

RIPORTER RENDSZER LÉTREHOZÁSA A *TRICHODERMA REESEI* PEPTAIBOL SZINTETÁZ EXPRESSZIÓJÁNAK ANALÍZISÉHEZ

Sándor Erzsébet¹ – Bernhard Seiboth² – Karaffa Levente³ – Fekete Erzsébet³ – Irinyi László¹ – Kövics György J.¹ – Christian P. Kubicek²

¹Debreceni Egyetem, Agrártudományi Centrum, Mezőgazdaságtudományi Kar, Növényvédelmi Tanszék

²TU Vienna, Institute of Chemical Engineering, Division Applied Biochemistry and Gene Technology, Austria

³Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

Bevezetés, Irodalmi áttekintés

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó talajlakó fonalas gombákat több mint 70 éve tanulmányozzák. Ennek oka részben az, hogy a növénypatogén gombák elleni biológiai védekezés (biokontroll) talán legígéretesebb fegyvereinek számítanak (Kubicek és mtsai, 2001). Napjainkban már kereskedelmi forgalomban is kaphatók különböző *Trichoderma* törzseket tartalmazó készítmények (pl. PlantShield HC, Trichodex, Soilgard 12G, Primastop), melyek elvileg lehetőséget adnak a fungicid-hatású vegyszerek mellőzésére, vagy csökkentett mértékű használatára (Hjeljord és Tronsmo, 1988).

A növénykórokozók elleni biológiai védekezés a növénytermesztésben vonzó alternatívája a kemikáliák használatának, amely gyakran környezetszennyezési problémákkal jár, ráadásul egyre gyakrabban figyelhető meg a különböző fungicidekkel szemben rezisztens törzsek megjelenése is. Számos *T. harzianum* törzset tartalmazó biopeszticidet használnak a biológiai védekezésben, mivel hatékony parazitája sok gazdaságilag fontos növénypatogén gombának (pl. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Pytium* spp., *Botrytis cinerea*). A biokontroll törzsek alkalmazásának hatékonyságát nem könnyű megjósolni, ezért egyelőre szerény versenytársai csak a különböző kemikáliáknak (Harman és Björkman, 1998; Hjeljord és Tronsmo, 1988). A mikoparazitizmus folyamatának molekuláris szintű megismerése mindenképpen elősegíti a *Trichoderma* törzsek eredményesebb és megbízhatóbb felhasználását a biológiai védekezésben.

A mikoparazita *Trichoderma* fajok a fitopatogén gombákat többlépcsős folyamat során pusztítják el, amiben sejtfalbontó enzimek mellett a termelt antibiotikumok – köztük a peptaibolok – is szerepet játszanak (Lorito és

mtsai, 1996). Feltételezések szerint a sejtfalbontó enzimek, pl. a kitinázok csökkentik a parazitált gomba sejtfalának merevségét (rigiditását), míg a peptaibol antibiotikumok gátolják a membránhoz kötött enzimeket. Ezek közé az enzimek közé tartoznak a sejtfal-komponensek szintetázai, így a parazitált gomba javító („repair”) enzimeit nem képesek ellensúlyozni a sejtfalbontó enzimek hatását (Kubicek és mtsai, 2001).

A peptaibolok olyan gombák által termelt lineáris polipeptidek, melyek 7-20 aminosavból állnak, és közös jellemzőjük, hogy (i) viszonylag nagy arányban található bennük egy „abnormális” aminosav, az α -amino izobutánsav, (ii) N-terminális részükön alkil-csoport (általában acetyl), (iii) C-terminális részükön amino-alkohol (pl. fenilalaninol vagy leucinol) található (Rebuffat és mtsai, 1999). A peptid típusú antibiotikumok közé tartozó peptaibolokat kizárólag gombák, köztük a *Trichoderma*, *Hypocrea*, *Gliocladium*, *Acromonium* nem fajtái termelik (Degencolb és mtsai, 2003). A peptaibolok a membránokat permeabilizálják.

A peptaibolok a nem riboszómán szintetizálódó polipeptidek közé tartoznak. *T. virens*-ből a közelmúltban klónoztak egy peptaibol szintáz enzimet kódoló szekvenciát (*tex1*). A *tex1* 62,8 kb hosszúságú, intron nélküli „open reading frame”, amely 18 peptid szintáz modulból, valamint egy-egy, az N- és C-terminális részen található, fehérjét módosító doménből áll (Wiest és mtsai, 2002).

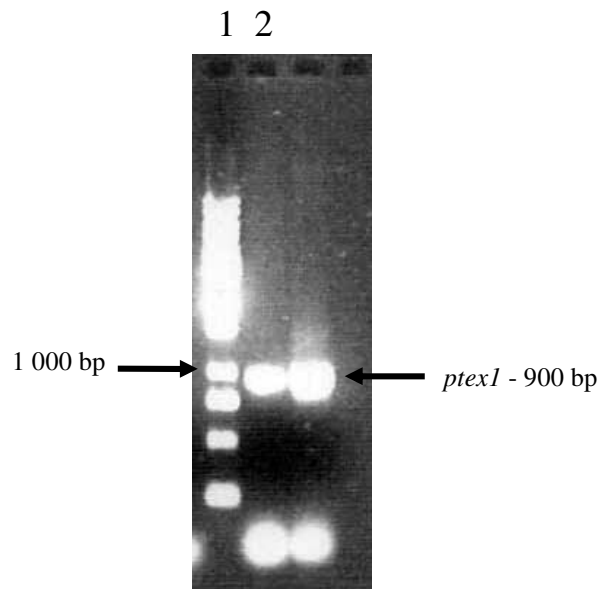
Tervezett munkánk célja megvizsgálni egy könnyen transzformálható, régóta tanulmányozott, peptaibolt termelő mikoparazita *Trichoderma* törzs, a *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) peptaibol termelését befolyásoló tényezőket, és felderíteni a bioszintézis molekuláris szintű szabályozását. Mivel a biológiai védekezésben használt fajok legtöbbször nehezen transzformálható (C.P. Kubicek személyes közlése), a vizsgálatokhoz egy könnyen transzformálható, hosszú ideje tanulmányozott és peptaibolt is termelő (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol>), korábban már általunk is vizsgált (Seiboth és mtsai, 2002) *Trichoderma* fajt, a *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) *pyr4* – (uridin prototróf) TU 6 törzsét használjuk majd, amely szintén igen aktív a növénypatogén (pl. *Pythium*) fajokkal, szemben (C.P. Kubicek, nem publikált eredmény).

Eredmények

A génexpresszió Northern analízissel történő vizsgálatát az intront nem tartalmazó *tex1* gén szokatlan nagysága miatt (csaknem 63 kb) elvetettük. A további vizsgálatokhoz egy riporterrendszert hoztunk létre, amelyben a peptaibol szintetáz kódoló *tex1* promóter szekvenciája után egy riporter gént, nevezetesen az *Aspergillus niger* glükóz oxidáz génjét (*goxA*) ültettünk be. A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó vad típusú fajok közös

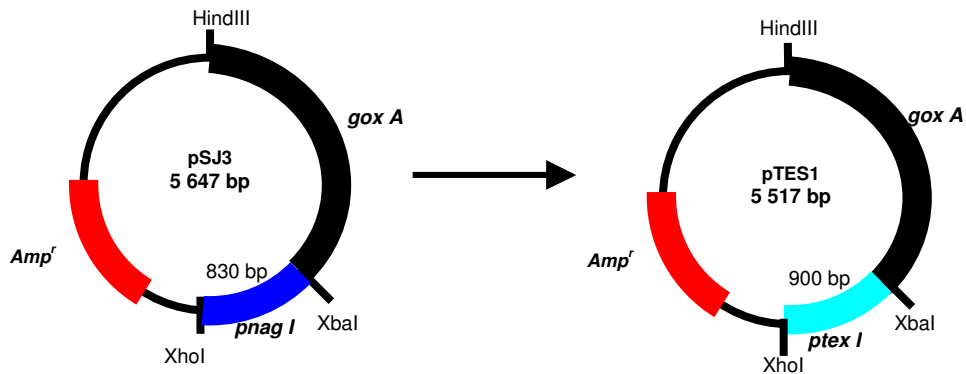
jellemvonása, hogy nem rendelkeznek glükóz oxidáz aktivitással (Mach és mtsai, 1999).

Első lépésként megkerestük a *T. virens* *tex1* génjéhez nagyon hasonló, peptaibol szintetáz kódló szekvenciát a *T. reesei* genomjában. Ezt követően a kódló résztől 5' irányban található 900 bp-nyi, a promóter régiót tartalmazó szakaszt PCR-el felszaporítottuk (1. ábra).



1. ábra: a *ptex1* amplifikációja PCR-el 50 (1) és 55 (2) °C-os anellációs hőmérsékleten

A pTES1 plazmid létrehozásához a *tex1* promóter régiót tartalmazó fragmentumot (*ptex1*) a megfelelő restrikciós hasító-helyek segítségével „kicseréltük” a pSJ2 plazmid *pnag1* szakaszával (2. ábra).



2. ábra: A pTES1 plazmid létrehozásának vázlata

A *T. reesei* protoplasztokat kotranszformáltuk a *tex1*-promoter:*goxA* fúziót tartalmazó pTES1 plazmiddal és a *pyr4* génnel PEG 6000 jelenlétében. Az így létrejött uridin auxotróf transzformánsok további szelektálásával kiválasztottuk a megfelelő *tex1*-promoter:*goxA* fúziót is tartalmazó *T. reesei* törzset.

A transzformáns segítségével a továbbiakban vizsgálni fogjuk a peptaibol-termelést befolyásoló körülményeket. Célunk a maximális peptaibol-termeléshez szükséges paraméterek meghatározása, melyek segítséget nyújthatnak hatékonyabb *Trichoderma* biopreparátumok előállításához, illetve az eredményes biológiai védekezéshez szükséges körülmények kialakításához.

Karaffa Erzsébet (szül.: Sándor Erzsébet) az MTA Bólyai János Kutatói Ösztöndíjasa.

Irodalom

- Degencolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B., and Grafe, U. (2003): The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibotics in fungi and their mass spectrometric identification via fragment ions. *J Peptide Sci.* 9: 666-678.
- Harman, G.E. and Björkman, T. (1988): Potential and existing use of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Harman G.E., Kubicek C.P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Applications, 2. Taylor and Francis Ltd, London, UK pp. 229-266.
- Hjeljord, L. and Tronsmo, A. (1988): *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman G.E., Kubicek C.P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Applications, 2. Taylor and Francis Ltd, London, UK, pp. 131-152.
- Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K., and Lorito, M. (2001): *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J Plant Pathol* 83:11-23.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., and Kubicek, C.P. (1996): Cell-wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178: 6382-6385.
- Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S.L., Zeilinger, S., Kulling, C., M., and Kubicek, C.P. (1999): Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviridae* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1858-1863.
- Seiboth, B., Karaffa, L., Sándor, E., and Kubicek, C.P. (2002): The *Hypocrea jecorina gal10* (UDP-glucose 4-epimerase-encoding) gene differs from yeast homologues in sequence, genomic organization and expression. *Gene* 295: 143-149.
- Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B.W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J., Bodo, B., Kenerley, C. (2002): Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of peptaibol synthetase. *J. Biol. Chem.* 277: 20862-20868.

**A REPORTER SYSTEM FOR PEPTAIBOL SYNTHETASE
GENE EXPRESSION ANALYSIS IN *TRICHODERMA REESEI***

**E. Sándor¹, B. Seiboth², L. Karaffa³, E. Fekete³, L. Irinyi¹, G.J. Kövics¹
and C.P. Kubicek²**

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Debrecen, Hungary

²TU Vienna, Institute of Chemical Engineering, Division Applied Biochemistry and Gene Technology, Area Molecular Biotechnology, Vienna, Austria

³Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Debrecen, Hungary

Because of the potential importance of peptaibols in the biological control of plant diseases a transgenic *T. reesei* strain carrying a *tex1*-promoter:*goxA* fusion plasmid was constructed for further studies. The peptaibol synthetase gene (which is highly similar to *T. virens tex1*) was identified in the genome sequence of *T. reesei*. A 900 bp 5' upstream noncoding fragment, presumed to include the promoter region of *tex1* was cloned into the pSJ3 plasmid (which contains the *Aspergillus niger goxA* gene encoding glucose oxidase). Finally, we transformed *T. reesei* with the *tex1*-promoter:*goxA* fusion containing pSJ3 plasmid.