

# Párosodási típus gének előfordulása fekete *Aspergillus* törzsekben

Szigeti Gyöngyi, Kocsubé Sándor, Varga János

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék, 6726 Szeged, Közép fasor 52.



## Bevezetés:

Az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójába tartozó fajok (fekete *Aspergillus*-ok) nagy jelentőséggel bírnak mind orvosi- mind élelmiszer-mikrobiológiai, valamint biotechnológiai szempontból is. Jelentőségüket főleg az adja, hogy nagy mennyiségben képesek hidrolitikus enzimek (lipázok, amilázok), valamint szerves savak (citromsav, glükonsav) termelésére. Gazdasági hasznuk mellett azonban humán betegségek okozói is lehetnek, valamint egyes fajok gyakran élelmiszereinket szennyezhetik, ami azért nagy jelentőségű, mert különböző mikotoxinokat (ochratoxinokat, fumonizineket) termelhetnek, melyek az állatokra és emberekre egyaránt káros (karcinogén) hatással bírnak. Egyes fajok elkülönítése morfológiai alapon nem lehetséges, kalmodulin gén szekvenciáik alapján azonban minden fekete *Aspergillus* faj elkülöníthető (Samson és mtsai 2007).

Az *Aspergillus* fajok nagy részénél, köztük a fekete *Aspergillus*-oknál csak aszexuális szaporodás ismert, vegetatív szaporító képletek, konídiumok segítségével. A gomba genomban a MAT gének felelősek a párosodás irányításáért. Fonalas gombák esetén két típus lehetséges, a MAT1-1 és MAT1-2. A MAT1-1 gén egy DNS-kötő domént, míg a MAT1-2 gén egy HMG domént kódol. Az *Aspergillus niger* teljes genom szekvenálása után azonosították a MAT 1-1 párosodási típus gént (Pel és mtsai 2007). Egyedül a MAT gének jelenléte még nem elegendő a szexuális szaporodáshoz, de fontos előfeltétele annak (Dyer és Paoletti 2005). Egy lehetséges szexuális ciklus megismerése ezeknél a gombáknál lehetővé tenné, hogy mélyebb betekintést nyerjünk törzsejükhöz és evolúciójukba.

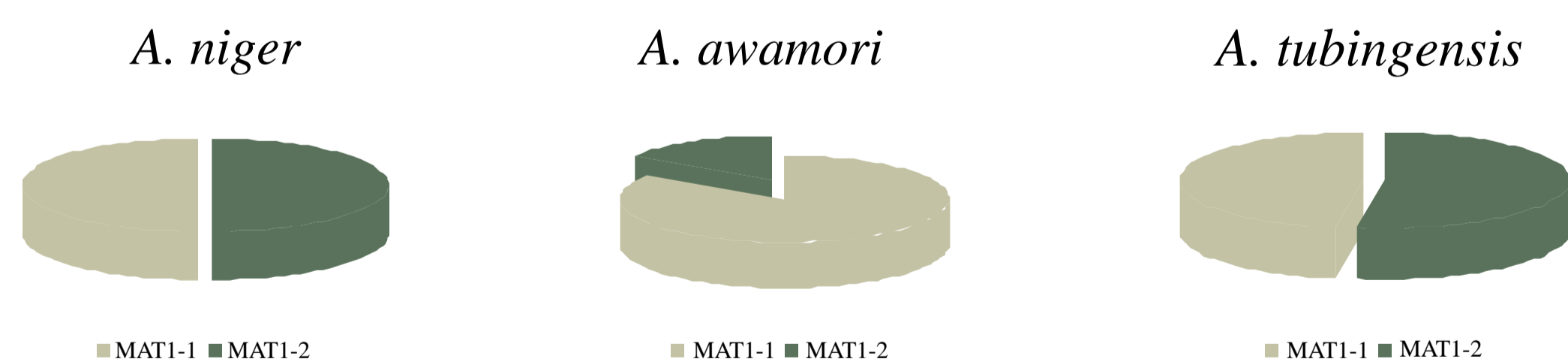
Munkánk során, meghatároztuk különböző mezőgazdasági termékekről és beltéri levegőből izolált fekete *Aspergillus* törzsek fajeloszlását, valamint vizsgáltuk a párosodási típus gének előfordulását és azok eloszlását. A törzsek fajszintű azonosítását részletes kalmodulin szekvenciáik alapján végeztük. Továbbá összehasonlítottuk néhány izolátum párosodási típus géneinek szekvenciáit.



1. ábra: Mazsola, datolya és hagyma minták mikrobiótája

		Hagyma	Datolya	Mazsola	Welwitschia	Beltéri levegő
<i>A. niger</i>	MAT1-1	-	-	8	-	-
	MAT1-2	-	-	7	-	1
<i>A. awamori</i>	MAT1-1	29	-	8	13	10
	MAT1-2	5	-	4	-	2
<i>A. tubingensis</i>	MAT1-1	-	21	-	-	-
	MAT1-2	-	17	-	-	1

1. táblázat: Különböző forrásokból izolált fekete *Aspergillus* törzsek MAT géneinek eloszlása



2. ábra: A MAT gének eloszlása az egyes fajok esetén

## Anyagok és módszerek:

A törzsek izolálása, fajszintű azonosítása:

A fekete *Aspergillus* törzsek izolálását DRBC (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol) agar lemezekon végeztük. Tiszta tenyészeteket hoztunk létre, majd DNS kivonást végeztünk EpiCentre DNS kivonó kit segítségével. A részletes kalmodulin gén amplifikálását a már korábban leírt módon hajtottuk végre (Varga és mtsai 2010). A szekvenciákat a BioEdit programmal jelenítettük meg, majd ezeket a Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) internetes adatbázisával vetettük össze.

Párosodási típus gének vizsgálata:

A párosodási típus gének amplifikálásához a következő primereket használtuk: Aspmat1.1for: -CTTCGCTTCTGTGGCAGAA-; Aspmat1.1rev: -TGGGCAGCGAARGCCAT- Aspmat1.2for: -TACAGAGCTGCTTTGGCAGGA-; Aspmat1.2rev: -CATTGGTGGWCGAGGRACCTT-

A szekvenciákat BioEdit programmal jelenítettük meg, majd a MEGA programcsomag 5. verzióját használtuk a szekvenciák illesztéséhez és a további filogenetikai analízishez. A hézagokat ötödik karakterállapotként kezeltük, és minden karaktert azonos súllyal vettünk figyelembe. Close-Neighbor-Interchange algoritmus segítségével Maximum Parszímónia fát készítettünk. A topológia megbízhatóságának ellenőrzésére 1000 bootstrap ismétlést futtattunk.

## Eredmények:

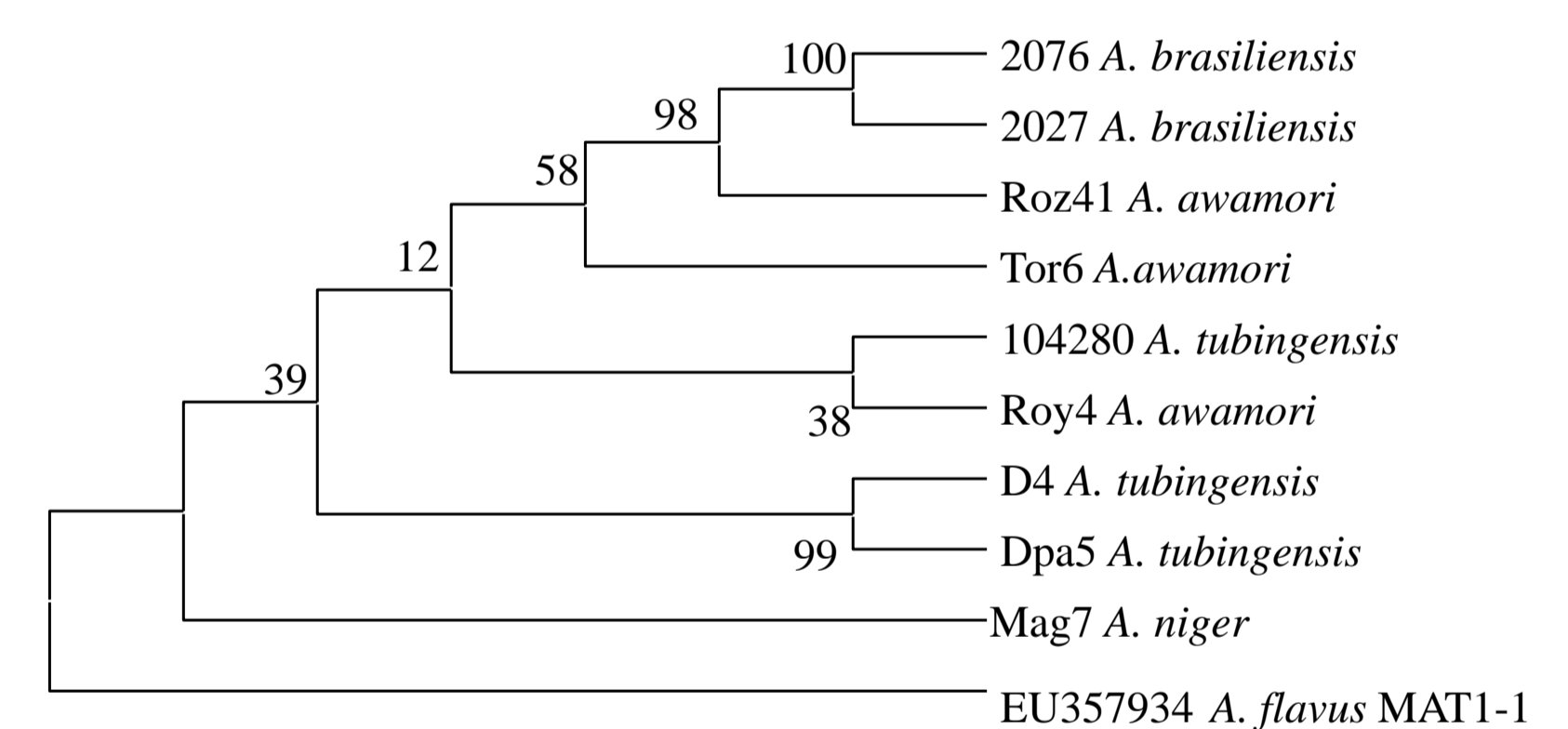
Az izolált törzsek fajeloszlása:

Munkánk során 114 fekete *Aspergillus* törzset izoláltunk hagymáról, datolyáról, mazsoláról, és beltéri levegőből, továbbá a vizsgálatba bevontunk 13 Welwitschia növényről izolált törzset is. A szekvencia-alapú fajmeghatározás szerint a hagymáról izolált 34 törzs mindegyike az *A. awamori* fajhoz tartozott, a datolyáról származó 38 törzs pedig *A. tubingensis*-nek bizonyult. A Welwitschia növényről izolált 13 törzset szintén kivétel nélkül *A. awamori*-nak határoztuk. Ezek az eredmények felvetik egy esetleges habitat-preferencia lehetőségét ennél a gombacsoporthoz.

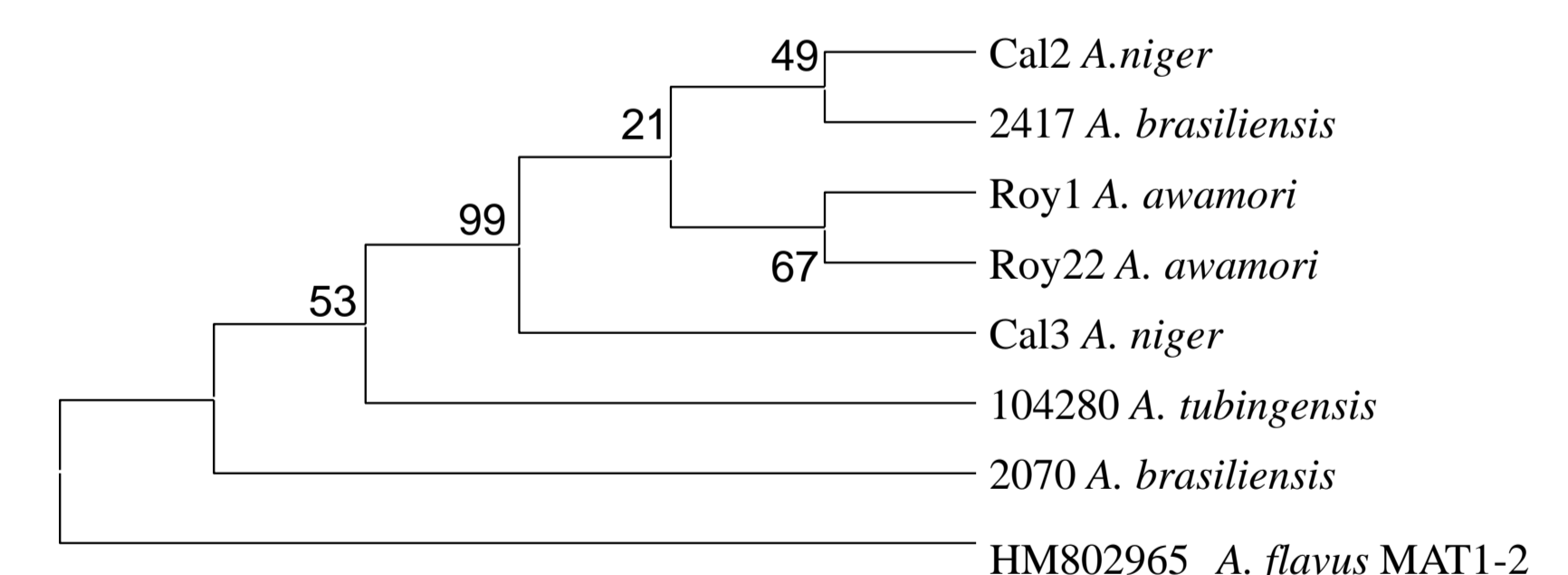
A párosodási típus gének vizsgálata:

Minden izolátum esetén sikerült igazolnunk a MAT1-1 vagy a MAT 1-2 gén jelenlétét. Az *A. niger* és *A. tubingensis* fajok esetén 1:1 MAT1-1:MAT1-2 arányt, míg az *A. awamori* faj esetén 6:1 arányt tapasztaltunk (2. ábra). Ez az eltolódás lehet a kis mintaszám miatt is, messzemenő következtetés levonásához mindenképpen több izolátum vizsgálata szükséges, ami terveink között szerepel. A Welwitschia növényről származó 13 *A. awamori* törzs mindegyikében a MAT1-1 párosodási típus gén volt jelen.

A egyes fajok párosodási típus géneinek bázissorrendjét összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az azonos fajba tartozó izolátumok nem különülnek el egymástól (3.-4. ábra).



3. ábra: A MAT1-1 párosodási típus gének bázissorrendjei alapján készített Maximum Parszímónia fa.



4. ábra: A MAT1-2 párosodási típus gének bázissorrendjei alapján készített Maximum Parszímónia fa.

## Irodalomjegyzék:

- DYER, P.S., PAOLETTI, M. (2005) Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med. Myc.* **43**: 7-14.  
 PEL, H.J. és mtsai. (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* **25**: 221-231.  
 Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. (2007) Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Stud. Mycol.* **59**: 129-145.  
 Varga, J., Kocsubé, S., Suri, S., Szigeti, G., Szekeres, A., Varga, M., Tóth, B., Bartók, T. (2010) Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. *Int. J. Food Microbiol.* **143**:143-149.

## Köszönetnyilvánítás:

Jelen kutatási eredmények megjelenését „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának kiszélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos utánpótlás biztosításával” című, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 azonosítószámú projekt támogatja. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatási munkát a K84077 számú OTKA pályázat is támogatta.



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

