

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***Az Aspergillus nidulans gfdB* gén bevitelének fajspecifikus
hatásai ozmofil *Aspergillus* fajokban**

Bodnár Veronika

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István



DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1 Az <i>Aspergillus</i> nemzetség bemutatása	8
2.2 Az <i>Aspergillus</i> törzsek ipari jelentősége	10
2.3 Az <i>Aspergillus</i> ok stresszadaptációja	13
2.4 Az ozmofilitás szerepe és működésének szabályozása	14
2.5 A glicerín metabolizmus jelentősége	17
3. Anyagok és módszerek.....	18
3.1 A stresszkísérletekhez felhasznált törzsek és tenyésztési körülmények	18
3.1.1 A vizsgálatokhoz használt transzgén törzsek előállítása.....	18
3.1.2 Az <i>Aspergillus</i> törzsek tenyésztése	19
3.1.3 Alkalmazott tápközegek.....	19
3.2 Az <i>Aspergillus</i> törzsek genotípus ellenőrzése.....	20
3.2.1 A <i>gfdB</i> gén kópiaszámának ellenőrzése qPCR módszerrel.....	20
3.2.2 A <i>gfdB</i> gén expresszió analízise qRT-PCR módszerrel	21
3.3 Stresszadaptációs vizsgálatok	21
3.3.1 <i>A. wentii</i> CBS141173 és <i>A. wentii</i> CBS141173 'c <i>gfdB</i> törzsek, illetve az <i>A. glaucus</i> CBS516.65 és <i>A. glaucus</i> CBS516.65 'c <i>gfdB</i> törzsek életképességének vizsgálata	21
3.3.2 Összehasonlító stressztolerancia vizsgálat klaszter-analízis és multidimenziós skálázás módszerével <i>Aspergillus</i> törzsekben.....	22
3.4 Transzkripciós vizsgálatok.....	23
3.4.1 A transzkripciós vizsgálatokhoz használt törzsek és tenyésztési körülmények.....	23
3.4.2 RT-qPCR vizsgálatok.....	24
3.4.3 RNS szekvenálás	24
3.4.3 Transzkriptom adatok kiértékelése.....	25
3.5 Statisztikai módszerek.....	26
3.6 Felhasznált anyagok és vegyszerek.....	26
4. Eredmények.....	27
4.1 A vizsgált <i>Aspergillus</i> törzsek genotípusának ellenőrzése.....	27
4.1.1 A <i>gfdB</i> gén transzformációjának ellenőrzése <i>A. wentii</i> CBS141173 'c <i>gfdB</i> törzsekben.....	27
4.1.2 A <i>gfdB</i> gén expressziójának meghatározása qRT-PCR módszerrel <i>A. wentii</i> CBS141173 'c <i>gfdB</i> törzsekben.....	28
4.2 Stresszérzékenység vizsgálatok.....	29
4.2.1 Az <i>A. wentii</i> CBS141173 és <i>A. wentii</i> CBS141173 'c <i>gfdB</i> törzsek fenotípusának jellemzése	29

4.2.2 Az <i>A. wentii</i> CBS141173 és <i>A. glaucus</i> CBS516.65 stressztolerancia alapú összehasonlító elemzése 17 <i>Aspergillus</i> törzssel	35
4.2.3 Az <i>A. wentii</i> CBS141173, <i>A. glaucus</i> CBS516.65 és <i>A. nidulans</i> THS30 stressztolerancia alapú pozicionálása	37
4.3 Transzkripciós vizsgálatok	38
4.3.1 A <i>gfdB</i> gén expressziójának összehasonlító hatásvizsgálata <i>A. nidulans</i> THS30 és <i>A. wentii</i> CBS141173 törzsekben	38
4.3.2 A <i>gfdB</i> gén expresszió hiányának hatása <i>A. nidulans</i> törzsben	41
4.3.3 A <i>gfdB</i> gén jelenlétének hatása az <i>A. wentii</i> fiziológiájára	48
5. Eredmények megbeszélése	56
5.1 Stresszkezelések hatása <i>Aspergillus spp.</i> esetében az ozmofil fenotípus aspektusából ..	58
5.2 Multidimenzionális megközelítés az <i>Aspergillus</i> fajok stresszválasz alapú pozicionálása céljából	60
5.3 Molekuláris betekintés az <i>Aspergillus wentii</i> és az <i>Aspergillus nidulans</i> ozmotikus stresszválaszaiba	60
6. Összefoglalás	64
7. Summary	65
9. Irodalomjegyzék	66
10. Tárgyszavak-Keywords	80
11. Köszönetnyilvánítás	81
12. Melléklet	83
13. Függelék	85

Rövidítések jegyzéke

AMM	minimál táptalaj („ <i>Aspergillus</i> Minimal Medium”)
ATCC	American Type Culture Collection
CBS	Fungal Biodiversity Centre
CP	a qPCR reakciókban a PCR termék detektálható akkumulálódásához szükséges ciklusok száma („crossing point”)
DCM	szárastömeg („dry cell mass”)
FC	egy gén transzkripció változása („fold change”) a transzkriptomikai vizsgálatok esetében
<i>gfdB</i>	glicerín-3-foszfát dehidrogenáz („glycerol 3-phosphate dehydrogenase”)
HOG pathway	nagy ozmolaritású glicerín útvonal („high-osmolarity glycerol pathway”)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz („mitogen-activated protein kinase”)
MDS	sokdimenziós skálázás („multidimensional scaling”)
MIC _{xx}	a legkisebb koncentráció, ami már xx %-os növekedés gátlást okoz („Minimum inhibitory concentration”)
MSB	menadion-nátrium-biszulfit („Menadione Sodium Bisulphite”)
NSS	nitratos sóoldat („nitrate salt solution”)
RT-qPCR	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció („real-time quantitative polymerase chain reaction”)
<i>t</i> BOOH	<i>tert</i> -butil-hidroperoxid („ <i>tert</i> -Butyl hydroperoxide”)
TOR	tápanyagellátottság érzékelésében fontos jelátviteli fehérje/jelátviteli útvonal („target of rapamycin”)
TRIzol	RNS izolálásra kifejlesztett reagens („Total RNA Isolation Reagent”)

1. Bevezetés

Az *Aspergillus* nemzetséghez tartozó taxonok gazdag diverzitása lehetővé tette e nemzetség kiemelkedését a fonalas gombák között. Az *Aspergillus* fajok képesek a legkülönbözőbb élőhelyeken megtelepedni, a normál körülményektől egészen az extrém környezeti paraméterekkel jellemezhető élőhelyekig (Perrone és mtsai. 2007). Ezért az *Aspergillus*ok genetikai és metabolikus vizsgálata elengedhetetlen az élelmiszeripar és táplálkozástudomány enzimtermelési folyamatainak jobb megértéséhez (Mach-Aigner és mtsai. 2010). Az *Aspergillus* alapú fermentációs rendszerek fejlesztése hozzájárulhat a nagy mennyiségben felhasznált és kiváló minőségű enzimek ipari mértékben történő előállításához. Ezeket az enzimeket már számos területen alkalmazzák, köztük az élelmiszergyártásban, a gyógyszeriparban (Tao és mtsai. 2010). Az AB Enzymes, a BASF, a Chr. Hansen, a DuPont és a Novozymes csak néhány példa olyan biotechnológiai vállalatokra, amelyek az *Aspergillus* fajokat használják szerves savak, enzimek, fehérjék és másodlagos metabolitok ipari léptékű gyártására (Meyer és mtsai. 2016).

Az *Aspergillus*ok alkalmazása széles körben elterjedt a tradicionális fermentációs felhasználástól kezdve egészen a heterológ fehérjetermelésig. Például az *Aspergillus niger* számos élelmiszer- és takarmánygyártásban használt enzimet termel, köztük glükóamilázokat, proteázokat és fitázokat, továbbá az *Aspergillus oryzae* malátagyártáshoz, míg az *Aspergillus terreus* sztatinek előállításához használják. Az *A. niger*t pedig már szintén használják rekombináns fehérjék, például borjú kimozin, humán laktoferrin, valamint egy növényi eredetű édesítőszer, az inulin ipari előállításában (Ntana és mtsai. 2020).

Az *Aspergillus wentii* és az *Aspergillus glaucus* előnyös tulajdonságai számos további kutatási lehetőséget kínálnak az élelmiszer- és táplálkozástudomány, valamint az ipari biotechnológia területén. Az enzimtermelés optimalizálása és a gombák stressztoleranciát biztosító génjeinek az átvitele más organizmusokba új lehetőségeket teremthet a fenntartható és hatékony ipari folyamatok előmozdítása és az új termékek fejlesztése érdekében (Abrashv és mtsai. 2016). Az *A. wentii* például jól ismert xerofil és ozmofil tulajdonságairól, amelyek lehetővé teszik számára, hogy száraz és nagy sótartalmú környezetekben is túléljen és szaporodjon. Így nem meglepő, hogy ezen tulajdonságok vonzóvá teszik az ipari enzimtermelés szempontjából, például az amiláz vagy lipáz enzimek előállítása során, amely enzimek fontos szerepet játszanak az élelmiszerek előállításában és az ipari biotechnológiai folyamatokban (Wheeler és mtsai. 1993). Az *A. glaucus* is hasonlóan fontos enzimtermelő ozmofil gombafaj, melyet amiláz és proteáz termelésre is használnak. A proteázok a fehérjék lebontásában és

emésztésében játszanak fontos szerepet, elősegítve az élelmiszerek emészthetőségét és tápanyagfelszívódását (Barbesgaard és mtsai. 1992).

A törzsek ozmotoleranciájának megváltoztatása ígéretes eszköz lehet a termékképződés növelésére, vagy a spórák életképességének a meghosszabbítására (Steensels és mtsai 2014, Hagiwara és mtsai. 2015).

Az ozmolitok felhalmozódása gyakran a környezet megnövekedett ozmolaritására adott stresszválasz (Blomberg és mtsai 1992; Brown és mtsai. 2014; de Lima és mtsai. 2015; Hagiwara és mtsai. 2016). Így nem meglepő, hogy a glicerín bioszintézisében részt vevő enzimek, mint például a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz (Gfd) vagy a glicerín dehidrogenáz (Gld), gyakran hozzájárulnak az ozmotikus stresszválasz kialakulásához (de Vries és mtsai. 2003; Miskei és mtsai. 2009; de Vries és mtsai. 2017). Az *Aspergillus gfd* szekvencia elemzése alapján látható, az ősi *gfd* gén már megkettőződött az *Aspergillusok* diverzifikációja előtt, és ennek következtében a legtöbb *Aspergillus* fajnak két *gfd* génje van. A két *gfd* gén nemcsak szekvenciájában, hanem szabályozásában és funkciójában is különbözik egymástól. A genom szintű transzkripciós elemzések során azt tapasztalták, hogy az *A. nidulans gfdB*-t a menadion-nátrium-biszulfit (MSB) és a H₂O₂ által kiváltott oxidatív stressz indukálta, valamint a NaCl általi ozmotikus stressz szintén növelte expresszióját, míg a *gfdA* csak MSB stressz esetén mutatott kisebb indukálódást (Emri és mtsai. 2015; Fillinger és mtsai. 2001a; Király és mtsai. 2020a). *A. nidulans* esetében a *gfdB* gén deléciója növelte az oxidatív stresszérzékenységet és mérsékelten növelte a sejtfalintegritási stressz szenzitivitást, de nem befolyásolta a törzs ozmotikus stressz toleranciáját (Király és mtsai. 2020a). A *gfdA* deléciója azonban komoly növekedési problémákat okozott, amelyek 1 M NaCl hozzáadásával részben korrigálhatók voltak, továbbá fokozott sejtfalintegritási stresszérzékenységet eredményeztek (Brown és mtsai. 2014). Az *A. fumigatus* esetében szintén megfigyelhető volt a *gfdA* deléció negatív hatása, ami glükózon történő növekedés csökkenéshez vezetett, azonban a NaCl vagy szorbit hozzáadása a tápközeghez részben helyreállította ezt a növekedési defektust (Fillinger és mtsai. 2001a). Másrészt a *gfdB* deléció nem járt lényeges növekedési problémákkal, és még a *gfdB* túlzott expressziója sem volt képes helyreállítani a Δ *gfdA* mutáns csökkent növekedését (Zhang és mtsai. 2018).

Az ozmofil *A. glaucus* és *A. wentii* csak egy *gfdA* ortológot tartalmaz, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a *gfdB* elvesztése kapcsolatban lehet e fajok ozmofil természetével (de Vries és mtsai. 2017). Az ilyen funkciók fontossága folyamatosan csökkenhet tartósan nagy ozmolaritás mellett. Bár sem a *gfdA*, sem a *gfdB* deléciója nem befolyásolta jelentősen az *A. nidulans* ozmotoleranciáját, az *A. nidulans gfdA* génje jelentős fiziológiai szerepet játszik a

sejtnövekedés és a sejtfa integritásának fenntartásában (Fillinger és mtsai. 2001). Az *A. nidulans gfdB* expressziója *A. glaucus*ban növelte a gomba stressztűrő képességét oxidatív és sejtfa integritási stressznek kitett tenyészetekben, de nem befolyásolta az *A. glaucus* ozmofil természetét (Király és mtsai. 2020b).

Munkánk kezdetekor, így a következő kérdésekre kerestük a választ: (1) Javítható-e az iparilag jelentős *A. wentii* faj stressztűrő képessége célzott genetikai módosítások révén, az *An-gfdB* gén szupplementálásával? (2) A *gfdB* gént érintő géndózis változások okozhatják-e új fenotípusok megjelenését (pl. az ozmofilitás megszűnését, a stressztolerancia erősödését) az *A. wentii* fonalas gomba esetében? (3) Rekonstruálható-e az *A. nidulans* fenotípusa a tőle evolúciós szempontból távolabb elhelyezkedő ozmofil *A. wentii* esetében a *gfdB* gén szupplementálása révén? (4) Transzkriptomikai megközelítés révén betekintést nyerhetünk-e a megfigyelt ozmofil fenotípusok háttérében álló molekuláris folyamatokról?

A felmerült kérdések megválaszolása érdekében az alábbi vizsgálatokat végeztük el:

1. Az *An-gfdB* génnel transzformált *A. wentii* CBS141173 mutáns és vad típusú törzsek stresszérzékenység vizsgálatának elvégzése ozmotikus stresszt kiváltó ágensek adása és azok nélkül, sejtfa integritási, nehézfém-, és oxidatív stresszt okozó ágensek jelenlétében.
2. Komparatív stresszérzékenységi vizsgálatok elvégzése az *A. glaucus* CBS516.65 mutáns és vad törzseinek vizsgálatba történő bevonásával és összehasonlítása a szintén ozmofil *A. wentii* CBS141173 mutáns és vad törzseivel.
3. Multidimenzionális megközelítés alkalmazása az *Aspergillus* fajok stresszválasz alapú pozicionálása céljából további 17 *Aspergillus* faj analízisbe történő bevonásával.
4. Transzkripciós vizsgálatok elvégzése ozmotikus stresszt kiváltó ágensek jelenlétében, a *gfdB* gén expressziójának összehasonlító hatásvizsgálata céljából az *A. nidulans* THS30 és *A. wentii* CBS141173 vad és mutáns törzseiben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az *Aspergillus* nemzetség bemutatása

Az *Aspergillus* nemzetség magába foglalja az *Ascomycota* törzsbe tartozó fonalas gombák egy változatos csoportját. Ezek a gombák mindenütt jelen vannak a környezetben, és világszerte számos élőhelyen megtalálhatók, beleértve a talajt, a bomló szerves anyagokat, a növényeket és a beltéri környezetet, például otthonokat és kórházakat. Az *Aspergillus* fajok arról ismertek, hogy másodlagos metabolitok széles skáláját képesek előállítani, melyek némelyike iparilag fontos, míg más metabolitok akár toxikusak is lehetnek az emberekre és az állatokra nézve (Bennett és mtsai. 2003).

Taxonómiailag az *Aspergillus* nemzetség az *Aspergillaceae* családba tartozik, az *Eurotiales* renden belül. A nemzetségnek jellegzetes morfológiája van, beleértve a konídiumok (ivartalan spórák) láncát hordozó konidiofórokat, amelyek jellegzetes, kefére vagy seprűre emlékeztető, radiális módon rendeződő képletek, így innen ered az "*Aspergillus*" elnevezés is, amely az "asperillum" latin szóból származik (Samson és mtsai. 2009).

Alapvető szerepet játszanak a tápanyagok újrahasznosításában és a szerves anyagok lebontásában az ökoszisztémákban. Az emberi tevékenységek, például a mezőgazdaság, az élelmiszer-feldolgozás és a beltéri környezet szintén kedvező feltételeket biztosít bizonyos *Aspergillus* fajok szaporodásához.

Az *Aspergillus* fajok gazdasági és ipari jelentősége nagy. Széleskörben használják őket a biotechnológiában és az ipari fermentációs folyamatokban enzimek, szerves savak és gyógyszerek előállítására. Például az *Aspergillus niger*t citromsav termelésre, míg az *Aspergillus oryzae*t szójabab fermentálására használják szójaszószt és más fermentált termékek előállításánál (Keller és mtsai. 2005).

Bár sok *Aspergillus* faj ártalmatlan szaprofita, néhány opportunistá patogén képes emberi fertőzést okozni, különösen az immunhiányos egyéneknél. A klinikailag legjelentősebb fajok közé tartozik az *Aspergillus fumigatus*, az *Aspergillus flavus*, az *Aspergillus niger* és az *Aspergillus terreus*. Ezek a gombák az aspergillózisnak nevezett betegségek széles skáláját okozhatják, amely az allergiás reakcióktól az invazív tüdő- és szisztémás fertőzésekig terjed. Ezenkívül bizonyos *Aspergillus* fajok képesek toxikus szekunder metabolitokat termelni, amelyek mikotoxinként ismertek. Például az *A. flavus* és az *A. parasiticus* aflatoxinokat (erős karcinogének) termelnek, amelyek szennyezhetik a mezőgazdasági termékeket, például a földimogyorót, a kukoricát és a dióféléket. Az aflatoxinokkal szennyezett élelmiszerek

krónikus expozíciója komoly egészségügyi következményekkel járhat, beleértve a májrákot és az immunszuppressziót (Fisher és mtsai. 2018; Latgé és mtsai 2019).

Az ozmofil *Aspergillus*ok képesek alkalmazkodni és növekedni olyan környezetekben, ahol nagy az ozmotikus nyomás, például nagy só- vagy cukor tartalmú közegekben. Ezek a fajok számos élőhelyen megtalálhatók, beleértve a sós vizeket, sóssá vált talajokat, konzerveket és egyes élelmiszereket. Az ozmofil *Aspergillus*ok fontosak lehetnek ipari és környezetvédelmi szempontból is, például sóálló enzimek előállításában vagy sóval szennyezett területek megtisztításában (Varga és mtsai. 2007).

Az ozmofil *Aspergillus*ok legjelentősebb képviselői:

- *Aspergillus sydowii*: Ez a faj gyakran előfordul tengeri környezetben, különösen tengeri algákkal együtt, sósvízi élőhelyeken. Ozmofilitást mutat és ezért nagy sókoncentrációjú szubsztrátumokon is szaporodhat. Az *A. sydowii*t különböző tengeri forrásokból izolálták, és arról ismert, hogy számos szekunder metabolitot képes előállítani, ezért jelentős a biotechnológiai alkalmazhatósága (Jones és mtsai. 2009).
- *Aspergillus wentii*: Az *A. wentii* ozmofil tulajdonságairól ismert, és gyakran izolálják nagy cukor- és só tartalmú környezetből. Különböző élelmiszer termékekben, köztük gyümölcsökben, fermentált élelmiszerekben és nagy só tartalmú élőhelyeken találták meg. Az *A. wentii*nek jelentős és hatékony ozmotikus stressz adaptációs mechanizmusai vannak, beleértve a kompatibilis oldott anyagok szintézisét (Houbraken és mtsai. 2011).
- *Aspergillus penicillioides*: Ez a faj általában nagy cukor- és só tartalmú környezetben található, például tartósított élelmiszerekben, szárított gyümölcsökben és nagy páratartalmú beltéri környezetben. Alkalmazkodik a hipertóniás környezethez, és hozzájárulhat a tárolt élelmiszerek megromlásához (Nazareth és mtsai. 2014).
- *Aspergillus restrictus*: Ez a faj általában nagy só tartalmú környezetben található, például sóbányákban és szikes talajokban. Képes alkalmazkodni a szélsőséges ozmotikus körülményekhez, valamint képes melanin termelésre, amely megvédi az UV-sugárzástól ezeken az élőhelyeken (Novak és mtsai. 2017).
- *Aspergillus glaucus*: Gyakran megtalálható különböző élőhelyeken, beleértve a talajt, a korhadó növényzetet és a beltéri környezetet. Gyakran izolálják élelmiszer termékekből is, különösen a nagy cukor- vagy só tartalmúakból, például gyümölcsökből, sajtokból és pácolt húsokból. Az *A. glaucus* bizonyos körülmények között hozzájárulhat az élelmiszerek megromlásához és mikotoxinokat is termelhet. Ozmofilitása révén jól túlél nagy ozmolalítású környezeteket (Lopes és mtsai. 2022).

Az *Aspergillus* nemzetség sokféle gombafajt foglal magába, melyek ökológiai, ipari és orvosi jelentősége nagy. Míg sok *Aspergillus* faj pozitívan járul hozzá különféle folyamatokhoz ipari hasznosíthatósága révén (pl.: enzimtermelés), néhány faj egészségügyi kockázatot jelenthet az emberek és az állatok számára közvetlen fertőzés vagy mikotoxin szennyezés révén. Így az *Aspergillus* fajok tanulmányozása fontos e fajok káros hatásainak csökkentése és hasznos tulajdonságainak felhasználása érdekében.

2.2 Az *Aspergillus* törzsek ipari jelentősége

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fonalas gombákat széles körben használják különféle ipari folyamatokban, mivel rengeteg enzimet, szerves savat és szekunder metabolitot képesek termelni. Az *Aspergillus* fajok kiváló enzimtermelők, például amilázokat, proteázokat, lipázokat, cellulázokat és xilanázokat termelnek, amelyek különféle iparágakban, így élelmiszer-, textil-, mosószer- és bioüzemanyag-gyártásban is alkalmazhatók (Gupta és mtsai. 2014).

Az *A. awamori*t gyakran alkalmazzák különféle enzimek, különösen amilázok és proteázok előállítására, amelyeket az élelmiszer-feldolgozásban, sörfőzésben és mosószeriparban alkalmaznak. Alkoholos italok erjesztésére és koji előállítására is használják (Hossain és mtsai. 2013).

Az *A. niger*t szerves savak, például citromsav, glükonsav és itakonsav kereskedelmi előállítása során is hasznosítják. A citromsavat különösen széles körben veszik igénybe az élelmiszeriparban és a gyógyszeriparban (Papagianni és mtsai. 2007).

Az *Aspergillus* fajokat különféle antibiotikumok, például penicillin és cefalosporinok előállítására is alkalmazzák, amelyek döntő fontosságúak a gyógyszeriparban a bakteriális fertőzések kezelésében (Liu és mtsai. 2014). Az *A. terreus*t a gyógyszeriparban hasznosítják másodlagos metabolitok, különösen a lovasztatin előállítására, amely egy koleszterinszint-csökkentő gyógyszer. Ezenkívül szteroidok biotranszformációjában és enzimek előállításában is alkalmazzák (Cherry és mtsai. 2003).

Bizonyos *Aspergillus* fajok képesek különböző szennyező anyagok, például szénhidrogének, színezékek és nehézfémek lebontására, így potenciális alkalmazásokat kínálnak a környezeti bioremediációban.

Egyes *Aspergillus* fajok biokontroll ágensként használhatók fel a növényi kórokozók ellen, ezáltal csökkentve a mezőgazdaságban a vegyi növényvédő szerektől való függőséget (Woo és mtsai. 2014).

Az *A. wentii* számos ipari folyamat során felhasználásra kerülhet, különösen enzimtermelésben és bioremediációban. Hasonlóan sok másik *Aspergillus* fajhoz, az *A. wentii* is képes különféle enzimeket termelni, melyeket különféle iparágakban, például élelmiszerfeldolgozásban, textilgyártásban és bioüzemanyag-gyártásban alkalmazzák. Az *A. wentii* által termelt enzimek közé tartoznak többek között az amilázok, proteázok, lipázok, cellulázok és xilanázok. Az *A. wentii*nek potenciálisan alkalmazható a bioremediációban, mivel képes lebontani a különböző szennyező anyagokat. Az *Aspergillus* nemzetséghez tartozó gombák képesek szerves vegyületek metabolizálására és összetett molekulák lebontására, így hasznosak lehetnek a környezet megtisztításában. Az *A. wentii* különösen hatékony lehet a szénhidrogének és más szerves szennyező anyagok degradációjában. Bár kevésbé feltárt, mint más fajok esetében, de az *A. wentii* is képes olyan szekunder metabolitok előállítására, amelyek ipari alkalmazásra kerülhetnek. Ezek a szekunder metabolitok lehetnek antibiotikumok és gyógyszerészeti vagy mezőgazdasági jelentőségű bioaktív vegyületek (Lago és mtsai. 2021; Miao és mtsai. 2014; Li és mtsai. 2018a; Wells és mtsai. 1975; Choma és mtsai. 2013; Form és mtsai. 2019; Wu és mtsai. 1974). Az *A. wentii* PG18 törzs glükóamiláz termelését átfogóan tanulmányozták (Lago és mtsai. 2021), mivel a glükóamilázokra nagy az igény, ezért termelésük optimalizálása kulcsfontosságú. Hagyományos süllyesztett fermentáció esetében a nyers szűrletben mért amiláz specifikus aktivitás az *A. wentii* PG18 törzs esetében nagyobb volt a többi vizsgált *Aspergillus* fajhoz képest (például *A. fumigatus*) (Lago és mtsai. 2021). Az *A. wentii*, mint az extrém oldottanyag-toleráns xerofil gombák egyik képviselője, szintén jelentős szerepet tölt be a biodízel gyártásban. Például a talajból izolált *A. wentii* Ras101 lipáz- termelő törzset gyakran használják a biodízel gyártásban.

Az *A. glaucus* elsősorban enzimtermelésben és élelmiszer-feldolgozásban használják. Az *A. glaucus* számos enzimet képes termelni, beleértve az amilázokat, proteázokat, lipázokat, cellulázokat és xilanázokat. Ezeknek az enzimeknek széleskörű ipari alkalmazásai vannak, például az élelmiszeriparban, az italok előállításában, továbbá a textil-, mosószer- és bioüzemanyag-gyártásban. Az *A. glaucus* eredetű enzimeket gyakran használják fel, mivel képesek hatékonyan átalakítani az összetett szubsztrátumokat egyszerűbb vegyületekké, jelentősen elősegítve ezzel a különféle ipari folyamatokat. Sok *Aspergillus* fajhoz hasonlóan az *A. glaucus* is képes különféle szerves vegyületeket és szennyező anyagokat lebontani, mint például a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok), poliklórozott bifenilek (PCB-k), peszticidek, nehézfémek, szénhidrogének, fenolos vegyületek és ipari színezékek. Alkalmazhatják az *A. glaucus* olyan bioremediációs folyamatokban is, amelyek célja a környezeti szennyeződések, például szénhidrogének és ipari hulladékok degradációja. Az *A.*

glaucus ipari jelentőségű szekunder metabolitokat termel, beleértve antibiotikumokat és egyéb bioaktív vegyületeket. Ezeknek a szekunder metabolitoknak lehet gyógyszerészeti, mezőgazdasági vagy biotechnológiai alkalmazása, hozzájárulva új gyógyszerek, mezőgazdasági termékek vagy ipari folyamatok kifejlesztéséhez (Machida és mtsai. 2010). Az ausztrál aszalt szilvák romlását okozó penészgombák között az *A. glaucus* csoport dominált, ismert xerofil jellegük miatt (Pitt és mtsai. 1968). Ezen túlmenően az iparilag alkalmazott *A. glaucus* MA0196 törzs, amelyet a katsuobushi érlelésében és fermentációjában használnak, különböző típusú hidrolitikus enzimeket, például amilázt, lipázt, cellulázt és aszparaginsav-proteázt is képes termelni, valamint hem fehérjék degradációjára is használható (Takenaka és mtsai. 2019). Az AgCMCase, az *A. glaucus* CCHA törzs egyedülálló GH5 celluláza, nagy cellulóz-hidrolizáló képességű enzim, valamint hőstabil, pH-stabil és sótűrő. Ennek eredményeként ez egy olyan enzim, amely képes lehet redukáló cukrokat felszabadítani a bioetanol gyártási folyamatában (Chen és mtsai. 2020; Li és mtsai. 2018b). Ezenkívül az *A. glaucus* morfológiájának és a polarizált növekedést biztosító génjeinek megváltoztatásával sikerült javítani bioreaktorban történő alkalmazáskor a süllyesztett fermentáció folyamatok hatékonyságát és a kihozatalt (Cai és mtsai. 2014). Az antarktisi *A. glaucus* 363 CA által termelt szuperoxid-diszmutáz (SOD) enzimet iparban felhasználják antioxidánsok előállítására, valamint a gyógyszeriparban is alkalmazzák ezt az enzimet különféle készítményekben, mivel segít a sejtek védelmében és a gyulladások csökkentésében, így hozzájárulhat a krónikus betegségek kezeléséhez és megelőzéséhez (Abrashev és mtsai. 2016). A halofil *A. glaucus* gomba *AgGlpF* génjét, amely egy transzporter fehérjét kódol, a glicerint vízzel és más töltetlen oldott anyagokkal együtt szállítja és részt vesz az ozmoregulációban, szintén felhasználták sótűrő szójabab csíraplazma előállítására, ami megnövelte a szójabab hozamát és feljavította a minőségét (Liu és mtsai. 2015).

2.3 Az *Aspergillus*ok stresszadaptációja

Az *Aspergillus*ok figyelemreméltó módon alkalmazkodnak a különböző stresszhatásokhoz, mely lehetővé teszi számukra a különböző ökológiai nichék elfoglalását. Az *Aspergillus*ok stressz adaptációs mechanizmusai fiziológiai és molekuláris válaszok kombinációját foglalják magukba.

Ozmotikus stresszadaptáció: Ozmotikus stressz esetén az *Aspergillus* fajok biztosítják az intracelluláris ozmotikus egyensúly fenntartását, kompatibilis oldott anyagok, például glicerin, trehalóz és aminosavak szintéziséen és felhalmozásán keresztül. Ezek a vegyületek segítenek fenntartani a sejtek turgornyomását és megakadályozzák a vízvesztést. A Hog1 MAP kináz jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik az *Aspergillus* fajok ozmotikus stresszválaszában (Hagiwara és mtsai. 2009a).

Oxidatív stresszadaptáció: Az *Aspergillus*ok oxidatív stresszel szembesülnek az aerob anyagcserében keletkező reaktív oxigén részecskék (ROS) vagy környezeti tényezők, például UV-sugárzás vagy vegyi anyagok hatására. Az oxidatív stressz ellensúlyozására az *Aspergillus* fajok antioxidáns védekező mechanizmusokat aktiválnak, beleértve enzimek, például katalázok, a szuperoxid diszmutázok és a peroxidázok, valamint nem enzimátikus antioxidánsok, például a glutation, valamint a C- és E-vitaminok termelését (Yaakoub és mtsai. 2022b).

Hőmérsékleti stresszadaptáció: Az *Aspergillus*ok széles hőmérséklet-tartományban képesek szaporodni, a mezofiltól a termotoleráns körülményekig. A hőmérsékleti stresszhez való alkalmazkodás érdekében ezek a gombák szabályozzák a hősokkfehérjék (HSP-k) és más chaperonok expresszióját, amelyek megakadályozzák a fehérjék denaturációját magas hőmérsékleten. A HsfA hősokk transzkripciós faktort az *A. nidulans* hősokk-válasz kulcsfontosságú szabályozójaként azonosították (Oda és mtsai. 2019).

Tápanyag limitáltsági stresszadaptáció: Az *Aspergillus*ok tápanyag limitáltsági stressz körülményekkel szembesülnek, amikor az alapvető tápanyagok, például szén, nitrogén vagy foszfor korlátozott mennyiségben van a környezetükben. A tápanyag-limitált körülmények közötti túlélés érdekében az *Aspergillus* fajok képesek aktiválni azokat a tápanyagszerzési útvonalakat, melyek révén alternatív tápanyagforrásokat tudnak hasznosítani. Például a nitrogén limitációkor az *Aspergillus* fajok fokozzák a nitrogén-anyagcserében és -szállításban részt vevő gének expresszióját (He és mtsai. 2019).

A kedvezőtlen élőhelyeken való túlélés érdekében a mikrobáknak észlelniük kell a környezeti stresszhatásokat, továbbítaniuk kell ezeket a jeleket, és védekező reakciókat kell

kifejleszteniük. A védekező reakciókban szerepet játszó „core signal” fehérjék általában konzerváltabbak, mint az „upstream” és „downstream” komponensek. Az ozmotikus, oxidatív és sejtfalintegritási stressz jelátviteli útvonalak kulcsfontosságú komponensei általában konzerváltak, de az upstream érzékelők és a downstream transzkripciós szabályozók jelentősen eltérnek egymástól. Érdeemes megemlíteni, hogy nincs közvetlen összefüggés a stresszjelző utak konzerváltságának foka és a gomba stresszel szembeni toleranciája között. A gomba stresszjelző komponensek gyorsan evolválódtak az elmúlt korokban, így a stresszre adott válaszok niche-specifikus módon módosulhattak. A stresszre adott celluláris és molekuláris válaszoknak akut (azonnali) és adaptív fázisai vannak. Az akut reakciók célja a stressz negatív következményei által okozott károk csökkentése. Az adaptív reakciók viszont jellemzően a sejtes homeosztázis helyreállítását biztosítják annak érdekében, hogy a mikroba az új környezeti körülmények között is szaporodhasson. A sejteknek észlelniük kell a környezetükben bekövetkező változásokat, és aktiválniuk kell a szükséges jelátviteli útvonalakat a megfelelő akut és adaptív stresszválaszok kialakításához. Becslések szerint jelenleg a gombafajok száma a Földön 2,2 millió és 3,8 millió között van, és sokféleségük az általuk elfoglalt nichék változékonyságát jól tükrözi (Hyde 2022). A gombák stresszindukciós útvonalai gyorsan és niche-specifikusan átalakulnak (Nikolaou és mtsai. 2009). Például az *Aspergillus nidulans*ban két HogA paralógot azonosítottak: SakA (más néven HogA) és MpkC. Ezek a MAPK fehérjék különböző szerepeket töltenek be az ozmoadaptáció és a stresszreakciók során. A SakA/HogA kulcsszerepet játszik az ozmotikus stresszre adott válaszban, míg az MpkC kiegészíti ezt a funkciót. A SakA/HogA fontos az ozmotikus stresszre adott válaszban és a sejtek túlélésében nagy hidrogén-peroxid (H₂O₂) koncentrációk mellett, segíti az ozmotikus és redox egyensúly fenntartását és a sejtvédelemben játszik szerepet. Az MpkC szintén részt vesz a hiperozmotikus stresszreakcióban, bár nem nélkülözhetetlen az ozmoadaptációhoz, kiegészíti a SakA/HogA funkcióját, különösen bizonyos stresszfeltételek mellett (Garrido-Bazán és mtsai. 2018).

2.4 Az ozmofilitás szerepe és működésének szabályozása

Az ozmofília és ozmotikus stressz tolerancia kritikus szerepet játszik az *Aspergillus*ok túlélésében és elterjedésében, lehetővé téve számukra, hogy változatos környezeti körülmények között, változó ozmotikus nyomás mellett is fennmaradjanak. Egyes *Aspergillus*ok figyelemre méltó ozmotikus alkalmazkodóképességet mutatnak, lehetővé téve számukra, hogy fenntartsák a sejthomeosztázist változó ozmotikus nyomású környezetben. Ezt a kompatibilis oldott

anyagok, például glicerin, trehalóz és prolin felvétele és szintézisének szabályozása révén érik el, amelyek segítenek az ozmotikus stressz kivédésében és a sejt szerkezetek stabilizálásában (Hagiwara és mtsai. 2016). Az ozmofil *Aspergillus*ok fenn tudják tartani az ozmoregulációt és az ionháztartást ozmotikus stressz körülmények között is. Ez magába foglalja az iontranszporterek és csatornák regulációját és ehhez kapcsolódóan, az ionok intracelluláris koncentrációjának szabályozását, ami kulcsfontosságú a sejtterfogás és az ozmotikus egyensúly fenntartásához (Martín 2022). Különböző védelmi mechanizmusokat alkalmaznak az ozmotikus stressz leküzdése érdekében. Ilyen mechanizmusok például a stresszválasz fehérjék (pl. chaperonok, antioxidánsok) szintézise, a DNS-javító rendszerek aktiválása, valamint a membrán összetételének a megváltoztatása a sejtek integritásának megőrzése érdekében (Hagiwara és mtsai. 2016). Az ozmotikus stressz befolyásolja az *Aspergillus*ok anyagcsereújtait is, ami olyan metabolikus adaptációt eredményez, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy túléljenek és szaporodjanak ozmotikusan kihívást jelentő körülmények között. Ezenkívül módosíthatják a szekunder metabolit termelésüket is ozmotikus stressz hatására. Az *Aspergillus*ok ozmotikus alkalmazkodóképessége elengedhetetlen ökológiai sikerükhöz és ahhoz, hogy megtelepedhessenek különböző élőhelyeken, beleértve a talajt, a bomló szerves anyagokat és a különböző élelmiszertermékeket. Ozmofiliájuk lehetővé teszi számukra, hogy ingadozó ozmotikus körülmények között is boldoguljanak, leküzdve ezáltal a többi mikroorganizmust (Cairns és mtsai. 2018).

Az *Aspergillus*ok számos jelátviteli útvonalat alkalmaznak az ozmotikus stresszválasz aktiválásához, ezáltal biztosítva túlélésüket és alkalmazkodásukat a kihívásokkal teli környezetben.

Például a HOG útvonal révén, amely egy konzervált MAPK jelátviteli kaszkád, amely az ozmotikus stressz hatására aktiválódik (Zhang és mtsai. 2021).

A kalcium jelátvitel szintén szerepet játszik az ozmotikus stresszválaszban, mely magába foglalja a kalciumcsatornákat, a kalciumkötő fehérjéket és a kalcium-dependens protein kinázokat (CDPK), amelyek szabályozzák a különböző sejt folyamatokat, beleértve az ionháztartást és a génexpressziót (de Castro és mtsai. 2019).

A ciklikus AMP (cAMP)-függő protein kináz A (PKA) útvonal részt vesz az ozmotikus stresszválaszban és az adaptációban. Szabályozza a génexpressziót, az anyagcserét és a stressztűrést a PKA és a downstream effektorok aktiválása révén (Huang és mtsai 2017).

Az *Aspergillus*oknak további MAP kinázai is vannak, beleértve az MpkA-t és MpkB-t, amelyek részt vesznek a sejt fal integritás biztosításában és a stresszválaszok szabályzásában.

Ezek az útvonalak keresztezhetik is egymást az ozmotikus stressz jelátvitellel, és együttesen biztosítják a sejtfal integritását és a stresszhez való alkalmazkodást (Valiante és mtsai. 2015).

A TOR-útvonal integrálja a tápanyag-elérhetőségből, az energiaállapotból és a környezeti stresszhatásokból származó jeleket, hogy ezáltal is koordinálja a növekedést és az anyagcserét. Ezzel összhangban szerepet játszik az ozmotikus stresszválasz, a sejtnövekedés és proliferáció összehangolásában (Saxton és mtsai 2017).

A HOG útvonalat ozmoszenzorok aktiválják, amelyek érzékelik az ozmotikus nyomás változásait. Az *Aspergillus*okban a Sho1-szerű transzmembrán fehérje és az Sln1 hisztidin kináz elsődleges ozmoszenzorként működik, detektálva az extracelluláris ozmolaritás változásait. Az ozmotikus stressz érzékelésekor az ozmoszenzorok aktiválnak egy mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkádot, amely három kinázból áll: Ssk2, Pbs2 és Hog1 (*Saccharomyces cerevisiae*). Ez a kaszkád továbbítja az ozmotikus jelet a sejtfelszínről a sejtmagba, ahol szabályozza a génexpressziót, hogy elősegítse az ozmotikus adaptációt. Az ozmotikus stresszre adott válaszként a MAPK kaszkád a Hog1, az útvonal MAP kinázának kettős foszforilációjához vezet a treonin és tirozin oldalláncokon. A foszforilált Hog1 áthelyeződik a sejtmagba, ahol foszforilálja a transzkripció faktorokat és más szabályozó fehérjéket, modulálva a génexpressziót, hogy elősegítse az ozmotikus stressz adaptációt. A foszforilált Hog1 szabályozza az ozmotikus stresszválasz gének expresszióját a megfelelő transzkripció faktorok, például a Hot1 és az MsnA foszforilálásával. A Hot1 transzkripció faktor *S. cerevisiae*ben szabályozza a glicerin-3-foszfát dehidrogenáz géneket, amelyek a glicerinszintézisben vesznek részt az ozmotikus stressz válasz részeként. Az MsnA transzkripció faktor pedig *A. nidulans*ban szabályozza az ozmotikus stressz válasz géneket, például a glicerin-3-foszfát dehidrogenáz és az iontranszporter géneket, amelyek elősegítik az ozmolitok szintézisét és az ionok egyensúlyának fenntartását. Ezek a transzkripció faktorok specifikus DNS-szekvenciákhoz kötődnek a célgének promótereiben, ezáltal aktiválva vagy elnyomva azok expresszióját az ozmotikus stressz hatására. A HOG útvonal koordinálja az ozmotikus adaptációban részt vevő különböző sejtfolyamatokat, beleértve az ozmolitok (pl. glicerin) szintézisét, az iontranszporterek szabályozását és a sejt strukturális elemeinek a védelmét az ozmotikus károsodástól. A HOG útvonal kölcsönhatásba lép más jelátviteli útvonalakkal, beleértve a cAMP/PKA útvonalat és a TOR (rapamycin célpontja) útvonalat, hogy integrálja az ozmotikus stressz jeleket a tápanyag elérhetőségének és az anyagcsere állapotának függvényében (Hagiwara és mtsai. 2016; Lara-Rojas és mtsai. 2011; Mavrianos és mtsai. 2014).

2.5 A glicerín metabolizmus jelentősége

Az *Aspergillus*ok glicerín-anyagcseréje biokémiai útvonalak komplex hálózatát öleli fel, amelyek lehetővé teszik ezen gombáknak a glicerín szénforrásként történő hasznosítását növekedési és energiatermelési folyamataikhoz. Számos tanulmány fényt derített az *Aspergillus* fajokban a glicerín felhasználásának háttérében álló mechanizmusokra. Például Zhang és munkatársai (2018) rávilágítottak a *glcA* gén által kódolt glicerín kináz szerepére a glicerín-katabolizmus kezdeti lépésében. Ez az enzim katalizálja a glicerín foszforilációját, és így glicerín-3-foszfátot állít elő, amely azután beléphet a glikolízisbe vagy a glicerín-foszfát transzfer rendszerbe. Ezen túlmenően azonosították a *gldB* által kódolt glicerín dehidrogenáz szerepét a glicerín dihidroxi-aceton-foszfáttá (DHAP) történő alakulásában (de Vries és mtsai. 2003).

A glicerín termelés több, egymással összefüggő anyagcsere-útvonalat foglal magába. Ezek az útvonalak hozzájárulnak a glicerín szintéziséhez különböző szénforrásokból, beleértve a glükózt, és kulcsfontosságúak mind a sejtmetabolizmus, mind az ozmoadaptáció szempontjából.

A glikolitikus útvonal elsődleges útvonalként szolgál a glicerín prekursorok előállításához *Aspergillus*okban. A glükóz glikolízis útján metabolizálódik, így dihidroxi-aceton-foszfát (DHAP) keletkezik, amely a glicerinszintézis fontos köztterméke. A DHAP a glicerinszintézis prekursora a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz (G3PDH) számára, ugyanis ez az enzim katalizálja a DHAP alakulását glicerín-3-foszfáttá, amely tovább alakul glicerinné (Brown és mtsai. 2015).

A pentóz-foszfát útvonal közvetve támogatja a glicerín szintézist a szükséges kofaktorok biztosításával. A NADPH szükséges ahhoz, hogy a DHAP G3PDH-val glicerín-3-foszfáttá alakuljon. *A. nidulans*ban a NADPH kofaktor biztosítása kiemelten fontos a glicerín termelésben ozmotikus stressz körülmények között (Hagiwara és mtsai. 2015).

Ozmotikus stressz hatására az *Aspergillus*ok a HOG jelátviteli útvonalat aktiválják, hogy szabályozzák a glicerintermelést. A HOG útvonal irányítja a glicerín szintézisben részt vevő gének transzkripciók aktiválását az ozmotikus stressz hatására. Az olyan mitogén aktivált protein kinázok, mint az SskA és a SakA, szabályozzák a glicerinszintézis gének expresszióját, beleértve a *gfdA*t és a *gfdB*t (Furukawa és mtsai. 2007).

3. Anyagok és módszerek

3.1 A stresszkísérletekhez felhasznált törzsek és tenyésztési körülmények

1. táblázat A kísérletekhez felhasznált törzsek.

Törzsnév	Genotípus	Referencia
<i>A. nidulans</i> THS30.3	<i>pyrG89, AfupyrG⁺; pyroA⁺; veA⁺</i> ; prototróf kontrol	(Park és mtsai. 2015)
<i>A. nidulans</i> Δ <i>gfdB</i>	<i>pyrG89; ΔgfdB::AfupyrG⁺; pyroA⁺; veA⁺</i>	(Király és mtsai. 2020a)
<i>A. glaucus</i> CBS516.65	vad típus	(de Vries és mtsai. 2017)
<i>A. glaucus</i> CBS516.65 'c <i>gfdB1-2</i>	<i>An-gfdB</i> szupplementált	(Király és mtsai. 2020b)
<i>A. wentii</i> CBS141173	vad típus	(de Vries és mtsai. 2017)
<i>A. wentii</i> CBS141173 'c <i>gfdB1-3</i>	<i>An-gfdB</i> szupplementált	(Bodnár és mtsai. 2023)

3.1.1 A vizsgálatokhoz használt transzgén törzsek előállítása

A higromicin B rezisztencia gént tartalmazó pAN7.1 plazmid (Punt és mtsai. 1987; teljes szekvencia elérhető az alábbi linken: <https://www.addgene.org/168129/>) alapú transzformáció során bejuttatásra került az *A. nidulans* *gfdB* gén (lókusz ID: AN6792) saját natív promóterével és terminátor szekvenciájával (**Melléklet 1. táblázat**), *XbaI-HindIII* klónozási hellyel az *A. wentii* protoplasztokba. A protoplasztokat exponenciális növekedési fázisú (13-14 órás) sülyesztett kultúrárs *A. wentii* tenyészetekből állítottuk elő komplex táptalajon (2% glükózt tartalmazó NMM, 0,5% élesztőkivonattal és 1% peptonnal kiegészítve), a *Trichoderma harzianum* lizáló enzim felhasználásával (Sigma, St Louis, MO, USA), a polietilén-glikol (PEG) alapú transzformációs módszerrel, Szewczyk és mtsai. (2006) alapján. Transzformációnként 10^6 - 10^7 protoplasztot használtunk 100 μ l-es szuszpenzióban és 5-8 μ g pAN7.1 plazmidot 10 μ l-es alikvotokban. A transzformánsokat egyetlen konídiumból növesztettük, 100 μ g mL⁻¹ higromicint tartalmazó NMM tápközegen, 25 °C-on történő 3-5 napos inkubáció után. A genomális DNS izolálásához a transzformánsokat rotációs

rázógépben inkubáltuk egy éjszakán át 25 °C-on, 220 fordulat/perc sebességgel 100 µg mL⁻¹ higromicint tartalmazó NMM-ben. A genomi DNS-t centrifugálással gyűjtött micéliumból izoláltuk (Szabó és mtsai. 2020a). A *gfdB* gén sikeres beépülésének bizonyítására genomiális DNS izolálást követően Emerald PCR reakciókat (EmeraldAmp MAX PCR Master Mix, Takara Bio, San Jose, CA, USA) hajtottunk végre az AN6792 *Xba*I FW és AN6792 *Hind*III REV primerekkel (**Melléklet 1. táblázat**).

3.1.2 Az *Aspergillus* törzsek tenyésztése

A vizsgálatban használt törzsek listája az **1. táblázatban** található. Az *A. wentii* és *A. glaucus* konídiumokat malátakivonat agaron (MEA) (1,5 % agar, 25 °C sötétben, 6 nap) állítottuk elő, *A. glaucus* esetében 1,0 M NaCl kiegészítéssel (de Vries és mtsai. 2017; Emri és mtsai. 2018; Orosz és mtsai. 2018). Az *A. nidulans* törzseket Barratt nitrát minimál táptalajon (NMM) spóráztattuk standard körülmények között (1,5% agar, 25 °C sötétben, 6 nap; (Barratt és mtsai. 1965). A konidiospórákat 9 g L⁻¹ NaCl-t és 100 µL L⁻¹ TWEEN-80-at tartalmazó steril vízbe szuszpendáltuk, két réteg Miracloth-on (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA) átszűrtük, majd hemocitóméterrel meghatároztuk a spóraszámot. Valamennyi törzset NMM tápagar lemezekon tenyésztettünk a megadott tenyésztési körülményekkel és 50%-os glicerinben elkészített konidiospóra szuszpenziós törzsolatokban tároltuk -75 C°-on (Szabó és mtsai. 2020a,b).

3.1.3 Alkalmazott tápközegek

A minimál táptalaj összetétele:

20 g/l agar

10 g/l glükóz

5 v/v % 20x NSS oldat

0,1 v/v % nyomelem oldat

pH 6,5

A malátás táptalaj összetétele:

30 g/l maláta kivonat

15 g/l agar

5 g/l mikológiai pepton

pH 6,0

A 20x NSS (nitrátos sóoldat „nitrate salt solution”) oldat összetétele:

6 g/l NaNO₃

1,5 g/l KH₂PO₄

0,5 g/l MgSO₄·4H₂O 0,5 g/l KCl

A spóramosó folyadék összetétele:

9 g/l NaCl

100 µl/l Tween 80

A nyomelem oldat összetétele:

50 g/l EDTA

22 g/l ZnSO₄·7H₂O

11 g/l H₃BO₃

5 g/l MnCl₂·4H₂O

5 g/l FeSO₄·7H₂O

1,6 g/l CoSO₄·5H₂O

1,6 g/l CuSO₄·5H₂O

1,1 g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O

3.2 Az *Aspergillus* törzsek genotípus ellenőrzése

3.2.1 A *gfdB* gén kópiaszámának ellenőrzése qPCR módszerrel

A qPCR reakcióhoz a Fast SYBR® Green master mixet (Applied Biosystems by Life Technologies, Waltham, MA, USA) használtuk. A *gfdB* gén kópiaszámának meghatározásához hígítási sorozatot (320 ng, 160 ng, 80 ng, 40 ng, 20 ng, 10 ng DNS 7 µl térfogatonként) készítettünk az *A. wentii* transzgenikus törzsek ismert koncentrációjú genomiális DNS-éből. Referencia génként az egy kópiás *A. nidulans* γ-glutamilsztein-szintetáz (lókusz azonosító: AN3150) ortológot kódoló *Aspwe1_39921* gént használtuk *A. wentii* esetében. A qPCR reakciókat 96 lyukú lemezekben hajtottuk végre, és a reakcióelegyek 7 µl adott koncentrációjú genomiális DNS-t, 10 µl Fast SYBR® Green master mixet, 0,4 µl forward primert, 0,4 µl reverse primert és 2,2 µl nukleázmentes vizet tartalmaztak. Három párhuzamos mérést végeztünk minden egyes primerpárral minden genomi DNS-koncentrációnál LightCycler®480 készüléken (Roche, Basel, Svájc), a primerpárok teljes listája elérhető a **Melléklet 1. táblázatában**. A PCR ciklusokat a következő protokoll szerint végeztük: 1. 95 °C 2 perc; 40×

ciklusszám: 95 °C 5 s, 51 °C 10 s, 65 °C 20 s; 95 °C 15 s, 51 °C 15 s, 95 °C folyamatos ciklus, 37 °C 1 s (Szabó és mtsai. 2020a). Az *A. wentii* genomjába beépült *gfdB* gén kópiaszámát a korábban leírtak szerint számszerűsítettük {(Király és mtsai. 2020a, b; Szabó és mtsai. 2020a, b); egyenlet felhasználásával (Herrera és mtsai. 2009)}.

3.2.2 A *gfdB* gén expresszió analízise qRT-PCR módszerrel

Az RNS izoláláshoz használt micéliumot 3 napos rázatott lombikos tenyészetekből (NMM, 220 rpm, 25 °C) gyűjtöttük. Az RNS-t liofilizált micéliumból izoláltuk TRIzol reagenssel (Chomczynski 1993), és a qRT-PCR méréseket a korábban leírtak szerint (Emri és mtsai. 2015) Xceed SG 1-step 2× Mix Lo-ROX qPCR Kit (Institute of Applied Biotechnologies, Prague, Czech Republic) segítségével végeztük el. A qRT-PCR méréseknél reakciónként 500 ng RNS-t használtunk, és a reakciókat 40 ciklus után leállítottuk a gyártó ajánlása szerint (az alkalmazott primerpárokat a **Melléklet 1. táblázata** foglalja össze). A relatív transzkripció szinteket a $\Delta\Delta C_P$ módszerrel határoztuk meg, ahol $\Delta C_T = C_T$ referenciagén - C_T *gfdB*, a C_T pedig a keresztezési pontoknak megfelelő qRT-PCR ciklusszámokat jelenti. A relatív transzkriptum szinteket az *Aspwe1_38228* (*A. fumigatus* *tefl* ortológ) referencia génnel is vizsgáltuk, mely reakciók szintén hasonló eredményeket adtak (Szabó és mtsai. 2020a).

3.3 Stresszadaptációs vizsgálatok

3.3.1 *A. wentii* CBS141173 és *A. wentii* CBS141173 'c *gfdB* törzsek, illetve az *A. glaucus* CBS516.65 és *A. glaucus* CBS516.65 'c *gfdB* törzsek életképességének vizsgálata

A vizsgált referencia és mutáns törzsek (**1. táblázat**) stresszérzékenységének tanulmányozására és összehasonlítására nagy léptékű stressz agar lemezes vizsgálatokat végeztünk (Balázs és mtsai. 2010). A laboratóriumunkban rutinszerűen használt standard stressz agar lemez protokollokat követve (de Vries és mtsai. 2017, Orosz és mtsai. 2018) 1×10^5 frissen gyűjtött spórát pontoszerűen beoltottunk Barratt-féle NMM agaron, és 25 °C-on inkubáltuk 5 és 10 napig. Az NMM agart szükség szerint különféle stresszkeltő ágensekkel egészítettük ki. Az ozmofil *A. wentii* és *A. glaucus* törzsek esetében hasonló stresszérzékenységi kísérletsorozatot ismételtünk meg, ahol az NMM agart a stresszorok mellett 2 M szorbittal is kiegészítettük. A következő stresszt-kiváltó ágenseket alkalmaztuk a zárójelben jelzett koncentrációkban: sejtfal integritási stressz: kongóvörös (54, 81 és 108 μM); oxidatív stressz: *tert*-butil-hidroperoxid (*t*BOOH; 0,4, 1,6 és 2,4 mM), hidrogén-peroxid (9 és 18 mM), menadion-nátrium-biszulfid (MSB; 0,096, 0,19, 0,38, 0,62 mM), diamid (1,5 mM); nehézfém

stressz: CdCl₂ (0,1, 0,15, 0,2 és 0,5 mM); hiperozmotikus stressz (amennyiben alkalmazható): szorbit (2 M), NaCl (0,5, 1 és 1,5 mM). A stresszkezeléseket követően a törzsek stresszérzékenységét a telepek átmérőjével jellemeztük (Balázs és mtsai. 2010; de Vries és mtsai. 2017; Orosz és mtsai. 2018; Király és mtsai. 2020a,b).

3.3.2 Összehasonlító stressztolerancia vizsgálat klaszter-analízis és multidimenziós skálázás módszerével *Aspergillus* törzsekben

Az *Aspergillus* nemzetségében megfigyelt általános stresszérzékenység elemzése során, az *A. wentii* (CBS141173), *A. wentii* (CBS141173) 'c *gfdB1*, *A. glaucus* (CBS516.65), *A. glaucus* (CBS516.65) 'c *gfdB1*, *A. nidulans* THS30.3 és *A. nidulans* Δ *gfdB* törzsek, jelenlegi és a korábbi vizsgálatokban keletkezett adatait (Király és mtsai. 2020a,b) összehasonlítottuk más *Aspergillus* fajokkal, mely adatai elérhetőek a Fungal Stress Database-ben (FSD; <https://www.fung-stress.org/>; de Vries és mtsai. 2017; Orosz és mtsai. 2018; Emri és mtsai. 2018). A vizsgálatban felhasznált további 15 *Aspergillus* faj stresszérzékenységi adatai elérhetőek a FSD adatbázisban: *A. aculeatus* (CBS 172.66), *A. brasiliensis* (CBS 101740), *A. carbonarius* (CBS 141172 = DTO) 115-B6), *A. clavatus* (CBS 513.65 = NRRL1), *A. fischeri* (CBS 544.65), *A. flavus* (CBS 128202 = NRRL 3357), *A. fumigatus* (CBS 126847 = Af293), *A. luchuensis* (CBS 106.47), *A. niger* (CBS 113.46 és N402), *A. oryzae* (Rib40), *A. sydowii* (CBS 593.65), *A. terreus* (NIH2624), *A. tubingensis* (CBS 134.48) és *A. versicolor* (CBS 795.97).

A MIC₅₀ érték, (Emri és mtsai. 2018, alapján) a stressz-indukáló ágens azon legkisebb koncentrációja mely 50%-kal csökkent a telepátmérő növekedést, meghatározásra került H₂O₂, MSB, CdCl₂ stressznek kitett tenyészeteken 25 °C-on történő 5 és 10 napos inkubációt követően. A NaCl, a kongóvörös és a szorbit esetében az 1,0 M, 108 µM, illetve 2,0 M koncentrációnál mért relatív növekedési értékeket (a stresszmentes kontroll tenyészetekben mért %-ban) vettük figyelembe a klaszteranalíziseknél, amelyet az R 4.2.0-s verziójú szoftverével végeztünk. A standardizált értékek elérhetőek a **Melléklet 2. táblázatában**. Az R Project (www.R-project.org/) „dist”, „hclust” és „cmdscale” függvényeit használtuk a törzsek közötti Euklideszi távolságok meghatározására, valamint a kladogram és az MDS diagram létrehozására (R Core Team 2022). Az **1. táblázatban** feltüntetett törzsek stresszérzékenységére vonatkozó különbségek és hasonlóságok, a különböző stressz körülmények között mért átlagos telepátmérő értékek alapján kerültek ábrázolásra az MDS diagramon. A következő stresszorok jelenlétében mért telepátmérőket vettük figyelembe:

54 μ M kongóvörös, 2 M szorbit, 0,096 mM MSB, 0,4 mM *t*BOOH, 9 mM H₂O₂, 1 M NaCl, 0,5 mM CdCl₂ a törzsek összehasonlítása során. Az erősen ozmofil *A. glaucus* esetében minden NMM stressz agar lemezt 2 M szorbittal egészítettünk ki.

3.4 Transzkripció vizsgálatok

3.4.1 A transzkripció vizsgálatokhoz használt törzsek és tenyésztési körülmények

A transzkripció vizsgálatához a **2. táblázatban** felsorolt *A. nidulans* és *A. wentii* törzseket használtuk. Minden törzset Barratt minimál agar lemezen tartottunk (Barratt és mtsai. 1965) 25 °C-on. A 6. napon gyűjtött konídiumokat használtuk süllyesztett tenyészetek inokulálására.

2. táblázat A transzkripció vizsgálatokhoz használt törzsek.

Törzs	Genotípus	Referencia
<i>A. nidulans</i> THS30	<i>pyrG89, AfupyrG⁺; pyroA⁺; veA⁺</i>	Park és mtsai. 2015
<i>A. nidulans</i> Δ <i>gfdB</i>	<i>pyrG89; ΔgfdB::AfupyrG⁺; pyroA⁺; veA⁺</i>	Király és mtsai. 2020a
<i>A. wentii</i> CBS141173	Vad-típus	de Vries és mtsai. 2017
<i>A. wentii</i> ' <i>c gfdB</i> CBS141173	<i>An-gfdB</i> komplementált törzs	Bodnár és mtsai. 2023

Az 1×10^8 konídiummal beoltott Barratt-féle minimál levest (100 ml táptalaj 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban) rotációs rázógépből inkubáltuk 25 °C-on, 220 fordulat/perc (kb. 3,7 Hz) mellett. Az *A. nidulans* micéliumot 36 óra (THS30) illetve 38 óra (Δ *gfdB*), míg az *A. wentii* micéliumot 65 óra (mind a CBS141173, mind a '*c gfdB*) tenyésztés után gyűjtöttük be. Az exponenciálisan növekvő fázisú micéliumok hasonló fiziológiai körülmények között történő gyűjtésére az egyes törzsek esetében eltérő inkubációs időket használtunk (Bodnár és mtsai. 2023). Az összegyűjtött micéliumot mostuk, majd 100 ml friss Barratt-féle minimál levesbe vagy 2 M szorbittal, 1 M NaCl-dal és 1 M NaCl + 2 M szorbittal kiegészített Barratt minimál táplevesbe vittük át. A tenyészeteket tovább inkubáltuk 25 °C-on, 220 fordulat/perc sebességgel, melyekből 0,5 óra (RNS-izolálás), vagy 10 óra (DCM-meghatározás) után mintát vettünk.

3.4.2 RT-qPCR vizsgálatok

Az RNS izolálása Chomczynski 1993 ("TRI reagens" módszer) szerint történt liofilizált micéliumból kiindulva. Az RT-qPCR vizsgálatokat a **Melléklet 3. táblázatában** felsorolt primerpárokkal végeztük, Xceed SG 1-step 2× Mix Lo-ROX qPCR Kit (Institute of Applied Biotechnologies, Prága, Cseh Köztársaság) használatával a gyártó protokollja szerint. A relatív transzkripció szinteket a ΔCP (a referencia- és célgén keresztjezi pontja közötti különbség) értékekkel jellemeztük. $\Delta CP = CP^{\text{referencia gén}} - CP^{\text{vizsgált gén}}$, és CP a PCR termék kimutatását jelző fluoreszcencia küszöb eléréséhez szükséges ciklusszám. Az *A. nidulans* minták esetében az AN6542 (*actA*; γ -aktin), az *A. wentii* esetében az *Aspwe1_0167845* (feltételezett transzlációs elongációs faktor EF-3) referenciagént használtuk.

3.4.3 RNS szekvenálás

A teljes RNS-t liofilizált micéliumból (Chomczynski 1993) izoláltuk négy különböző tenyészetből (kezeletlen, 2 M szorbit, 1 M NaCl és 2 M szorbit + 1 M NaCl tenyészetek) minden törzs esetében (*A. nidulans* THS30 és $\Delta gfdB$, *A. wentii* CBS141173 és '*c gfdB*') három biológiai ismétléssel (összesen 48 minta). A kapott readeket (mintánként 12–60 millió read) a hisat2 (2.1.0-s verzió; Kim és mtsai. 2019) szoftver segítségével illesztettük a referencia genomokra (a readek 84-96%-a illesztésre került) és az illesztett readek számának meghatározásához featureCounts (2.0.0-s verzió, Liao és mtsai. 2014) szoftvert használtunk. Az alábbi genom és gff fájlokat használtuk (FungiDB; <https://fungidb.org/fungidb/app>):

https://fungidb.org/common/downloads/release-65/AnidulansFGSCA4/fasta/data/FungiDB-65_AnidulansFGSCA4_Genome.fasta;

https://fungidb.org/common/downloads/release-65/AnidulansFGSCA4/gff/data/FungiDB-65_AnidulansFGSCA4.gff;

https://fungidb.org/common/downloads/release-65/AwentiiDTO134E9/fasta/data/FungiDB-65_AwentiiDTO134E9_Genome.fasta;

https://fungidb.org/common/downloads/release-65/AwentiiDTO134E9/gff/data/FungiDB-65_AwentiiDTO134E9.gff.

A differenciálisan expresszált géneket a DESeq2 (verzió 1.36.0; Love és mtsai. 2014) program segítségével határoztuk meg. Az RPKM értékek kiszámításához az edgeR csomag „rpkm” függvényét (Robinson és mtsai. 2010), a főkomponens-analízis végrehajtásához pedig a „prcomp” függvényt használtuk. A *gfdB* gén esetében (amely nem része az *A. wentii* CBS141173 genomnak) meghatároztuk az *A. nidulans gfdB* génjének FungiDB-ben elérhető szekvenciájára illeszthető readeket (<https://fungidb.org/fungidb/app>) a BBmap szoftver

segítségével (39.03-as verzió; <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>; „perfectmode” beállítás) és az így kapott adatok alapján számoltuk ki az RPKM („reads per kilobase per million mapped reads”) értékeket. Az *A. nidulans* THS30 törzs esetében a BBmap szoftver által generált adatokkal és az edgeR csomag „rpkm” funkciójával számított RPKM értékek közötti különbség (az adatok a GSE255841 címen érhetők el; Gene Expression Omnibus; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) kevesebb, mint 10% volt.

3.4.3 Transzkriptom adatok kiértékelése

A túl- és alulszabályozott géneket olyan differenciáltan expresszálódó génekként határoztuk meg (DEG-ek; korrigált p -érték $< 0,05$), ahol $\log_2FC >$ küszöbérték, illetve $\log_2FC < -1 \times$ küszöbérték volt, küszöbértékként 1-et megadva. Az FC a fold change értéket jelenti, a \log_2FC értékeket pedig a DESeq2 szoftver (1.36.0 verzió) számította ki. A \log_2FC érték kiszámításánál a kezeletlen tenyészetek (amikor az ozmotikus stressz kezelés hatását vizsgáltuk egy törzsre), vagy az *A. nidulans* THS30, illetve az *A. wentii* CBS141173 tenyészetek (amikor a génmanipuláció következményeit vizsgáltuk egy tenyésztési körülmény mellett a megfelelő fajban) transzkriptomját tekintettük referenciának.

A génkészlet-dúsulási elemzéseket a ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) platformon (*A. nidulans*), vagy a FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/app>) platformon (*A. wentii*) végeztük, az alapértelmezett beállításokat alkalmazva. A háromnál kevesebb gént tartalmazó GO és KEGG útvonalakat, illetve a csak egy gént tartalmazó találatokat kihagytuk az elemzésből, és csak azokat a találatokat vettük figyelembe, amelyek korrigált p -értéke (Benjamini-Hochberg korrekció) $< 0,05$ volt. Mivel a génkészlet-dúsítási elemzések nagymértékben függenek a vizsgált génkészletek méretétől, a vizsgálatokat 0, 1 és 2 küszöbértékkel meghatározott túl- és alulszabályozott gének csoportjaival is elvégeztük.

A transzkriptomok változásának hasonlóságait vagy a \log_2FC értékek közötti Pearson-féle korrelációs együtthatóval jellemeztük, vagy a túl- és alulszabályozott gének Venn-analízisével.

Az *A. nidulansban* az ozmotikus stressz alatt különösen fontosnak tartott (és az ozmotikus stressz által felülszabályozott) géneket az idézett dokumentumokból gyűjtöttük össze (Han és mtsai 2002, Furukawa és mtsai. 2005, Hagiwara és mtsai. 2007, 2009a, 2009b, Lara-Rojas és mtsai. 2011). E géneket „ozmotikus stresszgének”-nek tekintettük, bár természetesen más stresszválaszokhoz is hozzájárulnak. Az ismert, vagy feltételezhetően antioxidáns enzimeket (kataláz, citokróm c-peroxidáz, glutation-diszulfid-oxidoreduktáz, glutation-peroxidáz, glutation-transzferáz, (hem)peroxidáz, peroxiredoxin, szuperoxid-

diszmutáz és tioredukciós-diszulfid reductáz) kódoló géneket a FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/app>) és Pákozdi és mtsai. 2023 közleménye alapján választottuk ki („oxidatív stressz” génnek). A „glicerin metabolizmus” gének Fillinger és mtsai. 2001a, alapján kerültek kigyűjtésre. Ezen gének ortológjait az *A. wentii*-ben a FungiDB-től gyűjtöttük össze (<https://fungidb.org/fungidb/app>). Amikor egynél több *A. wentii* ortológ szerepelt a FungiDB-ben, a „legjobb találatot” a Blastp platformmal határoztuk meg (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). A Fisher-féle tesztet (az R projekt „fisher.test” funkciója; <https://www.r-project.org/>) használtuk ezen gének dúsulásának tanulmányozására a megfelelő génkészletekben.

3.5 Statisztikai módszerek

A stresszkezelések és a génmanipulációk hatása az *A. wentii* CBS141173, az *A. wentii* CBS141173 'c *gfdB1*, 'c *gfdB2* és 'c *gfdB3*, valamint az *A. glaucus* CBS516.65 és *A. glaucus* CBS516.65 'c *gfdB1* és 'c *gfdB2* törzseket kéttényezős varianciaanalízissel (ANOVA), majd Tukey-féle post hoc tesztel elemeztük. Az átlagos telepátmérő értékek közötti különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha a korrigált *p*-érték 0,05-nél kisebb volt (Király és mtsai. 2020a,b).

3.6 Felhasznált anyagok és vegyszerek

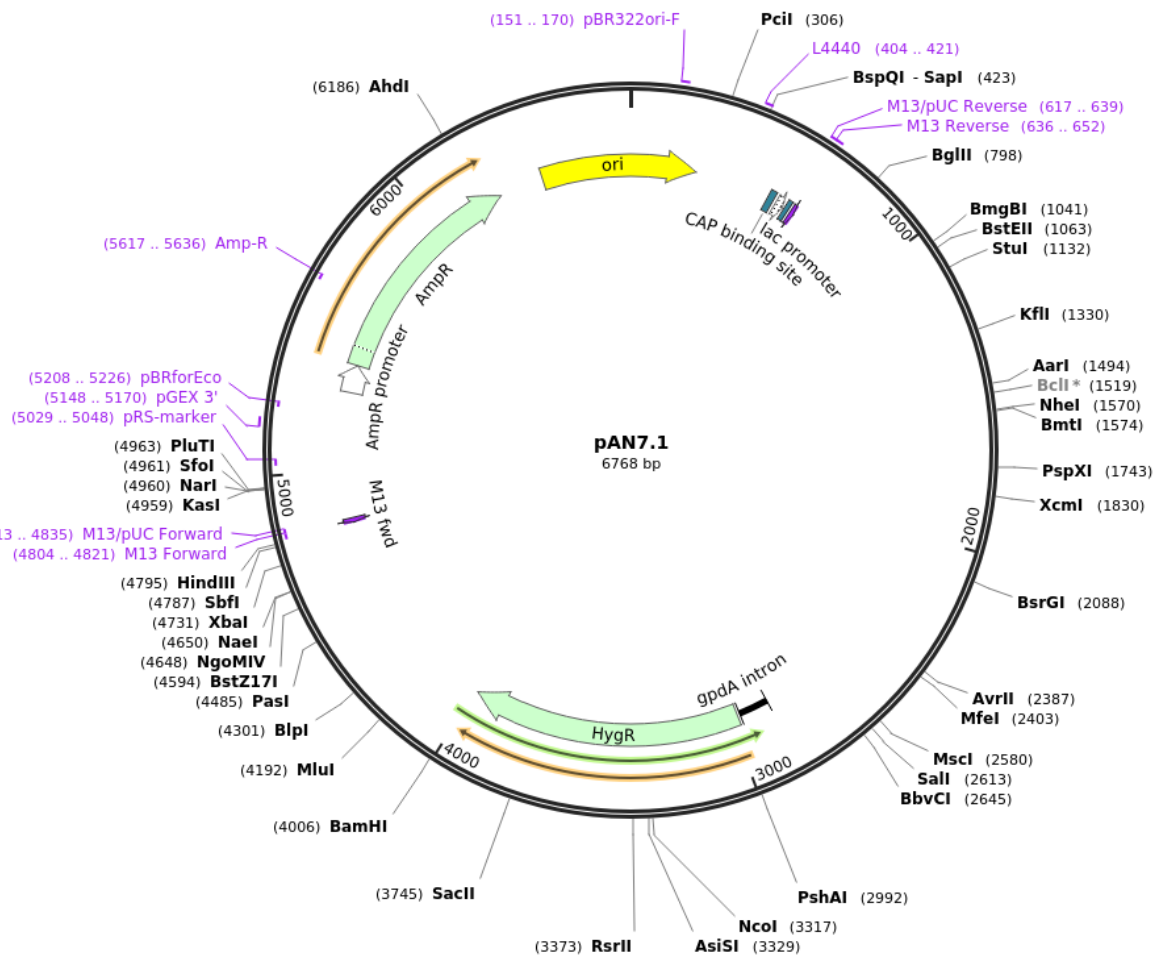
A vizsgálatainkban felhasznált vegyszerek, – amennyiben azt a disszertációban másképpen nem jelöltem – a Sigma-Aldrich Kft. és a WVR Kft. analitikai tisztaságú termékei voltak.

4. Eredmények

4.1 A vizsgált *Aspergillus* törzsek genotípusának ellenőrzése

4.1.1 A *gfdB* gén transzformációjának ellenőrzése *A. wentii* CBS141173 'c *gfdB* törzsekben

Az *A. wentii* CBS141173 'c *gfdB* törzsek előállításához az *A. nidulans* *gfdB* natív promóter- és terminátor szekvenciáját tartalmazó pAN7.1 plazmid került felhasználásra. A *gfdB* gén (lókus ID: AN6792) jelenlétét az AN6792 *Xba*I FW és AN6792 *Hind*III REV primerekkel igazoltuk (Melléklet 1. táblázat). A *gfdB* gén kópiaszám meghatározása qPCR módszerrel történt az *A. wentii* CBS141173 'c *gfdB* törzsekben. A várható genotípusok ellenőrzése után meghatároztuk a beépült *A. nidulans* *gfdB* gén kópiaszámát.



1. ábra A higromicin B rezisztencia gént tartalmazó pAN7.1 plazmid vektortérképe (Punt és mtsai. 1987; a vektortérkép elérhető az alábbi adatbázisban: <https://www.addgene.org/168129/>) Az *A. wentii* protoplasztok transzformálására az *A. nidulans* *gfdB* gén (locus ID: AN6792) natív promóter és terminátor szekvenciákkal került bejuttatásra az *Xba*I-*Hind*III klónozási helyekre.

3. táblázat A *gfdB* gén kópiaszám meghatározása *gfdB*-vel transzformált független *A. wentii* 'c *gfdB* transzformánsokban^a

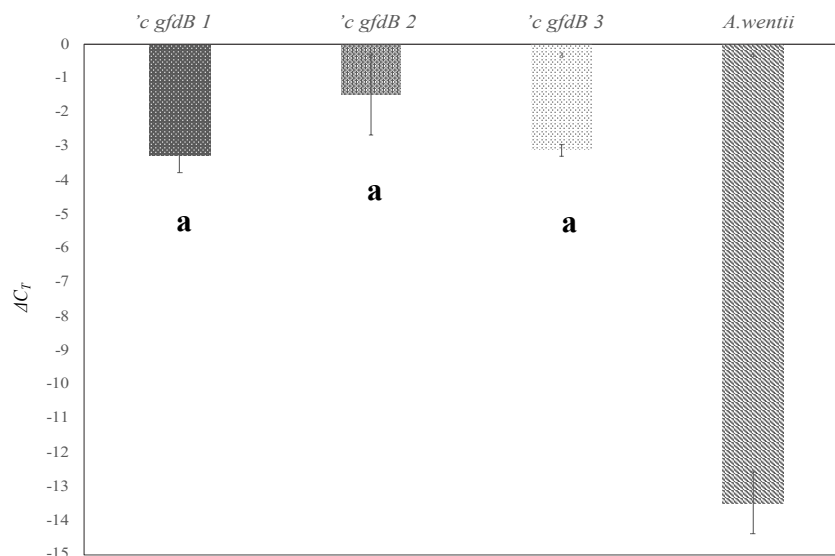
Törzs	<i>gfdB</i> ^b	r ²	<i>Aspwe1_39921</i> ^b	r ²	Kópiaszám
'c <i>gfdB1</i>	y=-4,2037x+23,034	0,98	y = -4,5586x + 28,023	0,99	0,91 ± 0,18
'c <i>gfdB2</i>	y=-4,1217x+23,306	0,98	y = -5,7735x + 30,019	0,98	0,98 ± 0,02
'c <i>gfdB3</i>	y=-4,0371x+22,878	0,98	y = -5,5362x + 30,126	0,99	0,97 ± 0,13

^a Ezekben az analízisekben az *A. nidulans* γ -glutamilsztein szintetáz (*A. nidulans* lókuszt ID: AN3150) gén ortológját kódoló *Aspwe1_39921*-et használtuk egykópiás referencia génként. A beépült *A. nidulans* *gfdB* (lókuszt azonosító: AN6792) gén(ek) genomkénti számát a következő egyenlettel határoztuk meg: *gfdB* genomként = (a *gfdB* összes kópiája)/(az *Aspwe1_39921* összes kópiája).

^b A $C_T = m(\log \text{ mennyiség}) + b$ egyenletet úgy alkalmaztuk, hogy felrajzoltuk a log mennyiség standard görbét a megfelelő C_T érték függvényében, ahol y a C_T érték, m a meredekség, x a log(mennyiség), és b a metszési pont.

4.1.2 A *gfdB* gén expressziójának meghatározása qRT-PCR módszerrel *A. wentii* CBS141173 'c *gfdB* törzsekben

A *gfdB* gén expresszióját *A. wentii*-ben qRT-PCR módszerrel mutattuk ki.



2. ábra A *gfdB* gén relatív transzkripció szintjei az *A. wentii* 'c *gfdB1*, 'c *gfdB2* és 'c *gfdB3* mutánsaiban, valamint a vad típusú törzsből (CBS141173). A micéliumokat nitrát minimál tápközegben 220 fordulat/perc sebességgel, 25 °C-on 3 napig inkubált tenyészetekből gyűjtöttük be. A

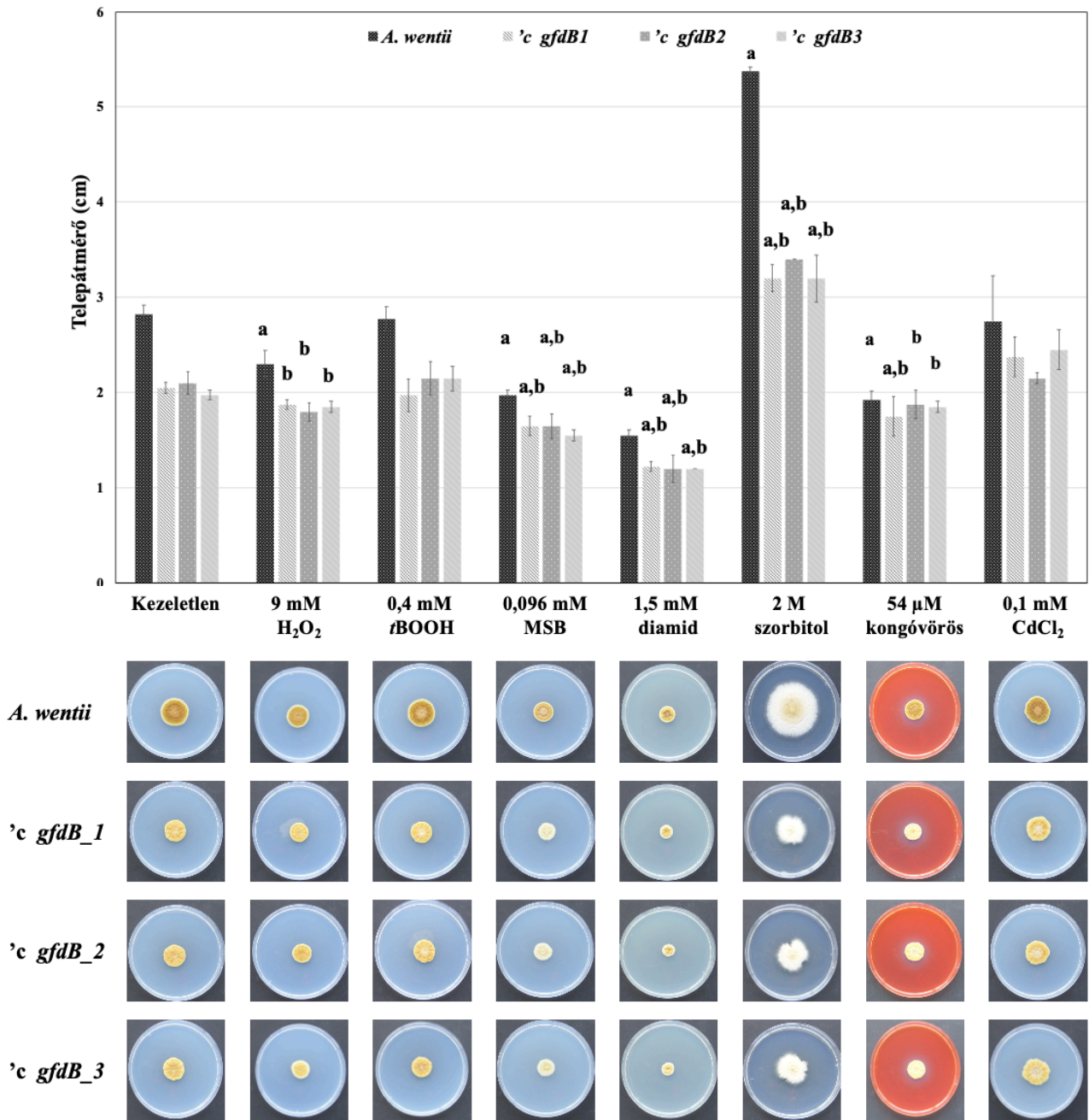
relatív transzkripció szinteket a $\Delta\Delta\text{CP}$ módszerrel határoztuk meg, ahol $\Delta C_T = C_T$ referenciagén $- C_T$ *gfdB*, a C_T pedig a keresztezési pontoknak megfelelő rRT-PCR ciklusszámokat jelöli. Az *Aspwe1_38228* gént (az *A. fumigatus tef1* ortológját) használtuk referencia génként. Az átlag értékeket és a szórást három független kísérletből számítottuk.

^a Szignifikáns különbség a mutáns és a vad típusú törzs között ($p < 0,05$; Student t-teszt). A mutánsok relatív transzkripció értékei nem különböztek szignifikánsan egymástól ($p < 0,05$; Student t-teszt).

4.2 Stresszérzékenység vizsgálatok

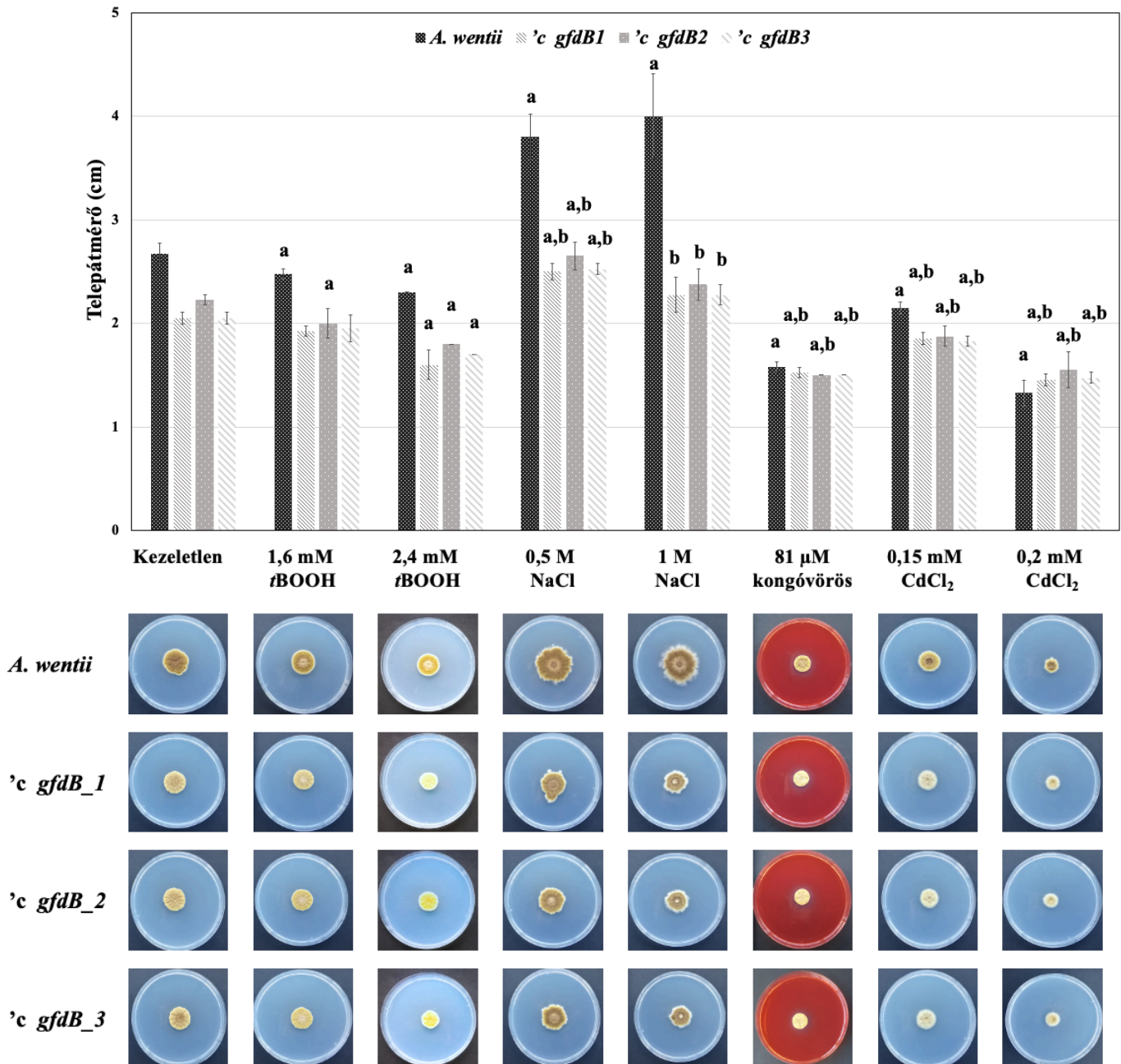
4.2.1 Az *A. wentii* CBS141173 és *A. wentii* CBS141173 '*c gfdB* törzsek fenotípusának jellemzése

Az *A. wentii* '*c gfdB1*', '*c gfdB2*' és '*c gfdB3*' törzsek (független transzformánsok) ozmofiliáját és stresszérzékenységi fenotípusait összehasonlítottuk az *A. wentii* vad típusú törzsével. Figyelemreméltó, hogy az *A. wentii A. nidulans gfdB*-vel való kiegészítése részben komplementálta a vad típusú *A. wentii* ozmofiliáját, amely 2 M szorbitnak vagy 0,5 M vagy 1 M NaCl stresszkezelésnek volt kitéve (**3. és 4. ábra**), míg a nagyobb expozíció, 1,5 M NaCl koncentráció nem eredményezett ozmofiliát a vad típusú törzsben, sőt gátló hatású volt a '*c gfdB*' törzsekre (**5. ábra**). Lassú növekedési fenotípust figyeltünk meg a *gfdB*-vel kiegészített *A. wentii* mutánsok esetében szorbit hiányában, körülbelül 16-30%-kal csökkent a telepátmérők mérete (**3., 4. és 5. ábra**). 2 M szorbit jelenlétében kezeletlen körülmények között, a telepátmérők hozzávetőlegesen 28-35%-kal kisebbek az *A. wentii* '*c gfdB1*', '*c gfdB2*' és '*c gfdB3*' mutáns törzsek esetében, az *A. wentii* vad típusú törzshöz képest (**6. ábra**). Szórványosan kisebb stresszérzékenységi fenotípusokat figyeltünk meg az oxidatív (H_2O_2 , *tBOOH*, MSB, diamid), a sejtfal integritási (kongóvörös) és a nehézfémeknek (Cd^{2+}) kitett *A. wentii* kultúrákban, amelyek jellemzően a '*c gfdB*' törzsekben felerősödtek, a nagy (0,2 mM) koncentrációjú CdCl_2 kezelések kivételével, ahol az *A. nidulans gfdB* pótlása enyhén csökkentette a megfigyelt nehézfém stresszérzékenységet (**3. és 4. ábra**).



3. ábra Az *A. wentii* vad típusú és a *gfdB*-vel kiegészített 'c *gfdB1*, 'c *gfdB2* és 'c *gfdB3* törzsek stresszérzékenységi fenotípusai különböző stressz körülmények között, 10 napos inkubációt követően 25 °C-on NMM stressz agar lemezekon. Mindegyik kísérletben az „a” és „b” betűk szignifikáns különbségeket jeleznek a stresszkezelt és a kezeletlen tenyészetek növekedése között, valamint a genetikai manipulációk és a stresszhatások közötti jelentős kölcsönhatásokat.

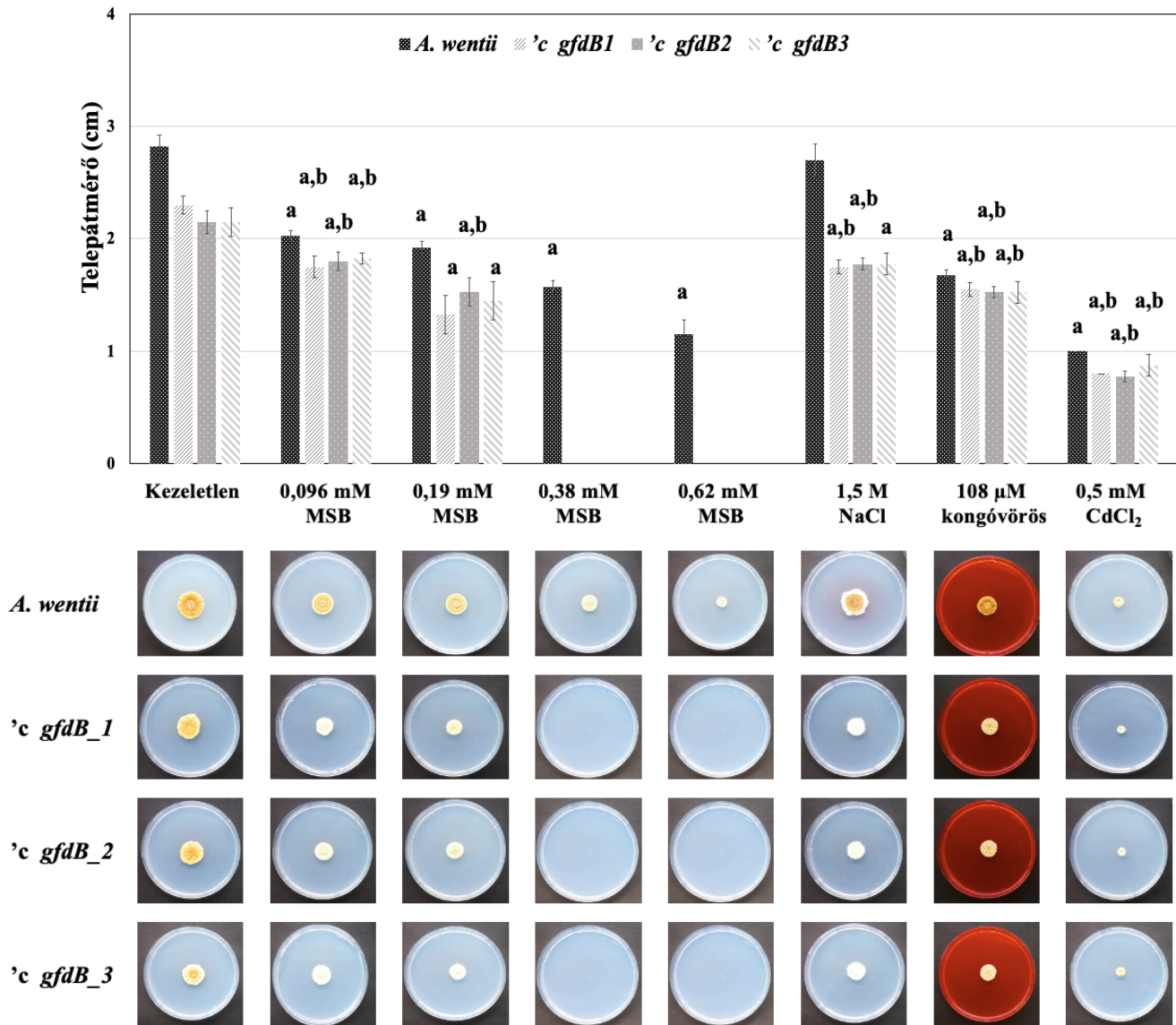
A kombinált ozmolitos kezelések (2 M szorbit 1 M vagy 1,5 M NaCl-dal) hátrányosak voltak az *A. wentii* számára, és az ozmolit keverékek gátló ereje tovább fokozódott a 'c *gfdB* törzsekben (6. ábra). Egyes esetekben 2 M szorbit hozzáadása a táptalajhoz növelte a környezeti stressz súlyosságát, például a 'c *gfdB* törzsek esetében 1,5 mM diamid jelenlétében nem tapasztaltunk növekedést.



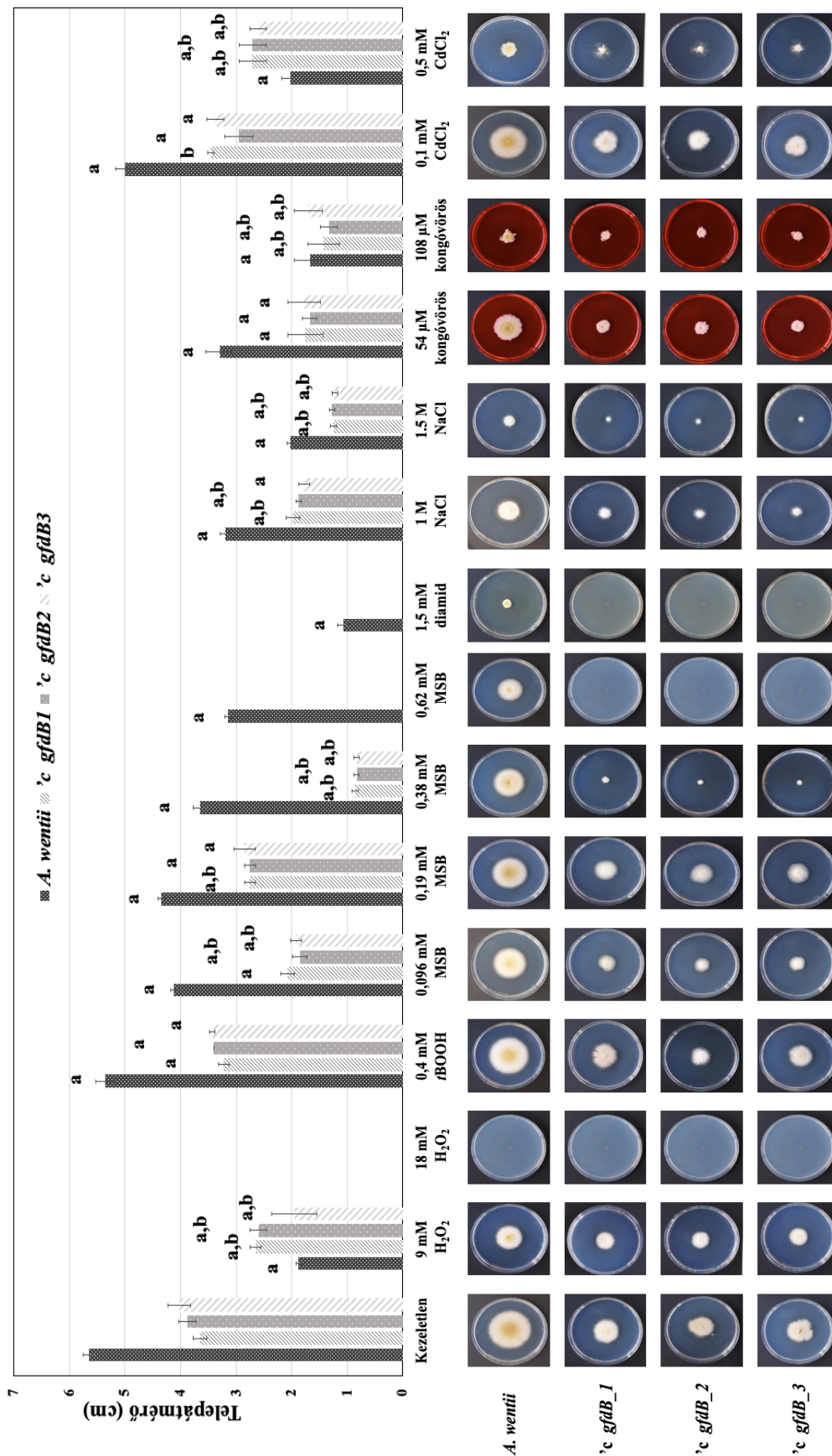
4. ábra Az *A. wentii* vad típusú és a *gfdB*-vel kiegészített 'c *gfdB1*, 'c *gfdB2* és 'c *gfdB3* törzsek változó stressztűrése (10 napos inkubáció, 25 °C, NMM stressz agar lemezek). Az „a” és „b” betűk a stresszkezelt és a kezeletlen tenyészetek növekedése közötti jelentős különbségeket, valamint a genetikai manipulációk és a stresszhatások közötti jelentős kölcsönhatásokat jelölik.

Ezzel szemben a 2 M szorbit elősegítette a '*c gfdB* törzsek növekedését, amikor 0,38 mM MSB-nek voltak kitéve (**6. ábra**), míg ozmolit kiegészítés hiányában elmaradt a növekedés (**5. ábra**). A 2 M szorbit hozzáadása az NMM agarhoz kismértékben növelte az *A. wentii* '*c gfdB* törzsek oxidatív stressztűrő képességét is 9 mM H₂O₂ jelenlétében (**6. ábra**), ami nem volt megfigyelhető NMM stressz agar kísérletek során, szorbit hiánya esetében (**3. ábra**).

A stresszexpozió és az *A. nidulans gfdB*-szupplementáció közötti kölcsönhatásokat kétirányú ANOVA-val, majd Tukey-féle post hoc teszttel is vizsgáltuk. Amint a **3., 4., 5. és 6. ábrán** látható, a stresszexpozió - *gfdB* kölcsönhatások meglehetősen szórványosak voltak, de néhány egyértelmű kölcsönhatás (az ábrák felső részében „b” betűvel jelölt) megfigyelhető volt. Nem volt detektálható kölcsönhatás a 2,4 mM *tBOOH*-kezelés és a *gfdB* kiegészítés között *A. wentii* esetében (**4. ábra**), bár az *A. nidulans gfdB* teljesen helyreállította az *A. glaucus* növekedését 0,4 mM *tBOOH* jelenlétében 2 M szorbittal kiegészített stressz agar lemezeken (Király és mtsai. 2020b). A 2 M szorbit hozzáadása nem befolyásolta számottevően a stresszexpozió és a *gfdB* gén közötti kölcsönhatásokat *A. wentii* esetében, például 54 μM kongóvörös kezelés esetében ezen kölcsönhatás elveszett 2 M szorbit jelenlétében (**6. ábra**).



5. ábra *A. wentii* *'c gfdB* törzsek stressz fenotípusai (10 napos inkubációt követően, 25°C-on, NMM stressz agar lemezeken). „a” szignifikáns különbségek a stresszkezelt és a kezeletlen kultúrák növekedése között. „b” jelentős kölcsönhatások a genetikai manipulációk hatásai és a stresszhatások között.



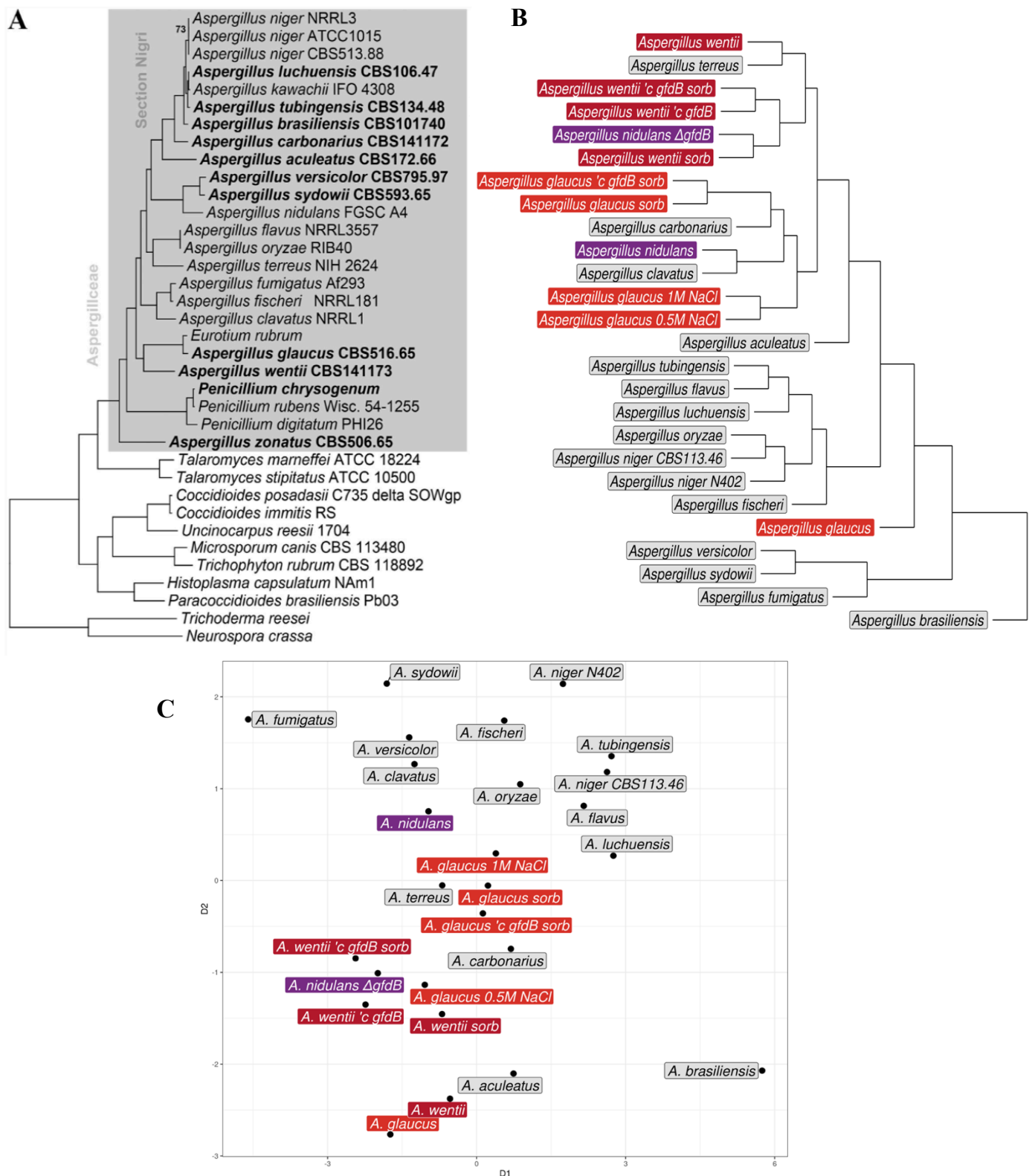
6. ábra Az *A. wentii* 'c gfdB törzsekben detektált változatos fenotípusok NMM stressz agar lemezeken (10 nap, 25°C, 2M szorbit jelenlétében). „a” szignifikáns különbségek a stresszkezelt és a kezeletlen kultúrák növekedése között. „b” jelentős kölcsönhatások a genetikai manipulációk hatásai és a stresszhatások között.

4.2.2 Az *A. wentii* CBS141173 és *A. glaucus* CBS516.65 stressztolerancia alapú összehasonlító elemzése 17 *Aspergillus* törzsszel

Megvizsgáltuk 17 *Aspergillus* faj evolúciós távolságait, stresszérzékenységét (Orosz és mtsai. 2018), a MIC₅₀ értékek (H₂O₂, MSB, CdCl₂), valamint a stresszhatásokra (szorbit, NaCl, kongóvörös) mért telepátmérők alapján, melyeket multidimenzióális skálázással ábrázoltunk (Emri és mtsai. 2018). A dendrogramok készítéséhez klaszteranalízist végeztünk (az *A. niger*-t két törzs képviselte) (7. **ábra**; 5 és 10 napos inkubáció, 25 °C; Emri és mtsai. 2018).

Klaszteranalízist és többdimenziós skálázást végeztünk egy kiterjesztett stressz-adatbázison, hogy nyomon követhessük a két ozmofil *A. glaucus* és *A. wentii* faj stressztolerancián alapuló pozicionálásában bekövetkezett változásokat, amelyeket az ozmolitok és a *gfdB* gén szupplementációja váltott ki. E cél elérése érdekében 0,5 és 1 M NaCl-dal (*A. glaucus*), 2 M szorbittal kiegészített *A. glaucus* és *A. wentii* NMM stressz agar tenyészetekből nyert stresszérzékenységi adatokat (*A. glaucus* és *A. wentii* vad típusú törzsek, *A. glaucus* és *A. wentii* 'c *gfdB* törzsek) (de Vries és mtsai. 2017; Emri és mtsai. 2018; Orosz és mtsai. 2018; Király és mtsai. 2020b), valamint az *A. nidulans* Δ *gfdB* géndeléciós mutánst (Király és mtsai. 2020a) szintén figyelembe vettük mind a dendrogram (7B. **ábra**), mind a többdimenziós léptékű diagram (7C. **ábra**) készítésénél.

Sem a klaszteranalízissel készült dendrogram (7B. **ábra**), sem a vizsgált *Aspergillus* fajok környezeti stressztűrő képessége közötti távolságok többdimenziós analízise (7C. **ábra**) nem különítette el lényegesen az ozmolitnak kitett és a *gfdB* génnel szuplementált *A. glaucus* és *A. wentii* törzseket a vad típusú *A. wentii*, a vad típusú *A. nidulans* és az *A. nidulans* Δ *gfdB* törzsektől (7. **ábra**). Mindazonáltal az *A. wentii* és az *A. nidulans* Δ *gfdB*, amelyekben nem voltak *gfdB* gének, viszonylag közelebb voltak egymáshoz, mint a vad típusú *A. nidulans* törzshöz. Hasonló tendenciák nem figyelhetők meg az *A. glaucus* esetében, amely szigorúan xerofil/ozmofil gomba, amely ozmolit pótlása nélkül alig tud szaporodni (Melléklet 1. **ábra**; de Vries és mtsai. 2017; Orosz és mtsai. 2018; Király és mtsai. 2020b).

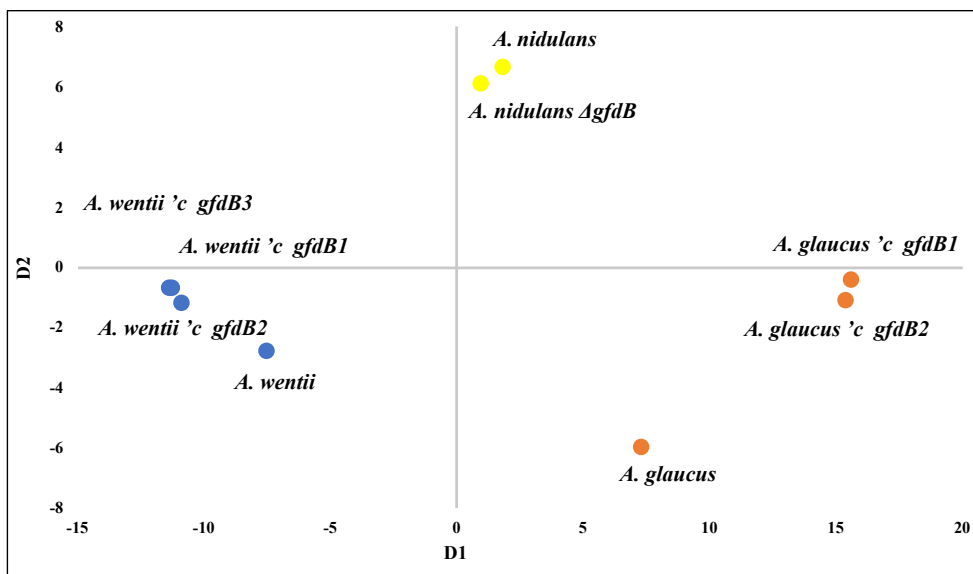


7. ábra A vizsgált *Aspergillus* törzsek filogenetikai pozícióinak és stressztűrő képességének összehasonlítása. **7A.** rész, az *Aspergillus spp.* de Vries és mtsai. 2017, korábbi publikációjából reprodukálva módosításokkal. Az *A. niger ATCC 1015* azonos a *CBS 113.46*-tal. **7B.** rész, a klaszteranalízis dendrogramja, amely az *A. glaucus*, *A. nidulans* és az *A. wentii* törzsekre a jelenlegi és korábbi (Király és mtsai. 2020a,b) vizsgálatokból nyert vagy a Fungal Stress Adatbázisban tárolt stressztűrési adatokon alapul (az összes többi törzs; Orosz és mtsai. 2018; <http://www.fung-stress.org/>). **7C.** rész, a vizsgált *Aspergillus* fajok stressztolerancia variabilitásának többdimenziós léptékű ábrázolása (de Vries és mtsai. 2017; Emri és mtsai. 2018).

Amint a **7B.** és **C.** ábrán látható, minden NMM-en vagy 2 M szorbittal kiegészített NMM agaron növesztett *A. wentii* vad típusú és 'c *gfdB* törzs az *A. terreus* közelében maradt (**7B. ábra**; klaszteranalízis dendrogram) illetve közel az *A. aculeatus*hoz (**7C. ábra**; többdimenziós léptékű ábrázolás). Hasonlóképpen, minden ozmolittal (NaCl, szorbit) kiegészített *A. glaucus* törzs az *A. carbonarius* és az *A. clavatus* közelében maradt (**7B. ábra**; klaszteranalízis dendrogram) vagy az *A. carbonarius* és *A. terreus* közelében (**7C. ábra**).

4.2.3 Az *A. wentii* CBS141173, *A. glaucus* CBS516.65 és *A. nidulans* THS30 stressztolerancia alapú pozícionálása

Az *A. glaucus* és *A. wentii* vad típusú és 'c *gfdB* mutáns törzsek stressztűrő képességét az *A. nidulans* vad típusú és Δ *gfdB* mutáns törzsével is összehasonlítottuk többdimenziós skálázás módszerével. Ebben a kísérletsorozatban a telepátmérőket NMM agar lemezeken mértük, amelyeket kiválasztott stressz-indukáló ágensekkel (54 μ M kongóvörös, 2 M szorbit, 0,96 mM MSB, 0,4 mM *t*BOOH, 9 mM H₂O₂, 1 M NaCl és 0,5 mM CdCl₂) egészítettük ki (**8. ábra**). A **7. ábrán** bemutatott 17 *Aspergillus* faj alapú klaszteranalízis dendrogrammal és többdimenziós léptékű diagrammal ellentétben ez a megközelítés egyértelműen azt jelezte, hogy az *A. wentii* és az *A. glaucus* kiegészítése az *A. nidulans* *gfdB* génjével megnövelte a távolságot e fajok között (**8. ábra**). Ez az eredmény összhangban van azzal a megfigyeléssel, miszerint a *gfdB* beépítése nagymértékben növelte az *A. glaucus* oxidatív stressztűrő képességét anélkül, hogy befolyásolta volna az ozmofiliáját (Király és mtsai. 2020b), míg ugyanezen gén beépítése az *A. wentii* genomba csökkentette az ozmofiliát anélkül, hogy egyértelmű, egyirányú változást adna oxidatív stressztűrés esetében (**3., 4., 5. és 6. ábra**). Érdekes módon ugyanaz a módszer nem mutatott mélyreható különbségeket az *A. nidulans* vad típusú és a Δ *gfdB* törzs stressztűrésében, és mindkét törzs külön maradt, nagy távolságra a vizsgált *A. glaucus* és *A. wentii* törzsektől (**8. ábra**).



8. ábra Az *Aspergillus* vad típusú (*A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. wentii*) és mutáns (*A. nidulans* Δ *gfdB*; *A. glaucus* 'c *gfdB1* és 'c *gfdB2*; *A. wentii* 'c *gfdB1*, 'c *gfdB2* és 'c *gfdB3*) törzseket teszteltük többdimenziós skálázás módszerével. A stresszérzékenységi vizsgálatokat NMM stressz agar lemezeken (10 napos inkubáció, 25 °C) végeztük, és az *A. glaucus* törzsekhez készített táptalajok minden esetben 2 M szorbit kiegészítést tartalmaztak.

4.3 Transzkripciós vizsgálatok

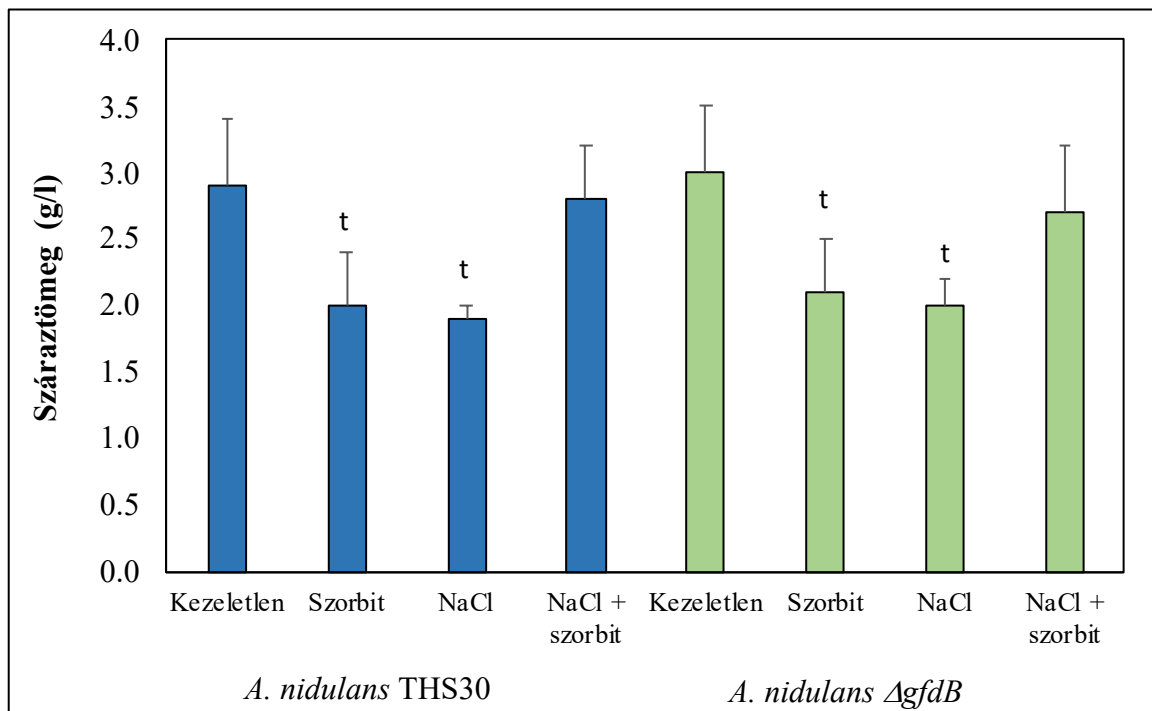
4.3.1 A *gfdB* gén expressziójának összehasonlító hatásvizsgálata *A. nidulans* THS30 és *A. wentii* CBS141173 törzsekben

A szorbit (2 M), NaCl (1 M) és NaCl + szorbit (1 M és 2 M) kezelések hatásának a vizsgálatát a 2. táblázatban feltüntetett tenyészetek tanulmányozásával vizsgáltuk.

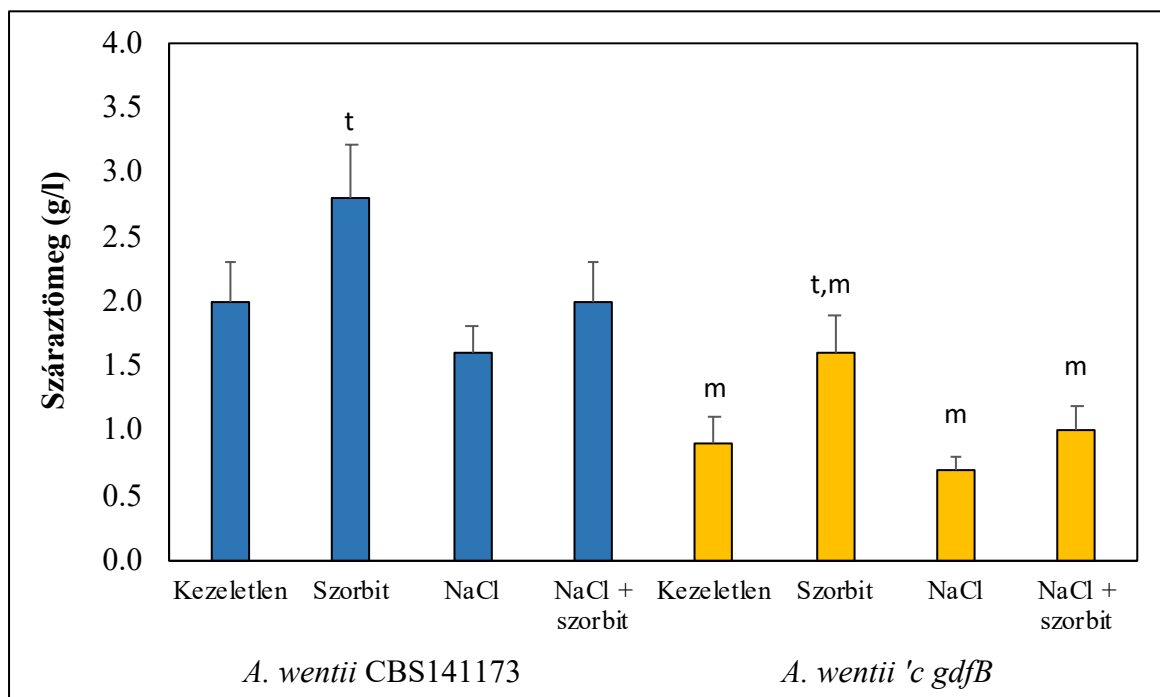
Az RNS szekvenálással kimutatott négy törzs tenyészetében az ozmolitok által kiváltott genom szintű transzkripciós változások jó korrelációt mutattak az RT-qPCR adatokkal (**Melléklet 4. táblázat**). A főkomponens-elemzések alapján (**Melléklet 2. ábra**) a stresszkezelések jelentős hatással vannak a transzkriptomokra, és a három biológiai replikátum mindegyik kezelésben hasonló transzkriptumot mutatott, kivéve a szorbittal kezelt *A. wentii* CBS141173 és a NaCl-al kezelt *A. wentii* 'c *gfdB* kultúrákat, ahol a hasonlóság kisebb volt. Figyelman kívül nem hagyható azonban, hogy az ozmofil *A. wentii* CBS141173 törzs, kezelésekk előtti, hosszú tenyésztési ideje normál ozmolaritás mellett szükségszerűen növelte a csoporton belüli eltérések növekedésének lehetőségét ezekben a kísérletekben.

A szorbit és NaCl stresszkezelések csökkentették az *A. nidulans* THS30 növekedését a süllyesztett kultúrákban (**9. A ábra**), ahogy az agar lemezes kísérletekből várható volt (Bodnár

és mtsai. 2023). A korábbi tanulmányokkal összhangban (Bodnár és mtsai. 2023) a *gfdB* gendeléciónak nem volt jelentős hatása a növekedésre (9. A ábra). A kombinált stresszkezelés (NaCl + szorbit) sem csökkentette szignifikánsan a növekedést (9. A ábra). A *gfdB* gént szignifikánsan indukálta mind a szorbit, mind a NaCl stressz a korábbi tanulmányoknak megfelelően (Furukawa és mtsai. 2007, Balázs és mtsai. 2010), de a kombinált NaCl + szorbit stressz esetében ez nem volt megfigyelhető a THS30 törzsben (10. A ábra). Ezzel szemben a *gfdA* expressziója kevésbé változott a *gfdB* génhez képest, és ezek a változások specifikusak az ozmotikus stressz típusára. A *gfdA* gén transzkripcióját a NaCl kezelés fokozta, a kombinált NaCl+szorbit kezelés csökkentette, és szorbit jelenlétében mindkét törzsben változatlan maradt (10. B ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a Gldb (NADP-függő glicerín-dehidrogenáz), az *A. nidulans* ozmotoleranciájáért felelős kulcsenzim (de Vries és mtsai. 2003) és a GfdA (Fillinger és mtsai. 2001a) mellett, a GfdB is részt vett az ozmotikus stresszválasz kialakulásában, annak ellenére, hogy ennek az enzimnek a szerepe kevésbé volt jelentős (Király és mtsai. 2020a, és 9. ábra) és szabályozottsága, így a stresszválaszban betöltött szerepe is különbözik a GfdA-tól.



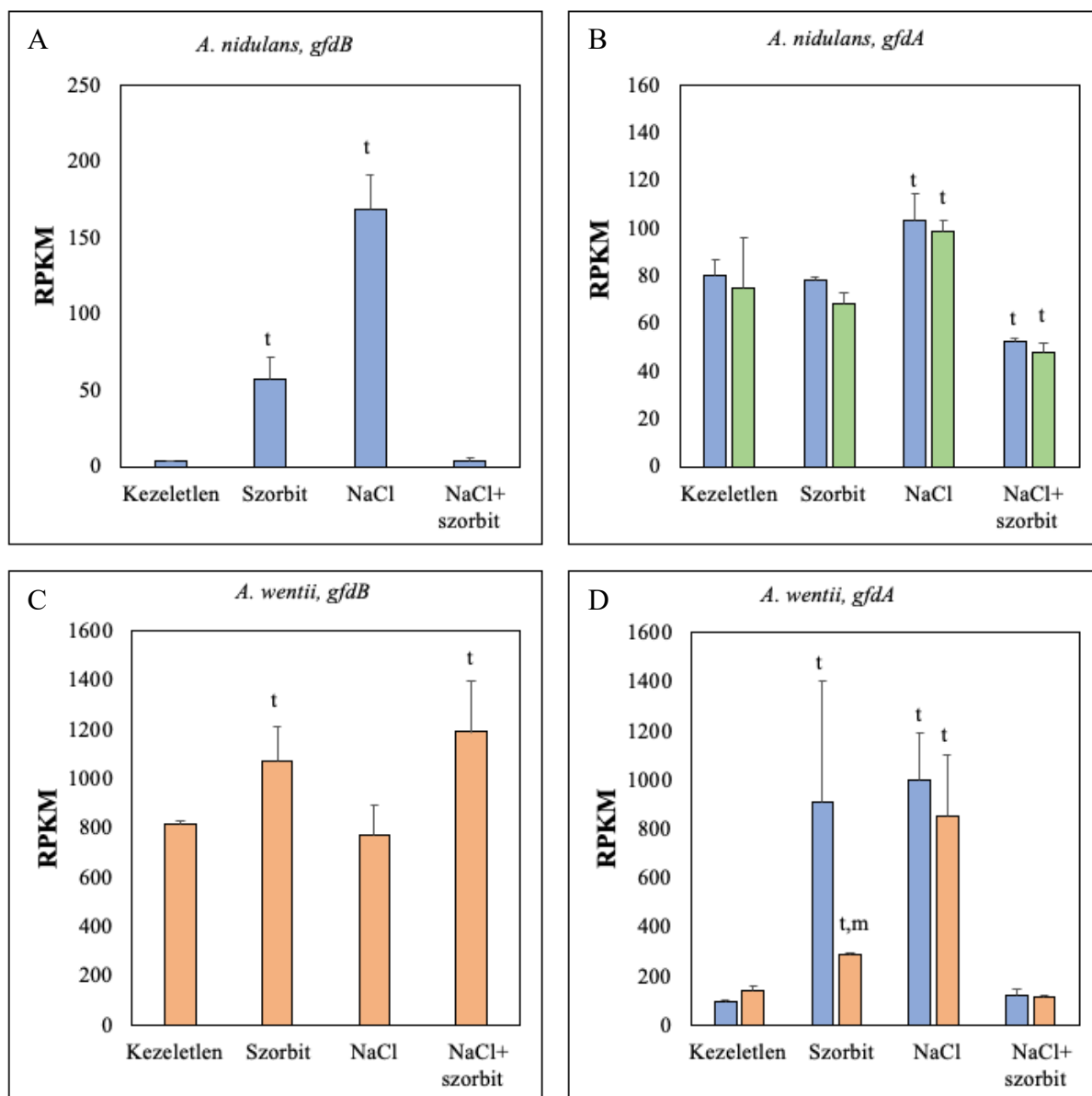
(a)



(b)

9. ábra A stresszkezelések hatása az *A. nidulans* (A) és *A. wentii* (B) tenyészetek növekedésére. Három biológiai ismétlés átlagos \pm SD értékeit mutatjuk be. A „t” betű a kezelés szignifikáns hatását (Student t-teszt, $p < 0,05$) jelöli (a kezeletlenhez viszonyítva), az „m” a mutáció szignifikáns hatását (a referenciatörzs azonos kezeléséhez képest).

Amikor ugyanazokat a stresszkezeléseket alkalmaztuk az *A. wentii* CBS 141173 esetében, növekedése, összhangban ozmofil természetével, vagy megnőtt (szorbiton), vagy nem változott jelentősen (**9B. ábra**). Az *An-gfdB* gén expressziója a gombában nem változtatta meg lényegesen ezt a mintát, de jelentősen csökkentette a növekedést (**9B. ábra**). Az *An-gfdB* gén (saját promóterével) aktívabb volt az *A. wentii* 'c *gfdB* törzsben (**10C. ábra**), mint az *A. nidulans*ban (**10A. ábra**), és más expressziós mintázatot is mutatott: a szorbit és NaCl + szorbit kezelés indukálta, a NaCl kezelés pedig represszálta a gén expresszióját. A *gfdA* gén mindkét *A. wentii* törzsben hasonlóan viselkedett (**10D. ábra**), mint az *A. nidulans* *gfdB* génje (**10A. ábra**): a szorbit és NaCl kezelés igen, de a NaCl+szorbit kezelés nem okozott indukációt, ami arra utal, hogy az *A. wentii* GfdA az *A. nidulans* GfdB funkcionális ortológja lehet az ozmoregulációban. Érdekes módon a *gfdA* expressziója az *A. wentii* 'c *gfdB*-ben elmaradt a CBS141173 törzsétől (**10D. ábra**).

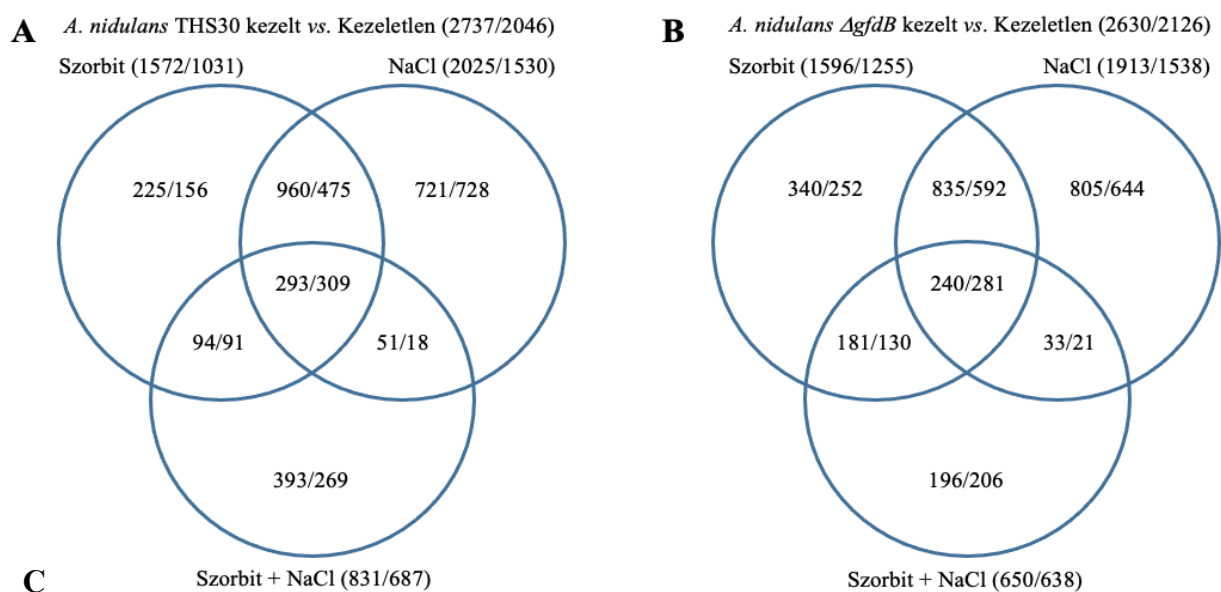


10. ábra Stresszkezelések hatása a *gfdB* (A, C) és *gfdA* (B, D) gének transzkripciójára az *A. nidulans* vad típusú (kék) és mutáns ($\Delta gfdB$, zöld vagy 'c *gfdB*, narancssárga) törzseiben (A, B) és *A. wentii*-ben (C, D). Három biológiai ismétlésből származó RPKM értékek átlagos \pm SD értékeit mutatjuk be. A szignifikáns (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) különbségeket a stresszkezelt és a kezeletlen tenyészetek, illetve a mutáns és a referencia törzsek között „t”, illetve „m” betűkkel jelöljük. A *gfdA* gén esetében az edgeR csomag „rpkm” funkciója alapértelmezett beállításokkal (Robinson és mtsai. 2010), míg a *gfdB* gén esetében a BBmap szoftver (39.03-as verzió; <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) „Perfectmode” beállításokat alkalmaztuk az RPKM értékek kiszámításához.

4.3.2 A *gfdB* gén expresszió hiányának hatása *A. nidulans* törzsben

2737 gén indukálódott és 2046 gén represszálódott legalább egy stresszkezelés során az *A. nidulans* THS30 törzsben (11A. ábra). A szorbit és a NaCl kezelés stresszre reagáló gének

közötti nagy átfedés (11A. ábra), valamint a két kezelés által kiváltott genomszintű transzkripciós változások közötti nagy korrelációs együttható (11C. ábra) azt mutatta, hogy a szorbit és a NaCl stresszválaszok hasonlóak voltak. A kombinált NaCl + szorbit stresszkezelésre adott válasz szintén hasonló volt a másik két stresszválaszhoz (11A. és C. ábra). Ez a kezelés azonban csak kis transzkripciós változásokat okozott a nem kombinált kezelésekhez képest (11A. ábra), ami összhangban van a törzs növekedési profiljával (9A. ábra) és a *gfdB* gén transzkripciós profiljával (10A. ábra).



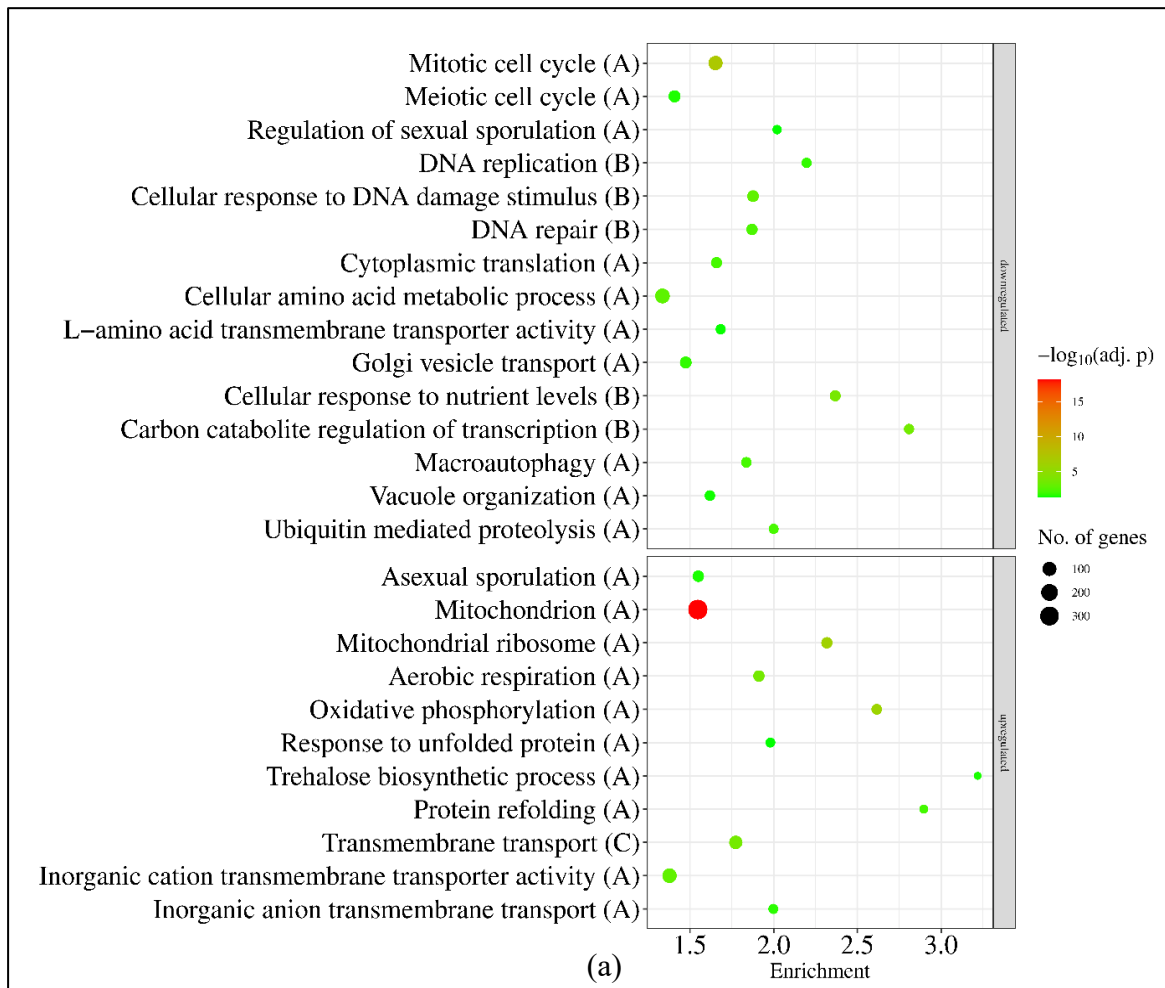
Pearson-féle korrelációs együttható:		Δ vs. Vad típus				Vad típus			Δ		
		Kezeletlen	Szorbit	NaCl	NaCl + Szorbit	Szorbit vs. Kezeletlen	NaCl vs. Kezeletlen	NaCl + szorbit vs. Kezeletlen	Szorbit vs. Kezeletlen	NaCl vs. Kezeletlen	NaCl + szorbit vs. Kezeletlen
Δ vs. Vad típus	Kezeletlen	1.000	0.290	0.290	0.283	0.307	0.270	0.314	-0.023	-0.002	-0.153
	Szorbit		1.000	0.477	0.372	-0.052	0.006	0.198	0.360	0.098	0.257
	NaCl			1.000	0.318	-0.052	-0.160	0.082	0.072	0.163	0.103
	NaCl + Szorbit				1.000	0.039	0.075	-0.198	0.103	0.102	0.268
Vad típus	Szorbit vs. Kezeletlen					1.000	0.829	0.586	0.802	0.727	0.428
	NaCl vs. Kezeletlen						1.000	0.409	0.685	0.872	0.293
	NaCl + szorbit vs. Kezeletlen							1.000	0.531	0.338	0.695
Δ	Szorbit vs. Kezeletlen								1.000	0.768	0.634
	NaCl vs. Kezeletlen									1.000	0.419
	NaCl + szorbit vs. Kezeletlen										1.000

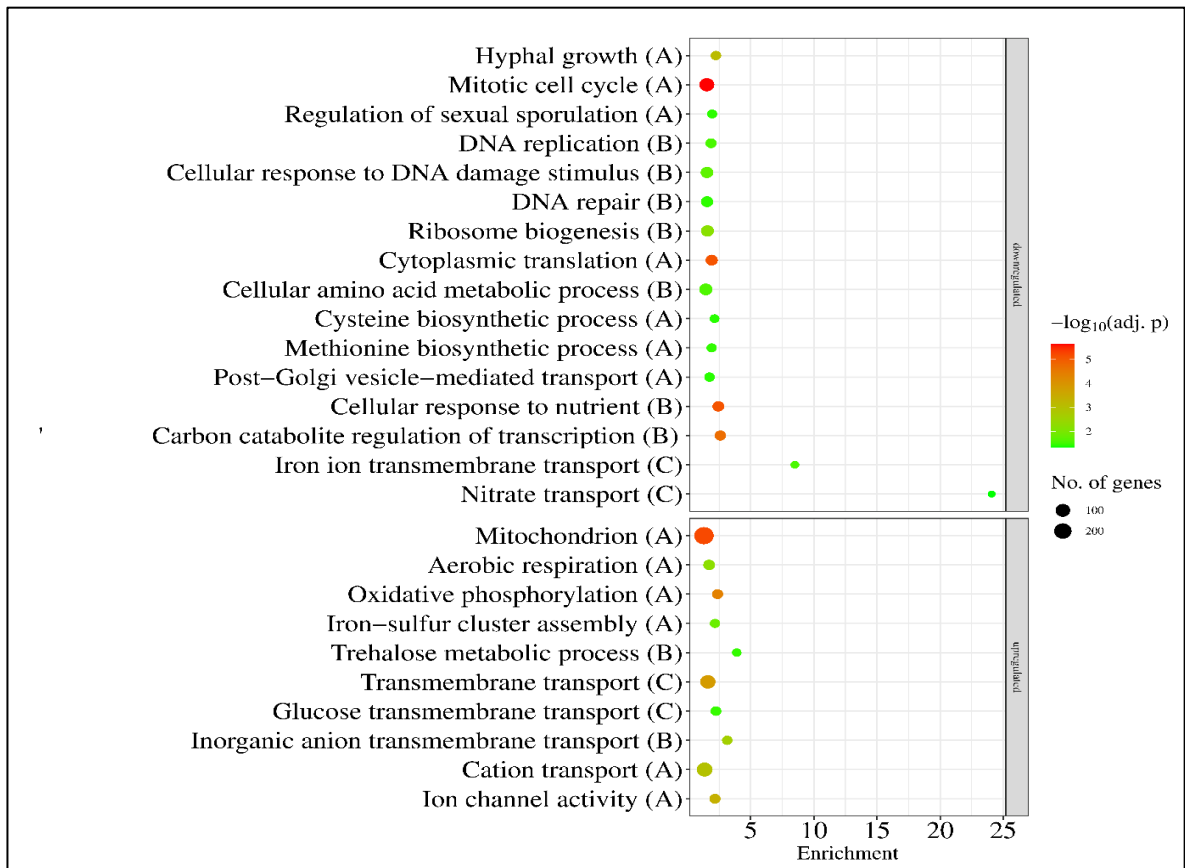
11. ábra A stresszkezelések által okozott genomszintű transzkripciós változások *A. nidulans*ban.

A, B panelek: Venn-analízis a THS30 és a *ΔgfdB* törzsekben az indukálódott és represszálódott génekről ($|\log_2FC| > 1$). C panel: Pearson-féle korrelációs együtthatók a transzkripciós változások \log_2FC értékei között. A THS30 és *ΔgfdB* törzsek rövidítése „Vad típus”, illetve „ Δ ”.

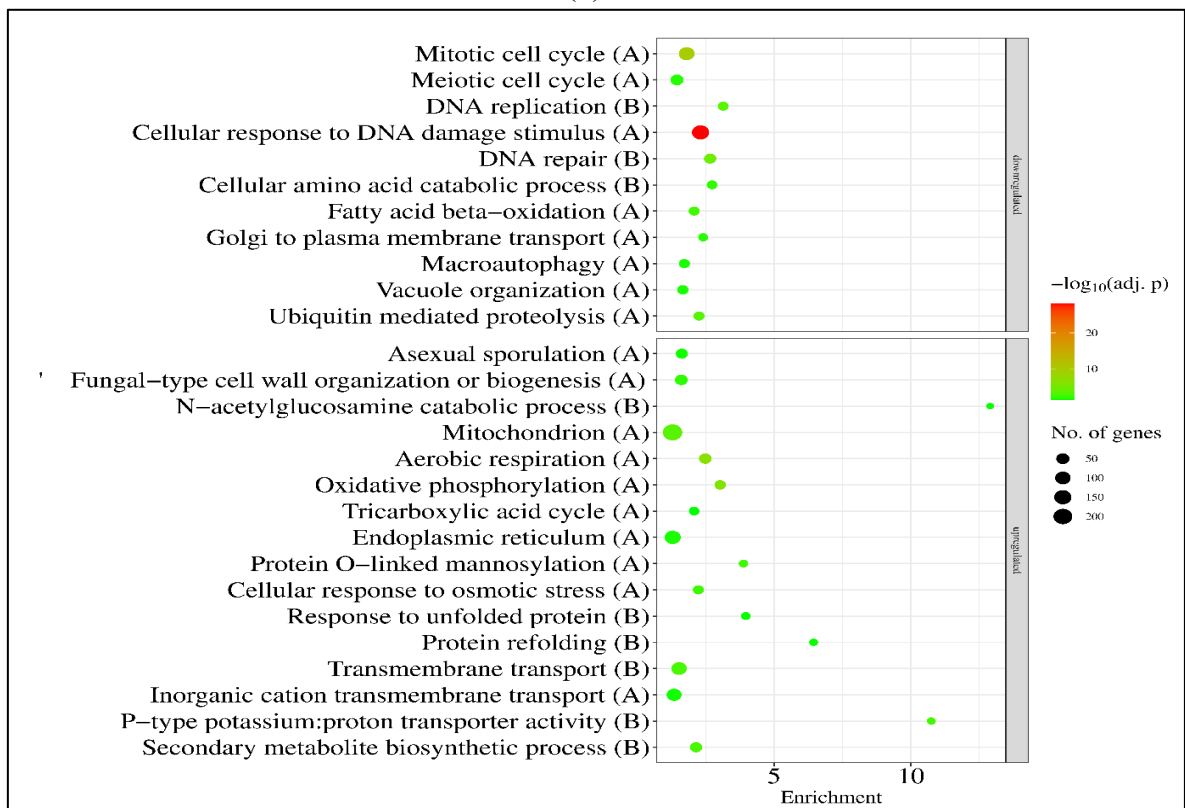
A géncsoport dúsulási vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a három válasz között jelentős átfedés volt (**Melléklet 5. táblázat és 12. ábra**). A mitotikus sejtciklus, a DNS-replikáció és a DNS-javító gének az aminosav-anyagcsere-génekkal együtt feldúsultak a represszáldott génkészletben, míg a mitokondriális funkció génjei (beleértve a légzési és oxidatív foszforilációs géneket) és a különféle transzportfolyamatokban és ionháztartásban résztvevő gének mindegyik kezelés esetében feldúsultak az indukálódott génkészletben (**Melléklet 5. táblázat, 12. ábra**). A szexuális fejlődésben (vagy meiotikus sejtciklusban) résztvevő gének szintén represszáldottak minden kezelés esetében, amit az ivartalan szaporodási gének indukálódása kísért a szorbitos és NaCl + szorbitos kezeléseknél (**Melléklet 5. táblázat és 12. ábra**). A nem kombinált (szorbit és NaCl) kezelések esetén a „bulk” protein transzlációban és szén/glükóz represszióban résztvevő gének szintén feldúsultak a represszáldott génkészletekben, míg az indukálódott génkészletek trehalóz metabolizmus génekkal dúsultak (**Melléklet 5. táblázat, 12. ábra**). Szorbit (szorbit és NaCl + szorbit kezelések) jelenlétében az autofágia és a fehérje degradációs gének, valamint a fehérje „refolding” gének feldúsultak a represszáldott-, illetve az indukálódott génkészletekben (**Melléklet 5. táblázat, és 12. ábra**). A szakirodalom alapján 16 gén került kiválasztásra, amelyek általában ozmotikus stressz alatt indukálódnak (**Melléklet 6. táblázat**; „ozmotikus stressz gének”; Han és mtsai. 2002, Furukawa és mtsai. 2005, Hagiwara és mtsai. 2007, 2009a, 2009b, Miskei és mtsai. 2009, Lara-Rojas és mtsai. 2011). Legtöbbjük szorbit- és NaCl stressz hatására végzett kísérleteinkben indukálódást mutatott (**Melléklet 6. táblázat**). Néhány ilyen gén a kombinált stresszkezelésben is indukálódott, azonban feldúsulásuk nem volt szignifikáns az indukálódott génkészletekben (**Melléklet 6. táblázat**). A legtöbb „glicerin metabolizmus” gén transzkripció aktivitása szignifikánsan megnőtt szorbiton vagy a NaCl-on, beleértve a glicerin transzport, bioszintézis és lebontás génjeit is (**Melléklet 6. táblázat**). Mivel az ozmotikus stressz oxidatív stresszt is okozhat, a *gfdB* deléciója pedig növelte az oxidatív stresszérzékenységet (Király és mtsai. 2020a), az antioxidáns enzim gének transzkripció viselkedését is vizsgáltuk. A szorbit- és NaCl kezelések számos antioxidáns enzim gén transzkripcióját szignifikánsan növelték, ideértve a *sodB*-t (mitokondriális Mn-szuperoxid-dizmutázt kódoló gén; Leiter és mtsai. 2016, Pákozdi és mtsai. 2023), a *catA*-t (konídium-specifikus katalázt kódoló gén; Navarro és mtsai. 1996) és a *ccp1* gént (citokróm c-peroxidázt kódoló gén; Sato és mtsai. 2009), azonban ennek

a génkészletnek a feldúsulása az indukálódott gének között csak NaCl stressz esetén volt jelentős (**Melléklet 6. táblázat**).





(b)



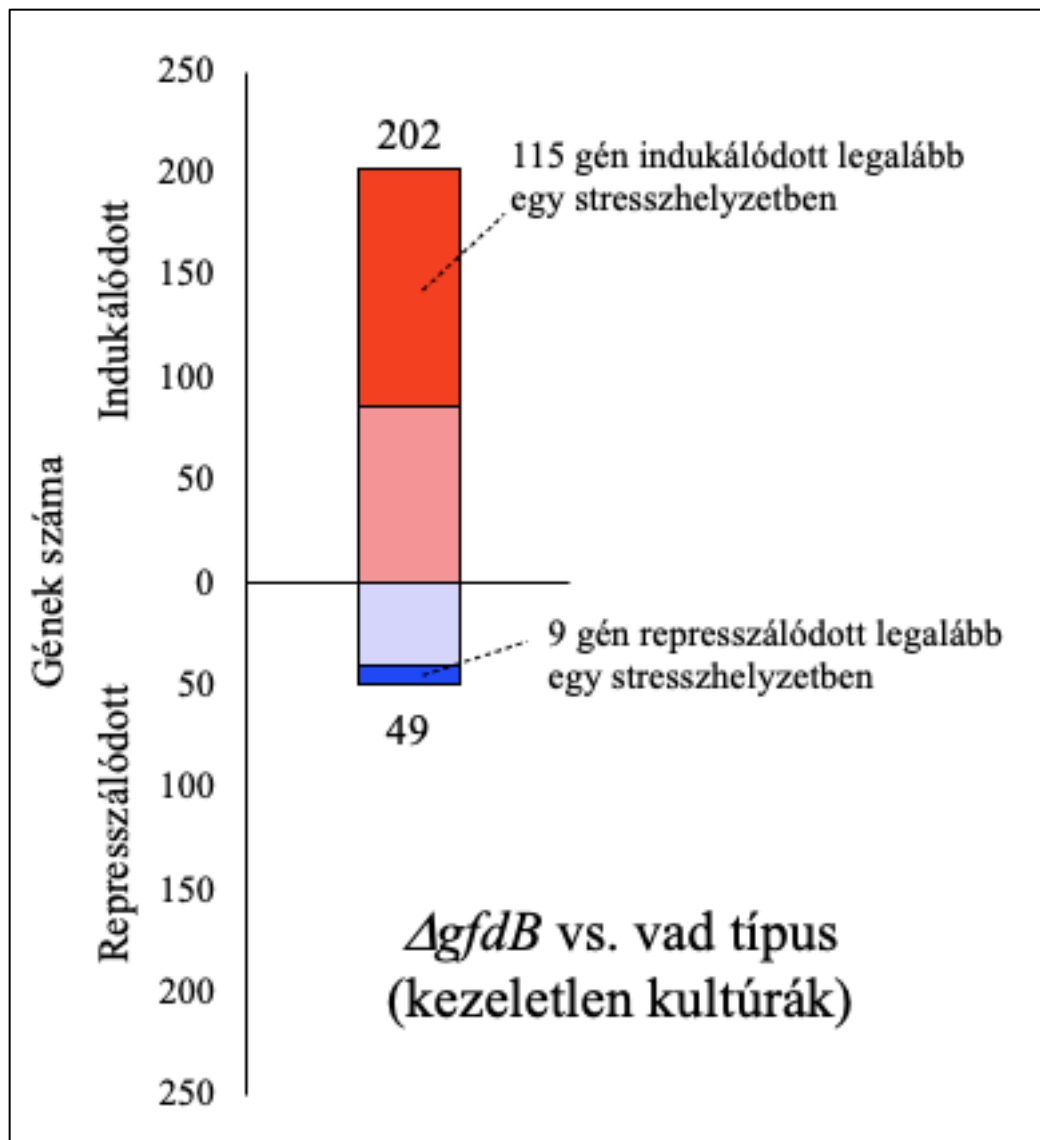
(c)

12. ábra A szorbit (A), NaCl (B) és NaCl + szorbit (C) kezelések *A. nidulans* THS30-ra gyakorolt hatásának génkészlet-dúsulási analízise. A kiválasztott szignifikánsan dúsult (p korrigált $< 0,05$) GO

és KEGG útvonalak kerültek ábrázolásra. A kiegészített kifejezések teljes listája a **Melléklet 5. táblázatában** található. A zárójelben lévő betűk a vizsgált génkészletet jelölik: „A” – minden DEG, „B” – DEG $|\log_2FC| > 1$, „C” – DEG $|\log_2FC|$ -vel > 2 . Ha egy kiválasztott terminus egynél több génkészletben dúsult, csak a legerősebb kritériumokkal rendelkező készlet került bemutatásra.

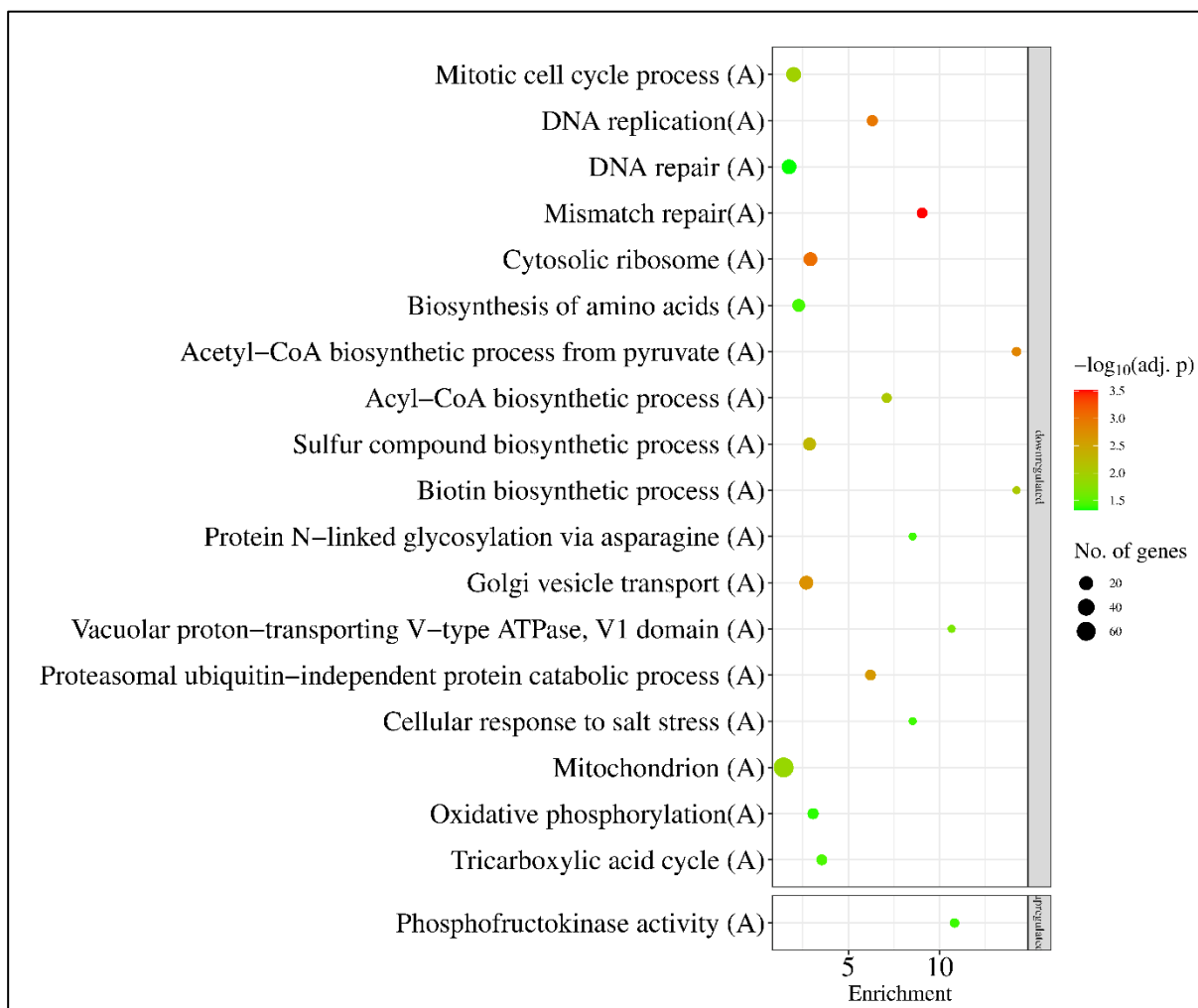
A *gfdB* gén deléciója nem változtatta meg lényegesen a stresszre reagáló gének számát: 2630 gén indukálódott, 2126 pedig represszálódott legalább egy kezelés során (**11B. ábra**). Megoszlásuk a három kezelés között és a három stresszválasz közötti korrelációk hasonló tendenciát mutattak, mint a referencia törzsnél (**11. ábra**). A Δ *gfdB* mutáns és a referencia törzs transzkriptumainak közvetlen összehasonlítása csak kis eltéréseket mutatott (**13. ábra**). Ezenkívül a két törzs stresszérzékeny génkészletei közötti átfedés is nagy volt (a stresszre reagáló gének több mint vagy közel 50%-a) minden kezelés esetében (**Melléklet 3. ábra**). Ennek megfelelően a Δ *gfdB* géndeléciós mutáns stresszválaszai hasonlóak voltak a referencia törzséhez. A géncsoport dúsulási elemzések eredményei azt is mutatják, hogy a mutáns három stresszválaszában hasonló biológiai funkciók indukálódtak, mint a referenciatörzs esetében (**Melléklet 4. ábra, Melléklet 5. és 6. táblázat**).

A *gfdB* gén deléciója 202 gén indukálódását és 49 gén represszálódását eredményezte kezeletlen körülmények között a géndeléciós mutánsban a referencia törzshöz képest (**13. ábra, Melléklet 7. táblázat**). Azok a gének, amelyek a THS30 referencia törzsben legalább egy stresszkezelésben indukálódást mutattak, szignifikánsan feldúsultak az indukálódott génkészletben (115 gén a 202 génből) (**Melléklet 7. táblázat**). A *gfdB* géndeléciós mutáns és a referencia törzs között talált, genomra kiterjedő transzkripció különbségek szintén pozitív korrelációt mutattak a referencia törzs stresszkezelés által kiváltott transzkripció változásaival (**11C. ábra**). A géncsoport dúsulási vizsgálatok bizonyos hasonlóságokat tártak fel a *gfdB* géndeléció és a stresszkezelések transzkripció következményei között: A stresszkezelésekhez hasonlóan a *gfdB* gén deléciója represszálta a mitotikus sejtciklust, a replikációt, a translációt, valamint a „repair” és fehérje degradációs géneket (**Melléklet 5. táblázat, Melléklet 4. ábra**). A stresszkezelésekkel ellentétben azonban a mitokondriális folyamatokhoz kapcsolódó géneket is represszálta, mint például az oxidatív foszforilációt és a trikarbonsav-ciklust szabályozó gének (**Melléklet 5. táblázat, Melléklet 4. ábra**), valamint jelentős változásokat okozott az „ozmotikus stressz”, „glicerin-anyagcsere” transzkripciójában, azonban az „oxidatív stressz” géneket érintő változások nem voltak megfigyelhetőek (**Melléklet 6. táblázat**).



(a)

13. ábra Folytatás



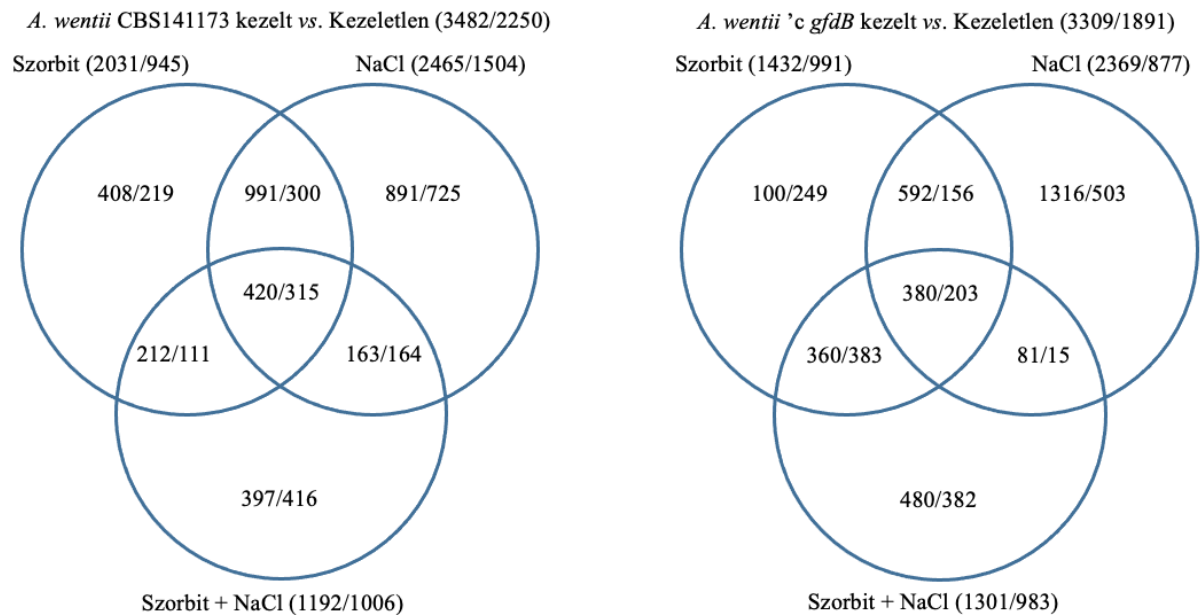
(b)

13. ábra Az *A. nidulans* THS30 és $\Delta gfdB$ törzsek transzkriptomjainak közvetlen összehasonlítása kezeletlen körülmények között. Az indukálódott (piros) és represszálódott (kék) gének ($|\log_2FC| > 1$) számát a $\Delta gfdB$ mutáns és a THS30 törzs összehasonlítása mutatja kezeletlen tenyészetekben (a). Génkészlet-dúsulási elemzések a *gfdB* gendeláció hatásairól kezeletlen körülmények között (b). A kiválasztott szignifikánsan dúsult (p korrigált $< 0,05$) GO és KEGG útvonal bemutatása. A zárójelben lévő betű a vizsgált génkészletet jelzik: „A” – minden DEG. Ha egy kiválasztott kategória egynél több génkészletben dúsult, csak a legerősebb kritériumokkal rendelkező halmaz kerül bemutatásra.

4.3.3 A *gfdB* gén jelenlétének hatása az *A. wentii* fiziológiájára

Az alkalmazott stresszkezelések 3482 gén indukálódását és 2250 gén represszálódását eredményezték az *A. wentii* CBS141173 referencia törzsben (14A. ábra). A szorbit és a NaCl kezelés stresszre reagáló génkészletei közötti nagy átfedés (14A. ábra), valamint a két kezelés által kiváltott genomszintű transzkripciós változások közötti nagy korrelációs együttható (14C.

14. ábra) azt mutatta, hogy a szorbit- és a NaCl stresszválaszok hasonlóak voltak. A kombinált stressz ismét kisebb transzkripciós változásokat okozott a nem kombinált kezelésekhez képest (14A. ábra).



Pearson-féle korrelációs együttható:		'c vs. Vad típus				Vad típus			'c		
		Kezeletlen	Szorbit	NaCl	NaCl + Szorbit	Szorbit vs. Kezeletlen	NaCl vs. Kezeletlen	NaCl + szorbit vs. Kezeletlen	Szorbit vs. Kezeletlen	NaCl vs. Kezeletlen	NaCl + szorbit vs. Kezeletlen
'c vs. Vad típus	Kezeletlen	1.000	0.504	0.248	0.518	0.197	0.346	0.259	-0.229	-0.291	-0.303
	Szorbit		1.000	0.268	0.603	-0.374	0.004	0.128	0.183	-0.231	0.154
	NaCl			1.000	0.367	-0.097	-0.311	-0.178	-0.064	0.174	-0.099
	NaCl + Szorbit				1.000	-0.165	0.016	-0.191	-0.041	-0.158	0.192
Vad típus	Szorbit vs. Kezeletlen					1.000	0.738	0.544	0.502	0.569	0.174
	NaCl vs. Kezeletlen						1.000	0.474	0.482	0.572	0.117
	NaCl + szorbit vs. Kezeletlen							1.000	0.490	0.166	0.525
'c	Szorbit vs. Kezeletlen								1.000	0.676	0.674
	NaCl vs. Kezeletlen									1.000	0.313
	NaCl + szorbit vs. Kezeletlen										1.000

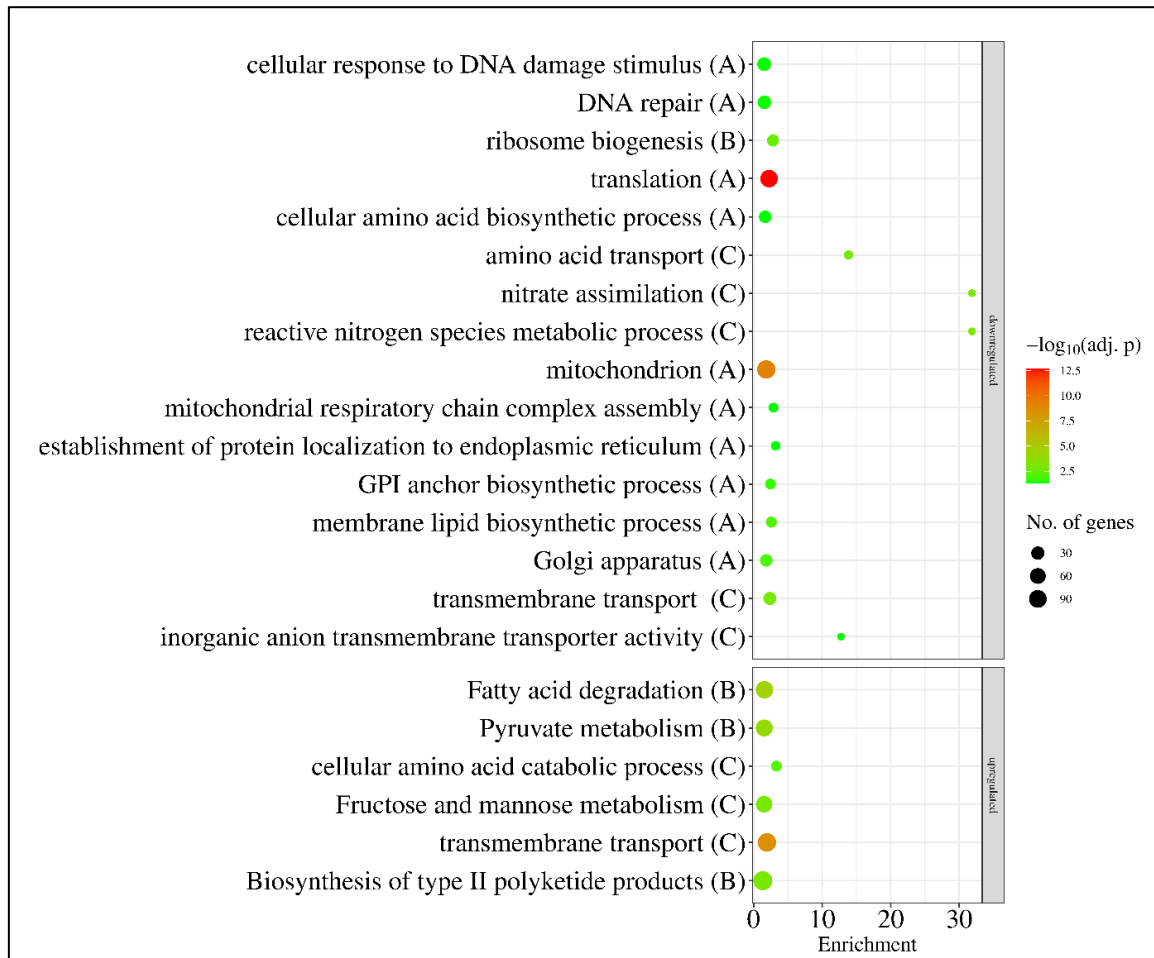
14. ábra Stresszkezelések által okozott genom szintű transzkripciós változások az *A. wentii*ben. A, B panelek: Venn-analízis a CBS141173 és a 'c *gfdB* törzsekben az indukálódott és a represszálódott génekről ($|\log_2FC| > 1$). C panel: Pearson-féle korrelációs együtthatók a transzkripciós változások \log_2FC értékei között. A CBS141173 és a 'c *gfdB* törzsek rövidítése „Vad típus” és „c” néven szerepel.

A géncsoport dúsulási analízisek alapján a represszálódott génkészletekben a DNS-javító és az aminosav-anyagcsere gének, míg az indukálódott génkészletekben a transzporter gének dúsultak fel az alkalmazott kezelésektől függetlenül (15. ábra, Melléklet 5. táblázat).

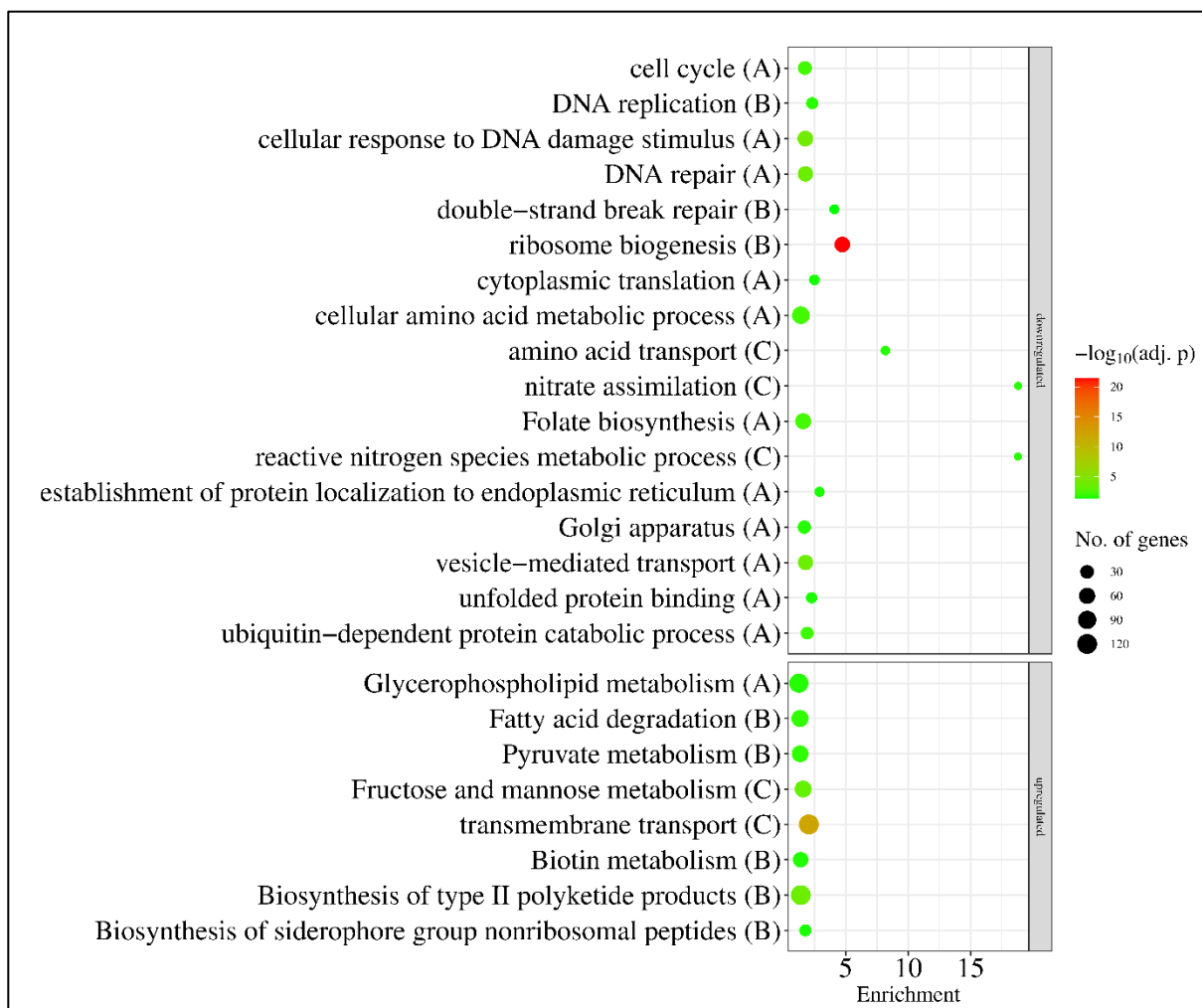
A riboszóma biogenezis és translációs gének a represszálódtak, míg az aminosav és zsírsav degradációs gének, a szekunder metabolizmusban részt vevő gének vagy a fruktóz-mannóz metabolizmusban részt vevő gének feldúsultak az indukálódott génkészletekben szorbit- és NaCl kezelések esetében (**15. ábra, Melléklet 5. táblázat**). A tenyészetek növekedési profiljával összhangban (**9B. ábra**) a DNS-replikáció és a sejtciklus gének csak a NaCl-al kezelt tenyészetekben mutattak repressziót (**15. ábra, Melléklet 5. táblázat**). Az *A. nidulans* THS30 törzsben az összes ozmotikus stresszkezelés hatására indukálódott mitokondriális gének feldúsulást mutattak a represszálódtak génkészletben az *A. wentii* CBS141173 növekedést serkentő szorbitos kezelés esetében (**15. ábra, Melléklet 5. táblázat**). Az *A. nidulans* „ozmotikus stressz gének” ortológjai nem mutattak olyan nyilvánvaló indukálódást *A. wentii*-ben, mint *A. nidulans* esetében (**Melléklet 6. táblázat**). Néhány gén azonban erős indukálódást mutatott mind szorbit-, mind a NaCl kezelés esetében: a *gfdA* mellett (**Melléklet 6. táblázat és 10D. ábra**) az *atfA* b-ZIP transzkripció faktor ortológ gén ASPWEDRAFT_37015, és az *ypdA* foszfortranszfer szabályozó protein ortológ gén ASPWEDRAFT_99233 (**Melléklet 6. táblázat**). Az *A. nidulans*hoz hasonlóan az antioxidáns enzim gének egy része indukálódott az *A. wentii* CBS141173 szorbittal vagy NaCl-dal kezelt tenyészeiben (**Melléklet 6. táblázat**). Az indukálódott gének közül az ASPWEDRAFT_506345 (feltételezetten szuperoxid-dismutázt kódoló), az ASPWEDRAFT_48635 és az ASPWEDRAFT_53830 (feltételezetten katalázokat kódoló), valamint az ASPWEDRAFT_235979 (feltételezetten citokróm c-peroxidázt kódoló) megfigyelhető volt (**Melléklet 6. táblázat**).

Az *An-gfdB* gén expressziója *A. wentii*-ben nem változtatta meg lényegesen a stresszre reagáló gének számát: 3309 indukálódott, 1891 pedig repressziót mutatott (**14B. ábra**). Megoszlásuk a kezelések között többé-kevésbé hasonló mintát mutatott a referencia törzsben tapasztaltakhoz (**14B. ábra**). A három kezelés stresszre reagáló génkészletei közötti átfedés és a három transzkripció változás páronkénti korrelációja némi csökkenést mutatott a mutánsban a referencia törzshez képest, de az eredmény még mindig szignifikánsnak tekinthető volt (**14. ábra**). A géncsoport dúsulási analízisek eredményei alapján az *A. wentii* 'c *gfdB* mutáns törzs három stresszválasza is többé-kevésbé hasonló volt: sejtciklus, DNS-replikáció, DNS-„repair” riboszóma biogenezis, fehérje degradációs gének indukálódtak a represszált génkészletekben, míg a biotin és a zsírsav bioszintézis, valamint a transzporter gének feldúsultak az indukálódott génkészletekben (**Melléklet 5. táblázat**). A fruktóz-mannóz anyagcsere gének és a szekunder metabolizmus gének a szorbittal és NaCl-dal kezelt tenyészetek indukálódott génkészleteiben

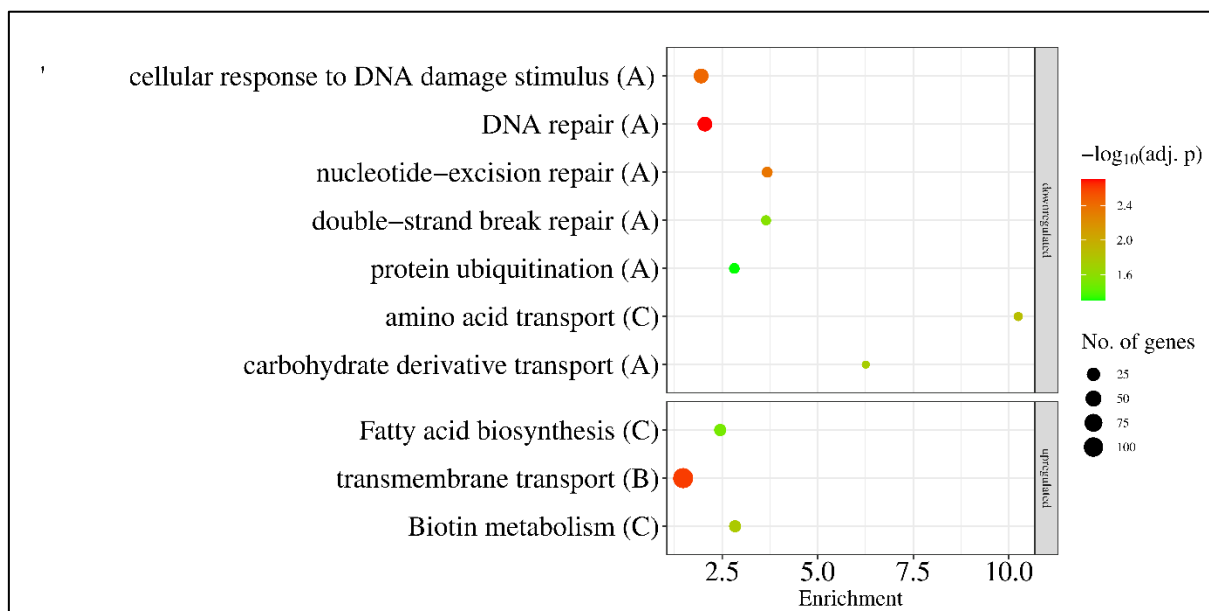
feldúsultak, míg a mitokondriális funkciójú gének csak a NaCl + szorbittal kezelt tenyészetek indukálódott génkészletében dúsultak (Melléklet 5. táblázat).



(a)



(b)



(c)

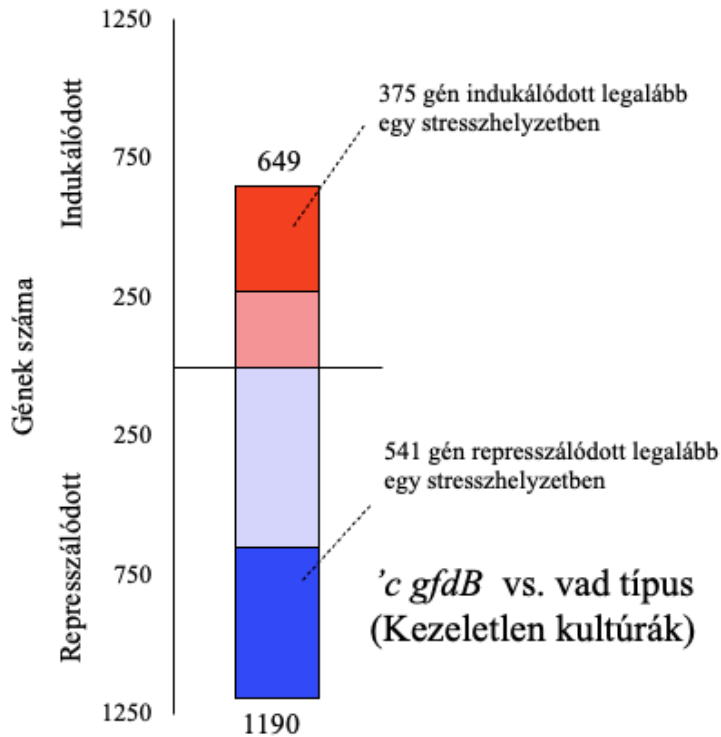
15. ábra A szorbit (A), NaCl (B) és NaCl + szorbit (C) kezelések *A. wentii* CBS141173-ra gyakorolt hatásának géncsoport dúsulási elemzése. A kiválasztott szignifikánsan dúsult (p korrigált $< 0,05$) GO

és KEGG útvonal kerültek ábrázolásra. A zárójelben lévő betűk a vizsgált génkészletet jelölik: „A” – minden DEG, „B” – DEG $|\log_2FC| > 1$, „C” – DEG $|\log_2FC|$ -vel > 2 . Ha egy kiválasztott terminus egynél több génkészletben dúsult fel, csak a legerősebb kritériumokkal rendelkező kategória kerül bemutatásra.

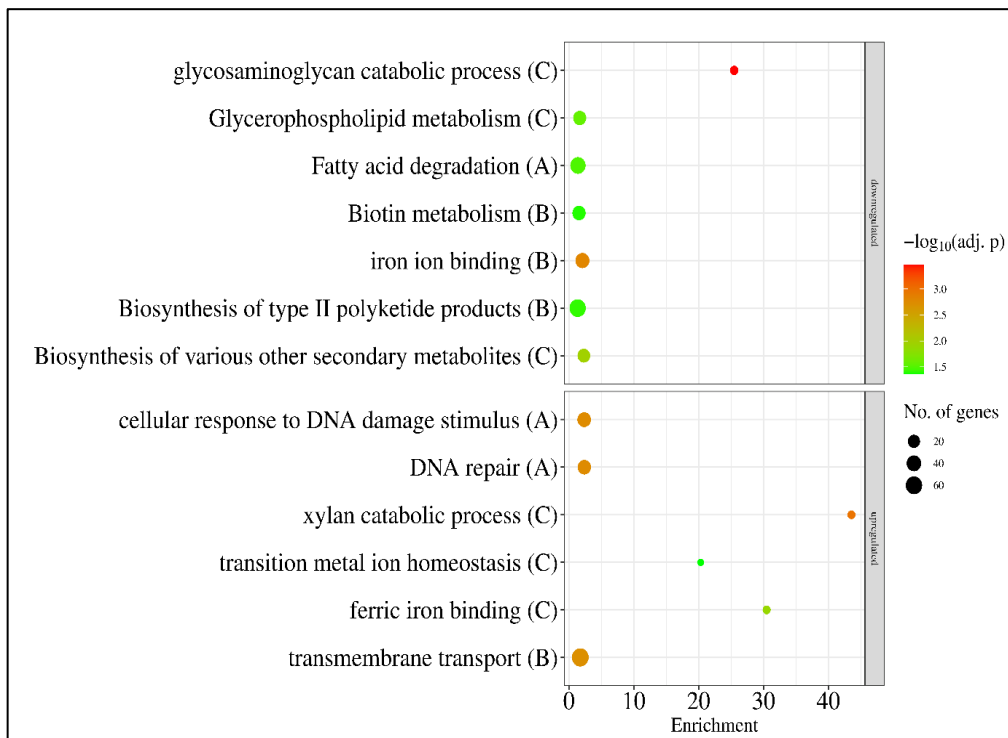
Az *An-gfdB*-t expresszáló mutáns és az *A. wentii* referencia törzs transzkriptumainak közvetlen összehasonlítása négy tenyésztési körülmény között sokkal nagyobb különbségeket mutatott (**16. ábra**), mint az *A. nidulans* esetében (**13. ábra**). A mutáns és a referencia törzs indukálódott vagy represszálódott génkészletei között az egyes kezeléseknél talált átfedés, valamint a két törzs ugyanazon kezelés által okozott transzkripciós változásai közötti korreláció is kisebb volt az *A. wentii*-ben (**Melléklet 5. ábra és 14. ábra**), mint az *A. nidulans*-ban (**Melléklet 3. ábra és 11. ábra**). A *gfdB* gén expressziója *A. wentii*-ben nagyobb változást okozott a genom szintű transzkripciós profilban, mint ennek a génnek a deléciója *A. nidulans*-ban. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a *gfdB* expressziója jelentősen csökkentette az *A. wentii* növekedését (**9B. ábra**), míg e gén deléciója nem volt jelentős hatással az *A. nidulans* növekedésére (**9A. ábra**).

Az *An-gfdB* gén expressziója *A. wentii*-ben 649 gén indukálódását és 1190 gén represszióját eredményezte kezeletlen körülmények között a referenciatörzshöz képest (**16. ábra, Melléklet 7. táblázat**). Azok a gének, amelyek a CBS141173 referenciatörzsben legalább egy stresszkezelésben indukálódást mutattak, szignifikánsan feldúsultak az indukálódott génkészletben (375 gén a 649 génből), míg azok a gének, amelyek legalább egy stresszkezelésben repressziót mutattak a referenciatörzsben, szignifikánsan feldúsultak a represszálódott génkészletben (541 gén az 1190 génből) (**Melléklet 7. táblázat**). A *gfdB* génexpresszió által kiváltott genomszintű transzkripciós változások pozitív korrelációt mutattak a referencia törzs kezelés által kiváltott transzkripciós változásaival (**14C. ábra**).

A géncsoport dúsulási analízisek eredményei alapján a 'c *gfdB* mutáns esetében, a represszálódott génkészletben feldúsultak a másodlagos anyagcsere gének és a biotin anyagcsere gének, míg a DNS javító és transzporter gének az indukálódott génkészletben dúsultak fel kezeletlen körülmények között a CBS141173 referencia törzshöz képest.



(a)



(b)

16. ábra Az *A. wentii* CBS141173 és a '*c gfdB* törzsek transzkriptomjainak közvetlen összehasonlítása kezeletlen körülmények között. Az indukálódott (piros) és represszálódott (kék) gének (DEG-k $|\log_2FC| > 1$) számát a '*c gfdB* mutáns és a CBS141173 törzs összehasonlítása mutatja

kezeletlen tenyészetekben (a). Génkészlet-dúsulási elemzések az *A. wentii*-ben az *A. nidulans-gfdB* expressziójának hatásairól kezeletlen körülmények között (b). A kiválasztott szignifikánsan dúsított (p korrigált $< 0,05$) GO és KEGG útvonal kategóriákat mutatjuk be. A zárójelben lévő betűk a vizsgált génkészletet jelzik: „A” – minden DEG; „B” – DEG-ek $|\log_2FC|$ -vel > 1 ; „C” – DEG-ek $|\log_2FC|$ -vel > 2 . Ha egy kiválasztott kifejezés egynél több génkészletben dúsult, csak a legerősebb kritériumokkal rendelkező halmaz kerül bemutatásra.

5. Eredmények megbeszélése

A genetikai módosítások alkalmazása a mikroorganizmusok esetében kulcsfontosságú a bonyolult biológiai folyamataik megértéséhez, az ipari biotechnológiai módszerek fejlesztéséhez és új alkalmazások kidolgozásához különböző iparágakban. Az ozmotikus stresszválaszok megértése és manipulálása, valamint az ozmoadaptáció bonyolult mechanizmusainak tanulmányozása gombákban elengedhetetlen szerepet játszik az élelmiszeripari és gyógyszeripari folyamatok optimalizálása szempontjából. Az ozmoadaptációt szabályozó molekuláris mechanizmusok megfejtésével a kutatók célzott stratégiákat tervezhetnek a gombák stressztűrő képességének fokozására, ezáltal optimalizálva a biotechnológiai folyamatokat és bővítve a biotechnológiai alkalmazások repertoárját (Park és mtsai. 2017).

Az ozmotikus stresszt az ozmotikus nyomás változásai jellemzik, jelentős kihívásokat jelentve a gomba szaporodása és -túlélése szempontjából. A gombák a káros ozmotikus stresszhatások enyhítése érdekében különféle alkalmazkodási mechanizmusokat fejlesztettek ki, ideértve a glicerín és kompatibilis sók szintézisét és felhalmozódását. A glicerín-3-foszfát dehidrogenáz, amelyet a *gfdB* gén kódol, központi szerepet játszik a glicerín bioszintézisében, ezáltal elősegítve az ozmotikus stressztűrést a gombákban (Zhang és mtsai. 2018).

A paralóg génpárok elvesztése az *Aspergillus* nemzetségben ritkán fordul elő, ám két xerofil/ozmofil faj, az *A. glaucus* és az *A. wentii*, evolúciójuk során elvesztette a *gfdB* ortológ génjét, mely esemény akár összefüggésbe hozható az ozmofília megjelenésével (de Vries és mtsai, 2017; Orosz és mtsai, 2018). Ezt a feltételezést erősítette az *A. nidulans gfdB* gén kifejeződésének fokozódása 0,6 M NaCl jelenlétében (Balázs és mtsai, 2010). A génkópiaszám növelése egyszerűsítheti és finomíthatja a gomba genom szabályozó rendszerét (Wapinski és mtsai. 2007). Ha a megnövelt géndózis szelektív előnyt biztosít a mikroorganizmus számára, a duplikált gének megőrződhetnek, még azonos funkcióval is. Az ilyen génduplikációk redundánssá válhatnak, és egyik másolatuk elveszítheti funkcióját, pszeudogénné alakulva. Ezzel szemben a duplikált gének divergálhatnak, új funkciókat fejleszhetnek (neofunkcionalizáció), vagy a meglévő funkciókat megoszthatják egymás között (szubfunkcionalizáció) (Ames és mtsai. 2010; Levasseur és mtsai. 2011). A gombák genomjának ilyen dinamikus átrendeződése és a génduplikációk evolúciós szerepe alapvető fontosságú lehet a fajok alkalmazkodóképességének és sokféleségének megértésében.

Korábbi kutatások kimutatták, hogy az *A. nidulans gfdA* és *gfdB* gének jelentős szerepet játszanak a sejtnövekedésben és a sejtfal integritásának fenntartásában. A *gfdA* gén különösen

fontos a sejtfal stabilitása szempontjából (Fillinger és mtsai. 2001a), míg a *gfdB* gén az oxidatív stressz elleni védelemben nélkülözhetetlen, különösen a H_2O_2 , *tBOOH* és diamid hatásaival szemben (Király és mtsai. 2020a). Érdemes megemlíteni, hogy ezek a gének funkciói átfednek, mivel a Δ *gfdB* törzs kisebb növekedést és nagyobb sejtfalintegritási szenzitivitást mutatott kongóvörös jelenlétében (Király és mtsai. 2020a). Az *A. glaucus*ban végzett korábbi vizsgálatok alapján azonban az *A. nidulans gfdB* génjének az *A. glaucus* genomjába való beépülése szignifikánsan nagyobb stressztűrő képességet okozott a gombában *tBOOH*, H_2O_2 , MSB, kongóvörös és $CdCl_2$ jelenlétében, így a *gfdB* gén hiánya nem eredményezett ozmofil fenotípust (Király és mtsai. 2020b).

Az *A. glaucus*nak számos előnyös tulajdonsága van, beleértve az ígéretes enzimtermelést (Tao és mtsai. 2010, 2011; Abrashev és mtsai. 2016; Li és mtsai. 2018; Takenaka és mtsai. 2019; Chen és mtsai. 2020), a poliketid termelést (Cai és mtsai. 2009, 2014; Sun és mtsai. 2009; Wu és mtsai. 2017), valamint a bioremediációs képességet (Gajendiran és Abraham 2017; Wei és Zhang 2018; Zhou és mtsai. 2021). Ezen felül, az ipari gombatörzsek esetében kiemelkedően fontos a stressztűrőképesség (Bai és mtsai. 2003; Li és mtsai. 2011; Teixeira és mtsai. 2011; Hagiwara és mtsai. 2016; Deparis és mtsai. 2017; Steensels és mtsai. 2019; Brandt és mtsai. 2021; Yaakoub és mtsai. 2022a). Mindezek alapján felmerült az a fontos kérdés, hogy az *A. nidulans gfdB* génjének szerepe az oxidatív stressztolerancia növelésében hogyan hasznosítható más *Aspergillus* fajok esetében.

Ezen megfigyelések azt sugallják, hogy az *A. nidulans gfdB* génjének integrálása potenciálisan javíthatja más *Aspergillus* fajok ipari alkalmazhatóságát azáltal, hogy növeli azok stressztűrő képességét. Ez különösen fontos lehet olyan ipari folyamatokban, ahol a gombákat különféle oxidatív stressz tényezők érik, és ahol a megnövekedett stressztűrés közvetlenül hozzájárulhat a termelési hatékonysághoz és a folyamat stabilitásához.

A doktori disszertációmban így a következő kérdéseket szeretnénk volna megválaszolni:

- (i) A glicerín-3-foszfát-dehidrogenáz kódoló *A. nidulans gfdB* gén inzerciója az ozmofil *A. wentii*ben javítja-e a törzs stressztűrő képességét?
- (ii) A *gfdB* ortológ gén elvesztése összefüggésbe hozható-e az ozmofília megjelenésével *A. wentii*ben?
- (iii) Az *A. wentii* és *A. glaucus* vad típusú törzsek *An-gfdB* génnel történő transzformációja evolúciós szempontból közelebb helyezi-e a törzseket az *A. nidulans*hoz?
- (iv) Transzkriptomikai adatok magyarázhatják-e az ozmofilitásban megmutatkozó különbségeket?

5.1 Stresszkezelések hatása *Aspergillus spp.* esetében az ozmofil fenotípus aspektusából

Az *A. wentii* *A. nidulans gfdB* génnel történő kiegészítése után az *A. wentii 'c gfdB* törzsek stressztűrő képességében csak csekély változásokat tapasztaltunk az *A. wentii* vad típusú törzssel történő összehasonlításban. Kisebb mértékű inhibíció volt detektálható az *A. wentii 'c gfdB* törzsek esetében 0,15mM CdCl₂ kezelésnél az *A. wentii* vad típusú törzshöz képest (**4. ábra**), míg 0,1 mM CdCl₂ jelenlétében nem volt mérhető gátlás, mely arra utal, hogy az alkalmazott koncentráció a vad és a mutáns *A. wentii* törzseknél is tolerálható volt. A nagyobb koncentráció alkalmazásával 0,5mM CdCl₂ kezelésnél szintén kimutatható volt a szignifikáns különbség a genetikai manipulációk hatásai és a stresszhatások között, azonban már jóval kisebb mértékű volt a kisebb koncentrációknál mért változásokhoz képest (**5. ábra**). A *'c gfdB* törzsek 0,2 mM koncentrációjú CdCl₂ kezeléseknél jobban növekedtek az *A. wentii* vad típusú törzshöz képest, amellett, hogy mindkét törzsnél volt mérhető szignifikáns inhibíció a kezeletlen kontroll törzsekhez képest (**4. ábra**). További detektált változások közé sorolható az enyhén megnövekedett oxidatív stressztűrés is (MSB, H₂O₂; csak 2 M szorbit jelenlétében; **3., 4., 5. és 6. ábra**), mely lényegesen eltér a szintén ozmofil *A. glaucus* detektált fenotípusaitól (Király és mtsai. 2020b).

Az *A. wentii* esetében a 2 M szorbit és 1 M vagy 1,5 M NaCl kombinációi kedvezőtlen hatást fejtettek ki, különösen a *'c gfdB* törzseknél, ahol az ozmolit elegyek gátló hatása még erősebb volt (**6. ábra**). Például, 2 M szorbit hozzáadása a táptalajhoz fokozta a környezeti stresszt, mivel a *'c gfdB* törzsek 1,5 mM diamid jelenlétében nem mutattak növekedést. Azonban voltak olyan esetek a kombinált stresszkezelések esetében, ahol a 2M szorbit kiegészítés növelte a *'c gfdB* törzsek ellenállóképességét 0,38 mM MSB és 9 mM H₂O₂ kezelésnél (**6. ábra**), míg szorbit hiánya esetében az NMM stressz agar kísérleteknél ez nem volt megfigyelhető (**3. ábra**). A szorbittal kiegészített stresszkezelés döntően nem befolyásolta a stresszexpozió és az *A. nidulans gfdB*-szupplementáció közötti kölcsönhatásokat, az 54 µM kongóvörös kezelés kivételével, ahol interakció nem volt kimutatható szorbit jelenlétében (**6. ábra**), míg az *A. glaucus* esetében a *gfdB* transzformációja teljesen helyreállította a törzs növekedését 0,4 mM *tBOOH*-dal szupplementált kultúrában, mely fenotípus nem volt megfigyelhető *A. wentii* esetében (**4. ábra**). Fontos megjegyezni azonban, hogy az *A. glaucus*nál észlelt stressztűrő képesség javulás *tBOOH* kezelésnél kizárólag a 2M szorbittal kiegészített NMM stressz agar kísérleteknél volt detektálható, míg a kiegészítés nélküli tápközegen a vad és a mutáns törzsek telepátmérője a kezeletlen kontroll törzsekhez képest nem mutatott

szignifikáns különbséget a stresszkezelt és a kezeletlen kultúrák növekedése között, illetve a genetikai manipulációk hatásai és a stresszhatások között sem (**Melléklet 1. ábra**).

A. wentii-nél az *A-ngfdB* szupplementációja 0,5M NaCl kezelésnél részben megőrizte a törzs ozmofil fenotípusát, azonban 1M NaCl esetében nem volt mérhető szignifikáns különbség a stresszkezelt és a kezeletlen kultúrák növekedése között a mutáns törzseknel, telepátmérőjük a kezeletlen telepátmérőkhöz mutatott hasonlóságot és méretük jelentősen elmaradt az 1M NaCl-dal kezelt vad típusú törzs telepátmérőjétől. Míg a nagy NaCl koncentráció (1,5M) gátló hatású volt mindkét törzs esetében a 2M szorbittal kiegészített és a kiegészítés nélküli NMM stressz agar kísérletekben. A kombinált stresszkezeléseknél már az 1M NaCl kezelés is gátló hatású volt mind a két törzsnél. Az *A. wentii* és az *A. glaucus* esetében jelentős különbség a két törzs között, hogy míg az *A. wentii* 2M sorbit szupplementáció nélkül mérhető stressztűrőképességet produkál, az *A. glaucus* esetében olyan mértékű növekedés csökkenést okoz a kezeletlen törzsnél, hogy a stressztűrő képesség kizárólag 2M szorbit kiegészítése mellett válik mérhetővé, ezzel is jelezve a két ozmofil faj közötti stresszadaptációs különbséget.

Célkitűzés (i) Az megállapítható, hogy a *gfdB* gén bevitele az ozmofil *A. wentii*-be nem javítja a törzs stressztűrő képességét, eltekintve néhány, szórványosan detektálható kisebb fenotípusoktól. A *gfdB* gén szupplementációja eltérő stressztűrést okozott *A. wentii*-ben a szintén ozmofil *A. glaucus*-hoz képest, mely törzsnél a gén inzerciója jelentős stressztűrőképesség növekedést okozott oxidatív stressz esetében (Király és mtsa. 2020b). Ezen eredmények pedig arra hívják fel a figyelmet, hogy a gombák stresszválasz rendszerének bármilyen változása meglehetősen összetett, gyakran előre nem látható fiziológiai változásokat eredményezhet.

Célkitűzés (ii) A *gfdB* ortológ gén elvesztésének az ozmofilitásra gyakorolt hatása *A. wentii* esetében kizárólag a stressz agar kísérletek eredményeit alapul véve, mérhető volt és a gén szupplementációja hatással volt a törzs ozmofilitására. A mutáns törzsek esetében az ozmofilitás csökkent a vad típusú törzshöz képest, de a *gfdB* gén expressziója csak részben állította helyre a vad típusú törzs ozmofil fenotípusát a mutáns törzsekben. Azonban ezen eredmények mélyebb megértéséhez a transzkriptom analízis módszereit is figyelembe szükséges vennünk.

5.2 Multidimenzionális megközelítés az *Aspergillus* fajok stresszválasz alapú pozicionálása céljából

Az *A. glaucus* és az *A. wentii* stressztűrően alapuló pozicionálását az *Aspergillus*ok között klaszteranalízis dendrogram és többdimenziós skálaábrázolási megközelítéssel vizsgáltuk, amint az a **7B. és C.** ábrán látható. Figyelemre méltó, hogy a vizsgált *A. wentii* és az ozmolittal kiegészített *A. glaucus* vad típusú és 'c *gfdB* törzs néhány ipari és/vagy mezőgazdasági szempontból fontos *Aspergillus* fajok köztük az *A. aculeatus* (ígéretes hidroláz-termelő gomba; Mhuantong és mtsai. 2020; Wang és mtsai. 2021), az *A. carbonarius* (a szőlő egyik fő ochratoxin-A termelője; Mondani és mtsai. 2020), *A. clavatus* (jelentős szekunder metabolit termelő, Zutz és mtsai. 2013), vagy az *A. terreus* közelében helyezkedik el (lovasztatint, itakonsavat termel és hidrolizál; Ryngajłło és mtsai. 2021). Ezért a további vizsgálatoknak arra kell törekedniük, hogy felfedjenek minden lehetséges kapcsolatot a gombák környezeti stressztűrése és a genomjukban lévő *gfdB* ortológ jelenléte között (de Vries és mtsai. 2017; Emri és mtsai. 2018; Orosz és mtsai. 2018).

Amikor a vizsgált *A. glaucus*, *A. wentii* és *A. nidulans* törzsek stressztolerancia alapú pozicionálását a stresszt kiváltó ágensek gondos kiválasztását követően nyert adatok felhasználásával végeztük, az *An-gfdB* szupplementációja jól elkülönítette az *A. wentii* és *A. glaucus* törzseket, megnövelve ezzel a távolságot ezen *Aspergillus* fajok között, miközben pozíciójuk a vad típusú *A. nidulans* és a $\Delta gfdB$ törzsekhez képest változatlan maradt (**8. ábra**).

Célkitűzés (iii) Ezen megfigyelések alapján elmondható, hogy az *An-gfdB* gén szupplementációja nem hozta közelebb egyik ozmofil fajt sem az *A. nidulans*hoz, mely megfigyelés alapján arra következtethetünk, hogy evolúciós szempontból egy már jóval korábbi szétválás történhetett a vizsgált fajok esetében, megnövelve ezzel azok evolúciós távolságát.

5.3 Molekuláris betekintés az *Aspergillus wentii* és az *Aspergillus nidulans* ozmotikus stresszválaszaiba

Az *A. nidulans* ozmotikus stresszre adott válaszai a stressz agar lemezes vizsgálatok esetében eltérőek voltak (Király és mtsai. 2020a) az ozmofil *A. wentii* által detekált fenotípusoktól (**3., 4. és 5. ábra**). Az MDS analízis során a stresszt kiváltó ágensek gondos kiválasztását követően, az *A. wentii* vad és mutáns törzseinél a 2M szorbit és 1M NaCl kezelés

telepátmérő növekedést okozott, míg az *A. nidulans* vad és mutáns törzseknél ezen kezelések 48-50%-os, és 35-33% -os gátlást okoztak a telepátmérőkben (**8.ábra**), ezzel is tükrözve az *A. nidulans* ozmotoleráns, de nem ozmofil fenotípusát (de Vries és mtsai. 2003).

Az ozmofil fenotípus mélyebb megértése céljából ozmotikus stressz indukálta (2M szorbit, 1M NaCl, illetve ezen stressz indukáló ágensek kombinációja) válaszreakciókat vizsgáltunk sülyesztett kultúrákból származó RNS adathalmazok felhasználásával az *A. nidulans* és *A. wentii* vad és a mutáns törzsek alkalmazásával.

Az *A. nidulans* THS30 transzkriptom adatelemzése alapján megállapítható, hogy a törzs kanonikus hiperozmotikus stresszválaszt mutatott, mely során megfigyelhető volt a transzportfolyamatok, a mitokondriális funkciók (Hefnawy 2001), az ivartalan szaporodás, a HOG útvonal elemeinek (*pbsA*, *hogA*, *ptpA*, *atfA*) (Furukawa és mtsai 2005, Miskei és mtsai. 2009, Lara-Rojas és mtsai. 2011), valamint a glicerin (*gfdB*) (Redkar és mtsai. 1995) és a trehalóz (*tpsA*, *orlA*, *treB*) (Borgia és mtsai 1996, Fillinger és mtsai. 2001b) metabolizmus géneknek az indukciója, mindkét stressz kezelés esetében (NaCl, szorbit). Mindazonáltal a DNS-javítás, a fehérje degradációs folyamatok és az autofágia (Gasch 2007, Hartmann és mtsai. 2011) repressziója arra utal, hogy az alkalmazott kezelések nem voltak erősek az *A. nidulans* THS30 esetében, ami összhangban van a törzs jó ozmotoleranciájával (de Vries és mtsai. 2003). Ezzel szemben az *A. wentii* CBS141173 törzsnél nem kanonikus hiperozmotikus stresszválaszok voltak, csak a *treB* ortológ ASPWEDRAFT_33761 (amely feltételezhetően trehalázt kódol) transzkripciója mutatott szignifikáns növekedést, valamint a mitokondriális funkciókat a szorbitos kezelés represszálta *A. wentii*-ben eltérően az *A. nidulans* stresszválaszától.

Megjegyzendő különbség a két törzs között, hogy az *A. nidulans* esetében az optimális ozmolaritás mellett növekvő kultúráknak alkalmazkodniuk kellett a kedvezőtlenül nagy ozmolaritáshoz, míg az *A. wentii* esetében a szuboptimális ozmolaritás mellett növekvő tenyészeteknek kellett a kedvezően nagy ozmolaritáshoz alkalmazkodniuk.

A kombinált stresszkezelés antagonista módon fejtette ki hatását a vizsgált törzsek esetében, bár hasonló folyamatok mutattak indukálódást vagy represszálódást, a stresszválasz sokkal gyengébb volt a nem kombinált kezelésekhöz képest. Az ozmotikus stressz-specifikus gének indukálódása elmaradt, kivéve a HOG útvonal válaszsabályozóját kódoló *sskA*-t (Hagiwara és mtsai. 2007), (**11. és 12. ábra, Melléklet 5. és 6. táblázat**). Feltételezhető, hogy a Na⁺ ionok csökkentik az ozmotikus gradienst azáltal, hogy gyorsan (és kontrollálatlanul; Wadskog és Adler 2003) bejutnak a sejtekbe, míg a szorbit, amely szintén bejut a sejtekbe (sejtek általi felvétel), de lassabban, mint a Na⁺, valamiképpen megvédte a fehérjéket a Na⁺

toxicitástól. Hipotézisünkkel összhangban de Vries és mtsai. (2003) kimutatták, hogy az ozmotikus stresszérzékeny *ΔgldB A. nidulans* mutánsok képesek kompenzálni a NaCl stresszt extracellulárisan hozzáadott poliolo (glicerin, eritrit, arabitol, mannit) felvételével. Míg de Lima és mtsai. (2015) kísérletileg kimutatták, hogy a kozmotróp vegyületek (beleértve a szorbitot is) képesek semlegesíteni a kaotrop szerek hatását in vitro agar-gélesedési vizsgálatokban.

Megfigyeléseink alapján az *A. nidulans* különböző körülmények között eltérő mechanizmusokat használ a túléléshez. Normál állapotban a GfdA enzim látja el a glicerin-3-foszfát dehidrogenáz feladatát, azonban amikor a sejteket szorbit vagy NaCl oldattal kezeltük, a *gfdB* gén expressziója jelentősen megnőtt, aktivitása közelített a *gfdA* transzkripció aktivitásához (**10. ábra**). Ez arra utal, hogy a *gfdB* gén és a hozzá kapcsolódó glicerin-3-foszfát útvonal kritikus szerepet játszik az ozmotikus stresszhez való alkalmazkodásban (**10. ábra, Melléklet 6. táblázat**). Érdekes módon, a *gfdB* gén deléciója csak csekély mértékben befolyásolja az *A. nidulans* stresszválaszát, növekedését és ozmotikus stressztűrését (**11. ábra, 9. ábra**, Király és mtsai., 2020a), ami azt jelzi, hogy a sejtekben alternatív útvonalak is képesek ellátni a glicerin termelését, mint például a GfdA és a NADP-specifikus glicerin-dehidrogenáz enzimek. Továbbá, a *gfdB* gén deléciója az *A. nidulans* THS30 törzsben olyan transzkripció változásokat idéz elő, amelyek hasonlítanak a hiperozmotikus stressz által kiváltott változásokhoz (**11C. ábra**), így ezek a változások elősegíthetik, hogy a mutáns törzs könnyebben alkalmazkodjon a hiperozmotikus körülményekhez, ami magyarázatot adhat a *ΔgfdB* törzs változatlan ozmotoleranciájára. Az *A. nidulans ΔgfdB* törzs ezen tulajdonságai azt sugallják, hogy a GfdB hiányos mutánsok nem szenvednek jelentős hátrányt az ozmoreguláció terén, és ezért nem állnak erős szelekciós nyomás alatt. Azonban ezek a törzsek fokozott érzékenységet mutatnak az oxidatív stresszre (Király és mtsai., 2020a), ami arra utal, hogy a *gfdB* gén hiánya komoly negatív hatásokkal járhat, és stabilizálhatja a gén jelenlétét a genomban. Ez a megközelítés új megvilágításba helyezi a *gfdB* gén szerepét, nemcsak az ozmotikus stresszre adott válaszban, hanem az oxidatív stresszel szembeni ellenállásban is, és rávilágít arra, hogy az *A. nidulans* hogyan alkalmazkodik különböző környezeti kihívásokhoz.

Az *A. wentii 'c gfdB* mutánsának transzkriptomja minden tenyésztési körülmény mellett jelentősen eltér a CBS141173 referencia törzsetől (**16. ábra**), sokkal inkább, mint az *A. nidulans ΔgfdB* mutáns a THS30 törzstől (**13. ábra**). A nagy ozmolaritású környezetben végzett kezelések során az *A. wentii* mutáns és vad típusú törzseinek transzkripció válaszai nagyobb különbségeket mutattak, és kevésbé voltak összhangban (**14C. ábra, Melléklet 5. ábra**), mint az *A. nidulans* esetében (**11C. ábra, Melléklet 3. ábra**). A '*c gfdB* törzs vizsgálati eredményei

azt sugallják, hogy az evolúció során miután a GfdB hiányához alkalmazkodtak, minden olyan mechanizmus, amely túlságosan megnöveli a Gfd aktivitását (például a *gfdA* gén megduplázódása vagy a *gfdB* gén horizontális géntranszfere), hátrányos lehet a törzsre nézve. Ezen kívül, az *A. wentii* vad típusú törzs megnövekedett *gfdA* génexpressziója valószínűleg a *gfdB* hiánya kompenzálásának az eredménye (**10D ábra**).

Ezen eredmények rávilágítanak arra, hogy a genetikai hálózatok és az evolúciós nyomás hogyan alakítják a génexpresszió dinamikáját, különösen olyan kritikus gének esetében, mint a *gfdB*.

Célkitűzés (ii) és (iv) Megfigyeléseink alapján, megállapítható tehát, hogy transzkriptom szintjén detektálhatóak különbségek az *A. wentii* esetében az *A. nidulans*sal történő összehasonlításban, illetve feltételezhető, hogy a *gfdB* gén hiánya *A. wentii*ben, valószínűleg nem az ozmofília oka, hanem inkább a nagy omzolaritású környezethez való alkalmazkodás következménye.

6. Összefoglalás

A gombák ipari alkalmazásának hatékonysága nagyban függ a stressztűrő képességüktől, melynek javítása forradalmasíthatja a biotechnológiai és mezőgazdasági eljárásokat. Az intracellulárisan kompatibilis oldott anyagok, például a glicerin, a mannit, az eritrit és az arabitól (Sánchez-Fresneda és mtsai. 2013; de Lima és mtsai. 2015; Király és mtsai. 2020a) által kiváltott stressz vizsgálata, sülyesztett *Aspergillus* tenyészetekben, módot adhat a cukoralkohol-hozamok növelésére az ipari fermentációs folyamatokban – mely területet idáig leginkább az ozmotoleráns/ozmofil élesztőket érintette (Moon és mtsai. 2010; Yang és mtsai. 2021; Erian és Sauer 2022; Yaakoub és mtsai. 2022a).

Kísérleteinkből kiderült, hogy az *An-gfdB* gén saját promóter és terminátor szekvenciájával történő inzerciója az ozmofil *A. wentii*-be nem javítja a törzs stressztűrő képességét, így ezen képesség fokozására alkalmazott célzott stratégiák esetében figyelembe kell vennünk az esetleges fajspecifikus válaszreakciókat. Feltételezhetjük azt is, hogy az *A. nidulans gfdB* a saját promóterével az *A. glaucus* és az *A. wentii* genomjába (7A. ábra) bonyolult kölcsönhatásba lép különböző transzkripciós faktorokkal, megváltozott stresszválasz-készséggel és módosult promóter-preferenciákkal (Wohlbach és mtsai. 2009), hozzájárulva az *A. glaucus* és az *A. wentii c' gfdB* törzsek fenotípusos különbségeihez (3., 4., 5. és 6. ábra; Király és mtsai. 2020b). Ez azt jelenti, hogy nem csak azokat a géneket szükséges azonosítanunk, amelyek javítják a stressztűrést, hanem olyan szabályozó elemeket is kell találnunk, amelyek biztosítják ezen gének hatékony és biztonságos működését a gombák genomjában.

Továbbá az MDS analízis alapján, megállapítottuk, hogy e gén saját szabályozó elemeivel történő inzerciója, nem hozta közelebb evolúciós szempontból a két ozmofil fajt (*A. wentii*, *A. glaucus*) az ozmotoleráns *A. nidulans*-hoz. Valamint a transzkriptom analízis eredményei alapján, feltételezhető, hogy a *gfdB* gén hiánya *A. wentii*-ben, nem az ozmofilia oka, hanem a nagy ozmolaritású környezethez való alkalmazkodás következménye.

Összefoglalva, tanulmányunk rávilágít a genetikai módosítások és a fajspecifikus fiziológiai válaszok bonyolult összefüggéseire a gombákban. Az ozmoadaptációt meghatározó molekuláris mechanizmusok feltárásával ezek az eredmények utat nyithatnak a célzott stratégiák kifejlesztése előtt a stressztűrő képesség fokozására és a biotechnológiai folyamatok optimalizálására. A jövőbeni kutatások ezen a területen igen ígéretesek a mikrobiális biológia megértésének előmozdítására és a gombák biotechnológiai alkalmazása teljes potenciáljának kiaknázására.

7. Summary

The efficiency of industrial applications of fungi largely depends on their stress tolerance, the enhancement of which could revolutionize biotechnological and agricultural processes. Investigating the stress induced by intracellularly compatible solutes such as glycerol, mannitol, erythritol, and arabitol (Sánchez-Fresneda et al. 2013; de Lima et al. 2015; Király et al. 2020a) in submerged *Aspergillus* cultures could offer a way to increase sugar alcohol yields in industrial fermentation processes—a field that has primarily focused on osmotolerant/osmophilic yeasts until now (Moon et al. 2010; Yang et al. 2021; Erian and Sauer, 2022; Yaakoub et al. 2022a).

Our experiments revealed that the insertion of the *An-gfdB* gene with its own promoter and terminator sequences into the osmophilic *A. wentii* did not enhance the strain's stress tolerance. Therefore, targeted strategies to improve this capability must consider potential species-specific responses. We also hypothesize that the *A. nidulans gfdB* gene, when paired with its own promoter and integrated into the genomes of *A. glaucus* and *A. wentii* (**Figure 7A.**), interacts with various transcription factors, resulting in altered stress responses and promoter preferences (Wohlbach et al. 2009). This contributes to the phenotypic differences observed in the *A. glaucus* and *A. wentii c' gfdB* strains (**Figures 3, 4, 5, and 6**; Király et al. 2020b). This implies that we need to identify not only genes that enhance stress tolerance but also regulatory elements that ensure the effective and safe functioning of these genes within fungal genomes.

Furthermore, MDS analysis showed that inserting this gene with its own regulatory elements did not bring the two osmophilic species (*A. wentii*, *A. glaucus*) evolutionarily closer to the osmotolerant *A. nidulans*. Transcriptome analysis suggests that the absence of the *gfdB* gene in *A. wentii* is not the cause of osmophilia but rather a consequence of adaptation to high osmolarity environments.

In summary, our study highlights the complex interplay between genetic modifications and species-specific physiological responses in fungi. By uncovering the molecular mechanisms underlying osmoadaptation, these findings pave the way for developing targeted strategies to enhance stress tolerance and optimize biotechnological processes. Future research in this area holds great promise for advancing our understanding of microbial biology and harnessing the full potential of fungi in biotechnological applications.

9. Irodalomjegyzék

1. Abrashev R, Feller G, Kostadinova N, Krumova E, Alexieva Z, Gerginova M, Spasova B, Miteva-Staleva J, Vassilev S, Angelova M (2016) Production, purification, and characterization of a novel cold-active superoxide dismutase from the Antarctic strain *Aspergillus glaucus* 363. Fungal Biol 120:679–689. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.03.002>
2. Ames RM, Rash BM, Hentges KE, Robertson DL, Delneri D, Lovell SC (2010) Gene duplication and environmental adaptation within yeast populations. Genome Biol Evol 2:591–601. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq043>
3. Bai Z, Harvey LM, McNeil B (2003) Oxidative stress in submerged cultures of fungi. Crit Rev Biotechnol 23:267–302. <https://doi.org/10.1080/07388550390449294>
4. Balázs A, Pócsi I, Hamari Z, Leiter É, Emri T, Miskei M, Oláh J, Tóth V, Hegedus N, Prade RA, Molnár M, Pócsi I (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. Mol Genet Genomics 283:289–303. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0513-z>
5. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B (1992) On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol 36(5):569–572. doi:10.1007/BF00183230
6. Barratt RW, Johnson GB, Ogata WN (1965) Wild-Type and Mutant Stocks of *Aspergillus nidulans*. Genetics 52:233–246. <https://doi.org/10.1093/genetics/52.1.233>
7. Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 16(3):497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
8. Bodnár V, Király A, Orosz E, Miskei M, Emri T, Karányi Z, Leiter É, de Vries RP, Pócsi I (2023) Species-specific effects of the introduction of *Aspergillus nidulans gfdB* in osmophilic aspergilli. Appl Microbiol Biotechnol 107:2423–2436. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12384-9>
9. Blomberg, A., Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in microbial physiology*, 33, 145–212. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60217-9](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60217-9)
10. Borgia PT, Miao Y, Dodge CL (1996) The *orlA* gene from *Aspergillus nidulans* encodes a trehalose-6-phosphate phosphatase necessary for normal growth and chitin synthesis at elevated temperatures. Mol Microbiol 20:1287–1296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02647.x>

11. Brandt BA, Jansen T, Volschenk H, Görgens JF, Van Zyl WH, Den Haan R (2021) Stress modulation as a means to improve yeasts for lignocellulose bioconversion. *Appl Microbiol Biotechnol* 105:4899–4918. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11383-y>
12. Brown NA, Dos Reis TF, Ries LN (2015) G-protein coupled receptor-mediated nutrient sensing and developmental control in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 90(5):882-896. doi:10.1111/mmi.13135
13. Brown AJ, Budge S, Kaloriti D, Tillmann A, Jacobsen MD, Yin Z, Ene IV, Bohovych I, Sandai D, Kastora S, Potrykus J, Ballou ER, Childers DS, Shahana S, Leach MD (2014) Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol* 217:144-55. <https://doi.org/10.1242/jeb.088930>
14. Cai M, Zhang Y, Hu W, Shen W, Yu Z, Zhou W, Jiang T, Zhou X, Zhang Y (2014) Genetically shaping morphology of the filamentous fungus *Aspergillus glaucus* for production of antitumor polyketide aspergiolide A. *Microb Cell Fact* 13:73. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-73>
15. Cai MH, Zhou XS, Sun XQ, Tao KJ, Zhang YX (2009) Statistical optimization of medium composition for aspergiolide A production by marine-derived fungus *Aspergillus glaucus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:381–389. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0507-6>
16. Cairns, T.C., Nai, C., Meyer, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol Biotechnol* 5, 13 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>
17. Choma A, Wiater A, Komanięcka I, Paduch R, Pleszczyńska M, Szczodrak J (2013) Chemical characterization of a water insoluble (1→3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*. *Carbohydr Polym* 91(2):603-8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.060>
18. Chen L, Wei Y, Shi M, Li Z, Zhang SH (2020) Statistical optimization of a cellulase from *Aspergillus glaucus* CCHA for hydrolyzing corn and rice straw by RSM to enhance yield of reducing sugar. *Biotechnol Lett* 42(4):583-595. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02804-5>
19. Cherry JR, Fidantsef AL (2003) Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol* 14(4):438-443. doi:10.1016/s0958-1669(03)00099-5
20. Chomeczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15(532-534):536–537
21. de Lima AF, Stevenson A, Baxter E, Gillion JL, Hejazi F, Hayes S, Morrison IE, Prior BA, McGenity TJ, Rangel DE, Magan N, Timmis KN, Hallsworth JE (2015) Concomitant

osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Curr Genet* 61:457–477. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0496-8>

22. de Vries RP, Flitter SJ, van de Vondervoort PJ, Chaverroche MK, Fontaine T, Fillinger S, Ruijter GJ, d'Enfert C, Visser J (2003) Glycerol dehydrogenase encoded by *gldB* is essential for osmotolerance in *Aspergillus nidulans*. *J Mol Microbiol* 49:131–141. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03554.x>

23. de Castro P A, Colabardini, A C, Manfiolli, A O, Chiaratto, J, Silva, L P, Mattos, E C, Palmisano, G, Almeida, F, Persinoti, G F, Ries, L N A, Mellado, L, Rocha, M C, Bromley, M, Silva, R N, de Souza, G S, Loures, F V, Malavazi, I, Brown, N A, & Goldman, G H (2019) *Aspergillus fumigatus* calcium-responsive transcription factors regulate cell wall architecture promoting stress tolerance, virulence and caspofungin resistance. *PLoS Genet.* 2019;15(12):e1008551. doi:10.1371/journal.pgen.1008551

24. de Vries, RP, Riley, R, Wiebenga, A, Aguilar-Osorio, G, Amillis, S, Uchima, CA, Anderluh, G, Asadollahi, M, Askin M, Barry, K, Battaglia, E, Bayram, Ö, Benocci, T, Braus-Stromeyer, SA, Caldana, C, Cánovas, D, Cerqueira, GC, Chen, F, Chen, W, Choi, C, Clum, A, Dos Santos, RA, Damásio, AR, Diallinas, G, Emri, T, Fekete, E, Flipphi, M, Freyberg, S, Gallo, A, Gournas, C, Habgood, R, Hainaut, M, Harispe, ML, Henrissat, B, Hildén, KS, Hope, R, Hossain, A, Karabika, E, Karaffa, L, Karányi, Z, Kraševc, N, Kuo, A, Kusch, H, LaButti, K, Legendijk, EL, Lapidus, A, Levasseur, A, Lindquist, E, Lipzen, A, Logrieco, AF, MacCabe, A, Mäkelä, MR, Malavazi, I, Melin, P, Meyer, V, Mielnichuk, N, Miskei, M, Molnár, ÁP, Mulé, G, Ngan, CY, Orejas, M, Orosz, E, Ouedraogo, JP, Overkamp, KM, Park, HS, Perrone, G, Piumi, F, Punt, PJ, Ram, AF, Ramón, A, Rauscher, S, Record, E, Riaño-Pachón, DM, Robert, V, Röhrig, J, Ruller, R, Salamov, A, Salih, NS, Samson, RA, Sándor, E, Sanguinetti, M, Schütze, T, Sepčić, K, Shelest, E, Sherlock, G, Sophianopoulou, V, Squina, FM, Sun, H, Susca, A, Todd, RB, Tsang, A, Unkles, SE, van de Wiele, N, van Rossen-Uffink, D, Oliveira, JV, Vesth, TC, Visser, J, Yu, JH, Zhou, M, Andersen, MR, Archer, DB, Baker, SE, Benoit, I, Brakhage, AA, Braus, GH, Fischer, R, Frisvad, JC, Goldman, GH, Houbraken, J, Oakley, B, Pócsi, I, Scazzocchio, C, Seiboth, B, vanKuyk, PA, Wortman, J, Dyer, PS, Grigoriev, IV (2017) Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol.* 2017, 18-28. doi: 10.1186/s13059-017-1151-0.

25. Deparis Q, Claes A, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM (2017) Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res* 17:fox036. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox036>

26. Emri T, Antal K, Riley R, Karányi Z, Miskei M, Orosz E, Baker SE, Wiebenga A, de Vries RP, Pócsi I (2018) Duplications and losses of genes encoding known elements of the stress defence system of the Aspergilli contribute to the evolution of these filamentous fungi but do not directly influence their environmental stress tolerance. *Stud Mycol* 91:23–36. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.10.003>
27. Emri T, Szarvas V, Orosz E, Antal K, Park H, Han KH, Yu JH, Pócsi I (2015) Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics* 16:478. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1705-z>
28. Erian AM, Sauer M (2022) Utilizing yeasts for the conversion of renewable feedstocks to sugar alcohols - a review. *Bioresour Technol* 346:126296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126296>
29. Fillinger S, Chaverocche MK, van Dijck P, de Vries R, Ruijter G, Thevelein J, d'Enfert C (2001b) Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading)* 147:1851-1862. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-7-1851>
30. Fillinger S, Ruijter G, Tamás MJ, Visser J, Thevelein JM, d'Enfert C (2001a) Molecular and physiological characterization of the NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 39:145-157. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02223.x>
31. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 360(6390):739-742. <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>
32. Form IC, Bonus M, Gohlke H, Lin W, Daletos G, Proksch P (2019) Xanthone, benzophenone and bianthrone derivatives from the hypersaline lake-derived fungus *Aspergillus wentii*. *Bioorg Med Chem* 27(20):115005. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.021>
33. Furukawa K, Hoshi Y, Maeda T, Nakajima T, Abe K (2005) *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* 56:1246-1261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04605.x>
34. Furukawa K, Yoshimi A, Furukawa T, Hoshi Y, Hagiwara D, Sato N, Fujioka T, Mizutani O, Mizuno T, Kobayashi T, Abe K (2007) Novel reporter gene expression systems for monitoring activation of the *Aspergillus nidulans* HOG pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1724-1730. <https://doi.org/10.1271/bbb.70131>

35. Gajendiran A, Abraham J (2017) Biomineralisation of fipronil and its major metabolite fipronil sulfone by *Aspergillus glaucus* strain AJAG1 with enzymes studies and bioformulation. *3 Biotech* 7:212. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0820-8>
36. Garrido-Bazán V, Jaimes-Arroyo R, Sánchez O, Lara-Rojas F, Aguirre J (2018) SakA and MpkC Stress MAPKs Show Opposite and Common Functions During Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol.* 2018;9:2518.. [doi:10.3389/fmicb.2018.02518](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02518)
37. Gasch AP (2007) Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* 24:961-976. <https://doi.org/10.1002/yea.1512>
38. Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy MG, Zeilinger S (2014) Biotechnology and biology of *Trichoderma*. *Ind Biotechnol Microorg* 137-152. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43859-2_6
39. Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Furukawa K, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Yamashino T, Mizuno T (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1003-1014. <https://doi.org/10.1271/bbb.60665>
40. Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K (2009a) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet Biol* 46:868-878. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.07.003>
41. Hagiwara D, Mizuno T, Abe K (2009b) Characterization of NikA histidine kinase and two response regulators with special reference to osmotic adaptation and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:1566-1571. <https://doi.org/10.1271/bbb.90063>
42. Hagiwara D, Sakamoto K, Abe K, Gomi K (2016) Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:1667–1680. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1162085>
43. Hagiwara D, Yoshimi A, Sakamoto K, Gomi K, Abe KH, Kitagaki H (2015) Response and Adaptation to Cell Wall Stress and Osmotic Stress in *Aspergillus* Species. *Stress Biol Yeasts Fungi* 199-218. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55248-2_13
44. Han KH, Prade RA (2002) Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 43:1065-1078. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02774.x>

45. Hartmann T, Sasse C, Schedler A, Hasenberg M, Gunzer M, Krappmann S (2011) Shaping the fungal adaptome-stress responses of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* 301:408-416. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.008>
46. He C, Huang Y, Liu P, Wei J, Yang Y, Xu L, Xiao, M (2019) Transcriptome analysis of genes and metabolic pathways associated with nicotine degradation in *Aspergillus oryzae* 112822. *BMC Genomics*. 2019;20(1):86. doi:10.1186/s12864-019-5446-2
47. Hefnawy MA (2001) Effect of osmotic stress on *Aspergillus chevalieri* respiratory system. *Folia Microbiol (Praha)* 46:407-412. <https://doi.org/10.1007/BF02814430>
48. Herrera ML, Vallor AC, Gelfond JA, Patterson TF, Wickes BL (2009) Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 47:1325–1332. <https://doi.org/10.1128/jcm.02073-08>
49. Huang G, Cao C (2017) Global regulatory roles of the cAMP/PKA pathway revealed by phenotypic, transcriptomic, and phosphoproteomic analyses in a null mutant of PKA catalytic subunit in *Candida albicans*. GEO Accession viewer, NCBI. <https://doi.org/10.1111/mmi.13681>
50. Hossain MA, Ahmed S, Rahman MM (2013) Properties and applications of microbial alkaline proteases. In: *Enzyme Technology* (pp. 13-35). Springer Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6046-0_2
51. Houbraken J, Samson RA (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud Mycol* 70:1–51. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>
52. Hyde, K.D. *The numbers of fungi*. *Fungal Diversity* 114, 1 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00507-y>
53. Jones EBG, Suetrong S, Sakayaroj J, et al. (2009) Classification of marine *Aspergillus* *Penicillium* and *Trichoderma* species based on molecular phylogenetic analyses using sequences of the ITS region of ribosomal DNA. *Fungal Divers* 37:1–51. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0071-x>
54. Keller NP, Turner G, Bennett JW (2005) Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3(12):937-947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
55. Kim D, Paggi JM, Park C (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* 37:907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

56. Király A, Hámori C, Gyémánt G, Kövér KE, Pócsi I, Leiter É (2020a) Characterization of *gfdB* putatively encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol* 124:352–360. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.011>
57. Király A, Szabó IG, Emri T, Leiter É, Pócsi I (2020b) Supplementation of *Aspergillus glaucus* with *gfdB* gene encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *J Basic Microbiol* 60:691–698. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000067>
58. Lago MC, Dos Santos FC, Bueno PSA, de Oliveira MAS, Barbosa-Tessmann IP (2021) The glucoamylase from *Aspergillus wentii*: purification and characterization. *J Basic Microbiol* 61:443–458. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000595>
59. Lara-Rojas F, Sánchez O, Kawasaki L (2011) *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development, and spore functions. *Mol Microbiol* 80:436–454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07581.x>
60. Latgé JP, Chamilos G (2019) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev* 33(1):e00140-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>
61. Leiter É, Park H, Kwon N.J, Han KH, Emri T, Oláh V, Mészáros I, Dienes B, Vincze J, Csernoch L, Yu JH, Pócsi I (2016) Characterization of the *aodA*.; *dnmA*.; *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Sci. Rep.* 6, 20523. doi: 10.1038/srep20523.
62. Levasseur A, Pontarotti P (2011) The role of duplications in the evolution of genomes highlights the need for evolutionary-based approaches in comparative genomics. *Biol Direct* 6:11. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-11>
63. Li Q, Bai Z, O'Donnell A, Harvey LM, Hoskisson PA, McNeil B (2011) Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. *Biotechnol Lett* 33:457–467. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0471-x>
64. Li XD, Li X, Li XM, Xu GM, Liu Y, Wang BG (2018a) 20-Nor-Isopimarane Epimers Produced by *Aspergillus wentii* SD-310, a Fungal Strain Obtained from Deep Sea Sediment. *Mar Drugs* 16(11):440. <https://doi.org/10.3390/md16110440>
65. Li Z, Pei X, Zhang Z, Wei Y, Song Y, Chen L, Liu S, Zhang SH (2018b) The unique GH5 cellulase member in the extreme halotolerant fungus *Aspergillus glaucus* CCHA is an endoglucanase with multiple tolerance to salt, alkali, and heat: prospects for straw degradation applications. *Extremophiles* 22:675–685. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1028-5>
66. Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) featureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>

67. Liu XD, Wei Y, Zhou XY, Pei X, Zhang SH (2015) *Aspergillus glaucus* aquaglyceroporin gene *glpF* confers high osmosis tolerance in heterologous organisms. *Appl Environ Microbiol* 81:6926–6937. <https://doi.org/10.1128/aem.02127-15>
68. Liu XD, Xie L, Wei Y, Zhou X, Jia B, Liu J, Zhang S (2014) Abiotic stress resistance, a novel moonlighting function of ribosomal protein RPL44 in the halophilic fungus *Aspergillus glaucus*. *Appl Environ Microbiol* 80:4294–4300. <https://doi.org/10.1128/aem.00292-14>
69. Lopes SA, Oki Y, Vieira MC, et al. (2022) Fungi spoilage of food and control using natural products: A review. *Food Res Int* 122:108092. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.108092>
70. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
71. Mach-Aigner AR, Pucher ME, Mach RL (2010) D-Xylose as a repressor or inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Environ Microbiol* 76(6):1770-1776. doi:10.1128/AEM.02746-09
72. Machida M, Gomi K (2010) *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Horizon Scientific Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190159>
73. Martín JF (2022) Vacuolar and Peroxisomal Calcium Ion Transporters in Yeasts and Fungi: Key Role in the Translocation of Intermediates in the Biosynthesis of Fungal Metabolites. *Genes (Basel)*. 2022;13(8):1450. doi:10.3390/genes13081450
74. Mavrianos J, Desai C, Chauhan N (2014) Two-component histidine phosphotransfer protein Ypd1 is not essential for viability in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 9(1):e86472. doi:10.1128/EC.00243-13
75. Meyer V, Andersen MR, Brakhage AA, Braus GH, Caddick MX, Cairns TC, de Vries RP, Haarmann T, Hansen K, Hertz-Fowler C, et al. (2016) Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: A white paper. *Fungal Biol Biotechnol* 3:6. doi:10.1186/s40694-016-0024-8
76. Mhuantong W, Charoensri S, Poonsrisawat A, Pootakham W, Tangphatsornruang S, Siamphan C, Suwannarangsee S, Eurwilaichitr L, Champreda V, Charoensawan V, Chantasingh D (2020) High quality *Aspergillus aculeatus* genomes and transcriptomes: a platform for cellulase activity optimization toward industrial applications. *Front Bioeng Biotechnol* 8:607176. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.607176>

77. Miao FP, Liang XR, Liu XH, Ji NY (2014) Aspewentins A-C norditerpenes from a cryptic pathway in an algicolous strain of *Aspergillus wentii*. *J Nat Prod* 77(2):429-32. <https://doi.org/10.1021/np401047w>
78. Miskei M, Karányi Z, Pócsi I (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet Biol* 46(Suppl 1):S105–S120. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.013>
79. Mondani L, Palumbo R, Tsitsigiannis D, Perdakis D, Mazzoni E, Battilani P (2020) Pest management and ochratoxin A contamination in grapes: a review. *Toxins (Basel)* 12:303. <https://doi.org/10.3390/toxins12050303>
80. Moon HJ, Jeya M, Kim IW, Lee JK (2010) Biotechnological production of erythritol and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(4):1017–1025. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2496-4>
81. Navarro RE, Stringer MA, Hansberg W, Timberlake WE, Aguirre J (1996) *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* 29:352-359. <https://doi.org/10.1007/BF00317926>
82. Nazareth SW, Gonsalves V (2014) Halophilic *Aspergillus penicillioides* from athalassohaline, thalassohaline, and polyhaline environments. *Front Microbiol.* 2014;5:412. doi:10.3389/fmicb.2014.00412
83. Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I, Brown AJ (2009) Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol* 9:44. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-44>
84. Novak Babic M, Gunde-Cimerman N, Vargha M, et al. (2017) Halotolerant and halophilic fungi in the extreme arid region of the Atacama Desert in Chile. *Mycol Prog* 16:589–607. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1304-9>
85. Ntana F, Mortensen UH, Sarazin C, Figge R (2020) *Aspergillus*: A Powerful Protein Production Platform. *Catalysts* 10(9):1064. <https://doi.org/10.3390/catal10091064>
86. Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O (2019) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus nidulans* grown under heat stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 83(7):1323-1332. doi:10.1128/AEM.72.5.3448-3457.2006
87. Orosz E, van de Wiele N, Emri T, Zhou M, Robert V, de Vries RP, Pócsi I (2018) Fungal Stress Database (FSD)--a repository of fungal stress physiological data. *Database (Oxford)* 2018: bay009. <https://doi.org/10.1093/database/bay009>

88. Pákozdi K, Emri T, Antal K, Pócsi I (2023) Global Transcriptomic Changes Elicited by *sodB* Deletion and Menadione Exposure in *Aspergillus nidulans*. *J Fungi* 9:1060. <https://doi.org/10.3390/jof9111060>
89. Papagianni M (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport, and modeling. *Biotechnol Adv* 25(3):244-263. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.01.002
90. Park HS, Jun SC, Han KH, Hong SB, Yu JH (2017) Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Adv Appl Microbiol* 100:161–202. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>
91. Park HS, Man YY, Lee MK, Jae Maeng P, Chang Kim S, Yu JH (2015) Velvet-mediated repression of β -glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* spores. *Sci Rep* 5:10199. <https://doi.org/10.1038/srep10199>
92. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, Meijer M, Noonim P, Mahakarnchanakul W, Samson RA (2007) Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud Mycol* 59:53-66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
93. Pitt JI, Christian JH (1968) Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Aust J Biol Sci* 21(1):73-82. <https://doi.org/10.1071/BI9680073>
94. Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, van den Hondel CA (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56(1):117–124. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90164-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90164-8)
95. R Core Team (2022) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria <https://www.R-project.org/>. Accessed 04 Aug 2022
96. Redkar RJ, Locy RD, Singh NK (1995) Biosynthetic pathways of glycerol accumulation under salt stress in *Aspergillus nidulans*. *Exp Mycol* 19:241-246. <https://doi.org/10.1006/emyc.1995.1030>
97. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
98. Ryngajłło M, Boruta T, Bizukojć M (2021) Complete genome sequence of lovastatin producer *Aspergillus terreus* ATCC 20542 and evaluation of genomic diversity among *A. terreus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 105:1615–1627. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11133-0>

99. Samson RA, Varga J (2009) What is a species in *Aspergillus*? *Med Mycol* 47(Suppl 1):S13-S20. doi:10.1080/13693780802354011
100. Sánchez-Fresneda R, Guirao-Abad JP, Argüelles A, González-Párraga P, Valentín E, Argüelles JC (2013) Specific stress-induced storage of trehalose, glycerol, and D-arabitol in response to oxidative and osmotic stress in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun* 430(4):1334–1339. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.118>
101. Sato I, Shimizu M, Hoshino T, Takaya N (2009) The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungus-specific glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 284:8042-8053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807771200>
102. Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 169:361-371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.035>
103. Steensels J, Gallone B, Voordeckers K, Verstrepen KJ (2019) Domestication of industrial microbes. *Curr Biol* 29(10):R381–R393. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.025>
104. Steensels J, Snoek T, Meersman E, Picca Nicolino M, Voordeckers K, Verstrepen KJ (2014) Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38:947-950. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12073>
105. Sun X, Zhou X, Cai M, Tao K, Zhang Y (2009) Identified biosynthetic pathway of aspergiolide A and a novel strategy to increase its production in a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors simultaneously. *Bioresour Technol* 100:4244–4251. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.061>
106. Szabó Z, Pákózdí K, Murvai K, Kecskeméti Á, Oláh V, Logrieco AF, Madar A, Dienes B, Csernoch L, Emri T, Hornok L, Pócsi I, Leiter É (2020a) *FvnmSOD* is involved in oxidative stress defence, mitochondrial stability, and apoptosis prevention in *Fusarium verticillioides*. *J Basic Microbiol* 60:994–1003. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000560>
107. Szabó Z, Pákózdí K, Murvai K, Pusztahelyi T, Kecskeméti Á, Gáspár A, Logrieco AF, Emri T, Ádám AL, Leiter É, Hornok L, Pócsi I (2020b) *FvatfA* regulates growth, stress tolerance, as well as mycotoxin and pigment productions in *Fusarium verticillioides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:7879–7899. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10717-6>
108. Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, Edgerton H, Xiong Y, Taheri-Talesh N, Osmani SA, Oakley BR (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* 1:3111–3120. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.405>
109. Takenaka S, Lim L, Fukami T, Yokota S, Doi M (2019) Isolation and characterization of an aspartic protease able to hydrolyze and decolorize heme proteins from *Aspergillus glaucus*. *J Sci Food Agric* 99:2042–2047. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9339>

110. Tao YM, Xu XQ, Ma SJ, Liang G, Wu XB, Long MN, Chen QX (2011) Cellulase hydrolysis of rice straw and inactivation of endoglucanase in urea solution. *J Agric Food Chem* 59:10971–10975. <https://doi.org/10.1021/jf203712n>
111. Tao YM, Zhu XZ, Huang JZ, Ma SJ, Wu XB, Long MN, Chen QX (2010) Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain *Aspergillus glaucus* XC9. *J Agric Food Chem* 58:6126–6130. <https://doi.org/10.1021/jf1003896>
112. Teixeira MC, Mira NP, Sá-Correia I (2011) A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Biotechnol* 22:150–156. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.011>
113. Valiante V, Heinekamp T, Brakhage AA (2015) The Aspergilli and their way of life. In: *Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era*. Springer, Dordrecht, pp 1-26. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9329-8_1
114. Varga J, Kocsubé S, Tóth B, Frisvad JC, Perrone G, Susca A, Samson RA (2007) *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with worldwide distribution. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(8):1925-1932. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65011-0>
115. Wadskog I, Adler L (2003) Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In: Hohmann S, Mager WH (eds) *Yeast Stress Responses*. *Topics Curr Genet* 1:201-239. https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_5
116. Wang J, Gao Z, Qian Y, Hu X, Li G, Fu F, Guo J, Shan Y (2021) Citrus segment degradation potential, enzyme safety evaluation, and whole genome sequence of *Aspergillus aculeatus* strain ZC-1005. *Front Microbiol* 12:671200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.671200>
117. Wapinski I, Pfeffer A, Friedman N, Regev A (2007) Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature* 449:54–61. <https://doi.org/10.1038/nature06107>
118. Wei Y, Zhang SH (2018) Abiostress resistance and cellulose degradation abilities of haloalkaliphilic fungi: applications for saline-alkaline remediation. *Extremophiles* 22:155–164. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0986-3>
119. Wheeler KA, Hocking AD (1993) Interactions among xerophilic fungi associated with dried salted fish. *J Appl Bacteriol* 74:164–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03010.x>
120. Wohlbach DJ, Thompson DA, Gasch AP, Regev A (2009) From elements to modules: regulatory evolution in Ascomycota fungi. *Curr Opin Genet Dev* 19:571–578. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.09.007>

121. Woo SL, Pepe O, Russo D (2014) Biological control of phytopathogenic fungi by fungal antagonists: A review. *J Biol Control* 72:1-17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.01.006>
122. Wu MT, Ayres JC, Koehler PE, Chassis G (1974) Toxic metabolite produced by *Aspergillus wentii*. *Appl Microbiol* 27(2):337-9. <https://doi.org/10.1128/am.27.2.337-339.1974>
123. Wu Y, Ren Y, Zhou X, Cai M, Zhang Y (2017) Transcription factor Agse1 affects development, osmotic stress response, and secondary metabolism in marine-derived *Aspergillus glaucus*. *J Basic Microbiol* 57:873–882. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700123>
124. Yaakoub H, Sanchez NS, Ongay-Larios L, Courdavault V, Calenda A, Bouchara JP, Coria R, Papon N (2022a) The high osmolarity glycerol (HOG) pathway in fungi. *Crit Rev Microbiol* 48:657–695. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.2011834>
125. Yaakoub H, Mina S, Calenda A, Bouchara JP, Papon N (2022b) Oxidative stress response pathways in fungi. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(6):333. doi:10.1007/s00018-022-04353-8
126. Yang L, Kong W, Yang W, Li D, Zhao S, Wu Y, Zheng S (2021) High D-arabitol production with osmotic pressure control fed-batch fermentation by *Yarrowia lipolytica* and proteomic analysis under nitrogen source perturbation. *Enzyme Microb Technol* 152:109936. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109936>
127. Zhang C, Meng X, Gu H, Ma Z, Lu L (2018) Predicted glycerol 3-phosphate dehydrogenase homologs and the glycerol kinase GlcA coordinately adapt to various carbon sources and osmotic stress in *Aspergillus fumigatus*. *G3 (Bethesda)* 8:2291–2299. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200253>
128. Zhang X, Wang Z, Jiang C, Xu JR. Regulation of biotic interactions and responses to abiotic stresses by MAP kinase pathways in plant pathogenic fungi. *Stress Biol.* 2021;1(1):5. Published 2021 Aug 18. doi:10.1007/s44154-021-00004-3
129. Wells JM, Cole RJ, Kirksey JW (1975) Emodin, a toxic metabolite of *Aspergillus wentii* isolated from weevil-damaged chestnuts. *Appl Microbiol* 30(1):26-28. <https://doi.org/10.1128/am.30.1.26-28.1975>
130. Zhou Z, Wu X, Lin Z, Pang S, Mishra S, Chen S (2021) Biodegradation of fipronil: current state of mechanisms of biodegradation and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 105:7695–7708. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11605-3>
131. Zutz C, Gacek A, Sulyok M, Wagner M, Strauss J, Rychli K (2013) Small chemical chromatin effectors alter secondary metabolite production in *Aspergillus clavatus*. *Toxins (Basel)* 5:1723–1741. <https://doi.org/10.3390/toxins5101723>



Nyilvántartási szám: DEENK/305/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bodnár Veronika

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bodnár, V.**, Antal, K., De Vries, R. P., Pócsi, I., Emri, T.: Aspergillus nidulans gfdB, Encoding the Hyperosmotic Stress Protein Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase, Disrupts Osmoadaptation in Aspergillus wentii.
J. Fungi. 10 (4), 1-23, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof10040291>
IF: 4.7 (2022)
2. **Bodnár, V.**, Király, A., Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Karányi, Z., Leiter, É., De Vries, R. P., Pócsi, I.: Species-specific effects of the introduction of Aspergillus nidulans gfdB in osmophilic aspergilli.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 107 ((2023).), 2423-2436, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-023-12384-9>
IF: 5 (2022)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,7

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,7

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.05.27.



10. Tárgyszavak-Keywords

Aspergillus nidulans, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus glaucus*, Ozmofilitás, Környezeti stressz, Oxidatív stressztolerancia, RNS szekvenálás, glicerín-3-foszfát-dehidrogenáz, hiperozmotikus stressz

Aspergillus nidulans, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus glaucus*, Osmophily, Environmental stress, Oxidative stress tolerance, RNA sequencing, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, hyperosmotic stress

11. Köszönetnyilvánítás

Őszinte tisztelettel és mély hálával szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető, egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette nélkülözhetetlen támogatásával és értékes szakmai útmutatásával a doktori munkám elkészítését a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Emri Tamás egyetemi tanárnak, a transzkripciós vizsgálatokban, az RT-qPCR kísérletek elvégzésében, kiértékelésében és a statisztikai vizsgálatokban nyújtott lelkiismeretes szakmai támogatásáért, aki mindig készségesen osztotta meg velem szakmai tudását és tapasztalatait.

Továbbá köszönöm Dr. Leiter Éva egyetemi docensnek a genetikai munkában nyújtott elengedhetetlen segítségét, valamint hasznos szakmai tanácsait.

Szeretném megköszönni Dr. Király Anita laboratóriumi munkák során nyújtott segítségét, hasznos szakmai tanácsait és segítőkészségét.

Köszönettel tartozom Dr. Antal Károly főiskolai docensnek (EKE TTK Állattani Tanszék) a statisztikai kiértékelésért és bioinformatikai munkájáért, a referencia genomokra történő illesztésében nyújtott segítségéért és az illesztett readek számának meghatározásáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Karányi Zsolt tudományos segédmunkatársnak a multidimenzionális analízisekben nyújtott segítségéért.

További köszönettel tartozom Dr. Miskei Mártonnak a statisztikai munkákban nyújtott segítségéért.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Ronald de Vries professzor úrnak (Westerdijk Fungal Diversity Institute, Utrecht, The Netherlands) a kísérletekhez használt vektor rendelkezésünkre bocsátását.

Nagyon köszönöm Tóth Gáborné laboratóriumi asszisztens stresszvizsgálatokban nyújtott odaadó segítségét.

Köszönettel tartozom Pákozdi Klaudia PhD hallgatónak a laboratóriumi munkák során nyújtott szakmai segítségért, valamint Dr. Orosz Erzsébetnek a stresszadatbázissal kapcsolatos segítségéért.

Köszönöm továbbá a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának a szakmai segítségét és támogatását.

A doktori munkám elkészítését az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Az értekezés alapjául szolgáló kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (Magyarország) NN125671 és K131767 számú projektjei támogatták. A TKP2021-EGA-20 sz. projekt a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatásával valósult meg a TKP2021-EGA finanszírozási rendszeren keresztül. A projekt a HUN-REN Magyar Kutatási Hálózat anyagi támogatásában részesült.

12. Melléklet

A jelen értekezés alapjául szolgáló kiegészítő ábrák és táblázatok terjedelmük miatt az eredeti publikációkban is közölt online formátumban kerülnek bemutatásra.

Melléklet 1. táblázat. A tanulmányban használt oligonukleotidok (S1. kiegészítő táblázat).
https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs00253-023-12384-9/MediaObjects/253_2023_12384_MOESM1_ESM.pdf

Melléklet 2. táblázat. Stressztolerancia vizsgálatokból származó standardizált MIC₅₀ értékek és telepátmérők, MDS plot és dendrogram generálásához (S2. kiegészítő táblázat).
https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs00253-023-12384-9/MediaObjects/253_2023_12384_MOESM1_ESM.pdf

Melléklet 3. táblázat. A vizsgálatban használt primer párok (S1. kiegészítő táblázat).
<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

Melléklet 4. táblázat. Az *A. wentii* és az *A. nidulans* tenyészetek RT-qPCR adatai (S2. kiegészítő táblázat).
<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

Melléklet 5. táblázat. A génkészlet-dúsítási elemzések eredményei (S3. kiegészítő táblázat).
<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

Melléklet 6. táblázat. Az *A. nidulans* hiperozmotikus stressz, oxidatív stressz és glicerin metabolizmus génjeinek RNS szekvenálási adatai, valamint az *A. wentii* ortológok RNS szekvenálási adatai (S4. kiegészítő táblázat).
<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

Melléklet 7. táblázat. A kiválasztott gének transzkripciós viselkedése az alkalmazott ozmotikus stressz körülmények között (S5 kiegészítő táblázat).
<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

Melléklet 1. ábra. Az *A. glaucus* 'c *gfdB1* és 'c *gfdB2* törzsek stressz fenotípusai (10 napos inkubáció, 25°C, NMM stressz agar lemezek), (S2 kiegészítő ábra).

https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs00253-023-12384-9/MediaObjects/253_2023_12384_MOESM1_ESM.pdf

Melléklet 2. ábra. Az *A. nidulans* (A) és az *A. wentii* (B) törzsek stresszkezelt és kezeletlen tenyészetéből nyert RNS szekevenálási adatok főkomponens (PC) analízise (S1. kiegészítő ábra).

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

Melléklet 3. ábra. Átfedés az *A. nidulans* THS30 és a Δ *gfdB* törzsek stresszválaszai között (S2. kiegészítő ábra).

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

Melléklet 4. ábra. Átfedés az *A. wentii* CBS141173 és a 'c *gfdB* törzsek stresszválaszai között (S4. kiegészítő ábra).

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

Melléklet 5. ábra. Génkészlet-dúsítási elemzések a szorbit (A), NaCl (B) és NaCl + szorbit (C) kezelések *A. wentii* 'c *gfdB*re gyakorolt hatásáról (S5. kiegészítő ábra).

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof10040291/s1>

13. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények teljes terjedelmükben.