

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS
Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

**Környezeti tényezők *Trichoderma* törzsekre gyakorolt hatásának
vizsgálata, és antagonista törzsek nemesítése**

Készítette:
Kredics László

Témavezető:
dr. Manczinger László

Szegedi Tudományegyetem
Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED

2001

TARTALOMJEGYZÉK

I. Bevezetés	5
II. Irodalmi áttekintés	7
II.1. A <i>Trichoderma</i> nemzetség általános jellemzése	7
II.2. <i>Trichoderma</i> törzsek ökofiziológiai tulajdonságai	8
II.3. Extracelluláris enzimek szerepe a <i>Trichoderma</i> fajok antagonizmusában	10
II.4. <i>Trichoderma</i> törzsek nemesítésének lehetőségei	13
III. Anyagok és módszerek	17
III.1. Mikroorganizmusok és plazmidok	17
III.2. Tenyésztési körülmények	18
III.2.1. <i>In vitro</i> antagonizmus-teszt	18
III.2.2. A <i>T. viride</i> T124-es törzs előtenyésztése enzimtermelés-vizsgálatok céljára	18
III.2.3. Táptalajok és tápoldatok a vízpotenciál, peszticidek és nehézfémionok <i>Trichoderma</i> törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálatára	20
III.2.4. A <i>Trichoderma</i> törzsek növekedésének mérése	21
III.2.5. <i>Trichoderma</i> törzsek enzimtermelésének indukciója hővel inaktivált Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal szilárd táptalajon	22
III.2.6. <i>Trichoderma</i> törzsek enzimtermelésének indukciója hővel inaktivált <i>Bacillus subtilis</i> sejtekkel folyadék kultúrában	22
III.2.7. <i>Trichoderma</i> törzsek transzformációja során alkalmazott táptalajok és tápoldatok	23
III.3. Sephadex G-150 oszlopkromatográfia	23
III.4. A vízpotenciál meghatározása	24
III.5. Enzimaktivitás-mérések	24
III.5.1. Az enzimaktivitás-mérések alapszerepei	24
III.5.2. Speciális inkubációk	25
III.6. Nemesítés UV-mutagenezissel	27
III.6.1. UV-fénnyel szembeni érzékenység meghatározása	27
III.6.2. Nehézfémrezisztens mutánsok izolálása és jellemzése	27
III.6.3. Kompakt morfológiájú mutánsok izolálása a <i>Trichoderma viride</i> T124-es törzsből	28

III.7. Transzformációs kísérletek	28
III.7.1. Plazmidtisztítás	28
III.7.2. A plazmidok azonosítása restrikciós enzim analízissel	29
III.7.3. <i>Trichoderma</i> protoplasztok transzformálása	29
IV. Eredmények és megvitatásuk	31
IV.1. <i>Trichoderma</i> törzsek növénypatogén gombákkal szembeni <i>in vitro</i> antagonizmusának vizsgálata	31
IV.2. A <i>Trichoderma viride</i> T124-es törzs extracelluláris enzimtermelésének vizsgálata	33
IV.2.1. Enzimtermelés induktív és nem induktív körülmények között különböző szén- és nitrogénforrások jelenlétében	33
IV.2.2. Extracelluláris enzimek termelése az idő függvényében induktív és nem induktív körülmények között	35
IV.3. Mikoparazita <i>Trichoderma</i> törzsek extracelluláris enzimrendszereinek vizsgálata Sephadex G-150 oszlopkromatográfiával	36
IV.4. A vízpotenciál és a hőmérséklet hatása a <i>Trichoderma harzianum</i> T66-os törzs növekedésére, enzimszekréciónak és <i>in vitro</i> enzimaktivitásaira	46
IV.4.1. A vízpotenciál és a hőmérséklet hatása a növekedésre	47
IV.4.2. A vízpotenciál hatása az enzimszekréciónak	48
IV.4.3. A vízpotenciál és a hőmérséklet hatása az <i>in vitro</i> enzimaktivitásokra	49
IV.5. Peszticidek hatása mikoparazita <i>Trichoderma</i> törzsek növekedésére és <i>in vitro</i> enzimaktivitásaira	53
IV.6. Nehézfémionok hatása mikoparazita <i>Trichoderma</i> törzsek növekedésére és <i>in vitro</i> enzimaktivitásaira	54
IV.6.1. Nehézfémionok hatása a növekedésre	55
IV.6.2. Nehézfémionok hatása az extracelluláris enzimek <i>in vitro</i> aktivitására	56
IV.7. <i>Trichoderma</i> törzsek baktériumbontó képességének vizsgálata	60
IV.7.1. <i>Trichoderma</i> törzsek bakteriolitikus aktivitásának vizsgálata hővel inaktivált baktériumokkal kiegészített táptalajokon	60
IV.7.2. Baktérium-toleráns telepek izolálása	62
IV.8. Mikoparazita <i>Trichoderma</i> törzsek nemesítése UV-mutagenézissel	63
IV.8.1. A vizsgált <i>Trichoderma</i> törzsek UV-fénnyel szembeni érzékenysége	63

IV.8.2. Nemesítés szárazságtűrésre	63
IV.8.3. Nemesítés nehézfém-tűrésre, a nehézfémrezisztens mutánsok jellemzése	66
IV.9. Mikoparazita <i>Trichoderma</i> törzsek transzformációs nemesítése	71
IV.9.1. Hygromycin B-rezisztencián alapuló transzformációs rendszerek kidolgozása vad típusú <i>Trichoderma</i> törzsekre	71
IV.9.2. A <i>T. viride</i> T124-es törzséből izolált kompakt morfológiájú mutánsok transzformálása hygromycin B-rezisztenciára	73
V. Összefoglalás	74
VI. Summary	78
VII. Irodalomjegyzék	82
VIII. Köszönetnyilvánítás	92

I. BEVEZETÉS

A *Trichoderma* nemzetség tagjai az imperfekt gombák közé tartoznak, a *Hypocrea* ascomyceta nemzetségbe tartozó fajok anamorfa alakjai. Talaj- és avarlakó életmódot folytatnak (Danielson és Davey, 1973), részt vesznek a talajba került elhalt növényi részek lebontásában. Egyes törzsek extracelluláris enzimeik segítségével képesek más gombák sejtfalát feloldani (Ridout és mtsai., 1986; Sivan és Chet, 1989), ezáltal parazitálni tudnak különböző fonalagombákat, köztük növénypatogéneket is (Lynch, 1987; Papavizas, 1985). Néhány törzs mikoparazitizmusban fontos enzimeinek profilját részleteiben is elemezték (Labudova és Gogorova, 1988; Ridout és mtsai., 1988). A parazitálandó gomba fonalain a *Trichoderma* törzsek hifacsavarulatokat képeznek, majd appresszóriumnak nevezett szívóhifáikkal képesek a sejtfal feloldása után belenőni a gazda gomba fonalainak belsejébe, és tápanyagforrásként hasznosítani azok sejt tartalmát. A gombasejt falat bontó enzimek felhasználhatók gombákból történő protoplasztképzésre (Beach és Nurse, 1981; Kitamoto és mtsai., 1988). Számos gombaellenes antibiotikum termelését is kimutatták e fajokból (Dennis és Webster, 1971 a, b; Ghisalberti és Rowland, 1993).

A *Trichoderma* fajok jó kompetíciós képességük és extracelluláris enzimtermelésük révén kiválóan alkalmasak arra, hogy belőlük a növénypatogén gombák elleni biológiai védekezésben felhasználható biofungicid törzseket nemesítsünk (Benítez és mtsai., 1998; Manczinger és mtsai., 2002; Papavizas, 1985). A nemesítési programok célja egyrészt az, hogy a gazda gomba sejt falának bontásában résztvevő extracelluláris kitináz, glukanáz és proteáz enzimek konstitutívan, nagy mennyiségben termelődjenek, másrészt pedig az, hogy a törzsek a környezeti tényezők értékeinek szélesebb tartományában legyenek életképesek. A legígéretesebb biofungicid-jelölt törzsek a *Trichoderma aureoviride*, a *Trichoderma hamatum*, a *Trichoderma harzianum* és a *Trichoderma viride* fajcsoportokba tartoznak.

Munkánk során célul tűztük ki:

- különböző fajcsoportokba tartozó *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombákkal szembeni *in vitro* antagonizmusának vizsgálatát,
- a biológiai védekezés szempontjából igen kedvező sajátságokkal rendelkező *T. viride* T124-es törzs esetében egyes extracelluláris enzimek termelésének vizsgálatát induktív és nem induktív körülmények között különböző szén- és nitrogénforrások jelenlétében,
- különböző fajcsoportokba tartozó mikoparazita *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimrendszereinek oszlopkromatográfiás vizsgálatát,
- különböző környezeti tényezők (vízpotenciál, hőmérséklet, peszticidek, nehézfémionok, antagonista baktériumok) *Trichoderma* törzsek növekedésére és extracelluláris enzimrendszereinek működésére gyakorolt hatásának vizsgálatát,
- mikoparazita törzsek jobb ökofiziológiai tulajdonságokra történő nemesítését UV-mutagenézissel,
- valamint transzformációs rendszerek kidolgozását a hatékonyabb nemesítés céljaira.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. A *Trichoderma* nemzetség általános jellemzése

A *Trichoderma* nemzetség tagjai mikroszkópikus fonalgombák, melyek teleomorf alakjai az Ascomycota törzs Euascomycetes osztálya Pyrenomycetes alosztályának Hypocreales rendjébe, a Hypocreaceae családba tartoznak. Heterotallikusak, a szexuális folyamathoz két párosodási típus szükséges. Anamorfjaikat, melyeknél az ivaros szakasz hiányzik, korábban a Deuteromycota törzs Hyphomycetes osztályába, újabban a fent említett Hypocreaceae családon belül elkülönített mitospórás Hypocreaceae egységbe sorolják (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html>). A nemzetségbe tartozó fajok első átfogó, morfológiai bélyegeken alapuló rendszerét Rifai (1969) dolgozta ki, aki a fajok morfológiai variabilitása, két faj között átmenetet képező formák sora, valamint különböző *Hypocrea* fajok *Trichoderma* alakjainak egymáshoz hasonló morfológiai megjelenése miatt a határozásban fajcsoportok használatát javasolta. Azóta a rendszeren több finomítást eszközöltek, de a fajok elkülönítése és rokonsági viszonyaik pontos feltérképezése még továbbra is folyamatban van.

A *Trichoderma* nemzetség morfológiai jellemzésével és rendszertanával kapcsolatban több összefoglaló tanulmány áll rendelkezésre (Bissett, 1984; Rifai, 1969). A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó törzsek rendszerint gyors növekedésűek, telepeik zöld, fehér vagy barnás színűek. A telepek felszíne kezdetben sima, később a kiemelkedő légmicéliumoktól és konídiumtartóktól egyenetlenné válik. Harántfalakkal tagolt, szintelen fonalaikon gyakori az elágazódás. Kitartó- illetve szaporítóképleteik a végálló, vagy közbülső helyzetű sejtekből képződő klamidospórák, valamint az erősen elágazó konídiumtartók végén elhelyezkedő fialidok által lefűzött konídiospórák, melyek szintelenek, sárgászöldek vagy zöldek lehetnek. A morfológiai alapú fajmeghatározás a fonalak elágazódásainak gyakorisága és elhelyezkedése, a

klamidospórák képződésének viszonyai, a konídiumtartók szerveződése, valamint a konídiumok színe, alakja és felszínének mintázata alapján történik.

II.2. *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai tulajdonságai

Egyes *Trichoderma* törzsek antagonista képességüknek köszönhetően a növénypatogén gombák elleni biológiai védekezés ígéretes jelöltjei, potenciálisan felhasználhatók a komplex integrált növényvédelemben. A nemzetséggel kapcsolatos ökofiziológiai tanulmányok jelentősége óriási: a különböző környezeti stresszhatások, mint például a kompetitív mikroorganizmusok jelenléte a talajban, a peszticid- és nehézfémzennyezések, az alacsony hőmérséklet és az alacsony vízpotenciál jelentősen befolyásolják a *Trichoderma* fajok életműködéseit. Ezért a biokontroll törzsekkel végzett szabadföldi kísérleteket megelőzően hasznos e paraméterek micélium-növekedésre, sporulációra, kompetíciós képességre, enzimszekrécióra és *in vitro* enzimaktivitásokra gyakorolt hatásának laboratóriumi vizsgálata.

A *Trichoderma* nemzetséggel foglalkozó szakirodalomban fellelhetők a hőmérsékletnek a spóracsírázásra és csíratömlő-növekedésre (Magan, 1988), micélium-növekedésre és kompetitív képességekre (Badham, 1991), szaprofita képességre (Eastburn és Butler, 1991) és az *in vitro* extracelluláris enzimaktivitásokra (Antal és mtsai., 2000) gyakorolt hatásával kapcsolatos közlemények. Egyes környezeti tényezőknek, mint például a hőmérsékletnek és a baktériumok gátló hatásának a *Trichoderma* fajok kompetitív szaprofita képességére gyakorolt hatását tanulmányozta Naár és Kecskés (1998). A szerzők szerint a *Trichoderma* fajok kompetitív sikerét legnagyobb mértékben a baktériumok gátló hatásával szembeni tolerancia segíti.

A *Trichoderma* törzsek biofungicidként történő felhasználásának egyik legfőbb korlátja alacsony ozmotoleranciájuk. A talaj vízviszonyai a gombák élettevékenységeit jelentősen

befolyásoló korlátozó tényezőt képviselnek. Száraz körülmények kialakulhatnak egyébként kevésbé száraz talajokban is az esős időszakok közötti kiszáradás következményeként. Más esetekben olyan növénypatogénnal szemben lehet szükségünk biológiai védekezésre, melyek képesek száraz talajokban is növekedni és betegséget okozni. A vízviszonyok erősen befolyásolják a gombák életfolyamatait, többek között a növekedést (Luard és Griffin, 1981), kritikusan hatnak a szaprofita képességre (Eastburn és Butler, 1991; Magan és Lynch, 1986), a gombák közötti kölcsönhatásokra (Badham, 1991; Magan és Lacey, 1984; Pfender és mtsai., 1991), a toxintermelésre (Cuero és mtsai., 1987; Niles és mtsai., 1985) és az enzimtermelésre (Grajek és Gervais, 1987; Marin és mtsai., 1997; Sarrette és mtsai., 1992). Biokontroll sajátosságú *Trichoderma* törzsek alkalmazásának tervezésekor nagyon fontosak a vízviszonyok különböző életműködésekre gyakorolt hatásáról szerzett információk.

A peszticidek biológiai védekezésben használt *Trichoderma* törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálata rendkívül fontos, amennyiben a biofungicideket kémiai növényvédőszerrel kombináltan kívánjuk alkalmazni. Davet (1981) a propyzamide nevű herbicid és öt fungicid (benomyl, quintozene, vinclozolin, thiram és prothiocarb) *T. harzianum* szubsztrátkolonizáló képességére kifejtett hatását vizsgálta. Két szisztémás fungicid talajgombákra, köztük *T. viride*-re gyakorolt szelektív hatását elemezték Abdel-Fattah és munkatársai (1982). A *Sclerotium cepivorum* által okozott hagyma fehérrothadás gombaantagonistáinak (*Chaetomium globosum* és *Trichoderma* fajok) peszticidekre (captan, mancozeb, thiram, benomyl, és két dikarboximid) való érzékenységet is megállapították, és dikarboximid-rezisztens biotípusokat szelektáltak (Kay és Stewart, 1994).

Bár számos nehézfém (pl. réz, cink, kobalt, stb.) nélkülözhetetlen elem a gombák növekedéséhez, nagy koncentrációban legtöbbjük toxikus hatású. Morley és Gadd (1995) toxikus nehézfémek *Rhizopus arrhizus* és *T. viride*, valamint agyagásványok általi megkötését vizsgálták. *Trichoderma* fajoknál a nehézfémek megkötését (Loksha és Somashekar, 1989) és

felhalmozódását (Ledin és mtsai., 1996), valamint néhány nehézfém növekedésre, spóráképzésre (Babich és mtsai., 1982; Somashekar és mtsai., 1983) és differenciálódásra (Frank és mtsai., 1993) gyakorolt hatását vizsgálták.

A *Trichoderma* törzsek hidegtűrésre, ozmotoleranciára, nehézfém- és peszticid-rezisztenciára, valamint konstitutív extracelluláris enzimtermelésre történő nemesítése hatékony antagonistá törzseket eredményezhet a növénypatogén gombák elleni biológiai védekezés céljaira.

II.3. Extracelluláris enzimek szerepe a *Trichoderma* fajok antagonizmusában

A *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombákkal szembeni antagonizmusa feltehetően három alapvető folyamat, az antibiózis, a kompetíció és a mikoparazitizmus szinergista hatásának az eredménye. E három mechanizmus biokémiai hátterét gombaellenes vegyületek és extracelluláris enzimek termelése biztosítja.

A *Trichoderma* fajok által szekretált extracelluláris enzimek alapvető szerepet töltenek be mind a kompetíció, mind a mikoparazitizmus folyamataiban. Természetes talajrendszerekben a talajlakó mikroorganizmusok között kiterjedt versengés folyik a korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló tápanyagforrásokért, pl. a szénforrásért, nitrogénforrásért, nyomelemekért és vitaminokért. Ezekkel a korlátozó tényezőkkel kapcsolatos tápanyag-hasznosítási kísérleteket végeztek Jackson és munkatársai (1991) *Trichoderma* törzsek esetében. Manczinger és Polner (1987) 65 *Trichoderma* izolátum szénforrás-hasznosítási képességét vizsgálta 127 különböző szénforráson. A nemzetség rendszerezésében felhasználható információk mellett az ilyen jellegű tanulmányok a *Trichoderma* törzsek kompetitív sajátosságaival kapcsolatban is hasznos adatokkal szolgálnak. A *Trichoderma* fajok jó kompetitorok, gyors növekedési képességgel rendelkeznek.

Extracelluláris enzimeik, pl. cellulázaik és xilanázaik lehetővé teszik számukra a talajban lévő növényi maradványok gyors kolonizálását.

A *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombákkal szembeni antagonizmusában a feltételezések szerint alapvető szerepet tölt be a gombasejtfal litikus enzimekkel történő lebontásán alapuló mikoparazitizmus (Elad és mtsai., 1982). A felismerés után a *Trichoderma* hifák a gazda gomba hifái köré csavarodnak, hifacsavarulatokat és appresszórium-szerű képleteket hoznak létre, majd a sejtfalon át behatolnak a gazdasejtbe. Inbar és Chet (1992) igazolta, hogy a lektinek fontos szerepet játszanak a felismerés folyamatában: egy *T. harzianum* törzs hifái képesek voltak concanavalin A-val, vagy *Sclerotium rolfsii* sejtfalából származó lektinnel bevont nejlonszálakon is hifacsavarulatokat létrehozni, melyek mintázata a valódi gazdahifákon megjelent mintázathoz hasonlított. Az extracelluláris enzimek fontos szerepet töltenek be a bejutás során, és a gazdasejtfal lebontásában egyaránt. A Basidiomycota és Ascomycota törzsekbe tartozó gombák sejtfala kitin és β -glukán fibrillumokat tartalmaz fehérjehálózatba ágyazva, míg az Oomycota gombák fő sejtfalalkotói a β -glukán és a cellulóz. A gazda sejtfalának megtámadásához a *Trichoderma* fajoknak olyan extracelluláris enzimekre van szükségük, melyek segítségével képesek ezeket a sejtfalalkotókat lebontani. *Rhizoctonia solani*, *S. rolfsii* és *Pythium aphanidermatum* fajok sejtfalának lebontásában a kitinázokat és β -1,3-glukanázokat találták a legfontosabb enzimeknek (Elad és mtsai., 1982; Sivan és Chet, 1989).

A kitin β -1,4 kötésekkel kapcsolódó *N*-acetyl-glükózamin (GlcNac) monomerekből felépülő biopolimer. Sahai és Manocha összefoglaló tanulmánya (1993) alapján a kitinbontó enzimeket három csoportra oszthatjuk: endokitinázokra, melyek internális helyeken véletlenszerűen hasítják a kitin mikrofibrillumot, s működésük nyomán kitotetraóz, kitotrióz és diacetyl-kitobióz egységek szabadulnak fel; β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázokra, melyek a

kitotetraóz, kitotrióz és diacetyl-kitobióz molekulák nem redukáló végéről GlcNac monomereket hasítanak le; valamint exokitinázokra, (más néven kitobiozidázokra), melyek diacetyl-kitobióz egységeket hasítanak le a kitin mikrofibrillum nem redukáló végéről. Ulhoa és Peberdy *T. harzianum*-ból tisztított és jellemzett egy extracelluláris endokitinázt (1992) és egy, a β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázok csoportjába tartozó extracelluláris kitobiázt (1991). Az ezt követő kutatások során ennek a gombának a kitinbontó enzimrendszere sokkal összetettebbnek bizonyult. Haran és munkatársai (1995) hat különböző enzimet azonosítottak: két β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázt, és négy endokitinázt. A feltételezések szerint a *T. harzianum* kitinbontó enzimrendszerének indukciója valószínűleg a mikoparazitizmus korai eseménye, melyet a folyamat első lépése, a felismerés serkent (Inbar és Chet, 1995). Nemrég tisztázták egy endokitináz enzimnek a *Trichoderma virens* *R. solani* elleni biokontroll aktivitásában betöltött szerepét (Baek és mtsai., 1999): azon törzsek, melyek endokitináz génjét mutációval inaktiválták, csökkent biokontroll aktivitást mutattak, míg konstitutív promóter mögé épített gént tartalmazó vektorral transzformált törzsek a patogénnel szemben sokkal hatékonyabbak voltak, mint a vad típusú törzs.

A β -1,3-glukanázokat (laminarinázokat) két csoportba sorolhatjuk: az endo-típusú enzimek β -1,3-kötéseket hasítanak a poliszacharidlánc mentén véletlenszerűen, rövid oligoszacharidokat felszabadítva, míg az exo-típusú enzimek glükóz egységeket hasítanak a szubsztrát nem redukáló végéről. Az első, kizárólag glukanokat hasító *Trichoderma* β -1,3-glukanázt *T. longibrachiatum*-ból tisztították (Tangarone és mtsai., 1989). A *T. harzianum* β -1,3-glukanbontó rendszere laminarinnal való indukció alapján legalább hét extracelluláris enzimből áll (Vázquez-Garciduenas és mtsai., 1998). A glükóz valamennyi vizsgált enzim képződését gátolta. Feltételezhető, hogy ezek az enzimek különböző szerepet töltenek be a gazda sejtfalának bontásában.

Az Oomycota *Pythium* fajok elleni mikoparazitizmusban a *Trichoderma* törzsek cellulázai is fontos szerepet játszhatnak, elősegíthetik az antagonista bejutását a gazda hifájába (Benhamou és Chet, 1997). A *Trichoderma* cellulázokat azonban főként ipari jelentőségük miatt tanulmányozzák intenzíven (Kubicek és mtsai., 1990).

A gazda sejtfalának bontásában más, kisebb polimereket (fehérjéket, β -1,6-glukánokat, stb.) hidrolizáló sejtfalbontó enzimek is szerepet játszhatnak. Flores és munkatársai (1997) bizonyították, hogy a *T. harzianum* egy proteázt kódoló génjének emelt szintű kifejeződése fokozott biokontroll aktivitást eredményezett, ami arra utal, hogy a proteázok fontos szerepet töltenek be a gazdasejtfal proteinkomponenseinek lebontásában, és a gazdasejtek teljes lízisében. Elad és Kapat a közelmúltban *T. harzianum* proteázok *Botrytis cinerea* elleni biológiai védekezésben betöltött szerepét vizsgálta (1999).

De la Cruz és munkatársai egy, a *T. harzianum* mikoparazitizmusával kapcsolatos endo- β -1,6-glukanázt tisztítottak és jellemeztek, és megállapították, hogy az enzim kooperatívan működött a β -1,3-glukanázokkal és kitinázokkal a sejtfal bontásában (1995).

II.4. *Trichoderma* törzsek nemesítésének lehetőségei

A biológiai védekezésben alkalmazott *Trichoderma* törzsek eleve rezisztensek lehetnek számos, növénypatogén gombák ellen alkalmazott kémiai fungicidre. A komplex integrált növényvédelem alapját fungicidrezisztens biokontroll törzsek kémiai fungicidekkel történő kombinált alkalmazása képezi, mely kevésbé káros az ökoszisztémára és az emberi egészségre, mint a kémiai védekezés önmagában (Sivan és Chet, 1992). Gyakran a biokontroll törzsek is érzékenyek az alkalmazott fungicidre, például a széles körben használt benomylra. Ilyen esetekben sikerült indukált mutagenézissel rezisztens mutánsokat izolálni (Ahmad és Baker, 1988).

A sikeres biológiai védekezés *Trichoderma* és *Gliocladium* fajok esetében 10^5 - 10^6 konídium jelenlétét igényli egy gramm talajban (Adams, 1990). Az ilyen nagy mennyiségű propagulum jelenléte nem kívánatos sem ökológiai, sem gazdasági, sem közegészségügyi szempontból. A probléma megoldását fokozott biokontroll hatékonyságú *Trichoderma* és *Gliocladium* törzsek nemesítése jelentheti. Az olyan törzsek, melyek nem igényelnek hosszú indukciós folyamatot a lebontó enzimek termeléséhez, hatékonyabbak lehetnek a biológiai védekezésben. A biokontroll törzsek általában konstitutívan termelik a β -1,3-glukanázokat, míg a kitináz enzimrendszer bizonyos elemei és a leghatékonyabb proteázok indukciót igényelnek (Haran és mtsai., 1996; Tilburg és Thomas, 1993).

Kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a mikoparazita *Trichoderma* törzsek mutagenezissel történő nemesítésével kapcsolatban. Egyes beszámolók mutagénkezelés utáni random izolátumok teszteléséről, mások az integrált növényvédelemben felhasználható fungicidrezisztens mutánsok izolálásáról tudósítanak, de az enzimszkréciós képességek mutagenezissel történő fokozásáról csak néhány adat áll rendelkezésre (Manczinger és mtsai., 1994; Sinha és Upadhyay, 1993). Célszerű lenne több figyelmet fordítani a mutagenezissel történő nemesítésre, mert az így előállított törzsek szabadföldi alkalmazását könnyebben engedélyezik a környezetvédelmi szervek, mint a protoplasztfúzióval vagy transzformációval nemesített törzsekét.

A protoplasztfúzió az egyes ígéretes törzsek kedvező tulajdonságai kombinálásának gyors és hatékony módszere, melyet sikerrel alkalmaztak biokontroll *T. harzianum* törzsek nemesítésére (Sivan és Harman, 1991; Stasz, 1990). *Trichoderma* törzsekből könnyen készíthetők protoplasztok, melyek indukált fúziója számos esetben kedvezőbb biokontroll sajátságokkal rendelkező genetikai rekombinánsokat eredményezett (Pe'er és Chet, 1990; Sivan és Harman, 1991; Stasz és mtsai., 1988).

A mutagenézissel vagy protoplasztfúzióval történő nemesítésnél a kívánt sajátságért felelős gének közvetlen sejtbe juttatása sokkal hatásosabb lehet. Ehhez szükség van hatékony transzformációs rendszerekre és a megfelelő klónozott génekre.

Számos publikáció foglalkozik a *Trichoderma* törzsek transzformációjának módszertanával. A transzformációt általában sejtfalmentes protoplasztokon hajtják végre, mert ezek a legtöbb törzsből könnyen előállíthatók. Léteznek azonban alternatív lehetőségek is, mint például a biolisztikus (Lo és mtsai., 1998; Lorito és mtsai., 1993), vagy az *Agrobacterium tumefaciens* segítségével megvalósított transzformáció (De Groot és mtsai., 1998).

A transzformánsok szelekciójára leggyakrabban használt módszerek domináns szelekciós markereken alapulnak, például fungicidrezisztenciát eredményező géneken (β -tubulin gén: Ulhoa és mtsai., 1992; hygromycin B foszfortranszferáz gén: Herrerra-Estrella és mtsai., 1990; Manczinger és mtsai., 1997; Sivan és mtsai., 1992), auxotrófia-komplementáción (arginin-auxotrófia: Antal és mtsai., 1997; uracil-auxotrófia: Gruber és mtsai., 1990a; Manczinger és mtsai., 1995) és acetamid-katabolikus géneken (Pentillä és mtsai., 1987), míg más rendszerek riporter-gének aktivitását használják ki (green fluorescent protein: Inglis és mtsai., 1999; β -galaktozidáz gén: Antal és mtsai., 1997; Pentillä és mtsai., 1987; β -glükuronidáz gén: Lo és mtsai., 1998). Mivel a transzformációs gyakoriság sok esetben a kívánt szint alatt volt, a gyakoriság fokozására homológ géneket (Bergés és Barreau, 1991; Gruber és mtsai., 1990b; Smith és mtsai., 1991), homológ expressziós szignálokat (Mach és mtsai., 1994) vagy nukleáz inhibitorokat (Manczinger és mtsai., 1997) alkalmaztak.

A mikoparazita törzsek biokontroll hatékonyságának transzformáció útján történő fokozása céljából a mikoparazitizmus folyamatában fontos géneket klónoztak és használtak génátvitelre. A közelmúltban kitináz géneket (Baek és mtsai., 1999; Deane és mtsai., 1999; Giczey és mtsai., 1998), néhány esetben proteáz (Flores és mtsai., 1997) és endoglukanáz géneket (Sanchez-Torres és mtsai., 1994) alkalmaztak transzformációra a gének

kópiaszámának növelése céljából. A transzformáns törzsek egy része emelkedett biokontroll aktivitást mutatott.

A nemesítés mindhárom említett módja alkalmas jobb ökofiziológiai tulajdonságú biokontroll törzsek létrehozására, de amíg a protoplasztfúzióval és transzformációval nemesített *Trichoderma* törzsek nehezen engedélyeztethetők szabadföldi használatra, addig a gyakorlati nemesítés legfőbb eszköze a mutagenézis marad.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Mikroorganizmusok és plazmidok

A *T. aureoviride* T122, *T. harzianum* T66 és T334, valamint a *T. viride* T124 és T228 jelű törzseket Manczinger és munkatársai izolálták a délmagyarországi Ásotthalom közelében lévő erdő talajából. A *T. viride* T114-es törzs a Budapesti Műszaki Egyetem törzsgyűjteményéből származik. Ezek a törzsek jó hidegtűrő képességgel rendelkező mikoparazita törzsek, melyek antagonista sajátságúak *Fusarium*, *Pythium* és *Rhizoctonia* fajokkal szemben (Antal és mtsai., 2000).

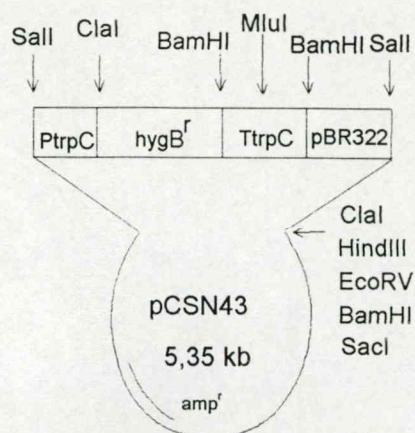
Az *in vitro* antagonizmus-tesztekben a szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht. törzsgyűjteményéből származó növénypatogén *Fusarium culmorum* 1181, *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, *Pythium debaryanum* és *Rhizoctonia solani* törzseket használtuk.

A gombákat minimál táptalajon tartottuk fenn (Manczinger és Ferenczy, 1985).

A *Trichoderma* törzsek baktériumbontó képességének vizsgálatára a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményéből származó Gram-pozitív (*Bacillus subtilis* 0210, *B. subtilis* 0212, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*) és Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*) baktériumokat alkalmaztunk. Plazmidfenntartásra és szaporításra az *Escherichia coli* HB101-es törzse szolgált. A baktériumtörzseket LB-táptalajon (1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, 1,5% agar, desztillált víz) tartottuk fenn.

A transzformációs kísérletekben alkalmazott pCSN43 plazmidvektor (1. ábra) gombákban használható szelekciós markerként az *E. coli* hygromycin B-rezisztencia génjét (hygromycin B foszfortranszferáz) tartalmazza, ami az *Aspergillus nidulans trpC* génje promóterének és terminátorának kontrollja alatt áll.

Baktérium-szelekciós markerként ampicillin rezisztencia génjét hordozza (Staben és mtsai., 1989).



III.2. Tenyésztési körülmények

III.2.1. *In vitro* antagonizmus-teszt

1. ábra. A pCSN43 plazmid térképe

A *Trichoderma* törzsek növényparazita gombákkal szembeni antagonisták képességét 25°C-on *F. culmorum*, *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, *P. debaryanum* és *R. solani* törzsekkel szemben vizsgáltuk. A tesztelt *Trichoderma* törzsek és a növénypatogén törzsek 3 mm átmérőjű hifa-korongjai élesztőkivonatos (0,2% élesztőkivonat, 0,5% glükóz, 2% agar, desztillált víz) táptalajra, egymástól pontosan 3 cm távolságra kerültek leoltásra. A *Trichoderma* törzseket a növénypatogének leoltását követő második napon oltottuk le, majd a csészéket 12 napig inkubáltuk.

III.2.2. A *T. viride* T124-es törzs előtenyésztése enzimtermelés-vizsgálatok céljára

A *T. viride* T124-es törzs enzimtermelésének vizsgálatára az alábbi induktív és nem induktív tápoldatokat alkalmaztuk: T1 (2% alanin, 0,5% NH₄Cl, 0,1% KH₂PO₄, 0,1% MgSO₄×7 H₂O); T2 (2% alanin, 0,5% NaNO₃, 0,1% KH₂PO₄, 0,1% MgSO₄×7 H₂O); T3 (0,5% glükóz, 0,5% NH₄Cl, 0,1% KH₂PO₄, 0,1% MgSO₄×7 H₂O); T4 (0,5% glükóz, 0,5% NaNO₃, 0,1% KH₂PO₄, 0,1% MgSO₄×7 H₂O); T5 (1% glicerol, 0,5% NH₄Cl, 0,1% KH₂PO₄,

0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$); T6 (1% glicerol, 0,5% NaNO_3 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$); T7 (0,5% mannitol, 0,5% NH_4Cl , 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$); T8 (0,5% mannitol, 0,5% NaNO_3 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$); T9F (2% szárított *Fusarium culmorum* hifa). Indukció céljából a T1-T8 tápoldatokat 2% szárított *Fusarium culmorum* hifával, 0,05% laminarinnal, 0,05% kolloid kitinnel vagy 0,05% zselatinnal egészítettük ki. A *F. culmorum* hifapreparátumot az alábbiak szerint állítottuk elő: a konídiumokat 500 ml-es lombikba oltottuk, mely 100 ml YEGK tápoldatot tartalmazott (0,5% élesztőkivonat, 1% glükóz, 0,5% KH_2PO_4), 180 rpm fordulatszámmal 25°C-on rázattuk 3 napig, majd szűréssel összegyűjtöttük, desztillált vízzel mostuk és vákuumban szárítottuk a micéliumot.

Az induktív és nem induktív körülmények között különböző szén- és nitrogénforrások jelenlétében történő enzimtermelés vizsgálatához a T1-T8 tápoldatokat használtuk magukban, illetve *F. culmorum* hifával kiegészítve, valamint a T9F tápoldatot. A *T. viride* T124-es törzs konídiumait a tápoldatokba oltottuk, majd 150 rpm fordulatszámmal 25°C-on rázattuk 3 napig. A micéliumot centrifugálással kiülepítettük (10 perc, 3000 g), majd enzimaktivitásokat mértünk a felülúszóban.

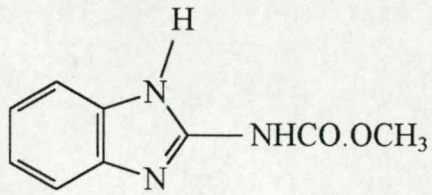
Az aspecifikus proteáz, β -1,3-glukanáz és β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz enzimek termelődésének időbeli követése céljából a vizsgált törzs konídiumait a T7-es, T8-as tápoldatokba, valamint a T5-T8 tápoldatok megfelelő inducerrel (zselatin, laminarin, kolloid kitin) kiegészített változataiba oltottuk, majd 25°C-on rázattuk 8 napig, és 24 óránként mintát vettünk a fermentléből az enzimaktivitás-mérések céljára.

III.2.3. Táptalajok és tápoldatok a vízpotenciál, peszticidek és nehézfémionok *Trichoderma* törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálatára

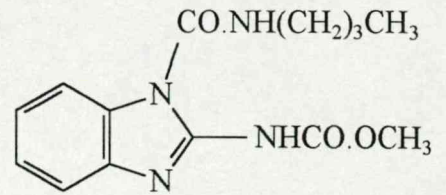
A vízpotenciál növekedésre és enzimszekrécióra gyakorolt hatásának vizsgálatokor a táptalajok és tápoldatok vízpotenciál-értékeit különböző mennyiségű NaCl hozzáadásával állítottuk elő (Chirife és Resnik, 1984). A glicerol ozmotikumként történő felhasználását potenciális szénforrás volta miatt kerültük a tápközegekben, de glicerolt alkalmaztunk a vízpotenciál *in vitro* enzimaktivitásokra gyakorolt hatásának vizsgálatokor, így alacsonyabb vízpotenciál-értékeket tudtunk beállítani, mint az NaCl-dal lehetséges volt.

A peszticidek *Trichoderma* törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálata során három fungicid-hatású (carbendazim, benomyl, és dicloran) valamint négy herbicid-hatású (fenuron, monuron, diuron, és fluometuron) vegyületet vizsgáltunk. Az alkalmazott vegyületek kémiai szerkezete a 2. ábrán látható.

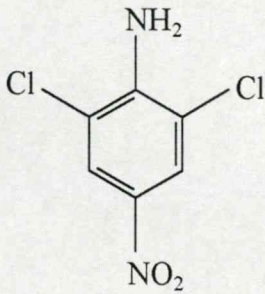
A különböző peszticidek és nehézfémionok *Trichoderma* törzsek növekedésére gyakorolt hatásának vizsgálatokor az alkalmazott táptalajt (1% glükóz, 0,5% KH_2PO_4 , 0,1% NaNO_3 , 0,2% élesztőkivonat, 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5% agar) peszticid- és nehézfémvegyületekkel egészítettük ki az alábbi koncentráció-tartományokba eső különböző végkoncentrációkra: benomyl: 0-2 $\mu\text{g/ml}$; MBC: 0-2 $\mu\text{g/ml}$; dicloran: 0-10 $\mu\text{g/ml}$; monuron: 0-1000 $\mu\text{g/ml}$; diuron: 0-50 $\mu\text{g/ml}$; fenuron: 0-700 $\mu\text{g/ml}$; fluometuron: 0-1000 $\mu\text{g/ml}$; $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 0-6 mmol; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$: 0-0,3 mmol; $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 0-10 mmol; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 0-10 mmol; $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$: 0-1 mmol; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 0-10 mmol; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$: 0-10 mmol, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: 0-10 mmol, HgCl_2 : 0-0,8 mmol, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 0-5 mmol.



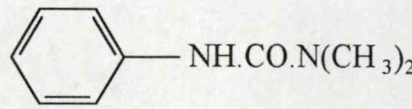
Carbendazim



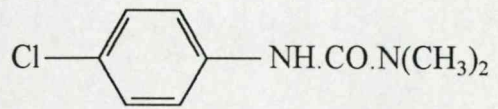
Benomyl



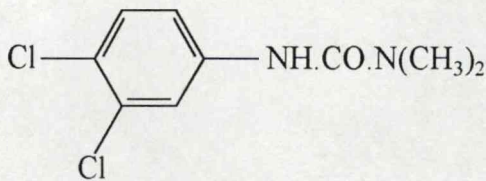
Dicloran



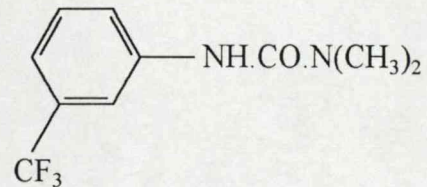
Fenuron



Monuron



Diuron



Fluometuron

2. ábra. A kísérleteink során vizsgált peszticidek kémiai szerkezete (Worthing, 1987)

III.2.4. A *Trichoderma* törzsek növekedésének mérése

A lineáris növekedési rátát telepátmérő-mérésekkel határoztuk meg: 9 cm átmérőjű csészékbe öntött 25 ml táptalajt aktívan növekvő telepek széléről dugófúróval kivágott 4 mm-es korongokkal oltottunk le. Vízpotenciál hatásának vizsgálatakor a lemezeket 4, 10, 25 és 37°C-on, nehézfémionok hatásának vizsgálatakor pedig 25°C-on inkubáltuk. A telepátmérőket vonalzóval mértük naponta két merőleges tengely mentén. Minden kísérletet két

párhuzamosban végeztünk. Felvettük a micélium-növekedési görbét a vízpotenciál függvényében 10 és 25°C-on, valamint meghatároztuk a micélium-növekedés 50%-os gátlását okozó nehézfém- és peszticid-koncentrációkat (IC₅₀-értékek).

III.2.5. *Trichoderma* törzsek enzimtermelésének indukciója hővel inaktivált Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal szilárd táptalajon

LB-táptalajon 30°C-on 3 napig növesztett Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium-tenyészetekből 1-1 kacsnyit 100 ml LB-táptalajba oltottunk. Az 1 napig 35°C-on rázatott tenyészetet centrifugáltuk (5000 g, 8 perc), majd 1% NaCl-dal mostuk. 50 ml kétszeres töménységű táptalajhoz (1% KH₂PO₄, 0,2% mannitol, 0,1% élesztőkivonat, 1,5% agar) azonos térfogatú baktérium-szuszpenziót (OD₅₇₀=1) kevertünk. Félkémcsövekbe 4-4 ml táptalajt öntöttünk, majd a megdermedt táptalaj felszínét 20 µl konídium-szuszpenzióval oltottuk le. A feltisztult zóna méretét 7 nap inkubáció után határoztuk meg.

III.2.6. *Trichoderma* törzsek enzimtermelésének indukciója hővel inaktivált *Bacillus subtilis* sejtekkel folyadékkultúrában

B. subtilis 0212 törzs sejtuszuszenziójából 3 ml-t oltottunk 500 ml-es lombikokba, melyek 100 ml táptalajot (0,2 % mannitol, 0,1 % élesztőkivonat, 1% KH₂PO₄, pH 5,0) tartalmaztak. Sterilizálás után a táptalajokat 1 ml *Trichoderma* konídium-szuszpenzióval (10⁷ konídium/ml) oltottuk le, majd 4 napig rázattuk 210 rpm-mel 25°C-on. A fermentleveket vattán átszűrtük, centrifugáltuk (5000 g, 10 perc), liofilizáltuk, majd 10 ml desztillált vízben oldottuk, és az enzimmérésekig -18°C-on tároltuk. A nem induktív fermentleveket baktériumsejteket nem

tartalmazó tápoldatban állítottuk elő a fent leírtakkal megegyező tenyésztési körülmények között.

III.2.7. *Trichoderma* törzsek transzformációja során alkalmazott táptalajok és tápoldatok

A *Trichoderma* törzsek protoplasztáláshoz való előtenyésztéséhez 1% glükózt, 0,5% KH_2PO_4 -ot, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot és 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazó tápoldatot használtunk. A *Trichoderma* protoplasztok regenerálására alkalmazott táptalaj összetevői: 1% glükóz, 0,5% KH_2PO_4 , 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 27% szacharóz és 1,5% agar.

III.3. Sephadex G-150 oszlopkromatográfia

A liofilezéssel tízszeresére töményített fermentlevek 2 ml-ét Sephadex G-150 gélt (Pharmacia) tartalmazó oszlopra (0,9 x 56 cm) vittük fel. Ennek a gélnek a frakcionálási molekulásúly-tartománya fehérjékre 5000-400000 dalton. Eluensként 0,1% MgCl_2 -ot és 0,1% NaCl -ot tartalmazó oldatot használtunk. A minta teljes átfolyása után a 10-10 cseppet tartalmazó frakciókat -20°C -on tároltuk. Az enzimaktivitások mérései a III.5. fejezetben leírt módon történtek. Az aktivitáscsúcsoknak megfelelő frakciótartományokra meghatároztuk a megoszlási koefficiens (K_{av}) értékét:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

ahol V_e az elúciós térfogat (megfelelő frakció száma x 1 frakció térfogata [0,52 ml]), V_0 a kizárási térfogat (6,24 ml), V_t pedig a gélagy össztérfogata (35,6 ml).

Az aktivitáscsúcsoknak megfelelő hozzávetőleges molekulásúly-értékeket kalibrációs görbéről határoztuk meg a kapott K_{av} értékek segítségével.

III.4. A vízpotenciál meghatározása

Az oldatok ozmolalitását Vogel OM 801 ozmométerrel végzett ozmometrikus méréssel határoztuk meg. Vízakivitást számoltunk az oldatok ozmolalitásából, a közeg mátrixpotenciálját elhanyagolhatónak tekintve. Ezt követően vízpotenciál-értékeket számoltunk a vízakivitásból az alábbi egyenlet segítségével:

$$\text{vízpotenciál} = \frac{RT \ln a_w}{V_w}$$

ahol $R = 8,31 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ bar/mol K}$, T a hőmérséklet (K), a_w a vízakivitás és V_w a víz parciális molális térfogata (m^3/mol). A vízpotenciál-értékeket MPa-ban fejeztük ki.

III.5. Enzimaktivitás-mérések

III.5.1. Az enzimaktivitás-mérések alpmódszerei

A hifamennyiséget a szervesen kötött foszfortartalom alapján (Herbert és mtsai., 1971) határoztuk meg. Az aspecifikus proteáz méréséhez azokazeint, az aspecifikus kitináz méréséhez pedig kolloid kitint használtunk szubsztrátként.

A β -glükózidáz, cellobiohidroláz, β -xilozidáz és β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz aktivitások mérésére paranitrofenil-, a tripszin- és kimotripszin-típusú proteáz aktivitások mérésére pedig paranitroanilin szubsztrátokat használtunk (Sigma). A fermentlevek 100 μl -ét

100 µl 200 µg/ml-es szubsztrátoldattal inkubáltuk 1 órán át 25°C-on, majd Labsystems Uniskan II mikrotiterlap-spektrofotométer segítségével meghatároztuk a minták optikai denzitását 405 nm-en. Paranitrofenil szubsztrátok alkalmazása esetén a mérések előtt az enzimreakciókat 50 µl 10% Na₂CO₃ hozzáadásával állítottuk le.

Az endocelluláz, endoxilanáz és β-1,3-glukanáz aktivitásokat természetes szubsztrátokkal (CMC, xilán ill. laminarin, Sigma) inkubáltuk, a méréseket pedig a redukáló cukor felszabadulásán alapuló dinitroszalicilsav-módszerrel végeztük: 100 µl fermentlevet kevertünk 100 µl 1 mg/ml-es szubsztrátoldattal, majd 24 órán át inkubáltuk 25°C-on. Ezt követően 400 µl dinitroszalicilsav-reagenst adtunk a mintákhoz, majd 100°C-os vízfürdőn 20 percig inkubáltuk. Hűtés után meghatároztuk a minták optikai denzitását 570 nm-en Labsystems Uniskan II mikrotiterlap-spektrofotométer segítségével. Az egyes enzimek mérésére használt szubsztrátokról és mérési módszerekről nyújt áttekintést az 1. táblázat.

III.5.2. Speciális inkubációk

A vízpotenciál *in vitro* enzimaktivitásokra gyakorolt hatásának vizsgálatokor 0,5 mg/ml-es oldatokat készítettünk a szubsztrátokból glicerol és pH 6-os foszfát-puffer elegyében, -0,74 MPa és -50,32 MPa közötti vízpotenciál-értékek beállítása céljából.

A kultúrfiltrátumok 100 µl-nyi mintáit liofilizáltuk és a megfelelő szubsztrátoldat 200 µl-ében feloldottuk. Mikrotiterlapokon 4, 10, 25 és 37°C-on 1 órán át történt inkubáció után a reakciókat leállítottuk, és OD₄₀₅-meghatározást végeztünk a fent leírtak szerint. Minden esetben két párhuzamos mérést végeztünk.

1. táblázat. A vizsgált enzimeknek megfelelő indukáló szénforrás, mérési szubsztrát és irodalom

Vizsgált enzim	Indukáló szénforrás	Mérési szubsztrát	Irodalom
β -glükozidáz	mikrokristályos cellulóz	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glükopiranozid	Gupta és mtsai., 1991
cellobiohidroláz	mikrokristályos cellulóz	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-cellobiozid	Deshpande és mtsai., 1984
endocelluláz	mikrokristályos cellulóz	karboximetil-cellulóz (CMC)	Miller, 1959
β -xilozidáz	xilán	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-xilopiranozid	Xu és mtsai., 1991
endoxilanáz	xilán	xilán	Miller, 1959
aspecifikus proteáz	tejpor (Skim Milk Powder)	azokazein	Lottenberg és mtsai., 1981
tripszin-típusú proteáz	tejpor (Skim Milk Powder)	<i>N</i> -benzoil-Phe-Val-Arg- <i>p</i> -nitroanilid	Delmar és mtsai., 1979
kimotripszin-típusú proteáz	tejpor (Skim Milk Powder)	<i>N</i> -szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilid	Gupta és mtsai., 1991
aspecifikus kitináz	kolloid kitin	kolloid kitin	Rodriguez-Kabana és mtsai., 1983
β -1,4-N-acetil-glükózaminidáz	kolloid kitin	<i>p</i> -nitrofenil- <i>N</i> -acetyl- β -D-glükózaminid	Yabuki és mtsai., 1986
β -1,3-glukanáz	laminarin	laminarin	Miller, 1959

A nehézfémionok *in vitro* enzimaktivitásokra gyakorolt hatásának vizsgálatokor a felülúszók 100 μ l-nyi mennyiségét 50 μ l 2 mg/ml-es szubsztrátoldattal valamint 50 μ l 4 mmolos nehézfémoldattal inkubáltuk, ami 0,5 mg/ml-es szubsztrát-, és 1 mmolos nehézfémvégkoncentrációt eredményezett.

Minden esetben három párhuzamos mérést végeztünk.

III.6. Nemesítés UV-mutagenézissel

III.6.1. UV-fénnyel szembeni érzékenység meghatározása

A nemesítendő *Trichoderma* törzsekből 10000 konídium/ml-es szuszpenziókat készítettünk. A szuszpenziókból 50-50 µl-t táptalajra (0,1% glükóz, 0,3% élesztőkivonat, 1% KH_2PO_4 , 2% agar) szélesztettünk csikban, majd 23 cm magasságban lévő Philips 15W-os germicidlámpával különböző ideig (0-60 s) besugároztuk a csészéket. Az UV-kezelés nélküli kontroll csészén számolt telepszámot 100%-nak tekintve kiszámoltuk a túlélési százalékot az egyes kezelési idők esetében. Az UV-mutagenézissel történő nemesítés során a 10%-os túlélésnek megfelelő kezelési időt alkalmaztuk az egyes törzsekre.

III.6.2. Nehézfémrezisztens mutánsok izolálása és jellemzése

A nehézfémrezisztens mutánsokat UV-mutagenézissel izoláltuk. A mutánsok direkt szelekciójára a következő nehézfém-koncentrációkat használtuk: $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 25 mmol, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$: 1,6 mmol, $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 3 mmol, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 4 mmol, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$: 0,3 mmol, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 2 mmol, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$: 12 mmol, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: 1 mmol, HgCl_2 : 0,4 mmol, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 1,5 mmol. Ezek a koncentráció-értékek a vad típusú törzsek növekedését 90%-ban gátolták. Az összes izolált mutánst leteszteltük valamennyi nehézfémre az esetleges keresztrezisztenciák megállapítása céljából. A vad típusú törzsek és néhány jó tulajdonságú mutáns *Pythium*, *Rhizoctonia* és *Fusarium* törzsek elleni antagonizmusának képességét *in vitro* antagonizmus-tesztekben vizsgáltuk az adott nehézfémet IC_{50} -koncentrációjában tartalmazó agarlemezeken. Az *in vitro* antagonizmus vizsgálatát a III.2.1. pontban leírtak szerint végeztük

azzal a különbséggel, hogy a *Trichoderma* mutánsokat és a növénypatogén gombákat egyidőben oltottuk a táptalajra.

III.6.3. Kompakt morfológiájú mutánsok izolálása a *Trichoderma viride* T124-es törzsből

A felvett UV-érzékenységi görbe alapján a 10%-os túlélést eredményező 55 másodperces UV-besugárzást választottuk kompakt morfológiájú mutánsok izolálására. A táptalajra szélesztett konídiumokat UV-sugárzással kezeltük, majd 3 nap inkubáció után továbboltottuk a csészéken megjelenő kompakt morfológiájú telepeket.

III.7. Transzformációs kísérletek

III.7.1. Plazmidtisztítás

A kísérleteink során felhasznált pCSN43 plazmidot módosított Birnboim-féle alkalikus lízis módszerrel tisztítottuk *E. coli*-ből (Birnboim, 1983): az LB-tápotdatban egy éjszakán át 37°C-on 200 rpm-mel rázatott tenyészetet centrifugálás (6000 rpm/10 perc) után GET-pufferben (50 mmol glükóz, 10 mmol EDTA·Na₂, 25 mmol TRIS, 0,5 ml 1n HCl) vettük fel, 40 mg lizozimot adtunk hozzá, 4°C-on inkubáltuk 10 percig, majd 5 ml ASDS-t (0,2 mol NaOH, 1% SDS), újabb 10 perc után pedig 4 ml acetát puffert (40,7 % Na-acetát, 1% KCl, 1,725 %-os ecetsav) mértünk hozzá. 10 perc 4°C-on történő inkubálás után centrifugáltuk a mintát (16000 rpm/20 perc), a felülúszóhoz 2 térfogatnyi 95%-os etanolt adtunk, majd egy éjszakán át -20°C-on inkubáltuk. Centrifugálás (6000 rpm/10 perc), mosás és szárítás után desztillált vízben felvettük a mintát, majd RN-áz kezelést végeztünk 20 µl 10 mg/ml-es

koncentrációjú RN-áz törzsoldattal 37°C-on 1 óráig. Ezt követte a fenolozás: 1 ml pufferolt PCI-t (fenol : kloroform : izoamilalkohol 25 : 24 : 1; 1 M TRIS HCl-val pH 8,0-ra állítva) adtunk a preparátumhoz, centrifugáltuk (6000 rpm/10 perc), óvatosan leszedtük a felső vizes fázist, majd 1/10 térfogatnyi acetát puffert és 2 térfogatnyi 95%-os etanolt adtunk hozzá és egy éjszakán át -20°C-on inkubáltuk. Újabb centrifugálás, 70%-os alkohollal történő mosás és szárítás után a csapadékot 0,5 ml steril desztillált vízben vettük fel.

III.7.2 A plazmidok azonosítása restrikciós enzim analízissel

Emésztési elegyet készítettünk (1 µg plazmid DNS, 1 µl tízszeres töménységű restrikciós enzim puffer, 1 µl restrikciós enzim - *Bam*HI, *Hind*III, *Sa*II, 7 µl desztillált víz), majd az összemért elegyet 1 órán át inkubáltuk 37°C-on. Az emésztést 6 µl felvivő oldat (30% glicerol, 0,1% brómfenolkék) hozzáadásával állítottuk le, a mintákat pedig 1%-os horizontális agaróz gélben elektroforetizáltuk TBE-pufferben (1% TRIS pH 8,0, 5,5% bórsav, 0,1% EDTA·Na₂). 15 perc 0,001%-os etidium-bromidos festés után a mintákat UV fényben vizsgáltuk.

III.7.3. *Trichoderma* protoplasztok transzformálása

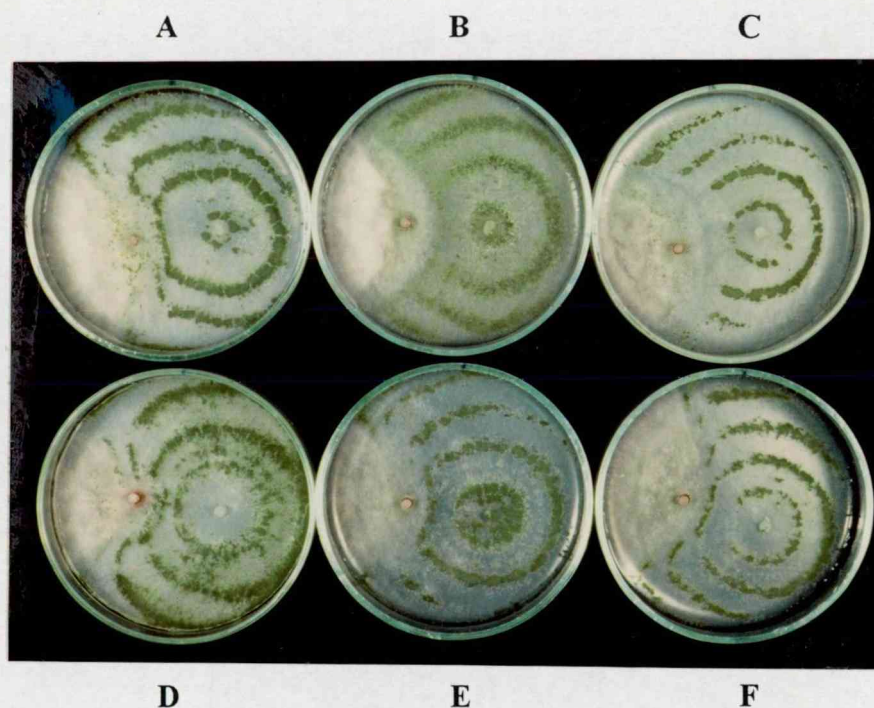
Az általunk végzett transzformációs eljárásban a gomba sejtfalát éticsiga emésztőrendszeréből preparált csigaenzim segítségével oldottuk le, és az így kapott protoplasztokat transzformáltuk. Az alkalmazott transzformálási módszer Ballance és Turner *Aspergillus nidulans*ra kidolgozott módszerének módosított formája (1985). A protoplasztkészítés során 1 kacsnyi gombakonídiumot leoltottunk 20 ml minimál tápoldatba, 24 órán keresztül rázattuk 25°C-on 200 rpm-mel, centrifugáltuk (6000 rpm/10 perc), majd

pufferolt csigaenzimben (400 mg csigaenzim, 20 μ l merkaptoetanol, 20 ml KCl-os foszfát pufferben: 0,6 M KCl, 0,8% KH_2PO_4 , 0,15% Na_2HPO_4 , pH 6,0) felszuszpendáltuk a kiülepített sejteket. Egy órás, kis sebességgel történő rázatás után a keletkező protoplasztokat átszűrtük steril vattán, centrifugáltuk (6000 rpm/10 perc), majd 50 ml KCl-os foszfát pufferben felszuszpendáltuk. 10 ml 0,7 M-os KCl oldattal történő mosás után Bürker-kamrával megszámláltuk a keletkezett protoplasztokat. Ezt követte a transzformálás folyamata: kettéosztottuk a szuszpenziót (5-5 ml), centrifugáltuk (6000 rpm/5 perc), 200-200 μ l TN 1 oldatban (0,7 M KCl, 50 mmol CaCl_2) vettük fel a protoplasztokat, az egyik szuszpenzióhoz 20 μ l-t adtunk a pCSN43 plazmidpreparátumból, a másik szuszpenzió volt a kísérlet kontrollja. A szuszpenziókhöz 50-50 μ l 4°C-os TN2-t (60% PEG 6000, 100 mmol TRIS·HCl, 50 mmol CaCl_2 , pH 7,5) adtunk (Langin és mtsai., 1990), 10 percig 4°C-on inkubáltuk, 1-1 ml TN2 oldatot adtunk hozzá, 5 percig szobahőmérsékleten tartottuk, majd 100-100 ml 40°C-os regeneráló táptalajba kevertük a mintákat és 4-4 Petri-csészébe öntöttük szét a 100-100 ml táptalajt.

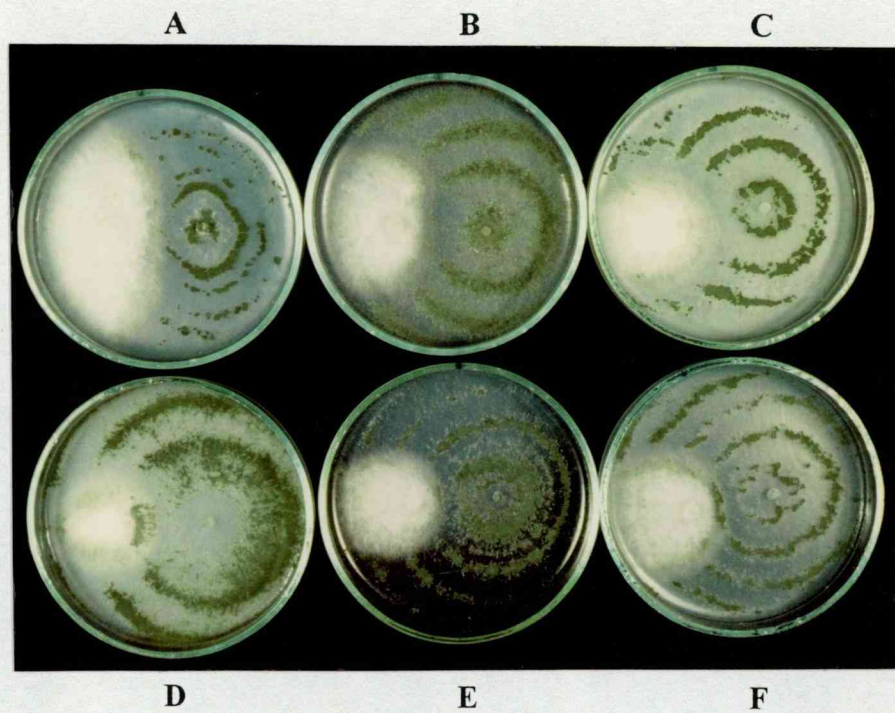
IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

IV.1. *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombákkal szembeni *in vitro* antagonizmusának vizsgálata

A *Trichoderma* törzsek antagonista képességeit 25°C-on növénypatogén *F. culmorum* (3. ábra), *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* (4. ábra), *P. debaryanum*, valamint *R. solani* (5. ábra) gombákkal szemben mértük fel élesztőkivonatos táptalajon. Az antagonizmus makroszkóposan észlelhető jelensége a törzsek azon képessége, hogy Petri-csészére leoltva közös tenyészetben képesek-e gátolni az antagonizálandó törzs növekedését és ránövekedni a telepére. Mindegyik megvizsgált *Trichoderma* törzs képes volt jelentős mértékben gátolni a növénypatogén gombák telepeinek növekedését, egyes esetekben a *Trichoderma* törzsek rá is nőttek a növénypatogénekre.



3. ábra. *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizmusa *F. culmorum*-mal szemben. A. *T. harzianum* T66, B. *T. viride* T114, C. *T. aureoviride* T122, D. *T. viride* T124, E. *T. viride* T228, F. *T. harzianum* T334.



4. ábra. *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizmusa *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*-val szemben. A. *T. harzianum* T66, B. *T. viride* T114, C. *T. aureoviride* T122, D. *T. viride* T124, E. *T. viride* T228, F. *T. harzianum* T334.



5. ábra. *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizmusa *R. solani*-val szemben. A. *T. harzianum* T66, B. *T. viride* T114, C. *T. aureoviride* T122, D. *T. viride* T124, E. *T. viride* T228, F. *T. harzianum* T334.

Korábbi tapasztalatok alapján a vizsgált törzsek többsége 10°C-on is képes antagonizálni *R. solani* és *F. oxysporum* törzseket, *P. debaryanummal* szemben pedig a *T. aureoviride* és *T. viride* törzsek bizonyultak hatékonyabbnak ezen a hőmérsékleten (Antal és mtsai., 2000). Egy közelmúltban született tanulmány egy szegfűből izolált endofita *T. aureoviride* törzs *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*-val szembeni hatékony *in vitro* antagonizmusáról tudósít, és a törzs biokontroll célokra történő alkalmazásának lehetőségét elemzi (Carver és mtsai., 1996). Camporota (1985) 28 *Trichoderma* törzs *R. solani*-val szembeni *in vitro* antagonizmusát tanulmányozta, és az antagonizmus hátterében álló mechanizmusok közül a mikoparazitizmust találta a leghatékonyabbnak. *F. culmorum*-mal szemben sikeres *in vitro* antagonizmus-kísérleteket végeztek *T. harzianum* törzsekkel, a szerzők az antibiózis antagonizmusban betöltött szerepét hangsúlyozzák (Michrina és mtsai., 1995).

Az általunk vizsgált növénypatogén gombák mellett *Trichoderma* törzsek sikeres *in vitro* antagonistának bizonyultak más gombakártevők, pl. *Sclerotium rolfsii*, *Ceratobasidium cornigerum*, *Phytophthora parasitica* f. *nicotianae*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium myriotylum* (Bell és mtsai., 1982), *Alternaria solani*, *Botrytis fabae*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium tricinctum* (Labudova és Gogorova, 1988) ellen is.

IV.2. A *Trichoderma viride* T124-es törzs extracelluláris enzimtermelésének vizsgálata (Manczinger és mtsai., 2001)

IV.2.1. Enzimtermelés induktív és nem induktív körülmények között különböző szén- és nitrogénforrások jelenlétében

A *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimrendszereinek előzetes vizsgálatát a *T. viride* T124-es törzsön végeztük, mivel törzseink közül ez a törzs rendelkezik a legkedvezőbb

sajátságokkal a biológiai védekezés céljaira. Az eredményeket a 2. táblázat foglalja össze.

Aspecifikus kitináz csak induktív körülmények között termelődött. Korábbi adatok alapján a *T. harzianum* kitinolitikus enzimeit is csak induktív körülmények között termelődnek (Schickler és mtsai., 1998), az indukcióban pedig a kitin monomere, az *N*-acetil-gükózamin játszik döntő szerepet.

Az aspecifikus proteáz és β -1,3-glukanáz alacsony szintű konstitutív aktivitást mutatott, mely a β -1,3-glukanáz esetében mind a szén-, mind a nitrogénforrástól függött: a konstitutív β -1,3-glukanáz aktivitás szintje a NaNO_3 -tartalmú, szénforrásként glicerolt tartalmazó tápoldatban (T6) bizonyult a legmagasabbnak, míg NH_4Cl esetében erős represszió volt megfigyelhető. Induktív körülmények között minden vizsgált enzim aktivitása növekedett mindegyik tápoldattípusban. Az aspecifikus proteáz és a β -1,3-glukanáz esetében a NaNO_3 ,

2. táblázat. A *T. viride* T124-es törzs enzimszekréciója induktív (I) és nem induktív (NI) körülmények között. NA: nincs adat

Táp- oldat	Szén- forrás	Nitrogén- forrás	Aspecifikus proteáz (OD360)		β -1,3-glukanáz (OD540)		Aspecifikus kitináz (OD585)	
			NI	I	NI	I	NI	I
T1	alanin	NH_4Cl	0,009	0,029	0,000	0,046	0,000	0,134
T3	glükóz	NH_4Cl	0,013	NA	NA	NA	0,000	NA
T5	glicerol	NH_4Cl	0,002	0,473	0,000	0,034	0,000	0,248
T7	mannitol	NH_4Cl	0,007	0,092	0,023	0,053	0,000	0,068
T2	alanin	NaNO_3	0,010	0,047	0,004	0,036	0,000	0,088
T4	glükóz	NaNO_3	0,003	NA	NA	NA	0,000	NA
T6	glicerol	NaNO_3	0,009	0,608	0,063	0,084	0,000	0,168
T8	mannitol	NaNO_3	0,007	0,434	0,015	0,065	0,000	0,195
T9F	<i>Fusarium</i> hifa		NA	0,170	NA	0,032	NA	0,019

mint nitrogénforrás és a glicerol, mint szénforrás eredményezte a legnagyobb mértékű enzimszekréción induktív körülmények között.

Mindhárom vizsgált enzim aktivitása represszálható volt tehát bizonyos szén- és nitrogénforrások által. A kiválasztott enzimek aktivitásszintje a legtöbb esetben magasabb volt NaNO_3 nitrogénforrásként történő alkalmazása esetén, mint NH_4Cl jelenlétében, míg a szénforrások közül a glicerol kedvezőbb hatást gyakorolt a szekréción, mint a mannitol. *Fusarium* hifapreparátum egyedüli szén- és nitrogénforrásként történő alkalmazásával is sikerült indukálni mindhárom enzimrendszert. Hasonló eredményeket értek el más növénypatogén gombákból készített preparátumokkal is, pl. *T. harzianum*-ot *R. solani* sejtfalpreparátumon növesztve mind proteáz, mind β -1,3-glukanáz, mind kitináz enzimek indukciója kimutatható volt (Ridout és mtsai., 1988), az utóbbi két enzimrendszer pedig *Sclerotinia sclerotiorum* sejtfal egyedüli szénforrásként történő alkalmazásával is jól indukálhatónak bizonyult (Menendez és Godeas, 1998).

IV.2.2. Extracelluláris enzimek termelése az idő függvényében induktív és nem induktív körülmények között

Az aspecifikus proteáz, β -1,3-glukanáz és β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz enzimaktivitásokat 8 napon át kísértük figyelemmel, az aktivitásokat a hifatömegre vonatkoztattuk.

Az aspecifikus proteáz aktivitás mind az induktív, mind a nem induktív mintákban detektálható volt már 1 nap inkubálás után, de induktív körülmények között jóval magasabb enzimszinteket tapasztaltunk. A második naptól kezdve az aspecifikus proteáz aktivitás minden tápoldattípusban csökkent, feltehetően öndegradáció következtében. A termelt proteázszint

magasabbnak bizonyult NaNO_3 nitrogénforrásként történő alkalmazásakor, mint NH_4Cl esetében. A tápoldatba kibocsátott enzimszint magasabb volt glicerol esetében, mint a mannitolos tápoldatban.

A β -1,3-glukanáz 1 nap rázatás után megjelent induktív és nem induktív körülmények között egyaránt, de az enzim aktivitását represszálta az NH_4Cl , mint egyedüli nitrogénforrás. A második naptól a kezdetben termelt β -1,3-glukanáz aktivitása fokozatosan csökkent induktív körülmények között a vizsgált időtartam végéig, ellentétben a konstitutív enzimszinttel, mely enyhe emelkedést mutatott. A tápoldatba kibocsátott enzimszint magasabb volt glicerol szénforrásként való alkalmazásakor, mint mannitol esetében.

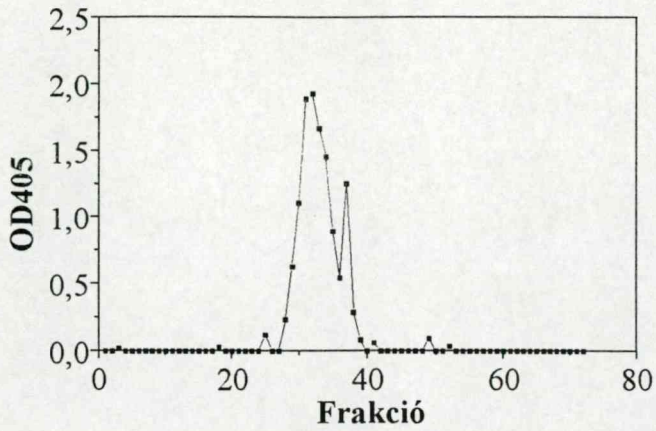
A leoltás utáni első napon alacsony β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz aktivitást mértünk. Meglepő módon magasabb aktivitásokat tapasztaltunk a nem induktív tápoldatokból származó mintákban, mint az induktív tápoldatokból származókban, ami feltehetően a hifák növekedésének kitin jelenléte által történő gátlásával magyarázható. A konstitutív körülmények között termelt enzimszint emelkedett a harmadik napig, majd lassan csökkent a vizsgálati időszak végéig. A termelt β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz enzimszint magasabb volt NaNO_3 nitrogénforrásként történő alkalmazásakor, mint NH_4Cl esetében.

IV.3. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimrendszerének vizsgálata Sephadex G-150 oszlopkromatográfiával (Antal és mtsai., 2001a)

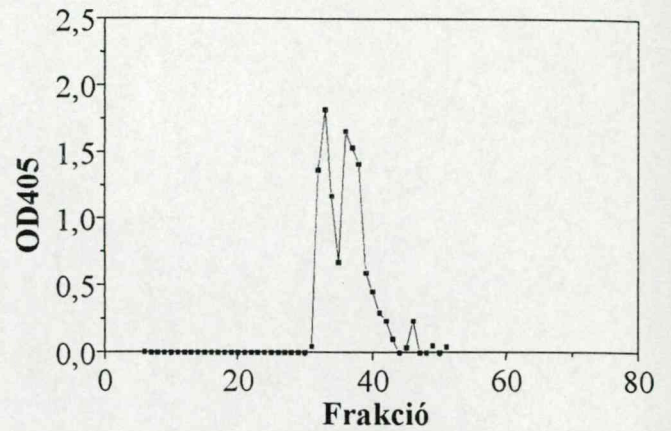
Vizsgálataink során a *T. harzianum* T66-os és T334-es, a *T. aureoviride* T122-es, valamint a *T. viride* T114-es, T124-es és T228-as törzseinek extracelluláris β -glükozidáz, cellobiohidroláz, endocelluláz, β -xilozidáz, endoxilanáz, tripszin- és kimotripszin-típusú

proteáz, β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz és laminarináz enzimprofilját vizsgáltuk induktív fermentlevekben Sephadex G-150 oszlopkromatográfiával.

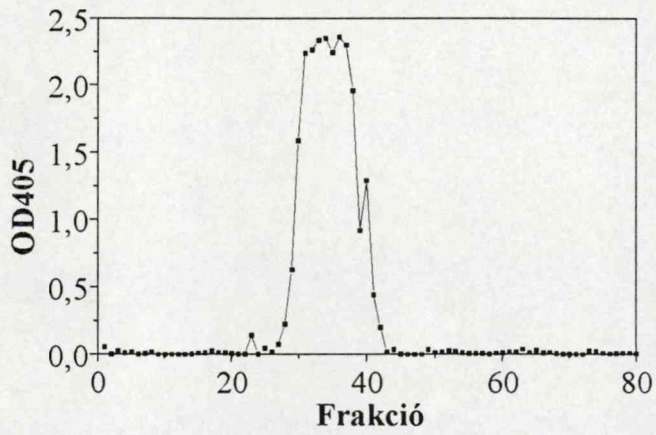
A törzsek β -glükozidáz aktivitásai a 25-65 kDa-os molekulásúly-tartományba estek. Az egyes törzsek β -glükozidáz profilja (6. ábra) hasonló lefutást mutatott, minden esetben legalább két izoenzim volt detektálható, ami megfelel a *Trichoderma pseudokoningii* (Dong és mtsai., 1997) és *Trichoderma reesei* (Takashima és mtsai., 1999) esetében publikált eredményeknek. A T122-es és T114-es törzsek β -glükozidáz görbéinek lefutása alapján azonban további izoenzimek jelenléte feltételezhető. A cellobiohidroláz aktivitások (7. ábra) a 22-65 kDa-os tartományba estek és feltehetően két izoenzimből állnak, melyek a T124-es és T228-as törzsek esetében jól elkülönültek. A szakirodalom *Trichoderma* fajok esetében két cellobiohidrolázt említ, a CBHI-et, mely *T. koningii* esetében 54 kDa-osnak bizonyult (Wey és mtsai., 1994), és a CBHII-t, mely 49,6 kDa-os molekulásúlyú *T. viride* esetében (Wang és mtsai., 1995). A törzsek endocelluláz enzimprofilja (8. ábra) összetett, számos izoenzim feltételezhető. Az endocelluláz aktivitásokat az 5-65 kDa közötti tartományban mértük. Az egyes törzsek között különbségeket találtunk, de a T114-es és T228-as törzs profiljai nagyon hasonlónak bizonyultak. Korábbi tanulmányok *T. reesei* esetében 4 (Ilmén és mtsai., 1997), *T. pseudokoningii* esetében 5 endocelluláz izoenzim jelenlétéről tudósítanak (Dong és mtsai., 1997). A β -xilozidáz aktivitások (9. ábra) a nagy molekulásúlyú (40-100 kDa) frakciókban jelentek meg. *T. reesei* esetében egy 100 kDa körüli, meglehetősen nagy molekulásúlyú β -xilozidázt írtak le (Poutanen és Puls, 1988). Az endoxilanáz aktivitások (10. ábra) a kis molekulásúlyú tartományban (5-30 kDa) adtak elhúzódó csúcsot, számos izoenzimből álló összetett rendszert sejtetve, a T124-es és T228-as törzsek endoxilanáz profilja azonban a többi törzsénél egyszerűbbnek tűnt. Egy *T. reesei* törzs esetében Tenkanen és munkatársai (1992) két endoxilanázt írt le, melyek molekulásúlya 20 és 19 kDa volt. A tripszin- (11. ábra) és kimo-



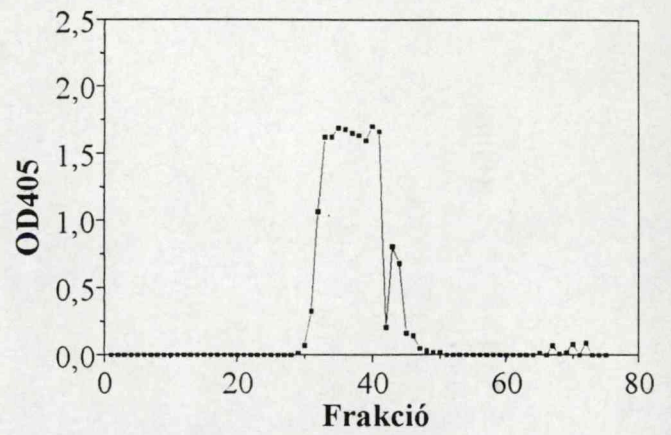
A. *T. harzianum* T66



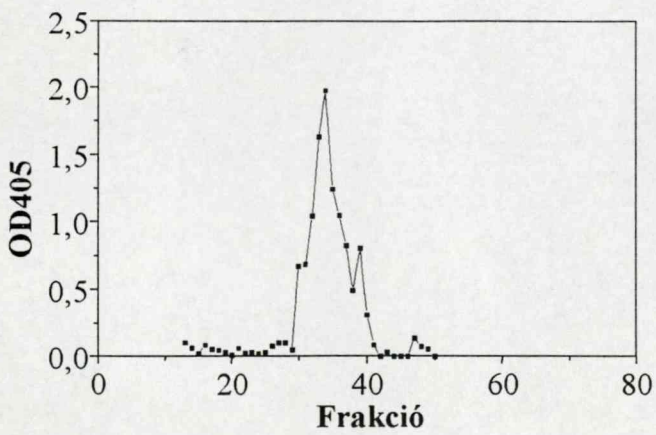
B. *T. harzianum* T334



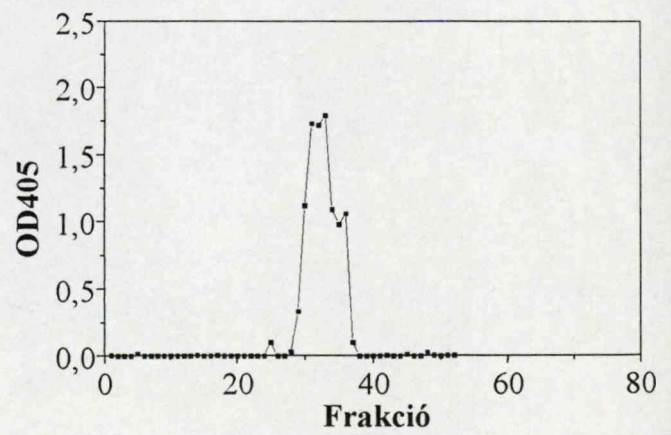
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114

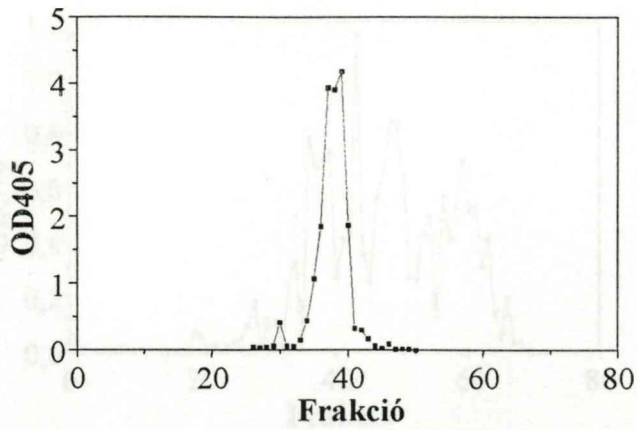


E. *T. viride* T124

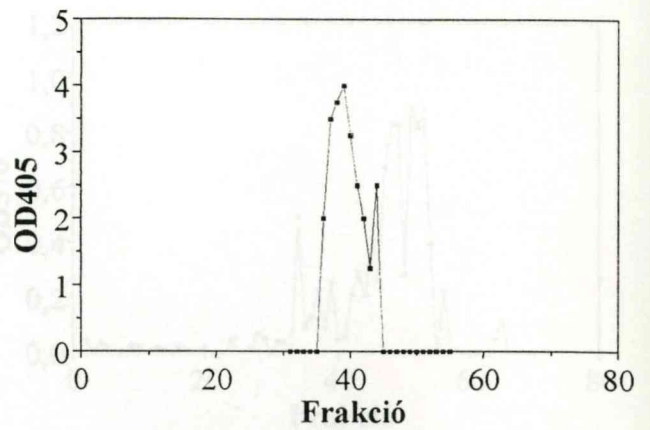


F. *T. viride* T228

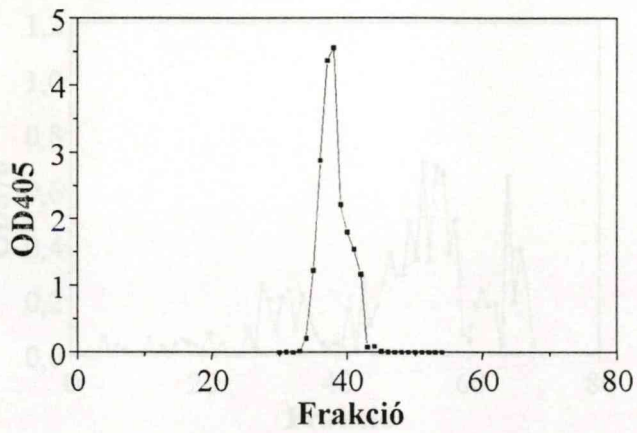
6. ábra. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek β -glükozidáz aktivitásai



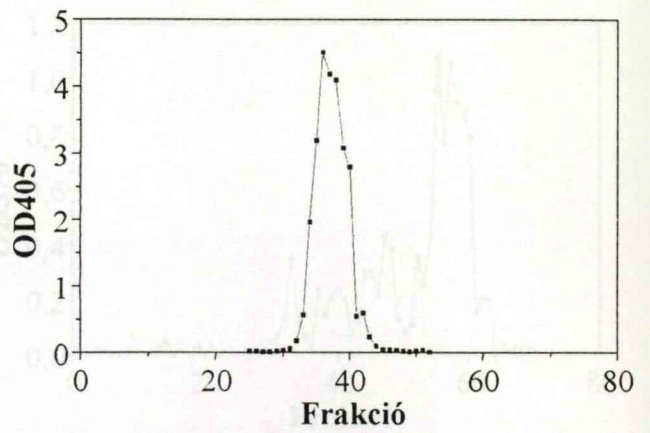
A. *T. harzianum* T66



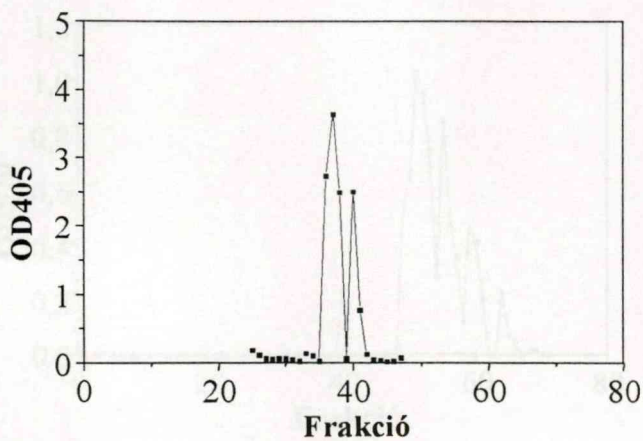
B. *T. harzianum* T334



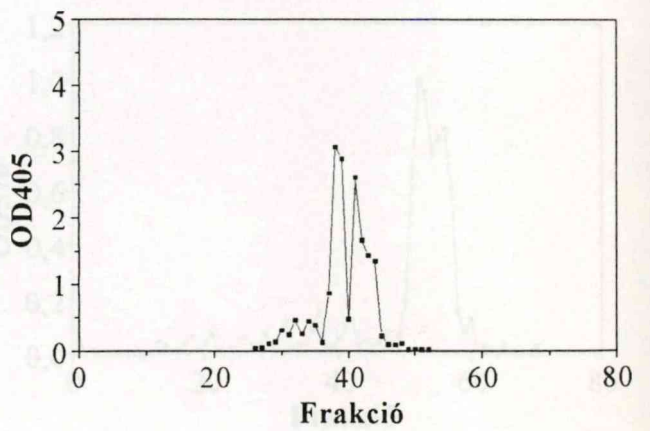
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114

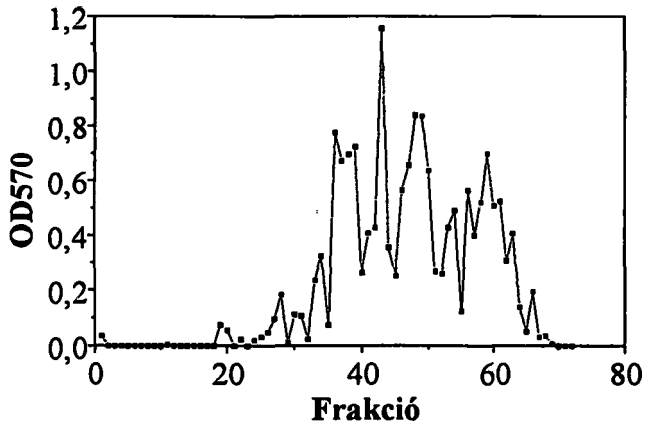


E. *T. viride* T124

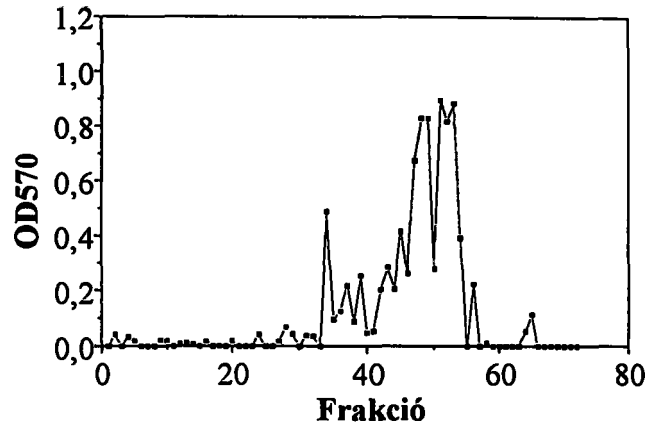


F. *T. viride* T228

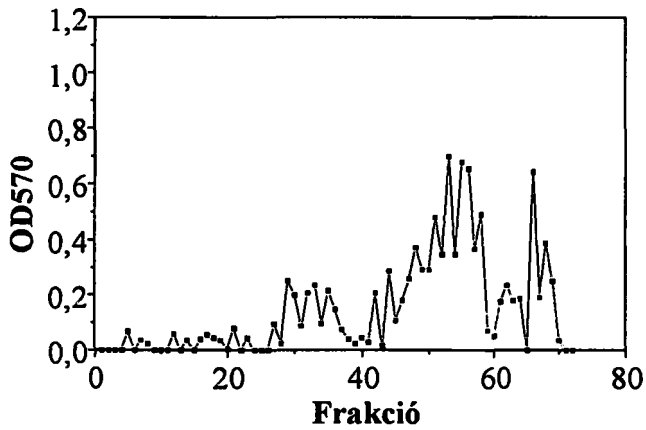
7. ábra. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek cellobiohidroláz aktivitásai



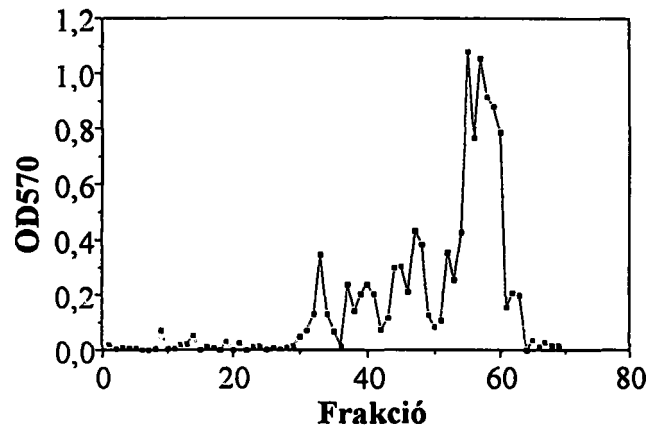
A. *T. harzianum* T66



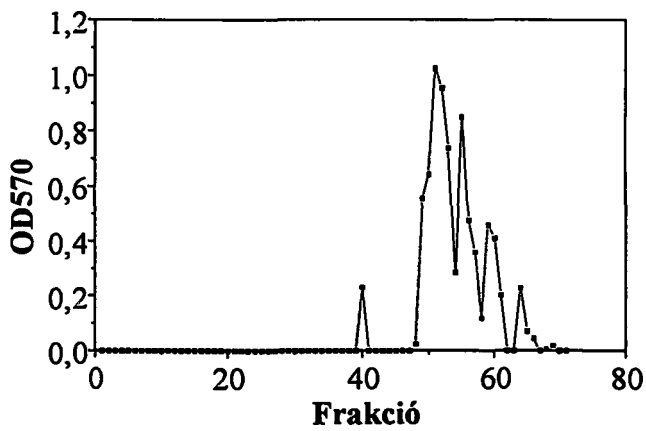
B. *T. harzianum* T334



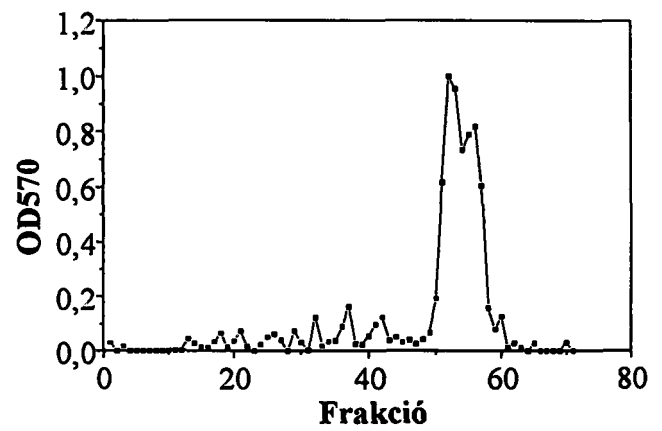
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114

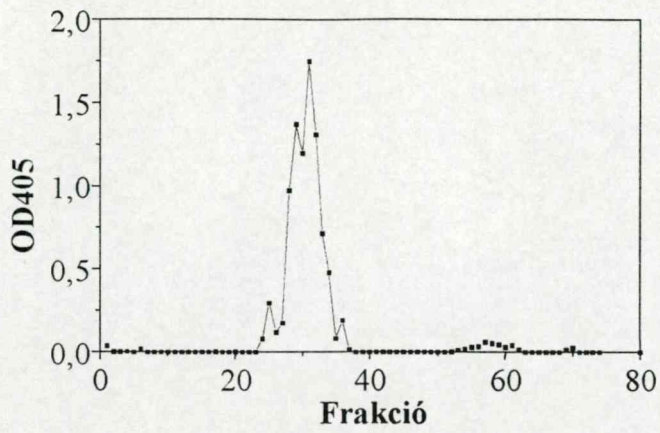


E. *T. viride* T124

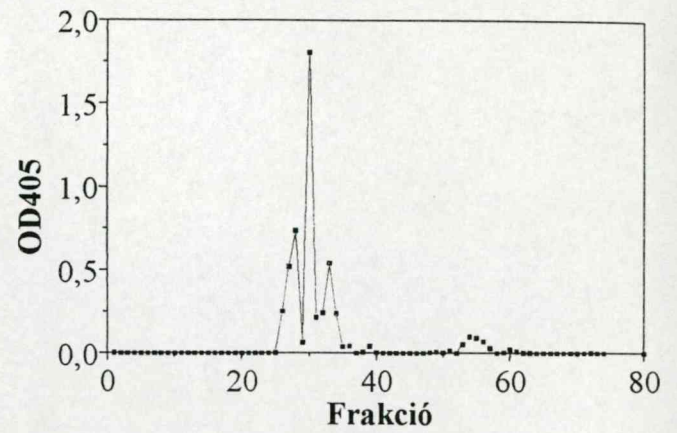


F. *T. viride* T228

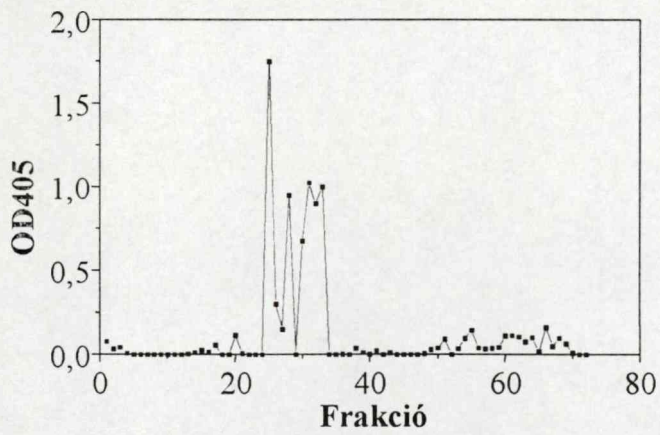
8. ábra. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek endocelluláz aktivitásai



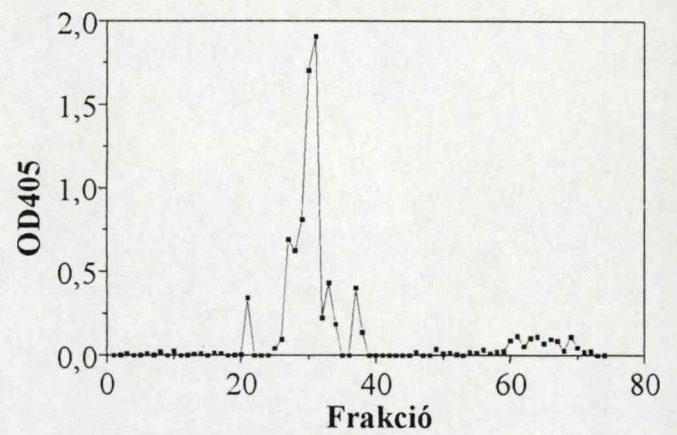
A. *T. harzianum* T66



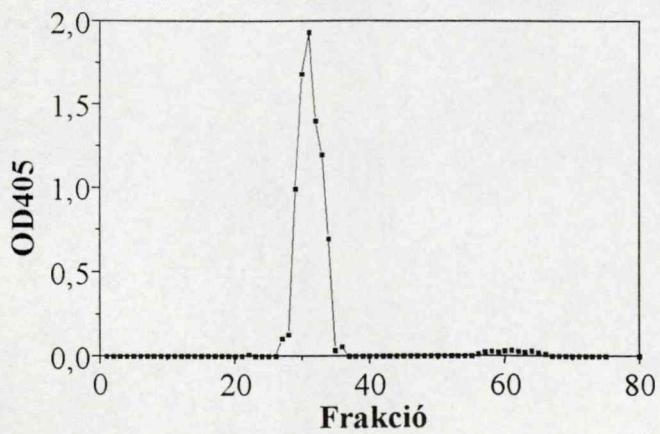
B. *T. harzianum* T334



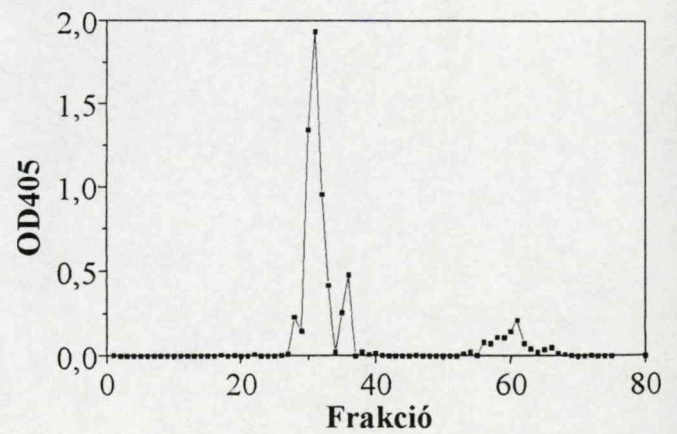
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114

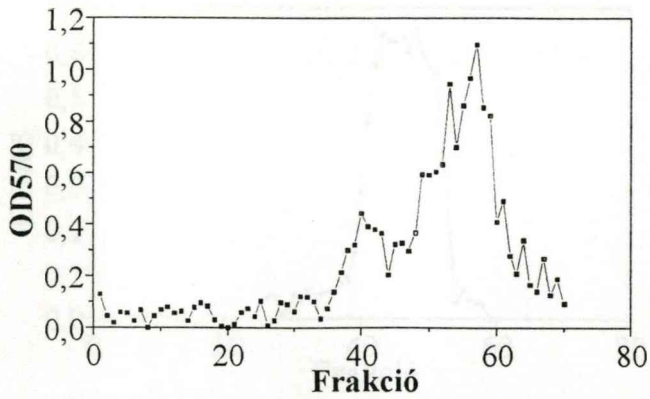


E. *T. viride* T124

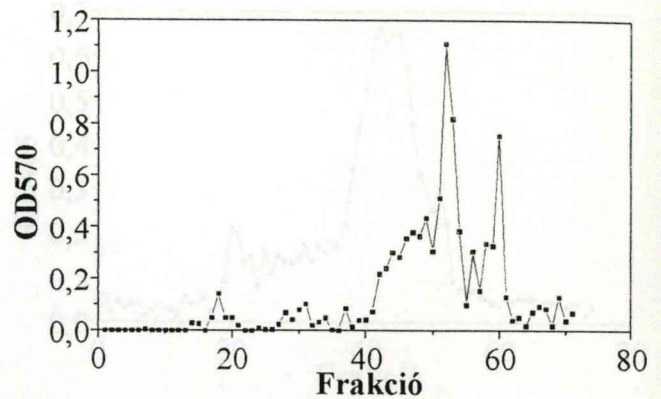


F. *T. viride* T228

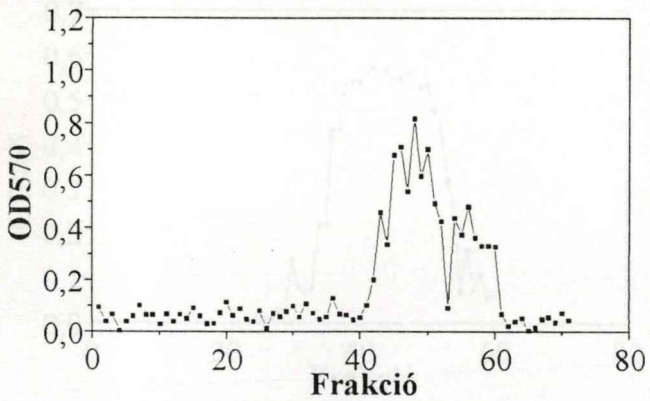
9. ábra. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek β -xilozidáz aktivitásai



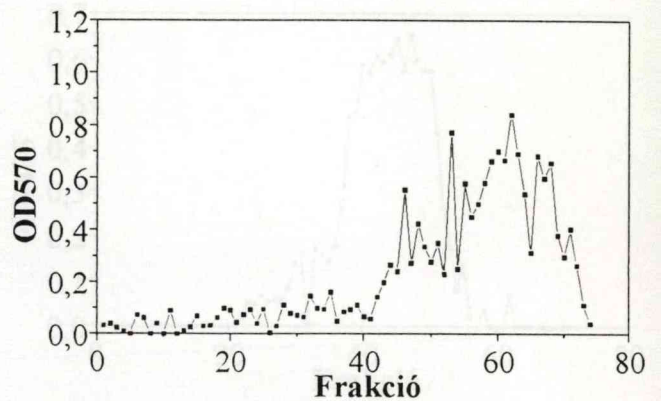
A. *T. harzianum* T66



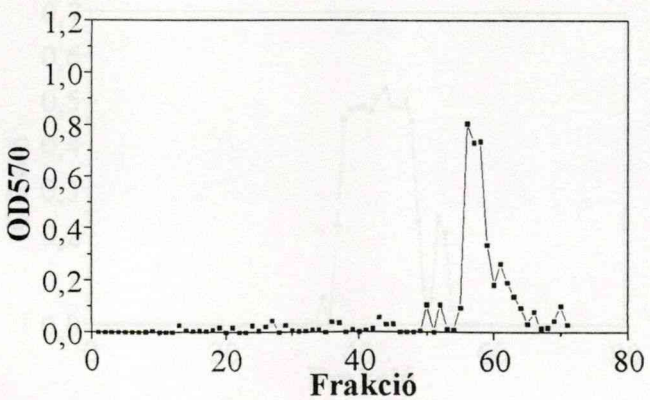
B. *T. harzianum* T334



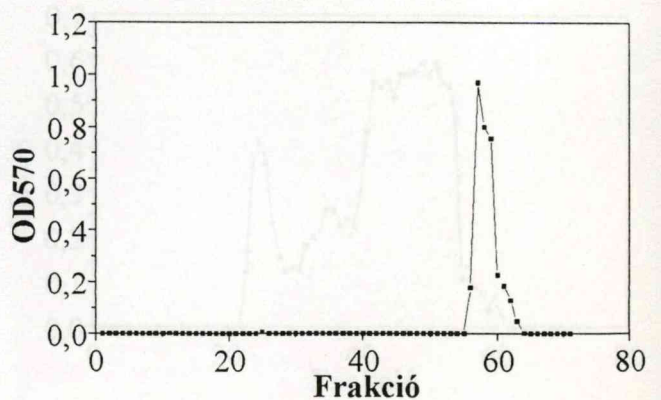
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114

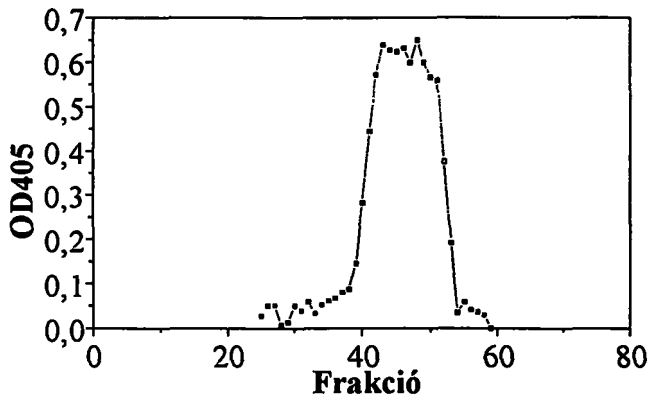


E. *T. viride* T124

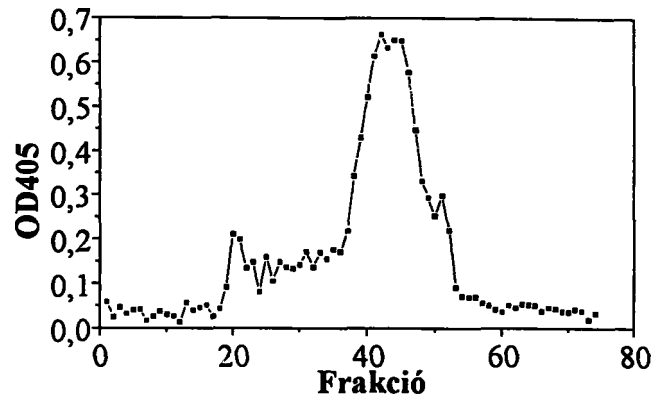


F. *T. viride* T228

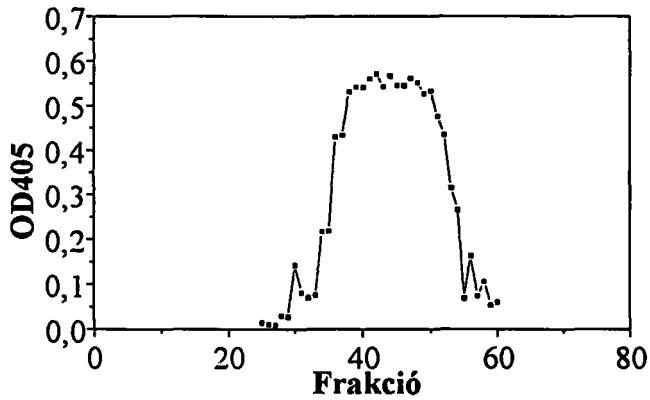
10. ábra. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek endoxilanáz aktivitásai



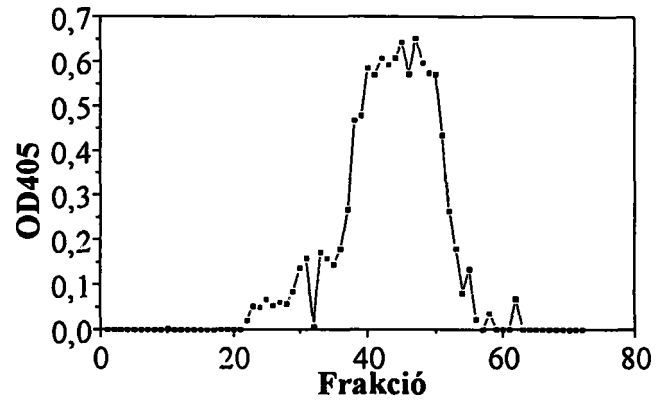
A. *T. harzianum* T66



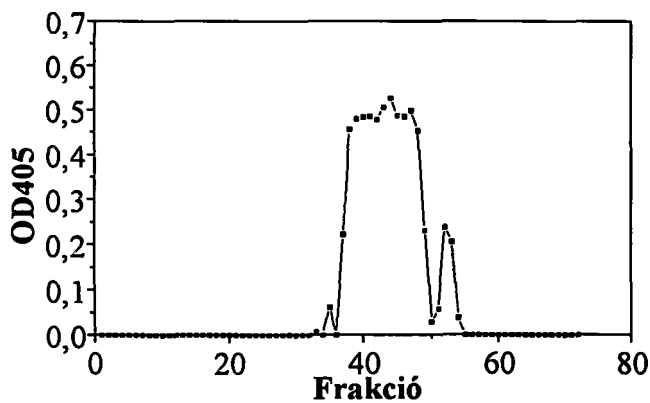
B. *T. harzianum* T334



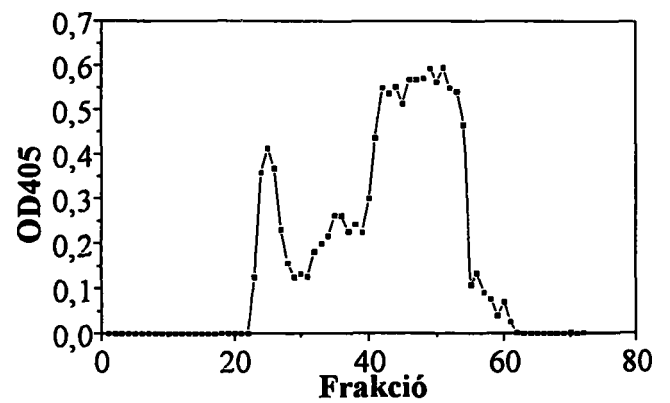
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114

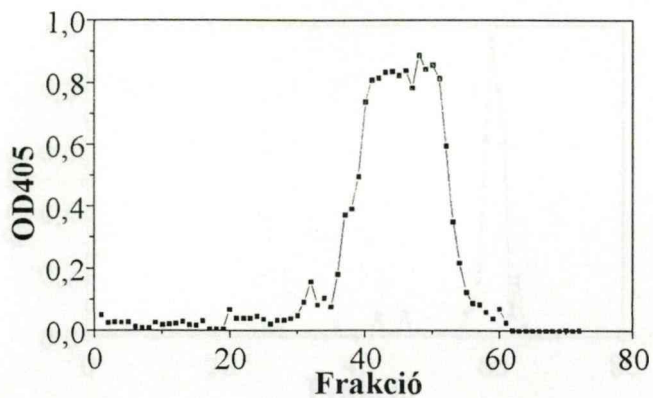


E. *T. viride* T124

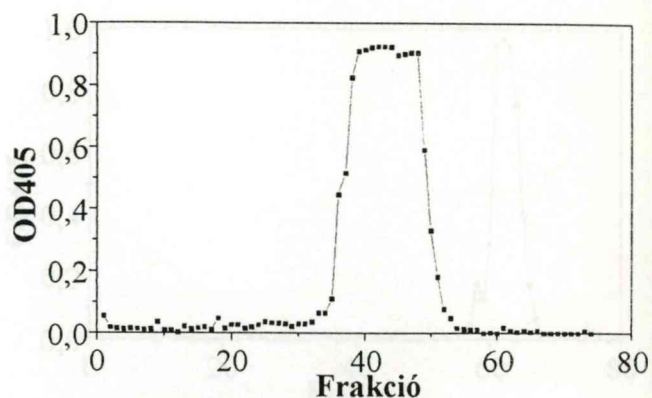


F. *T. viride* T228

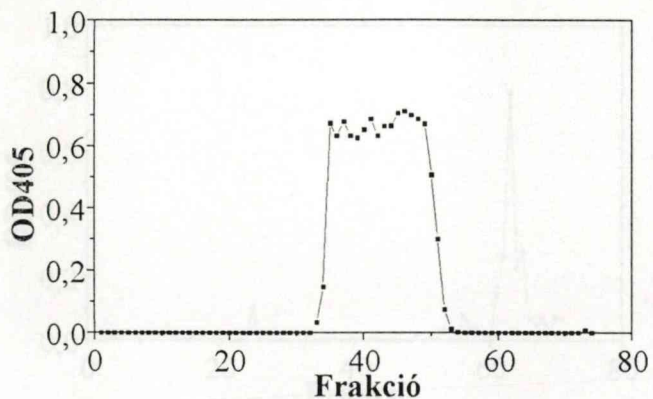
11. ábra. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek tripszin-típusú proteáz aktivitásai



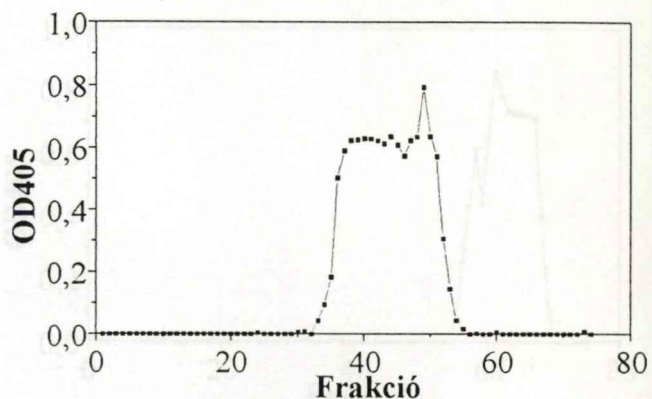
A. *T. harzianum* T66



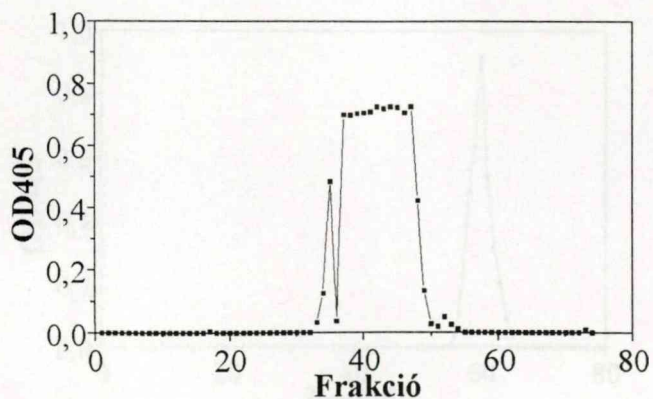
B. *T. harzianum* T334



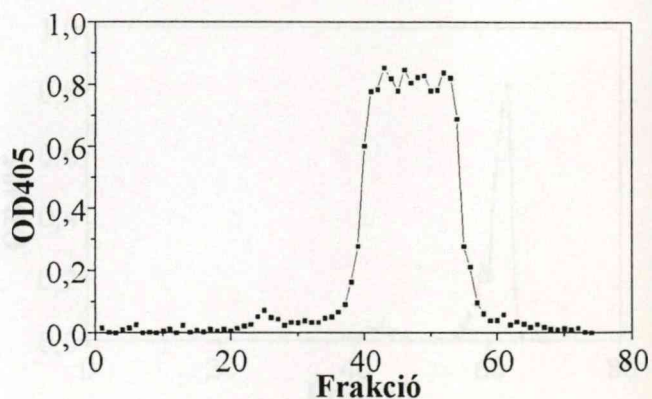
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114

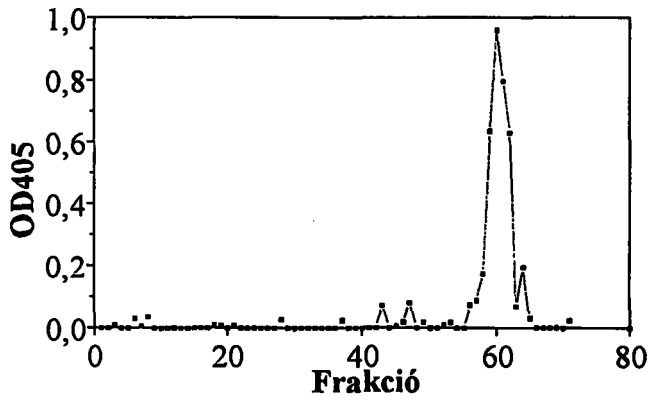


E. *T. viride* T124

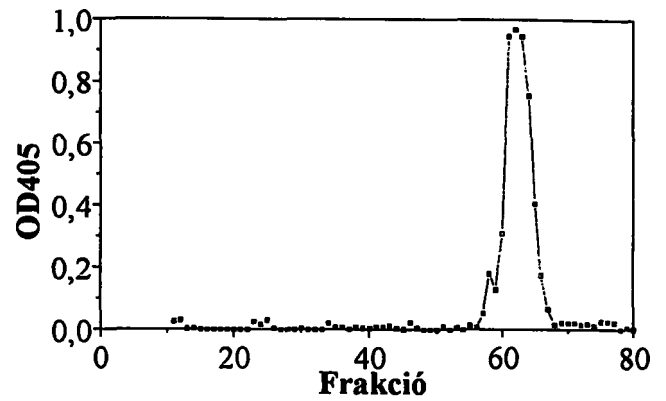


F. *T. viride* T228

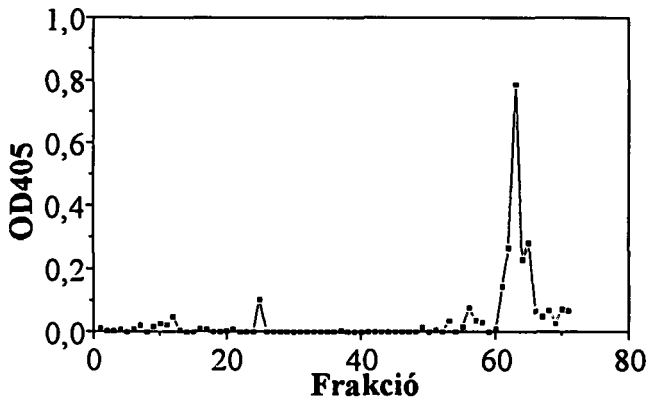
12. ábra. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek kimotripszin-típusú proteáz aktivitásai



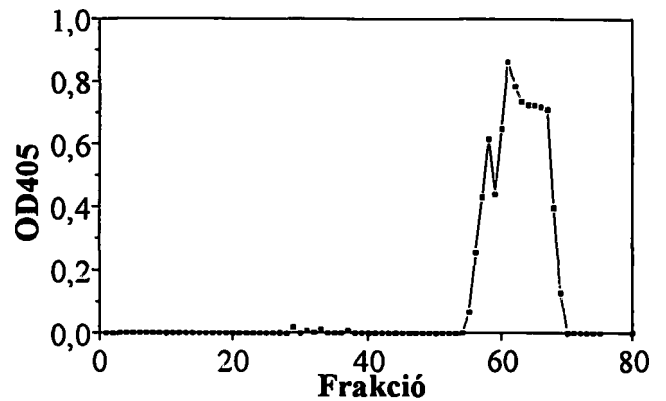
A. *T. harzianum* T66



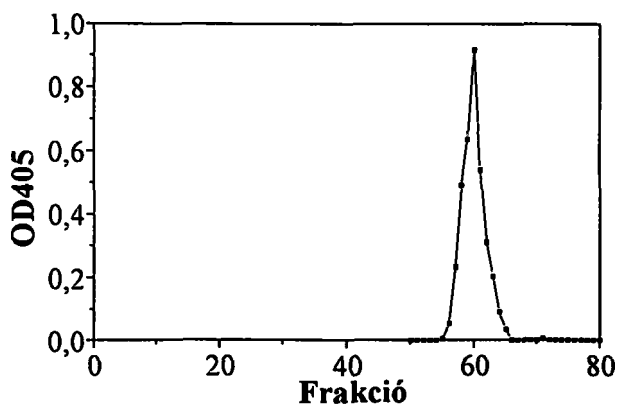
B. *T. harzianum* T334



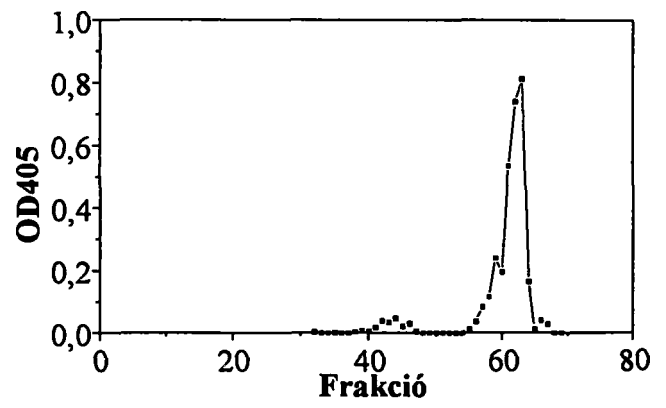
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114



E. *T. viride* T124



F. *T. viride* T228

13. ábra. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz aktivitásai

tripszin-típusú proteáz görbék (12. ábra) nagy hasonlóságot mutattak az egyes törzsek között: mindkét rendszer komplexnek mutatkozott, az aktivitásokat a 10-41 kDa-os molekulásúly-tartományban mértük. Tripszin esetében nagy molekulásúlyú (60-200 kDa) izoenzimek is kimutathatók voltak a T334-es, T114-es és T228-as törzsek esetében.

A *Trichoderma* törzsek extracelluláris proteolitikus rendszereivel kapcsolatban kevés adat áll rendelkezésre a szakirodalomban (Elad és Kapat, 1999; Flores és mtsai., 1997; Geremia és mtsai., 1993; Ridout és mtsai., 1988). A β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz aktivitásokat (13. ábra) a kis molekulásúlyú tartományban (5-7 kDa) mértük, a T114-es törzs esetében elhúzódo aktivitáscúccsal. A szakirodalomban *T. harzianum* esetében két β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz izoenzimiről tudósítanak (Haran és mtsai., 1995; Lorito és mtsai., 1994).

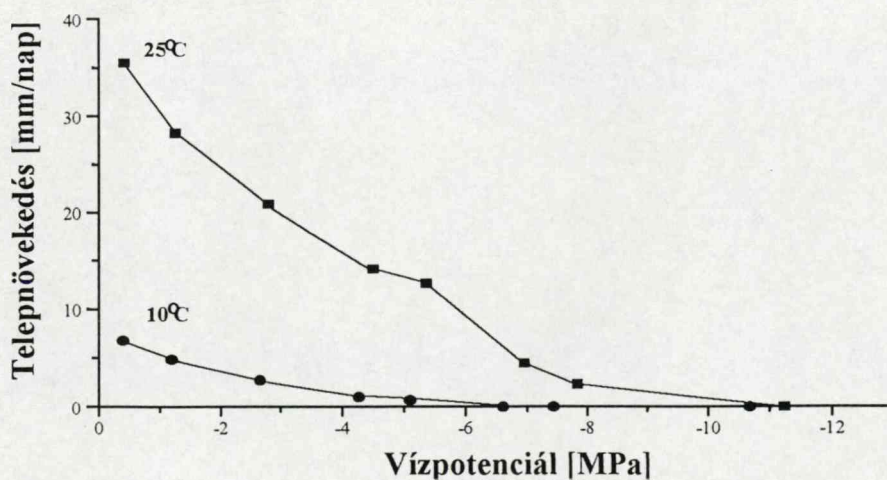
Mivel a biológiai védekezés céljaira potenciálisan felhasználható *Trichoderma* törzsek antagonizmusra való képességének hátterében számos különböző enzimrendszer együttesen játszik szerepet, a *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimprofiljainak részletes vizsgálata komoly gyakorlati jelentőséggel bír.

IV.4. A vízpotenciál és a hőmérséklet hatása a *Trichoderma harzianum* T66-os törzs növekedésére, enzimszekréciójára és *in vitro* enzimaktivitásaira (Kredics és mtsai., 2000)

A *Trichoderma* fajok kompetitív sajátságait jelentősen befolyásolják különböző környezeti tényezők, különösen a hőmérséklet és a vízviszonyok. Biokontroll törzsek alkalmazásának tervezésekor tanácsos a vízviszonyok és a hőmérséklet *Trichoderma* fajok életműködéseire gyakorolt hatásáról információkat gyűjteni. Az alábbi kísérletekben célunk a vízpotenciál és hőmérséklet *Trichoderma harzianum* növekedésére, valamint β -glükozidáz, cellobiohidroláz, β -xilozidáz, β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz és kimotripszin-típusú proteáz enzimeinek szekréciójára és *in vitro* aktivitásaira gyakorolt hatásának vizsgálata volt.

IV.4.1. A vízpotenciál és a hőmérséklet hatása a növekedésre

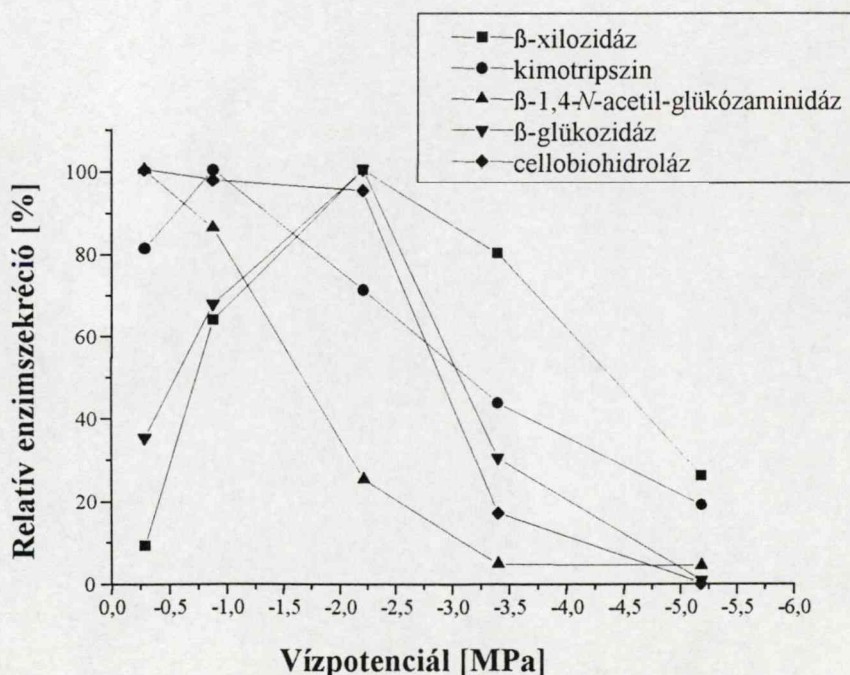
A telepnövekedést 4, 10, 25 és 37°C-on követtük $-0,444$ MPa-tól $-11,232$ MPa-ig terjedő vízpotenciálú táptalajokon. Semmilyen növekedést nem tapasztaltunk 37°C-on. 4°C-on a $-1,480$ MPa-nál magasabb vízpotenciál-értékeken volt némi növekedés, mely a vizsgált törzs jó hidegtűrő képességével magyarázható. Jelentős telepnövekedési rátákat csak 10 és 25°C-on tapasztaltunk (14. ábra). A *T. harzianum* maximális növekedési rátája 36 mm/nap volt $-0,444$ MPa-on. A $-11,232$ MPa-os vízpotenciál érték 25°C-on, és a $-7,252$ MPa-os vízpotenciál-érték 10°C-on már korlátozónak bizonyult, micélium-növekedést nem tapasztaltunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a magasabb vízpotenciálok magasabb lineáris növekedési rátát eredményeznek mindkét hőmérsékleten.



14. ábra. A vízpotenciál hatása *T. harzianum* telepnövekedési rátájára

IV.4.2. A vízpotenciál hatása az enzimszekrécióra

A vízpotenciál hatását vizsgáltuk a β -glükózidáz, cellobiohidroláz, β -xilozidáz, β -1,4-*N*-acetil-glükózaminidáz és kimotripszin-típusú proteáz enzimek szekréciójára a $-0,296$ és $-5,180$ MPa közötti vízpotenciál-tartományban. A 15. ábra mutatja eredményeinket NaCl ozmotikumként történő alkalmazása esetén. Az egyes enzimek szekréciójára optimális vízpotenciál-értékek eltérőek voltak. A cellobiohidroláz és β -1,4-*N*-acetil-glükózaminidáz enzimek a legmagasabb vízpotenciál-értéken ($-0,296$ MPa) mutattak optimális szekréciót, és a kiválasztott enzim mennyisége a vízpotenciál csökkenésével csökkent. A kimotripszin-típusú proteáz enzim szekréciós görbéje hasonló, maximuma $-0,888$ MPa-nál jelentkezett. A β -glükózidáz és β -xilozidáz szekréció $-2,220$ MPa-os vízpotenciál-értéknél volt optimális. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor KCl-ot használtunk a vízpotenciál csökkentésére. Az enzimszekréció mértéke tehát feltehetően nem az ozmotikumként használt só minőségétől, hanem a létrehozott vízpotenciáltól függ.



15. ábra. A vízpotenciál hatása a *T. harzianum* enzimszekréciójára folyadékkultúrákban

A kísérlet alapján megállapítható, hogy a különböző enzimek szekrécijára különböző vízpotenciál értékek bizonyultak optimálisnak, tehát a T66-os törzs által a tápközegbe szekretált enzimek mennyiségi és minőségi összetétele alapvetően függ a közeg vízpotenciáljától.

IV.4.3. A vízpotenciál és a hőmérséklet hatása az *in vitro* enzimaktivitásokra

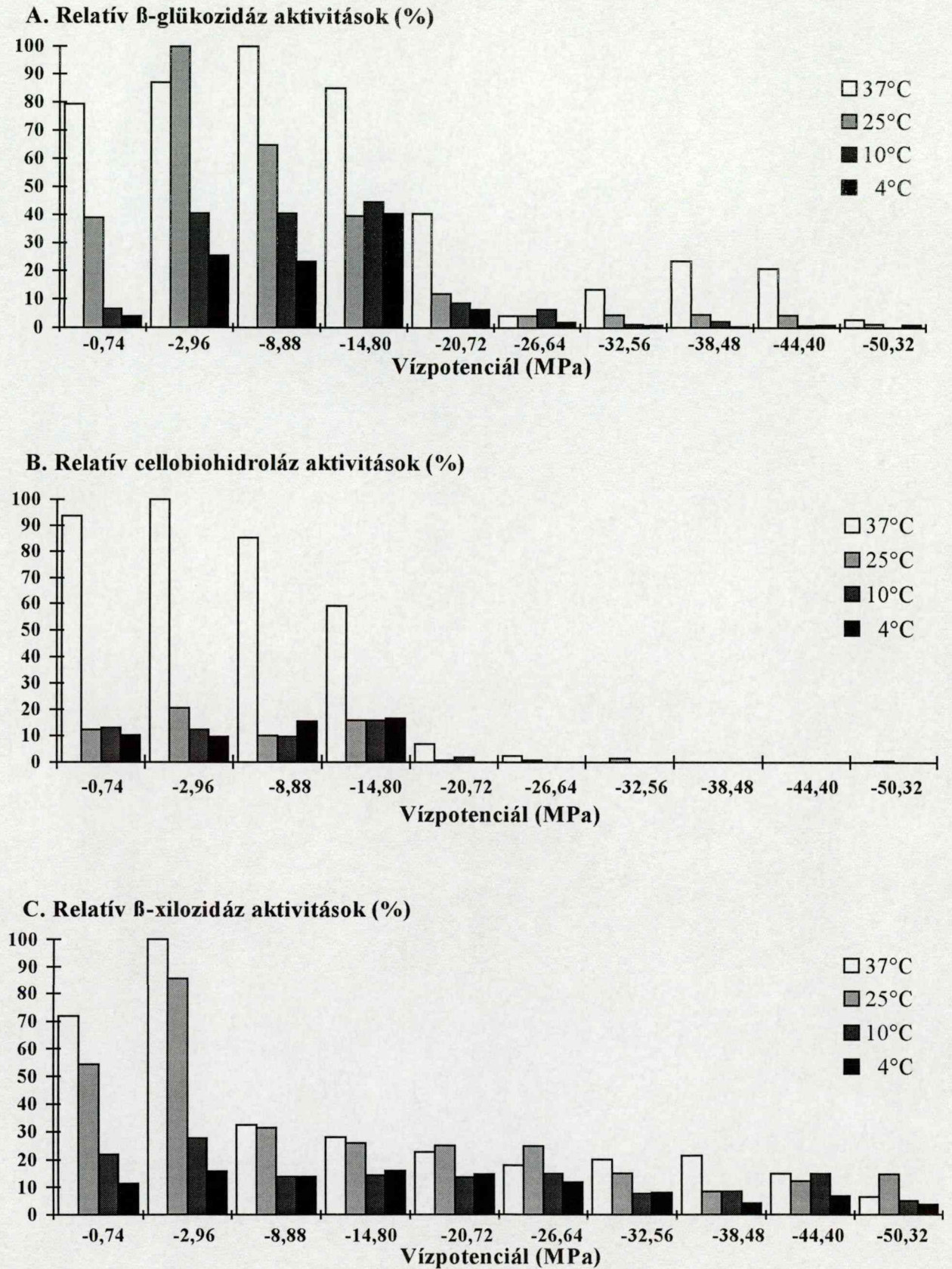
A vízpotenciál hatását vizsgáltuk a β -glükozidáz, cellobiohidroláz, β -xilozidáz, β -1,4-*N*-acetil-glükózaminidáz és kimotripszin-típusú proteáz enzimek *in vitro* aktivitásaira 4, 10, 25 és 37°C-on. A 16. ábra a vizsgált enzimek relatív enzimaktivitását mutatja 4 nap tenyésztés után, 100%-nak az egyes enzimek ezen időpontbeli legnagyobb aktivitását vettük. 37°C-on minden enzim aktivitása viszonylag magasnak bizonyult. A β -glükozidáz (16. A) és cellobiohidroláz (16. B) a $-0,74$ és $-14,80$ MPa közötti tartományban mutatott optimális enzimaktivitásokat $-8,88$ illetve $-2,96$ MPa-nál mérhető maximummal. A β -glükozidáz esetében egy második csúcs is megjelent $-38,48$ MPa-nál. A β -xilozidáz (16. C) optimális vízpotenciál-tartománya szűkebbnek adódott ($-0,74$ -tól $-2,96$ MPa-ig), maximuma $-2,96$ MPa-nál helyezkedett el, és egy másik csúcs volt található $-38,48$ MPa-nál.

Ezen esetekben a maximális enzimaktivitások a micélium-növekedéshez optimálisnál alacsonyabb vízpotenciál-értékeken jelentkeztek. Az β -1,4-*N*-acetil-glükózaminidáz (16. D) és a kimotripszin-típusú proteáz (16. E) viszont $-0,74$ MPa-nál volt a legaktívabb, mely érték a növekedéshez is optimális. A β -1,4-*N*-acetil-glükózaminidáz aktivitások közel lineárisan csökkentek a vízpotenciál csökkenésével, de $-38,48$ MPa-nál egy második, kisebb csúcs is mérhető volt. A kimotripszin-típusú proteáz aktivitásnak $-0,74$ MPa-nál található a maximuma,

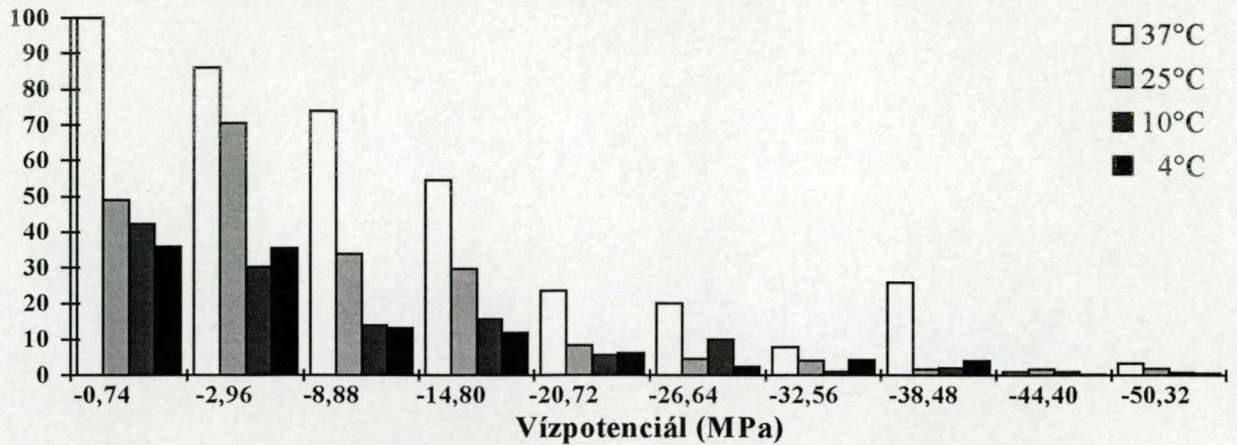
és a relatív enzimaktivitások 40-60% körüli értékeket mutatnak egy igen széles (-2,96 és -50,32 MPa közötti) vízpotenciál-tartományban. Alacsonyabb hőmérsékleten minden enzim aktivitása alacsonyabb volt. Érdekes, hogy a β -glükozidáz és a cellobiohidroláz esetében az alacsonyabb hőmérsékleteken (10°C és 4°C) a maximális aktivitások alacsonyabb vízpotenciál-értékeknél (-14,80 MPa) jelentek meg. E hidegtűrő törzs 10°C-os és 4°C-os relatív enzimaktivitásai között a legtöbb esetben nem tapasztaltunk szembetűnő különbséget. Úgy tűnik, hogy a hőmérséklet csökkentése leginkább a cellobiohidroláz aktivitásokat, legkevésbé a kimotripszin-típusú proteáz aktivitásokat befolyásolja. A legtöbb enzim esetében még -14,80 MPa-on is jelentős enzimaktivitásokat mértünk. Ezen alacsony vízpotenciál-értékek a növekedést korlátozó vízpotenciál-érték alatt vannak.

Összefoglalva: a vizsgált enzimek aktivitásait jelentősen befolyásolta a vízpotenciál és a hőmérséklet. A β -glükozidáz, cellobiohidroláz és β -xilozidáz enzimek esetében a maximális aktivitások a növekedés számára optimális vízpotenciálnál alacsonyabb értékeken jelentkeztek. A cellobiohidroláz aktivitások bizonyultak a legérzékenyebbek a hőmérséklet és a vízpotenciál csökkentésére. A β -glükozidáz aktivitás összetettnak mutatkozott, ez az enzimrendszer legalább két izoenzimből áll. A -38,48 MPa-nál található második aktivitási csúcs ezen enzim esetében feltehetőleg egy xerofil izoenzim jelenlétének köszönhető. Ez igaz lehet a β -1,4-*N*-acetil-glükózaminidáz esetében -38,48 MPa-nál található csúcsra is. A kimotripszin-típusú proteáz vízpotenciál csökkentésével szembeni rezisztenciája bizonyult a legnagyobbnak, ezen enzim aktivitásai -50,32 MPa-on viszonylag magasak voltak minden hőmérsékleten a többi enzim megfelelő értékeihez képest.

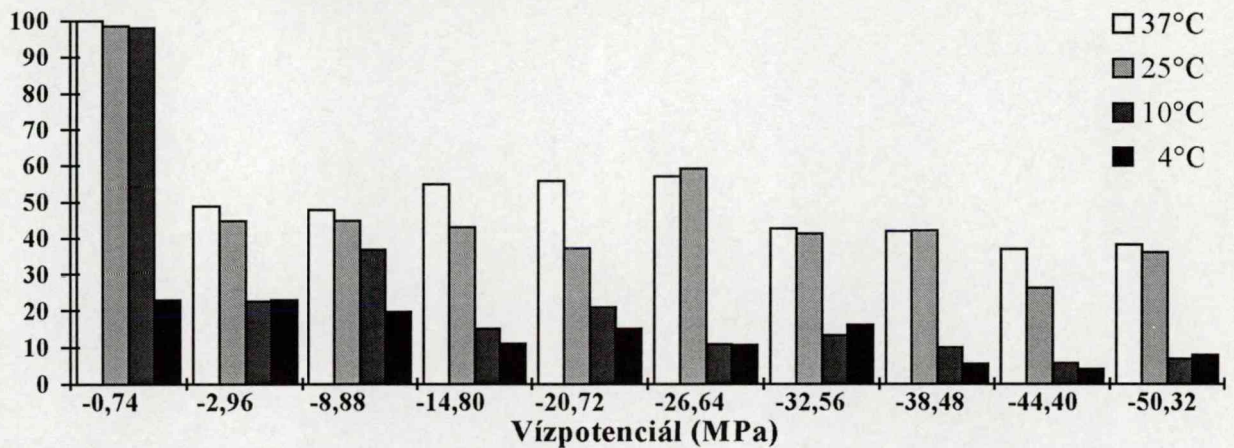
Eredményeink azt mutatják, hogy a *T. harzianum* enzimek aktívak maradhatnak olyan környezeti feltételek mellett is, ahol már nincs micélium-növekedés. Ez a tény azt sugallja, hogy a növekedésre nézve szárazságtűrő *Trichoderma* törzsek nemesítése olyan biokontroll



16. ábra (A-C). Relatív *in vitro* enzimaktivitások különböző vízpotenciálokon és hőmérsékleteken 4 nap indukáló tápoldatban történt tenyésztés után

D. Relatív β -1,4-*N*-acetil-glükózaminidáz aktivitások (%)

E. Relatív kimotripszin-típusú proteáz aktivitások (%)



16. ábra (D-E). Relatív *in vitro* enzimaktivitások különböző vízpotenciálokön és hőmérsékleteken 4 nap indukáló tápoldatban történt tenyésztés után

törzseket eredményezhet, melyek eleve szárazságtűrő enzimeiknek köszönhetően alacsonyabb vízpotenciál-értékű talajokban is hatékonyak a növénypatogén gombák ellen. A szárazságtűrés a feltételezések szerint kompatibilis oldott anyagok, főleg glicerol intracelluláris akkumulációján alapul (Hocking, 1986). A szárazságtűrés hidegtűréssel való kombinálásának nagy a gyakorlati jelentősége: a biokontroll törzseknek jobb stressztűrő képességgel kell

rendelkezniük, mint a patogéneknek, melyek ellen bevetésre kerülnek a biológiai védekezés során.

IV.5. Peszticidek hatása mikoparazita *Trichoderma* törzsek növekedésére és *in vitro* enzimaktivitásaira

Három fungicid (benomyl, MBC és dicloran), valamint négy herbicid (monuron, diuron, fenuron és fluometuron) törzseink növekedésére és extracelluláris enzimeik *in vitro* aktivitására gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Lemértük törzseink növekedési képességét az egyes peszticidek különböző koncentrációinál. A 3. táblázat a vizsgált peszticidek IC₅₀ koncentrációit tartalmazza. A herbicidek esetében az IC₅₀-koncentrációk értékei olyan magasak voltak, amilyen koncentrációk alkalmazásuk során nem alakulnak ki a talajban. A diuron, mely egy korábbi tanulmány alapján *Gliocladium virens*, *T. hamatum* és *T. koningii* esetében a telepmorfológia megváltozását és növekedésgátlást okoz, (Tan és Chua, 1987) az általunk vizsgált koncentráció-tartomány legmagasabb értékeinél sem volt képes a törzsek növekedésének 50%-os gátlására. Az általunk vizsgált herbicidek fotoszintézis-gátlók, *Trichoderma* törzsekkel történő kombinálásuk a kapott eredmények alapján feltehetőleg nincs kedvezőtlen hatással a biokontroll törzsre. Komplex integrált növényvédelmi eljárások tervezésekor elsősorban a biokontroll törzs gombaellenes vegyületekkel történő kombinálása okozhat nehézségeket. A dicloran ilyen szempontból kedvező vegyületnek tűnik: vízoldékonysága 7 µg/ml, a *Trichoderma* törzsek számottevő gátlására csak túltelített koncentráció-értékeken képes. Törzseink benomyl- és MBC-érzékenysége problémát okozhat benzimidazol-tartalmú vegyületekkel való kombinált alkalmazás során, e célra célszerű benomyl-, illetve MBC-rezisztens mutánsokat alkalmazni. A benomyl-rezisztencia hátterét *Trichoderma* törzsek

esetében részletesen tanulmányozták (Peterbauer és mtsai., 1992; Goldman és mtsai., 1993), és benomylrezisztens mutánsok biokontroll sajátosságairól is számos adat áll rendelkezésre (Papavizas és Lewis, 1983).

A *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimeinek működését a vizsgált peszticidek eltérő támadáspontjuknál fogva nem befolyásolják.

3. táblázat. Peszticidek IC₅₀-koncentrációi az egyes törzsekre µg/ml-ben

Törzs	benomyl	MBC	fenuron	fluometuron	monuron	dicloran
T66	0,52	0,26	385,00	200,00	170,00	9,75
T114	0,38	0,21	618,00	580,00	430,00	11,10
T122	0,45	0,22	580,00	430,00	275,00	NM
T124	0,48	0,21	515,00	575,00	340,00	12,25
T228	0,45	0,24	515,00	535,00	215,00	7,80
T334	0,41	0,21	420,00	380,00	325,00	NM

NM: nem meghatározható

Számos, a növényvédelemben alkalmazott peszticid tartalmaz különböző nehézfémeket, melyek biokontroll *Trichoderma* törzsekkel történő kombinálásuk esetén szintén kedvezőtlen hatással lehetnek azok életműködéseire.

IV.6. Nehézfémionok hatása mikoparazita *Trichoderma* törzsek növekedésére és *in vitro* enzimaktivitásaira (Kredics és mtsai., 2001a,b)

Tíz nehézfémion (alumínium, réz, nikkel, kobalt, kadmium, cink, mangán, ólom, higany és vas) hatását vizsgáltuk a *T. harzianum* T66-os és T334-es, *T. aureoviride* T122-es, és a *T. viride* T114-es, T124-es és T228-as *Trichoderma* törzsek lineáris micélium-növekedésére,

valamint ezen törzsek növénypatogén gombákkal szembeni antagonizmusában szerepet játszó enzimeinek (β -glükózidáz, cellobiohidroláz, β -xilozidáz, endoxilanáz, β -1,4-*N*-acetilglükózaminidáz, tripszin-típusú proteáz, kimotripszin-típusú proteáz, és β -1,3-glukanáz) *in vitro* aktivitására.

IV.6.1. Nehézfémionok hatása a növekedésre

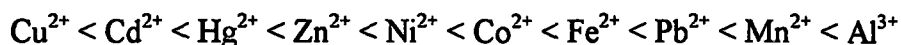
A kísérletekbe bevont hat *Trichoderma* törzs micélium-növekedését jelentős mértékben befolyásolták a nehézfémionok (4. táblázat).

4. táblázat. Az alkalmazott nehézfémvegyületek egyes *Trichoderma* törzsekre vonatkoztatott IC₅₀-értékei mmolban

Törzs	AlCl ₃ × 6 H ₂ O	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	NiSO ₄ × 7 H ₂ O	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	Cd(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	Mn(SO ₄) ₂ × 4 H ₂ O	Pb(NO ₃) ₂	HgCl ₂	FeSO ₄ × 7 H ₂ O
T66	3,73	0,16	0,94	0,92	0,18	0,72	5,66	1,70	0,27	1,14
T114	5,00	0,20	0,78	0,80	0,17	0,60	2,63	1,68	0,26	1,47
T122	5,14	0,15	0,88	0,94	0,18	0,72	3,03	1,62	0,31	1,28
T124	4,14	0,19	0,82	0,82	0,17	0,62	3,03	1,38	0,23	1,15
T228	5,80	0,14	0,85	1,06	0,16	0,70	2,83	1,22	0,32	1,47
T334	4,97	0,14	0,80	0,88	0,23	0,90	2,62	1,28	0,31	1,94

Az IC₅₀-értékek hat törzs közötti legkisebb variációját nikkelt és kobalt esetében tapasztaltuk (5,30% illetve 7,75%), míg a vas esetében jelentős, 15,60%-os variációt mutattak. A mangán esetében tapasztalt 23,80%-os variáció a *T. harzianum* T66-os törzsének kimagasló mangántűrésével magyarázható. A legalacsonyabb IC₅₀-értékeket réz, míg a legmagasabbakat

alumínium esetében tapasztaltuk. Ezen adatok alapján az IC₅₀-értékek átlagának alábbi sorozatát állapíthattuk meg az egyes nehézfémionokra:



A T66-os jelzésű *T. harzianum* törzs rendelkezett a legjobb tolerancia-sajátságokkal nikkelen, mangánon és ólmon. Az összes nehézfémet tekintetbe véve a *T. harzianum* T66-os és a *T. aureoviride* T122-es törzsek rendelkeztek a legjobb, míg a *T. viride* T114-es és T124-es jelű törzsei a legrosszabb tolerancia-sajátságokkal.

IV.6.2. Nehézfémionok hatása az extracelluláris enzimek *in vitro* aktivitására

A tíz nehézfém 1 mmolos koncentrációjának a mikoparazitizmusban szerepet játszó β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz, tripszin-típusú proteáz, kimotripszin-típusú proteáz és β -1,3-glukanáz, valamint a kompetícióban szerepet játszó β -glükozidáz, cellobiohidroláz, β -xilozidáz és endoxilanáz enzimek *in vitro* aktivitásaira gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz aktivitásokat (17. A ábra) erősen gátolta a higany, míg a vas és a cink csak egyes törzsek *in vitro* aktivitásait gátolta. Fokozott aktivitásokat tapasztaltunk alumíniummal, rézzel és ólommal történt inkubálás esetén, míg a többi nehézfémion nem befolyásolta a β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz aktivitásokat jelentős mértékben. Egy *T. harzianum* törzsből tisztított β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz enzimről közölt adatok szerint a réz még 10 mmolos koncentrációban is serkentette az enzimaktivitásokat (Ulhoa és Peberdy, 1991).

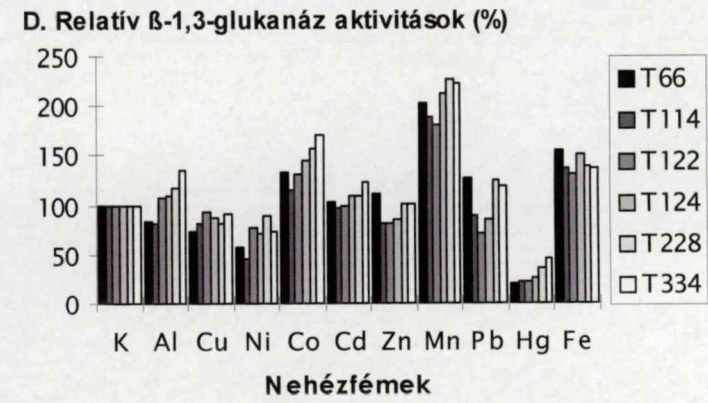
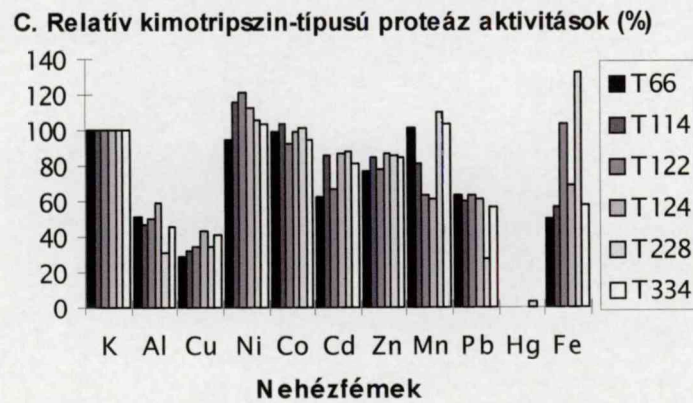
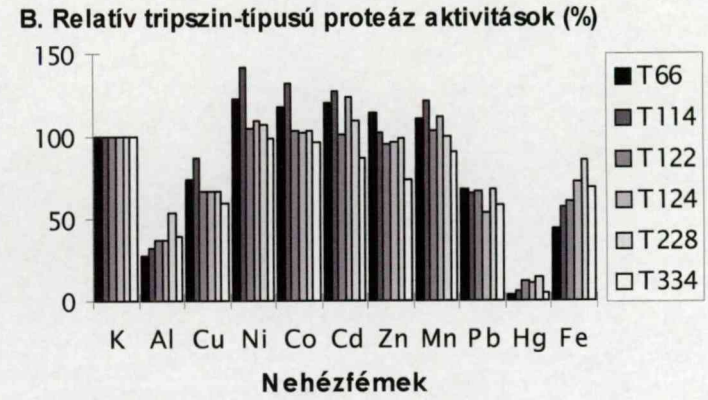
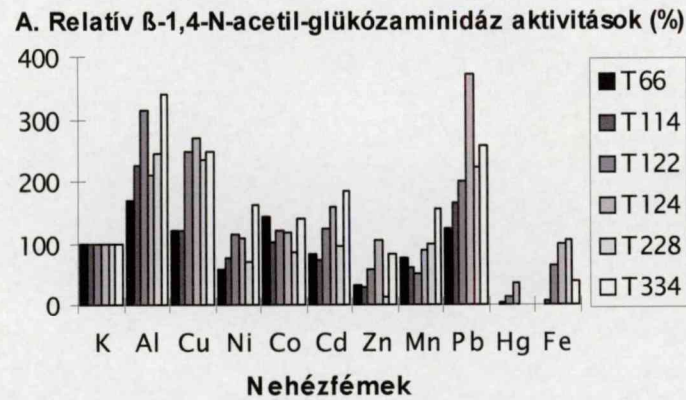
A higany erősen, míg az alumínium, réz és az ólom enyhén gátolta mindkét vizsgált proteáz aktivitását (17. B, C ábrák). Úgy tűnik, hogy a réz a kimotripszin-típusú aktivitásokat nagyobb mértékben gátolja, mint a tripszin-típusú aktivitásokat.

A β -1,3-glukanáz aktivitásokat (17. D ábra) gátolta a higany és serkentette a mangán. Egy korábbi tanulmány szerint a mangán gátlónak bizonyult egy *T. longibrachiatum* törzsből tisztított laminarináz aktivitására, de ezt a gátlást egyedi esetnek tulajdonították (Tangarone és mtsai., 1989).

Alumínium, réz, kadmium, cink és ólom esetében a β -glükozidáz (17. E ábra), cellobiohidroláz (17. F ábra) és β -xilozidáz (17. G ábra) enzimek aktivitásának növekedését tapasztaltuk. Serkentette még a fentieken kívül a cellobiohidrolázt a mangán és a vas, a β -xilozidázt pedig a vas. A higany gátolta, míg a nikkelt és a kobalt nem befolyásolta jelentős mértékben a fenti három enzim aktivitását.

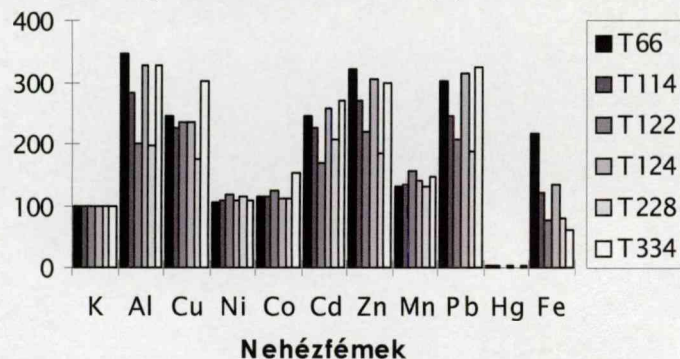
Az endoxilanáz (17. H ábra) esetében a higany általi gátlás mellett említést érdemel a réz, nikkelt és ólom enyhe gátlása egyes törzsek esetében, valamint a kobalt, mangán és a vas serkentő hatása.

Összevetve a nehézfémionok növekedésre és *in vitro* enzimaktivitásokra gyakorolt hatását, megállapíthatjuk, hogy a higany, mely 1 mmolos koncentrációban a micélium-növekedést teljesen gátolja, az összes vizsgált enzim aktivitását is erősen gátolta. A két proteáz *in vitro* aktivitását az alumínium és a réz 1 mmolos koncentrációban gátolta, amely érték jóval alacsonyabb az IC_{50} -értéknél. Az ólom 1 mmolos koncentrációban hasonló százalékos mértékben gátolta a két proteáz enzim aktivitását, mint a micélium-növekedést. A többi nehézfémion nem befolyásolta a mikoparazitizmusban szerepet játszó enzimek *in vitro* aktivitásait olyan mértékben, mint amennyire a micélium-növekedést gátolta, sőt egyes esetekben emelkedett enzimaktivitásokat mértünk. Meg kell azonban jegyezni, hogy az alumí-

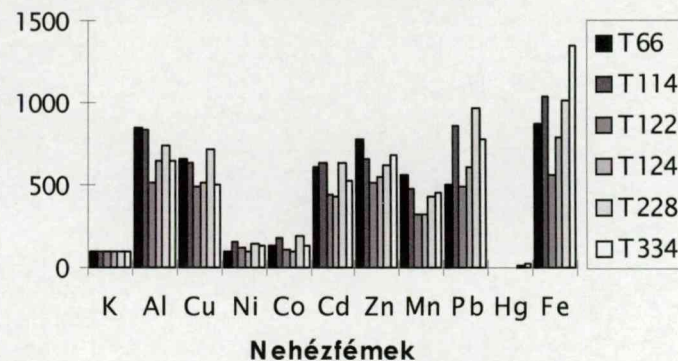


17. ábra (A.-D.). Nehézfémek hatása *Trichoderma* törzsek enzimaktivitásaira. K: nehézfém nélküli kontroll.

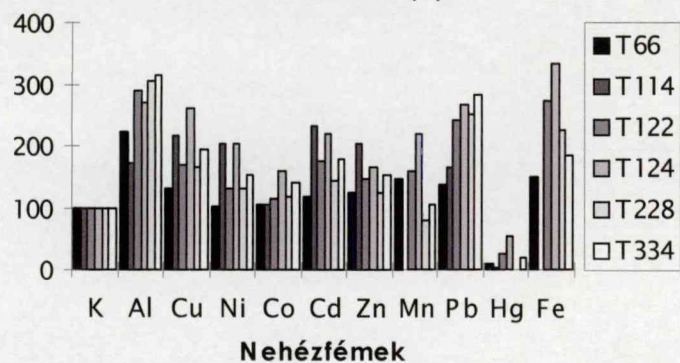
E. Relatív β -glükozidáz aktivitások (%)



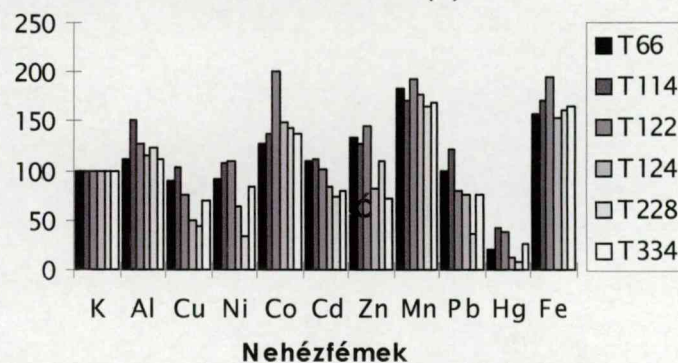
F. Relatív cellobiohidroláz aktivitások (%)



G. Relatív β -xilozidáz aktivitások (%)



H. Relatív endoxilanáz aktivitások (%)



17. ábra (E.-H.). Nehézfémek hatása *Trichoderma* törzsek enzimaktivitásaira. K: nehézfém nélküli kontroll.

nium, réz és ólom általi serkentés feltehetőleg közvetett hatás, amely a proteolitikus enzimek gátlása útján valósul meg.

Összességében megállapíthatjuk, hogy az extracelluláris enzimek képesek aktívak maradni olyan nehézfém-koncentrációk mellett is, amelyek már erősen gátolják a micélium-növekedést. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a növekedésükre nézve nehézfémrezisztenssé nemesített *Trichoderma* törzsek révén olyan biokontroll törzsekhez juthatunk, melyek nehézfémekkel szennyezett talajokban is hatásosak a növénypatogén gombák ellen. Másrészt, ilyen mutánsokat sikerrel lehetne nehézfém-tartalmú peszticidekkel kombináltan alkalmazni a komplex integrált növényvédelem keretein belül.

IV.7. *Trichoderma* törzsek baktériumbontó képességének vizsgálata (Antal és mtsai., 2001b)

IV.7.1. *Trichoderma* törzsek bakteriolitikus aktivitásának vizsgálata hővel inaktivált baktériumokkal kiegészített táptalajokon

A hővel inaktivált Gram-pozitív illetve Gram-negatív baktériumokkal kiegészített táptalajon egy *T. aureoviride* (T122), egy *T. harzianum* (T66) és egy *T. viride* (T228) törzs baktériumbontó képességét vizsgáltuk, melynek mértékét a táptalajon mért feltisztult zóna mérete alapján határoztuk meg. Feltisztult zóna képzésére csak azok a *Trichoderma* törzsek képesek, melyek, mint azt az *Agaricus bisporus* (Fermor és mtsai., 1991; Fermor és Wood, 1981; Grant és mtsai., 1984; Lincoln és mtsai., 1997) és *Schizophyllum commune* (Grant és mtsai., 1990) esetében elvégzett kísérletek is bizonyítják, baktériumbontásra alkalmas muramidáz, kitináz és proteáz enzimrendszerrel rendelkeznek. A három vizsgált *Trichoderma* törzs baktériumbontó képességéről nyújt áttekintést az 5. táblázat.

A *Trichoderma* törzsek baktériumbontó képessége nagy változékonyságot mutatott a degradáció mértéke és specifitása tekintetében. Megfigyelhető, hogy a *Bacillus* nemzetségbe tartozó fajokat ugyanaz a *Trichoderma* törzs eltérő mértékben bontotta, feltételezhetően a baktériumfajra specifikus enzimtermelés miatt. A törzsek képesek voltak mindhárom vizsgált Gram-negatív baktérium bontására.

5. táblázat. *Trichoderma* törzsek baktériumbontó képessége (a feltisztulási zónák mérete mm-ben)

Baktériumok	<i>T. aureoviride</i> T122	<i>T. harzianum</i> T66	<i>T. viride</i> T228
<i>B. subtilis</i> 0210	7	8	4
<i>B. subtilis</i> 0212	8	3	8
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	2	3	0
<i>B. megaterium</i>	7	6	2
<i>M. luteus</i>	0	0	0
<i>E. coli</i>	7	9	8
<i>P. aeruginosa</i>	9	9	5
<i>S. marcescens</i>	9	8	4

A hővel inaktivált *B. subtilis* sejteket tartalmazó táptalajokon a vizsgált törzsek kiemelkedő degradációs aktivitást mutattak. Két törzs (*T. harzianum* T66 és *T. aureoviride* T122) esetében megvizsgáltuk a β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz, valamint a tripszin- és kimotripszin-típusú proteáz aktivitásokat induktív körülmények között (hővel inaktivált *B. subtilis* sejtek jelenlétében) és nem induktív körülmények között (baktériumsejtek hiányában), folyadékkultúrában. A kapott eredményeket összegzi a 6. táblázat.

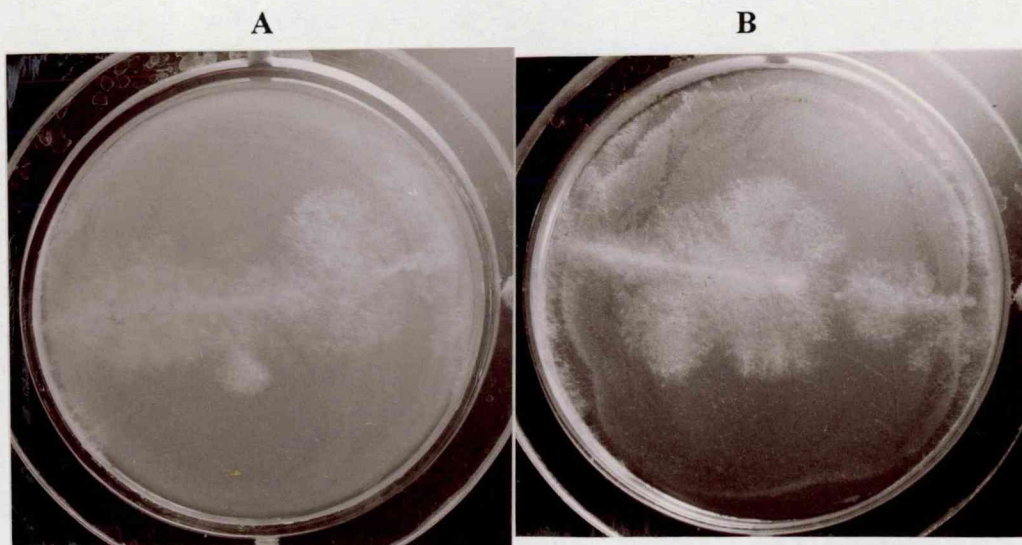
A mért értékek alapján látható, hogy a vizsgált törzsek mind a β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázt, mind a proteáz enzimeket alacsony, konstitutív szinten termelik, a baktériumsejtek jelenléte pedig indukálja a törzsek enzimszekrécióját.

6. táblázat *Trichoderma* törzsek 4 napos fermentleveiből mért enzimaktivitások *B. subtilis* sejtekkel indukált, és nem indukált körülmények között

Enzimek		<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>
		T66	T122
β-1,4- <i>N</i> -acetil-glükózaminidáz	indukált	174,8	173,2
	nem indukált	33,2	21,1
Tripszin-típusú proteáz	indukált	23,6	49,1
	nem indukált	12,8	0,7
Kimotripszin-típusú proteáz	indukált	15,5	39,1
	nem indukált	2,3	3,1

IV.7.2. Baktérium-toleráns telepek izolálása

A biofungicidként alkalmazott *Trichoderma* törzsek biokontroll aktivitását hátrányosan befolyásolja a törzsek baktériumokkal szembeni érzékenysége, ezért indokolt lehet baktériumokkal szemben jó antagonista sajátságokkal rendelkező törzsek alkalmazása a biológiai védekezés céljaira. Vizsgált törzseink közül a *T. harzianum* T66-os és a *T. viride* T228-as törzsek élő *B. subtilis* 0210 jelenlétében baktérium-toleráns szektorokat képeztek, melyek feltehetőleg spontán mutáció révén jöttek létre (18. ábra A, B).



18. ábra. *Trichoderma* törzsek baktérium-toleráns telepei. A. *T. harzianum* T66, B. *T. viride* T228

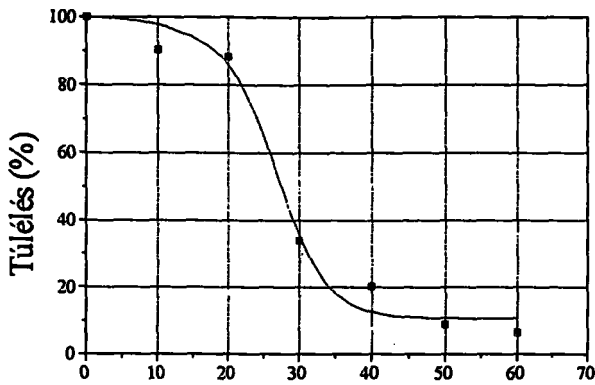
IV.8. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek nemesítése UV-mutagenezissel

IV.8.1. A vizsgált *Trichoderma* törzsek UV-fénnyel szembeni érzékenysége

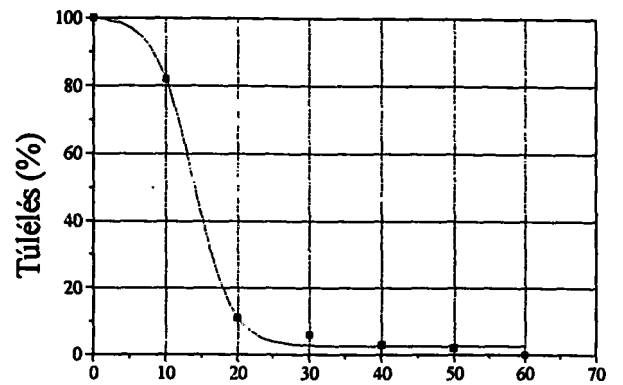
A vizsgálatainkba bevont hat mikoparazita törzs UV-fénnyel szembeni érzékenységét mutatja a 19. ábra. A túlélési százalék-értékekre a *T. viride* T114-es törzs esetében hiperbolikus, a többi törzs esetében pedig szigmoid görbe volt illeszthető. Az UV-mutagenezissel történő nemesítés során a 10%-os túlélésnek megfelelő kezelési időt alkalmaztuk az egyes törzsekre, tehát a *T. harzianum* T66 és *T. viride* T124 esetében 50 s-os, a *T. aureoviride* T122 és *T. viride* T228 esetében 40 s-os, a *T. viride* T114 és *T. harzianum* T334 esetében pedig 20 s-os besugárzást.

IV.8.2. Nemesítés szárazságtűrésre

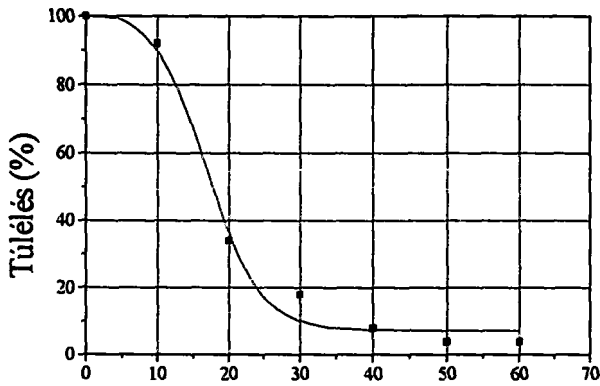
Számos ígéretes törzset sikerült izolálni UV-mutagenezissel és 9% NaCl-ot tartalmazó táptalajon történő szelekcióval. Ezek a törzsek azonban nem szelektív körülmények között történő passzálás során elvesztették szárazságtűrő sajátosságukat. Esetükben feltehetően nem szárazságtűrő mutánsokról, hanem a száraz körülményekhez adaptálódott törzsekről van szó. Valódi szárazságtűrő mutánsok létrehozásához további nemesítési munkára van szükség.



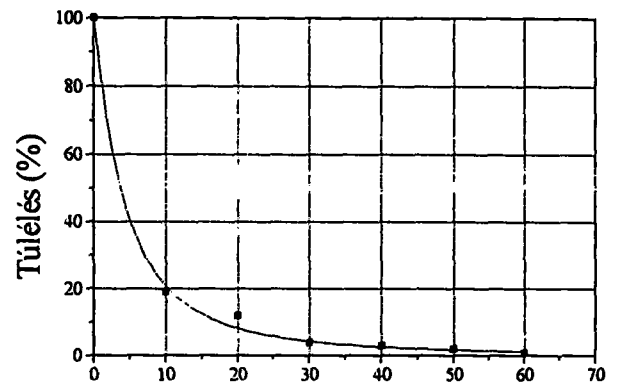
A. *T. harzianum* T66



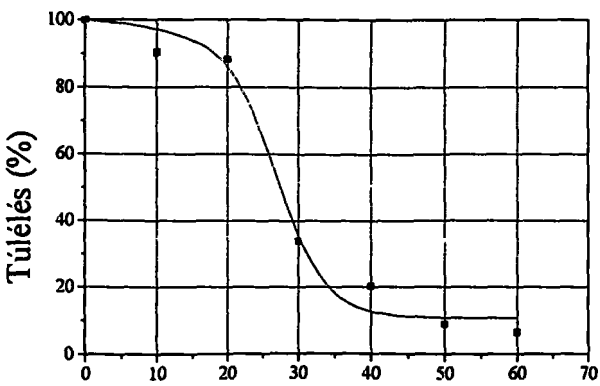
B. *T. harzianum* T334



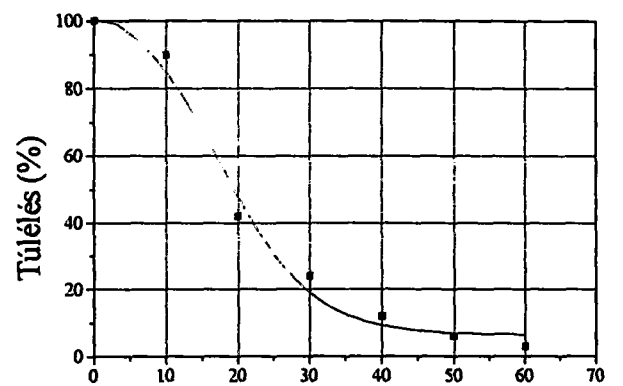
C. *T. aureoviride* T122



D. *T. viride* T114



E. *T. viride* T124

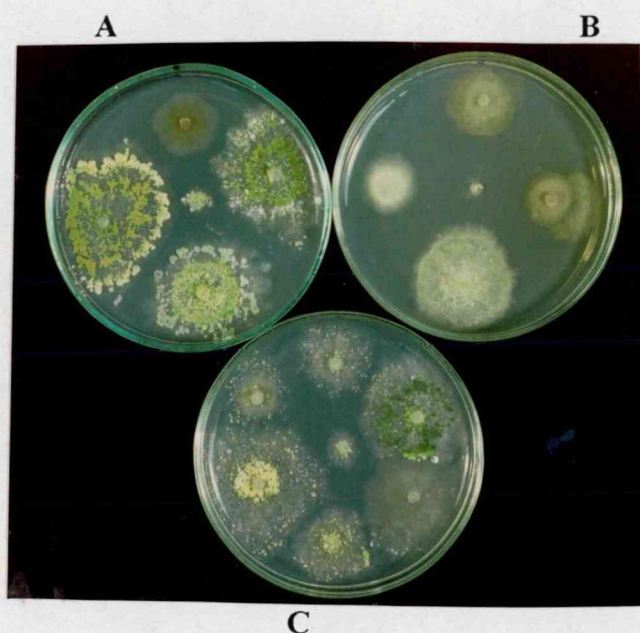


F. *T. viride* T228

19. ábra. *Trichoderma* törzsek UV-érzékenységi görbéi



20. ábra. Rézrezisztens mutánsok (körben), és szülői törzsek (a csészék közepén). A. *T. harzianum* T66-os törzs és mutánsai, B. *T. viride* T114-es törzs és mutánsai, C. *T. viride* T228-as törzs és mutánsai 1,6 mmol $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazó táptalajon 4 nap inkubáció után



21. ábra. Nikkelrezisztens mutánsok (körben), és szülői törzsek (a csészék közepén). A. *T. harzianum* T66-os törzs és mutánsai, B. *T. viride* T114-es törzs és mutánsai, C. *T. aureoviride* T122-es törzs és mutánsai 3 mmol $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazó táptalajon 4 nap inkubáció után

IV.8.3. Nemesítés nehézfém-tűrésre, a nehézfémrezisztens mutánsok jellemzése (Kredics és mtsai., 2001a,c)

177 nehézfémrezisztens mutánst izoláltunk a hat vizsgált *Trichoderma* törzsből UV-mutagenézissel. A 20. ábrán rézrezisztens, a 21. ábrán pedig nikkelrezisztens mutánsok és szülői törzsek telepeit láthatjuk az adott nehézfém-tartalmazó táptalajokon. A mutánsokat minden nehézfém-en leteszteltük a lehetséges keresztrezisztenciára. A legjobb tulajdonságú mutánsok listája a 7. táblázatban látható. A nikkelrezisztens mutánsok 68%-a, míg az alumínium-rezisztensek 63%-a rézrezisztensnek bizonyult. Jelentős keresztrezisztenciát mutattak még az ólomrezisztens mutánsok kadmiumon, valamint a rézrezisztensek nikkelen. A tapasztalt keresztrezisztenciák mértéke leolvasható a 8. táblázatból.

A legjobb tulajdonságú mutánsokat *in vitro* antagonizmus-tesztekben vizsgáltuk növénypatogén *Pythium*, *Rhizoctonia* és *Fusarium* törzsekkel szemben. A 22. és 23. ábra a *T. harzianum* T66-os törzse, és az abból izolált Cu² jelű rézrezisztens mutáns *in vitro* antagonizmusát, míg a 24. és 25. ábra a *T. harzianum* T334-es törzse, és a belőle izolált Co³ jelű kobaltrezisztens mutáns *in vitro* antagonizmusát mutatja *P. debaryanum* és *R. solani*, illetve *F. culmorum* és *F. oxysporum* törzsekkel szemben, hét napos inkubáció után. A nehézfém-tartalmú táptalajokon az antagonizmus határfoka a vizsgált mutáns törzsek esetében jelentős mértékben meghaladta a vad típusú törzsek antagonizmusának határfokát. Ilyen mutánsok sikerrel kombinálhatók lehetnek nehézfém-tartalmú peszticidekkel a komplex integrált növényvédelem keretein belül.

7. táblázat. A legjobb mutánsok rezisztencia-tulajdonságai

Legjobb mutánsok	A telepnövekedési ráta 150%-nál nagyobb mértékben meghaladja a vad típusét az alábbi nehézfémeken	A telepnövekedési ráta a vad típus-hoz képest 100% és 150% közötti az alábbi nehézfémeken
T66 Al9	Al, Cu, Pb, Hg	
T66 Cu2	Cu, Ni, Pb, Hg	Zn
T66 Cu4	Cu, Ni, Hg	Zn, Pb
T66 Ni8	Al, Cu, Pb	Ni, Mn, Hg
T66 Co2	Cu, Co, Pb	Cd, Hg
T66 Zn7	Zn, Pb	Al, Cu, Ni, Co, Cd
T114 Cu5	Cu, Ni, Hg	Al, Zn
T114 Zn1	Cu, Ni, Zn	Cd, Hg
T114 FeII5	Ni, Zn, Fe	Al, Cu, Co
T114 FeII10	Ni, Cd, Fe	Al, Cu, Zn
T122 Al3	Al, Cu, Ni	Cd, Hg
T122 Ni1	Cu, Ni, Co	Cd
T122 Ni2	Cu, Ni, Fe	Cd, Zn
T122 Ni3	Cu, Ni, Co	Al, Cd, Hg, Fe
T122 Ni4	Cu, Ni, Cd	Co, Zn, Hg, Mn, Fe
T122 Co1	Cu, Co, Cd, Mn, Hg	Ni, Zn, Pb
T122 Co3	Cu, Co, Cd, Hg	Ni, Zn, Pb, Fe
T122 Co4	Cu, Co, Cd, Hg	Ni, Zn, Pb, Mn, Fe
T122 Co5	Cu, Co, Cd, Mn, Hg	Ni, Zn, Pb, Fe
T122 Zn5	Cu, Ni, Zn	Co, Cd, Hg
T122 Zn6	Cu, Ni, Zn	Cd, Hg, Fe
T124 Cu10	Cu, Ni, Co	
T124 Ni1	Cu, Ni, Fe	Zn
T124 Ni4	Cu, Ni, Cd, Hg, Fe	Al, Zn
T124 Ni6	Cu, Ni, Hg, Fe	Zn
T124 Ni7	Cu, Ni, Fe	Zn
T124 Ni8	Cu, Ni, Hg	Zn, Fe
T124 Co1	Cu, Co, Pb, Mn, Hg, Fe	Al, Ni, Zn
T124 Co3	Cu, Co, Pb, Mn, Hg, Fe	Al, Ni
T124 Co4	Cu, Ni, Co, Cd, Mn, Fe	Zn, Pb, Hg
T124 Co5	Cu, Ni, Co, Pb, Mn, Hg	Cd, Zn
T124 Cd1	Cu, Ni, Co, Fe	Cd, Hg
T124 Zn2	Cu, Ni, Zn, Fe	Cd
T124 Zn6	Cu, Ni, Zn	Al
T124 Zn7	Cu, Ni, Zn, Fe	Al, Mn
T228 Al1	Al, Cu, Cd	Ni, Hg, Fe
T228 Cu3	Cu, Ni, Cd, Fe	
T228 Cu5	Cd, Hg, Fe	Cu, Ni
T228 Pb2	Ni, Co, Cd	Al, Pb, Hg
T334 Co1	Cu, Ni, Co, Pb	Zn, Mn, Hg, Fe
T334 Co3	Cu, Ni, Co	Zn, Pb, Mn, Fe
T334 Co4	Cu, Ni, Co, Pb	Al, Cd, Zn, Mn, Hg
T334 Zn5	Ni, Zn, Hg	Cu, Co, Cd

8. táblázat. Az izolált nehézfémrezisztens mutánsok keresztrezisztenciája

Keresztrezisztencia	A	B	C
Nikkelrezisztens mutánsok rézen	68%	16%	84%
Alumínium-rezisztens mutánsok rézen	63%	19%	82%
Ólomrezisztens mutánsok kadmiumon	58%	33%	91%
Rézrezisztens mutánsok nikkelen	50%	21%	71%
Cinkrezisztens mutánsok rézen	47%	26%	73%
Cinkrezisztens mutánsok nikkelen	47%	5%	52%
Kobaltrezisztens mutánsok rézen	38%	23%	51%
Mangánrezisztens mutánsok rézen	38%	4%	42%
Rézrezisztens mutánsok kadmiumon	36%	7%	43%
Ólomrezisztens mutánsok nikkelen	33%	8%	41%
Vasrezisztens mutánsok nikkelen	32%	25%	57%
Nikkelrezisztens mutánsok vason	24%	32%	56%
Alumínium-rezisztens mutánsok kadmiumon	19%	38%	57%
Vasrezisztens mutánsok kadmiumon	14%	21%	35%
Cinkrezisztens mutánsok kadmiumon	11%	53%	64%
Kadmiumrezisztens mutánsok rézen	11%	41%	52%
Mangánrezisztens mutánsok alumíniumon	8%	42%	50%
Higanyrezisztens mutánsok alumíniumon	7%	79%	86%
Higanyrezisztens mutánsok rézen	7%	64%	71%
Vasrezisztens mutánsok cinken	4%	57%	61%
Vasrezisztens mutánsok rézen	4%	50%	54%
Ólomrezisztens mutánsok alumíniumon	0%	58%	58%
Higanyrezisztens mutánsok nikkelen	0%	57%	57%
Ólomrezisztens mutánsok vason	0%	50%	50%
Nikkelrezisztens mutánsok cinken	0%	48%	48%
Higanyrezisztens mutánsok kadmiumon	0%	43%	43%

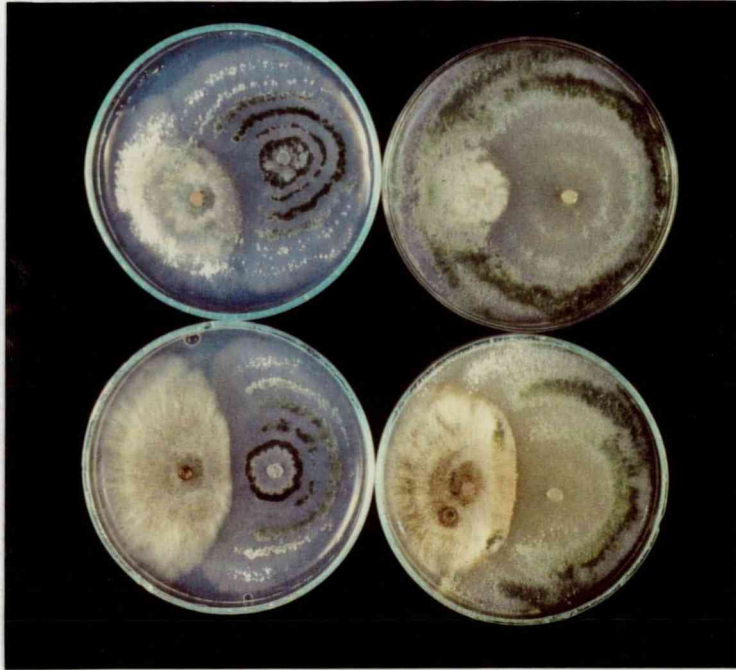
A. Azon mutánsok %-a, melyek telepnövekedési rátája 150%-nál nagyobb mértékben meghaladja a vad törzsét, **B.** Azon mutánsok %-a, melyek telepnövekedési rátája a vad törzs 100%-a és 150%-a között van, **C.** Összesen

P. debaryanum

T66

P. debaryanum

T66 Cu2

*R. solani* T66*R. solani* T66 Cu2

22. ábra. A *T. harzianum* T66-os törzs, és a belőle származó Cu2 rézrezisztens mutáns *in vitro* antagonizmusa *P. debaryanum*mal és *R. solani*val szemben 0,15 mmol CuSO₄-on

F. oxysporum T66*F. oxysporum* T66 Cu2*F. culmorum* T66*F. culmorum* T66 Cu2

23. ábra. A *T. harzianum* T66-os törzs, és a belőle származó Cu2 rézrezisztens mutáns *in vitro* antagonizmusa *F. oxysporum*mal és *F. culmorum*mal szemben 0,15 mmol CuSO₄-on

P. debaryanum

T334

P. debaryanum

T334 Co3

*R. solani* T334*R. solani* T334 Co3

24. ábra. A *T. harzianum* T334-es törzs, és a belőle származó Co3 kobaltrezisztens mutáns *in vitro* antagonizmusa *P. debaryanum*mal és *R. solani*val szemben 0,9 mmol CoCl_2 -on

F. oxysporum T334*F. oxysporum* T334 Co3*F. culmorum* T334*F. culmorum* T334 Co3

25. ábra. A *T. harzianum* T334-es törzs, és a belőle származó Co3 kobaltrezisztens mutáns *in vitro* antagonizmusa *F. oxysporum*mal és *F. culmorum*mal szemben 0,9 mmol CoCl_2 -on

IV.9. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek transzformációs nemesítése

IV.9.1. Hygromycin B-rezisztencián alapuló transzformációs rendszerek kidolgozása vad típusú *Trichoderma* törzsekre

A *T. harzianum* T66-os és T334-es, a *T. aureoviride* T122-es, valamint a *T. viride* T114-es, T124-es és T228-as törzseket transzformáltuk a domináns szelekciós markerként hygromycin B-rezisztenciát hordozó pCSN43 plazmival. A *T. viride* T124-es és T228-as törzsek bizonyultak a leghatékonyabban transzformálhatónak, 10^7 /ml illetve 4×10^6 /ml kiindulási protoplasztmennyiség és 300 $\mu\text{g/ml}$ szelekciós hygromycin B koncentráció mellett 200-300 transzformáns/ μg DNS-nek adódott a transzformációs gyakoriság. Kedvező transzformációs gyakoriságokat kaptunk még a *T. harzianum* T66-os és T334-es törzsei esetében is (3×10^6 /ml illetve 6×10^6 /ml kiindulási protoplasztmennyiség és 300 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin B koncentráció mellett 100, illetve 100-200 transzformáns/ μg DNS). A *T. aureoviride* T122-es és a *T. viride* T114-es törzsek hygromycin B érzékenysége a fenti négy törzsénél kisebb volt, ezért a transzformáció során 450 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin B-t alkalmaztunk a szelekció céljaira. Valószínűleg a magas hygromycin B koncentrációval magyarázható e két törzs esetében, hogy a viszonylag magas kiindulási protoplasztszám (10^7 /ml illetve 5×10^6 /ml) ellenére alacsony transzformációs gyakoriságokat (10-20 transzformáns/ μg DNS) kaptunk. A hat mikoparazita *Trichoderma* törzssel végzett transzformációs kísérleteink eredményeiről nyújt áttekintést a 9. táblázat.

A hygromycin B-rezisztenciát számos esetben alkalmazták domináns szelekciós markerként *Trichoderma* törzsek transzformációja során. Sivan és mtsai. (1992) számos, HygB gént tartalmazó plazmidot megvizsgáltak *T. viride* transzformáció céljaira és 0,06-4,2

transzformáns/μg plazmid DNS közötti transzformációs gyakoriságokat érték el. Hygromycin B szelekciós rendszer alkalmazása mellett a kísérleteinkben kapottnál szintén jóval alacsonyabb transzformációs gyakoriságokat érték el *T. harzianum*, *T. hamatum* (6,6-11 transzformáns/μg plazmid DNS; Ulhoa és mtsai., 1992) és *T. longibrachiatum* (0,5-5 transzformáns/μg plazmid DNS; Sanchez-Torres és mtsai., 1994) esetében. Az általunk elért transzformációs gyakoriságokkal azonos nagyságrendű transzformánst (200-500 transzformáns/μg plazmid DNS) állítottak elő Manczinger és mtsai. (1997) *T. viride* pCSN43 plazmiddal történő transzformálása során, ez a gyakoriság pedig még kb. százszorosára volt növelhető poliaminok (spermin, spermidin, putreszcin) alkalmazásával.

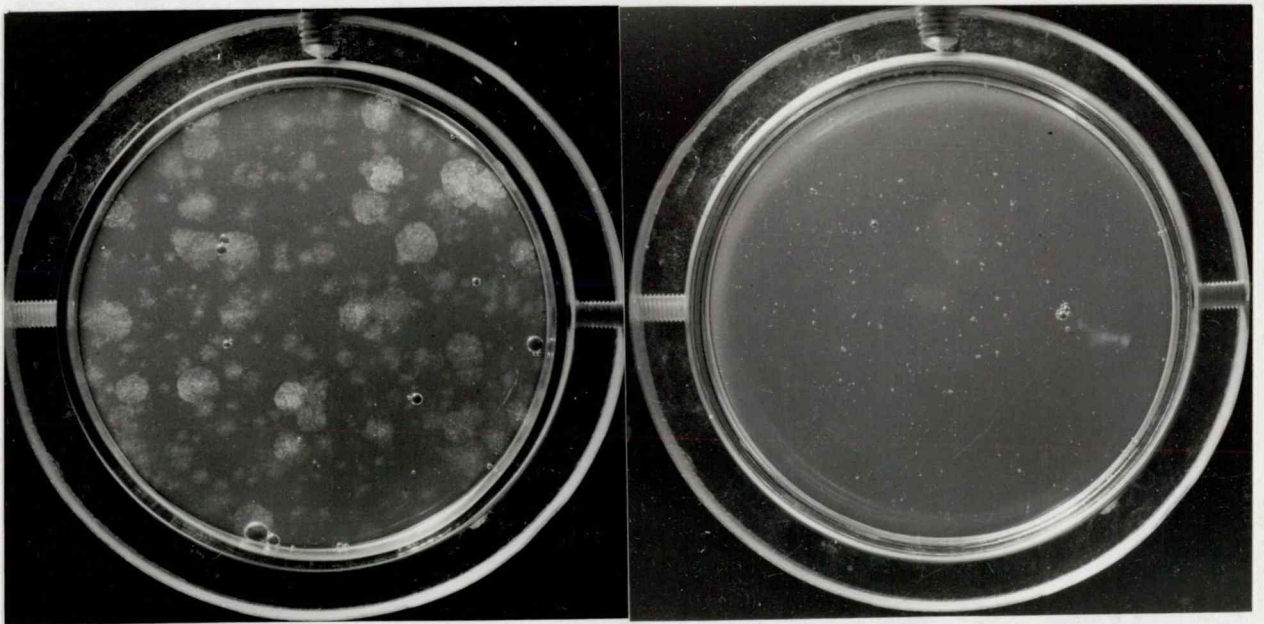
A magas transzformációs gyakoriságokat eredményező módszerek kifejlesztése nagy jelentősége bír, hiszen ezek nemcsak bizonyos extracelluláris enzimek génjeinek bejuttatására, hanem akár nehézfém-rezisztenciára történő nemesítésre is felhasználhatók pl. heterológ metallothionein gének kifejeztetése útján.

9. táblázat. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek transzformációjának összehasonlító adatai

Fajcsoport	Törzs	Kiindulási protoplaszt-mennyiség	Szelekciós hygromycin B koncentráció	Transzformánsok száma/μg DNS
<i>T. harzianum</i>	T66	3×10^6 /ml	300 μg/ml	~100 db
	T334	6×10^6 /ml	300 μg/ml	~100-200 db
<i>T. aureoviride</i>	T122	10^7 /ml	450 μg/ml	~10-20 db
<i>T. viride</i>	T114	5×10^6 /ml	450 μg/ml	~10-20 db
	T124	10^7 /ml	300 μg/ml	~200-300 db
	T228	4×10^6 /ml	300 μg/ml	~200-300 db

IV.9.2. A *T. viride* T124-es törzséből izolált kompakt morfológiájú mutánsok transzformálása hygromycin B-rezisztenciára

Elsőként megvizsgáltuk két kompakt morfológiájú mutáns protoplasztálódási képességét. Ugyanazt a csigaenzim-preparátumot alkalmazva, melynek segítségével a vad típusú törzsből 10^7 protoplasztot is elő lehetett állítani egy-egy kísérlethez, a mutánsokból 10^6 db körüli protoplaszt képződött. A transzformánsok szelekciója céljából a regeneráltató táptalaj 300 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban tartalmazott hygromycin B-t. A 26. ábrán transzformánsokat tartalmazó csésze és kontrollja látható. A transzformációs gyakoriságok 200-250 transzformáns telep/ μg DNS-nek adódtak. A kompakt morfológiájú mutánsok transzformációja során könnyebben meg tudtuk állapítani a transzformációs gyakoriságokat, mint a vad típusú törzs esetében, mivel a kompakt transzformánsok könnyebben számolhatók.



26. ábra. A *T. viride* T124-es törzs egy kompakt morfológiájú mutánsából származó transzformánsokat tartalmazó csésze (balra) és kontrollja (jobbra) 5 nap inkubáció után

V. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Trichoderma* nemzetség - egyes tagjai növénypatogén gombákkal szembeni antagonistikus tulajdonságának, illetve kiemelkedő extracelluláris enzimtermelő képességének köszönhetően - kiterjedt kutatások tárgyát képezi. Mivel az antagonistikus tulajdonság nem fajhoz, hanem egyes törzsekhez köthető, így napjainkban is folyik a változatos mezőgazdasági környezethez, ipari elvárásokhoz legjobban illeszkedő *Trichoderma* törzsek környezetből történő izolálása, az ígéretes törzsek kiválasztása, az antagonistikus képességeknek és az extracelluláris enzimek termelődésének vizsgálata és a törzsek nemesítése. E témákhoz kapcsolódik kutatócsoportunk munkája is.

Megvizsgáltuk hat *Trichoderma* törzs növénypatogén gombákkal szembeni *in vitro* antagonizmusra való képességét. Mindegyik törzs képes volt jelentős mértékben gátolni a növénypatogén gombák telepeinek növekedését, egyes esetekben a *Trichoderma* törzsek rá is nőttek a növénypatogénekre.

A vizsgálatainkba bevont törzsek közül a *T. viride* T124-es törzs rendelkezik a legkedvezőbb sajátságokkal a biológiai védekezés céljaira, ezért az extracelluláris enzimrendszerek előzetes vizsgálatát ezen a törzsön végeztük. Megvizsgáltuk ezen törzs aspecifikus kitináz, proteáz és β -1,3-glukanáz aktivitásait különböző szén- és nitrogénforrásokon. A kiválasztott enzimek aktivitásszintje a legtöbb esetben magasabb volt NaNO_3 nitrogénforrásként történő alkalmazása esetén, mint NH_4Cl jelenlétében, míg a szénforrások közül a glicerol kedvezőbb hatást gyakorolt a szekrécióra, mint a mannitol. Mindhárom vizsgált enzim aktivitása represszálható volt bizonyos szén- és nitrogénforrások által.

Mivel a biológiai védekezés céljaira potenciálisan felhasználható *Trichoderma* törzsek antagonizmusra való képességének háttérében számos különböző enzimrendszer együttesen

játszik szerepet, a *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimprofiljainak részletes vizsgálata komoly gyakorlati jelentőséggel bír. Kísérleteink során tanulmányoztuk három különböző fajcsoportba tartozó hat *Trichoderma* törzs extracelluláris β -glükózidáz, cellobiohidroláz, endocelluláz, β -xilozidáz, endoxilanáz, tripszin- és kimotripszin-típusú proteáz és β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz enzimprofiljait, melyek a hat vizsgált törzs esetében jelentős mértékű hasonlóságot mutattak.

A *Trichoderma* fajok kompetitív sajátosságait jelentősen befolyásolják különböző környezeti tényezők, pl. a hőmérséklet, a vízviszonyok, valamint a peszticidek, a nehézfémek és antagonisták jelenléte a talajban. Biokontroll törzsek alkalmazásának tervezésekor tanácsos ezen környezeti tényezők *Trichoderma* fajok életműködéseire gyakorolt hatásáról információkat gyűjteni, a biokontroll törzseknek ugyanis jobb stressztűrő képességgel kell rendelkezniük, mint a patogéneknek, melyek ellen bevetésre kerülnek a biológiai védekezés során.

Megvizsgáltuk a vízpotenciál és hőmérséklet egy *Trichoderma harzianum* törzs növekedésére, valamint β -glükózidáz, cellobiohidroláz, β -xilozidáz, β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz és kimotripszin-típusú proteáz enzimeinek szekrécijára és *in vitro* aktivitásaira gyakorolt hatását. A magasabb vízpotenciál-értékek magasabb lineáris növekedési rátát eredményeztek. A különböző enzimek szekrécijára különböző vízpotenciál értékek bizonyultak optimálisnak, a vizsgált törzs enzimszekréciját tehát befolyásolta a vízpotenciál a folyadékkultúrákban. A vizsgált enzimek *in vitro* aktivitásaira is jelentős hatással volt a hőmérséklet és a vízpotenciál. Eredményeink alapján azonban a *T. harzianum* enzimeit aktívak maradhatnak olyan vízpotenciál-értékek mellett is, amelyek teljesen gátolták a micélium-növekedést. Növekedésükben szárazságtűrőbb *Trichoderma* törzsek nemesítése tehát olyan biokontroll törzseket eredményezhet, melyek alacsonyabb vízpotenciál-értékű talajokban is hatékonyak a növénypatogén gombák ellen.

Három fungicid és négy herbicid törzseink növekedésére és extracelluláris enzimeik *in vitro* aktivitására gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. A vizsgált herbicidek esetében az IC₅₀-koncentrációk értékei olyan magasak voltak, amilyen koncentrációk alkalmazásuk során nem alakulnak ki a talajban. Törzseink fungicidérzékenysége viszont problémát okozhat gombaellenes vegyületekkel való kombinált alkalmazás során, ezért célszerű fungicidrezisztens mutánsokat alkalmazni. Eltérő támadáspontjuknál fogva a vizsgált peszticidek nem befolyásolták a *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimeinek működését.

Számos, a növényvédelemben alkalmazott peszticid tartalmaz különböző nehézfémeket, melyek biokontroll *Trichoderma* törzsekkel történő kombinálásuk esetén szintén kedvezőtlen hatással lehetnek a törzsekre. Tíz nehézfémion (alumínium, réz, nikkell, kobalt, kadmium, cink, mangán, ólom, higany és vas) hatását vizsgáltuk törzseink lineáris micélium-növekedésére, valamint ezen törzsek növénypatogén gombákkal szembeni antagonizmusában szerepet játszó enzimeinek (β -glükózidáz, cellobiohidroláz, β -xilozidáz, endoxilanáz, β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz, tripszin-típusú proteáz, kimotripszin-típusú proteáz és β -1,3-glukanáz) *in vitro* aktivitására. Tapasztalataink alapján az extracelluláris enzimek képesek aktívak maradni olyan nehézfém-koncentrációk mellett is, amelyek már erősen gátolják a micélium-növekedést.

A biofungicidként alkalmazott *Trichoderma* törzsek biokontroll aktivitását hátrányosan befolyásolja a törzsek baktériumokkal szembeni érzékenysége, ezért indokolt lehet baktériumokkal szemben jó antagonista sajátságokkal rendelkező törzsek alkalmazása a biológiai védekezés céljaira. Megvizsgáltuk három törzs baktériumbontó képességét, mely nagy változékonyságot mutatott a degradáció mértéke és specifitása tekintetében. Eredményeink alapján a vizsgált törzsek mind a β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázt, mind a proteáz enzimeket alacsony, konstitutív szinten termelik, a baktériumsejtek jelenléte pedig indukálja a törzsek

enzimszekrécióját. Két vizsgált törzsünk élő *Bacillus subtilis* sejtek jelenlétében baktérium-toleráns szektorokat képezett.

A biokontroll *Trichoderma* törzsek nemesítése során célszerű lenne több figyelmet fordítani a mutagenézis alkalmazására, mert az így előállított törzsek szabadföldi alkalmazását könnyebben engedélyezik a környezetvédelmi szervek, mint a protoplasztfúzióval vagy transzformációval nemesített törzsekét. Nemesítési munkánk során 177 nehézfémrezisztens mutánszt izoláltunk UV-mutagenézissel hat vizsgált *Trichoderma* törzsből. A mutánsok nehézfémeken való tesztelése során számos esetben keresztrezisztenciát tapasztaltunk, mely lehetővé teszi az egy lépésben több nehézfémrel szembeni rezisztenciára nemesítést. Egyes mutánsaink az adott nehézfémet tartalmazó táptalajon a vad törzsnél sokkal hatékonyabban antagonizálták a tesztorganizmusként alkalmazott növénypatogén gombákat. Ilyen törzsek ígéretesek lehetnek pl. nehézfém-tartalmú peszticidekkel történő kombinált felhasználás céljaira a komplex integrált növényvédelem keretein belül.

Törzseink további nemesítése céljából hygromycin B-rezisztencián alapuló transzformációs rendszereket dolgoztunk ki, és számos esetben kedvező transzformációs gyakoriságokat kaptunk. A *T. viride* T124-es törzséből izolált kompakt morfológiájú mutánsokat is sikerrel transzformáltuk hygromycin B-rezisztenciára. A magas transzformációs gyakoriságokat eredményező módszerek kifejlesztése nagy jelentőséggel bír, hiszen ezek nemcsak bizonyos extracelluláris enzimek géneinek bejuttatására, hanem akár nehézfém-rezisztenciára történő nemesítésre is felhasználhatók pl. heterológ metallothionein gének kifejeztetése útján.

VI. SUMMARY

The *Trichoderma* genus, due to the antagonistic features of some of its members against plant pathogenic fungi, and their outstanding extracellular enzyme production abilities, is the subject of extensive investigations. Since antagonism is a feature associated not with the species, but with certain strains, the isolation from the environment of *Trichoderma* strains best suited to the varied agricultural environment and industrial expectations, the selection of promising strains, the investigation of antagonistic abilities and the production of extracellular enzymes, and the breeding of the strains are in progress to this day. The work of our research group is also connected to these topics.

We examined the *in vitro* antagonistic abilities of six *Trichoderma* strains against plant pathogenic fungi. All of the strains were able to significantly inhibit the colony growth of the plant pathogens, in some cases the *Trichoderma* strains overgrew them.

Between the strains involved in our experiments the *T. viride* T124 has the most favourable properties for the purposes of biological control, so the preliminary examination of extracellular enzyme systems was carried out with this strain. We examined the aspecific chitinase, protease and β -1,3-glucanase activities of this strain on different carbon- and nitrogen sources. The activity levels of the selected enzymes were higher in the case of NaNO_3 as nitrogen source than in the presence of NH_4Cl , while glycerol as carbon source had more favourable effects on secretion than mannitol. All of the examined enzymes were repressable by certain carbon- and nitrogen sources.

While numerous different enzyme systems together reveal the background of the antagonistic ability of *Trichoderma* strains with biocontrol potential, the detailed examination of the extracellular enzyme profiles of *Trichoderma* strains is of serious practical importance. We examined the enzyme profiles of extracellular β -glucosidase, cellobiohydrolase, endocellu-

lase, β -xylosidase, endoxylanase, trypsin- and chymotrypsin-like protease and β -1,4-*N*-acetylglucosaminidase in the case of six *Trichoderma* strains belonging to three different species groups, the profiles of the enzymes showed significant similarities between the examined strains.

The competitive abilities of *Trichoderma* species are significantly influenced by different environmental parameters, like temperature, water conditions, the presence of pesticides, heavy metals and antagonistic bacteria in the soil. When planning the application of biocontrol strains it is suggested to collect information about the effects of such parameters on the activities of *Trichoderma* species, because biocontrol agents should have better stress tolerance levels than the pathogens against which they are going to be used during biological control.

We examined the effects of water potential and temperature on the growth of a *Trichoderma harzianum* strain, and on the secretion and *in vitro* activities of enzymes β -glucosidase, cellobiohydrolase, β -xylosidase, β -1,4-*N*-acetylglucosaminidase and chymotrypsin-like protease produced by this strain. Higher water potential values resulted in higher linear growth rate. Enzyme secretion was influenced by water potential in liquid cultures, different water potential values proved to be optimal for the secretion of the different enzymes. Temperature and water potential had significant effect on the *in vitro* activities of the examined enzymes, however, based on our results, the enzymes of *T. harzianum* could remain active even at water potential values completely inhibiting mycelial growth. So breeding *Trichoderma* strains for xerotolerance could result in biocontrol strains effective against plant pathogenic fungi even in soils with lower water potentials.

We also examined the effects of three fungicides and four herbicides on the growth and *in vitro* activities of extracellular enzymes of our strains. In the case of the examined herbicides the IC₅₀ concentrations were found to be so high, which values can not be present in the soil during their application. However, the fungicide susceptibility of our strains may cause

problems during their combined application with antifungal compounds, for such purposes fungicide resistant mutants should be applied.

Because of their different point of attack, the pesticides did not influence the activity of the extracellular enzymes produced by the *Trichoderma* strains.

Several pesticides applied in the practice of plant protection contain different heavy metals, thus they may have unfavourable effects on biocontrol *Trichoderma* strains, when combined with them. We examined the effects of ten heavy metal ions (aluminium, copper, nickel, cobalt, cadmium, zinc, manganese, lead, mercury and iron) on the linear mycelial growth of our strains and on the *in vitro* activities of their enzymes involved in antagonism against plant pathogenic fungi (β -glucosidase, cellobiohydrolase, β -xylosidase, endoxylanase, β -1,4-*N*-acetyl-glucosaminidase, trypsin-like protease, chymotrypsin-like protease and β -1,3-glucanase). Based on our results the extracellular enzymes could remain active under heavy metal concentrations which strongly inhibit mycelial growth.

The susceptibility of biofungicide *Trichoderma* strains to bacteria has detrimental effects on their biocontrol activity, the application of strains with good antagonistic properties against bacteria for the purposes of biological control is therefore reasonable. We examined the bacterium-degrading ability of three strains, which proved to be variable in the degree and specificity of degradation. Based on our results, the strains produced both β -1,4-*N*-acetyl-glucosaminidase and proteases in low, constitutive level, and the presence of bacterial cells induced the enzyme secretion of the strains. Two of our strains produced bacterium-tolerant sectors in the presence of *Bacillus subtilis*.

More attention should be paid to the mutagenic methods of breeding of biocontrol *Trichoderma* strains, because strains bred by mutagenesis can get registration for on field use from environmental protection agencies more easily than strains produced by protoplast fusion, or transformation. We isolated 177 heavy metal resistant mutants by UV-mutagenesis from the

six investigated *Trichoderma* strains. Cross-resistance was found in several cases when the mutants were tested on the heavy metals, this makes possible the one-step development for mutants resistant to more heavy metals. Some of our mutants were effective antagonists of the plant pathogenic test organisms even on media containing the respective heavy metals. Such mutants might be the preferred choice for combined application with heavy metal-containing pesticides in the frame of a complex integrated plant protection.

For the further breeding of our strains we developed transformation systems based on hygromycin B resistance. In several cases we could reach optimal transformation frequencies. The compact morphological mutants isolated from strain *T. viride* T124 could also be transformed to hygromycin B resistance. The development of methods resulting in high transformation frequencies is of great importance: such methods are valuable not only for the insertion of extracellular enzyme genes, they might also be used for breeding for heavy metal resistance eg. via the expression of heterologous methallothionein genes.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

- Abdel-Fattah, H. M., Abdel-Kader, M. I. A., Hamida, S. (1982) Selective effects of two systemic fungicides on soil fungi. *Mycopathologia* 79, 93-99.
- Adams, P. B. (1990) The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 59-72.
- Ahmad, J. S., Baker, R. (1988) Rhizosphere competence of benomyl-tolerant mutants of *Trichoderma* spp. *Can. J. Microbiol.* 34, 694-696.
- Antal, Zs., Kredics, L., Manczinger, L., Ferenczy, L. (2001a) Extracellular enzyme profiles of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *IOBC/WPRS Bull.* 24(3), 337-340.
- Antal, Zs., Kredics, L., Molnár, A., Manczinger, L., Nagy, E. (2001b) Induction of extracellular enzyme systems of mycoparasitic *Trichoderma* strains by bacteria. *9th International Symposium on Microbial Ecology: Interactions in the Microbial World. Book of Abstracts* pp.263.
- Antal, Zs., Manczinger, L., Ferenczy, L. (1997) Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Tech.* 11, 205-208.
- Antal, Zs., Manczinger, L., Szakács, Gy., Tengerdy, R. P., Ferenczy, L. (2000) Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycol. Res.* 104, 545-549.
- Babich, H., Gamba-Vitalo, C., Stotzky, G. (1982) Comparative toxicity of nickel to mycelial proliferation and spore formation of selected fungi. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 465-468.
- Badham, E. R. (1991) Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. *Mycologia* 83, 455-463.
- Baek, J.-M., Howell, C. R., Kenerley, C. M. (1999) The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* 35, 41-50.
- Ballance, D. J., Turner, G. (1985) Development of a highfrequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* 36, 321-331.
- Beach, D., Nurse, P. (1981) High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature (London)* 290, 140-142.
- Bell, D. K., Wells, H. D., Markham, C. R. (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against 6 fungal plant pathogens. *Phytopathol.* 72, 379-382.

- Benhamou, N., Chet, I. (1997) Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2095-2099.
- Benítez, T., Delgado-Jarana, J., Rincón, A., Rey, M., Limón, C. (1998) Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 2, 129-150.
- Bergés, T., Barreau, C. (1991) Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. *Curr. Genet.* 19, 359-365.
- Birnboim, H. C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Method. Enzymol.* 100, 243-255.
- Bissett, J. (1984) Revision of the genus *Trichoderma*. *Can. J. Bot.* 69, 924-931.
- Camporota, P. (1985) *In vitro* antagonism between *Trichoderma* spp. and *Rhizoctonia solani*. *Agronomie* 5, 613-620.
- Carver, C. E., Pitt, D., Rhodes, D. J. (1996) Aetiology and biological control of *Fusarium* wilt of pinks (*Dianthus caryophyllus*) using *Trichoderma aureoviride*. *Plant Pathol.* 45, 618-630.
- Chirife, J., Resnik, S. L. (1984) Unsaturated solutions of sodium chloride as reference sources of water activity at various temperatures. *J. Food. Sci.* 49, 1486-1488.
- Cuero, R. G., Smith, J. E., Lacey, J. (1987) Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89, 221-226.
- Danielson, R. M., Davey, C. B. (1973) The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 5, 485-494.
- Davet, P. (1981) The effects of some pesticides upon substrate colonization by *Trichoderma harzianum* Rifai in the presence of other soil fungi. *Soil Biol. Biochem.* 13, 513-517.
- De Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J., Beijersbergen, A. G. M. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnol.* 16, 839-842.
- De la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benítez, T., Llobell, A. (1995) Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 177, 1864-1871.
- Deane, E. E., Whipps, J. M., Lynch, J. M., Peberdy, J. F. (1999) Transformation of *Trichoderma reesei* with a constitutively expressed heterologous fungal chitinase gene. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 419-424.
- DelMar, E. G., Largman, C., Brodrick, J. W., Geokas, M. C. (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* 99, 316-320.

- Dennis, C., Webster, J. (1971a) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of nonvolatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 25-39.
- Dennis, C., Webster, J. (1971b) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 41-48.
- Deshpande, M. V., Eriksson, K. E., Pettersson, L. G. (1984) An assay for selective determination of exo-1,4,- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 138, 481-487.
- Dong, W., Yinbo, Q., Peiji, G. (1997) Primary studies on several cellulase components with special characteristics purified from *Trichoderma pseudokoningii* S38. *Biotech. Appl. Biochem.* 25(2), 181-187.
- Eastburn, D. M., Butler, E. E. (1991) Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* 83, 257-263.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28, 719-725.
- Elad, Y., Kapat, A. (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 177-189.
- Fermor, T. R., Wood, D. A. (1981) Degradation of bacteria by *Agaricus bisporus* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* 126, 377-387.
- Fermor, T. R., Wood, D. A., Lincoln, S. P., Fenlon, J. S. (1991) Bacteriolysis by *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 15-22.
- Flores, A., Chet, I., Herrera-Estrella, A. (1997) Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr. Genet.* 31, 30-37.
- Frank, V., Tamova, G., Takacsova, L. (1993) Effects of cadmium and mercury on growth and differentiation of *Trichoderma viride*. *Zentralbl. Mikrobiol.* 148, 229-232.
- Geremia, R., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S. B., Van-Montagu, M., Herrera-Estrella, A. (1993) Molecular characterization of the proteinase-encoding gene *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8, 603-613.
- Ghisalberti, E. L., Rowland, C. Y. (1993) Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Prod.* 56, 1799-1804.
- Giczey, G., Kerényi, Z., Dallmann, G., Hornok, L. (1998) Homologous transformation of *Trichoderma hamatum* with an endochitinase encoding gene, resulting in increased levels of chitinase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 247-252.
- Goldman, G. H., Temmerman, W., Jacobs, D., Contreras, R., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, A. (1993) A nucleotide substitution in one of the beta-tubulin genes of

- Trichoderma viride* confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate. *Mol. Gen. Genet.* 240, 73-80.
- Grajek, W., Gervais, P. (1987) Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 658-662.
- Grant, W. D., Fermor, T. R., Wood, D. A. (1984) Production of bacteriolytic enzymes and degradation of bacterial cell walls during growth of *Agaricus bisporus* on *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 761-769.
- Grant, W. D., Prosser, B. A., Asher, R. A. (1990) A bacteriolytic muramidase from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 2267-2273.
- Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C. P., De-Graaff, L. H. (1990a) The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. *Curr. Genet.* 18, 71-76.
- Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C. P., De-Graaff, L. H. (1990b) Cloning of the *Trichoderma reesei pyrG* gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transforming system. *Curr. Genet.* 18, 447-452.
- Gupta, S. C., Leathers, T. D., El-Sayed, G. N., Ignoffo, C. M. (1991) Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media insecta cuticule. *Exp. Mycol.* 15, 310-315.
- Haran, S., Schickler, H., Chet, I. (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142, 2321-2331.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I. (1995) New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 99, 441-446.
- Herbert, D., Phipps, P. J., Strange, R. E. (1971) Chemical analysis of microbial cells. In: Norris, J. R., Ribbons, D. W. (ed.) *Methods in Microbiology* 5B, pp. 209-344.
- Herrera-Estrella, A., Goldman, G. H., Van-Montagu, M. (1990) High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Mol. Microbiol.* 4, 839-844.
- Hocking, A. D. (1986) Effects of water activity and culture age on the glycerol accumulation patterns of five fungi. *J. Gen. Microbiol.* 132, 269-275.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M. L., Penttilä, M. E. (1997) Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1298-1306.
- Inbar, J., Chet, I. (1992) Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J. Bacteriol.* 174, 1055-1059.
- Inbar, J., Chet, I. (1995) The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 141, 2823-2829.

- Inglis, P. W., Queiroz, P. R., Valadares-Inglis, M. C. (1999) Transformation with green fluorescent protein of *Trichoderma harzianum* 1051, a strain with biocontrol activity against *Crinipellis pernicioso*, the agent of witches'-broom disease of cocoa. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45, 63-67.
- Jackson, A. M., Whipps, J. M., Lynch, J. M. (1991) Nutritional studies of four fungi with disease biocontrol potential. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 456-461.
- Kay, S. J., Stewart, A. (1994) The effect of fungicides on fungal antagonists of onion white rot and selection of dicarboximide-resistant biotypes. *Plant Pathol.* 43, 863-871.
- Kitamoto, Y., Mori, N., Yamamoto, M., Ohiwa, T., Ichikawa, Y. (1988) A simple method for protoplast formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 445-450.
- Kredics, L., Antal, Zs., Manczinger, L. (2000) Influence of water potential on growth, enzyme secretion and *in vitro* enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Curr. Microbiol.* 40, 310-314.
- Kredics, L., Antal, Zs., Manczinger, L., Nagy, E. (2001a) Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 112-116.
- Kredics, L., Dóczy, I., Antal, Zs., Manczinger, L. (2001b) Effect of heavy metals on growth, and extracellular enzyme activities of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 249-254.
- Kredics, L., Dóczy, I., Antal, Zs., Manczinger, L. (2001c) Isolation and characterization of heavy metal resistant mutants from mycoparasitic *Trichoderma* strains. *IOBC/WPRS Bull.* 24(3), 233-236.
- Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W., Kubicek-Pranz, E. M. (eds) (1990) *Trichoderma reesei* cellulases: biodiversity, genetics, physiology and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Labudova, I., Gogorova, L. (1988) Biological control of phytopathogenic fungi through lytic action of *Trichoderma* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 52, 193-198.
- Langin, T., Daboussi, M. J., Gerlinger, C., Brygoo, Y. (1990) Influence of biological parameters and gene transfer technique on transformation of *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* 17, 313-319.
- Ledin, M., Krantz-Rülcker, C., Allard, B. (1996) Zn, Cd and Hg accumulation by microorganisms, organic and inorganic soil components in multi-compartment systems. *Soil Biol. Biochem.* 28, 791-799.
- Lincoln, P., Fermor, T. R., Wood, D. A. (1997) Production and detection of muramidase and acetylglucosaminidase from *Agaricus bisporus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 24-29.

- Lo, C. T., Nelson, E. B., Hayes, C. K., Harman, G. E. (1998) Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathol.* 88, 129-136.
- Lokesha, S., Somashekar, R. K. (1989) Biosorption potency of heavy metals by some fungi. *Curr. Sci.* 58, 571-573.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Di-Pietro, A., Harman, G. E. (1993) Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr. Genet.* 24, 349-356.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L. Harman, G. E. (1994) Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetylglucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol.* 84, 398-405.
- Lottenberg, R., Christensen, U., Jackson, C. M., Coleman, P. L. (1981) Assay of coagulation proteases using peptide chromogenic and fluorogenic substrates. *Method. Enzymol.* 80, 341-361.
- Luard, E. J., Griffin, D. M. (1981) Effect of water potential on fungal growth and turgor. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 76, 33-40.
- Lynch, J. M. (1987) *In vitro* identification of *Trichoderma harzianum* as a potential antagonist of plant pathogens. *Curr. Microbiol.* 16, 49-53.
- Mach, R. L., Schindler, M., Kubicek, C. P. (1994) Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr. Genet.* 25, 567-570.
- Magan, N. (1988) Effects of water potential and temperature on spore germination and germ-tube growth *in vitro* and on straw leaf sheaths. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90, 97-107.
- Magan, N., Lacey, J. (1984) Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82, 83-93.
- Magan, N., Lynch, J. M. (1986) Water potential, growth and cellulolysis of fungi involved in decomposition of cereal residues. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1181-1187.
- Manczinger, L., Antal, Zs., Ferenczy, L. (1994) Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains by UV-mutagenesis. In: IUMS Congresses Praha, Poster Abstracts.
- Manczinger, L., Antal, Zs., Ferenczy, L. (1995) Isolation of uracil auxotrophic mutants of *Trichoderma harzianum* and their transformation with heterologous vectors. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 59-62.
- Manczinger, L., Antal, Zs., Kredics, L. (2002) Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains (a review). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, közlésre elfogadva

- Manczinger, L., Antal, Zs., Schoop, A., Kredics, L. (2001) Characterization of the extracellular enzyme systems of *Trichoderma viride* AH124. *Acta. Biol. Hung.* 52, 223-229.
- Manczinger, L., Ferenczy, L. (1985) Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 72-76.
- Manczinger, L., Komonyi, O., Antal, Zs., Ferenczy, L. (1997) A method for high-frequency transformation of *Trichoderma viride*. *J. Microbiol. Methods* 29, 207-210.
- Manczinger, L., Polner, G. (1987) Cluster analysis of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates. *System. Appl. Microbiol.* 9, 214-217.
- Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., Magan, N. (1997) Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* on maize grain. *Cereal Res. Commun.* 25, 499-500.
- Menendez, A. B., Godeas, A. (1998) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742) - Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma harzianum*. *Mycopathologia* 142, 153-160.
- Michrina, J., Michalikova, A., Rohacik, T., Kulichova, R. (1995) Antibiosis as a possible mechanisms of antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium culmorum*. *Ochrana Rostlin* 31, 177-184.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Morley, G. F., Gadd, G. M. (1995) Sorption of toxic metals by fungi and clay minerals. *Mycol. Res.* 99, 1429-1438.
- Naár, Z., Kecskés, M. (1998) Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma* species. *Microbiol. Res.* 153, 119-129.
- Niles, E. V., Norman, J. A., Pimbley, D. (1985) Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in wheat and barley. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84, 259-266.
- Papavizas, G. C. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54.
- Papavizas, G. C., Lewis, J. A. (1983) Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. *Phytopathol.* 73, 407-411.
- Pe'er, S., Chet, I. (1990) *Trichoderma* protoplast fusion: A tool for improving biocontrol agents. *Can. J. Microbiol.* 36, 6-9.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Ratto, M., Salminen, E., Knowles, J. A. (1987) A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61, 155-164.

- Peterbauer, C. K., Heidenreich, E., Baker, R. T., Kubicek, C. P. (1992) Effect of benomyl and benomyl resistance on cellulase formation by *Trichoderma reesei* and *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 38, 1292-1297.
- Pfender, W. F., Sharma, U., Zhang, W. (1991) Effect of water potential on microbial antagonism to *Pirenophora tritici-repentis* in wheat residue. *Mycol. Res.* 95, 308-314.
- Poutanen, K., Puls, J. (1988) Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 425-432.
- Ridout, C. J., Coley-Smith, J. R., Lynch, J. M. (1986) Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2345-2352.
- Ridout, C. J., Coley-Smith, J. R., Lynch, J. M. (1988). Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 180-187.
- Rifai, M. A. (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers*, No.116.
- Rodriguez-Kabana, K., Godoy, G., Morgan-Jones, G., Shelby, R. A. (1983) The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies. *Plant Soil* 75, 95-106.
- Sahai, A. S., Manocha, M. S. (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* 11, 317-338.
- Sanchez-Torres, P., Gonzalez, R., Perez-Gonzalez, J. A., Gonzalez-Candelas, L., Ramon, D. (1994) Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *egl1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 440-446.
- Sarrette, M., Nout, M. J. R., Gervais, P., Rombouts, F. M. (1992) Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 420-425.
- Schickler, H., Haran, S., Oppenheim, A., Chet, I. (1998) Induction of the *Trichoderma harzianum* chitinolytic system is triggered by the chitin monomer, *N*-acetylglucosamine. *Mycol. Res.* 102, 1224-1226.
- Sinha, I., Upadhyay, R. S. (1993) Modification of biocontrol potential of *Trichoderma viride*. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 28, 209-214.
- Sivan, A., Chet, I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 675-682.
- Sivan, A., Chet, I. (1992) Microbial control of plant diseases. In: Mitchell, R. (ed.) *Environmental Microbiology*. Wiley-Liss Inc., New York, p. 335.

- Sivan, A., Harman, G. E. (1991) Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 23-30.
- Sivan, A., Stasz, T. E., Hemmat, M., Hayes, C. K., Harman, G. E. (1992) Transformation of *Trichoderma* spp. with plasmids conferring hygromycin B resistance. *Mycologia* 84, 687-694.
- Smith, J. L., Bayliss, F. T., Ward, M. (1991) Sequence of the cloned *pyr4* gene of *Trichoderma reesei* and its use as a homologous selectable marker for transformation. *Curr. Genet.* 19, 27-34.
- Somashekar, R. K., Kulashekar, M. D., Satsihchandra Prabhu, M. (1983) Toxicity of heavy metals to some fungi. *Int. J. Environ. Stud.* 21, 277-280.
- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M. (1989) Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Gen. Newsl.* 36, 78-83.
- Stasz, T. E. (1990) Genetic improvement of fungi by protoplast fusion for biological control of plant pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* 12, 322-327.
- Stasz, T. E., Harman, G. E., Weeden, N. F. (1988) Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* 80, 141-150.
- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., Uozumi, T. (1999) Molecular cloning and expression of the novel fungal β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* 125, 728-736.
- Tan, T. K., Chua, L. H. (1987) The response of three soil fungi to dalapon and diuron treatments. *Pest. Sci.* 20, 233-240.
- Tangarone, B., Royer, J. C., Nakas, J. P. (1989) Purification and characterization of an endo-(1,3)- β -D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 177-184.
- Tenkanen, M., Puls, J., Poutanen, K. (1992) Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 566-574.
- Tilburg, A-U. B. van, Thomas, M. D. (1993) Production of extracellular proteins by the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 236-242.
- Ulhoa, C. J., Peberdy, J. F. (1991) Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Curr. Microbiol.* 23, 285-289.
- Ulhoa, C. J., Peberdy, J. F. (1992) Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 236-240.
- Ulhoa, C. J., Vainstein, M. H., Peberdy, J. F. (1992) Transformation of *Trichoderma* spp. with dominant selectable markers. *Curr. Genet.* 21, 23-26.

- Vázquez-Garciduenas, S., Leal-Morales, C. A., Herrera-Estrella, A. (1998) Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1442-1446.
- Wang, J. R., Zhang, M. F., Huang, T. (1995) The primary structure of cellobiohydrazase gene (CBH II) from *Trichoderma viride*. *Acta Genet. Sin.* 22, 74-80.
- Wey, T. T., Hseu, T. H., Huang, L. (1994) Molecular cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma koningii* G-39. *Curr. Microbiol.* 28, 31-39.
- Worthing, C. R. ed. (1987) The pesticide manual. A world compendium. Eighth edition. Lavenham Press, Lavenham, Suffolk. pp 58, 127, 274, 324, 393, 412, 584.
- Xu, W. Z., Shima, Y., Negoro, S., Urabe, I. (1991) Sequence and properties of β -xylosidase from *Bacillus pumilus* IPO. Contradiction of the previous nucleotide sequence. *Eur. J. Biochem.* 202, 1197-1203.
- Yabuki, M., Mizushina, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fujii, T., Shimada, M., Yamashita, M. (1986) Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 32, 25-38.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki:

dr. Manczinger László egyetemi docensnek szakmai irányításáért és a kutatómunka kapcsán felmerült elméleti és gyakorlati problémák megoldásában, valamint a kutatási eredményekből készült publikációk, pályamunkák sikeréhez nyújtott segítségével,

Dr. Kevei Ferenc tanszékvezető egyetemi docensnek, **Prof. Ferenczy Lajosnak** és **Prof. Nagy Erzsébetnek** a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológia Tanszékén, illetve a Magyar Tudományos Akadémia és a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Kutatócsoportjában végzett munkám támogatásáért,

dr. Antal Zsuzsannának, valamint **Dóczi Ilonának**, **Molnár Annamáriának** és **Hatvani Nórának** az eredményekben gazdag közös munkáért,

Lele Máriának a laboratóriumi munkában, feladatkörét messze meghaladóan nyújtott technikai segítségével, **Nagy Lajos Gergelynek** a fényképek elkészítéséért,

továbbá kollégáimnak, akik információik és tapasztalataik átadásával, segítőkészségükkel, emberségükkel hozzájárultak munkám sikeres elvégzéséhez.