

**BIOTECHNOLÓGIAI SZEMPONTBÓL FONTOS *TRICHODERMA* ÉS  
*CLAVICEPS* TÖRZSEK NEMESÍTÉSE MUTAGENEZISSSEL,  
PROTOPLASZTFÚZIÓVAL ÉS TRANSZFORMÁCIÓVAL**

**Tézisek**

**Dr.Manczinger László  
adjunktus**

**JATE Mikrobiológiai Tanszék**

**SZEGED 1995**

## 1. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

A *Trichoderma* génusz tagjai a *Hypocrea* ascomycaeta génusz anamorphjai (1).

A legtöbb faja rendkívül elterjedt a természetes élőhelyeken (2). Extracelluláris biopolimer-bontó enzimrendszereikkel résztvesznek a növényi és állati hulladék anyagok lebontásában. Sok közöttük a fakultatív mikoparazita. Hatékony extracelluláris enzimtermelő képességük valamint gombaparazitizmusuk miatt a biotechnológiai kutatások gyakori alanyai (3,4).

Bizonyos *Trichoderma* izolátumok azon képességét, hogy más gombákat, így talajlakó növényparazita gombákat (pl. *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Phythium* stb. fajok) szívóhifáikkal és extracelluláris sejtfalbontó enzimeikkel képesek elpusztítani, több országban próbálják felhasználni arra, hogy biofungicid készítményeket állítsanak elő (4). A vad törzsek hatékonysága azonban meglehetősen rossz, így a törzsek nemesítésre szorulnak. A rossz hatékonyság oka az, hogy a parazitáláshoz szükséges "kulcsenzimek", a  $\beta$ -1,3-glukanázok, kitinázok és proteinázok szekréciója indukcióval és represszióval egyaránt szabályozott a *Trichoderma* fajokban (5).

Celluláz termelő képességével a *T. reesei* /korábban *T. viride* illetve *T. longibrachiatum* / tűnik ki. Olyan celluláz enzimrendszert szekretál, mely még a kristályos állapotú cellulózt is képes lebontani. A jó celluláz illetve hemicelluláz termelő törzsek nemesítése különösen az 1970-es évektől kezdődően vált intenzívvé (6). Ebbe a nemesítési munkába kapcsolódtam be 1977-től és eredményeim alapján írtam és védtem meg egyetemi doktori disszertációm.

A *Claviceps* génusz tagjai fontos alkaloidokat termelő fakultatív növényparazita fonalas gombák. Olyan alkaloidokat termelnek, melyeket sokféle gyógyszerkészítmény gyártásánál felhasználnak (7). Ezen gomba fajok mesterséges szubsztrátokon fermentorban is képesek az alkaloidokat megtermelni, de vegyület-spektrum és mennyiség vonatkozásában az ipari törzsek többsége nemesítésre szorul.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A *Trichoderma longibrachiatum* QM414 törzs nemesítése:

Ennek az USA-ban ismételt mutagenezissel előállított jó celluláz termelő törzsnek 1977-ben kezdtük meg átfogó genetikai vizsgálatát. Semmi sem volt az ideig ismert a törzs paraszexuális ciklusáról. Célul tűztük ki ennek feltárását és olyan nemesítési módszerek kidolgozását, melyek a paraszexuális ciklusban keletkező genetikai neokombinások és rekombinások esetlegesen kedvező új tulajdonságain alapulnak.

A nemesítés második fázisában tervbevéttük genetikai transzformációs rendszerek kidolgozását is melyeket alkalmazni lehet e törzs transzformációs nemesítésére.

Célul tűztük ki továbbá *Trichoderma* törzsek izolálását hazai és külföldi talajmintákból, hogy közülük a legjobb extracelluláris enzimtermelőképeségű törzsekből kiindulva fokozott mikoparazita képeségű törzseket állítsunk elő mutagenezissel, protoplasztfúzióval és transzformációval.

További kutatási célunk volt, hogy megvizsgáljuk *Claviceps* törzsek nemesíthetőségét mutagenezis és protoplasztfúzió segítségével.

## 3. A KUTATÓMUNKA SORÁN FELHASZNÁLT FONTOSABB MÓDSZEREK

A törzsek fenntartása élesztőkivonat táptalajon történt (8).

Az auxotróf mutánsok izolálásához UV-mutagenezist követően szűréses dúsítást alkalmaztunk (9). Akonidiális *Claviceps* törzsekből a mutánsokat protoplasztjaik  $\gamma$ -sugár kezelésével állítottuk elő. A specifikus uracil auxotrófok izolálásához direkt szelekciót használtunk 5-fluoroorotsav segítségével (10).

A protoplasztok előállítása a JATE Mikrobiológiai Tanszékén készült liofilizált csigaenzim készítménnyel történt Ferenczy és mtsi. módszerével (11), mely valamennyi törzsünk esetében fiatal rázatott kultúrákat használva elegendő protoplasztot adott a kísérletek sikeres elvégzéséhez. A protoplasztfúziók kiváltására a polietilén-gliol-Ca<sup>++</sup> módszert használtuk (12). A fúziós termékek regenerációjához 0,6M KCl illetve más törzsek esetében 0,8M szacharóz bizonyult a legjobb ozmotikus stabilizátornak.

A protoplasztok genetikai transzformációját Ballance és mtsi.(13) módszerével végeztük el megfelelő optimalizálások után. A transzformánsok genomjának hibridizációs analíziséhez a Boehringer cég nonizotóp hibridizációs kitjét használtuk fel az össz DNS kivonása és tisztítása (14), horizontális gélelektroforézise és blottolása (15) után.

A szülői és a nemesített törzsek enzimaktivitásának in situ detektálására és mérésére p-nitrofenil, metilumbelliferil, aminometilkumarin,  $\beta$ -naftil illetve p-nitroanilid típusú mesterséges kromogén illetve fluorogén enzimszubsztrátokat használtunk (16).

Az emelkedett szintű  $\beta$ -1,3-glukanáz mutánsok detektálása a laminarin-kongóvörös technikával történt (17). A glukanáz, celluláz és hemicelluláz aktivitások mérésénél Miller dinitroszalicilsavas módszerét (18) alkalmaztuk.

## 4. SAJÁT KUTATÁSI EREDMÉNYEK

### 4.1. A *Trichoderma longibrachiatum* QM 9414 törzsének nemesítése

-A törzsből sikerrel izoláltunk mintegy 1000 mono- és diauxotróf mutánst egy a törzsre adaptált szűrési dúsítási eljárással.

-Hatékony módszereket dolgoztunk ki protoplasztok előállítására és fúziójára e törzs esetében.



- Megfelelő genotípusú törzsek felhasználásával protoplasztfúzióval heterokarionokat állítottunk elő és felhasználásukkal bizonyítottuk, hogy a paraszexuális ciklus jelen van a törzsben, de a szomatikus diploid sejtmag rendkívül instabil, igen nagy gyakorisággal aneuploidokon keresztül spontán még a heterokariotikus hifa sejteken belül haploidizálódik, miközben genetikai neokombinások keletkeznek (8). Ezt a jelenséget azóta több más kutatócsoport is igazolta és parameliózisnak nevezték el (19).

-A törzs auxotróf mutánsaiból sikerült olyan 2-dezoxiglükóz rezisztens mutánsokat izolálnunk, melyek recesszívnek bizonyultak heterokarion állapotban (20).

- Amennyiben a protoplasztfúziós keresztezésekben az egyik partner ilyen rezisztens mutáns volt a másik pedig 2-dezoxiglükóz érzékeny auxotróf törzs a létrehozott heterokarion konidiumait 2-dezoxiglükózzal kiegészített minimál táptalajra csíkozva a haploid prototróf rekombinások sokkal gyorsabban növekedtek mint a heterokariotikus elemekből megeredt telepek. Így közvetlenül haploid prototróf rekombinásokra tudunk szelektálni. Módszerünket mind elméleti genetikai kutatások mind pedig gyakorlati nemesítési célok megvalósítására sikerrel tudtuk felhasználni (21).

-A későbbiekben megvizsgáltuk a törzs nemesítésének lehetőségét transzformációs módszerekkel is. Sikerrel transzformáltuk a törzs protoplasztjait heterológ vektorokkal. Szűréses dúsítással karbamoil-ornitin transzferáz mutánsokat izoláltunk, melyeket 20-30 transzformáns /  $\mu\text{g}$  DNS gyakorisággal transzformálni tudtunk a pSal23 plazmiddal, mely az *Aspergillus nidulans* argB génjét tartalmazta. Megfelelő uracil auxotróf mutáns felhasználásával a *Neurospora crassa* pyr4 génjével / pKIM7 illetve pDJB3 plazmidok / valamint az *A. nidulans* pyrG génjével /pPL6 plazmid / nagy hatásfokkal tudtuk a törzset transzformálni /500-1000 transzformáns /  $\mu\text{g}$  plazmid DNS /. Az eredeti vad törzsben az *Escherichia coli* kloramfenikol rezisztencia génje /pBR329 plazmid / illetve élesztő

/pCH100 plazmid / promoterral nem expresszáldott elég hatékonyan. A *N.crassa* benomil rezisztencia génje /pSV50 plazmid / szintén használhatatlannak bizonyult (22).

#### 4.2. Rendszertani és ökológiai kutatási eredmények

-Vizsgálataink során mintegy 400, zöld konidiumot képző *Trichoderma* törzset izoláltunk hazai és külföldi ( braziliai és kubai ) talajmintákból.

-A törzseket Rifai (1969) határozókulcsa (1) alapján azonosítottuk, majd megvizsgáltuk az izolátumok asszimilációs spektrumát 130 különböző szénforráson.

A kapott eredményeket numerikus taxonómiai módszerekkel dolgoztuk fel és sikerült a fajaggregátumokon belül 5 *T.harzianum*, 3 *T.hamatum*, 3 *T.viride*, 2 *T.koningii*, 2 *T.aureoviride* és 2 *T.pseudokoningii* faj meglétét detektálnunk (23).

- A *T.harzianum* izolátumok esetében auxotróf mutánsaik protoplasztfúziójával bizonyítottuk, hogy az általunk asszimilációs spektrum adatokkal detektált fajok valóban léteznek, azok egymással mégcsak lassú növekedésű heterokariont sem hajlandók létrehozni (24).

- Bizonyítottuk továbbá, hogy az Ásotthalmi Emlékerdő-ben a zöld konidium-termelő *Trichoderma* fajok rendkívül nagy denzitásban és diverzitásban fordulnak elő, mind asszimilációs spektrumuk mind pedig extracelluláris enzim termelő képességük ( celluláz,  $\beta$ -glükozidáz, xilanáz, amiláz, pektináz,  $\beta$ -1,3-glukanáz, kitináz és proteináz ) vonatkozásában.

- Kimutattuk, hogy ezen az élőhelyen az őszi és a tavaszi *Trichoderma* fajaggregátum megoszlás szabályos váltakozást ,ciklikus allogén szukcessziót mutat. Tavasszal a

domináns faj a *T.hamatum* ősszel viszont a *T.harzianum*, *T.viride* és *T.aureoviride* kodomináns fajként viselkednek (25).

#### 4.3. Gombaparazita képességű *Trichoderma* törzsek izolálása és nemesítése

- Vizsgálatainkban saját vad izolátumokat teszteltünk a parazitizmusban fontos kulcsenzimek termelésére természetes és mesterséges kromogén valamint fluorogén szubsztrátok felhasználásával (26,27).

- A legjobbnak bizonyuló törzsekből mutagenezissel jobb enzimtermelő (enyhén konstitutív, illetve szén- és nitrogénforrás derepresszált) mutánsokat állítottunk elő a törzsek  $\beta$ -1,3-glukanáz, kitináz és proteináz enzimrendszereit illetően.

- A mutagenezissel történő nemesítés legfontosabb új eredménye az a megfigyelésünk volt, hogy a metilaminnal szemben izolált rezisztens mutánsok 20-30 %-a az extracelluláris proteinázok ammónium ionok általi repressziójával szemben rezisztenssé vált, ugyanakkor az ammónium ionokat nitrogén forrásként továbbra is hasznosítani volt képes. Emellett számos extracelluláris enzimet egy alacsony konstitutív szinten termelni kezdtek ezek a törzsek, így bizonyos proteinázokat és kitinázokat.

Ezek a mutánsok mind in vitro, mind in vivo a legjobb biopeszticid képességűnek bizonyultak a tesztelt nemesített törzsek között és üvegházi kísérletekben mintegy tízszer hatékonyabbak voltak mint az eredeti szülői törzsek *Fusarium culmorum*-mal szemben kukorica kultúrákban (28).

A legjobb *T.harzianum* és *T.viride* törzseinket protoplasztfúziót követő rekombinációval, illetve heterológ vektorokkal történő transzformációval is nemesítettük:

- A törzsekből auxotróf mutánsokat állítottunk elő, majd meghatároztuk a protoplaszt képződés és regeneráció optimális paramétereit.
  
- Az auxotróf mutánsok egy részéből recesszív metilamin rezisztens mutánsokat sikerült izolálni melyeket a protoplasztfúziót követő paraszexuális folyamatokban képződő protoróf rekombinánsok direkt szelekciójára sikerrel tudtunk felhasználni.
  
- Egy ígéretes 5-fluoroorotsav érzékeny *T.harzianum* törzsből direkt auxotróf izolálási technikával 9 uracil auxotróf mutánst állítottunk elő, melyek két komplementációs csoportba voltak oszthatók. Az egyik mutáns protoplasztjait a *N.crassa* pyr4 génjét tartalmazó pKIM7 kozmiddal 50-100 transzformáns /  $\mu\text{g}$  DNS gyakorisággal, a másik komplementációs csoport egy törzsét a *Podospora anserina* ura5 és a *T.reesei* ura5 génjét tartalmazó pPAura510 és pTRura5-3 plazmidokkal 150-2500 transzformáns /  $\mu\text{g}$  DNS gyakorisággal sikerült transzformálnunk (29).
  
- A rendelkezésünkre álló hygromycin B rezisztencia vektort ( pCSN43 ) csak az egyébként igen jó fungicid képességekkel rendelkező *T.viride* AH 124 törzsünk esetében tudtuk felhasználni, mivel csak ez a törzs mutatott megfelelő érzékenységet az antibiotikummal szemben. Nukleázgátlók jelenlétében el lehetett érni a  $10^4$  transzformáns /  $\mu\text{g}$  plazmid DNS nagyságrendű transzformációs gyakoriság értékeket ami már rendkívül hatékony kotranszformációs kísérletek alapját jelentheti.
  
- A transzformánsok között szintén számos jobb biofungicid képességű törzset találtunk.

Biofungicid nemesítésre irányuló kutatásainkat az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság támogatta.



#### 4.4. *Claviceps gombatörzsek nemesítése*

Mutagenézissel és protoplasztfúzióval sikerült kedvezőbb termelési tulajdonságú törzseket előállítanunk:

- Először tisztáztuk a törzsek mutagén érzékenységét valamint a protoplasztképzés és regeneráció optimális körülményeit, majd prototróf illetve auxotróf mutánsokat állítottunk elő. Munkánkat nehezítette, hogy a nemesítendő törzsek között akonidiálisak is voltak. Módszert dolgoztunk ki főleg csak egy sejtmagot tartalmazó protoplasztok előállítására és a mutagén kezeléseket ezekkel végeztük (30).
- Igazoltuk a törzsekben a paraszexuális ciklus meglétét és stabil szomatikus diploidokat izoláltunk. Kémiai haploidizáló szerekkel a diploidokból számos rekombinánsot sikerült előállítanunk (31).

### 5. MEGVITATÁS

A *T. longibrachiatum* QM 9414 törzsre kidolgozott allelikus komplementációra alapozott nemesítési módszerünk még ma is az egyetlen amellyel az átmeneti állapotban levő aneuploid illetve diploid telepek izolálhatók, bár közleményünk (8) óta mások is próbálkoztak a törzs protoplasztfúziós nemesítésével, eredményeik vagy ellentmondásosak (34), vagy módszerük kevésbé hatékony (35).

Ugyanez érvényes a törzseinkre kidolgozott direkt szeleciós rekombináns izolálási módszereinkre is (21). A közlés idején teljesen újnak számított az ötlet és azóta sem jelent meg hasonló elven működő nemesítési metodika.

Taxonómia eredményeink is (23) teljesen újak számítottak a közlés idején. Azóta Bissett morfológiai kutatásokkal (2) valamint más kutatócsoportok biokémia eljárásokkal is igazolták a fajcsoportokon belüli fajok létezését (36,37).

A *T.reesei*-vel nyert transzformációs eredményeink csak annyiban voltak újak, hogy mi más vektorokkal transzformáltunk. A törzset előttünk már sikerrel transzformálták más kutatócsoportok (10, 38-41), viszont az *Aspergillus nidulans* intront tartalmazó pyr G génjével (42) nekünk sikerült e törzset először transzformálni. Hasonló módon *T.harzianum* és *T. viride* törzsek sikeres transzformációjáról már előttünk több kutatócsoport is beszámolt (pl. 43,44) de az általuk használt hygromycin B rezisztencia vektorok szabadalmi oltalom alá esnek, ezért próbálkoztunk a nem szabadalmazott, *Neurospora crassa*-ban szép eredményeket adó pCSN 43 vektorral (45). A jövőben tervezett gyakorlati célú kotranszformációs nemesítési programunk szempontjából igen fontos, hogy ezzel a vektorral megkötöttségek nélkül dolgozhatunk *T.viride*-ben. Az általunk használt uracil auxotrófia komplementáló vektorokat mások már sikerrel használták *T.reesei* esetében (10), de *T.harzianum*-ra mi adaptáltuk először ezt a transzformációs metodikát (29).

Igen érdekes, hogy mint bebizonyítottuk, rendkívül könnyen lehet derepresszált illetve emelkedett szintű enzimszekretáló törzseket előállítani mutagenezissel mikoparazita *Trichoderma* törzsekből (28), mégis ez a nemesítési lehetőség mások figyelmét elkerülhette, mert a szakirodalomban szinte csak protoplasztfúziós és transzformációs nemesítésekkel kapcsolatos cikkeket lehet találni. Kivételt csak egyetlen közlemény jelent (46), de ebben sem irányul a mutagenezis az extracelluláris enzimszintek célzott megváltoztatására. Pedig a mutációval nemesített törzsek könnyebben kapnak zöld utat a széleskörű gyakorlati alkalmazást tekintve.

A *Claviceps* törzsekkel nyert eredményeink újszerűségét a két benyújtott és elfogadott szabadalom bizonyítja.

## 6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI ALKALMAZHATÓSÁGA

A *T. longibrachiatum*-mal kapcsolatosan kidolgozott direkt szelekciós módszerünk rekombinánsok előállítására nagyon gyors és egyszerű lehetőséget teremt jobb celluláz és  $\beta$ -glükózidáz termelő rekombinánsok nagy tömegben történő rutin izolálására.

A kidolgozott transzformációs rendszerek a törzs kotranszformációs továbbnemesítését teszik lehetővé.

A mutagenézissel és protoplasztfúzióval előállított kiemelkedő biofungicid képességű *T.harzianum* és *T.viride* törzseinket a Bio-Gen Kft. /Tapolca/ a közeljövőben különféle termékeiben forgalmazni fogja. A transzformációs rendszerek kotranszformációs nemesítést tesznek lehetővé illetve a mikoparazitizmusért felelős gének szerepének mélyebb megismerését.

A *Claviceps* törzsekkel kapcsolatos nemesítési munkánk eredményeként a Richter Gedeon Gyógyszerárugyár munkatársaival közösen két szabadalmi bejelentést tettünk és az egyik alapján már ipari léptékű termelés is folyt (32,33).

## 7. A SZERZŐ TÉZISEIVEL KAPCSOLATOS PUBLIKÁCIÓI

Manczinger, L., Ferenczy, L. (1985). Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 72-76.

Manczinger, L. (1985). Mutants of *Trichoderma reesei* resistant to 2-deoxy-D-glucose with altered sugar transport. FEMS Microbiol. Lett. 29, 289-291.



- Manczinger, L. (1988). A method for direct selection of recombinants following protoplast fusion in *Trichoderma reesei*. Progress Report 6, 48.
- Manczinger, L., Polner, G. (1987). Cluster analyses of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates. System. Appl. Microbiol. 9, 214-217.
- Manczinger, L., Furka, B. (1988). Detection of four species within the *Trichoderma harzianum* aggregate by protoplast fusion. Acta Microbiol. Hung. 35, 201.
- Manczinger, L., Antal, Zs. és Ferenczy, L. (1994). Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains by UV- mutagenesis.  
7th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division ,  
7th International Congress of Mycology Division . Prague, Czech Republic.  
Poster session.
- 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.
- Nagy, Á., Zalai, K., Manczinger, L., Ferenczy, L. (1992). Auxotróf mutánsok előállítása akonidiális *Claviceps* törzsekből.  
Acta Biol. Debrecina Suppl. 1992, 201-203.
- Nagy, Á., Manczinger, L., Zalai, K., Ferenczy, L. (1987). Production of neocombinants by protoplast fusion of *Claviceps purpurea* strains. 10th Congress of the Hungarian Society of Microbiology, Szeged 1987. Abstracts, 23.
- Zalai K., Trinn M., Manczinger L., Polestyukné Nagy Á., Kordik G., Pécsné Rázsó Á., Beszedics Gy., Ferenczy L., Nagy L., Robicsek K., Szegedi M. (1990).  
Eljárás ergolénvázas vegyületek, elsősorban ergometrin termelésére, és szelekciós festési eljárás.  
2251-2949/90/5 sz. magyar szabadalom.
- Trinn M., Manczinger L., Polestyukné Nagy Á., Kordik G., Pécsné Rázsó Á., Zalai K., Beszedics Gy., Ferenczy L., Nagy L., Robicsek K., Szegedi M. (1990).  
Eljárás elimoklavin fokozott termelésére és ehhez új törzs előállítására  
2251-2950/90/7 sz. magyar szabadalom.

## 8. A SZERZŐ VEZETÉSÉVEL KÉSZÜLT A TÉZISEKKEL KAPCSOLATOS SZAKDOLGOZATOK

- Nagy Mariann (1986). *Trichoderma* izolátumok összehasonlító fiziológiai vizsgálata.  
Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.

- Antal Zsuzsa (1991). A *Trichoderma harzianum* CBS 354.33 törzsének transzformációja heterológ vektorokkal. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.
- Kiss Nóra (1991). A *Trichoderma reesei* QM9414 törzs transzformálása heterológ vektorokkal. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.
- Hévér Anikó (1992). Egy gombaparazita *Trichoderma* törzs izolálása és jellemzése. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.
- Komonyi Orbán (1993). *Trichoderma viride* transzformálása pCSN 43 vektorral. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.
- Anneke Schoop (1995). Egy mikoparazita *Trichoderma viride* törzs extracelluláris enzimrendszerének vizsgálata. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.

## 9. A TÉZISEK IRODALMI HIVATKOZÁSAI

- [1] Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol.Papers, No.116.
- [2] Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69, 2357-2372.
- [3] Knowles, J., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T., Harkki, A., Salovuori, I. (1987). The cellulase genes of *Trichoderma*. Antonie van Leeuwenhoek 53, 335-341.
- [4] Papavizas, G.C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23, 23-54.
- [5] 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.
- [6] Montenecourt, B.S., Eveleigh, D.E. (1977). Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. 34, 777-782.
- [7] Rehacek, Z., Sajdl, P. (1990). Ergot alkaloids. Chemistry, biological effects, biotechnology. Elsevier, Amsterdam.

- [8] Manczinger, L., Ferenczy, L. (1985). Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 72-76.
- [9] Catcheside, D.G. (1954). Isolation of nutritional mutants of *Neurospora crassa* by filtration enrichment. J. Gen. Microbiol. 11, 34-36.
- [10] 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.
- [11] Ferenczy, L., Kevei, F., and Zsolt J. (1974). Fusion of fungal protoplasts. Nature 248, 793-794.
- [12] Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M. (1975). Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. Experientia 31, 50-52.
- [13] Ballance, D.J., Turner, G. (1985). Development of a highfrequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. Gene 36, 321-331.
- [14] Leach, J., Finkelstein, D.B., Rambosek, J.A. (1986). Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. Fungal Gen. Newsl. 33, 32-33.
- [15] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning : A laboratory manual. Second edition. Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, New York.
- [16] Manafi, M., Kneifel, W., Bascomb, S. (1991). Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Rev. 55, 335-348.
- [17] Teather, R.M., Wood, P.J. (1982). Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 43, 777-780.
- [18] Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31, 426-428.
- [19] Stasz, T. E., Harman, G. E., Gullino, M. L. (1989). Limited vegetative compatibility following intra- and interspecific protoplast fusion in *Trichoderma*. Exp. Mycol. 13, 364-371.
- [20] Manczinger, L. (1985). Mutants of *Trichoderma reesei* resistant to 2-deoxy-D-glucose with altered sugar transport. FEMS Microbiol. Lett. 29, 289-291.
- [21] Manczinger, L. (1988). A method for direct selection of recombinants following protoplast fusion in *Trichoderma reesei*. Progress Report 6, 48.

- [22] Kiss Nóra (1991). A *Trichoderma reesei* QM9414 törzs transzformálása heterológ vektorokkal. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.
- [23] Manczinger, L., Polner, G. (1987). Cluster analyses of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates. System. Appl. Microbiol. 9, 214-217.
- [24] Manczinger, L., Furka, B. (1988). Detection of four species within the *Trichoderma harzianum* aggregate by protoplast fusion. Acta Microbiol. Hung. 35, 201.
- [25] Nagy Mariann (1986). *Trichoderma* izolátumok összehasonlító fiziológiai vizsgálata. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.
- [26] Hevér Anikó (1992). Egy gombaparazita *Trichoderma* törzs izolálása és jellemzése. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.
- [27] Anneke Schoop (1995). Egy mikoparazita *Trichoderma viride* törzs extracelluláris enzimrendszerének vizsgálata. Diplomadolgozat. JATE Mikrobiológiai Tanszék.
- [28] Manczinger, L., Antal, Zs. és Ferenczy, L. (1994). Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains by UV- mutagenesis. 7th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division , 7th International Congress of Mycology Division . Prague, Czech Republic. Poster session.
- [29] 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.
- [30] Nagy, Á., Zalai, K., Manczinger, L., Ferenczy, L. (1992). Auxotróf mutánsok előállítása akonidiális *Claviceps* törzsekből. Acta Biol. Debrecina Suppl. 1992, 201-203.
- [31] Nagy, Á., Manczinger, L., Zalai, K., Ferenczy, L. (1987). Production of neocombinants by protoplast fusion of *Claviceps purpurea* strains. 10th Congress of the Hungarian Society of Microbiology, Szeged 1987. Abstracts, 23.
- [32] Zalai K., Trinn M., Manczinger L., Polestyukné Nagy Á., Kordik G., Pécsné Rázsó Á., Beszedics Gy., Ferenczy L., Nagy L., Robicsek K., Szegedi M. (1990). Eljárás ergolénvázas vegyületek, elsősorban ergometrin termelésére, és szelekciós festési eljárás. 2251-2949/90/5 sz. magyar szabadalom.
- [33] Trinn M., Manczinger L., Polestyukné Nagy Á., Kordik G., Pécsné Rázsó Á., Zalai K., Beszedics Gy., Ferenczy L., Nagy L., Robicsek K., Szegedi M. (1990). Eljárás elimoklavin fokozott termelésére és ehhez új törzs előállítására 2251-2950/90/7 sz. magyar szabadalom.

- [34] Ogawa, K., Brown, A., Wood, T.M. (1987). Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* QM 9414 by protoplast fusion using colour mutants. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 229-232.
- [35] Sandhu, D.K., Dogra, K., Bawa, S. (1992). Complementation analysis of cellulase mutants in *Trichoderma reesei* QM 9414. *Fungal Gen. Newsl.* 39, 80-81.
- [36] Stasz, T.E., Nixon, K., Harman, G.E., Weeden, F.N., Kuter, G.A. (1989). Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozyme polymorphism. *Mycologia* 81, 391-403.
- [37] Muthumeenakshi, S., Mills, P.R., Brown, A.E., Seaby, D.A. (1994). Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* 140, 769-777.
- [38] Penttilä, M., Nevalainen, H., Rattö, M., Salminen, E., Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61, 155-164.
- [39] Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C.P., de Graaff, L.H. (1990). 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.
- [40] Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C.P., de Graaff, L.H. (1990). Cloning of the *Trichoderma reesei* pyrG gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. *Curr. Genet.* 18, 447-451.
- [41] 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, 27-33.
- [42] Oakley, B.R., Rinehart, J.E., Mitchell, B.L., Carmona, C., Gray, G.L. (1987). Cloning, mapping and molecular analysis of the pyr G gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 61, 385-399.
- [43] 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.
- [44] Ulhoa, C.J., Vainstein, M.H., Peberdy, J.F. (1992). Transformation of *Trichoderma* species with dominant selectable markers. *Curr. Genet.* 21, 23-26.
- [45] Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J. Selker, E. (1989). Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Gen. Newsl.* 36, 78-83.