rokon *Sordaria* fajok esetében is.

A *Podospora anserina het-C* homológ (*hch*) génjének azonosítása során nem sikerült különböző allélokot kimutatni a vizsgált, vegetatív inkompatibilis törzsek között. Ez arra utal, hogy e faj inkompatibilitási rendszerében a *het-C* gén nem játszik szerepet..

A *Liseola* szekcióba tartozó anamorf *Fusarium proliferatum* (teleomorf alakja a *Gibberella intermedia*) világszerte elterjedt növénykórokozó gomba, amely képes továbbá emberre-állatra veszélye mikotoxinok (fumonizinek, fusarinsav, fuzarin-C és moniliformin) előállítására is. A *Fusarium* nemzetségben a heterokariózis jelenségét legbehatóbban a *Fusarium moniliforme* (teleomorf: *Gibberella fujikuroi*) rendszerét vizsgálták. Megállapították, hogy legalább 10 *het* lókuszból szabályozza az izolátumok vegetatív kompatibilitását. Nem ismert, hogy e genetikai vizsgálatok során talált *vic* lókuszból valamelyike *het-C* homológot hordoz-e, továbbá arról sincs semmilyen adatunk, hogy létezik-e egyáltalán *het-C* homológ a fuzáriumok genomjában.

Mindezek figyelembe vételével célul tűztük ki a *N. crassa het-C* gén homológjának azonosítását *F. proliferatum* gombából. További célkitűzésünk arra irányult, hogy megállapítsuk e gén feltételezett szerepét a faj vegetatív inkompatibilitási rendszerében.

Az eredeti pályázatban és szerződésben megtalálható célkitűzések és munkaterv nem azonos a megvalósítottal. A 2003. évi részjelentésemben tájékoztattam az OTKA Bizottságot arról, hogy az eredeti elképzelésem szerinti kísérletes munka alapját olyan molekuláris (AFLP) markerek jelentették volna, amelyet az amerikai partnerünk ígért. Mivel nem sikerült előállítaniuk ezeket a markereket, csoportvezetőmmel a fentiekben leírt megközelítést dolgoztuk ki a jelenség vizsgálatára. A 2003. évi részjelentésemet, és benne a tématerv módosítását az OTKA Bizottság elfogadta.

Eredmények

Az *fphch* gén izolálása

Munkánk kezdetekor egyetlen *Fusarium* faj genomjáról sem volt még elérhető genomi adatbázis, így céljaink elérése érdekében a *Fusarium sporotrichioides* EST cDNS szekvenciákat tartalmazó adatbankban (<http://www.genome.ou.edu/fsporo.html>) folytattuk le a kereséseket. A kereséshez a *N. crassa* HET-C^{OR} fehérje aminosav-sorrendjét használtuk. A legmagasabb homológiát (72% azonosság, 84% hasonlóság aminosav szinten) a j2f04fs.f1 jelű EST mutatta. Ezt a cDNS szekvenciát letöltöttük, és összehasonlítottuk a *N. crassa* *het-C^{OR}* génjével. A *N. crassa* *het-C^{OR}* génje az 1836-2223 bp-ig terjedő szakaszon mutatott homológiát a *F. sporotrichioides* EST 2-325 bp szakaszával. Az 1. ábrán az aminosav szintű összehasonlítás eredményét láthatjuk.

A j2f04fs.f1 jelű cDNS *N. crassa* *het-C^{OR}* génjével homológ szakaszának végeire degenerált oligonukleotid primereket terveztünk, és polimeráz láncreakció segítségével felszorzoztuk a célszekvenciát a *F. proliferatum* ITEM 2287 törzsének genomjából. A primerek elhelyezkedését az 1. ábrán nyilakkal jelöltük. A polimeráz láncreakciót mind *F. sporotrichioides*, mind *F. proliferatum* genomi DNS-en elvégeztük, az eredményt a 2. ábrán szemléltetjük.

A felszorzozott DNS szakasz kb. 340 bázispár hosszúságú volt, ami megegyezett az EST szekvenciája alapján számítottal. A *F. proliferatum* genomi DNS-ből amplifikált DNS fragmentumot izoláltuk, majd plazmid vektorba klónoztuk, és meghatároztuk nukleotid-sorrendjét. Az így kapott szekvenciát összehasonlítottuk a rendelkezésre álló fonalas gomba eredetű *het-c* homológ szekvenciákkal, és azt az eredményt kaptuk, hogy az általunk izolált DNS szakasz: (1) 85%-ban megegyezik a *F. sporotrichioides* j2f04fs.f1 jelű cDNS-ének megfelelő hosszúságú szekvenciájával; (2) 68,8%-ban azonos a *P. anserina* *hch* gén megfelelő fragmentumával; (3) és 63%-ban azonos a *N. crassa* *het-C* génjének megfelelő szakaszával. Tehát az általunk klónozott DNS fragmentum nagy valószínűséggel a *F. proliferatum* *het-C* génjének egy szakasza.

A *F. proliferatum* teljes hosszúságú *het-C* génjét (*fphch*) lambda-fág genomi génkönyvtárból azonosítottuk. Radioaktív próbaként a már ismertetett 340 bázispár hosszúságú, *het-C* homológ DNS szakaszt használtuk. Sikerült a *het-C* homológ szakaszt egy kb. 5000 bp hosszúságú *Xba*I fragmentre lokalizálni. E fragmentumot plazmid vektorba klónoztuk, és szekvenálással meghatároztuk nukleotid sorrendjét.

Az *fphch* szekvencia elemzése

Az általunk izolált *F. proliferatum fphch* génje 2536 bázispár hosszúságú. Lokalizálni tudtuk a transzkripció iniciációjának helyét, a transláció START és STOP kodonjait, valamint a poliadenilációs szignált is (3. ábra). A gén öt exonból áll, a kódolt fehérje 770 aminosav hosszúságú. A *F. proliferatum* FPHCH polipeptidje 63%-ban megegyezik és 73%-ban hasonlít a *N. crassa* HET-C^{GR} fehérjéhez, míg a *P. anserina* HET-C homológ (HCH) fehérjével még nagyobb homológiát, 69% azonosságot és 80% hasonlóságot mutat.

A továbbiakban Southern hibridizációval megállapítottuk, hogy az *fphch* gén egy kópiában fordul elő a *F. proliferatum* genomjában. A genomi DNS-t *EcoRI*, *SalI*, *XbaI* és *KpnI* restrikciós endonukleázokkal emésztettük. A várt fragmentumok a következők voltak: *EcoRI*: két fragment, az egyik kb. 4000 bp a másik hossza nem ismert; *SalI*: 815 és 1213 bp hosszúságú fragmentek; *XbaI*: kb. 5000 bp hosszúságú fragment; *KpnI*: 3324 bp hosszúságú fragment. Az eredmény megfelelt a várakozásnak, tehát az *fphch* gén egy kópiában fordul elő *F. proliferatum*-ban (4. ábra).

Az *fphch* gén expressziója

Megvizsgáltuk az *fphch* gén átíródását a gomba növekedésének különböző stádiumaiban. A Northern blotthoz RNS-t izoláltunk 5, 10, 24, 48, 72 és 96 órás korú micéliumból és konídiumból (0 órás minta). Radioaktív próbaként az *fphch* gén egy 900 bp hosszúságú, polimeráz láncreakcióval felsokszorozott darabját használtuk. A kapott eredményből megállapítható, hogy az *fphch* gén konstitutívan expresszálódik a *F. proliferatum*-ban (5. ábra). A kontroll hibridizálást úgy hajtottuk végre, hogy a membránról lemostuk az *fphch* gén darabját tartalmazó radioaktív próbát és a *F. proliferatum* aktin génjére tervezett oligonukleotid primerekkel felszaporított DNS fragmentumot hibridizáltattuk az RNS-hez.

Az *fphch* gén HVD homológ szakaszának azonosítása és elemzése

A *N. crassa het-C* alléljein azonosítottak egy ún. hipervariábilis domént (HVD) (6. ábra), és bizonyították, hogy e domén aminosav-sorrendjében lévő eltérés felelős a *het-C* allélok által kiváltott vegetatív inkompatibilitási reakció beindulásáért (lásd bevezetés).

Feltételeztük, hogy ha a *F. proliferatum fphch* génje hordoz olyan régiót, amely megegyezik a *N. crassa* hipervariábilis doménjével, továbbá a *F. proliferatum* esetében is kimutatható e szakasz jelentős mértékű polimorfizmusa a faj egyedei között, akkor nagyon

valószínű, hogy a *het-C* homológ gén a *F. proliferatum* esetében is része a gomba vegetatív inkompatibilitási rendszerének.

A *F. proliferatum fphch* génjén azonosítottuk azt a szakaszt, ami hasonlít a *N. crassa het-C* génjének hipervariábilis doménjéhez. Ez a szakasz az *fphch* gén 703-1198 bázispárok közötti szakaszára esik. A HVD homológ rész határoló szekvenciáira oligonukleotid primereket terveztünk (FphetcHVD/for és FphetcHVD/rev) és polimeráz láncreakciót végeztünk el 82 *F. proliferatum*, továbbá két-két *Fusarium moniliforme* (MP-A), *Fusarium subglutinans* (MP-B), *Fusarium fujikuroi* (MP-C), *F. subglutinans* (MP-E), *Fusarium thapsinum* (MP-F) és *Fusarium nygami* (MP-G) genomi DNS mintáján. E törzsek a *G. fujikuroi* gyűjtőfaj egy-egy párosodási populációját reprezentálták. A polimeráz láncreakció minden esetben működött, és így az összes vizsgált mintából fel tudtuk szaporítani a várt kb. 500 bp hosszúságú DNS fragmentumot. A DNS darabok jelentős méretbeli különbséget nem mutattak, ezért a szekvenciák bázis-sorrendjének különbségeit restriktív fragment-hossz polimorfizmus (RFLP) vizsgálatokkal próbáltuk felderíteni. Az RFLP vizsgálat során a HVD homológot kódoló DNS-szakaszt az előbb említett módon polimeráz láncreakcióval felszaporítottuk, majd a kapott terméket olyan restriktív endonukleázokkal hasítottuk, amelyek négy-hat bázispárnyi szakaszt ismernek fel és hasítanak el. Az *fphch* gén nukleotidsorrendjének elemzése nyomán a *HpaII*, *NcoI*, *SalI* és *TaqI* restriktív endonukleázokat választottuk ki az RFLP-hez. A vizsgálat során mindössze két *F. proliferatum*, két *F. subglutinans* (MP-B) és két *F. subglutinans* (MP-E) esetében tudunk eltérő mintázatot kimutatni. Ilyen eltérő mintázat figyelhető meg a 7. ábrán. A polimorfizmust mutató PCR termékeket plazmid vektorba klónoztuk, és meghatároztuk nukleotid-sorrendjüket. Elvégeztük a kapott DNS szekvenciák elemzését. Az analízis eredményeként megállapítottuk, hogy bár néhány helyen található olyan nukleotid szubsztitúciók, melyek aminosav cserét okoznak a HCH fehérjében, de sem inszerciók, sem deléciók (amit a *N. crassa* esetében megfigyelhető inszerciók-deléciók jelensége miatt vártunk) nem mutathatók ki a vizsgált mintákban. Tehát számos *G. fujikuroi* izolátumot megvizsgálva az *fphch* gén nem mutatott polimorfizmust, így feltételezhetjük, hogy ez a gén nem játszik szerepet a gomba vegetatív inkompatibilitásában..

F. proliferatum protoplasztok transzformálása mesterséges *fphch* alléllal

Az előbbi feltevésünket más módon is próbáltuk bizonyítani. Inszerciók PCR mutagenézissel előállítottunk egy mesterséges *fphch* allélt úgy, hogy az *fphch* gén feltételezett hipervariábilis doménjébe hat aminosavnyi (18 bp) hosszúságú fragmentumot építettünk be.

Ezután *F. proliferatum* protoplasztokat transzformáltunk mind a vad típusú, mind a mesterséges alléllal. Ha a mesterséges allél inkompatibilitási reakciót okoz, akkor annak jelentkeznie kell az életképes protoplasztok számában. Többször is elvégeztük a transzformálást, azonban nem tapasztaltunk csökkenést az életképes protoplasztok számában. Tehát a mesterséges allél sem képes beindítani a vegetatív inkompatibilitási reakciót e gombában.

Az *fphch* gén kiütése

A már ismertett eredményeink arra utaltak, hogy az *fphch* gén nem játszik szerepet a faj vegetatív inkompatibilitásban, transzkripcionálisan aktív formája mégis megtalálható a genomban. A gén funkciójának megismeréséhez *fphch* mínusz mutánsokat állítottunk elő a *Fusarium* fajok esetében bizonyítottan működő helyspecifikus rekombináció segítségével. Génkiütésre alkalmas plazmidkonstrukciót készítettünk (higromycin-foszfotranszferáz gént tartalmazó kazettával helyettesítettük az *fphch* gén egy szakaszát), és *F. proliferatum* protoplasztokat transzformáltunk vele. A kapott primer transzformánsok (54 db) közül PCR segítségével szűrtük ki azokat, amelyekben kettős homológ rekombináció történt. Kiválasztottunk hét transzformánst, és Southern hibridizációval ellenőriztük, hogy valóban kettős rekombináció történt-e (8. és 9. ábra). Radioaktív próbaként a teljes *fphch* gént tartalmazó, 4400 bp hosszúságú (*fphch* próba), illetve a teljes *hph* kazettát tartalmazó, 3800 bp hosszúságú (*hph* próba) PCR fragmentumokat használtuk. A genomi DNS emésztéséhez *KpnI* és *PstI* enzimeket használtunk. A *KpnI* enzimmel emésztett és *fphch* próbával hibridizált vad típusú törzsnek egy ismeretlen hosszúságú és egy 3344 bp hosszúságú fragmentumot kellett adnia, a transzformánsoknak pedig egy ismeretlen hosszúságú és egy 4826 bp hosszúságú fragmentumot. Ugyanezt a próbát alkalmazva és *PstI* enzimmel emésztve a genomi DNS-t a vad típusú törzs esetén két ismeretlen hosszúságú és egy 2975 bp hosszúságú fragmentumot vártunk, a transzformánsok esetében pedig, szintén két ismeretlen hosszúságú és egy 2518 bp hosszúságú fragmentumot. A *hph* próbát alkalmazva egyik esetben sem kellett pozitív eredményt kapnunk a vad típusú törzssel. A transzformánsoknak *KpnI* enzimes emésztés után egy 4826 bp hosszúságú fragmentumot, *PstI* enzimes emésztés után pedig, egy ismeretlen hosszúságú és egy 2518 bp hosszúságú fragmentumot kellett adniuk. A hibridizálás eredménye a 8. és 9. ábrán látható. Az ábrákon megfigyelhető, hogy a kapott fragmentumok mérete megegyezik a várt értékekkel. Kivétel ez alól a 8. számú minta, ahol nem a vártak megfelelően történt a beépülés, ezért ezzel a mintával a továbbiakban nem foglalkoztunk.

A $\Delta fphch$ transzformánsok jellemzése

A $\Delta fphch$ transzformánsokat megvizsgálva a növekedésben, a sporulációban és a konídiumok csírázásában nem találtunk eltérést a vad típusú törzstől, sem komplett, sem minimál táptalajon. Ez arra enged következtetni, hogy az *fphch* gén nem szükséges a gomba normális növekedéséhez laboratóriumi körülmények között.

A párosodási tulajdonságokat vizsgálva azonban találtunk különbségeket. A peritéciumok időben jóval később jelentek meg ha a transzformánsokat női partnerként alkalmaztuk a párosítási kísérletben. A vad típusú törzset a megfelelő teszter törzssel keresztezve már a tizedik napon megjelentek az első peritéciumok, míg a transzformánsok esetében csak a 21-28. napon. A peritéciumok számában is jelentős különbségeket tapasztaltunk, a vad típusú törzs esetében a peritéciumok száma elérte a 400-500 darabot, míg a transzformánsok esetében ez a szám csak 6-60 darab volt kb. 74 cm²-es területen. A peritéciumok érése itt nagyjából azonos időben következett be, a megjelenéstől számított 12-15. napon, és az érett peritéciumokban minden esetben megtaláltuk az aszkuszkokat és az aszkospórákat. Ez alapján az *fphch* gén által kódolt fehérje szerepet játszhat a *F. proliferatum* párosodási folyamataiban. E feltevés bizonyítása további kísérletes munkát igényel.

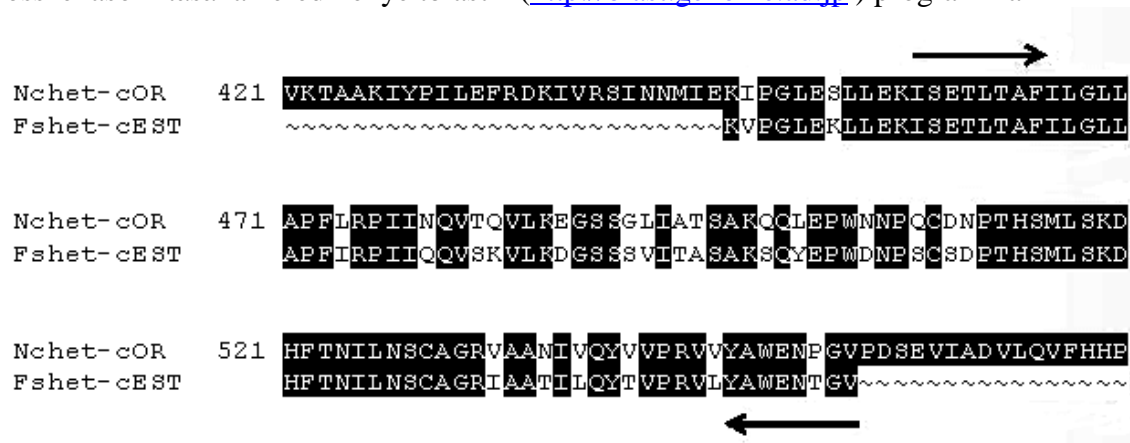
Természetesen megvizsgáltuk azt is, hogy vegetatív kompatibilitási kísérletekben hogyan viselkednek a transzformánsok. A transzformánsokból klorátrezisztens (*nit1*, *nit3*, *nitM*) mutánsokat állítottunk elő. E *nit* mutánsok azonban nem voltak képesek arra, hogy komplementálják egymást. Ez az eredmény szintén megerősíti azt a feltevésünket, hogy az *fphch* gén nem vesz részt a gomba vegetatív inkompatibilitási rendszerében.

Munkánk során a következő eredményeket értük el:

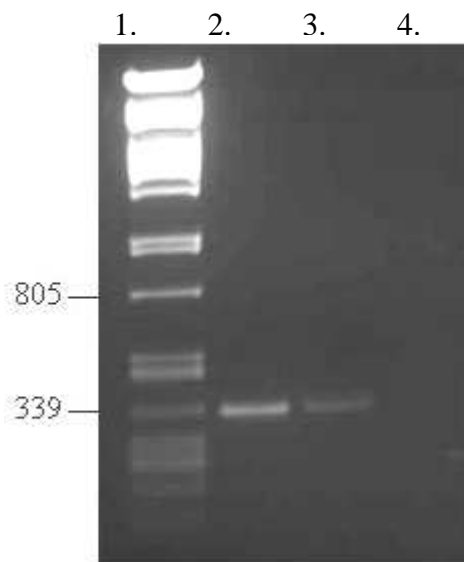
- (1) Azonosítottuk és jellemeztük a *Fusarium proliferatum* *het-C* homológ génjét (*fphch*).
- (2) Megállapítottuk, hogy a gén egy kópiában van jelen a genomban, transzkripciója egyenletes, a növekedés során nem változik.
- (3) Az *fphch* génen azonosítottuk azt a szakaszt, amely megfelel a *N. crassa* *het-C* gén hipervariábilis doménjének. Több mint 80 *F. proliferatum* izolátumot, továbbá a *G. fujikuroi* párosodási típus teszter törzseit analizálva megállapítottuk, hogy az *fphch* gén egyik esetben sem hordoz jelentős mértékű polimorfizmust, tehát valószínűleg nem vesz részt a faj vegetatív inkompatibilitási rendszerében. Erre utal a mesterséges allélekkel végzett transzformációs kísérletek eredménye is.

(4) Az *fphch* gén kiütésével próbáltunk meg következtetni a gén funkciójára. A vizsgált fenotípusok (morfológia, növekedési erély, konídium képzés) vizsgálata során nem találtunk különbséget a vad típusú és a $\Delta fphch$ transzformánsok között, tehát a gén nem befolyásolja lényegesen a gomba életét laboratóriumi körülmények között. Nem találtunk különbséget továbbá a vegetatív kompatibilitási tesztek során sem. Egyedül a párosodást vizsgáló kísérletek hoztak eredményt: $\Delta fphch$ transzformánsok sokkal kevésbé voltak képesek párosodni, mint a vad típusú egyedek.

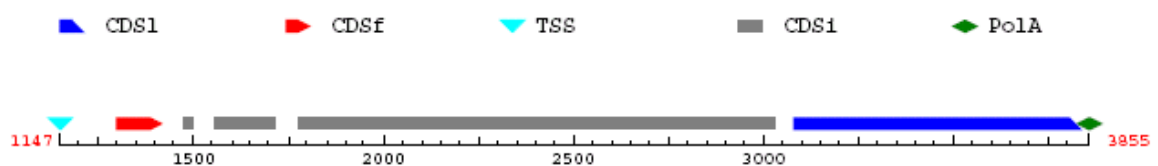
1. ábra: *N. crassa* *het-C*^{OR} és *F. sporotrichioides* EST j2f04fs.f1 aminosav-szintű összehasonlításának eredménye tblastX (<http://blast.genome.ad.jp>) programmal



2. ábra: *het-C* specifikus polimeráz lánreakció *Fusarium sporotrichioides* (2.) és *Fusarium proliferatum* (3.) genomi DNS templátokon. (1.): méret marker, (4): negatív kontroll.

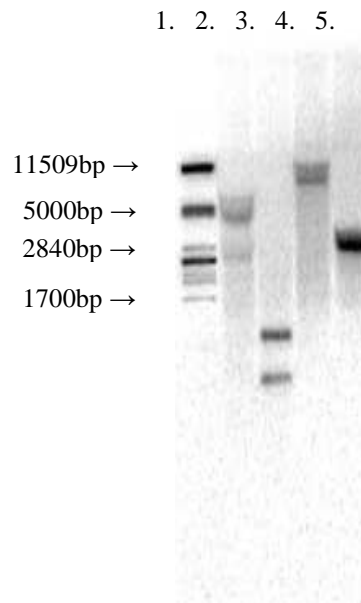


3. ábra: Az *fphch* gén szerkezete az FGENESH program (<http://www.softberry.com>) szerint. Az összehasonlítás a *Fusarium graminearum* hasonló fehérjéje alapján történt. TSS: transzkripciósi iniciációs hely; CDS: exonok; PolA: poliadenilációs szignál.

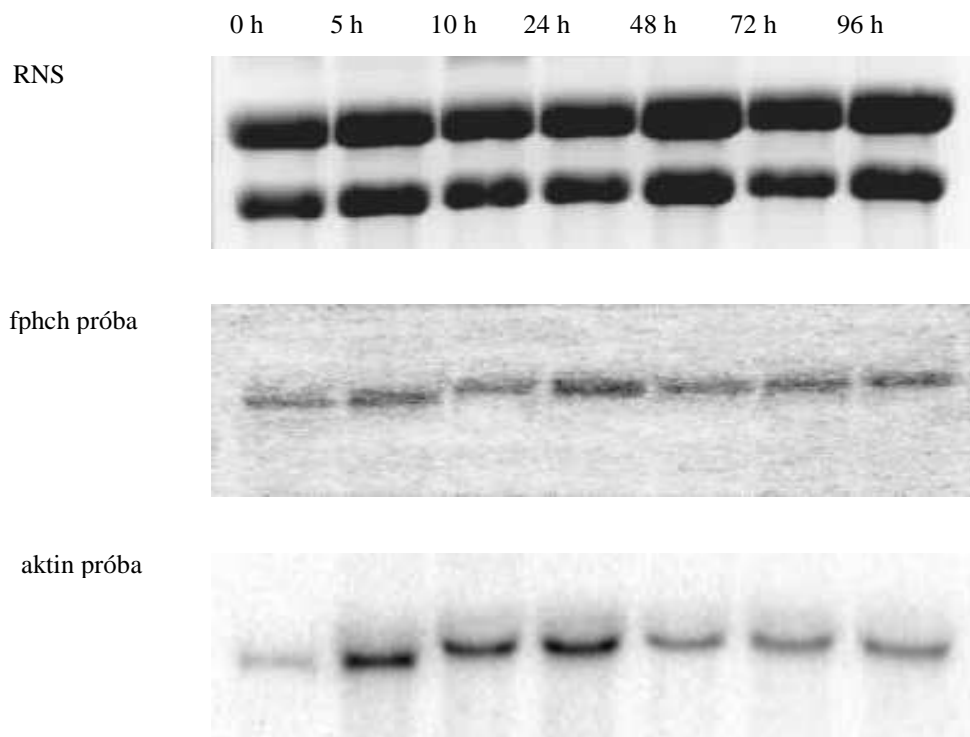


4. ábra: Genomi Southern hibridizáció

(1.): λ PstI marker; (2.): *EcoRI* emésztés; (3.): *SalI* emésztés; (4.): *XbaI* emésztés; (5.): *KpnI* emésztés



5. ábra: Az *fphch* gén expressziója

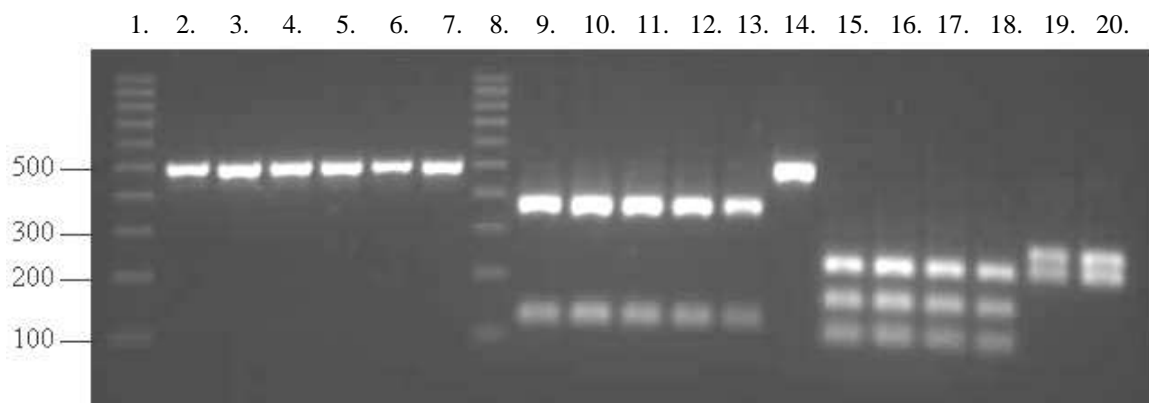


6. ábra: *Neurospora crassa* het-C génjének különböző alléljai által kódolt fehérjék aminosav-sorrendjének és a *Fusarium proliferatum* HET-C fehérje aminosav-sorrendjének összehasonlítása. A *F. proliferatum* HET-C protein leginkább a *N. crassa* HET-C^{GR} polipeptidjére hasonlít.

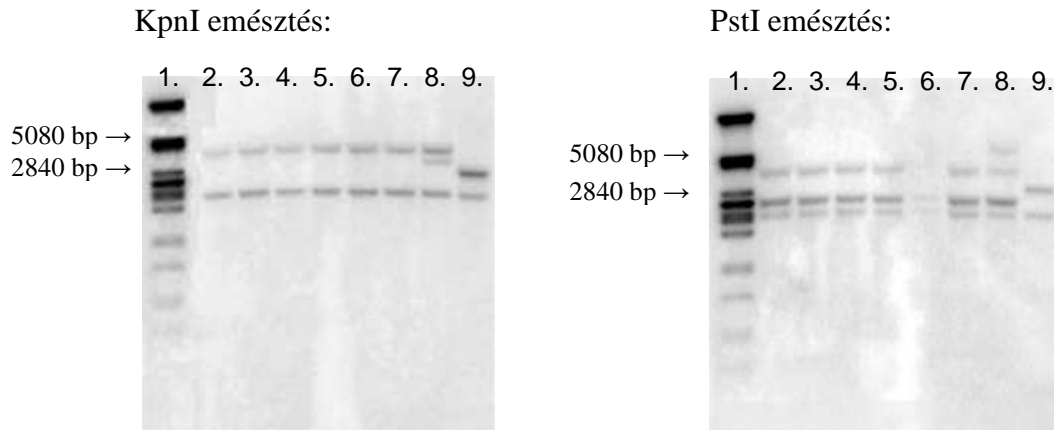
| | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|-----------------|-------------|----------------|----------------|----------|---------------|---------------|-------|---------|------------|
| NcHET-C_PA | 103 | ... | VWVLSFLAHGYATEE | FEVTE | ERLGVYRPEEHIDN | PLGYADGKDARE | YDPRLR | → | | | | |
| NcHET-C_OR | 111 | RAL | VWVLSFLAHGYATEE | FEVTE | ERLGVYRPEEHIDN | PLGYADGKDARE | FDPRLR | | | | | |
| NcHET-C_GR | 103 | ... | VWVLSFLAHGYATEE | FEVTE | ERLGVYRPEEHIDN | PLGYADGKDARE | YDPRLR | | | | | |
| FpHET-C | 103 | ... | VWVLSFMAHGYATGE | FEVTS | DRLGVYRPEEHIDN | PLGYEDGVDARTED | KRLR | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| NcHET-C_PA | 155 | | GPVHPAE | LEIDPNTGMK | NYIANEE | LAHQG | WNTTS | AGYIRFSLQRCIH | YGRLYTS | | | |
| NcHET-C_OR | 166 | | GPVHP | LEIDLYSGM | KNYIANER | LAHQG | WNTTS | AGYIRFSLQRCIH | YGRLYTS | | | |
| NcHET-C_GR | 155 | | GPVHPAE | LEIDPNTGMK | NYIANEE | LAHQG | WNTTS | AGYIRFSLQRCIH | YGRLYTS | | | |
| FpHET-C | 155 | | GPVEKIE | TEIDSR | TGMK | NYIANE | ...NGW | ATSAYLRYS | FARSIHYGRLYTS | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| NcHET-C_PA | 210 | | GSHGRGKESD | LCEALRCLG | QALHTLED | FPAHSNY | CELV | LIDMEER | .GGHSPVFF | | | |
| NcHET-C_OR | 221 | | GSRGRGKESD | LCEALRCLG | QALHTLED | FPAHSNY | CELV | LIDMEER | .GGHSPVFF | | | |
| NcHET-C_GR | 210 | | GSHGRGKESD | LCEALRCLG | QALHTLED | FPAHSNY | CELV | LIDMEER | .GGHSPVFF | | | |
| FpHET-C | 205 | | GSK.KGME | DDLCEALRCLG | QALHTMED | FSAHSNY | CELV | ...REL | GYHS.VFF | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| NcHET-C_PA | 264 | | HVGTATKLR | LEMQRFR | RVRP | EGGYD | SCAKYA | WPLVTGT | FGGVD | FLH | SVLGE | ANDH |
| NcHET-C_OR | 275 | | HVGTDIRITLR | | DTRN | NC | KSV | WPLVTGT | FGGVD | FLH | SVLGE | ANDH |
| NcHET-C_GR | 265 | | HVGTATRITLR | | | GRL | WPLVTGT | FGGVD | FLH | SVLGE | ANDH | |
| FpHET-C | 253 | | HCCGAHDE | TEHLH | | | GKR | VWPLVTGT | FGGVD | FLH | SVLGE | ANDH |
| | | | | | | | | | | | | |
| NcHET-C_PA | 319 | | FTQSEVDE | EMDALLTAE | QLTKG | SGGGSS | RDRGLS | L | FGLNL | G | SSSND | GDFISLVS |
| NcHET-C_OR | 320 | | FTQSEVDE | EMDALLTAE | QLTKG | SGGGSS | RDRGLS | L | FGLNL | G | SSSND | GDFISLVS |
| NcHET-C_GR | 305 | | FTQSEVDE | EMDALLTAE | QLTKG | SGGGSS | RDRGLS | L | FGLNL | G | SSSND | GDFISLVS |
| FpHET-C | 292 | | FTQSEVDE | VDV | ALKNAE | GAS | NRSGGGGG | GER | ..SL | G | FLGIKSS | .PSDFIGLVS |

7. Ábra: PCR RFLP vizsgálat

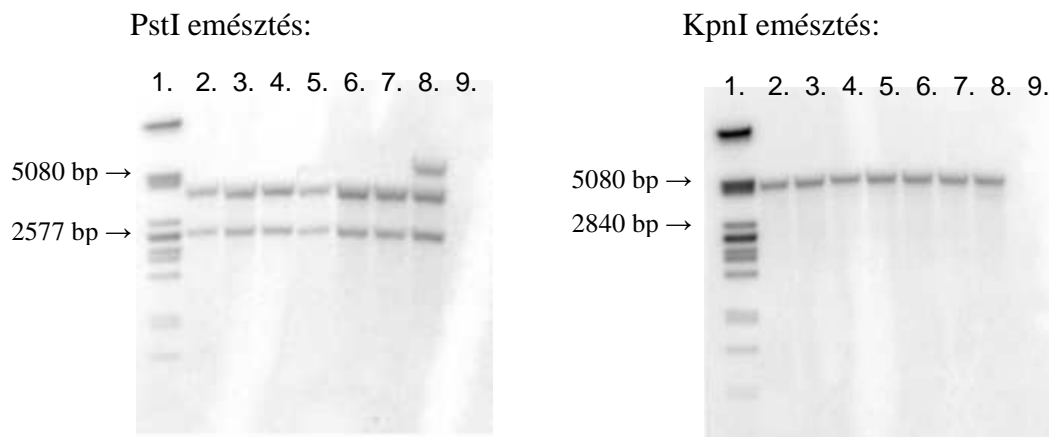
(1.) és (8.): méret marker; (2-7.): PCR termékek, az FphetcHVR/for és FphetcHVR/rev primerekkel felszaporítva; (9-14.): *HpaII* enzimmel kapott RFLP mintázat; (15-20.): *NcoI* enzimmel kapott RFLP mintázat. A minták sorrendje: *F. proliferatum* ITEM 2366, 2823 és *F. subglutinans* FGSC 7610, 7611, 7616, 7617.



8. ábra: A $\Delta fphch$ mutánsok Southern hibridizálása az *fphch* gént tartalmazó radioaktív próbával. (1.): λ PstI marker; (2-8.): $\Delta fphch$ transzformánsok DNS-ei; (9.): vad típusú törzs DNS-e.



9. ábra: A $\Delta fphch$ mutánsok Southern hibridizálása a *hch* kazettát tartalmazó radioaktív próbával. (1.): λ PstI marker; (2-8.): $\Delta fphch$ transzformánsok DNS-ei; (9.): vad típusú törzs DNS-e.



Összefoglalás

Kutatómunkánk során a növénykórokozó, toxintermelő fonalgomba *Fusarium proliferatum* vegetatív inkompatibilitási rendszerének megismerését tűztük ki célul. Munkánk során azonosítottuk és jellemeztük a *F. proliferatum* het-C homológ génjét (*fphch*). Megállapítottuk, hogy a gén egy kópiában van jelen a gomba genomjában, transzkripciója egyenletes, a növekedés során nem változik. Az *fphch* génen azonosítottuk azt a szakaszt, amely megfelel a *Neurospora crassa* het-C gén hipervariábilis doménjének. Nyolcvankét *F. proliferatum* és a *Gibberella fujikuroi* fajkomplex párosodási típus teszter törzseit analizálva megállapítottuk, hogy az *fphch* gén egyik esetben sem mutatott jelentős mértékű polimorfizmust, tehát ellentétben a *N. crassa*-val és hasonlóan a *P. anserina*-hoz valószínűleg nem vesz részt a faj vegetatív inkompatibilitási rendszerében. Erre utal továbbá a mesterséges allélekkel végzett transzformációs kísérletek eredménye is. Az *fphch* gén kiütésével próbáltunk meg következtetni a gén funkciójára. A vizsgált fenotípusok (morfológia, növekedési erély, konídium képzés) megfigyelése során nem találtunk különbséget a vad típusú és a $\Delta fphch$ transzformánsok között, tehát a gén nem befolyásolja lényegesen a gomba életét laboratóriumi körülmények között. Nem találtunk különbséget továbbá a vegetatív kompatibilitási tesztek során sem. Egyedül a párosodást vizsgáló kísérletek hoztak eredményt: $\Delta fphch$ transzformánsok sokkal kevésbé voltak képesek párosodni, mint a vad típusú egyedek.

Summary

Our scientific goal was the better understanding of the vegetative incompatibility system of the plant pathogenic and toxin producing fungus *Fusarium proliferatum* using molecular biological techniques. In the course of our experimental work we identified and characterised the het-C homologue gene from *F. proliferatum* (*fphch*). We established that this is a one copy gene and its transcription is uniform during the life of the fungus. We analyzed 82 *F. proliferatum* strains and the mating type tester strains of the *Gibberella fujikuroi* species complex, but we could not find any significant polymorphism. This result suggests that *fphch* does not have a vegetative incompatibility function like to the *hch* gene of *Podospora anserina* and different from the het-C genes of *Neurospora crassa*. We got further evidence from the transformation experiment using wild type and artificial *fphch* alleles. We tried to get information about the function of the *fphch* gene by gene knock out. All $\Delta fphch$ mutants grew

normally without observable differences in morphology or sporulation. However, when the sexual fertility was investigated, a significant losses of the female fertility of the $\Delta phcH$ mutants was observed.