

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

Telefon: +36 62 546-936
Fax: +36 62 544-352
galgoczi@bio.u-szeged.hu
www2.bio.u-szeged.hu/galgoczylab



Dr. Galgóczi László MTA doktora pályázat

Válaszok Prof. Dr. Sipiczki Mátyás bírálatára

Tisztelt Professzor Úr!

Szeretném megköszönni az MTA doktori értekezésem alapos bírálatát, a támogató szavakat, a kritikai észrevételeket és a gondolatébresztő kérdéseket. A kritikai észrevételekre és a kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

A kérdések megválaszolása előtt azonban röviden reflektálnék a dolgozat és a tézisek tartalmi és formai stílusára tett kritikai megjegyzésekre.

Elnézést kérek a tézisekben előforduló gyakori stílus, nyelvtani és gépelési hibákért. A tézisek megírása több odafigyelést és utólagos ellenőrzést igényelt volna.

A terjedelem csökkentése érdekében gyakran nem az eredeti közleményeket idéztem, hanem az azokat összefoglaló áttekintő cikkekre támaszkodtam. Az irodalmi bevezető elkészítése során elsősorban ezt a megközelítést választottam, mivel ezek az összefoglaló közlemények egy-egy kutatócsoport eredményeit rendszerint más csoportok eredményeivel összefüggésben mutatják be, és ezekből új, általános következtetéseket vonnak le. Ez jelentősen megkönnyítette a szerteágazó eredmények tárgyalását és a következtetések levonását. Ha az irodalmi bevezető írásakor nem ezt a módszert alkalmazom, akkor az idézett mintegy 300 közlemény száma akár kétszeresére vagy háromszorosára is emelkedhetett volna.

A dolgozatban azoknak a módszereknek a lényegi elvét ismerttettem, amelyek nem tartoznak szorosan a mikrobiológia és biotechnológia területén általánosan alkalmazott eljárások közé. Úgy véltem, ezek rövid bemutatása hozzájárul a könnyebb érthetőséghez. Az, hogy bizonyos módszerek ismertetése gyakran csupán felsorolássá egyszerűsödött, elsősorban terjedelmi okokra vezethető vissza. A gyakran multi- és interdiszciplináris jellegű kutatómunka során alkalmazott számtalan technika részletes bemutatása az anyagok és módszerek fejezet terjedelmét jelentősen megnövelte volna, ezért láttam célszerűnek, hogy inkább az ezeket bemutató közleményekre hivatkozzak. Ellenőriznem kellett volna, hogy ezek a hivatkozott források mindegyike valóban tartalmazza-e a módszerek részletes leírását, és nem csupán más közleményekre utalnak vissza. Ezért a figyelmetlenségért elnézést kérek.

Mindezek után rátérnék a kérdések megválaszolására.

1. A biokontrol fejezet meglehetősen szűkkeblűen tekinti át a hatalmas szakirodalmat. Talán nem is indokolt több figyelmet szentelni ennek a területnek ebben az értekezésben, mivel a vizsgált NRRL 181 izolátum nem tűnik ígéretes biokontrol ágensnek. Pontosabban fogalmazva, ez az alkalmazási lehetőség kevés figyelmet kapott az értekezésben. Lát a szerző lehetőséget az izolátum sejtjeinek vagy konídiumainak felhasználására a növényvédelemben?

Válasz: A kérdés alátámasztására kijelenthetjük, hogy számos *Aspergillus* faj biológiai növény- és terményvédelmi potenciállal rendelkezik különféle mechanizmusokon keresztül, beleértve az antimikrobiális metabolitok termelését (Ngo és mtsai. 2021), a kompetitív gátlást, valamint a mikotoxinok lebontását (Khan és mtsai. 2021). A gyakorlati alkalmazásra jó példa az *Aspergillus japonicus* és az *Aspergillus niger*, amelyek hatékonynak bizonyultak a babnövényeket fertőző *Sclerotinia sclerotiorum* elleni védekezésben, jelentősen csökkentve a betegség előfordulását mind üvegházi kísérletek során (Atallah és mtsai. 2022). Hasonló kísérletek keretében mindenképpen érdemes lenne megvizsgálni az *Aspergillus (Neosartorya) fischeri* NRRL 181 izolátum biokontroll-potenciálját. Amennyiben a biokontroll-hatékonyságot az NFAP és NFAP2 antifungális fehérjék termeléséhez kötnénk, az izolátum alkalmassága kérdésessé válhat, mivel jelenleg nem ismert, hogy növényvédelmi körülmények között termeli-e ezeket a fehérjéket, illetve ha igen, akkor vajon olyan mennyiségben, amely elegendő a növénykórokozó gombák elleni hatékony fellépéshez. Annak ellenére, hogy az *A. (N.) fischeri* elsősorban szaprofitaként ismert, gyakran rothadó élelmiszereken is megjelenik, különösen olyan gyümölcsökön, amelyeket a talaj közelében vagy közvetlenül a földről szüretelnek, ami ellentmond termőföldi alkalmazásának (Beuchat 1986). Másrészt az *A. (N.) fischeri* mikotoxinokat termel, mint például a verrucologen, valamint a fumitremorgin A és B. Ezek neurotoxikusak, és állatkísérletekben izomrángásokat és görcsrohamokat idéztek elő sertéseknél és juhoknál (Nielsen és mtsai. 1988). Véleményem szerint mindezek a tények ellentmondanak annak, hogy az *A. (N.) fischeri* NRRL 181 izolátumot közvetlen biokontroll ágensként alkalmazzuk.

2. Számos élesztőgomba termel olyan peptideket, amelyek más élesztőket, esetenként fonalas gombákat és baktériumokat is tudnak gátolni. Közöttük vannak olyanok, a killer-faktorok (zymocinek), amelyek sokban emlékeztetnek az értekezés Irodalmi áttekintésében felsoroltakra (pl. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2024.03.003>). Miért nem tekinthetők AFPknek?

Válasz: A dolgozatban tárgyalt, Eurotiomycetes-eredetű antifungális proteinek (AFP-k) és az élesztők által termelt killer toxinok között számos különbség figyelhető meg, amelyek alapján az utóbbiak vélhetően nem sorolhatók a klasszikus értelemben vett, gombák által termelt AFP-k közé. A killer toxinok (pl. a *Kluyveromyces lactis* által termelt zymocin) riboszómálisan szintetizált fehérjetoxinok, amelyeket leggyakrabban citoplazmatikus elemek, pl. dsRNS-vírusok vagy plazmidok kódolnak. Ezen toxinok általában specifikus receptorokat céloznak meg más gombasejteken, és gyakran a tRNS-ek hasításával vagy a membrán integritásának

megbontásával idézik elő a sejthalált (Billerbeck és mtsai. 2024). Ezzel szemben a klasszikus értelemben vett gomba AFP-k (mint például a dolgozatban is tárgyalt *Aspergillus* és *Penicillium* fajokból származók) kivétel nélkül a nukleáris genomban kódolt molekulák, amelyek gyakran a gombák membránjaihoz vagy sejtfalához kötődnek, és általában az ionháztartás megzavarásával vagy apoptózis indukció révén fejtik ki hatásukat (Holzknecht és Marx 2024). A killer toxinok többnyire glikoproteinek vagy multimer fehérjekomplexek, szűk spektrumú hatással és elsősorban más élesztőfajokat céloznak meg (Schaffrath és mtsai. 2018). A klasszikus értelemben vett gomba AFP-k kisméretű, ciszteinben gazdag, kationos fehérjék, a killer toxinokénál szélesebb spektrumú gombaellenes aktivitással és elsősorban más fonalgomba fajok ellen hatnak (Holzknecht és Marx 2024). Összefoglalva elmondható, hogy bár mindkét molekulacsoport antifungális aktivitással rendelkezik, eredetük, célpontjaik és hatásmechanizmusuk jelentős eltéréseket mutat. Ezek a különbségek indokolják a közöttük tett megkülönböztetést. Ugyanakkor, ha kizárólag a biológiai hatás kimenetelét vesszük figyelembe, mindkettőt nevezhetjük AFP-nek.

3. Az AFP-k, beleértve az értekezésben bemutatottakat is, más gombákat tudnak gátolni. Minek köszönhető, hogy saját magukat nem károsítják? Úgy tűnik, hogy arra az élesztőre (*Pichia pastoris*) és arra a fonalgombára (*Penicillium chrysogenum*) sem hatnak hátrányosan, amelyeknek az expressziós rendszerét használták a termeltetésükre. Egy másik élesztőre a *Candida albicans*-ra, viszont hatnak. Lehet sejteni a különbség okát?

Válasz: Sokáig azt feltételezték, hogy a termelő gombák teljesen ellenállóak a saját antifungális fehérjéik (AFP) hatásával szemben, feltehetően a sejtmembránjuk sajátos összetétele vagy valamilyen védelmi mechanizmusa miatt (Theis és mtsai 2003, Marx 2004, Meyer 2008, Binder és mtsai. 2010a, 2010b). Ugyanis a gombasejt membránja számos AFP számára kulcsfontosságú célpontot jelent, viszont a membrán lipidösszetétele, elsősorban bizonyos típusú glükoszilceramidok jelenléte, befolyásolhatja a gombák érzékenységet az AFP-kkel szemben. Az AFP-termelő gombák evolúciós úton olyan membránösszetételt alakíthattak ki, amelyek nem vagy kevésbé teszik őket érzékennyé a saját AFP-kel szemben (Paege és mtsai. 2019). Másrészről a gombák számos sejtszintű mechanizmussal rendelkeznek a stresszhatások és sejtkárosodások kivédésére. Egyes fajok esetében evolúciós úton kialakulhattak olyan specifikus válaszreakciók, mint például a fokozott kitinszintézis vagy a sejtfal integritási útvonalaik aktiválása, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy ellensúlyozzák saját AFP-k hatásait (Hagen és mtsai. 2007, Wang és mtsai. 2025). Továbbá, a gombák előállíthatnak olyan effektor fehérjéket, amelyek képesek az AFP-khez kötődni, ezáltal módosítani azok aktivitását, vagy akár eltávolítani őket a sejtmembrán közeléből. Ez a mechanizmus lehetővé teszi számukra, hogy megvédjék saját sejtjeiket az általuk termelt AFP-k hatásaitól (Wang és mtsai. 2025). Későbbi kutatások rámutattak arra, hogy a termelő gombafajok bizonyos fejlődési szakaszaikban érzékenyek lehetnek a saját AFP-kre. Ez az érzékenység összefüggésbe hozható az AFP-knek a natív termelő gombában kifejtett biológiai hatásaival (Meyer és Jung 2018). A dolgozatban is említésre kerül, hogy a *Penicillium chrysogenum* által termelt PAF szerepet

játszik a konídiogenezis megindításában, valamint az apoptózis és az autofágia indukciójában bizonyos biomasszatömeg elérését követően, éhezési körülmények között (Hegedüs és mtsai. 2011). Az *Aspergillus niger* AnAFP, illetve az *Aspergillus giganteus* AFPg esetében feltételezték, hogy ezek a fehérjék szintén hozzájárulhatnak az autofágia aktivációjához tápanyaghiányos állapotban (Paege és mtsai. 2016, Meyer és Jung 2018), amelyet egy idén közölt tanulmány kísérletesen is megerősített (Starke és mtsai. 2025). A *Penicillium digitatum* által szekretált AfpB szabályozott sejthalált idéz elő a termelő gombában, és valószínűleg szerepet játszik a populáció denzitásának szabályozásában (Gandía és mtsai. 2019, Bugeda és mtsai. 2020). Ezek az eredmények összességükben cáfolják azt a korábbi feltételezést, miszerint az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k nem képesek károsítani az őket termelő gombát. Ugyanakkor léteznek kivételek, pl. a *Penicillium expansum* által szekretált PeAfpA nem vált ki sejthalált a natív termelőben (Roperó-Pérez és mtsai. 2024).

Annak az oka, hogy az NFAP és NFAP2 nem hat hátrányosan a rekombináns termelésük megvalósítására alkalmazott gombákra elsősorban a termeléshez alkalmazott tápközegek összetételéből, valamint a termelt fehérjék mennyiségéből ered. Általánosan megfigyelhető, hogy a nagy ionerősségű tápközegek csökkentik a pozitív töltésű antifungális fehérjék hatékonyságát, mivel a közegben jelen lévő kationok versengenek a fehérjékkel a gomba sejtmembrán negatív töltésű helyeiért (Marx 2004, Meyer 2008). A termeltetésre használt két tápközeg, a *Pichia pastoris* (újabbán *Komagataella phaffii*) KM71H - *Buffered minimal methanol medium* (BMM) és a *Penicillium chrysogenum* Q176 - *P. chrysogenum minimal medium* (PcMM) összetételükből (ld. a válsz végén) adódóan nagy ionerősségű tápközegben számít. A termelt fehérjemennyiség mg/l szintű hozama nem éri el az adott fehérjék minimális gátló koncentrációját (MIC), amit ezekben a tápközegekben a termelő gombákkal szemben mutatnak (**1. táblázat**).

1. táblázat: Az NFAP és NFAP2 rekombináns termelésére alkalmazott gombatörzsek érzékenysége mikrodilúciós tesztben (72 óra, 25°C – *Penicillium chrysogenum* és 48, 30°C óra *Pichia pastoris*, 2×10^4 konídium/ml, illetve sejt/ml) a két antifungális protein termelésére alkalmazott tápközegben.

	MIC (µg/ml)	Tápközeg
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176		
NFAP	> 50	PcMM
NFAP2	> 50	
<i>Pichia pastoris</i> KM71H		
NFAP	> 50	BMM
NFAP2	50	

BMM: *buffered minimal methanol medium* - puffertelt minimál metanol tápoldat; MIC: *minimum inhibitory concentration* - minimális gátló koncentráció, PcMM: *Penicillium chrysogenum minimal medium* - *Penicillium chrysogenum* minimál tápoldat. MIC: Növekedés $\leq 5\%$ OD₆₀₀ érték alapján, amennyiben a kezeletlen kontrollé 100%.

Megjegyzendő, hogy a *P. chrysogenum* Q176 törzs az AFP-termeléshez alkalmazott inkubációs körülmények között a 96–148. óra között autolízisen megy keresztül, éppen abban az

időintervallumban, amikor a tenyészet felülúszójából a legnagyobb mennyiségű rekombináns AFP detektálható (nem közölt adat).

Utólagos pontosításként szeretnék elnézést kérni azért, hogy a dolgozat 9. táblázatában a hozam tévesen mg/ml mértékegységben szerepel, noha a szövegben végig következetesen a helyes mg/l mértékegység került alkalmazásra.

A válaszban említett tápoldatok összetevői:

- BMM: 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 puffer pH=6*, 1,34% (m/V) *Yeast Nitrogen Base*, 200 mg/l biotin, 0,5% (V/V) metanol.

* K_2HPO_4/KH_2PO_4 puffer (pH=6): 174 g/l K_2HPO_4 , 136 g/l KH_2PO_4 .

- PcMM: 2% (m/V%) szacharóz, 0,3% (m/V%) $NaNO_3$, 0,05% (m/V%) KCl, 0,05% (m/V%) $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,005% (m/V%) $FeSO_4 \times 7 H_2O$, 0,25% (V/V%) 1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 puffer (pH 5,8)*, 0,01% (V/V%) nyomelemoldat**

* K_2HPO_4/KH_2PO_4 puffer (pH 5,8): 174 g/l K_2HPO_4 , 136 g/l KH_2PO_4 .

**Nyomelemoldat: 0,1% (m/V%) $FeSO_4 \times 7 H_2O$, 0,9% (m/V%) $ZnSO_4 \times 7 H_2O$, 0,4% (m/V%) $CuSO_4 \times 5 H_2O$, 0,01% (m/V%) $MnSO_4 \times H_2O$, 0,01% (m/V%) H_3BO_3 , 0,01% (m/V%) $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$.

4. A Szerző az AFP-k egyik előnyének tartja, hogy velük szemben „minimális eséllyel alakul ki rezisztencia”. Például azért, mert „egyszerre több gombaspecifikus célpontot is támadhatnak eltérő mechanizmussal.” Az állítás alátámasztására számos review cikket idéz, de nem mutat be példát ilyen több-támadáspontú hatást kifejtő AFP-re. Milyen példák ismertek, és azok mennyire fehérje-specifikusak, illetve mennyire általánosíthatók?

Válasz: Az antifungális proteinek és peptidek (AFP-k) többféle módon képesek hatni a gombák ellen. Egyik és leggyakrabban megfigyelt hatásmechanizmus a membránkárosítás, vagyis amikor az AFP a sejtmembrán integritásának a megbontásával sejttartalom-szivárgást idéz elő (pl. lasiocepsin, portonectin). Gyakori hatásmód még a sejtfal kiépülésének a megakadályozása glükán (pl. echinocandin, neopeptin) vagy kitin bioszintézis gátláson keresztül (pl. nikkomycin, aureobasidin A). Egy másik hatásmód a DNS-, RNS- vagy fehérjeszintézis és más sejtfunkciók megzavarása intracelluláris célpontok (enzimek vagy organellumok) gátlásán keresztül (pl. lactoferrin, histatin 5). Következő gyakori hatásmód még az oxidatív stressz kiváltása reaktív oxigéngyökök (ROS) termelésének az indukciójával, ami sejtkárosodáshoz végül apoptózishoz vezet (pl. coprisin, histatin 5) (Buda De Cesare és mtsai. 2020, Gong és mtsai. 2024). Nem szorosan tartozik ide, de érdemes megemlíteni az immunmodulációt, azt hogy egyes AFP-k képesek fokozni a gazdaszervezet természetes védekező mechanizmusait is (pl. LL-37, histatin 5) (Buda De Cesare és mtsai. 2020, Li és mtsai. 2021). Amennyiben egyetlen peptid kettő vagy több ilyen mechanizmust egyesít, azt kettős illetve többes támadáspontú/hatásmechanizmusú peptidként tartjuk számon, amely tulajdonság jelentősen hozzájárulhat a hatékonyság fokozásához és a rezisztencia kialakulásának megelőzéséhez

(Girdhar és mtsai. 2024). Ilyen AFP-kre a teljesség igénye nélkül a **2. táblázat** tartalmaz példákat. Amint a **2. táblázatból** is kitűnik ezek a hatásmódok nem feltétlenül specifikusak egy-egy AFP-re. Például a sejtmembrán roncsolása és az apoptózishoz vezető ROS indukció számos növényi defenzin esetében is megfigyelhető kettős hatásmód.

2. táblázat: Példák kettős vagy többes támadáspontú/hatásmódú természetes eredetű antifungális peptidekre (AFP).

AFP	Eredet	Hatásmód	Hivatkozás
Állat			
Drosomycin	<i>Drosophila melanogaster</i>	Sejtmembrán-roncsolás + sejtfa	Fehlbaum és mtsai. 1994
Histatin 5	Humán nyál	Mitochondrium károsítás + ROS indukció – apoptózis + intracelluláris protein funkciógátlás (Ssa1p hősokk protein)	Helmerhorst és mtsai. 2001, Li és mtsai. 2003
Lactoferricin	Tehéntej	Sejtmembrán-roncsolás + ion kelátolás + DNS-, RNS-, proteinszintézis gátlás	Gruden és Poklar Ulrih 2021
Protegrin	Sertés fehérvérsejt	Sejtmembrán-roncsolás + intracelluláris célpontok gátlása	Ranade és Ramalingam 2020
Tritrpticin	Sertés neutrofil granulociták	Sejtmembrán-roncsolás + DNS károsítás + intracelluláris célpontok gátlása	Yang és mtsai. 2006
Növény			
DmAMP1	<i>Dahlia merckii</i>	Sejtmembrán-roncsolás+ protein bioszintézis gátlás	Thevissen és mtsai. 2000
MtDef4 és származékai	<i>Medicago truncatula</i>	Sejtmembrán-roncsolás + intracelluláris célpontok	Tetorya 2023
MtDef5B	<i>Medicago truncatula</i>	Sejtmembrán-roncsolás + ROS indukció - apoptózis + sejtmagi célpontok	Kalunke és mtsai. 2025
Psd1	<i>Pisum sativum</i>	Sejtmembrán-roncsolás + magi DNS károsítás	Almeida és mtsai. 2000
RsAFP2	<i>Raphanus sativus</i>	Sejtmembrán-roncsolás + ROS indukció - apoptózis	Thevissen és mtsai. 1999
Gomba			
AFPg	<i>Aspergillus giganteus</i>	Sejtmembrán-roncsolás + kitinszintézis gátlás	Meyer 2008
AnAFP	<i>Aspergillus niger</i>	Sejtmembrán-roncsolás + ROS indukció - apoptózis	Starke és mtsai. 2025
Efe-AFP	<i>Epichloë festucae</i>	Sejtmembrán-roncsolás + ROS indukció - apoptózis	Fardella 2024
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Apoptózis + Ca ²⁺ -egyensúly felborulás	Fizil és mtsai. 2018
PgAFP	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Sejtmembrán-roncsolás + ionhomeosztázis megzavarása + programozott sejthalál	Wang és mtsai. 2025

Összességében elmondható hogy a legtöbb AFP hasonló hatásmechanizmusokat alkalmaz a gombasejtek elpusztítására. A fentebb ismertetett hatásmódok közül ide sorolható a negatív töltésű gombamembránokhoz való kötődés révén létrejövő membránkárosítás, a mitochondrium funkciójának károsítása, a sejtfa kiépülésének a megzavarása elsősorban a β -glükán-szintézis

gátlásával, továbbá az apoptózishoz vezető ROS-termelés indukciója. Ezek általánosan jellemző tulajdonságok, és nem tekinthetők specifikusnak egyetlen AFP-re nézve sem (van der Weerden és mtsai. 2013, Gong és mtsai. 2024). A **2. táblázat** adatai alapján inkább az AFP-k eredete szolgálhat alapul a hatásmódok közti különbségtételhez.

E kérdéskör kapcsán szeretném megjegyezni, hogy egy jelenleg bírálat alatt álló kéziratunkban beszámolunk arról, hogy az NFAP2 kettős hatásmechanizmust mutat *Candida albicans*-szal szemben: Minimális gátló koncentráción (*minimum inhibitory concentration*, MIC) alkalmazva az NFAP2 specifikus sejtmembrán-roncsoló hatás révén gyorsan elpusztítja a gombasejteket (ahogyan az a dolgozatban is szerepel) (Pavela és mtsai. 2024). Ezzel szemben, ha a fehérjét MIC alatti értéken alkalmazzuk, az nem idéz elő azonnali sejtpusztulást, hanem a gomba növekedését lassítja. Ennek hátterében az állhat, hogy az NFAP2 a vakuólumokban internalizálódik, majd onnan felszabadulva csökkenti a sejtek metabolikus aktivitását a glutamát-dekarboxilázzal, az ATP-szintáz alfa alegységével és az enoláz 1-gyel való kölcsönhatás révén. Feltételezhető, hogy ez a kettős hatásmechanizmus hozzájárulhat ahhoz a megfigyeléshez, miszerint a *C. albicans* korlátozott képességgel rendelkezik erőteljes rezisztenciamechanizmusok kialakítására az NFAP2-vel szemben. Ez utóbbról részletesen egy, a dolgozat leadása után megjelent publikációnkban számoltunk be (Bende és mtsai. 2025).

Legvégül szeretném ismét megköszönni Prof. Dr. Sipiczki Mátyásnak az MTA doktori értekezésem pozitív bírálatát, az értékes kritikai észrevételeket és az elgondolkodtató kérdéseket.

Szeged, 2025. július 03.



Dr. Galgóczi László Norbert

Irodalomjegyzék

- Almeida MS, Cabral KM, Zingali RB, Kurtenbach E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch Biochem Biophys*. 2000;378:278–286.
- Atallah OO, Mazrou YSA, Atia MM, Nehela Y, Abdelrhim AS, Nader MM. Polyphasic characterization of four *Aspergillus* species as potential biocontrol agents for white mold disease of bean. *J Fungi (Basel)*. 2022;8:626.
- Bende G, Zsindely N, Laczi K, Kristóffy Z, Papp C, Farkas A, és mtsai. The *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein NFAP2 has low potential to trigger resistance development in *Candida albicans* *in vitro*. *Microbiol Spectr*. 2025;13:e0127324.
- Beuchat LR. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. *J Food Sci*. 1986;51:1506–1510.
- Billerbeck S, Walker RSK, Pretorius IS. Killer yeasts: expanding frontiers in the age of synthetic biology. *Trends Biotechnol*. 2024;42:1081–1096.
- Binder U, Oberparleiter C, Meyer V, Marx F. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 2010a;75:294–307.
- Binder U, Chu M, Read ND, Marx F. The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 2010b;9:1374–1382.
- Buda De Cesare G, Cristy SA, Garsin DA, Lorenz MC. Antimicrobial peptides: a new frontier in antifungal therapy. *mBio*. 2020;11:e02123-20.
- Bugeda A, Garrigues S, Gandía M, Manzanares P, Marcos JF, Coca M. The antifungal protein AfpB induces regulated cell death in its parental fungus *Penicillium digitatum*. *mSphere*. 2020;5:e00595-20.
- Fardella P. Harnessing antifungal proteins from fungi to protect plants: a review of the *Epichloë festucae* antifungal protein Efe-AfpA. *Grass Res*. 2024;4:e003.
- Fehlbaum P, Bulet P, Michaut L, Lagueux M, Broekaert WF, Hetru C, Hoffmann JA. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J Biol Chem*. 1994;269:33159–3363.
- Fizil Á, Sonderegger C, Czajlik A, Fekete A, Komáromi I, Hajdu D, és mtsai. Calcium binding of the antifungal protein PAF: Structure, dynamics and function aspects by NMR and MD simulations. *PLoS One*. 2018;13:e0204825.
- Gandía M, Garrigues S, Hernanz-Koers M, Manzanares P, Marcos JF. Differential roles, crosstalk and response to the antifungal protein AfpB in the three mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Fungal Genet Biol*. 2019;124:17–28.
- Girdhar M, Sen A, Nigam A, Oswalia J, Kumar S, Gupta R. Antimicrobial peptide-based strategies to overcome antimicrobial resistance. *Arch Microbiol*. 2024;206:411.
- Gong Y, Xue Q, Li J, Zhang S. Antifungal peptides from living organisms. *Front Microbiol*. 2024;15:1511461.
- Gruden Š és Poklar Ulrih N. Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides. *Int J Mol Sci*. 2021;22:11264.
- Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:2128–2134.

- Hegedűs N, Sigl C, Zadra I, Pócsi I, Marx F. The *paf* gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. J Basic Microbiol. 2011;51:253–262.
- Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:14637–1442.
- Holzknacht J és Marx F. Navigating the fungal battlefield: cysteine-rich antifungal proteins and peptides from Eurotiales. Front Fungal Biol. 2024;5:1451455.
- Khan R, Ghazali FM, Mahyudin NA, Samsudin NIP. Biocontrol of aflatoxins using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: A literature review. J Fungi (Basel). 2021;7:381.
- Kalunke RM, Pokhrel A, Tetorya M, Godwin J, Nath VS, Czymmek KJ, és mtsai. Modes of action and bio-fungicide potential of peptides derived from the bi-domain plant defensin MtDef5. J Exp Bot. 2025:eraf166.
- Li XS, Reddy MS, Baev D, Edgerton M. *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. J Biol Chem. 2003;278:28553–28561.
- Li T, Li L, Du F, Sun L, Shi J, Long M, és mtsai. Activity and mechanism of action of antifungal peptides from microorganisms: A review. Molecules. 2021;26:3438.
- Marx F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;65:133–142.
- Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;78:17–28.
- Meyer V és Jung S. Antifungal peptides of the AFP family revisited: Are these cannibal toxins? Microorganisms. 2018;6:50.
- Ngo MT, Van Nguyen M, Han JW, Kim B, Kim YK, Park MS, és mtsai. Biocontrol potential of *Aspergillus* species producing antimicrobial metabolites. Front Microbiol. 2021;12:804333.
- Nielsen PV, Beuchat LR, Frisvad JC. Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. Appl Environ Microbiol. 1988;54:1504–1510.
- Paeye N, Jung S, Schäpe P, Müller-Hagen D, Ouedraogo JP, Heiderich C, és mtsai. A transcriptome meta-analysis proposes novel biological roles for the antifungal protein AnAFP in *Aspergillus niger*. PLoS One. 2016;11:e0165755.
- Paeye N, Warnecke D, Zäuner S, Hagen S, Rodrigues A, Baumann B, és mtsai. Species-specific differences in the susceptibility of fungi to the antifungal protein AFP depend on C-3 saturation of glycosylceramides. mSphere. 2019;4:e00741-19.
- Pavela O, Juhász T, Tóth L, Czajlik A, Batta G, Galgóczy L, és mtsai. Mapping of the lipid-binding regions of the antifungal protein NFAP2 by exploiting model membranes. J Chem Inf Model. 2024;64:6557–6569.
- Ranade SS és Ramalingam R. A review on bioactive porcine peptide, protegrin-1. Int J Pept Res Ther. 2020;26: 1493–1501.
- Ropero-Pérez C, Moreno-Giménez E, Marcos JF, Manzanares P, Gandía M. Studies on the biological role of the antifungal protein PeAfpA from *Penicillium expansum* by functional gene characterization and transcriptomic profiling. Int J Biol Macromol. 2024;266:131236.
- Schaffrath R, Meinhardt F, Klassen R. Yeast killer toxins: Fundamentals and applications. In: Physiology and Genetics. The Mycota, vol 15. (Szerk.: Anke, T., Schöffler, A) Springer, Cham, Németország (2018): 87–118.

- Starke S, Velleman L, Dobbert B, Seibert L, Witte J, Jung S, és mtsai. The antifungal peptide AnAFP from *Aspergillus niger* promotes nutrient mobilization through autophagic recycling during asexual development. *Front Microbiol.* 2025;15:1490293.
- Tetorya M, Li H, Djami-Tchatchou AT, Buchko GW, Czymmek KJ, Shah DM. Plant defensin MtDef4-derived antifungal peptide with multiple modes of action and potential as a bio-inspired fungicide. *Mol Plant Pathol.* 2023;24:896–913.
- Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U. The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:588–593.
- Thevissen K, Terras FR, Broekaert WF. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:5451–5458.
- Thevissen K, Osborn RW, Acland DP, Broekaert WF. Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Mol Plant Microbe Interact.* 2000;13:54–61.
- van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:3545–3570.
- Wang Y, Wang S, Chen Y, Xie C, Xu H, Lin Y, és mtsai. The role of Npt1 in regulating antifungal protein activity in filamentous fungi. *Nat Commun.* 2025;16:2850.
- Yang ST, Shin SY, Hahm KS, Kim JI. Different modes in antibiotic action of tritrypticin analogs, cathelicidin-derived Trp-rich and Pro/Arg-rich peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758:1580–1586.