

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

***TRICHODERMA* TÖRZSEKEN ALAPULÓ NÖVÉNYVÉDŐ ÉS  
NÖVÉNYNÖVEKEDÉST SERKENTŐ BIOEFFEKTOROK FEJLESZTÉSE**

**Ph.D. értekezés**

**Körmöczi Péter**

Témavezető:

Dr. Kredics László  
egyetemi docens

Szeged  
2016

## TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	2
1. Rövidítések.....	5
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	8
3.1. A <i>Trichoderma</i> fajok általános előfordulása .....	8
3.2. A <i>Trichoderma</i> nemzetség taxonómiai áttekintése .....	8
3.2.1. A <i>Trichoderma</i> nemzetség molekuláris taxonómiája.....	9
3.2.2. A <i>Trichoderma</i> nemzetség szekcióinak jellemzése.....	10
3.3. A növénypatogén gombák jelentősége, kártétele, védekezési stratégiák .....	11
3.3.1. A vizsgálatainkban szereplő növénypatogén gombák és mezőgazdasági kártételük .....	11
3.3.2. A növénypatogén gombákkal szembeni lehetséges védekezési stratégiák .....	13
3.4. A <i>Trichoderma</i> fajok jelentősége a mezőgazdaságban .....	14
3.5. A <i>Trichoderma</i> fajok biokontroll mechanizmusai .....	15
3.5.1. Fungisztázis a talajban .....	16
3.5.2. Tápanyagokért folytatott verseny .....	17
3.5.3. Mikoparazitizmus .....	17
3.5.4. Sejtfalbontó enzimek és szabályozásuk .....	20
3.5.5. Antibiózis, a másodlagos anyagcseretermékek szerepe a biológiai védekezésben .....	23
3.6. A lakkáz enzim előfordulása, hasznosítási lehetőségei .....	23
3.6.1. A <i>Trichoderma</i> fajok lakkáztermelése .....	23
3.7. A különféle fungicidek és azok csoportosítása hatásmechanizmusuk alapján.....	24
3.8. A növények növekedésének és fejlődésének serkentése és ennek mechanizmusai .....	25
3.8.1. Rizoszféra-kompetencia .....	25
3.8.2. A gyökér kolonizációja .....	27
3.8.3. Az ásványi anyagok szolubilizálása, tápanyagfelvétel növelése.....	27
3.8.4. A klorofilltartalom és a fotoszintetikus aktivitás fokozása .....	28
3.8.5. Az abiotikus stresszhatások mértékének csökkentése.....	28
3.8.6. Másodlagos metabolitok termelése .....	28
3.8.7. Növényi hormonok bioszintézisének fokozása .....	29
4. Célkitűzések .....	30
5. anyagok és módszerek.....	31
5.1. Mintavételezés, mintavételi helyek .....	31
5.2. <i>Trichoderma</i> törzsek izolálása és azonosítása.....	31

5.2.1. <i>Trichoderma</i> törzsek izolálása a zöldségrizoszféra-mintákból .....	31
5.2.2. Genomi DNS kivonása az izolált <i>Trichoderma</i> törzsekből .....	32
5.2.3. Az izolált <i>Trichoderma</i> törzsek azonosítása .....	32
5.3. Agar-konfrontációs teszt .....	33
5.4. Különböző környezeti paraméterek hatása a micéliumnövekedésre .....	34
5.5. A <i>Trichoderma</i> törzsek cellulózbontó és foszfátmobilizáló képességének vizsgálata .....	35
5.6. A <i>Trichoderma</i> törzsek által termelt lakkáz enzimek vizsgálata .....	35
5.6.1. A <i>Trichoderma</i> törzsek lakkáz enzimeinek kvalitatív vizsgálata .....	35
5.6.2. A <i>Trichoderma</i> törzsek lakkáz-termelésének kvantitatív vizsgálata .....	36
5.6.3. <i>Trichoderma</i> törzsek által termelt lakkázok pH-függésének vizsgálata .....	36
5.7. Különböző fungicidek minimális gátló koncentráció (MIC) értékeinek meghatározása .....	36
5.8. Paradicsomnövényeken végzett kísérletek és mérések .....	37
5.8.1. Növénynevelés és a kísérleti elrendezés .....	37
5.8.2. A paradicsomnövények biomassa-produkciójának vizsgálata .....	38
5.8.3. A sztómakonduktancia és a CO <sub>2</sub> -asszimiláció meghatározása .....	38
5.8.4. A klorofill <i>a</i> fluoreszcencia indukciós paramétereinek meghatározása .....	38
5.8.5. A fotoszintetikus pigmenttartalmak meghatározása .....	39
5.8.6. Az összcukortartalom meghatározása .....	39
5.9. Az adatok feldolgozása és értékelése .....	40
6. Eredmények és megvitatásuk .....	41
6.1. Törzsek izolálása, az izolált törzsek változatossága .....	41
6.1.1. A részletes vizsgálatainkhoz felhasznált <i>Trichoderma</i> törzsek kiválasztásának szempontjai .....	43
6.2. A <i>Trichoderma</i> törzsek <i>in vitro</i> antagonizmusa .....	43
6.3. A vizsgált <i>Trichoderma</i> törzsek ökofiziológiai jellemzése .....	46
6.3.1. A hőmérséklet hatása a micéliumnövekedésre .....	47
6.3.2. A pH hatása a micéliumnövekedésre .....	49
6.3.3. A vízaktivitás hatása a micéliumnövekedésre .....	50
6.4. Cellulózbontó és foszfátmobilizáló képesség vizsgálata .....	54
6.4.1. A <i>Trichoderma</i> törzsek cellulózbontó képességének vizsgálata .....	54
6.4.2. A <i>Trichoderma</i> törzsek foszfátáz aktivitásának vizsgálata .....	57
6.5. A <i>Trichoderma</i> törzsek lakkáztermelésének vizsgálata .....	58
6.5.1. Lakkáztermelő <i>Trichoderma</i> törzsek azonosítása .....	58
6.5.2. Az igazolt lakkáztermelő törzsek lakkáz-aktivitásának vizsgálata .....	58
6.5.3. A lakkáz-aktivitás pH-függésének kimutatása .....	60
6.6. A törzsek fungicidekkel szembeni érzékenysége vizsgálata .....	61

6.7. A <i>T. asperellum</i> SZMC 20786-os törzs paradicsomnövények növekedésére és fotoszintetikus aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata .....	63
6.7.1. A <i>T. asperellum</i> SZMC 20786 törzzsel történt kezelés paradicsomnövények biomassza-produkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata.....	63
6.7.2. A <i>T. asperellum</i> SZMC 20786 törzzsel történő kezelés hatása a paradicsomnövények fotoszintetikus aktivitására .....	65
6.8. Növényvédő és növénynövekedést serkentő bioeffektor <i>Trichoderma</i> törzsek kiválasztása, termékfejlesztés .....	68
7. Összefoglalás.....	72
8. Summary .....	76
9. Irodalomjegyzék.....	80
10. Köszönetnyilvánítás .....	101

## 1. RÖVIDÍTÉSEK

6-PP	6-pentil-alfa-piron
ABTS	[2,2'-azinobisz-(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonát)]
<i>act</i>	aktint kódoló gén
ATP	adenozin-trifoszfát
$a_w$	vízaktivitás
BCA	Biological Control Agent – biokontroll ágens
BCI	Biokontroll Index
bp	bázispár
<i>cal</i>	kalmodulint kódoló gén
DMSO	dimetil-szulfoxid
<i>ech42</i>	endokitinázt kódoló gén
FHB	kalászfuzáriózis („ <i>Fusarium head blight</i> ”)
FOSC	<i>F. oxysporum</i> fajkomplexum
FSSC	<i>F. solani</i> fajkomplexum
FT	frisstömeg
Fv/Fm	A második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítása
G	guanozin
GPCR	G protein-kapcsolt receptorok („ <i>G protein-coupled receptors</i> ”)
HPLC	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
IES	Indolecetsav
IGS	Intergenic Spacer – gének közti szakasz
ITS	riboszomális RNS génklaszter köztes átíró elválasztó régiója („Internal Transcribed Spacer”)
MAMP	mikróba-asszociált molekuláris mintázat („microbe-associated molecular pattern”)
MAPK	mitogén-aktiválta protein kináz
MEA	malátakivonat táptalaj („ <i>Malt extract agar</i> ”)
MIC	minimális gátló koncentráció („ <i>Minimal Inhibitory Concentration</i> ”)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPQ	nem fotokémiai kioltás
NRPS	nem riboszomális peptid-szintetáz („ <i>nonribosomal peptide synthetase</i> ”)
OD	optikai denzitás
PCR	polimeráz láncreakció („ <i>polymerase chain reaction</i> ”)
Phi PSII	a második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítása
PK	poliketid
PKS	poliketid-szintáz
PSII	a második fotokémiai rendszer
qP	fotokémiai kioltás
ROS	reaktív oxigénfajták („ <i>reactive oxygen species</i> ”)
<i>rpb2</i>	RNS polimeráz II
SM	másodlagos anyagcseretermékek („ <i>secondary metabolites</i> ”)
SSCP	szubtilizin-szerű S8 proteáz
T	timin
<i>tef1</i>	transzlációs elongációs faktor 1-alfa alegysége
THSC	<i>T. harzianum</i> fajkomplexum
VOC	illékony szerves vegyület („ <i>volatile organic compound</i> ”)
YEG	élesztő-glükóz táptalaj („ <i>yeast extract - glucose agar</i> ”)

## 2. BEVEZETÉS

A *Trichoderma* nemzetség számos képviselője az emberi jólétre jelentős hatást gyakorló mikroorganizmusok közé sorolható. A *Trichoderma* fonalgombák alkalmazására több lehetőség is nyílik. A *Trichoderma* törzsek közül kerülnek ki a leggyakrabban használt biofungicidek és növénynövekedés-serkentők, ezen túl számos iparág által hasznosított extracelluláris enzimek forrásai is lehetnek. Változatos másodlagos metabolitok termelésére képesek, néhány fajuk klinikai jelentőséggel is rendelkezik, míg más törzseket úgy módosítottak, hogy általuk lehetőség nyíljon fehérjék heterológ megtermeltetésére. A talaj bioremediációjában is szerepet játszanak a szerves és szervetlen vegyületek, valamint nehézfémek felvételének szabályozása révén (Schuster és Schmoll, 2010; Harman 2011a,b; Mukherjee és mtsai., 2013).

Az utóbbi évtizedekben kétségkívül megnövekedett a *Trichoderma* fajokról szóló tanulmányok, valamint szabadalmak száma. A „Google Scholar Database” adatbázis a „*Trichoderma*” keresőszóra a 2013-as évben ~138 ezer találatot adott ki, míg ez a szám a 2016-os évre közel duplájára emelkedett, elérve a ~269 ezer találatot. A nemzetséget még az 1794-es évben Persoon (Persoon, 1794; Mukherjee és mtsai., 2013) írta le, az egyes fajok hasznosításában rejlő lehetőségeket azonban csak az 1930-as években ismerték fel. Mindez Weindling (1932, 1934) munkásságának köszönhető, aki bizonyította a *Trichoderma* fajok mikoparazitizmusát, antibiotikum-termelését és a biológiai védekezés céljaira történő alkalmazásuk lehetőségét. Az elkövetkező 30 évben viszonylagos csend állt be a *Trichoderma* törzseken alapuló biológiai védekezéssel kapcsolatos vizsgálatok területén, míg az 1970-es években szabadföldi kísérletek során be nem bizonyították hatékonyságukat. Napjainkban már a legtöbbet, és legszélesebb körben tanulmányozott mikroorganizmusok közé tartoznak, ami a rendelkezésre álló szakirodalom mennyiségéből is jól látható.

Kezdetben a *Trichoderma* törzsek azonosítása során főleg a morfológiai jegyekre támaszkodtak, ami a nemzetség pontatlan taxonómiájához vezetett. Áttörést a molekuláris biológiai módszereken, köztük a vonalkód-szekvenciákon alapuló módszerek („*barcoding*”) hoztak (<http://www.isth.info/>). Ma már számos, pontosan beazonosított törzs érhető el különböző törzsgyűjteményekben, és nagy mennyiségben állnak rendelkezésre DNS-szekvenciaadatok is. A *Trichoderma* törzsek esetében sajnos a pontos, fajsztű azonosítást sokszor elhanyagolják, pedig esetükben ez két okból is igen fontos lenne: 1. egyes előnyös tulajdonságok faj- illetve törzsspecifikusak lehetnek, ennél fogva fontos a

pontos azonosítás az egyes törzsekben rejlő összes lehetőség maximális kihasználása érdekében; 2. a pontos azonosítás még fontosabb a biztonsági szempontok szem előtt tartása miatt, hogy az alkalmazni kívánt törzs a gyártóra, a felhasználóra és a környezetre se jelentsen kockázatot. Itt meg kell említeni, hogy a rendelkezésre álló technikák, valamint internetes adatbázisok ellenére sajnálatos módon a kereskedelemben elérhető *Trichoderma*-alapú készítményekben jelenlevő törzsek jelentős része tévesen, vagy semmilyen formában sem lett azonosítva.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A *Trichoderma* fajok általános előfordulása

A *Trichoderma* nemzetség képviselői kozmopoliták, széles körben elterjedtek és világszerte számos ökoszisztéma állandó tagjai (Kubicek és mtsai., 2008; Kredics és mtsai., 2014). A *Trichoderma* fajok előfordulásában különböző faktorok játszanak szerepet, melyek között megtaláljuk az adott élőhely mikroklímáját, a rendelkezésre álló szubsztrátumokat, valamint komplex ökológiai kölcsönhatásokat (Hoyos-Carvajal és Bissett, 2011). A *Trichoderma* gombák túlélése az eltérő földrajzi adottságokkal rendelkező élőhelyeken a rendelkezésre álló tápanyagok széles körben történő hasznosításával, a magas reprodukív kapacitással, és a hatékony kompetitív tulajdonságokkal hozható összefüggésbe (Cardoso Lopes és mtsai., 2012). Változatos élőhelyekhez történő alkalmazkodásra való képességüket szemlélteti, hogy izoláltak már *Trichoderma* törzseket tengeri szivacsokból (Paz és mtsai., 2010; Gal-Hemed és mtsai., 2011), fűfélékből és lágyszárú növényekből, valamint endofita gombaként is számon tartják őket (Samuels és mtsai., 2006a; Zhang és mtsai., 2007; Mulaw és mtsai., 2010). A nemzetség képviselői a különféle gombafajokról, korhadó fákról, fakéregről, talajból és a növények rizoszférájából leggyakrabban izolált gombafajok között is jelen vannak.

Gombaellenes hatásuk a nagy mennyiségben termelt extracelluláris enzimeknek és antibiotikus hatású vegyületeknek köszönhetően érvényesül, így képesek váltani a szaprotróf és biotróf életmód között. A jelenleg rendelkezésre álló szakirodalmi adatok alapján az összes *Trichoderma* faj képes biotróf kapcsolat kialakítására (Jaklitsch, 2009; Druzhinina és mtsai., 2011; Druzhinina és Kubicek, 2013).

#### 3.2. A *Trichoderma* nemzetség taxonómiai áttekintése

A *Trichoderma* fajok taxonómiája (Hypocraceae, Hypocreales, Ascomycota) rövidebb múltra tekint vissza, mint a korábbi taxonómiai terminológiában használt teleomorf *Hypocrea* nemzetségé. Kezdetben a *Trichoderma* fajok azonosítása különböző morfológiai bélyegek alapján történt. Ez alapján az egyes fajok elkülönítése igen nehéznek bizonyult a viszonylag kevés eltérő morfológiai karakternek köszönhetően, ezáltal átfedések jöttek létre a fajok között, ami pontatlan fajazonosításokhoz vezetett (Samuels, 2006). Mivel a morfológiai alapon történő azonosítás még napjainkban is komoly kihívás, a nemzetséggel kapcsolatos áttörést a molekuláris alapon történő azonosítás hozta meg. Samuels (2006), valamint Druzhinina és Kopchinski (2006) a vonalkód-szekvenciákon



alapuló meghatározás segítségével 100 *Trichoderma* faj jellemzését végezték el. Ezt követően a *Trichoderma* törzsek diverzitásának vizsgálatát célzó tanulmányok sokkal nagyobb jelentőségre tettek szert, mellyel párhuzamosan kiterjedt mintavételezés folyt az egész világon (Chaverri és mtsai., 2003a; Hoyos-Carvajal és mtsai., 2009; Jaklitsch, 2009, 2011; Migheli és mtsai., 2009; Gal-Hemed és mtsai., 2011), így a nemzetség taxonómiája rövid idő alatt nagy fejlődésen ment keresztül.

### 3.2.1. A *Trichoderma* nemzetség molekuláris taxonómiája

A nukleinsav-polimorfizmus molekuláris módszereken alapuló jellemzése nagyon nagy számban biztosít lehetőséget a potenciális markerek taxonómiai vizsgálatok céljaira történő azonosítására (Lieckfeldt és mtsai., 1998). Az 1990-es évek végére a szekvenciaelemzés elfogadott és standard módszerré vált a gomba-rendszerbiológiában (Fujimori és Okuda, 1994; Kuhls és mtsai., 1996; Kindermann és mtsai., 1998; Dodd és mtsai., 2000), melynek következtében a *Trichoderma* fajok azonosítása is egyre megbízhatóbbá vált (Druzhinina és Kubicek, 2005; Druzhinina és mtsai., 2006; Samuels, 2006; Jaklitsch, 2009) és folyamatosan növekedett az azonosított fajok száma. Az első 100 molekulárisan jellemzett *Trichoderma* fajról 2006-ban nyújtottak áttekintést Druzhinina és munkatársai (2006).

A nemzetséget érintő első molekuláris taxonómiai vizsgálatok során a riboszomális RNS génklaszter köztes átíródo elválasztó (ITS) régiójának 1-es, majd később a 2-es szakaszát, valamint az 5,8S rRNS-t kódoló gént használták fel (Kindermann és mtsai., 1998; Lieckfeldt és mtsai., 1998; Dodd és mtsai., 2000). Az ITS-szekvenciák ugyan nem biztosítanak megfelelő mértékű filogenetikai felbontást, de alkalmasnak bizonyultak a vonalkód-alapú meghatározáshoz (Druzhinina és mtsai., 2005; Kredics és mtsai., 2014). Az ITS1 és ITS2 szekvenciákban megtalálható „horgony”-szakaszok azonosítása az interneten elérhető *TrichOKey* program ([www.isth.info](http://www.isth.info)) segítségével lehetővé teszi a leggyakrabban előforduló fajok azonosítását. Mindezek mellett újabb és újabb markerek jelentek meg, amelyek segítségével növelni lehetett a filogenetikai fák felbontását. Ezen markerek között megtalálhatóak a 18S, valamint a 28S RNS-t kódoló szakaszok, a translációs elongációs faktor 1-alfa (*tef1*) különböző szakaszai, továbbá az endokitináz (*ech42=chi18-5*) (Lieckfeldt és mtsai., 2000; Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002), az RNS polimeráz II-t (*rpb2*) (Chaverri és mtsai., 2003a), az aktint (*act*) és a kalmodulint (*cal1*) (Samuels és mtsai., 2006a,b; Jaklitsch és mtsai., 2008a) kódoló gének egyes szakaszai. A nemzetségben belül ezen markerek közül a filogenetikai vizsgálatok céljaira a *tef1* gén 4. és

5. intronjai bizonyultak a legalkalmasabbnak (Jaklitsch és mtsai., 2006a,b; Samuels és mtsai., 2006a; Jaklitsch, 2009, 2011).

### 3.2.2. A *Trichoderma* nemzetség szekcióinak jellemzése

A *T. longibrachiatum* és a *T. pseudokoningii* külön-külön a Rifai által 1969-ben létrehozott 9 fajaggregátum részét képezték (Samuels és mtsai., 2012), később pedig a *Longibrachiatum* szekció alapjául szolgáltak. Kuhls és munkatársai 1996-ban írták le a *T. reesei*-t, mint a szekció új képviselőjét, melynek az ivaros (teleomorf) alakja korábban *Hypocrea jecorina*-ként volt ismert. Druzhinina és munkatársai 2012-ben elvégezték a *Longibrachiatum* szekció felülvizsgálatát, és az újonnan leírt fajokkal együtt 21 önálló fajt soroltak a szekcióba.

A legtöbb *Trichoderma* faj a *Trichoderma* szekcióba tartozik (Kulling-Gradinger és mtsai., 2002, Druzhinina és Kubicek, 2005). Ez a szekció alapvetően megegyezik a Bissett (1991b) által bevezetett szekcióval, később azonban számos faj került át ide, főleg a *Pachybasium* szekcióból, többek között a *T. hamatum*, a *T. pubescens* és a *T. strigosum* (Kindermann és mtsai., 1998; Dodd és mtsai., 2000; Lieckfeldt és mtsai., 2001; Kulling-Gradinger és mtsai., 2002). A közelmúltban a *T. koningii* szubkládot, valamint a *Viride* és a *Viridescens* kládot írták le a szekció új tagjaiként (Jaklitsch és mtsai., 2006a; Samuels és mtsai., 2010). Később Jaklitsch (Jaklitsch, 2009, Jaklitsch és mtsai., 2012) munkásságának köszönhetően a *Trichoderma* szekció újabb 27, majd 43 fajjal bővült.

A *Pachybasium* szekciót Bissett (1991a) a *T. hamatum*-ra (korábban *Pachybasium hamatum*) alapozta, melyet később további 20 fajjal, többek között a *T. harzianum*-mal, *T. piluliferum*-mal, *T. polysporum*-mal és a teleomorf *H. gelatinosa*-val bővített (Bissett, 1991b). A szekcióról azonban kiderült, hogy parafiletikus (Kindermann és mtsai., 1998; Kulling-Gradinger és mtsai., 2002), ezért további 5 kládra osztották fel. A *T. hamatum*-ot áthelyezték a *Trichoderma* szekcióba, az összes többi hozzá hasonló morfológiájú fajt pedig egymástól független kládokba (*Ceramica*, *Chlorospora*, *Harzianum*, *Semiorbis*, *Strictipilosa* és *Stromaticum*) sorolták (Chaverri és Samules, 2003; Jaklitsch, 2009; Jaklitsch, 2011). A *T. hamatum* áthelyezésével a Bissett (1991a) által létrehozott szekciónevet már nem használták tovább. A szekciót később Lu és munkatársai (2004) szervezték újjá a *T. polysporum*/*H. pachybasiioides* köré, a *T. minutisporum*-mal és egyéb újonnan leírt fajokkal együtt. A szekció a *Pachybasiioides* nevet kapta, ám később Jaklitsch-nak (2011) köszönhetően *Pachybasium* „core” központi csoportnak nevezték el,

mely tovább bővült a *Podostroma* és *Podocrea* nemzetségekkel (Chamberlain és mtsai., 2004; Jaklitsch és mtsai., 2008b).

A *Hypocreanum* szekciót Bissett (1991a) a *T. lacteum*-ból eredeztette. A későbbiek folyamán Overton és munkatársai (2006a,b) vizsgálták felül a szekciót, majd a legújabb multilókusz-vizsgálaton alapuló filogenetikai elemzés során 13 fajt soroltak a *Hypocreanum* szekcióba, többek között a *T. austriacum*-ot, a *T. citrinum*-ot, a *T. decipiens*-t, a *T. phellinicola*-t, a *T. pulvinatum*-ot és a *T. sulphureum*-ot.

A Bissett által felállított szekciókon túl számos további kládot hoztak létre. A legnagyobb ezek közül a *Harzianum* klád, melybe zöld aszkospórákkal rendelkező fajok tartoznak (Jaklitsch, 2009; Druzhinina és mtsai., 2010). A klád fő képviselője a kozmopolita *T. harzianum sensu lato* fajkomplex, amely nagyfokú filogenetikai változatosságot mutat. További filogenetikai vizsgálatokat Chaverri és Samuels (2002, 2003), valamint Chaverri és munkatársai (2003b) végeztek, majd Druzhinina és munkatársai (2010) tovább folytatták a klád vizsgálatát. Druzhinina és munkatársai (2010) vizsgálataik alapján két, a *H. lixii*-től különböző, genetikailag eltérő anamorf fajt igazoltak, a *T. harzianum sensu stricto*-t és a korábban még le nem írt *T. „afroharzianum”*-ot. Mivel egyértelműen kiderült, hogy a *H. lixii* és a *T. harzianum sensu stricto* nem egy faj, a *H. lixii* – *T. harzianum* teleomorf – anamorf kapcsolatot megszüntették (Druzhinina és mtsai., 2010). A *H. lixii* és a *T. harzianum sensu stricto* mellett a klád 18 fajt számlál, melyek között megtalálható a *T. aggressivum* (Samuels és mtsai., 2002), a *T. pleuroti* és a *T. pleuroticola*, melyek termesztett gombák zöldpenészes fertőzéséért tehetők felelőssé (Park és mtsai., 2006; Komoń-Zelazowska és mtsai., 2007).

A *Harzianum* klád mellett további 8 kisebb klád (*Chlorospora*, *Spinulosa*, *Strictipilosa*, *Ceramica*, *Semiorbis*, *Brevicompectum*, *Psychrophyla*, valamint *Lutea*) került még meghatározásra (Chaverri és Samuels, 2003; Degenkolb és mtsai., 2008; Jaklitsch 2009, 2011).

### **3.3. A növénypatogén gombák jelentősége, kártétele, védekezési stratégiák**

#### **3.3.1. A vizsgálatainkban szereplő növénypatogén gombák és mezőgazdasági kártételük**

A takarmánynövényeket érintő betegségek óriási jelentőséggel rendelkeznek a mezőgazdaságban, és évről-évre súlyos termés kieséseket és gazdasági károkat képesek okozni (Viterbo és Horwitz, 2010; Mesterházy és mtsai., 1999). A talajban előforduló és

azon keresztül fertőzni képes mikroorganizmusok közül is a talajgombák a legjelentősebbek (Viterbo és Horwitz, 2010).

A *Fusarium* nemzetség a növénypatogén gombák egy nagyon változatos csoportját alkotja, képviselői széles gazdaspektrummal és földrajzi elterjedtséggel rendelkeznek (Doohan és mtsai., 2003). A növénypatogén *Fusarium*-ok a gabonák számos különböző megbetegedését képesek előidézni, többek között a palánták levélfoltosodását („*seedling blight*”), fuzáriumos tőrothadását („*foot rot*”), valamint a kalászfuzáriózist (FHB – „*Fusarium head blight*”). A kukoricánövények legtöbb részét is képesek megfertőzni a csírázás kezdetétől egészen az érés folyamatának legvégéig (Sutton, 1982; Parry és mtsai., 1995).

A *Fusarium* fajokhoz hasonlóan az egész világon nagy számban okoznak fertőzéseket az *Alternaria* nemzetség képviselői. Gazdanövényeik közé sorolhatunk számos gazdaságilag jelentős zöldséget és gyümölcsöt (pl. alma, brokkoli, karfiol, répa, burgonya, paradicsom) (Johnson és mtsai., 2001; Mora és Earle, 2001; Weir és mtsai., 1998). Számos dísznövényt és fűféléket is képesek megfertőzni (Laemmlen, 2001a). Az *Alternaria* fajok által okozott fertőzések leggyakrabban a növények föld feletti részein következnek be. A fertőzés legelső, kezdeti tünete egy apró fekete pont megjelenése a levél felszínén, melynek mérete a fertőzés előrehaladtával folyamatosan növekszik.

Különböző környezeti körülmények között képes a növények körében globális problémát okozni a gombák által kiváltott palántadőlés is. A palántadőlés elnevezése a hajtás és a gyökér szöveteinek szétesésére, vizenyőssé és puhává válására utal (Laemmlen, 2001b). A legtöbb palántadőlést kiváltani képes növénypatogén gomba a kifejllett növényen is képes különböző fertőzések kialakítására. A palántadőlésért felelős két leggyakoribb gomba a *Rhizoctonia solani*, valamint a *Pythium*-ok, de a betegséget okozhatják *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Alternaria*, *Phytophthora* és *Fusarium* fajok is (Laemmlen, 2001b).

Több mint 500 gazdanövénnyel (mezőgazdasági-, és dísznövények, fák) és nagyfokú negatív gazdasági hatással rendelkezik a *Rhizoctonia solani* (Anderson, 1982; Sneh és mtsai., 2013; Kai és mtsai., 2007). A 2000-es években Európában drámai növekedés következett be a betegség előfordulásainak számában, ezáltal meghatározó szereplőjévé vált a növénypatogén gombák által kiváltott fertőzéseknek (Grosch és mtsai., 2005). A *R. solani* szaprotróf és nekrotróf törzsei széles körű földrajzi elterjedtséggel rendelkeznek, szkleróciumaik igen ellenállóvá teszik a szélsőséges környezeti behatásokkal szemben (Kai és mtsai., 2007).

A tökfélék ismert kártevője a *Phoma cucurbitacearum*, amely a növények növekedése során a ragacsos szárfoltosságot idézi elő, a termés megjelenését követően pedig fekete rothadást képes kiváltani (Keinath és mtsai., 1995). A *Cucurbita* nemzetségen belül a *Phoma* törzsek által okozott fekete rothadásnak a sütőtök esetében is jelentős gazdasági szerepe van, ugyanis betakarítás előtt és a raktározás során is súlyos károkat képes okozni (Zitter és Kyle, 1992).

A levegőben a szél és az eső által terjesztett egyik legjelentősebb nekrotróf növénypatogén gomba a *Botrytis cinerea*, amely több mint 200 gazdanövénnyel rendelkezik világszerte (Williamson és mtsai., 2007a), köztük facsemetékkel, zöldségekkel, dísz-, és szántóföldi növényekkel, de a gyümölcsösök is ki vannak téve a *Botrytis* törzsek által okozott lágyrothadásnak és szürkepenészes megbetegedésnek. A *Botrytis* törzsek betakarítás előtt és után is egyaránt képesek a fertőzés kiváltására, mely a legtöbb esetben a növény föld feletti részein következik be (Williamson és mtsai., 2007b). A kifejlett, vagy már öregedő fázisban lévő kétszikű növények vannak leginkább kitéve a fertőzéseknek. A *Botrytis* elleni védekezés igen nehézkes, mivel a talajban micélium és konídium formájában is huzamosabb ideig túlél, valamint rövid idő alatt kialakulhat rezisztencia a védekezéshez használt fungicidekkel szemben, ezért a legtöbb esetben kombinált kezeléseket alkalmaznak (Williamson és mtsai., 2007a).

### **3.3.2. A növénypatogén gombákkal szembeni lehetséges védekezési stratégiák**

A növénypatogén gombák ellen történő védekezéshez elengedhetetlenül szükséges, hogy alapos információval rendelkezünk a növénypatogén kórokozóról, a gazdanövénnyel és a fertőzés kialakulásához szükséges környezeti feltételekről (Koike és mtsai., 2003). Egy hatásos védekezési stratégiának mindenféleképpen gazdaságosnak is kell lenni, a védekezésre fordított összeg nem haladhatja meg a betakarítást követően a terményből származó hasznot (Koike és mtsai., 2003). Ezért a védekezés során nagyon nagy a jelentősége az elővigyázatosságnak és a növények folyamatos megfigyelésének, különös tekintettel azokra a növényekre, amelyekre már jelentkeznek valamely fertőzés kezdeti tünetei. A fertőzéssel szembeni beavatkozás időzítése is kulcsszereppel bír. Mindezek mellett ahhoz, hogy a védekezés gazdaságos legyen, az alábbi feltételeknek is meg kell felelni: legyen egyszerű, biztonságos és költséghatékony, továbbá kellően hatásos ahhoz, hogy a fertőzést, elfogadható mértékben tudja csökkenteni vagy megszüntetni. A leghatásosabb azonban mégis az, ha több különböző stratégiát alkalmazunk egyszerre (Koike és mtsai., 2003).

A növénytermesztés során alapvető lehet a különféle növénypatogén ágensekkel szemben ellenálló, nemesített növényfajták használata, így elkerülve a fertőzések okozta termés kieséseket (Wink, 1988; Hammond-Kosack és Parker, 2003).

A növény optimális fejlődéséhez szükséges körülmények kialakítása is fontos szereppel bír. Az ideális körülmények megteremtése során minimalizálható az esélye annak, hogy a kórokozó találkozzon a gazdanövénygel. A vetés és ültetés előtt a megfelelő talajelőkészítés ebben az esetben elengedhetetlen. Továbbá segít, ha a vetés olyan földbe történik, ahol még nem fordult elő korábban az adott kórokozó által kiváltott megbetegedés. Emellett a megfelelő minőségű vetőmag használata is nélkülözhetetlen (Koike és mtsai., 2003).

A növénypatogénnal szembeni védekezés eszköze a kémiai védekezés is, a vegyszerek használata azonban nagyon költséges lehet és szigorúan szabályozott, mindezen túl pedig a környezetre is kockázatot jelenthet. A kémiai védekezés eszközei közé tartozik például a vetést megelőző talajfertőtlenítés, amely hatékonyan képes a növénypatogén gombák számának csökkentésére. A csávázott vetőmagok használata is segítséget nyújt a magokat illetve a palántákat megtámadó kórokozók ellen. A kémiai védekezés hátránya, hogy az adott növénypatogén gombáknál a rezisztencia hamar megjelenhet (Tjamos és mtsai., 2013).

Erre nyújthat megoldást az alább felsorolt védekezési stratégiákon túl a biológiai védekezés is, amely egyre nagyobb teret nyer a hatékony antagonista biokontroll ágenseknek köszönhetően, így megvalósítva az eredményes integrált növényvédelmet (Monte, 2001).

### **3.4. A *Trichoderma* fajok jelentősége a mezőgazdaságban**

A modern mezőgazdaság sikereinek ellenére még mindig vannak olyan gyakorlatok, melyek növelik a növényeket érintő betegségek kialakulásának kockázatát és a rovarok által okozott kártétel mértékét. Ezek közé tartozik a klonális növények folyamatos monokultúrákban történő termesztése, valamint a kórokozókkal szemben érzékeny fajtanövények használata is. További problémát vet fel a nitrogénalapú műtrágyák túlzott használata, mely szintén növelheti a növényeket érintő fertőzések kockázatát (Harman és mtsai., 1996). A talajban előforduló kórokozók közül a súlyos veszteségeket okozó gombák jelentősége a legnagyobb. Számos növénypatogén gomba, pl. a *Pythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* és *Fusarium* fajok kártételének mértéke

világszerte egyre jelentősebb. Negatív hatásuk nem kizárólag a fejlődő növényen jelentkezik, hanem az elraktározott terményeken is (Chet és mtsai., 1997). A mezőgazdaságban a vegyszerek alkalmazásával (kémiai védekezés, „*chemical control*”) számos gazdaságilag jelentős haszonnövényt érintő növényi kórokozót sikerült visszaszorítani. A vegyszerek használatával szemben azonban aggályok merültek fel, mivel a rovarkártevők és kórokozók fogékonysága ezekre a vegyszerekre nézve folyamatosan csökkent, és a rezisztencia is megjelent velük szemben. Mindezek mellett a kémiai növényvédőszerek a környezetre és az emberek egészségére is egyaránt káros hatást fejthetnek ki. Éppen ezért napjainkban egyre nagyobb érdeklődés övezi a különböző alternatív mezőgazdasági technikákat, melyekkel lehetőség nyílik a biológiai alapú növényvédelemre. A biológiai védekezés, vagy biokontroll („*biological control*”, „*biocontrol*”) során egy vagy több mikroorganizmusnak (természetes ellenség, kompetitor, antagonista), vagy azok valamilyen termékének előre eltervezett és jól átgondolt alkalmazása valósul meg a különböző kártevő és kórokozó mikroorganizmusok populációinak visszaszorítása céljából. A biológiai védekezés ezen felül irányulhat a haszonnövényt érintő negatív hatások csökkentésére is. Manapság számos baktérium-, és gombaalapú biokontroll készítmény vált elérhetővé, melyek között a *Trichoderma* nemzetség képviselői is megtalálhatóak. A nemzetségen belül a *T. virens*, *T. viride* fajok és a *T. harzianum* fajkomplexum (THSC) képviselői a leggyakrabban alkalmazott biokontroll ágensek (Grondona és mtsai., 1997). A *Trichoderma* törzsek, mint biokontroll ágensek („*biocontrol agent*”, *BCA*) sikere számos kedvező tulajdonságukon alapul. Ilyen a magas reprodukzív kapacitás, a kedvezőtlen körülmények nagyfokú tolerálása, és az a tulajdonságuk, hogy kiváló hatékonysággal képesek a különféle tápanyagok hasznosítására, továbbá a rizoszféra kolonizációjára. Ezek a többségében talajban előforduló mikroorganizmusok sikerrel kerültek a kereskedelmi forgalomba annak érdekében, hogy növeljék a terméshozamot a növény növekedésének serkentése, és a széles körben elterjedt növénykórokozókkal (baktériumok, gombák, oomycoták) szembeni biológiai védekezés révén (Monte, 2001; Harman és mtsai., 2004a).

### **3.5. A *Trichoderma* fajok biokontroll mechanizmusai**

A biokontroll ágensek élő szervezetek, melyek aktivitása jelentős mértékben függ a környezet fizikokémiai paramétereitől. Ebből az okból kifolyólag a *Trichoderma* törzsek által kifejtett biokontroll tevékenység sokszor megjósolhatatlan. Az egyes biokontroll

*Trichoderma* fajok törzsei közötti genetikai sokszínűség megismerése, valamint biokontroll mechanizmusaik alaposabb tanulmányozása révén a törzsek sokkal hatékonyabb alkalmazása valósulhat meg. A biokontroll mechanizmusok összetettek, a kórokozókkal szembeni védekezés a különböző mechanizmusok együttes hatása által valósulhat meg (Howell, 2003). Mindezek háttérében állhat a tápanyagért és élőhelyért folytatott kompetíció, és a *Trichoderma* által termelt másodlagos anyagcseretermékek, melyek gátolhatják a növénypatogén gombák spóráinak csírázását (fungisztázis). A biokontroll *Trichoderma* törzsek el is pusztíthatják a célszervezetet (antibiózis), vagy módosíthatják a rizoszférát azáltal, hogy savanyítják környezetük pH-ját, így megakadályozva a kórokozók növekedését. A biokontroll megvalósulhat a patogén és a BCA közötti direkt kapcsolat, azaz a mikoparazitizmus által, ami a fizikai kapcsolaton túl magába foglalja különféle hidrolitikus enzimek, továbbá toxikus vegyületek és antibiotikumok termelését, melyek együttesen is hathatnak a kórokozóra. A *Trichoderma* BCA-k pozitív hatást gyakorolnak a növényekre a növény növekedésének serkentése által (biofertilizáció), valamint a növények védekező rendszerének serkentése révén is (Harman és mtsai., 2004b).

### **3.5.1. Fungisztázis a talajban**

A talaj fungisztatikus hatása (Lockwood, 1997), valamint az a képességünk, hogy erősítsük, vagy éppen gyengítsük a talajnak ezt a tulajdonságát (Papavizas és Lumsden, 1980), jelentős hatással lehet a természetes úton jelenlevő vagy a mesterségesen kijutatott *Trichoderma* fajok túlélésére és populációméretére (Papavizas, 1985). A *Trichoderma* konídiumok ellenállóak lehetnek ezzel a fungisztatikus hatással szemben (Mitchell és Dix, 1975), de vannak érzékenyek fajok is (Lockwood, 1997). Az érzékenység semleges vagy lúgos kémhatású talajokban jobban érvényesül (Danielson és Davey, 1973a).

A jó antagonista képességgel rendelkező *Trichoderma* törzsek képesek a talaj más mikroorganizmusok és növények metabolitjai által kialakított fungisztatikus hatásának kiküszöbölésére, így képesek ebben a kompetitív környezetben túlélni (Benítez és mtsai., 2004). A *Trichoderma* törzsek a talajba juttatást követően gyors növekedésre képesek, melyben jelentős szerepet játszik, hogy nagyfokú természetes ellenálló-képességgel rendelkeznek számos toxikus vegyülettel szemben. Ez a rezisztencia az ABC transzport-rendszerek működésének köszönhetően képes létrejönni (Vyas és Vyas, 1995). A toxikus vegyületek között különféle herbicidek, fungicidek és peszticidek egyaránt megtalálhatóak (Chet és mtsai., 1997).



### 3.5.2. Tápanyagokért folytatott verseny

A *Trichoderma* fajok közös jellemzője, hogy képesek más gombafajokat kiszorítani a rizoszférából, így mind az élőhelyért, mind pedig a tápanyagokért zajló verseny kitűnő kompetitorai (Harman és mtsai., 2004b). Azok a *Trichoderma* törzsek, amelyek hatékonyabb tápanyagfelvételt és gyorsabb növekedést mutatnak, jelentős előnyhöz juthatnak.

A talajban normális körülmények között a vas oldhatatlan állapotban van jelen, azonban a baktériumok és a gombák egy speciális rendszer segítségével kelátolják és felvehető formájúvá alakítják. Ez a rendszer magába foglalja a sziderofórok, valamint olyan peptidek termelését, amelyek ligandként és vastranszporterként működnek. Jalal és munkatársai (1986) *T. virens* esetében 3 hidroxamát sziderofórt azonosítottak, míg Wilhite és munkatársai (2001) elvégezték a *T. virens* peptid-szintetáz kódoló *psyl* génjének delécióját, amelynek valószínűsíthetően a sziderofór-szintézisben van szerepe. Eredményeik alapján azonban nem mutatkozott különbség a deléció hatására a *P. ultimum*-mal és *R. solani*-val szembeni biokontroll képességben.

Bár még nem jelenthető ki teljes bizonyossággal, hogy a vas felvételéért sziderofórok révén megvalósuló verseny a biokontroll mechanizmusok része, a rendelkezésre álló eredmények azonban erre utalnak. Három *Trichoderma* faj, a *T. reesei*, THSC és *T. atroviride* összehasonlító genomelemzésének eredményei alapján a *Trichoderma* nemzetség biokontroll képességekkel rendelkező képviselői kiterjedt, a kelátolt vas felvételében közreműködő sziderofór-transzporter rendszerekkel rendelkeznek (Kubicek és mtsai., 2011; Kredics és mtsai., személyes közlés).

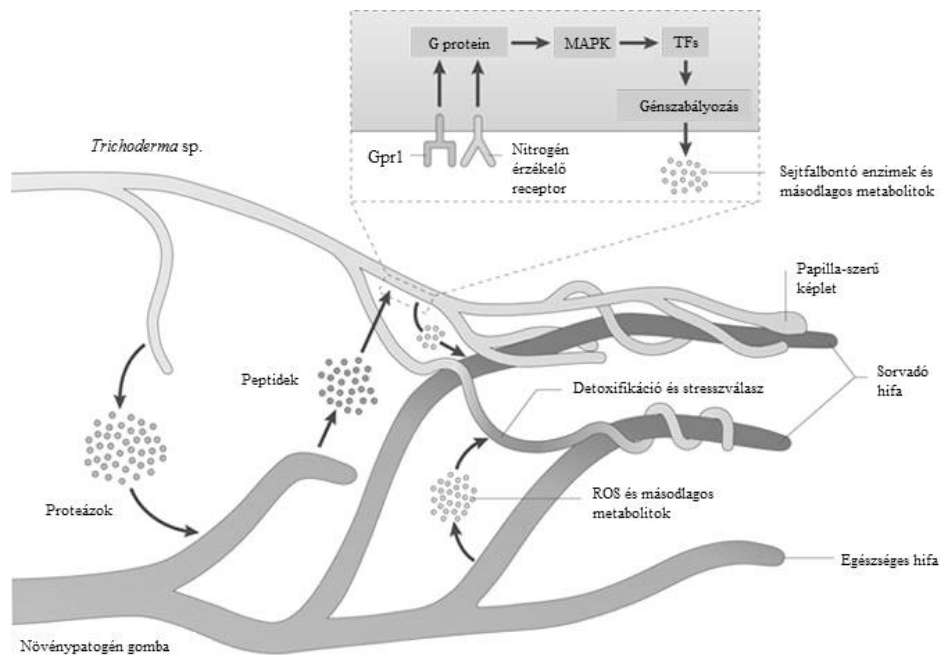
### 3.5.3. Mikoparazitizmus

A talajra összetett biológiai élőhelyként tekinthetünk. Különösképpen igaz ez a rizoszférára, ahol jelentős számú biológiai kölcsönhatást figyelhetünk meg a baktériumok, gombák, nematódák és a növények között (Singh és mtsai., 2004). Minden egyes organizmus a túlélésért küzd ebben az erősen kompetitív környezetben. A *Trichoderma* fajok és más gombák között létrejövő direkt kapcsolatokat hagyományosan nekrotróf hiperparazitizmusnak vagy mikoparazitizmusnak nevezzük (Harman, 2011a), melynek során olyan antagonista kapcsolat jön létre két gombafaj között, ahol az egyik faj képviselője közvetlenül támadja a másik faj képviselőjét. A gombák közötti parazita kapcsolatokat két fő csoportba sorolhatjuk az alapján, hogy a parazita mekkora agresszivitást mutat a gazda felé. Az első csoportba a biotróf kapcsolatokat soroljuk,

melynek során a gazda tápanyaggal látja el a parazitát, mely nem okozza a gazdaszervezet pusztulását. A második nagy csoportot a nekrotróf kapcsolatok alkotják. Az ebbe a csoportba sorolható mikoparazita gombák szélesebb gazdakörrel és nagyobb fokú agresszivitással rendelkeznek, és végső soron a gazdaszervezet pusztulását okozzák. Mivel a mikoparazita *Trichoderma* fajok az elpusztult gombákból álló biomasszát is képesek tápanyagforrásként hasznosítani, ezért életmódjukat mikoparazita helyett mikotrófnak is nevezhetjük, mely elnevezés magába foglalja mind a biotróf, mind pedig a szaprotróf táplálkozási stratégiákat (Druzhinina és mtsai., 2011). A *Trichoderma* nemzetség azon képviselőit, melyekre nekrotróf mikoparazitizmus jellemző, igazoltan is hatékony biokontroll ágenseknek tekinthetjük (Herrera-Estrella és Chet, 2003).

#### **3.5.3.1. A gazdagomba jelenlétének érzékelése**

A (nekrotróf) mikoparazitizmushoz vezető út komplex folyamat, melynek első lépése a gazdagomba jelenlétének érzékelése. Ennek megismeréséhez 3 különböző *Trichoderma* faj genomszekvenálásából (Kubicek és mtsai., 2011), valamint transzkriptomikai analíziséből (Lorito és mtsai., 2010; Seidl és mtsai., 2009) származó adatok nyújtottak átfogó ismereteket. A különböző *Trichoderma* törzseknél a gazdagombával létesített tényleges kapcsolat kialakítása előtt megfigyelték számos proteázt, és oligopeptid transzporter fehérjét kódoló gén kifejeződését (Seidl és mtsai., 2009; Suárez és mtsai., 2007). Ezen proteázok többsége a *T. cf. harzianum* CECT 2413 törzs transzkriptómájáról biokontroll körülmények között szerzett adatok alapján a szubtilizin-szerű szerin proteázok csoportjába tartozott (Suárez és mtsai., 2007; Seidl és mtsai., 2009). Azok a *T. atroviride* törzsek, amelyek túltermelik a *prb1* gén által kódolt proteázt, emelkedett mikoparazitikus aktivitással rendelkeznek (Flores és mtsai., 1997). Ezek a proteázok működésük során oligopeptideket szabadítanak fel a gazdagomba sejtfalából, melyek ezután a *T. atroviride* megfelelő receptoraihoz kötődve segítik a nitrogén hiányának érzékelését (Seidl és mtsai., 2009) (**1. ábra**). A G protein-kapcsolt receptorokat („G protein-coupled receptors”, GPCRs) tekintjük ezen oligopeptidek szenzorának. További G protein-kapcsolt receptorok is szerepet játszanak a gazdagomba érzékelésében. Ilyen például a Gpr1, amely a cAMP receptor-szerű GPCRs család tagja, mely szintén a *T. atroviride* mikoparazitizmusában játszik szerepet (Omann és mtsai., 2009).



**1. ábra.** A *Trichoderma* fajok mikoparazitizmusa a talajban.

A *Trichoderma* fajok által termelt és szekretált proteázok hatására a gazdagombából különféle peptidok szabadulnak fel. Ezek a peptidok vagy a G protein-kapcsolt receptorokhoz (Gpr1) vagy a nitrogén-érzékelő receptorokhoz kötődnek, így elindítva egy kaszkádmechanizmust, mely a MAPK-okon keresztül egy eddig ismeretlen transzkripciós faktort aktivál, ami aztán a sejtfal lebontásában szerepet játszó enzimek és másodlagos metabolitok termelődését váltja ki. A gazdagomba által termelt metabolitok és a reaktív oxigén gyökök (ROS) kiváltják a *Trichoderma* törzsek stresszválaszát, valamint detoxifikációját. Druzhinina és mtsai. (2011) nyomán.

A gombákban megtalálható jelátviteli utak közül a legjelentősebb a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) útvonal (Schmoll, 2008) (**1. ábra**). A *Trichoderma* fajok genomjában három MAPK-t kódoló gént találhatunk. Az egyik az úgynevezett patogénitáért felelős MAPK (TmkA; ismert még Tvkl és Tmk1 néven). A következő a sejtingegritásért felelős kináz (TmkB), a harmadik pedig az ozmoregulációban játszik szerepet (Hog1) (Schmoll, 2008). A *tmkA* deléciója a *T. virens* 'P' törzséből (gliovirin-termelő, *Pythium* fajokkal szemben hatásos biokontroll törzs) a *Sclerotium rolfii*-val szemben mutatott antagonizmusának elvesztését eredményezte, ellenben a *R. solani* elleni antagonizmusra való képessége megmaradt (Mukherjee és mtsai., 2003; Viterbo és mtsai., 2005). Mindezekkel ellentétben a *tmkA* deléciója a 'Q' törzsben (nagy mennyiségben termel gliotoxint, *R. solani*-val szemben hatásos) tovább javította a törzs *R. solani*-val valamint, *P. ultimum*-mal szemben mutatott biokontroll képességét. Minderre a másodlagos metabolitprofilban jelen lévő különbség szolgáltat magyarázatot. A másik két MAPK-ról (TmkB és a Hog1) sokkal kevesebb információ áll rendelkezésünkre, mivel a vizsgált mutánsok gyenge növekedést mutatnak, ami kizárja őket a sikeres

antagonizmusból. A TmkB mutáns *T. virens* mikoparazitizmusa sérült *S. rolfii*-val szemben (Kumar és mtsai., 2010), míg a Hog1 mutáns *T. atroviride* nem mutatott mikoparazita aktivitást (Delgado-Jarana és mtsai., 2006).

### **3.5.3.2. A tényleges kapcsolat kialakulása a mikoparazita és a gazdagomba között**

A mikoparazitizmus megvalósulásához a gazdagomba hifájának felismerésén túl szükség van a direkt kapcsolat kialakulására is, amely az úgynevezett ‘coiling’ mechanizmus révén valósul meg. Ennek során a *Trichoderma* hifa jellegzetes hurokszerű növekedést mutat a gazdagomba micéliuma körül (**1. ábra**). Ez a jelenség a gazdagomba hifájának felszínén jelen lévő lektinek felismerésén alapul (Inbar és Chet, 1996). Azonban a növényi lektinek is ugyanolyan mértékben képesek a ‘coiling’ mechanizmust indukálni, ami arra utal, hogy nem a lektinek határozzák meg a folyamat gazdaspecificitását (Rocha-Ramirez és mtsai., 2002). Egyes *Trichoderma* törzsek gazdaszervezet jelenlétének hiányában képesek a saját hifáik körül is körbetekeredni, ami viszont arra utalhat, hogy nincs szoros összefüggés a ‘coiling’ és a mikoparazitizmus között.

A *Trichoderma* fajok mikoparazita támadása során a gazdagomba hifájának mentén történő növekedéssel párhuzamosan papillaszerű képletek kialakulását is megfigyelhetjük (**1. ábra**). A folyamat későbbi lépései során a gazdagomba sejtfalának lebontása és a penetráció is ezen papilla-szerű képlet kialakulásának helyén fog bekövetkezni (Harman, 2011b; Harman és mtsai., 2004a; Chacón és mtsai., 2007). Ezek a képletek analógok a növénypatogén gombák appressóriumaiával.

### **3.5.3.3. A mikoparazitizmus végső lépése**

A mikoparazitizmus legvégső lépésében a *Trichoderma* törzsek gombaellenes másodlagos anyagcseretermékeik (antibiózis) és sejtfalbontó enzimek együttes hatása révén a gazda gombák pusztulását okozzák (**1. ábra**). A penetráció után a *Trichoderma* hifa intracellulárisan növekedik a gazdagomba hifájának belsejében, és tápanyagként hasznosítja annak beltartalmát.

### **3.5.4. Sejtfalbontó enzimek és szabályozásuk**

A mikoparazitizmus során a felismerés, majd a *Trichoderma* hifa azt követő morfológiai változásai után a hidrolitikus enzimek termelése kulcsfontosságú szerepet töltenek be a sikeres mikoparazita kölcsönhatás létesítésében, a gombasejtfal jelenti ugyanis az első akadályt a gazdagomba és a mikoparazita között. A sejtfal lebontásában számos enzim (kitinázok, glukánázok, N-acetilglükózaminidázok, proteázok) együttesen

játszik szerepet (Di Pietro és mtsai., 1993; Schirmböck és mtsai., 1994; Mishra, 2010). Mindezeket alátámasztandó, különféle kísérleti körülmények között vizsgálták *Trichoderma* törzsek rázatott tenyészeit. Amikor a törzsek növekedéséhez szükséges szén-, illetve nitrogénforrások jelen voltak a tápközegben, akkor a litikus enzimek kifejeződéséért felelős gének represszált, nyugalmi állapotban voltak (Mach és mtsai., 1999; Olmedo-Monfil és mtsai., 2002). Mivel a hidrolitikus enzimek specifikus szerepet töltenek be a mikoparazitizmus során csakúgy, mint a lehetséges gazdagomba felismerésében, így két különböző *Trichoderma* törzs együttes leoltásával vizsgálták az enzimeket kódoló gének kifejeződését. A tápanyag mennyiségének csökkenése által bekövetkezett korlátozó körülmények sem eredményezték azonban az enzimszint növekedését (Reithner és mtsai., 2011). Másrésztől tápanyaglimitáló körülmények között a gazdagomba sejtfalkomponenseinek tápközeghez történő hozzáadása a sejtfalbontó enzimeket kódoló gének kifejeződésének fokozását idézte elő (Olmedo-Monfil és mtsai., 2002; Suárez és mtsai., 2007).

#### **3.5.4.1. Kitinázok**

Bár a gazdagomba sejtfalának lebontása több litikus enzim együttes hatása révén valósul meg, a mikoparazitizmusban a kitinázok játszik a kulcsszerepet, a legtöbb gomba sejtfalában ugyanis a legnagyobb arányban kitint találunk (Baek és mtsai., 1999; Peberdy, 1990). A kitinolitikus enzimeket három fő csoportba sorolhatjuk (Harman és mtsai., 1993; Sahai és Manocha, 1993). Az első csoport képviselői közé tartoznak az endokitinázok (EC 3.2.1.14), amelyek véletlenszerűen hasítják a kitinláncokat kitotetraóz, kitotrióz és kitobióz egységekre. A második csoportba az exokitinázok – vagy kitobiozidázok (EC 3.2.1.29) – tartoznak, melyek kitobióz-egységeket hasítanak le a kitinláncról anélkül, hogy egyéb mono-, vagy oligoszacharid képződne. Az utolsó csoportot az *N*-acetyl- $\beta$ -D-glükózaminidázok – más néven kitobiázok (EC 3.2.1.30) – alkotják, melyek monomereket hasítanak le a kitin, illetve a kitin oligomerek nem redukáló végeiről.

#### **3.5.4.2. Glukanázok**

A kitinázok mellett igen fontos szerepet játszanak a mikoparazitizmusban a  $\beta$ -1,3-glukanázok (laminarinázok) (Harman és mtsai., 2004a) is, melyek két fő csoportra oszthatók (Manczinger és mtsai., 2002). Az endo- $\beta$ -1,3-glukanázok (EC 3.2.1.29) a  $\beta$ -kötéseket random helyeken hasítják a poliszacharidlánc mentén, ezáltal rövid oligoszacharidokat szabadítanak fel. Ezzel szemben az exo- $\beta$ -1,3-glukanázok (EC

3.2.1.58) glükóz egységeket hasítanak le a szubsztrát nem redukáló láncvégeről. Az első *Trichoderma*  $\beta$ -1,3-glukanáz enzim tisztítását Tangarone és munkatársai (1989) hajtották végre egy *T. longibrachiatum* törzsből. Később Vázquez-Garciduenas és munkatársai (1998) egy THSC törzs  $\beta$ -1,3-glukanáz rendszerének 7 tagját azonosították laminarin-indukció révén.

#### **3.5.4.3. Cellulázok**

Mivel a *Trichoderma* fajok többsége szaprotróf életmódot folytat, így részt vesznek a cellulóz, hemicellulóz és kitin biopolimerek lebontásában is (Schuster és Schmoll, 2010). A *Trichoderma* fajok celluláz (EC 3.2.1.4.) termelését ezért elsősorban ipari jelentősége miatt tanulmányozzák nagyon széles körben (Kubicek és mtsai., 1990). Amíg a cellulóz  $\beta$ -1,4 kötéssel kapcsolódó glükóz egységekből épül fel, addig a hemicellulóz egy heteropolimer, amely különböző pentózokból és hexózokból épül fel. Ezek gyakran acetilálva is vannak és elágazásokat is tartalmaznak (Do Vale és mtsai., 2014). A cellulóz és hemicellulóz lebontásához számos extracelluláris enzim együttes hatására van szükség. A *Trichoderma* fajok rendelkeznek a lebontáshoz szükséges összes enzimmal. A legjelentősebb celluláztermelő fajok a *T. reesei*, amely rendkívüli gazdasági jelentőséggel rendelkezik. Az általa termelt cellulázokat felhasználják az élelmiszeriparban (Galante és mtsai., 1998b), a textiliparban (Galante és mtsai., 1998a), papírgyártás során (Buchert és mtsai., 1998), valamint bioüzemanyag gyártásához is (Seiboth és mtsai., 2011). Mindezek mellett egyes jó celluláztermelő képességgel rendelkező *Trichoderma* törzsek az aratást követően a talajba történő kijuttatásuk esetén segíthetik a növényi szármadaradványok lebomlását is Khan és Amin (2012).

A *Trichoderma* fajok cellulázai az Oomycota törzsbe tartozó *Pythium* fajokkal szembeni mikoparazitizmus során is fontos szerepet játszanak a gazdagomba hifájába történő penetrációban (Benhamou és Chet, 1997).

#### **3.5.4.4. Proteázok**

Egyéb sejtfalbontó enzimek kisebb polimereket és fehérjéket hidrolizálnak, melyek végső soron hozzájárulnak a gazdagomba sejtfalának teljes széteséséhez. Flores és munkatársai (1997) egy THSC törzs biokontroll aktivitásának emelkedését mutatták ki egy proteináz fehérje túltermeltetése következtében, így igazolva a proteázok szerepét a gazdagomba sejtfalában található fehérjekomponensek lebontásában Szekeres és mtsai., 2004).

### 3.5.5. Antibiózis, a másodlagos anyagcseretermékek szerepe a biológiai védekezésben

A másodlagos anyagcseretermékek („*secondary metabolites*”, SM) kisméretű szerves molekulák, melyek jelenléte nem létszükséglet az organizmus növekedéséhez, fejlődéséhez és szaporodásához. Specifikus körülmények között azonban fontos szerepet töltenek be különféle jelátviteli utakban és szükségesek az egyéb mikroorganizmusokkal való kapcsolatok kialakításához. Ennél fogva a biokontroll folyamatok során betöltött szerepük vizsgálata nagy jelentőséggel bír. Ismeretes, hogy a *Trichoderma* fajok számos kis molekulatömegű, apoláros másodlagos metabolitot (pl. pironokat, terpenoidokat, szteroidokat és poliketideket) képesek termelni. A *Trichoderma* fajok képesek sziderofórok termelésére is, és nagy számban különféle peptidokat is előállítanak, amelyek rendhagyó aminosavakban gazdag, nem riboszómális fehérjeszintézis útján szintetizálódó metabolitok (Degenkolb és mtsai., 2006).

### 3.6. A lakkáz enzim előfordulása, hasznosítási lehetőségei

A lakkázok (EC 1.10.3.2, benzéndiol: oxigén oxido-reduktázok) polifenol-oxidázok, melyeket '*multicopper oxidase*'-nek is neveznek, mivel 4 rézatomot tartalmaznak. A lakkázok széles körben elterjedtek a magasabbrendű növényekben, valamint a rovarok és baktériumok körében is, de különféle gombák által termelt lakkázokat is azonosítottak (Gianfreda és mtsai., 1999). Az eddig legtöbbet vizsgált, gombák által termelt lakkázokat a fehérkorhasztó gombákból tisztították (Kiiskinen és mtsai., 2004). A gomba-lakkázok szerepet játszhatnak a növényekkel szembeni patogenitásban, a pigmenttermelésben és a lignocellulóz lebontásában (Thurston, 1994; Gianfreda és mtsai., 1999).

A lakkázok számos szubsztrátot képesek hasznosítani, ezért a különböző iparágak nagy érdeklődést mutatnak irántuk. Alkalmask lehetnek a textilfestékek fehérítésére, a papírgyártás során pedig a lignocellulóz lebontására. Felhasználhatók továbbá bioszenzorokban, detoxifikációs és bioremediációs folyamatokban is (Gianfreda és mtsai., 1999; Xu, 1999)

#### 3.6.1. A *Trichoderma* fajok lakkáztermelése

Kutatások bizonyították a *Trichoderma* fajok (*T. atroviride*, THSC) lakkáztermelését, melyet a zöld pigment termelésével hoztak összefüggésbe (Hölker és mtsai., 2002; Sadhasivam és mtsai., 2008; Chakroun és mtsai., 2010). Két talajmintából származó törzs, egy *T. viride* és egy *T. reesei* esetében is kimutatták a lakkáztermelést, a

két törzs molekuláris azonosítása azonban még nem történt meg (Gochev és Krastanov, 2007; Krastanov és mtsai., 2007). Mindezen munkák ellenére is csak igen kevés tanulmány foglalkozik a *Trichoderma* törzsek által termelt lakkázokkal.

### **3.7. A különféle fungicidek és azok csoportosítása hatásmechanizmusuk alapján**

A növénypatogén gombákkal szembeni lehetséges védekezési stratégiák közé tartozik a kémiai védekezés, ahogy ez már a 3.3.2.-es fejezetben is említésre került. A kémiai védekezés különböző fungicidek révén valósítható meg. A fungicidekkel történő védekezés kulcsfontosságú szerepet játszik a különféle növénykórokozókkal szembeni integrált növényvédelemben. Használatuk során a rezisztencia megjelenése fontos korlátozó tényezővé vált a fungicidek hatékonyságát és használhatóságának időtartamát figyelembevéve, így az újabb és újabb fungicidek kifejlesztése egyre magasabb költségekkel jár (Ma és Michailides, 2005). Megoldást nyújthat azonban az egyes biokontroll ágensek és a csökkentett mennyiségű fungicidek együttes alkalmazása az integrált növényvédelem keretein belül (Monte, 2001).

A különböző fungicideket hatásmechanizmusuk alapján csoportosíthatjuk, így megkülönböztethetünk kontakthatású és szisztémás hatású fungicideket.

A kontakthatású szerek közé tartoznak a réz-, és kénvegyületek, valamint a ditiokarbamát származékok (mankozeb, maneb, tirám), továbbá különböző ftálimid-származékok is, mint pl. a folpet és a kaptán, melyek a sejtlégzés gátlására képesek (Siegel, 1971).

A szisztémás hatású fungicidek közé soroljuk a dikarboximid fungicideket, például az iprodiont, amely a gombák DNS-szintézisének gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat (Pappas és Fisher, 1979).

Egy másik, nagy csoportot alkotnak a benzimidazolok, melyek közé sorolható a benomil, a karbendazim és a tiofanát-metil. Hatásmechanizmusukról megállapították, hogy a tubulin szintézisének gátlására képesek (Davidse, 1973).

Újabb nagy csoportot alkotnak a szterol-bioszintézis gátlói, ezeken belül megkülönböztetjük a szterol-C14-demetiláz inhibitorokat, melyeket az angol elnevezésük alapján DMI-fungicideknek neveznek. Legfőbb képviselőik az azolok, mint a triazol, imidazol és a pirimidin fungicidek (Russell, 1995). A különféle morfolinszármazékokkal (spiroxamin) a  $\Delta 8$ - $\Delta 7$  izomeráz és a  $\Delta 14$  reduktáz gátlása lehetséges (Russell, 1995).



### 3.8. A növények növekedésének és fejlődésének serkentése és ennek mechanizmusai

Évekkel ezelőtt még tartotta magát az a nézet, miszerint a *Trichoderma* fajok növény-növekedést serkentő hatásukat a csekély veszélyt jelentő növény-patogén gombák elpusztításán keresztül érik el. Ez a felvetés azt sugallta, hogy a nem steril környezetben lévő növények mindegyike szenved valamilyen mértékű fertőzéstől, így maximális növekedési potenciáljukat csak abban az esetben tudják elérni, ha a *Trichoderma* elnyomja a növény-patogén gomba által okozott negatív hatást, ezáltal növény-növekedést serkentő hatást kifejtve (Stewart és Hill, 2014). A kórokozók gátlása azonban nem lehet az egyedüli magyarázat, mivel a *Trichoderma* fajok hatása steril illetve félsteril körülmények között, hátrányos talajmikroflóra nélkül is érvényesül. Azóta számos egyéb mechanizmus szerepe került előtérbe a *Trichoderma* fajok növény-növekedést serkentő hatása kapcsán, többek között a növényi hormonok szintézise, vitaminok termelése, a talajban található tápanyagok szolubilizálása, a gyökérszövet fejlődésének erősítése, valamint a fotoszintézis és a növények védekező rendszerének fokozása (Harman, 2000, 2006; Harman és mtsai., 2004a; Inbar és mtsai., 1994). Valószínű, hogy az egyes *Trichoderma* törzsek ezen tulajdonságok közül egy, vagy akár több mechanizmus együtműködése révén fejtik ki pozitív hatásukat. A THSC T-22 irányította növény-növekedés-serkentést megfigyelték pl. üvegházi, valamint szabadföldi kísérletek során is, melynek hátterében a már említett tulajdonságok állhatnak. Fontos mechanizmus a gyökerek gyorsabb fejlődésének elősegítése is, ami növeli a növények szárazsággal szembeni ellenállóképességét (Altomare és mtsai., 2000; Harman, 1999; Harman és mtsai., 2004b; Mastouri és mtsai., 2010).

#### 3.8.1. Rizoszféra-kompetencia

A növények növekedésének serkentése kapcsán meg kell említeni a *Trichoderma* törzsek rizoszféra-kompetenciáját. A rizoszféra, mint élőhely általánosnak tekinthető a *Trichoderma* törzsek esetében, ezen az élőhelyen lehetőségük van mind biotróf, mind szaprotróf életmód kialakítására. Mindezeket alátámasztja az a vizsgálat, melynek során nagyon nagy számban és változatosságban izoláltak *Trichoderma* törzseket egy etiópiai kávéültetvény kávé-növényeinek (*Coffea arabica*) rizoszférájából (Mulaw és mtsai., 2010). Ezzel ellentétben, egy olaszországi tanulmány során a nem rizoszféra-jellegű talajminták vizsgálatakor kevés *Trichoderma* fajt izoláltak (Migheli és mtsai., 2009).

A *Trichoderma* fajok rizoszférához mutatott affinitását két okkal is magyarázhatjuk. Az első lehetséges magyarázat, hogy a szárazföldi növények 92%-ának



hogy lehetővé tegyék a gazdagombák által lebontott növényi részekből felszabaduló poliszacharidok lebontását (Druzhinina és mtsai., 2011).

A növények által a rizoszférába kiválasztott mono-, és diszacharidok fontos szénforrást jelentenek a mikorrhizaalkotó gombák számára (Nehls és mtsai., 2010), melyek közül a szacharóznak további szerepe van a rizoszféra *T. virens* általi kolonizációjában (Vargas és mtsai., 2009) (**2. ábra**). A *T. virens* ugyanis specifikus szacharóz-transzporterrel rendelkezik, mely a gyökér kolonizációjának kezdetén indukálódik, és nagyfokú hasonlóságot mutat a növények szacharóz-transzportereivel (Vargas és mtsai., 2011). Mindez arra utal, hogy a szacharóz aktívan juthat el a növénytől a gombáig.

### **3.8.2. A gyökér kolonizációja**

Egyes *Trichoderma* törzsek a gyökér kolonizációjára is képesek, melynek során a gyökér epidermiszén átjutva intracelluláris növekedést mutatnak. A gyökér epidermisze, a kortex, illetve az edénnyalábok ugyanakkor változatlanok maradnak. A gyökér kolonizációja kallóz és cellulóz felhalmozódása révén a környező sejtekben a sejtfal megvastagodását váltja ki. Mindemellett fenolos vegyületek is termelődnek, amelyek peroxidáz-irányította keresztkötések révén még nagyobb stabilitást eredményeznek a sejtfalban. A sejtfal ily módon történő módosítása meggátolja, hogy a gomba a gyökér mélyebb sejtrétegeibe is eljusson (Yedidia és mtsai., 1999).

A gyökér kolonizációja során a *Trichoderma*-nak együtt kell működnie a növény védekező rendszerével, mely különféle antimikrobiális vegyületeket (fitoalexinek) termel. A sikeres *Trichoderma*-növény kapcsolat maga után vonja a gomba detoxifikáló és védekező rendszerének aktiválását (**2. ábra**). Ebből adódóan a gombának hatásos rendszerrel kell rendelkeznie, hogy az őt károsító vegyületeket el tudja távolítani. Ruocco és munkatársai (2009) *T. atroviride*-ben azonosították a TAABC2 ABC-transzportert, mely különböző környezeti feltételek mellett is segítette a sikeres kolonizációt.

### **3.8.3. Az ásványi anyagok szolubilizálása, tápanyagfelvétel növelése**

A talaj tápanyagtartalma fontos tényező, mely jelentős hatással van a növény-növekedést serkentő gombák növekedésére és aktivitására. Ennek a serkentő hatásnak a mértéke a tápanyagban szegény talajok esetében rendelkezik a legnagyobb jelentőséggel. A nitrogénről tudjuk, hogy nélkülözhetetlen a növények fejlődéséhez és a maximális terméshozam eléréséhez. Harman és Björkman (1998) THSC T22 törzsével történő kukoricakezelést követően megállapították, hogy a kezelt növények nagyobbak és

zöldebbek voltak a kontroll növényeknél. Az intenzívebb növekedést a fokozottabb tápanyagfelvételnek tulajdonították, és munkájuk során kimutatták, hogy a THSC T22-es törzsével kezelt kukoricának 40%-al kevesebb műtrágyára volt szüksége a kezeletlen növényekhez képest. Mivel számos országban a műtrágyák alkalmazására korlátozásokat léptettek életbe, így a *Trichoderma* törzsek alkalmazása jó alternatív megoldást nyújthat a gazdáknak a megfelelő terméshozam fenntartásában (Stewart és Hill, 2014). A T22-es törzsről szintén megállapították, hogy szerepet játszik különféle tápanyagok szolubilizálásában, a növények számára felvehető formájúvá alakításában. Ezek között megtalálható a foszfát („rock phosphate”), a  $\text{Fe}^{3+}$ , a  $\text{Cu}^{2+}$ , a  $\text{Mn}^{4+}$  és a  $\text{Zn}^{0+}$  (Altomare és mtsai., 2000; Harman és mtsai., 2004b).

#### **3.8.4. A klorofilltartalom és a fotoszintetikus aktivitás fokozása**

Az Inbar és munkatársai (1994) által a THSC T203-as törzsével elvégzett üvegházi kísérletek során a száraztömeg növekedésével párhuzamosan megfigyelték a levélfelület növekedését, valamint a klorofilltartalom emelkedését is. A kezelések hatására javult a kísérletben szereplő uborka- és paprikanövények általános állapota is, annak ellenére, hogy a rendelkezésre álló tápanyagokban (nitrogén, foszfor és kálium) nem volt különbség (Harman és Björkman, 2005). Hasonló eredményeket értek el a T22-es törzzsel kukorica esetében is, így arra a következtetésre jutottak, hogy a kezelések hatására a növények fotoszintetikus aktivitása fokozódott (Harman, 2000).

#### **3.8.5. Az abiotikus stresszhatások mértékének csökkentése**

Számos *Trichoderma* törzsről megállapították, hogy képesek egyes növények azon gyökereinek a számát megnövelni, melyek a talajfelszíntől számított 1 méteres mélységet is eléri. Ezen gyökerek segítségével a növények hatékonyabb vízfelvételi képességre tesznek szert, így a szárazsággal szemben is nő az ellenállóképességük (Harman, 2012). A *Trichoderma* törzsek által történő gyökérkolonizáció késlelteti a szárazság hatására bekövetkező káros változások hatását is, melyek érintik például a sztóma-konduktanciát, a zöld fluoreszcencia-emissziót, valamint a fotoszintézist is, így összességében javítják a növények vízháztartását (Bae és mtsai., 2009).

#### **3.8.6. Másodlagos metabolitok termelése**

A növények növekedésének vizsgálata során Windham és munkatársai (1986) a talaj sterilizálását követően annak THSC és *T. koningii* törzsekkel történő beoltását

hajtották végre. Kutatásaik során paradicsom- és dohánynövényeket vizsgáltak, és a 8. hetet követően a gyökér és a hajtás száraztömegében 313%-os illetve 318%-os növekedést tapasztaltak. Kísérleteiket később megismételték úgy, hogy a csírázó magokat a *Trichoderma* törzsektől egy réteg celofán választotta el, a *Trichoderma* törzsek csírázást segítő hatását azonban így is sikerült kimutatniuk. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy diffuzibilis növekedést segítő faktornak vagy faktoroknak kell jelen lenniük, melyek másodlagos anyagcseretermékek és növényi hormonok lehetnek (**2. ábra**). Cutler és munkatársai (1986, 1989) további, a *Trichoderma* fajok másodlagos metabolitjainak növény-növekedést serkentő hatásait érintő vizsgálatokat végeztek, melynek során *T. koningii*-ből izolálták a koningin A-t, THSC-ből pedig a 6-pentil-alfa-piron-t.

### 3.8.7. Növényi hormonok bioszintézisének fokozása

Az utóbbi években számos tanulmány vizsgálta a növényi hormonok jelenlétét a mikrobák által kiváltott növény-növekedés-serkentés folyamata során. A növényi hormonok szerepének vizsgálata két irányból is zajlott: tanulmányozták, hogy a mikroba saját maga is képes-e növényi hormon megtermelésére, vagy valamilyen alternatív úton serkenti egyes növényi hormonok termelését (Sofó és mtsai., 2011). A *Trichoderma* törzsek által indukált növény-növekedés serkentés esetében mindkét útvonalat valószínűsíteni lehetett.

Sofó és munkatársai (2011) cseresznyét vizsgálva igazolták a THSC T22-es törzs növény-növekedést serkentő hatását, de a növényi hormon tápközegből történő azonosításával nem jártak sikerrel. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és tömegspektrometriai analízis segítségével azonban mind a gyökérben, mind a hajtásban sikerült kimutatniuk az auxinok közül az IES és a gibberelinsav szintjének megemelkedését (**2. ábra**).

Gravel és munkatársai (2007) hidropóniás körülmények között tanulmányozták egy *T. atroviride* törzs paradicsompalántákra kifejtett növekedésserkentő hatását. A tápközeget L-triptofánnal kiegészítve azt tapasztalták, hogy a triptofán koncentrációjának emelésekor a törzs növekedésserkentő hatása is fokozódott. Mindez arra utal, hogy a vizsgált *Trichoderma* törzs egy triptofánfüggő útvonalon képes az indolecetsav szintézisére.

#### 4. CÉLKITŰZÉSEK

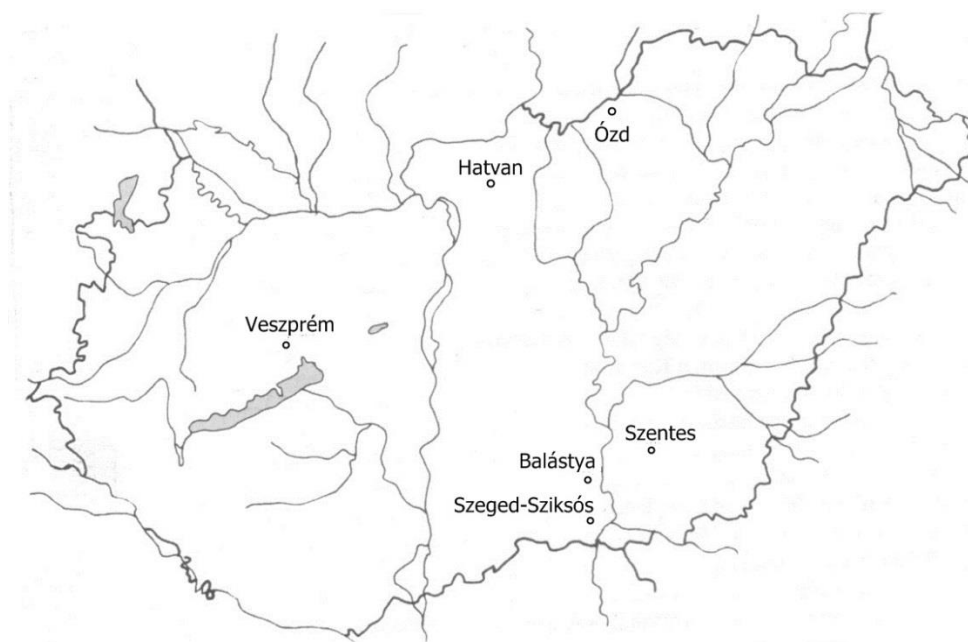
Munkánk során célul tűztük ki

1. *Trichoderma* törzsek izolálását Magyarországon termesztett zöldségek rizoszférájából, és molekuláris módszerekkel történő azonosítását,
2. *in vitro* antagonista képességeik felmérését különféle növénypatogén gombákkal szemben agar-konfrontációs tesztekben,
3. különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, pH, vízaktivitás) micéliumnövekedésre gyakorolt hatásának vizsgálatát,
4. cellulózbontó és foszfátmobilizáló, valamint lakkáz enzim termelésére való képességük vizsgálatát,
5. különféle fungicidekkel szembeni érzékenyséjük vizsgálatát,
6. növény-növekedés serkentésére való képességük vizsgálatát, valamint
7. növényvédő és növény-növekedést serkentő bioeffektor *Trichoderma* törzsek szelektálását gyakorlati alkalmazás céljára.

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1. Mintavételezés, mintavételi helyek

A termesztett zöldségek mintavételezését 6 magyarországi település – Balástya, Hatvan, Ózd, Szeged-Sziksós, Szentes és Veszprém – háztáji gazdaságaiban végeztük el egyszeri alkalommal 2011. augusztusa és szeptembere között (**3. ábra**). A mintavételezés során 3-3 paprika-, paradicsom-, répa-, saláta-, spenót-, tök-, karalábé-, petrezselyem- és zellernövény került begyűjtésre. A zöldségek gyűjtése során azokat a talajból frissen felszedve steril mintavevő zacskókban helyeztük el, majd a feldolgozásig 4 °C-on tároltuk.



**3. ábra.** Mintavételezési helyek Magyarországon

### 5.2. *Trichoderma* törzsek izolálása és azonosítása

#### 5.2.1. *Trichoderma* törzsek izolálása a zöldségrizoszféra-mintákból

A termesztett zöldségek rizoszféra-mintáinak feldolgozása során a *Trichoderma* törzsek izolálását Bengál-Rózsa (0,5% pepton, 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% glükóz, 0,05%  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 2% agar majd sterilizálás után 0,5 ml/l 0,2%-os diklorán etanolos oldata, 0,25 ml/l 5%-os Bengál-rózsa vizes oldata, 0,01% oxitetraciklin, 0,01% sztreptomicin, 0,01% klóramfenikol) táptalajon végeztük el. A steril mintavevő zacskókban található zöldségek gyökerének felszínéről steril csipesz és szike segítségével történt a minták táptalajra helyezése. 5 napos, 25 °C-on történő inkubációt követően a megjelenő *Trichoderma* telepeket élesztő-glükóz (YEG) (0,5% glükóz, 0,5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1% élesztőkivonat, 2%

agar) táptalajra oltottuk át tiszta tenyészetek készítése céljából. Csíkhúzásos módszer segítségével tiszta tenyészeteket készítettünk, fenntartásukat élesztő-glükózos táptalajon végeztük. Az izolált törzseket a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteményben ([www.szmc.hu](http://www.szmc.hu)) helyeztük el.

### 5.2.2. Genomi DNS kivonása az izolált *Trichoderma* törzsekből

A DNS-minták izolálásához a *Trichoderma* törzseket 25 ml YEG tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikokba oltottuk le. 5 nap inkubációt (25 °C, 180 rpm) követően a folyadéktenyészetekből a micéliumot szűrőtölcsér és vákuumpumpa segítségével elkülönítettük a tápoldattól. Az egyes törzsek micéliumait egy éjszakán át fagyasztva szárítottuk, majd dörzsmozsárban folyékony nitrogén segítségével porítottuk. Az így kapott porított micéliumokat használtuk fel a DNS izolálásához, amit az E.Z.N.A.<sup>®</sup> Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-tek) segítségével végeztünk el a gyártó utasításainak megfelelően.

### 5.2.3. Az izolált *Trichoderma* törzsek azonosítása

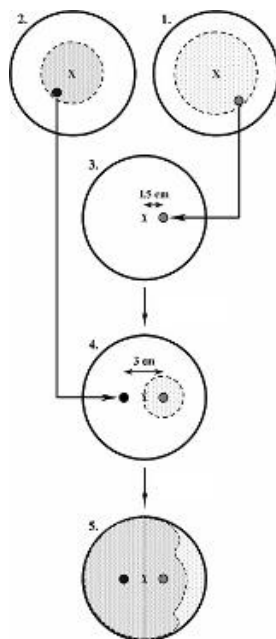
A *Trichoderma* izolátumok azonosításához polimeráz láncreakciót (PCR) végeztünk ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') és ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') indítószekvenciák felhasználásával (Naeimi és mtsai. 2011). A PCR-elegyek összetétele a következő volt (25 µl-re): 2,5 µl 10x *Taq*-polimeráz puffer (Fermentas), 5 µl dNTP mix (2 mM, Fermentas), 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Fermentas), 0,5 – 0,5 µl primer (10 µM) és 0,25 µl *Taq*-polimeráz (5 U/µl, Fermentas) enzim. A felszaporításhoz T3 Thermocycler készüléket (Biometra) használtunk a következő hőmérsékleti profil beállításával: 94 °C 5 perc, melyet 35 ciklus – 94 °C 30 sec, 48 °C 40 sec, 72 °C 1 perc követett, majd zárásként 3 perc 72 °C-on. A PCR-fragmentumok szekvenciájának meghatározásához külső szolgáltatást vettünk igénybe, melyet az ITS-szekvenciák alapján az „*International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*” internetes honlapján ([www.isth.info](http://www.isth.info)) elérhető, vonalkódokon (*barcoding*) alapuló *TrichO*KEY 2.0 (<http://www.isth.info/tools/molkey/>) program segítségével történő azonosítás követett (Druzhinina et al. 2005). Amennyiben a törzsazonosítás nem volt lehetséges a program használatával, akkor a *Tricho*BLAST (<http://www.isth.info/tools/blast/>) (Kopchinskiy és mtsai., 2005) vagy az NCBI (National Center for Biotechnology Information) honlapon elérhető BLASTN



(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) homológia keresés (Zhang és mtsai., 2000) segítségével végeztük a törzsek azonosítását.

### 5.3. Agar-konfrontációs teszt

A vizsgált *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonista képességeinek felmérése céljából agar-konfrontációs tesztek végeztünk (Szekeres és mtsai. 2006). A tesztek 9 növénypatogén gombával, köztük 4 *Fusarium solani* fajkomplexumba (FSSC) tartozó törzssel (SZMC 11057F, SZMC 11064F, SZMC 11067F és SZMC 11070F), egy *F. oxysporum* fajkomplexumba (FOSC) tartozó törzssel (SZMC 6237J), és egy-egy *Alternaria alternata* (SZMC 16085), *Phoma cucurbitacearum* (SZMC 16088), *Botrytis cinerea* (SZMC 6244J) és *Rhizoctonia solani* (SZMC 6252J) törzssel végeztük el. Az agar-konfrontációs tesztek 3 párhuzamosban végeztük MEA táptalajon (1% glükóz, 0,5% élesztőkivonat, 0,4%-os maláta kivonat, 2% agar). A tesztekhez 9 cm átmérőjű Petri-csészéket használtunk úgy, hogy a Petri-csészék középpontjától 1,5 – 1,5 cm távolságra két pontot rajzoltunk, így meghatároztuk a *Trichoderma* törzsek, valamint a vizsgált növénypatogén gombák leoltása között lévő távolságot, mely minden esetben 3 cm volt. A leoltást mindig a növénypatogén gombával végeztük el elsőnek, azok fiatal tenyészeiből dugófúróval vágott, 5 mm átmérőjű agarkorongokkal (4. ábra). Két nappal később a *Trichoderma* törzsek kerültek leoltásra hasonlóan 5 mm átmérőjű agarkorongokkal, 1,5 cm távolságra a csésze közepétől. Hét napos, 25 °C-on történt inkubációt követően a Petri-csészékről Nikon Coolpix P7700 digitális fényképezőgép segítségével 18 cm-es távolságból felvételeket készítettünk. Ezt követően a digitális fényképeket átméreteztük az Irfan View v4.30 szoftver segítségével, majd a felvételek alapján a Scion Image v4.02 szoftver segítségével meghatároztuk a *Trichoderma* törzsek által elfoglalt terület, valamint a *Trichoderma* és a növénypatogén gomba által együttesen elfoglalt terület nagyságát. Ezután Microsoft Excel 2010 szoftver felhasználásával meghatároztuk a Biokontroll Index (BCI) értékeket a következő képlet alapján: (*Trichoderma* törzs által elfoglalt terület / *Trichoderma* törzs és a növénypatogén gomba által együttesen elfoglalt terület) × 100.



**4. ábra.** A biokontroll index (BCI) értékek meghatározása során alkalmazott leoltási séma

1) a növénypatogén gomba telepe MEA táptalajon; 2) a tesztelt *Trichoderma* törzs telepe MEA táptalajon; 3) a növénypatogén gomba 5 mm átmérőjű agarkoronggal történő leoltása a konfrontációs csészére; 4) a tesztelt *Trichoderma* törzs 5 mm átmérőjű agarkoronggal történő leoltása a konfrontációs csészére 48 órával a növénypatogén gomba leoltása után; 5) konfrontációs csészék 7 nap inkubáció után (Szekeres és mtsai. 2006 nyomán).

#### 5.4. Különböző környezeti paraméterek hatása a micéliumnövekedésre

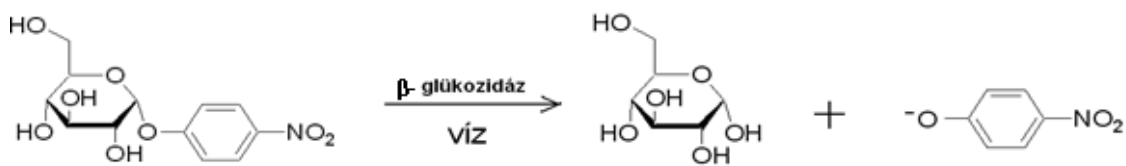
Különböző környezeti paraméterek (hőmérséklet-, pH-, és vízaktivitás) vizsgálata YEG táptalaj felhasználásával történt. A kísérleteket 3 párhuzamosban végeztük, melyek során a *Trichoderma* törzsek leoltása 5 mm átmérőjű agarkorongokkal történt 9 cm átmérőjű Petri-csészék középpontjába. A *Trichoderma* törzsek telepátmérőjének növekedését az inkubációs idő alatt naponta mértük vonalzó segítségével.

A hőmérséklet hatásának vizsgálata során 8 különböző értéket (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 és 40 °C) állítottunk be. A pH hatásának vizsgálatát 7 különböző pH-értéken (pH 2,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) végeztük, melyeket McIlvain pufferoldatok (A törzsoldat: 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; B törzsoldat: 0,1 M citromsav  $\times \text{H}_2\text{O}$ ) felhasználásával állítottuk be. Ebben az esetben a megfelelő pH-val rendelkező oldatokat, valamint a YEG táptalajt is kétszeres töménységben készítettük el, melyek a sterilizálást követő összeöntés során hígultak ki a végső koncentráció-értékekre.

A vízaktivitás ( $a_w$ ) értékek beállításához a YEG táptalajt 0%, 1%, 3%, 5%, 6%, 8%, 9% és 12% NaCl-dal egészítettük ki. A különböző NaCl koncentrációk az alábbi  $a_w$  értékeknek felelnek meg: 0,997, 0,991, 0,980, 0,968, 0,962, 0,951, 0,945 és 0,922 (Chirife és Resnik, 1984).

## 5.5. A *Trichoderma* törzsek cellulózbontó és foszfátmobilizáló képességének vizsgálata

A cellulózbontó és foszfátmobilizáló képességek vizsgálatát szintetikus minimál (1% glükóz, 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,01%  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) és kukoricaszár-őrleményt tartalmazó (0,2% kukoricaszár-őrlemény, 0,1%  $\text{NaNO}_3$ ) tápoldatok felhasználásával végeztük. A minimál tápoldatot  $2 \times 10^5$  konídiummal, míg a kukoricaszár-tartalmazó tápoldatot minimál tápoldatban 5 napig előnevelt, majd Büchner-tölcsérben szűrőpapír segítségével a fermentlétől elválasztott, steril desztillált vízzel átmosott *Trichoderma* micéliummal oltottuk le, majd 5 napig történő rázatás (180 rpm, 25 °C) után kromogén paranitrofenil szubsztrátokkal mértük az enzimaktivitásokat. A cellulózbontó képességet a cellobiohidroláz és  $\beta$ -glükozidáz enzimek aktivitásának mérésével vizsgáltuk paranitrofenil- $\beta$ -D-cellobiozid és paranitrofenil- $\beta$ -D-glükopiranozid szubsztrátokkal, a foszfátmobilizáló képességet pedig paranitrofenil-foszfát szubsztráttal. Ezekről a szubsztrátokról enzimaktivitás esetén lehasad a paranitrofenol sárga színreakciót eredményezve, melynek intenzitása arányos a jelen lévő enzim mennyiségével (**5. ábra**). A mikrotiterlap megfelelő mintahelyeire 100  $\mu\text{l}$  fermentléhez 100  $\mu\text{l}$  1 mg/ml koncentrációjú szubsztrátoldatot adtunk, majd a lemezeket 1 órán keresztül, 25 °C-on inkubáltuk. Az inkubáció letelte után a reakciókat 50  $\mu\text{l}$  10%-os  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oldat hozzáadásával állítottuk le. A minták optikai denzitását SPECTROstar<sup>nano</sup> mikrotiterlap-leolvasó segítségével mértük 405 nm-es hullámhosszon ( $\text{OD}_{405}$ ), három párhuzamosban. Kontrollként a tápoldatokból a leoltás időpontjában vett mintákat alkalmaztuk.



**5. ábra.** A p-nitrofenil típusú kromogén szubsztrátok működési elve.

A  $\beta$ -glükozidáz enzim működési elve megegyezik a vizsgálatainkban szereplő többi szubsztrátéval.

## 5.6. A *Trichoderma* törzsek által termelt lakkáz enzimek vizsgálata

### 5.6.1. A *Trichoderma* törzsek lakkáz enzimeinek kvalitatív vizsgálata

A 45 *Trichoderma* izolátum lakkáz enzimek termelésére való képességét ABTS [2,2'-azinobisz-(3-etilbenztiazolin-6-szulfonát)] vagy gvajakol (Sigma-Aldrich) szubsztrátot tartalmazó szelektív táptalajokon (0,1% glükóz, 0,1% élesztőkivonat, 0,02%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,04%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2% agar, 0,0004% digitonin + 0,05% ABTS vagy 800  $\mu\text{l}$

gvajakol) végeztük el. A lakkáz enzimek termelését az egyes szubsztrátoknak megfelelő színreakciók jelezték. Az ABTS szubsztrát esetében a termelő *Trichoderma* törzsek telepei körül kék csapadék jelenik meg, míg a gvajakol esetében ez a csapadék vöröses-barnás színű. A kísérlethez használt szelektív táptalajt ezen felül még digitoninnal egészítettük ki, amely a *Trichoderma* törzsek gyors növekedését gátolja, így lehetőségünk nyílt egy Petri-csészén több izolátum vizsgálatára.

#### **5.6.2. A *Trichoderma* törzsek lakkáz-termelésének kvantitatív vizsgálata**

A lakkáz enzimek termelődését rázatott tenyésztéssel vizsgáltuk 30 ml MEA tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer-lombikokban. A lombikokat *Trichoderma* konídiumok szuszpenziójával  $2 \times 10^6$ /ml végkoncentrációra oltottuk le. A 4 napos, 25 °C-on történő inkubáció (180 rpm) alatt 24 óránként 1-1 ml mintát vettünk a tápoldatokból, melyet centrifugálással ülepítettünk (10000 rpm, 5 perc). Az enzimmérésekig a mintákat -20 °C-on tároltuk. A méréseket a sejtmentes felülúszókból készített 10× hígítású oldatokkal végeztük mikrotiterlapon, 3 párhuzamosban, melynek során 100 µl fermentléhez 100 µl 25 mM szukcinát pufferben (A törzsoldat: 0,2 M borostyánkősav, B törzsoldat: 0,2 M NaOH, pH=3,5) felvett 5 mM ABTS szubsztrátoldatot adtunk. A mérésekhez kontrollként 100 µl MEA tápoldathoz mértünk 100 µl szubsztrátoldatot. Az optikai denzitást 25 °C-on történő 12 órás inkubációt követően SPECTROstar<sup>nano</sup> mikrotiterlap leolvasó segítségével mértük 436 nm-en.

#### **5.6.3. *Trichoderma* törzsek által termelt lakkázok pH-függésének vizsgálata**

A szekretált lakkázok pH-függésének megállapításához szintén a sejtmentes felülúszók 10×-es hígításait használtuk fel. 25 mM-os szukcinát-puffer segítségével 5 különböző pH értéket (3,5, 4, 5, 6, 6,5) állítottunk be. Az enzim mérés 5 mM-os ABTS szubsztrát alkalmazásával történt az 5.6.2. fejezetben leírtak szerint.

#### **5.7. Különböző fungicidek minimális gátló koncentráció (MIC) értékeinek meghatározása**

A *Trichoderma* törzsek fungicidekkel szembeni érzékenységének vizsgálatát mikrodilúciós módszer segítségével végeztük 3 párhuzamosban, 96 lyukú mikrotiterlapokon. Kísérleteink során 14 fungicidet (karboxin, ciprokonazol, fenhexamid, fludioxonil, flutriafol, folpet, imazalil, iprodion, penkonazol, spiroxamin, tiofanát-metil, tiram, triadimefon és triadimenol, Pestanal<sup>®</sup> analitikai standard, Fluka) vizsgáltunk 256

$\mu\text{g/ml}$  és  $0,5 \mu\text{g/ml}$  közötti koncentrációtartományban. Az egyes fungicidekből  $1 - 1 \text{ mg-ot}$  először  $100 \mu\text{l}$  DMSO-ban oldottunk fel, majd ezt követően  $900 \mu\text{l}$  YEG-tápoldatot adtunk hozzá. Ezt követően a fungicid-oldatokból felező hígítási sorozatot készítettünk YEG tápoldatban. A leoltáshoz  $2 \times 10^5/\text{ml}$ -es koncentrációjú konídium-szuszpenziókat készítettünk törzsekből YEG-tápoldatban. A mikrotiterlap minden egyes mintahelyére  $100 \mu\text{l}$  konídium-szuszpenziót, valamint  $100 \mu\text{l}$  fungicid-oldatot mértünk az egyes hígítási lépcsőkből. Kontrollként  $100 \mu\text{l}$  YEG-tápoldathoz adott  $100 \mu\text{l}$  konídium-szuszpenziót használtunk. A minták optikai denzitását  $72 \text{ óra}$ ,  $25^\circ\text{C}$ -on történt inkubációt követően  $620 \text{ nm}$ -es hullámhosszon mértük SPECTROstar<sup>nano</sup> mikrotiterlap-leolvasó segítségével. A MIC-értékek meghatározása Microsoft Excel 2010 szoftver felhasználásával történt. A meghatározás során a  $72 \text{ óras}$  mérések eredményeiből levonásra kerültek a  $0. \text{ perc}$ ben mért eredmények. Az így kapott értékeket megszoroztuk százszal, majd elosztottuk a növekedési kontroll  $3$  párhuzamos mintájából meghatározott átlagértékekkel. Abban az esetben fogadtuk el a vizsgált fungicidek gátló hatását, amennyiben a *Trichoderma* törzsek növekedése nem haladta meg a  $20\%$ -ot a pozitív kontrollhoz viszonyítva, és a százalékos szórás (relatív standard deviáció, RSD%) kisebb volt, mint  $10\%$ .

## 5.8. Paradicsomnövényeken végzett kísérletek és mérések

### 5.8.1. Növénynevelés és a kísérleti elrendezés

Kísérleteink során *Solanum lycopersicum* Mill. L. cvar. Ailsa craig paradicsomnövényeket használtunk fel. A csíráztatás  $3 \text{ napon}$  keresztül sötétben,  $26^\circ\text{C}$ -on történt nedvesített szűrőpapíron. Ezt követően a növények  $6 \text{ hetes}$  korukig  $6 \times 6 \text{ cm}$  átmérőjű műanyag cserépben,  $50 \text{ g}$  tőzegalapú termesztőközegben (Terracult GmbH, Németország) növekedtek kontrollált körülmények között. A növényeket hetente kétszer tápoldattal locsoltuk, melynek összetétele a következő volt:  $2 \text{ mM Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $1 \text{ mM MgSO}_4$ ,  $0,5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,5 \text{ mM KCl}$  + mikroelemek: ( $10^{-6} \text{ M MnSO}_4$ ,  $5 \cdot 10^{-7} \text{ M ZnSO}_4$ ,  $10^{-7} \text{ M CuSO}_4$ ,  $10^{-7} \text{ M (NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ,  $10^{-5} \text{ M H}_3\text{BO}_4$ ),  $2 \cdot 10^{-5} \text{ M Fe-EDTA}$ , pH  $5,8$ ) (Poór és mtsai. 2011). A növényeket  $12 \text{ óras}$  nappali és  $12 \text{ óras}$  éjszakai periódus,  $300 \mu\text{W m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fényintenzitás (F36W/GRO fénycsövek, Sylvania, Németország),  $24/22^\circ\text{C}$  nappali/éjszakai hőmérséklet és  $55\text{-}60\%$ -os relatív páratartalom mellett neveltük. A növények *Trichoderma*-kezelése  $20 \mu\text{l}$ -es mennyiségű  $1 \times 10^6/\text{ml}$ -es koncentrációjú konídium-szuszpenzióval történt a három napos csírázást követően. A mérésekhez minden

esetben a felülről számított harmadik levélemeletről származó, kifejtett leveleket használtuk fel. A kísérleteket 9 és 18 óra között végeztük és 3-5 alkalommal ismételtük.

### **5.8.2. A paradicsomnövények biomassa-produkciójának a vizsgálata**

A gyökér-, és hajtáshossz-vizsgálatokhoz először csapvíz alatt történő mosással eltávolítottuk a termesztőközeget, majd a felesleges víz leitatása után mérőszalag segítségével megmértük a hosszadatokat. Ezt követően mérleg segítségével meghatároztuk a frisstömegeket mind a gyökér, mind pedig a hajtás esetében.

### **5.8.3. A sztómakonduktancia és a CO<sub>2</sub>-asszimiláció meghatározása**

A sztómakonduktanciát és a CO<sub>2</sub>-asszimilációt hordozható fotoszintézismérő rendszerrel (LI-6400, Lincoln, Nebraska, USA) és a hozzá kapcsolt infravörös gázanalizátor segítségével határoztuk meg. A kamrában a mérés során mindvégig standard körülményeket biztosítottunk (25 °C, 65±10% nedvességtartalmú levegő, 500 μM m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> levegőáramlási sebesség, 300 μM m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitás). A méréseket 400 μM M<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>-koncentráción végeztük, miután a leveleken 15 perces fényadaptációt hajtottunk végre (Poór és mtsai., 2011).

### **5.8.4. A klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereinek meghatározása**

Az intakt levelekben a klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereit hordozható fotoszintézismérő rendszerrel (LI-6400, Lincoln, Nebraska, USA) határoztuk meg. A mérőkamrában a mérés során mindvégig standard körülményeket biztosítottunk (25 °C, 65±10% nedvességtartalmú, 400 μM M<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>-tartalmú levegő, 500 μM m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> levegőáramlási sebesség).

A mérések során a leveleken 15 perces sötétadaptációt végeztünk, majd a beállított paraméterekkel (aktinikus fény: 300 μM m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) elindítottuk a mérést (Poór és mtsai., 2011).

A mért klorofill *a* fluoreszcencia-értékekből (F<sub>m</sub>, F<sub>o</sub>, F<sub>v</sub>, F<sub>s</sub>, F<sub>m</sub>', F<sub>o</sub>') a következő paramétereket határoztuk meg (Roháček, 2002):

1. F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, ami megadja a második fotokémiai rendszer maximális kvantumhasznosítását, azaz a reakciócentrumok által begyűjtött összes energia fotokémiai folyamatokra fordítható részét.

2. A második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosítását ( $\Phi_{PSII} = (F_m' - F)/F_m'$ ), ami a teljes energiának az éppen nyitott reakciócentrumokban fotokémiai munkavégzésre felhasznált része (Genty és mtsai., 1989).
3. A fotokémiai kioltási paramétert ( $q_P$ ), azaz  $q_P = (F_m' - F_t)/(F_m' - F_o')$  (Bilger és Schreiber, 1986).
4. A nem fotokémiai kioltást (NPQ), azaz  $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$  (Bilger és Björkman, 1990)

#### 5.8.5. A fotoszintetikus pigmenttartalmak meghatározása

A klorofill és a karotinoid pigmenttartalmak meghatározásánál Lichtenthaler (1987) módszerét használtuk fel. 50 mg tömegű levélszövethez 1 ml 100%-os acetont adtunk, és 24 órán keresztül állni hagytuk sötétben 4 °C-on. Ezután centrifugáltuk a mintákat (15000 rpm, 15 perc, 4 °C), majd a felülúszót félretéve ismét 24 órás extrakciónak vetettük alá 1 ml 80%-os acetonnal, 4 °C-on, sötétben. Az abszorpcióméréseket KONTRON kétsugaras spektrofotométer (Milano, Olaszország) segítségével végeztük. Az extraktumok pigmenttartalmait 470, 534, 643 és 661 nm-en mért abszorpciók alapján számítottuk ki a következő képletek segítségével:

$$Kl\ a = 0.01261 \cdot A_{661} - 0.001023 \cdot A_{534} - 0.00022 \cdot A_{643}$$

$$Kl\ b = 0.02255 \cdot A_{643} - 0.00439 \cdot A_{534} - 0.004488 \cdot A_{661}$$

$$\text{Antocianin} = 0.0821 \cdot A_{534} - 0.00687 \cdot A_{643} - 0.002423 \cdot A_{661}$$

$$\text{Karotinoidok} = (A_{470} - 17.1 \cdot (\text{Chl } a + \text{Chl } b) - 9.479 \cdot \text{Antocianin}) / 119.26$$

A pigmenttartalmakat  $\mu\text{g g}^{-1}$  friss tömegre (FT) vonatkoztatva adtuk meg.

#### 5.8.6. Az összcukortartalom meghatározása

Az összcukor mennyiségének meghatározására Dubois és munkatársai (1956) módszerét használtuk fel. 1 g friss növényi mintát desztillált vízben eldörzsöltünk, majd 10 ml-re kiegészítve 90 °C-on, 45 percig forraltuk. Miután lehűlt a kivonat, centrifugáltuk (12000 rpm, 15 perc, 4 °C) és a felülúszóból 40  $\mu\text{l}$  extraktumot, 0,36 ml desztillált vizet, 0,4 ml 1,8%-os fenol oldatot, valamint 2 ml cc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -et mértünk össze. A mintákat összeráztuk, majd 15 perc elteltével 490 nm-en fotometráltuk (KONTRON kétsugaras spektrofotométer, Milano, Olaszország). Az összcukor mennyiségét szacharózzal készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg 20-250  $\mu\text{g/ml}$  koncentráció-intervallumban. Az összcukor-mennyiségeket  $\text{mg g}^{-1}$  FT-re vonatkoztatva adtuk meg.

## **5.9. Az adatok feldolgozása és értékelése**

A mért adatokat Microsoft Office Excel 2007 program és SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Németország) programok segítségével dolgoztuk fel és értékeltük ki. A kontrolltól való szignifikáns különbségek meghatározására Student-féle  $t$ -tesztet használtunk fel, ahol a kapott eredmények  $P \leq 0,05$  (\*),  $0,01$  (\*\*), vagy  $0,001$  (\*\*\*) valószínűségi szinteken különböznek egymástól szignifikánsan.



## 6. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 6.1. Törzsek izolálása, az izolált törzsek változatossága

A Magyarországon termesztett zöldségek rizoszférájából származó 16 mintából összesen 45 *Trichoderma* törzset izoláltunk. A törzsek ITS-régiójának szekvenciaelemzésével történő azonosítását követően az izolátumokat 10 különböző fajba tudtuk besorolni (**1. táblázat**).

Az izolált törzsek között legnagyobb számban a THSC képviselőit sikerült azonosítanunk (55,6%). A Szeged-Sziksós területéről származó karalábé- és paradicsom-rizoszférából származó mintákban ez a faj volt meghatározó, csakúgy, mint a veszprémi paradicsom-rizoszférából származó minták esetében is. A Szeged-Sziksós területéről származó paradicsom-rizoszférából származó mintákból sikerült a legtöbb *Trichoderma* törzset izolálni, összesen 15 izolátumot, melyek között két *Trichoderma* taxont (THSC és *T. koningiopsis*) sikerült azonosítani. Érdekességgént a második leggyakoribb fajnak a *T. pleurotica* adódott, karalábé-, paradicsom- és borsórizoszféra mintákból összesen 4 izolátummal (8,9%). A *T. pleurotica* a laskagomba zöldpenészes megbetegedését okozó ágensként ismert (Hatvani és mtsai., 2008). Paradicsom-, paprika- és petrezselyem mintákból 3-3 *T. atroviride* és *T. asperellum* törzset azonosítottunk. A saláta-, spenót- és tökrizoszféra mintákból 1-1 izolátumot azonosítottunk *T. longibrachiatum*/*T. orientale* (ITS szekvencia alapján történő pontos azonosításuk nem lehetséges) és *T. citrinoviride* törzsként. Mindkét taxonról elmondható, hogy legyengült immunrendszerű emberekben opportunistáknak humán patogénként képesek fertőzéseket, mikózisokat kiváltani (Kredics és mtsai., 2011). Fentiek mellett még a *T. koningiopsis*/*T. ovalisporum*, *T. hamatum*, *T. virens* és *T. gamsii* fajok képviselőit azonosítottuk paradicsom-, sárgarépa-, saláta- és paprikarizoszféra mintákból.

Eredményeink összhangban vannak Mulaw és munkatársai (2010), valamint Naeimi és munkatársai (2011) által végzett kutatások eredményeivel is, akik kávéültetvényről és rizsföldről származó mintákból végezték el *Trichoderma* törzsek izolálását és azonosítását. Az általuk izolált *Trichoderma* fajok között is a legnagyobb számban a THSC-t, második leggyakoribb fajként pedig a *T. hamatum*-ot (Mulaw és mtsai., 2010) illetve a *T. virens*-t (Naeimi és mtsai., 2011) azonosították.

**1. táblázat.** A vizsgált *Trichoderma* törzsek izolálásának és azonosításának adatai (a részletes vizsgálatainkhoz kiválasztott *Trichoderma* törzseket vastagon és piros színnel kiemelve jelöltük).

<i>Izolálás helye</i>	<i>Rizoszféra-minta</i>	<i>Törzsszám</i>	<i>ITS azonosítószám (GenBank)</i>	<i>TrichOkey 2.0 diagnózis eredménye</i>	<i>A legközelebbi NCBI BLAST találat</i>
Szeged-Sziksós	karalábé	<b>SZMC 20852</b>	JX173840	<b><i>T. pleuroticola</i></b>	
		<b>SZMC 20853</b>	JX173841	<b>THSC</b>	
		SZMC 20854	JX173842	THSC	
		SZMC 20855	JX173843	THSC	
		SZMC 20856	JX173844	THSC	
		SZMC 20857	JX173855	THSC	
		SZMC 20774	JX173849	<i>T. pleuroticola</i>	
		SZMC 20858	JX173851	THSC	
		SZMC 20859	JX173852	THSC	
		SZMC 20758	JX173850	THSC	
		SZMC 20759	JX173853	THSC	
		SZMC 20760	JX173854	THSC	
		<b>SZMC 20761</b>	JX173832	<b>THSC</b>	
		<b>SZMC 20762</b>	JX173833	<b>THSC</b>	
		SZMC 20777	JX173864	THSC	
	paradicsom	SZMC 20763	JX173834	<i>T. koningiopsis</i> /	
		SZMC 20764	JX173835	<i>T. ovalisporum</i>	
		SZMC 20765	JX173836	THSC	
		SZMC 20778	JX173865	<i>T. koningiopsis</i> /	
				<i>T. ovalisporum</i>	
		SZMC 20766	JX173837	<i>T. koningiopsis</i> /	
		SZMC 20767	JX173838	<i>T. ovalisporum</i>	
		SZMC 20768	JX173839	THSC	
		SZMC 20863	JX173845	THSC	
		SZMC 20864	JX173846	<i>T. pleuroticola</i>	
		SZMC 20769	JX173847	THSC	
		<b>SZMC 20779</b>	JX173848	<b><i>T. virens</i></b>	
			JX173861	azonosítatlan	
		SZMC 20865		<i>Trichoderma</i> faj	THSC
		<b>SZMC 20866</b>	JX173862	<b><i>T. asperellum</i></b>	
Veszprém	paradicsom	SZMC 20770	JX173856	THSC	
		SZMC 20771	JX173857	THSC	
		SZMC 20772	JX173859	THSC	
		SZMC 20773	JX173858	THSC	
		<b>SZMC 20780</b>	JX173860	<b>azonosítatlan</b>	<b><i>T. atroviride</i></b>
	spenót	<b>SZMC 20780</b>	JX173860	<b><i>Trichoderma</i> faj</b>	
		SZMC 20867	JX173863	<i>T. longibrachiatum</i> /	
	paradicsom			<i>T. orientale</i>	
				azonosítatlan	<b><i>T. gamsii</i></b>
		<b>SZMC 20783</b>	JX173876	<b><i>Trichoderma</i> faj</b>	
Balástya	paradicsom	SZMC 20776	JX173875	<i>T. pleuroticola</i>	
	tök	<b>SZMC 20868</b>	JX173874	<b><i>T. citrinoviride</i></b>	
Ózd	sárgarépa	<b>SZMC 20784</b>	JX173868	<b><i>T. hamatum</i></b>	
	paradicsom	<b>SZMC 20781</b>	JX173866	<b><i>T. atroviride</i></b>	
Hatvan	fűszerpaprika	SZMC 20782	JX173867	<i>T. atroviride</i>	
		<b>SZMC 20786</b>	JX173869	<b><i>T. asperellum</i></b>	
		SZMC 20787	JX173870	<i>T. asperellum</i>	
	saláta	SZMC 20785	JX173871	<i>T. hamatum</i>	
		<b>SZMC 20788</b>	JX173872	<b><i>T. longibrachiatum</i></b>	
	zeller	<b>SZMC 20869</b>	JX173873	<b>THSC</b>	

### 6.1.1. A részletes vizsgálatainkhoz felhasznált *Trichoderma* törzsek kiválasztásának szempontjai

A molekuláris módszerrel azonosított 45 *Trichoderma* törzs közül eltérő fajokba, sorolható, összesen 14 izolátumot választottunk ki részletes jellemzésre (*in vitro* antagonizmus, ökofiziológiai sajátosságok), melyek az **1. táblázat**ban vastagon kiemelten szerepelnek. A *Trichoderma* törzsek kiválasztása során szerepet játszott, hogy az adott törzsek különböző mintavételezési helyről és növényről származzanak, fontos szempontnak tekintettük továbbá azt is, hogy a vizsgált törzsek között minél több faj képviselői szerepeljenek, ezért a kezdeti vizsgálatainkba 1-1 opportunistá humán patogénként is ismert *T. longibrachiatum* és *T. citrinoviride*, valamint laskagomba-kártevő *T. pleuroticola* izolátumot is bevontunk.

További vizsgálatainkhoz (extracelluláris enzimek termelése, fungicidérzékenység vizsgálata) azonban az előzetes vizsgálatok eredményei és szakirodalmi adatok alapján eredményesen alkalmazható, ismert biokontroll fajokba tartozó 6 *Trichoderma* törzset választottunk ki. Ezeket a törzseket az **1. táblázat**ban piros színnel is kiemeltük.

### 6.2. A *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizmusa

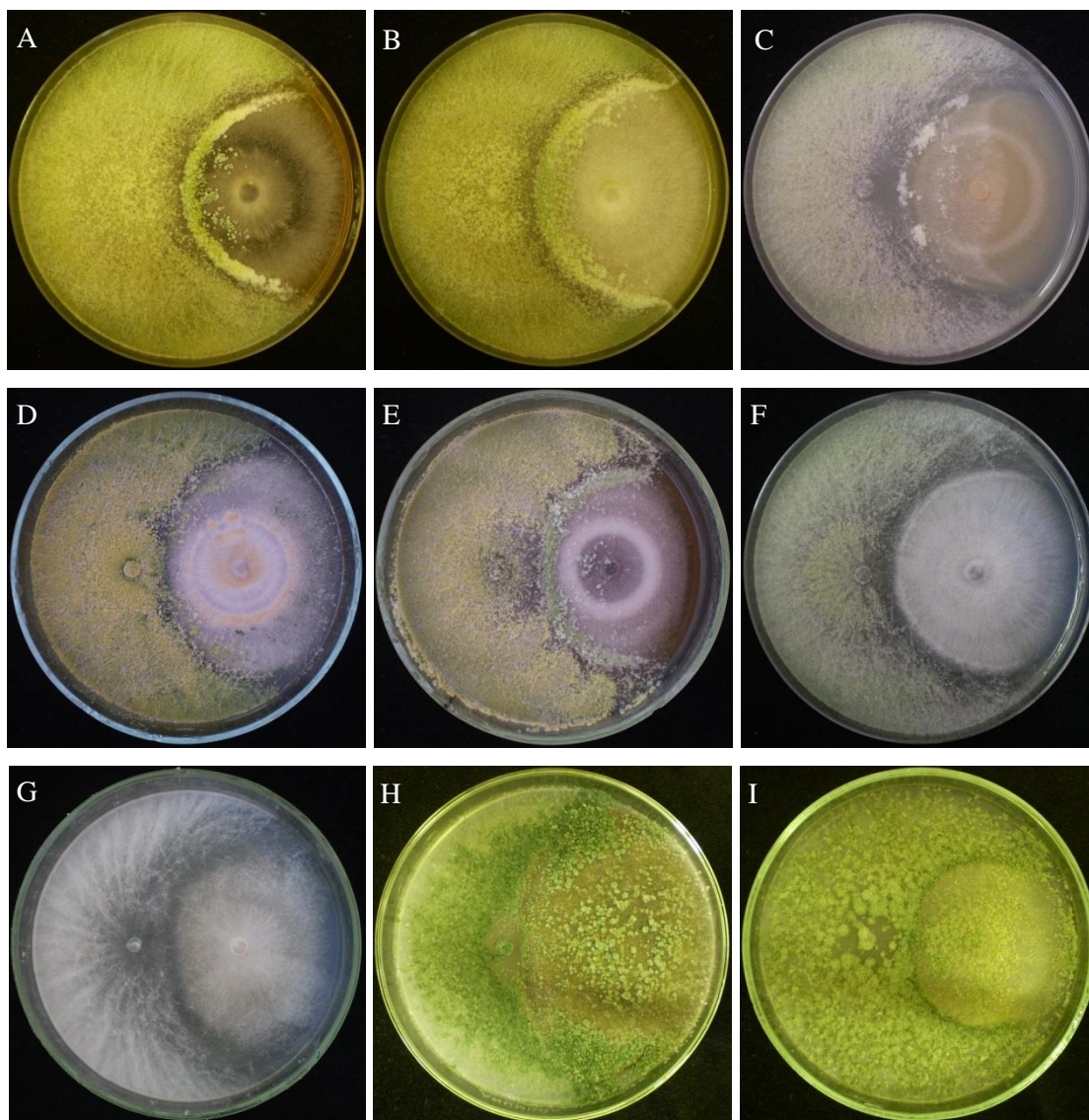
A *Trichoderma* törzsek biokontroll aktivitásának *in vitro* vizsgálatát agar-konfrontációs tesztek segítségével végeztük el, majd a képelemzést követően Biokontroll Index (BCI) értékeket számoltunk, melyeket a **2. táblázat**ban foglaltunk össze. A vizsgált növénypatogén gombákkal szemben mért legmagasabb BCI-értékeket a két *T. asperellum* törzs esetében mértük (**6. ábra**). Mindkét törzs 3-3 növénypatogén gomba ellen bizonyult a leghatásosabbnak. A *T. asperellum* SZMC 20866 két *F. solani* fajkomplexumba (FSSC) tartozó törzzsel (SZMC 11057F és az SZMC 11064F), valamint a *P. cucurbitacearum* törzzsel szemben, a *T. asperellum* SZMC 20786 pedig a vizsgálatainkba bevont másik két FSSC izolátummal (SZMC 11067F és SZMC 11070F), valamint az *A. alternata* SZMC 16085 törzzsel szemben mutatta a legnagyobb BCI-értékeket. A két *T. atroviride* törzs közül az SZMC 20781 bizonyult hatékony *in vitro* antagonistának a vizsgált *F. oxysporum* fajkomplexumba (FOSC) tartozó SZMC 6237J törzzsel szemben, míg a másik *T. atroviride* izolátum (SZMC 20780) a tesztelt *B. cinerea* törzzsel szemben mutatott magas BCI-értéket. Az agar-konfrontációs tesztekbe bevont *R. solani*-val szemben a *Trichoderma* izolátumok több mint fele mutatott 100-as BCI-értéket, ezek az izolátumok képesek voltak teljes mértékben ránövekedni a *R. solani* micéliumára és azon konídiumokat képezni.

A különböző növénypatogén gombák, pl. a *Botrytis*, *Fusarium* és *Rhizoctonia* fajok által történő fertőzések mértéke évről évre folyamatosan növekszik (Chet és mtsai., 1997), ezért egyre nagyobb a biopeszticidek (például a *Trichoderma* törzsek) jelentősége, melyek alkalmazása hatásos lehet a különféle kórokozók ellen (Harman, 2005). Elad és munkatársai (1993) az uborkáról izolált THSC T39-es törzséről állapították meg, hogy hatásos *Botrytis* által okozott fertőzésekkel szemben. Vizsgálataikat uborka-, paradicsom- és szőlőnövényeken végezték. Ezzel az eredménnyel összhangban az általunk izolált THSC törzsek is hatékonyak lehetnek *Botrytis* és *Rhizoctonia* által okozott fertőzésekkel szemben, annak ellenére, hogy nem az esetükben mértük a legmagasabb BCI-értékeket.

Egy argentin tanulmány (Mónaco és mtsai., 2004) arról számol be, hogy az általuk izolált *Trichoderma* törzs az agar-konfrontációs tesztekben 41% és 61% közötti hatékonysággal gátolta az *A. alternata*-t. Ezen eredményhez hasonlóan az általunk kapott, *A. alternata*-val szembeni BCI-értékek 25,07 és 64,33 között voltak. Munkánk során a BCI-értékek meghatározásához a Szekeres és munkatársai (2006) által kifejlesztett módszert alkalmaztuk, mely a *Fusarium* fajokon túl más növénypatogén gombák esetében is alkalmazhatónak bizonyult, a kapott eredmények jól összevethetőek egymással. Cuervo-Parra és munkatársai (2013, 2014) is ennek a módszernek az alkalmazásával vizsgálták az általuk izolált *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonista képességeit a kakaófa (*Theobroma cacao*) termését károsító növénypatogén gombákkal szemben. A módszer a jövőben egyre szélesebb körben elterjedhet a különböző *Trichoderma* törzsek biokontroll képességeinek felmérésére.

**2. táblázat.** *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombákkal szemben meghatározott biokontroll index (BCI) értékei. (A 70-es vagy annál nagyobb BCI-értékeket piros színnel jelöltük a táblázatban).

Vizsgált <i>Trichoderma</i> törzsek	Növénypatogén gombák								
	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	FOSC	<i>A. alternata</i>	<i>P. cucurbitacearum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>
	SZMC 11057F	SZMC 11064F	SZMC 11067F	SZMC 11070F	SZMC 6237J	SZMC 16085	SZMC 16088	SZMC 6244J	SZMC 6252J
<i>T. asperellum</i> SZMC 20866	<b>79,77 ± 1,22</b>	<b>76,90 ± 1,35</b>	<b>71,38 ± 3,04</b>	<b>75,61 ± 5,35</b>	48,18 ± 4,05	64,32 ± 0,53	<b>81,36 ± 1,26</b>	<b>75,97 ± 2,39</b>	<b>100,00 ± 0,00</b>
<i>T. asperellum</i> SZMC 20786	<b>77,76 ± 0,96</b>	64,45 ± 8,87	<b>88,84 ± 5,48</b>	<b>85,76 ± 2,12</b>	48,66 ± 4,26	65,77 ± 1,42	<b>80,63 ± 0,50</b>	<b>73,26 ± 0,51</b>	<b>100,00 ± 0,00</b>
<i>T. atroviride</i> SZMC 20780	62,41 ± 2,90	<b>73,91 ± 6,10</b>	37,63 ± 2,15	51,19 ± 0,96	66,99 ± 1,71	51,43 ± 0,42	59,21 ± 1,37	<b>92,21 ± 7,95</b>	<b>100,00 ± 0,00</b>
<i>T. atroviride</i> SZMC 20781	63,91 ± 0,76	59,64 ± 4,80	39,93 ± 2,14	48,39 ± 2,53	69,45 ± 5,76	54,16 ± 0,27	56,82 ± 1,20	<b>87,55 ± 10,82</b>	<b>100,00 ± 0,00</b>
<i>T. citrinoviride</i> SZMC 20868	53,76 ± 1,69	24,45 ± 1,20	46,97 ± 1,85	48,15 ± 1,92	39,22 ± 1,50	47,30 ± 2,55	61,98 ± 0,19	44,54 ± 2,36	<b>71,19 ± 3,67</b>
<i>T. gamsii</i> SZMC 20783	60,82 ± 1,42	50,39 ± 0,89	39,97 ± 1,74	59,36 ± 1,34	59,33 ± 2,91	49,22 ± 2,06	60,14 ± 0,75	50,70 ± 7,26	<b>100,00 ± 0,00</b>
<i>T. hamatum</i> SZMC 20784	68,22 ± 0,73	46,81 ± 0,77	47,88 ± 1,75	62,52 ± 0,63	51,05 ± 2,84	61,28 ± 1,38	67,96 ± 1,19	46,82 ± 1,06	<b>100,00 ± 0,00</b>
THSC SZMC 20761	63,02 ± 5,40	65,83 ± 1,72	63,39 ± 1,69	64,92 ± 0,87	49,82 ± 2,68	60,77 ± 1,06	61,19 ± 1,35	44,20 ± 4,21	<b>100,00 ± 0,00</b>
THSC SZMC 20853	<b>75,13 ± 0,88</b>	46,71 ± 4,27	52,79 ± 1,83	<b>70,04 ± 3,39</b>	54,17 ± 0,85	60,26 ± 0,81	60,45 ± 0,77	49,75 ± 4,56	<b>100,00 ± 0,00</b>
THSC SZMC 20869	42,19 ± 2,53	42,06 ± 3,08	37,83 ± 0,17	38,40 ± 0,95	45,71 ± 3,39	18,02 ± 1,02	14,92 ± 1,89	42,26 ± 4,55	<b>74,87 ± 7,34</b>
THSC SZMC 20762	63,69 ± 1,23	52,00 ± 6,30	47,91 ± 0,37	59,77 ± 1,79	60,46 ± 1,43	59,33 ± 0,53	57,84 ± 1,95	49,43 ± 3,03	<b>100,00 ± 0,00</b>
<i>T. pleuroticola</i> SZMC 20852	64,54 ± 2,23	62,84 ± 3,54	47,10 ± 2,14	68,06 ± 1,07	63,43 ± 4,49	61,01 ± 0,78	63,88 ± 0,79	46,45 ± 3,20	63,54 ± 2,17
<i>T. longibrachiatum</i> SZMC 20788	60,19 ± 1,68	38,31 ± 3,82	43,00 ± 0,47	56,40 ± 2,63	51,58 ± 4,92	59,84 ± 1,09	57,79 ± 1,65	46,37 ± 5,13	45,39 ± 3,05
<i>T. virens</i> SZMC 20779	40,66 ± 1,51	35,93 ± 1,68	53,43 ± 0,62	49,10 ± 2,91	41,38 ± 2,20	25,07 ± 2,33	35,59 ± 1,91	45,32 ± 8,37	62,37 ± 5,36



**6. ábra.** *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizmusa agar-konfrontációs tesztekben

**A, B, C:** *T. asperellum* SZMC 20866 *in vitro* antagonizmusa FSSC SZMC 11057F (A), SZMC 11064F (B) és *P. cucurbitacearum* SZMC 16088 (C) törzsekkel szemben. **D, E, F:** *T. asperellum* SZMC 20786 *in vitro* antagonizmusa FSSC SZMC 11067F (D), SZMC 11070F (E) és *A. alternata* SZMC 16085 (F) törzsekkel szemben. **G:** *T. atroviride* SZMC 20781 *in vitro* antagonizmusa FOSC SZMC 6237J (G) törzsszel szemben. **H, I:** *T. atroviride* SZMC 20780 *in vitro* antagonizmusa *B. cinerea* SZMC 6244J (H) és *R. solani* SZMC 6252J (I) törzsekkel szemben. A *Trichoderma* törzsek a Petri csészék bal oldalán, míg a növénypatogén gombák a csészék jobb oldalán találhatóak.

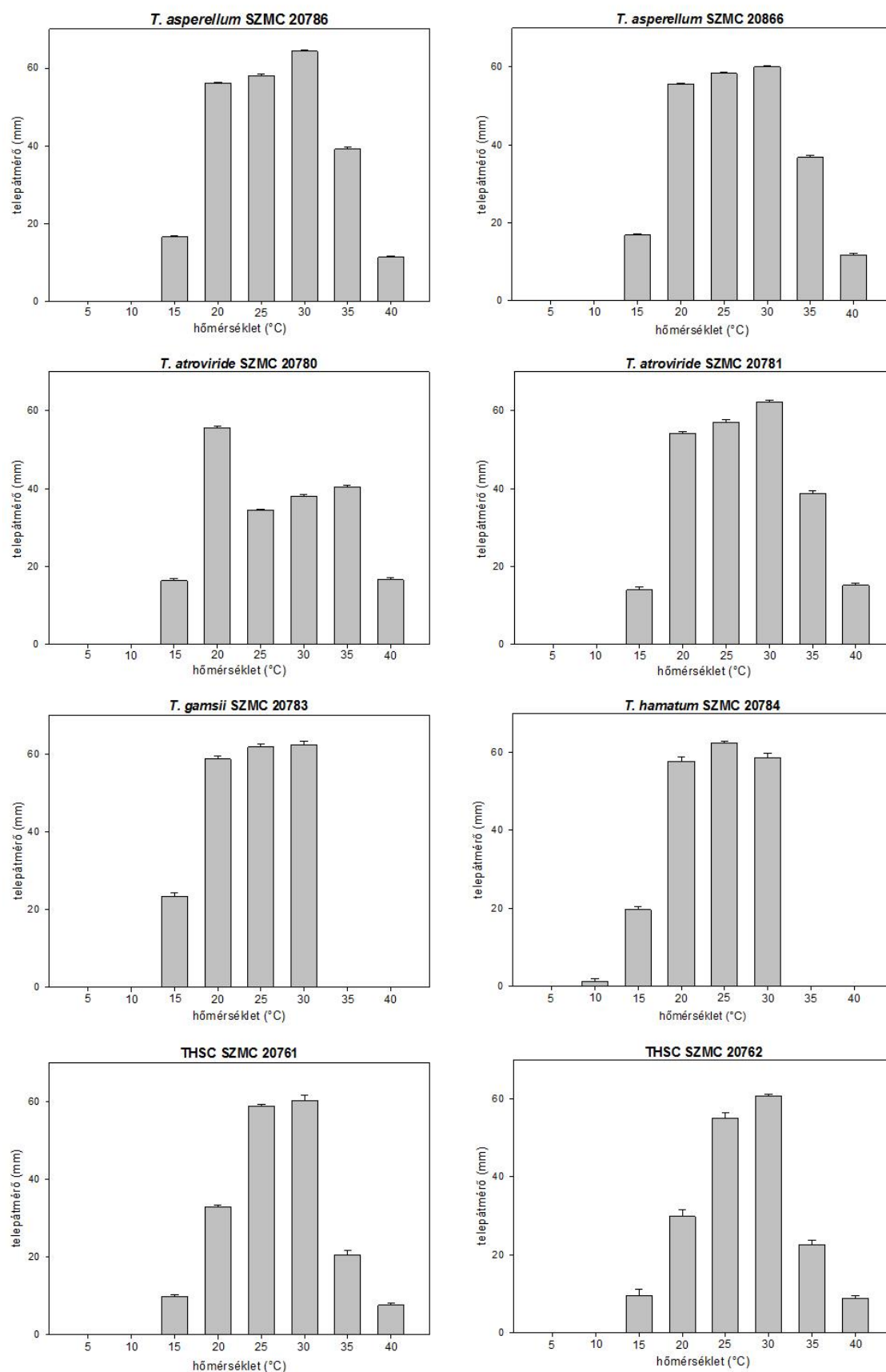
### 6.3. A vizsgált *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai jellemzése

A részletes jellemzésre kiválasztott 14 törzs esetében elvégeztük különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, pH és vízaktivitás) növekedésére gyakorolt hatásának felmérését.

### 6.3.1. A hőmérséklet hatása a micéliumnövekedésre

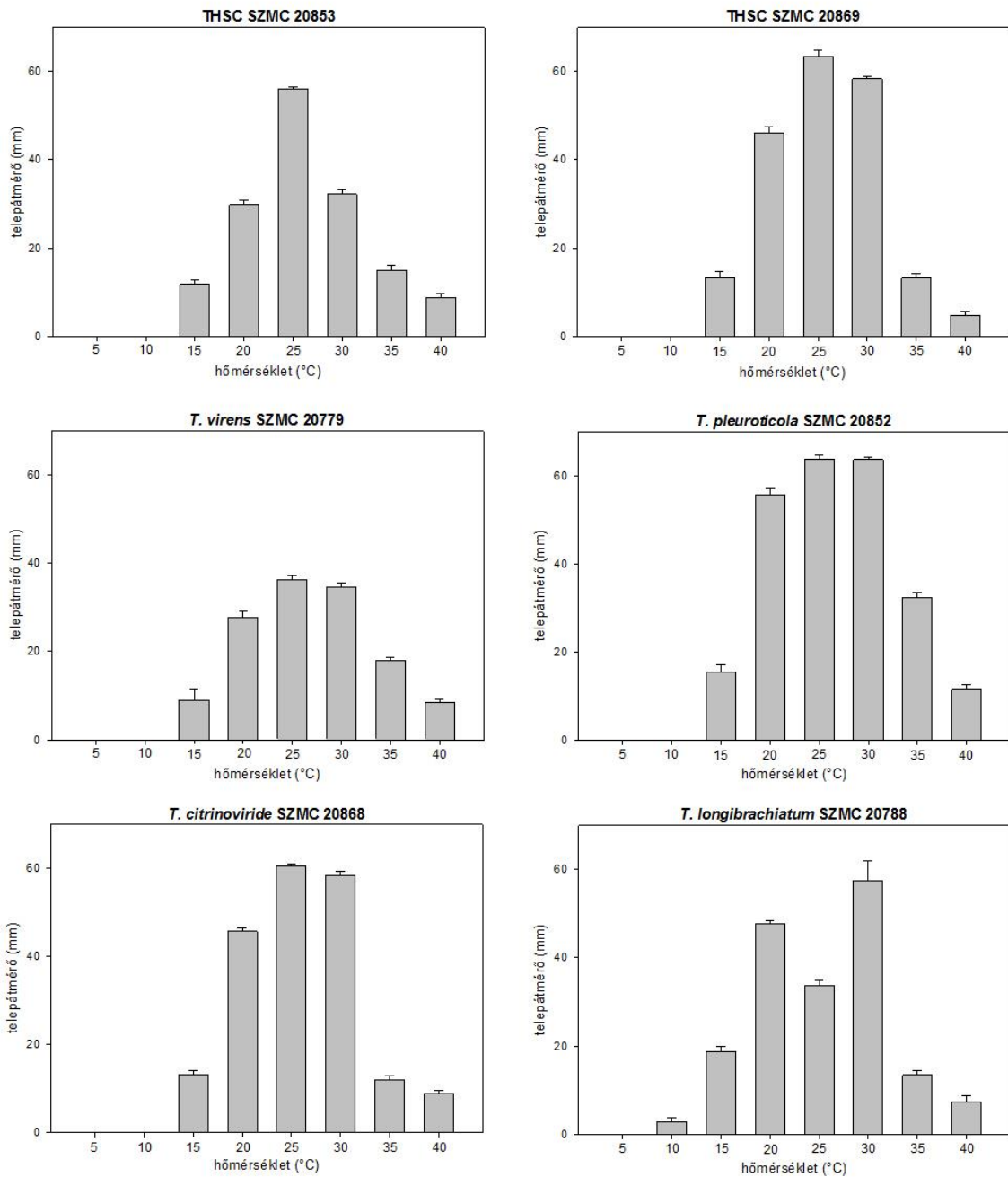
A különböző hőmérsékleti értékek micéliumnövekedésre gyakorolt hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy 5 °C-on egyik *Trichoderma* törzs sem mutatott növekedést, és 10 °C-on is csak a *T. hamatum* SZMC 20784 és a *T. longibrachiatum* SZMC 20788 törzseknél tudtunk kimutatni csekély mértékű növekedést (7. ábra). 15 °C-on a törzsek kismértékű növekedést mutattak. A *T. asperellum* törzsek esetében egyaránt 30 °C bizonyult optimálisnak a növekedéshez, míg a két *T. atroviride* törzs esetében eltérés mutatkozott: míg a *T. atroviride* SZMC 20780-as törzs növekedéséhez szükséges optimális hőmérséklet 20 °C volt, addig az SZMC 20781-es törzs esetében ez az érték 30 °C-nak bizonyult. A vizsgált THSC törzsek között szintén eltéréseket tapasztaltunk. A THSC SZMC 20761 és SZMC 20762 optima 30 °C-nak adódott, ezzel szemben a másik két vizsgált THSC törzsé (SZMC 20853, SZMC 20869) 25 °C-nak. A *T. atroviride* SZMC 20781 és a *T. longibrachiatum* SZMC 20788 törzsek esetében a vizsgált hőmérsékleti-értékek alapján kapott adatokból nem rajzolódott ki egyértelmű optimumgörbék. Adataink alapján a hőmérséklet további növelésével 35 illetve 40 °C-on egyre csökkent a növekedés mértéke. A *T. citrinoviride* és *T. longibrachiatum* törzsek micéliumnövekedése 35 és 40 °C között is megfigyelhető volt, ebből kifolyólag e két faj képviselője feltehetően képes lehet potenciális humán patogén fertőzéseket kiváltani (Antal és mtsai., 2005; Hatvani és mtsai., 2013). Az általunk szerzett és a szakirodalomban már korábban leírt adatok alapján is megállapítható, hogy a növekedéshez szükséges optimális hőmérsékleti értékekben eltérések mutatkoznak az egyes *Trichoderma* fajok között (Danielson és Davey, 1973b; Samuels, 1996). Mivel a legtöbb *Trichoderma* törzs mezofil, így ezen törzsek biokontroll ágensként történő alkalmazása hideg őszi és tavaszi időjárási feltételek mellett nem nyújt megfelelő védelmet a hidegkedvelő növénypatogén gombákkal szemben (Kredics és mtsai., 2003). Az alkalmazni tervezett biokontroll törzsekről eltérő hőmérsékleteken szerzett micéliumnövekedési adatok fontos információkkal segíthetik az adott törzs megfelelő alkalmazását.





**7. ábra.** A hőmérséklet hatása a vizsgált *Trichoderma* törzsek micéliumnövekedésére YEG táptalajon





**7. ábra (folytatás).** A hőmérséklet hatása a vizsgált *Trichoderma* törzsek micéliumnövekedésére YEG táptalajon

### 6.3.2. A pH hatása a micéliumnövekedésre

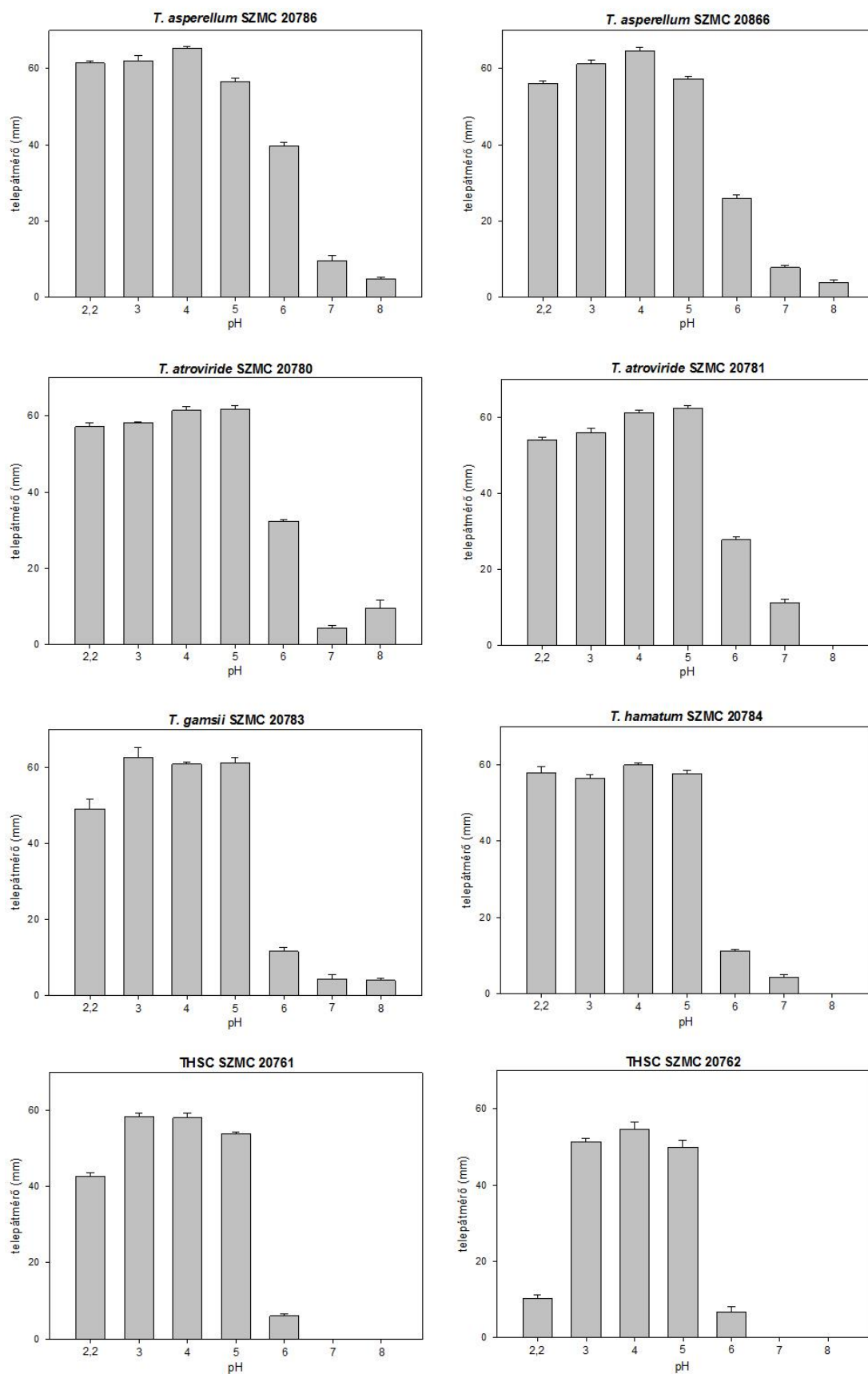
A különböző pH-értékek növekedésre gyakorolt hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a *Trichoderma* törzsek igen széles tartományban képesek növekedni (**8. ábra**). A grafikonok alapján a pH vizsgálatánál sem rajzolódtak ki jellegzetes optimum görbék. A vizsgált *Trichoderma* törzsekről általánosságban elmondható, hogy pH optimumuk 3 és 5-ös értéken volt megfigyelhető, ezen pH-értékeken mért növekedési adatok közötti eltérés is csekélynek mutatkozott. A 2,2-es pH-értéken eltérés mutatkozott a

törzsek között: míg nagyobb részük esetében az optimális értékhez közeli telepátmérő-adatokat mértünk, a többi törzsnél jóval alacsonyabb volt a növekedés. 5-ös pH érték felett a növekedés visszaesését tapasztaltuk, 8-as pH-értéken már csak 5 törzs volt képes kismértékű növekedésre (*T. asperellum* SZMC 20786 és SZMC 20866, *T. atroviride* SZMC 20780, *T. gamsii* SZMC 20783 és *T. pleurotica* SZMC 20852).

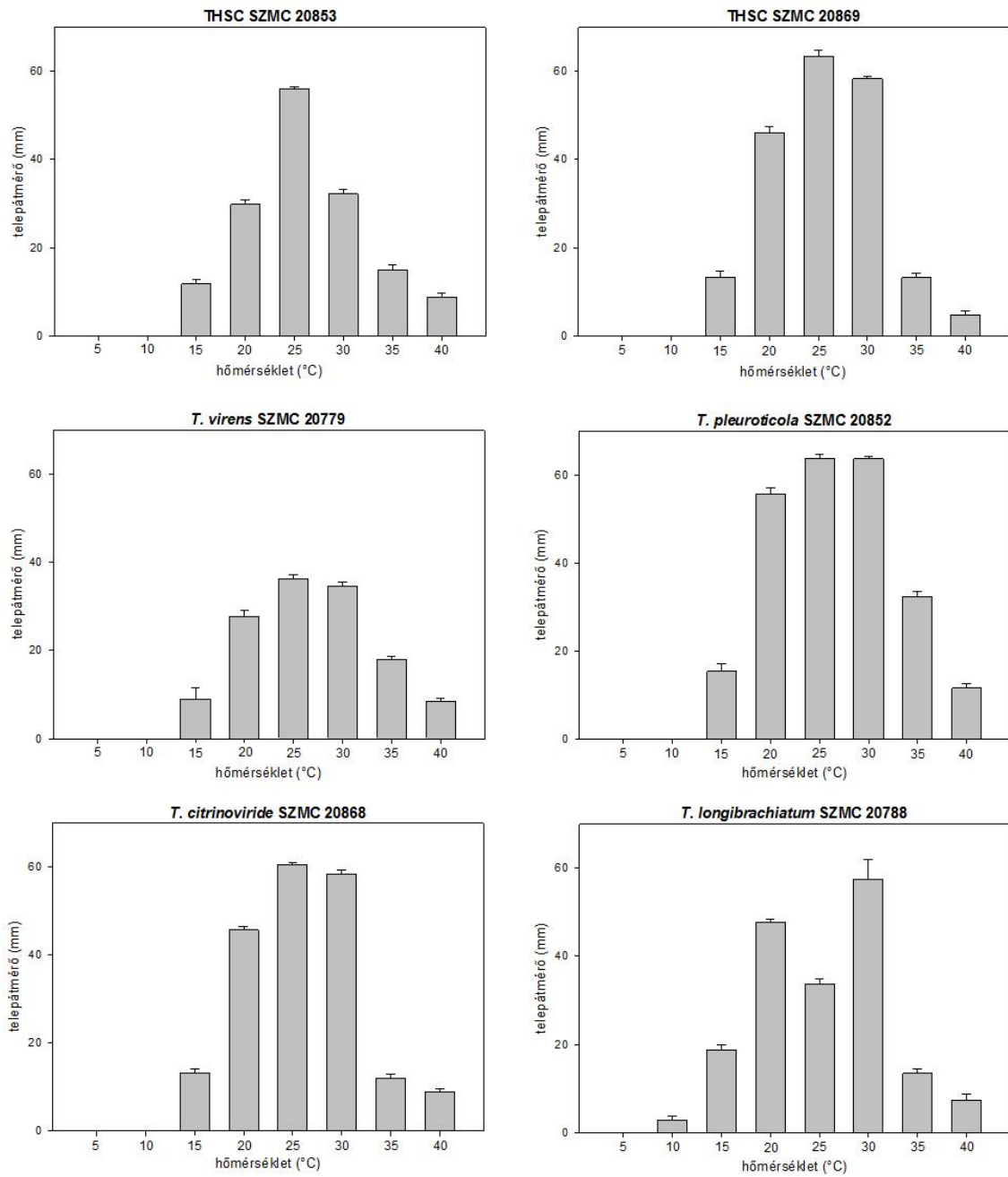
A *Trichoderma* törzsek biokontroll ágensként történő alkalmazása során figyelembe kell venni, hogy a különböző mezőgazdasági talajok pH-ja eltérő. Ebből kifolyólag fontos, hogy információt szerezzünk a pH micéliumnövekedésre gyakorolt hatásáról (Kredics és mtsai., 2003). Az extracelluláris enzimek termelésére is eltérő hatást gyakorolnak a különböző pH-értékek, ahogy ezt Delgado-Jarana és munkatársai (2000) bizonyították THSC  $\beta$ -1,6-glukanáz-termelése esetében.

### 6.3.3. A vízáktivitás hatása a micéliumnövekedésre

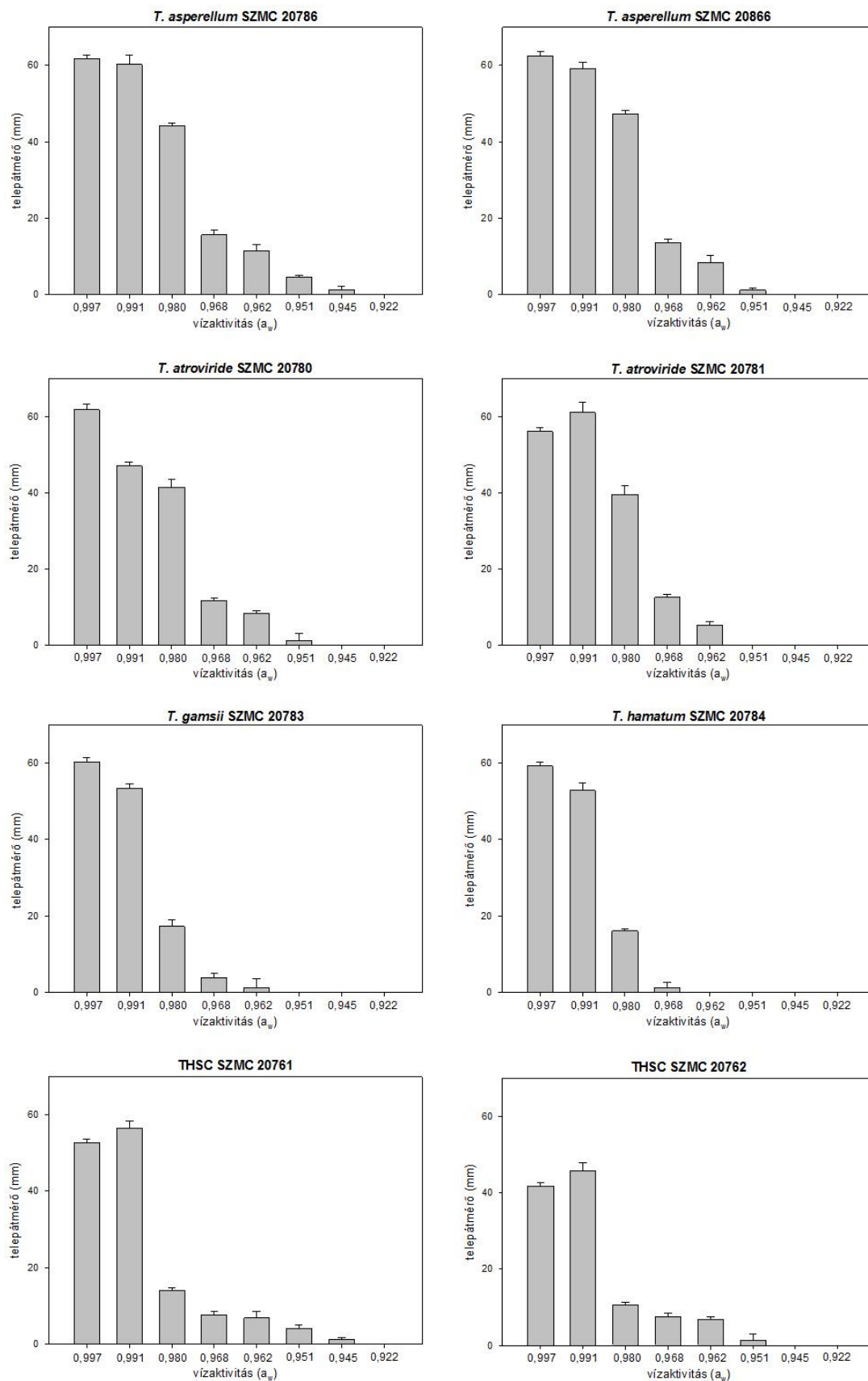
A törzsek telepátmérő-növekedését 8 különböző vízáktivitás-értéken ( $a_w$ ) is megvizsgáltuk. Eredményeinket a **9. ábra** oszlopgrafikonjain foglaltuk össze. A *Trichoderma* törzsek több mint fele 0,997-es  $a_w$ -értéken mutatott optimális növekedést, míg a többi törzs esetében a 0,991-es  $a_w$ -érték bizonyult optimálisnak. A *T. atroviride* törzsek esetében ismét eltérés mutatkozott, mivel az SZMC 20781-es törzs 0,997-es  $a_w$ -értéken mutatott optimális növekedést, ezzel szemben az SZMC 20781-es törzs 0,991-es  $a_w$ -értéken. A THSC törzsek között is különbséget tapasztaltunk, esetükben egy törzs (SZMC 20869) optimumának a 0,997-es  $a_w$ -érték, míg a többi törzs (SZMC 20761, SZMC 20762 és SZMC 20853) esetében a 0,991-es érték adódott. A vízáktivitás folyamatos csökkenésével a törzsek telepátmérője is egyre csökkent, 0,945-ös  $a_w$ -értéken már csak 3 törzs (*T. asperellum* SZMC 20786, THSC SZC 20761, *T. citrinoviride* SZMC 20868) mutatott igen csekély növekedést, míg 0,922-es  $a_w$ -értéken már egyik törzs sem volt képes növekedni. A *Trichoderma* törzsek alacsony szintű ozmotoleranciája képes korlátozni a törzsek biofungicidként történő alkalmazását (Kredics és mtsai., 2003), mivel a vízáktivitás jelentős hatással van a növekedésre. A vizsgálatainkba bevont *Trichoderma* törzsek gyors növekedésre csak a 0,997-es és a 0,991-es  $a_w$ -értékeken voltak képesek, így eredményeink összhangban vannak a Kredics és munkatársai (2000, 2004) által végzett korábbi kutatásokkal.



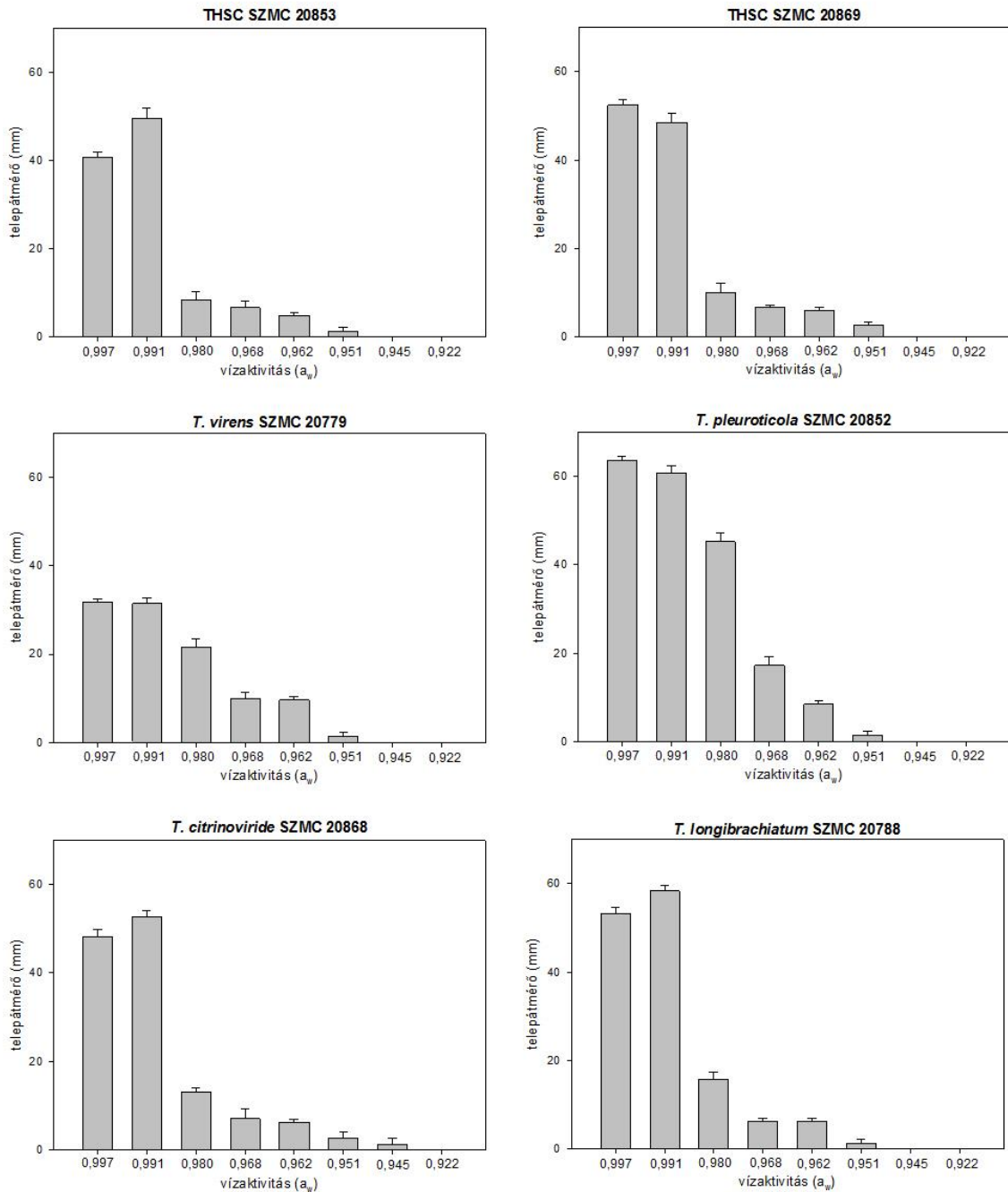
**8. ábra.** A pH hatása a vizsgált *Trichoderma* törzsek micéliumnövekedésére YEG táptalajon



**8. ábra (folytatás).** A pH hatása a vizsgált *Trichoderma* törzsek micéliumnövekedésére YEG táptalajon



**9. ábra.** A vízaktivitás hatása a vizsgált *Trichoderma* törzsek micéliumnövekedésére YEG táptalajon



**9. ábra (folytatás).** A vízaktivitás hatása a vizsgált *Trichoderma* törzsek micéliumnövekedésére YEG táptalajon

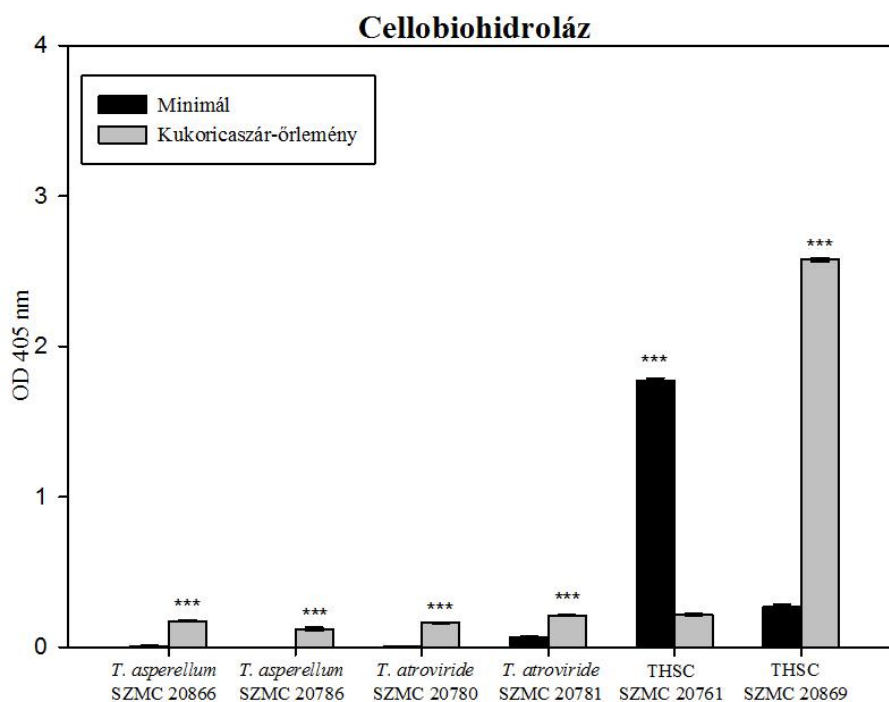
## 6.4. Cellulózbontó és foszfátmobilizáló képesség vizsgálata

### 6.4.1. A *Trichoderma* törzsek cellulózbontó képességének vizsgálata

A *Trichoderma* törzsek cellulózbontó képességének vizsgálatát szintetikus minimál, és kukoricaszár-őrleményt tartalmazó tápoldatokban történő rázatott tenyésztést követően a

micéliumoktól elválasztott fermentlevekben végeztük. Minimál tápoldatban a legmagasabb cellobiohidroláz (10. ábra) és  $\beta$ -glükózidáz (11. ábra) alapaktivitással a THSC SZMC 20761 és *T. hamatum* SZMC 20784 törzsek rendelkeztek, viszont ezen törzsek enzintermelése jelentősen visszaesett kukoricaszár-őrleményes tápoldatban. A minimál tápoldatban a fenti két törzsnél alacsonyabb, de összességében így is a 3. legmagasabb cellobiohidroláz és  $\beta$ -glükózidáz alapaktivitással rendelkező THSC SZMC 20869 törzs enzintermelése viszont drasztikusan megemelkedett a kukoricaszár-őrleményes tápoldatban.

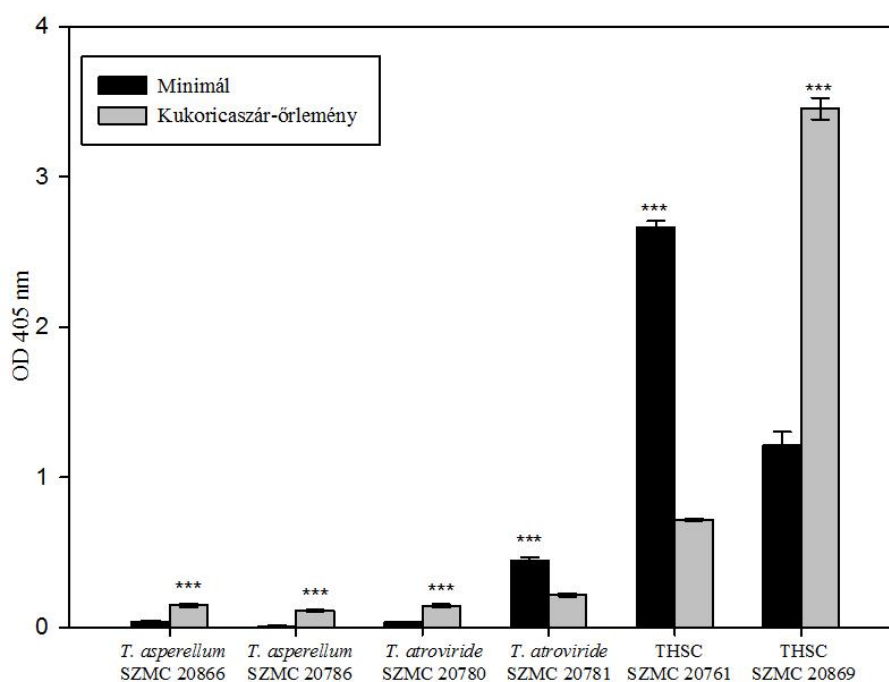
Az elmúlt évtizedben a lignocellulóz növényi biomassza magára vonta számos kutató figyelmét, mint megújuló energiaforrás, melyet felhasználhatnak bioüzemanyag, valamint különféle vegyszerek előállításához is (Laothanachareon és mtsai., 2015). Intenzív kutatások folytak ennek megfelelően a lignocellulóz összetett lebontásának részletes megismerésére. A bonyolult enzimatikus folyamatok révén megvalósuló növényi biomassza lebomlásának vizsgálatával lehetőség nyílt a lignocellulóz lebontásához szükséges, még hatékonyabb enzimsziszterek kifejlesztésére is (Laothanachareon és mtsai., 2015).



**10. ábra.** A vizsgált *Trichoderma* törzsek cellobiohidroláz enzimaktivitásai.

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

A gombák hatékony enzimszettel rendelkeznek, mellyel képesek a lignocellulóz lebontására. Ez az enzimszettel magába foglalja a cellulázokat (cellobiohidroláz, endoglukanáz), a hemicellulázt (xilanáz), valamint a  $\beta$ -glükózidázt (Soliman és mtsai., 2013). Khan és Amin (2012) egy *T. viride* törzs celluláztermelését vizsgálta banánfa szármaradványának lebontásában. Eredményeik alapján megállapították, hogy a banánfa szármaradványának cellulázok révén megvalósuló lebontása során a kiindulási súlyának 90%-át elvesztette, tehát nagyfokú lebomláson ment keresztül. A cellulóz lebontásáról általunk szerzett eredmények alapján elmondható, hogy a THSC SZMC 20869-es törzs nagyfokú cellobiohidroláz és  $\beta$ -glükózidáz aktivitással rendelkezik, így ennek a *Trichoderma* törzsnek a termőföldre történő kijuttatása az aratást követően elősegítheti a szármaradványok lebontását a talajban, ami a talaj minőségének javulásához, valamint a növénypatogén gombák számának csökkenéséhez vezethet, mivel azok szaporítóképletei a szármaradványokon képesek áttelelni, majd újabb fertőzéseket kialakítani.



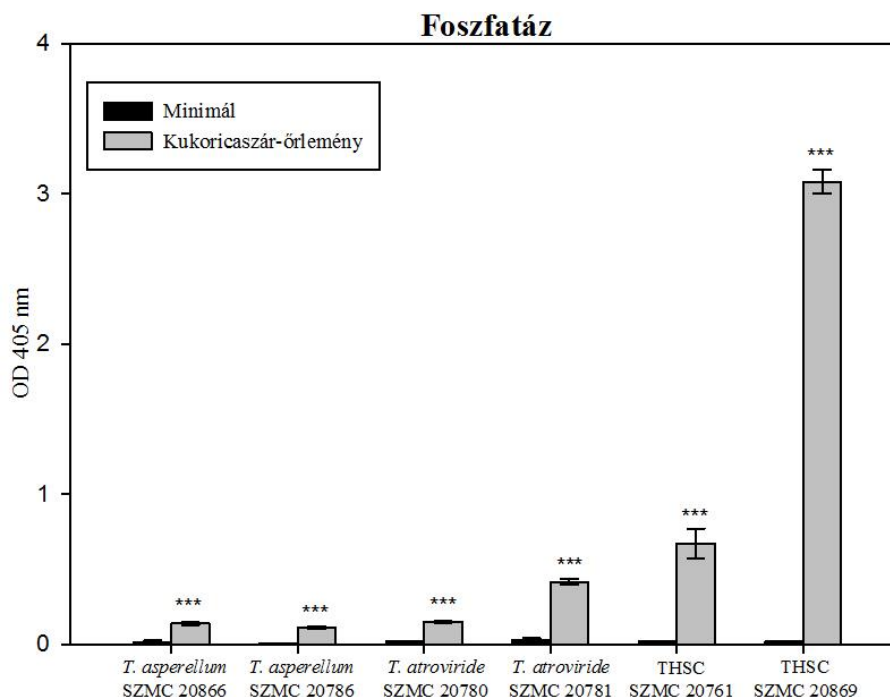
**11. ábra.** A vizsgált *Trichoderma* törzsek  $\beta$ -glükózidáz enzimaktivitásai.

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.



#### 6.4.2. A *Trichoderma* törzsek foszfátáz aktivitásának vizsgálata

A vizsgált *Trichoderma* törzsek közül foszfátáz aktivitást minimál tápoldatban egyik törzs esetében sem tapasztaltunk, míg kukoricaszár-őrleményes tápoldatban THSC SZMC 20869 törzs mutatta a legmagasabb foszfátáz aktivitást (**12. ábra**).



**12. ábra.** A vizsgált *Trichoderma* törzsek foszfátáz enzimaktivitásai.

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

A növények növekedésének a nitrogén után a második legfontosabb limitáló eleme a foszfor (P) (Beileski, 1973), amely a növények szárazanyag-tartalmának 0,2%-át teszi ki. A szolubilis P koncentrációja a talajban 0,05 és 10 ppm között van, azonban a P több (Bhattacharya és Jain, 2000), mint 80%-a a növények számára nem hasznosítható formában van jelen (Holford, 1997). Ennél fogva nagy a jelentősége azoknak a mikroorganizmusoknak, amelyek szerepet játszanak a P szolubilizálásában. Kapri és Tewari (2009) munkájuk során különböző fák (fenyő, himalájai cédrus, bambusz, guáva és tölgy) a rizoszférájából izolált *Trichoderma* törzsek P-mobilizáló képességét vizsgálták. Üvegházi kísérleteik során kimutatták, hogy a *Trichoderma* izolátumok a csicseriborsó (*Cicer arietinum*) növekedését serkentették. Növekedést értek el mind a hajtás és gyökér hosszában, mind pedig a nedves- és száraztömegben P-hiányos tápközegben. Ezen eredmények figyelembevételével a THSC SZMC 20689 törzsnél mért

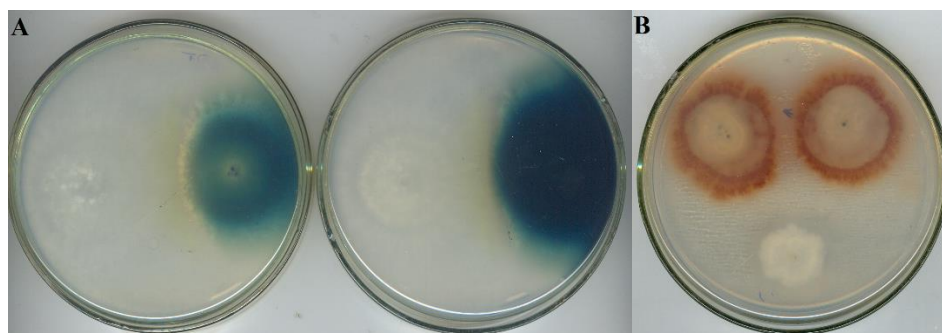
magas foszfatáz aktivitás arra utal, hogy ez a törzs a talajba kijuttatva serkentheti a P mobilizációját, ezáltal hatást gyakorolva a növények növekedésére is.

Az eredmények alapján a THSC SZMC 20869 törzse ígéretes szervezet lehet egy összetett biológiai készítmény cellulózbontó és foszfátmobilizáló képességű összetevőjeként.

## 6.5. A *Trichoderma* törzsek lakkáztermelésének vizsgálata

### 6.5.1. Lakkáztermelő *Trichoderma* törzsek azonosítása

A rizoszféra-mintákból származó *Trichoderma* törzsek lakkáz enzimek termelésére való képességének vizsgálatát ABTS vagy gvajakol szubsztrátokkal kiegészített táptalajokon végeztük. A módszer segítségével az izolált *Trichoderma* törzsek között összesen 3 törzset azonosítottunk, melyek erős lakkáztermelő képességet mutattak. A törzsek között megtalálható volt a két vizsgált *T. asperellum* (SZMC 20786, SZMC 20866), valamint a *T. atroviride* SZMC 20780. A *T. asperellum* SZMC 20866 mindkét szubsztrát esetében pozitív reakciót mutatott, míg az SZMC 20786 jelű törzs csak gvajakol jelenlétében, a *T. atroviride* SZMC 20780 pedig csak ABTS alkalmazása esetén (13. ábra).



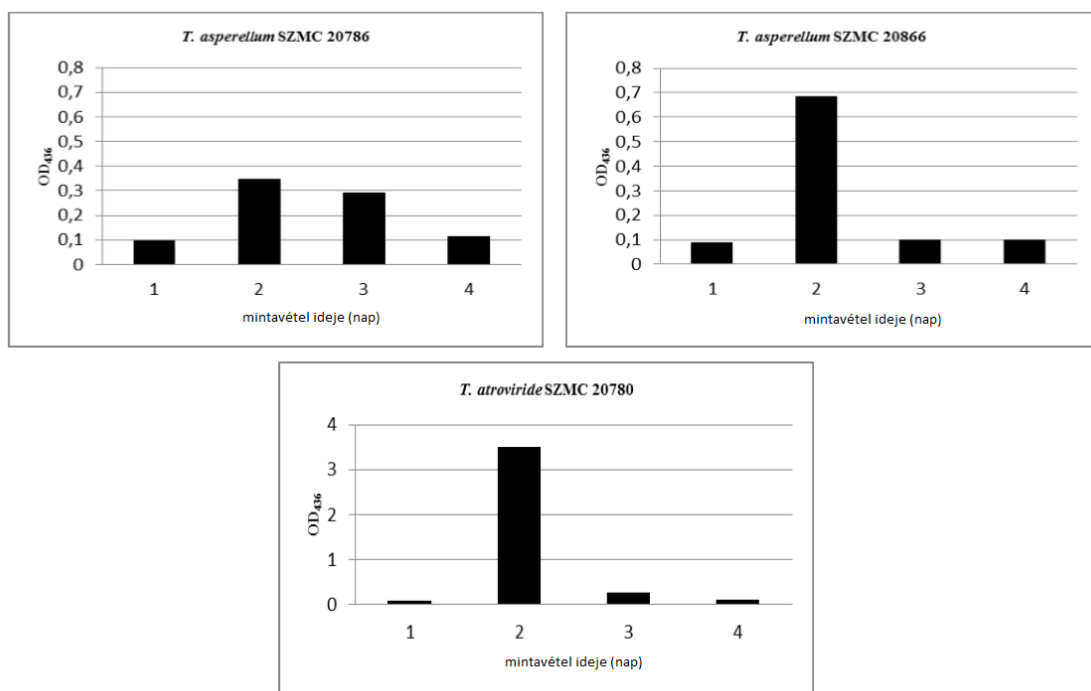
**13. ábra.** *Trichoderma* törzsek lakkáztermelésének kimutatása ABTS (A) és gvajakol (B) tartalmú szelektív táptalajokon.

A) Balról jobbra haladva a csészék jobb oldalán a *T. atroviride* SZMC 20780 és a *T. asperellum* SZMC 20866 kék színű pozitív színreakciói. B) A csésze bal felső részén a *T. asperellum* SZMC 20786, jobb felső részén a *T. asperellum* SZMC 20866 vöröses-barnás színreakciói. Lakkáz enzimet nem termelő kontrollként mindkét ábrán a THSC SZMC 20770 törzs szerepel.

### 6.5.2. Az igazolt lakkáztermelő törzsek lakkáz-aktivitásának vizsgálata

Az előzetes vizsgálatok során pozitív reakciót mutató 3 törzs esetében további vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy megállapítsuk, a tenyésztés mely napján a legmagasabb a relatív lakkáz-aktivitás. Mindhárom törzs esetében a tenyésztés 2. napján volt a legmagasabb a relatív lakkáz-aktivitás, a *T. asperellum* SZMC 20786 törzs

kivételével a 3. napon azonban már csak az alapaktivitást tudtuk detektálni. A 3 törzs közül a *T. atroviride* SZMC 20780 esetében 3 nagyságrenddel nagyobb lakkáz-aktivitást mértünk, mint a másik két törzsnél (**14. ábra**). Hölker és munkatársai (2002) egy *T. atroviride* törzs lakkáztermelését vizsgálták és megállapították, hogy a tenyésztés 7. napján volt a legmagasabb, szemben az általunk kapott eredményekkel. Sadhasivam és munkatársai (2008) a THSC lakkáztermelését vizsgálták, és a tápoldatban a 2. napon tudtak először kimutatni lakkáz-aktivitást, amely az általunk kapott eredményeknek megfelel. Azonban ez az aktivitás a 4. napra elérte a maximumát, a 8. naptól pedig már nem volt kimutatható, az általunk vizsgált *Trichoderma* törzsek lakkáz-aktivitása viszont már a 3. naptól visszaesett. A gombák lakkáztermeléséről bebizonyították, hogy nagymértékben függ a tenyésztés körülményeitől, a rendelkezésre álló szén-, és nitrogénforrástól (Sadhasivam és mtsai., 2008), továbbá függhet a tápközegben jelenlevő mikroelemektől vagy éppen azok hiányától. Ezek a tényezők befolyásolhatják, hogy az egyes törzsek esetében a tenyésztés kezdetétől számítva mikor éri el maximumát a lakkáz-aktivitás (Sadhasivam és mtsai., 2008). Általánosságban elmondható, hogy a gombák alacsony koncentrációban képesek a lakkáz enzim szekréciójára, de a tápoldatot megfelelő vegyületekkel kiegészítve többszörösére növelhető az enzim koncentrációja (Lee és mtsai., 1999; Vasconcelos és mtsai., 2000).

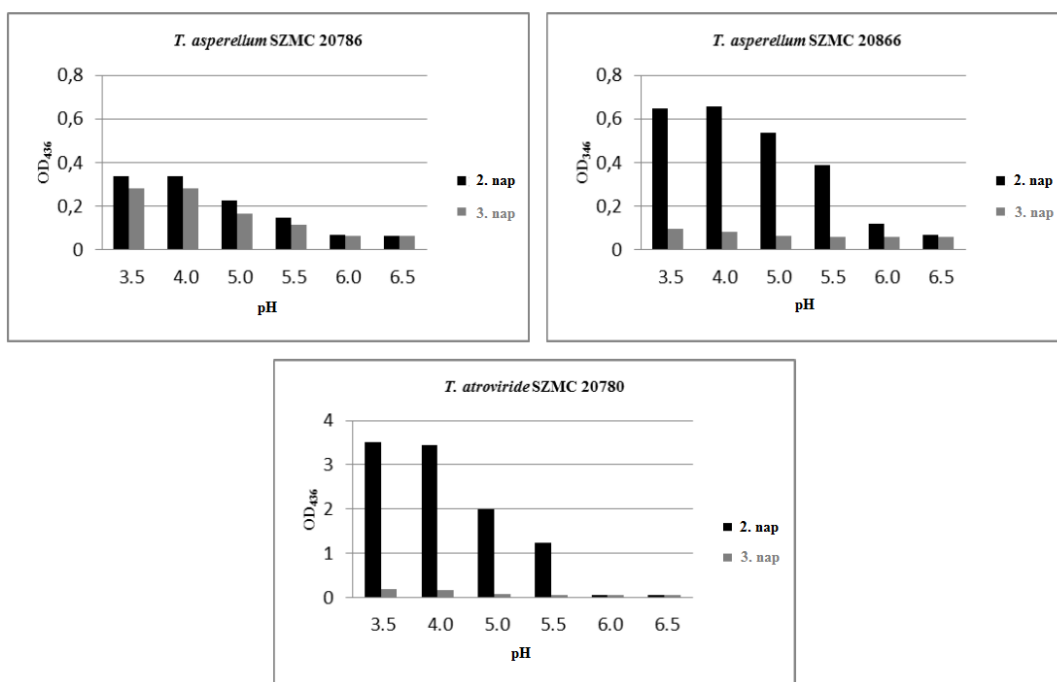


**14. ábra.** A 3 vizsgált *Trichoderma* törzs lakkáz enzimaktivitásai MEA tápoldatban.

Eredményeink alapján az ígéretes biokontroll képességekkel rendelkező THSC SZMC 20786-os törzs lakkáztermelésre való képessége révén lignocellulóz-bontási és bioremediációs potenciállal is rendelkezik.

### 6.5.3. A lakkáz-aktivitás pH-függésének kimutatása

Miután meghatároztuk, hogy a vizsgált *Trichoderma* törzsek lakkáztermelése a tenyésztés 2. illetve a 3. napján volt a legmagasabb, megvizsgáltuk a törzsek lakkáz-aktivitásainak pH-optimumát is. Mindhárom törzs esetében a 3,5-ös és a 4-es pH-értékek tekinthetők optimálisnak, 6-os pH-érték fölött pedig az aktivitások jelentős csökkenését figyelhettük meg (**15. ábra**). Eredményeinket részben alátámasztja a Chakroun és munkatársai (2010) által végzett kutatás, melyet szintén egy *T. atroviride* törzsszel folytattak, ahol a lakkáz enzim pH-optimuma 2 és 3 közöttinek bizonyult. A Sadhasivam és munkatársai (2008) által vizsgált lakkáz esetében meghatározott pH optimum 4,5-ös pH-értéknek adódott ABTS szubsztrát használata mellett. A 4,5-ös pH-érték fölött az aktivitásban folyamatos csökkenést figyeltek meg, mely az általunk vizsgált *Trichoderma* törzsekről is elmondható.



**15. ábra.** A 3 vizsgált *Trichoderma* törzs lakkáz enzimaktivitásai különböző pH-értékeken.

## 6.6. A törzsek fungicidekkel szembeni érzékenysége vizsgálat

Vizsgálataink során meghatároztuk 14 különböző fungicid *Trichoderma* törzsekkel szembeni minimális gátló koncentráció-értékeit. Az egyes törzsek esetében kapott MIC-értékeket az **3. táblázat**ban foglaltuk össze. Az eredmények alapján a rizoszférából izolált *Trichoderma* törzsek természetes toleranciával rendelkeznek a kísérletben tesztelt fungicidekkel szemben. A *T. asperellum* SZMC 20866-os törzs egyedülként az összes vizsgált fungiciddel szemben rezisztensnek bizonyult. A *T. atroviride* SZMC 20781 és a THSC SZMC 20761 jelű törzsek egy-egy fungicid iránt bizonyultak érzékenynek, előbbi az imazalilra, utóbbi pedig a tirámra. A *T. asperellum* SZMC 20786-os törzs az imazalil és a tirám iránt mutatott érzékenységet. A THSC SZMC 20869-es törzs növekedését szintén két fungicid, a spiroxamin és a tiofanát-metil volt képes kismértékben csökkenteni. A törzsek közül legérzékenyebbnek a *T. atroviride* SZMC 20781 bizonyult, növekedését a ciprokonazol, az imazalil, a penkonazol és a tiofanát-metil is gátolta.

Eredményeink alapján az egyes fungicidek gátló hatása, valamint azok hatásmechanizmusa között nem mutatható ki egyértelmű összefüggést. A fungicidek tekintetében a legtöbb érzékeny törzs az imazalil iránt mutatkozott, azonban felhasználását tekintve az imazalilt főleg citrusfélék kezelésére alkalmazzák (Eckert és mtsai., 1994), így esetünkben a törzsek biokontroll eljárásokban történő alkalmazásuk során ez nem okoz problémát.

Hatvani és munkatársai (2006) szintén *Trichoderma* törzsek (THSC T66 és *T. atroviride* T122) fungicidekkel szembeni érzékenységét vizsgálták. Eredményeik alapján a két törzs toleránsnak bizonyult karboxinnal, fludioxonillal és triadimefonnal szemben, míg az imazalil és a tiram esetében a mért MIC-értékek 100 illetve 50 µg/ml-nek bizonyultak.

Mivel a növénypatogén gombák elleni védekezés alapját a hagyományos mezőgazdaságban a kémiai védekezés jelenti (Vinale és mtsai., 2008), így ezen szerek használata a környezetre gyakorolt káros hatásaikon túl többszörös rezisztenciával rendelkező növénypatogén gombák megjelenéséhez és elterjedéséhez vezethet (Naseby és mtsai., 2000). Elad és munkatársai már 1992-ben izoláltak többszörös rezisztenciával rendelkező *Botrytis cinerea* törzset, de az első fenilamid-típusú peszticid, a metalaxil használata is rövid idő alatt számos ellenálló törzs kialakulásához vezetett (Georgopoulos, 1985).

**3. táblázat.** A biokontroll-jelölt *Trichoderma* törzsekkel szemben meghatározott MIC-értékek (µg/ml) a különböző fungicidek esetében. (Az egyes fungicidek gátló hatását piros színnel jelöltük)

	<i>T. asperellum</i> SZMC 20866	<i>T. asperellum</i> SZMC 20786	<i>T. atroviride</i> SZMC 20780	<i>T. atroviride</i> SZMC 20781	THSC SZMC 20761	THSC SZMC 20869
Karboxin	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Ciprokonazol	> 256	> 256	64	> 256	> 256	> 256
Fenhexamid	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Fludioxonil	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Flutriafol	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Folpet	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Imazalil	> 256	128	64	128	> 256	> 256
Iprodion	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Penkonazol	> 256	> 256	64	> 256	> 256	> 256
Spiroxamin	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	256
Tiofanát-metil	> 256	> 256	256	> 256	> 256	128
Tiram	> 256	256	> 256	> 256	128	> 256
Triadimefon	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Triadimenol	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256

Az ilyen jellegű vizsgálatok következtében mára nagy mennyiségű információ áll rendelkezésünkre a növénypatogén gombák fungicidekkel szembeni ellenállóképességéről. Ezzel szemben a potenciális biokontroll törzsek fungicid-rezisztenciájáról már jelentősen kevesebb adattal rendelkezünk, pedig ezek megismerése igen fontos lenne az integrált növényvédelem minél hatékonyabb alkalmazása szempontjából. Az integrált növényvédelem keretein belül fungicidrezisztens biokontroll törzsek csökkentett mennyiségű fungiciddal történő együttes alkalmazása hatékonyabb megoldást jelenthet a növénypatogén gombákkal szemben, továbbá a fungicidek környezetkárosító hatása is mérsékelhető (Chet és Inbar, 1994; Monte, 2001). Az általunk izolált és vizsgálatainkba bevont legtöbb *Trichoderma* törzs a növénypatogén gombákkal szemben mutatott *in vitro* antagonista képességeiken túl nagyfokú ellenállóképességgel rendelkezett a vizsgált fungicidekkel szemben, így sikerült potenciális jelölteket azonosítanunk a hatékony integrált növényvédelem megvalósításához. Eredményeink alapján a THSC-be tartozó törzsek kiváló celluláz- (ld. 6.4.1. fejezet) és foszfatáztermelő (ld. 6.4.2. fejezet) képességekkel rendelkező SZMC 20869-os jelű törzse mutatott a legtöbb fungiciddal szemben toleranciát, és a kiváló *in vitro* antagonista képességekkel rendelkező *T. asperellum* SZMC 20786-os törzs (ld. 6.2. fejezet) is csak a tiofanát-metillel szemben mutatott kismértékű érzékenységet. Ezek alapján a törzsek egy biológiai készítmény

szárbontó és foszformobilizáló, illetve biokontroll komponenseiként integrált növényvédelmi stratégiákban is potenciálisan alkalmazhatóak lehetnek.

#### **6.7. A *T. asperellum* SZMC 20786-os törzs paradicsomnövények növekedésére és fotoszintetikus aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata**

Mivel a jó biokontroll képességekkel rendelkező *Trichoderma* törzsek gyakran rendelkeznek növény-növekedés-serkentő képességekkel is, a paradicsomnövényeken végzett kísérletek céljaira legmegfelelőbb *Trichoderma* törzs kiválasztása a rendelkezésre álló adataink elemzése alapján történt. A kiválasztott *T. asperellum* SZMC 20786-os törzs rendelkezett a legmagasabb BCI-értékekkel számos növénypatogén gombával szemben, az ökofiziológiai vizsgálatok során széles hőmérsékleti, pH- és vízaktivitás-tartományban képes növekedni és a különféle fungicidek közül is csak az imazalilra és a tiramra bizonyult érzékenynek. A kiválasztás során azt is figyelembe vettük, hogy a szakirodalomban a legtöbbet hivatkozott és vizsgált *Trichoderma* törzset (T203; Samuels és mtsai., 2010) először THSC-ként (Kullnig és mtsai., 2001) azonosították, majd később már *T. asperellum* fajként szerepelt számos vizsgálatban (Yedidia és mtsai., 2003; Shores és mtsai., 2005; Viterbo és mtsai., 2010). Samuels és munkatársai (2010) részletes filogenetikai elemzés útján azonosítottak egy T/G bázispár-szubsztitúciót a *T. asperellum sensu lato* csoporton belül, így 3 faj elkülönítését tették lehetővé. Ezen fajok a két morfológiailag nagyon hasonló *T. asperellum sensu stricto*, valamint a *T. asperelloides*, továbbá e két fajtól morfológiailag különböző *T. yunnanense* voltak. E munkájuk kapcsán a T203-as törzset is bevonták részletes vizsgálataikba, és *T. asperelloides*-ként azonosították. A T203-as törzs rendszertani átsorolásával kapcsolatos, szakirodalomban fellelhető adatok is mind a *T. asperelloides* fajra vonatkoznak, a *T. asperellum sensu stricto* vizsgálatával ennek következtében csak kevés tanulmány foglalkozott (Brotman és mtsai., 2013; Gupta és mtsai., 2014). Az SZMC 20786 jelű törzset ITS-szekvenciája alapján *T. asperellum*-ként azonosítottuk, ezáltal lehetőségünk nyílt ezen faj részletesebb jellemzésére és növényekre gyakorolt hatásának vizsgálatára.

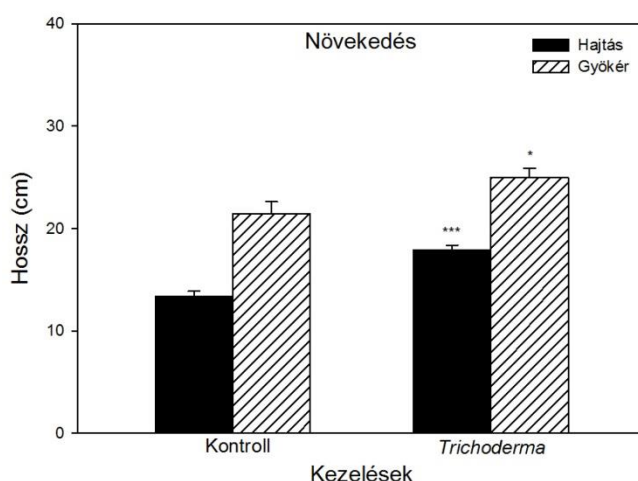
##### **6.7.1. A *T. asperellum* SZMC 20786 törzsszel történt kezelés paradicsomnövények biomassza-produkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata**

A paradicsomnövények *T. asperellum* SZMC 20786 törzsszel történő kezelését követően nyomon követtük a növények hajtás- és gyökérhosszának növekedését, melynek eredményeit a **16. ábra** foglalja össze. Eredményeink alapján a *Trichoderma*-kezelés

hatására szignifikáns gyökér-, és hajtáshossznövekedés következett be a kezeletlen kontrollnövényekhez képest.

A paradicsomnövények gyökerének és hajtásának hosszadatait követően a kontroll, valamint a kezelt növények frisstömegének összehasonlítását is elvégeztük, az így szerzett adatokat a **17. ábra** mutatja be. Az eredmények alapján mind a gyökér, mind pedig a hajtás frisstömegében jelentős növekedés következett be a *Trichoderma*-kezelés hatására a kezeletlen kontroll növényekhez képest.

Eredményeink számos kutatással összhangban állnak, melyek során már igazolták a különféle biokontroll *Trichoderma* törzsek növénynövekedés-serkentő hatását. Lindsey és Baker már 1967-ben törpe paradicsomot vizsgálva igazolták egy *T. viride* törzs pozitív hatását: a hajtás hosszában 28%-os, tömegében pedig 8%-os növekedést mértek. A rendelkezésre álló szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy az egyik legtöbbet tanulmányozott *Trichoderma* törzs, a T203 taxonómiai besorolását a legújabb adatok alapján *T. asperellum*-ról *T. asperelloides*-re módosították, a *T. asperellum sensu stricto* növekedésserkentő hatásának vizsgálatával így valójában csak kevés tanulmány foglalkozott. Qi és Zhao (2013) munkájuk során uborkanövényeket vizsgálva igazolták a *T. asperellum* Q1 törzsének növekedésserkentő hatását, mely abban az esetben is érvényesült, amikor a növényeket sóstressznek tették ki. A hajtásnövekedés mértéke a kontroll növényekhez képest elérte a 11,6%-ot, míg a növényeket sóstressznek kiteve a Q1 törzzsel történt kezelés hatására bekövetkező növekedés 38,9%-os volt.

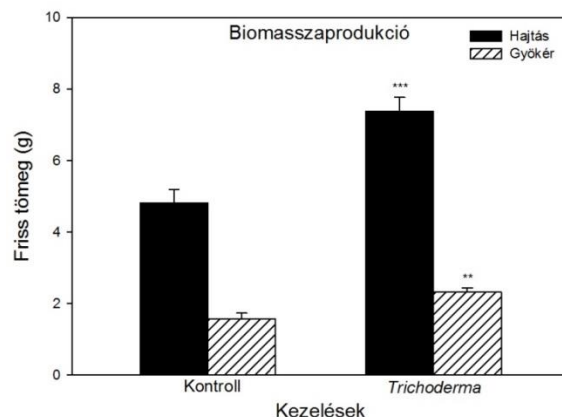


**16. ábra.** A növekedés változása paradicsomnövények levelében és gyökerében.

A mérések 6 héttel a *T. asperellum* SZMC 20786-os törzzsel történt beoltás után zajlottak (Átlag $\pm$ SE, n=10).

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.





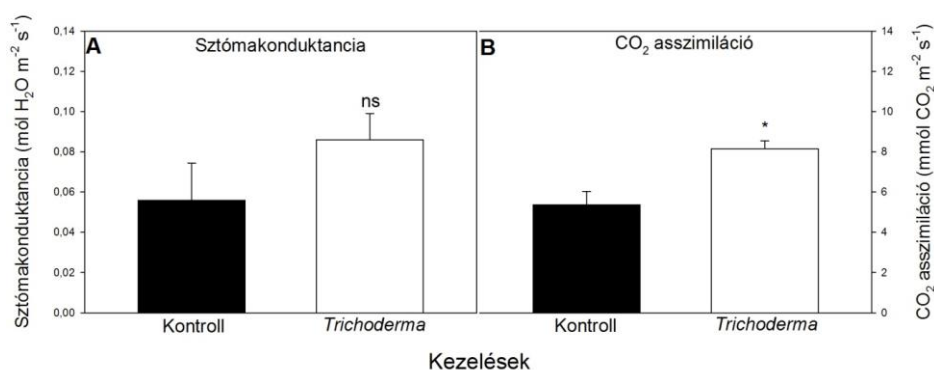
**17. ábra.** A frisstömeg változása paradicsomnövények levelében és gyökerében.

A mérések 6 héttel a *T. asperellum* SZMC 20786-os törzzsel történt beoltás után zajlottak (Átlag±SE, n=10).

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

#### 6.7.2. A *T. asperellum* SZMC 20786 törzzsel történő kezelés hatása a paradicsomnövények fotoszintetikus aktivitására

Munkánk során a *Trichoderma*-kezelést követően megvizsgáltuk a paradicsomnövények leveleiben a fotoszintézis hatékonyságát. A különféle paraméterek (sztómakonduktancia, CO<sub>2</sub> asszimiláció, klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméterek) nyomonkövetése révén megfigyelhetjük a fotoszintetikus rendszer működését. Az összcukortartalom, valamint a klorofill *a+b* és a karotinoidok tartalmának mérése a paradicsomnövények levelében további adatokkal szolgál a *Trichoderma* növényekre gyakorolt hatásairól.

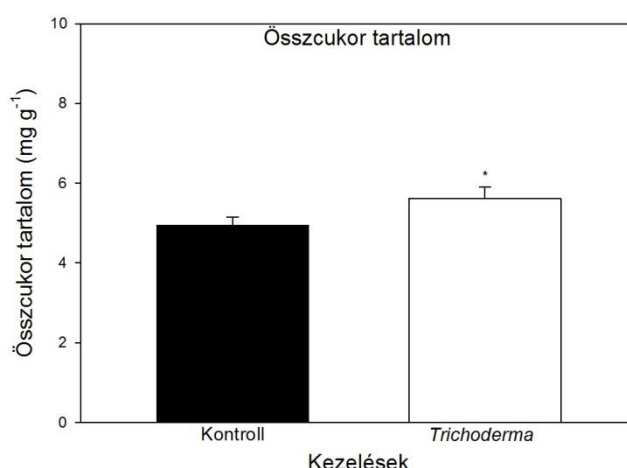


**18. ábra.** A sztómakonduktancia (A) és a CO<sub>2</sub> asszimiláció (B) változása paradicsomnövények levelében.

A mérések 6 héttel a *T. asperellum* SZMC 20786-os törzzsel történt beoltás után zajlottak (Átlag±SE, n=10).

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

A **18. ábra** mutatja a sztómakonduktancia (A), valamint a CO<sub>2</sub> asszimiláció (B) mérési eredményeit. Az összcukortartalom meghatározásából származó adatokat a **19. ábrán** tüntettük fel. A *T. asperellum* SZMC 20786 törzzsel történő kezelés hatására a sztómakonduktancia nőtt a kontroll növényekhez képest. Habár ez a növekedés nem mondható szignifikánsnak, mégis arra utal, hogy a sztómák nyitottsága hozzájárulhat a CO<sub>2</sub> asszimilációjának növekedéséhez, ami a növekedési adatokkal (**17. ábra**) együtt hatékonyabb fotoszintetikus aktivitásra és biomassza-produkcióra utal. Mivel a fotoszintézis végtermékei különféle cukrok, így ezt az összcukortartalomban bekövetkező növekedés (**19. ábra**) is megerősíti. Eredményeink összhangban vannak Doni és munkatársai (2014) által elvégzett kísérletek eredményeivel, akik rizsnövények kezelését végezték el *Trichoderma* izolátumokkal, és a növekedésserkentésen túl a CO<sub>2</sub> asszimiláció és a sztómakonduktancia növekedését is megfigyelték a kezelés hatására.

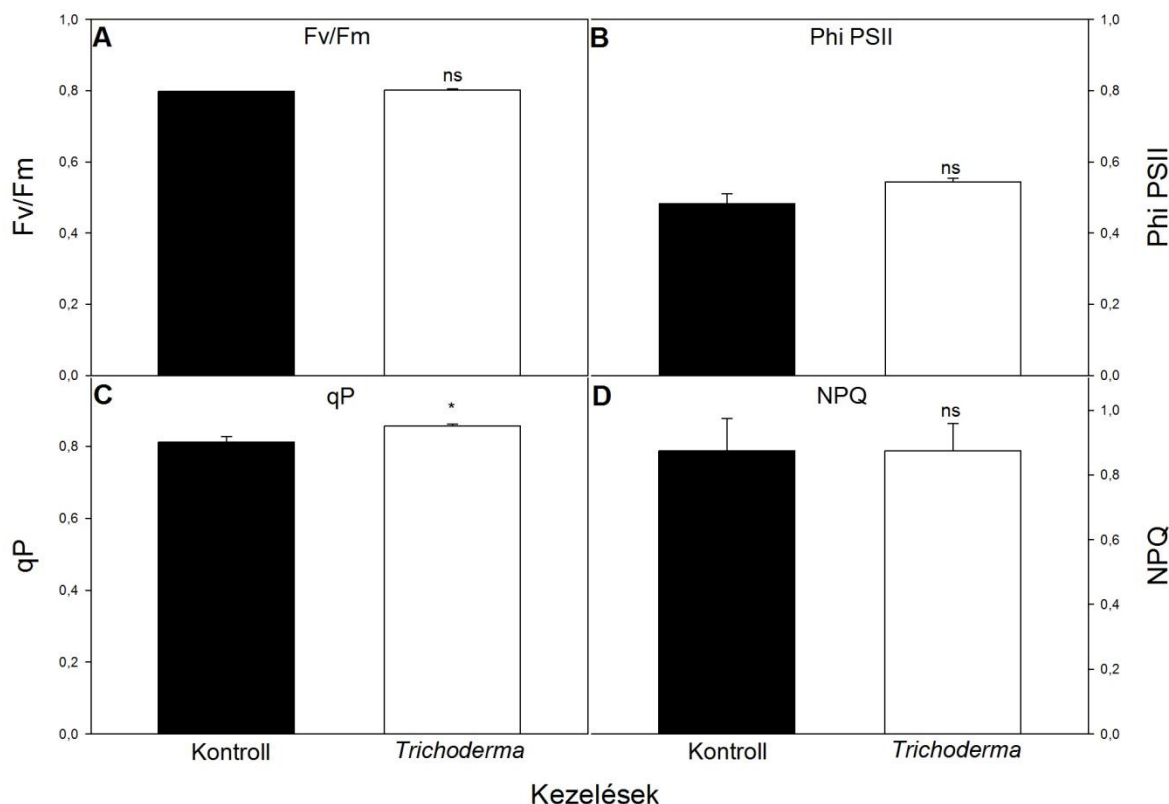


**19. ábra.** Az összcukortartalom változása paradicsomnövények levelében.

A mérések 6 héttel a *T. asperellum* SZMC 20786-os törzzsel történt beoltás után zajlottak (Átlag±SE, n=10).

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek.

Szintén a fotoszintetikus apparátusban bekövetkező változásokra utalhat a klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereinek megváltozása, melyek vizsgálatából származó adatokat a **20. ábrán** foglaltuk össze. A második fotokémiai rendszer (PSII) reakciócentrumainak maximális kvantumhasznosításában ( $F_v/F_m$ ), a második fotokémiai rendszer effektív kvantumhasznosításban ( $\Phi$  PSII), a fotokémiai kioltásban ( $qP$ ), valamint a hődisszipáció mértékében nem mutattunk ki jelentős változást a *Trichoderma*-kezelés hatására.

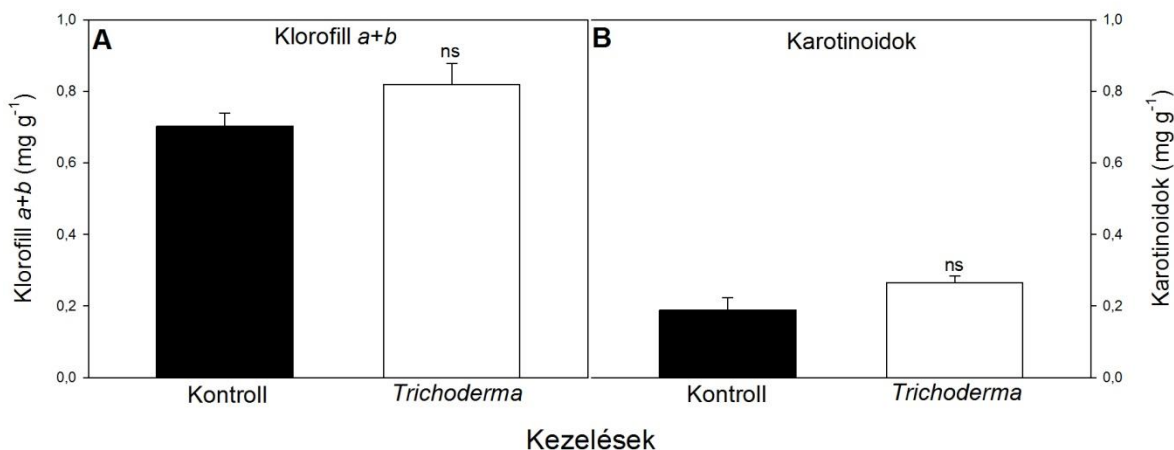


**20. ábra.** A klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméterek (A: Fv/Fm; B: Phi PSII; C: qP; D: NPQ) változása paradicsomnövények levelében.

A mérések 6 héttel a *T. asperellum* SZMC 20786-os törzzsel történt beoltás után zajlottak (Átlag $\pm$ SE, n=10).

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

Míg a fotoszintetikus apparátusban nem, addig a paradicsomnövények *Trichoderma*-kezelésének hatására a fotoszintetikus pigmentek (klorofill *a+b*, karotinoidok) szintjében növekedést tapasztaltunk (**21. ábra**). Bár ez az emelkedés nem bizonyult szignifikánsnak, mégis összhangban van a szakirodalmi adatokkal. Korábbi tanulmányokban már leírták különböző *Trichoderma* izolátumok fotoszintetikus pigmentekre gyakorolt pozitív hatását paradicsomnövényeken (Azarmi és mtsai., 2011), továbbá igazolták THSC esetében búza- (Al-Ezerjawi és Kadhim, 2014), valamint *T. hamatum* esetében mungóbabnövényeken is (Badar és Qureshi, 2012).



**21. ábra.** A klorofill *a+b* (A) és a karotinoidok (B) tartalmának változása paradicsomnövények levelében.

A mérések 6 héttel a *T. asperellum* SZMC 20786-os törzzsel történt beoltás után zajlottak (Átlag±SE, n=10).

A \*-gal jelölt kezelt minták a kezeletlen kontrolltól  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*) vagy 0,001 (\*\*\*) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek (ns: nem szignifikáns).

#### 6.8. Növényvédő és növénynövekedést serkentő bioeffektor *Trichoderma* törzsek kiválasztása, termékfejlesztés

Eredményeink alapján a kiváló *in vitro* antagonista képességekkel, lakkáztermelő képességgel, széles körű fungicidrezisztenciával és paradicsomnövények növekedésének serkentésére való képességgel rendelkező *T. asperellum* SZMC 20786-os törzset, valamint a kiváló celluláz- és foszfátáztermelő képességekkel rendelkező, fungicidekkel szemben polirezisztens THSC SZMC 20869-os törzset választottuk ki egy többkomponensű bioeffektor készítmény fejlesztésének céljára. A törzseket egy humuszképzésre szelektált, kiváló peroxidáz-termelő képességekkel rendelkező *Streptomyces albus* törzzsel és egy nitrogénkötésre szelektált, nitrogénforrás-mentes táptalajon is növekedni képes *Azotobacter vinelandii* törzzsel együtt átadtuk a szegedi székhelyű BioGO Kft.-nek (bioego.hu) egy többkomponensű mikrobiális bioeffektor talajjavító készítmény kifejlesztése céljából, melynek folyamatát nyomon követtük és szakmai tanácsadással segítettük. A két *Trichoderma* izolátum és két baktériumtörzs fermentációjának optimalizálását a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft. munkatársai végezték. A termék prototípusának engedélyeztetési vizsgálatait a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezetvédelmi Igazgatóságának Pécsi Talajbiológiai Laboratóriumában történtek, melyek során a mikrobiológiai készítmény csernozjom talajon növelte a talaj nitrogén-, foszfor- és káliumtartalmát, barna erdőtalajon

pedig a kontrollhoz viszonyítva több mint 7%-kal növelte a tarlóbontó aktivitást. Az engedélyeztetést követően a termék „BioeGO talajorganizátor” néven került forgalomba 2015-ben (**22. ábra**). Az azóta Dél-alföldi Innovációs Díjjal elismert termékkel a Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Karának munkatársai szántóföldi kísérleteket végeztek sárgarépa kultúrában, melyek során a műtrágyakezelt kontroll területhez képest a műtrágyakezelést BioeGO-val kiegészítve hektáronként 20,91 tonnás termésmennyiség-növekedést mértek, ami 17,87%-os növekedésnek felelt meg. A szerves trágyával kezelt kontroll területhez képest pedig a szerves trágya-kezelést BioeGO-val kiegészítve a karotintartalomban 40%-os növekedést mértek.



**22. ábra.** A BioeGO talajorganizátor.

A zöld színű kupakkal jelzett kannában a két *Trichoderma* törzs található, míg a sárga kupakkal jelöltben az *Azotobacter* és a *Streptomyces* törzsek.

A készítmény felhasználásával kapcsolatban sárgarépa (**23. ábra**), kukorica (**24. ábra**), paprika, petrezselyem (**23. ábra**), retek, földieper, napraforgó (**25. ábra**), paradicsom és dohány esetében egyaránt pozitív visszajelzések érkeztek a gazdálkodók részéről. A vizsgálatok során a készítmény kijuttatása az öntözővízzel, vagy traktor segítségével a talaj felszínére permetezve, majd szántás segítségével a talajba forgatással történt. További vizsgálatok szükségesek annak feltérképezése céljából, hogy a BioeGO egyes *Trichoderma*- és baktériumkomponensei milyen mértékben járulnak hozzá a készítmény hatékonyságához a különböző növénykultúrákban.





**23. ábra.** A BioeGO talajorganizátor pozitív hatása sárgarépa és petrezselyen esetében.



**24. ábra.** A BioeGO talajorganizátor pozitív hatása kukorica esetében.



**25. ábra.** A BioeGO talajorganizátor pozitív hatása napraforgó esetében.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Trichoderma* nemzetség képviselői kozmopoliták, világszerte elterjedtek és a különféle ökoszisztémák állandó tagjai, mivel a rendelkezésre álló tápanyagok széles körben történő hasznosítására képesek, továbbá magas reprodukzív kapacitással és hatékony kompetitív tulajdonságokkal rendelkeznek. Számos *Trichoderma* faj jelentős hatást gyakorol az emberi jólétre, alkalmazásukra ezért számos lehetőség nyílik. Közülük kerülnek ki a leggyakrabban használt biofungicidek és növénynövekedés-serkentők, ezen túl számos iparág által hasznosított extracelluláris enzimek forrásai is. Változatos másodlagos metabolitok termelésére képesek, néhány fajuk klinikai jelentőséggel rendelkezik, míg mások a talaj bioremediációjában játszanak szerepet. A modern mezőgazdaságban a sikerek ellenére még mindig számos olyan gyakorlat létezik, amelyek a növényeket érintő betegségek kialakulásának kockázatát növelik. További problémákat vet fel a túlzott műtrágyahasználat, valamint a fertőzni képes növénypatogén gombák (*Pythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*) jelenléte a talajban, melyek kártétele évről évre egyre jelentősebb. Ezen gombakártevők ellen történő védekezés elsősorban különböző vegyszerek alkalmazásával történik („*chemical control*”). A kémiai szerek környezetkárosító hatásán túl komoly problémát jelent a patogének körében megjelenő rezisztencia is. Napjainkban ezért egyre nagyobb érdeklődés övezi a különböző alternatív mezőgazdasági technikákat, melyekkel lehetőség nyílik a biológiai alapú növényvédelemre („*biocontrol*”). Napjainkra számos baktérium-, és gombaalapú biokontroll készítmény vált elérhetővé, melyek komponensei között a *Trichoderma* nemzetség képviselői is nagyszámban megtalálhatóak. A nemzetségen belül a *T. virens* és *T. viride* fajok, valamint a THSC képviselői a leggyakrabban alkalmazott biokontroll ágensek. A *Trichoderma* törzsek, mint biokontroll ágensek sikere számos kedvező tulajdonságukon alapul. Ilyen a magas reprodukzív kapacitás, a kedvezőtlen körülmények nagyfokú tolerálása, és hogy kiváló hatékonysággal képesek a különféle tápanyagok hasznosítására, továbbá a rizoszféra kolonizációjára. Ezek a többségében talajban előforduló mikroorganizmusok sikerrel kerültek kereskedelmi forgalomba annak érdekében, hogy növeljék a terméshozamot a növény növekedésének serkentése, és a széles körben elterjedt növénykórokozókkal (baktériumok, gombák, oomycoták) szembeni biológiai védekezés révén.

Munkánk során célul tűztük ki *Trichoderma* törzsek izolálását és molekuláris módszerekkel történő azonosítását Magyarországon termesztett zöldségek rizoszférájából, az izolált törzsek részletes jellemzését *in vitro* antagonista képességeik felmérésével,



valamint különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, pH, vízaktivitás) micéliumnövekedésre gyakorolt hatásának vizsgálatával. Céljaink között szerepelt továbbá az ígéretes törzsek cellulózbontó és foszfátmobilizáló képességeinek vizsgálata, lakkáz enzim termelésére való képességük felmérése, különféle fungicidekkel szembeni érzékenyséjük vizsgálata, valamint a legígéretesebb törzs növénynövekedés-serkentő hatásának felmérése is.

A Magyarországon termesztett zöldségek rizoszférájából származó 16 mintából összesen 45 *Trichoderma* törzset izoláltunk. A törzsek ITS szekvencián alapuló azonosítását követően a *Trichoderma* izolátumokat 10 különböző fajba tudtuk besorolni. A törzsek között legnagyobb számban a THSC képviselőit sikerült azonosítanunk (55,6%). Izolátumaink között a második leggyakoribb fajnak a *T. pleuroticola* adódott, ami a laskagomba zöldpenészes megbetegedését okozó fajként ismert. Azonosítottunk továbbá *T. longibrachiatum*/*T. orientale* és *T. citrinoviride* törzseket is, melyek legyengült immunrendszerű emberekben opportunistáknak humán patogénként képesek fertőzéseket, mikózisokat kiváltani. Fentiek mellett még a *T. koningiopsis*/*T. ovalisporum*, *T. hamatum*, *T. virens* és *T. gamsii* taxonok képviselőit azonosítottuk paradicsom-, sárgarépa-, saláta- és paprikarizoszféra-minták esetében.

A *Trichoderma* törzsek biokontroll aktivitásának *in vitro* vizsgálatát agar-konfrontációs tesztek segítségével végeztük el, majd ezt követően biokontroll index (BCI) értékeket határoztunk meg. A vizsgált növénypatogén gombákkal szemben mért legmagasabb BCI-értékeket a két *T. asperellum* törzs esetében mértük. Mindkét törzs 3-3 növénypatogén gomba ellen bizonyult a leghatásosabb *Trichoderma* izolátumnak. A *T. asperellum* SZMC 20866 két FSSC-be tartozó törzzsel (SZMC 11057F és SZMC 11064F), valamint a *P. cucurbitacearum* törzzsel szemben, a *T. asperellum* SZMC 20786 pedig a vizsgálatainkba bevont másik két FSSC izolátummal (SZMC 11067F és SZMC 11070F), valamint az *A. alternata* SZMC 16085 törzzsel szemben mutatta a legnagyobb BCI-értékeket.

Tizennégy, részletes jellemzésre kiválasztott törzs esetében elvégeztük különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, pH és vízaktivitás) micéliumnövekedésére gyakorolt hatásának felmérését. A különböző hőmérsékleti értékek hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy 5 °C-on egyik *Trichoderma* törzs sem mutatott növekedést, és 10 °C-on is csak két törzsnél mutattunk ki csekély mértékű növekedést (*T. hamatum* SZMC 20784, *T. longibrachiatum* SZMC 20788). 15 °C-on a törzsek kismértékű növekedést mutattak, azonban hőmérsékleti optimumuk átlagosan 20 és 30 °C között volt

megfigyelhető. A hőmérséklet további növelésével 35 illetve 40 °C-on egyre csökkent a törzsek növekedése. A *T. citrinoviride* és a *T. longibrachiatum* törzsek micéliumnövekedése 35 és 40 °C között is megfigyelhető, e két faj képviselői ezért potenciális humán patogénként kezelendők. A különböző pH-értékek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a törzsek igen széles pH-tartományban mutattak növekedést. Az összes *Trichoderma* törzs esetében a növekedés optimumának a 3-as illetve 5-ös pH-érték bizonyult. A vizsgált izolátumok esetében 4-es pH-érték fölött a növekedés intenzitásának jelentős csökkenését figyeltük meg. A vízakaktivitás hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a *Trichoderma* törzsek több, mint fele 0,997-es  $a_w$ -értéken mutatott optimális növekedést, míg a többi törzs esetében a 0,991-es  $a_w$ -érték bizonyult optimálisnak. A vízakaktivitás folyamatos csökkenésével a törzsek telepátmérője is egyre csökkent, 0,945-ös  $a_w$ -értéken már csak 3 törzs mutatott növekedést, míg 0,922-es  $a_w$ -értéken már egyik törzs sem volt képes növekedni.

A *Trichoderma* törzsek cellulózbontó és foszfátmobilizáló képességének vizsgálatát szintetikus minimál, és kukoricaszár-őrleményt tartalmazó tápoldatokban történő rázatott tenyésztést követően a micéliumoktól elválasztott fermentlevekben végeztük. Minimál tápoldatban a legmagasabb cellobiohidroláz és  $\beta$ -glükózidáz alapaktivitással a THSC SZMC 20761 és *T. hamatum* SZMC 20784 törzsek rendelkeztek, viszont ezen törzsek enzimtermelése jelentősen visszaesett kukoricaszár-őrleményes tápoldatban. A minimál tápoldatban a fenti két törzsnél alacsonyabb, de összességében így is a 3. legmagasabb cellobiohidroláz és  $\beta$ -glükózidáz alapaktivitással rendelkező THSC SZMC 20869 törzs enzimtermelése viszont drasztikusan megemelkedett a kukoricaszár-őrleményes tápoldatban. A vizsgált *Trichoderma* törzsek közül foszfátáz aktivitást minimál tápoldatban egyik törzs esetében sem tapasztaltunk, míg kukoricaszár-őrleményes tápoldatban szintén a THSC SZMC 20869 törzs mutatta a legmagasabb foszfátáz aktivitást.

A rizoszféra-mintákból származó *Trichoderma* törzsek lakkáz enzimek termelésére való képességének vizsgálatát ABTS, illetve gvajakol szubsztrátokkal kiegészített táptalajokon végeztük. A módszer segítségével az izolált *Trichoderma* törzsek között összesen 3 törzset azonosítottunk, melyek erős lakkáztermelő képességet mutattak (*T. asperellum* SZMC 20786 és SZMC 20866; *T. atroviride* SZMC 20780). Ezen törzsek esetében megállapítottuk, hogy a tenyésztés 2. napján volt a legmagasabb a relatív lakkáz-aktivitás. A 3 törzs közül a *T. atroviride* SZMC 20780 esetében 3 nagyságrenddel nagyobb lakkáz-aktivitást mértünk, mint a másik két törzs esetében. Miután megállapítottuk, hogy a vizsgált törzsek lakkáztermelése a tenyésztés 2. illetve 3. napján volt a legmagasabb,

megvizsgáltuk a törzsek lakkáz-aktivitásainak pH-optimumát is. Mindhárom törzs esetében a 3,5-ös és a 4-es pH-érték tekinthető optimálisnak, 6-os pH érték fölött pedig a lakkáz aktivitások jelentős csökkenését figyelhettük meg.

Vizsgálataink során meghatároztuk 14 különböző fungicid *Trichoderma* törzsekkel szembeni minimális gátló koncentráció-értékeit. Az eredményeink alapján a rizoszférából izolált *Trichoderma* törzsek természetes toleranciával rendelkeznek a kísérletben tesztelt fungicidekkel szemben. A fungicidek tekintetében a ciprokonazol, az imazalil, a penkonazol, a spiroxamin, a tiofanát-metil és a tirám esetében sikerült gátló hatást kimutatnunk.

Munkánk során vizsgáltuk a *T. asperellum* SZMC 20786 törzs paradicsomnövényekre gyakorolt növény-növekedést serkentő hatását. Eredményeink alapján a *Trichoderma*-kezelés hatására szignifikáns gyökér-, és hajtáshossz-növekedés következett be a kezeletlen kontrollnövényekhez képest. Ez a pozitív hatás a frisstömeg-adatokban is jelentkezett. A kezelést követően megvizsgáltuk a paradicsomnövények leveleiben a fotoszintézis hatékonyságát, az össz cukortartalom, valamint a klorofill *a+b* és a karotinoidok tartalmának mérése alapján. A sztómakonduktancia és a CO<sub>2</sub>-asszimiláció értékek esetében mért növekedések a fotoszintézis indukciójára utalnak, melyet megerősít az össz cukortartalomban mért növekedés is.

Eredményeink alapján két *Trichoderma* törzset választottunk ki egy többkomponensű bioeffektor készítmény fejlesztésének céljára: az egyik törzs a kiváló *in vitro* antagonista képességekkel, lakkáztermelő képességgel, széles körű fungicidrezisztenciával és paradicsomnövények növekedésének serkentésére való képességgel rendelkező *T. asperellum* SZMC 20786-os törzs, a másik pedig a kiváló celluláz- és foszfataáztermelő képességekkel rendelkező, fungicidekkel szemben polirezisztens THSC SZMC 20869-os törzs. A tervezett bioeffektor készítményt kiegészítettük egy humuszképzésre szelektált, kiváló peroxidáz-termelő képességekkel rendelkező *Streptomyces albus* törzsszel és egy nitrogénkötésre szelektált, nitrogénforrás-mentes táptalajon is növekedni képes *Azotobacter vinelandii* törzsszel. A törzseket átadtuk a BioeGO Kft.-nek. Az engedélyeztetést követően a termék „BioeGO talajorganizátor” néven került forgalomba 2015-ben, melyet azóta a Dél-alföldi Innovációs Díjjal is elismertek.

## 8. SUMMARY

Members of the genus *Trichoderma* are cosmopolitan fungi, widespread throughout the world as permanent members of different ecosystems. They can utilize wide scale of available nutrients and possess high reproductive capacity and competitive properties. A number of *Trichoderma* species has a significant impact on human welfare and numerous opportunities for application. They are the most commonly used biofungicides and plant growth promoters and they are also good resources of extracellular enzymes that can be used by several industries. *Trichoderma* species produce wide range of different secondary metabolites. Some species of the genus have clinical importance while others play roles in soil bioremediation. Despite the success of modern agriculture, there are still a lot of practices (e.g. excessive use of inorganic fertilizers) that increase the risk of diseases affecting plants. Moreover, plant pathogenic fungi present in the soils may raise further problems. The damages caused by *Pythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* and *Fusarium* species are increasing from year to year. The application of different chemicals (chemical control) is predominant to control their growth, however, these chemicals have negative environmental impacts and the emergence of resistant strains is also a serious problem. Nowadays there is a growing interest towards the alternative agricultural techniques, as they can provide e. g. a good opportunity for biological control. A number of bacterial- and fungal-based biocontrol products became available and a high incidence of *Trichoderma* strains can be observed among them. Within the genus *Trichoderma*, the species *T. virens*, *T. viride* and the THSC species complex are the most frequently used biocontrol agents. The success of *Trichoderma* species as biocontrol agents is based on their numerous positive properties such as the high reproductive capacity and a high degree of tolerance of adverse condition. They have high efficiency to utilize various nutrients as different carbon sources and the capability to colonize the rhizosphere. These mostly soilborne fungi have been marketed successfully in order to increase the crop yield by their plant growth promoting effects and biocontrol abilities against plant pathogenic microorganisms (bacteria, fungi, oomycetes).

The aims of this study were to isolate *Trichoderma* strains from Hungarian vegetable rhizosphere samples, to identify the isolates by molecular tools, and to characterize the strains via the assessment of their *in vitro* antagonistic capabilities and investigation of the effects of various environmental factors (temperature, pH, water activity) on their mycelial growth. Our aims also included the investigation of the cellulose-degrading and phosphate-mobilizing capabilities of the most promising strains, as

well as the examination of their laccase production and their sensitivity to different fungicides. Finally we aimed to study the plant growth promoting effect of the most promising strain.

Altogether we isolated 45 *Trichoderma* strains from 16 vegetable rhizosphere samples collected in Hungary. Based on ITS-sequence analysis we could identify 10 different *Trichoderma* species. The most abundant taxon among the isolates was the THSC species complex (55.6%). The species *T. pleuroticola* - known as one of the causal agents of oyster mushroom green mould disease - was the second most common species. We also identified representatives of the *T. longibrachiatum*/*T. orientale* and *T. citrinoviride* species. These strains are potential opportunistic human pathogens and may cause infections and mycoses in immunocompromised patients. In addition to the above mentioned species, we also isolated *T. koningiopsis*/*T. ovalisporum*, *T. hamatum*, *T. virens* and *T. gamsii* strains from tomato, carrot, salad, and paprika rhizosphere samples.

In order to describe the *in vitro* antagonistic abilities of the *Trichoderma* strains, we performed dual confrontation assays and determined the biocontrol index (BCI) values. The highest BCI values against the tested plant pathogenic fungi were determined in the case of the two *T. asperellum* strains. Both of these strains proved to be the most effective against 3-3 plant pathogenic fungi: *T. asperellum* SZMC 20866 was the most effective against FSSC SZMC 11057F, SZMC 11064F and *P. cucurbitacearum*, while *T. asperellum* SZMC 20786 was the most effective against the other two FSSC isolates (SZMC 11067F and SZMC 11070F) and *A. alternata* SZMC 16085.

We studied the effects of various environmental factors (temperature, pH, water activity) on the mycelial growth in the case of 14 *Trichoderma* strains selected for detailed characterisation. None of the examined *Trichoderma* strains could grow at 5 °C and only 2 strains (*T. hamatum* SZMC 20784, *T. longibrachiatum* SZMC 20788) were able to grow at 10 °C. The strains showed slight growth at 15 °C, while the optimal growth temperatures were between 20 and 30 °C. The mycelial growth of the strains decreased gradually by rising the temperature to 35 and 40 °C. We should treat *T. citrinoviride* and *T. longibrachiatum* strains as potential human pathogens, as they are able to grow between 35 and 40 °C. The *Trichoderma* strains showed mycelial growth in a wide range of pH values. All strains had their pH optima at 3 or 5. Decreased mycelial growth was observed above pH 4. In the case of water activity, more than half of the examined strains showed optimal growth at the  $a_w$  value of 0.997, whereas the growth optimum was at 0.991 in the case of the remaining strains. When the water activity was decreased, the diameters of the colonies

decreased as well. Only 3 strains showed growth at  $a_w$  0.945, while none of them could grow at 0.922.

The cellulose degrading and phosphate mobilizing capabilities of the selected *Trichoderma* strains were examined on liquid minimal and corn stem powder containing media. The mycelium-free ferment broths were used for the enzyme activity measurements. In liquid minimal medium, strains THSC SZMC 20761 and *T. hamatum* SZMC 20784 had the highest cellobiohydrolase and  $\beta$ -glucosidase activities, however, the enzyme productivity of these strains decreased in corn stem powder containing liquid medium. The enzyme production of THSC SZMC 20869 increased dramatically in corn stem powder containing liquid medium, but in minimal liquid medium its cellobiohydrolase and  $\beta$ -glucosidase activities were lower than that of the previously mentioned two strains. None of the examined *Trichoderma* strains showed phosphatase activities in minimal liquid medium. In corn stem powder containing liquid medium, THSC SZMC 20869 had the highest phosphatase activity.

The laccase production capability of *Trichoderma* strains derived from rhizosphere samples were studied on Petri plates containing a medium supplemented with ABTS or guaiacol as substrate. Three laccase-producing *Trichoderma* strains (*T. asperellum* SZMC 20786, SZMC 20688 and *T. atroviride* SZMC 20780) could be identified. The relative laccase activities of these strains were the highest on the second day of the fermentation. *T. atroviride* SZMC 20780 showed 3 fold higher laccase activities than the *T. asperellum* strains. We used ferment broths derived from the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> day of fermentation for the determination of the pH optimum of the laccase enzymes. The optimum pH for the laccases produced by the above mentioned *Trichoderma* strains were pH 3.5 and 4. We could measure a decrease in laccase activities above pH 6.

We determined the MIC values of 14 fungicides towards the selected *Trichoderma* strains. Our results showed that these rhizosphere-derived *Trichoderma* strains possess natural tolerance against the tested fungicides. Only 6 fungicides (cyproconazol, imazalil, penconazol, spiroxamine, thiophanate-methyl, thiram) showed inhibitory effects towards the examined *Trichoderma* strains.

We studied the plant growth promoting effect of *T. asperellum* SZMC 20786 strain on tomato plants. Significant growth in the length of shoots and roots could be detected. This positive effect was present in the case of plant fresh weight. After the treatment with *Trichoderma*, the photosynthetic efficacy of the plants was examined. We also collected data about the total sugar, chlorophyll *a+b* and carotenoid contents of the tomato plants.

The increased stomatal conductance and CO<sub>2</sub> assimilation, as well as the higher total sugar content suggest that the photosynthesis was induced in the tomato plants after the *Trichoderma* treatment.

Based on our results, 2 *Trichoderma* strains were selected as the components of a composite bioeffector product. The first one was *T. asperellum* SZMC 20786, a strain possessing excellent *in vitro* antagonistic and laccase-producing capabilities as well as tolerance towards a wide range of fungicides and plant growth promoting effects in tomato, while the second one was THSC SZMC 20869, a strain with the ability to produce high amounts of cellulase and phosphatase enzymes and polyresistance to the tested fungicides. The planned bioeffector product has been amended with a *Streptomyces albus* strain with excellent peroxidase-producing abilities as a humus-producing component, and an *Azotobacter vinelandii* strain with the capability to grow on nitrogen source-free medium, thus having the potential to provide excess nitrogen for crops. The previously mentioned strains were provided to the BioeGO Ltd. After the licencing of the product, it was named as “BioeGO soil organizer” and introduced into the market in 2015. Since then the product was recognised with the Southern Plain’s Innovation Award.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Al-Ezerjawi, N. H. és Kadhim, J. H. (2014). Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on total nitrogen, chlorophyll a and b contents and yield of wheat (*Triticum aestivum*. L) Class Eba'a-95. *Int J Sci Res*, 3(8), 1078-1083.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. és Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol*, 65(7), 2926-2933.
- Anderson, N. A. (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Ann Rev Phytopathol*, 20(1), 329-347.
- Antal, Z., Kredics, L., Pakarinen, J., Dóczi, I., Andersson, M., Salkinoja-Salonen, M., Manczinger, L., Szekeres, A., Hatvani, L., Vágvolgyi, C. és Nagy, E. (2005). Comparative study of potential virulence factors in human pathogenic and saprophytic *Trichoderma longibrachiatum* strains. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 52(3-4), 341-350.
- Azarmi, R., Hajieghrari, B. és Giglou, A. (2011). Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *Afr J Biotechnol*, 10(31), 5850-5855.
- Badar, R. és Qureshi, S. A. (2012). Comparative effect of *Trichoderma hamatum* and host-specific *Rhizobium* species on growth of *Vigna mungo*. *J Appl Pharm Sci*, 2(4), 128-132.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L. és Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J Exp Bot*, 60(11), 3279-3295.
- Baek, J. M., Howell, C. R. és Kenerley, C. M. (1999). The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet*, 35(1), 41-50.
- Beileski, R.L. (1973). Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24, 225-252.
- Benhamou, N. és Chet, I. (1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol*, 63(5), 2095-2099.



- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. és Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*, 7(4), 249-260.
- Bhattacharya, P. és Jain, R.K. (2000). Phosphorus solubilizing biofertilizers in whirlpool of rock phosphate - challenges and opportunities. *Fertil News* 45(10), 45-72.
- Bilger, W. és Björkman, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynt Res*, 25, 173-185.
- Bilger, W. és Schreiber, U. (1986). Energy-dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynt Res*, 10, 303-308.
- Bissett, J. (1991a). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot* 69(11), 2357-2372.
- Bissett, J. (1991b). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can J Bot*, 69(11), 2373-2417.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A. és Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003221.
- Buchert, J., Oksanen, T., Pere, J., Siika-Aho, M., Suurn-kki, A. és Viikari, L. (1998). Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma & Gliocladium*, Taylor & Francis, London, pp. 343–363.
- Calvet, C., Pera, J. és Barea, J. M. (1993). Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant Soil*, 148(1), 1-6.
- Cardoso Lopes, F.A., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M., Brandao, R. S., Monteiro, V. N., Junior, M. L., Guedes Coelho, A. S., Ulhoa, C. J. és Silva, R. N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biol*. 116, 815–824.
- Chacón, M. R., Rodríguez Galán, O., Benítez Fernández, C. T., Sousa, S., Rey, M., Llobell González, A. és Delgado Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol*, 10(1), 19-27.

- Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhouib, A. és Sayadi, S. (2010). Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochem*, 45(4), 507-513.
- Chamberlain, H. L., Rossman, A. Y., Stewart, E. L., Ulvinen, T. és Samuels, G. J. (2004). The stipitate species of *Hypocrea* (Hypocreales, Hypocreaceae) including *Podostroma*. *Karstenia*, 44, 1-24.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E. és Samuels, G. J. (2003a). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95(6), 1100-1140.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J. és Geiser, D. M. (2003b). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol*, 27(2), 302-313.
- Chaverri, P. és Samuels, G. J. (2002). *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. *Mycol Progr*, 1(3), 283-286.
- Chaverri, P. és Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud Mycol* 48(48), 1-116.
- Chet, I. és Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* 48, 37-43.
- Chet, I., Inbar, J. és Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: *The Mycota IV: environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 165-184.
- Chirife, J. és Resnik, S. L. (1984). Unsaturated solutions of sodium chloride as reference sources of water activity at various temperatures. *J Food Sci*, 49, 1486-1488.
- Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Suero, M., Sánchez-López, V. és Ramírez-Lepe, M. (2013). Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. *Afr J Biotechnol* 10(52), 10657-10663.
- Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Suero, M., Sánchez-López, V. és Ramírez-Lepe, M. (2014). *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif & Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. *Afr J Microbiol Res*, 8(16), 1704-1712.

- Cutler, H. G., Cox, R. H., Crumley, F. G. és Cole, P. D. (1986). 6-Pentyl- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agr Biol Chem*, 50(11), 2943-2945.
- Cutler, H. G., Himmelsbach, D. S., Arrendale, R. F., Cole, P. D. és Cox, R. H. (1989). Koninginin A: a novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. *Agr Biol Chem*, 53(10), 2605-2611.
- Danielson, R. M. és Davey, C. B. (1973a). Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma in vitro*. *Soil Biol Biochem*, 5(5), 517-524.
- Danielson, R. M. és Davey, C. B. (1973b). Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol Biochem*, 5(5), 495-504.
- Datnoff, L. E., Nemec, S. és Pernezny, K. (1995). Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biol Control*, 5(3), 427-431.
- Davidse, L. C. (1973). Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. *Pestic Biochem Phys*, 3(3), 317-325.
- Degenkolb, T., Dieckmann, R., Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Theis, C., Zafari, D., Chaverri, P., Ismaiel, A., Brückner, H., von Döhren, H., Thrane, U., Petrini, O. és Samuels, G. J. (2008). The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycol Progr*, 7(3), 177-219.
- Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Berg, A., Nirenberg, H. I., Gams, W. és Brückner, H. (2006). Peptaibiotics: screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chem Biodivers*, 3(6), 593-610.
- Delgado-Jarana, J., Pintor-Toro, J. A. és Benítez, T. (2000). Overproduction of  $\beta$ -1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. *Biochim Biophys Acta - Prot Struct Mol Enzymol*, 1481(2), 289-296.
- Delgado-Jarana, J., Sousa, S., Gonzalez, F., Rey, M. és Llobell, A. (2006). ThHog1 controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 152(6), 1687-1700.
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C. K., Broadway, R. M. és Harman, G. E. (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with cliotoxin. *Phytopathology*, 83(3), 308-313.
- Do Vale, L. H. F., Filho E. X. F., Miller, R. N. G., Ricart, C. A. O. és de Souza, M. V. (2014). Cellulase system in *Trichoderma*: an overview. In: Gupta, V. K., Schmoll,

- M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., Tuohy, M. (szerk) *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Hollandia. pp. 229–244.
- Dodd, S. L., Crowhurst, R. N., Rodrigo, A. G., Samuels, G. J., Hill, R. A. és Stewart, A. (2000). Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycol Res*, 104(01), 23-34.
- Doni, F., Isahak, A., Zain, C. R. C. M. és Yusoff, W. M. W. (2014). Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. *AMB Express*, 4(1), 1.
- Doohan, F. M., Brennan, J. és Cooke, B. M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur J Plant Pathol* 109(7), 755-768.
- Druzhinina, I. S. és Kopchinski, A. G. (2006). *TrichOKEY* v. 2-a DNA oligonucleotide BarCode program for the identification of multiple sequences of *Hypocrea* and *Trichoderma*. In: "IMC8 2006 Cairns", Medimond - Monduzzi Editore International, pp. 53-59.
- Druzhinina, I. S. és Kubicek, C. P. (2013). Ecological genomics of *Trichoderma*. In: Martin, F. (szerk): *The Ecological Genomics of Fungi*, Wiley-Blackwell, pp. 89-116.
- Druzhinina, I. S., Komoń-Zelazowska, M., Ismaiel, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G. J. és Kubicek, C. P. (2012). Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genet Biol*, 49(5), 358-368.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G. és Kubicek, C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55-64.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G. és Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol*, 42(10), 813-828.
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komoń-Zelazowska, M., Mulaw, T. B. és Bissett, J. (2010). The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evol Biol*, 10(1), 1.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. és Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol*, 9(10), 749-759.

- Druzhinina, I. és Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J Zhejiang Univ*, 6(2), 100-112.
- Dubois M., Gibbs K. A., Hamilton J. K., Roberts D. A. és Smith F. (1956). Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28, 350-352.
- Eckert, J. W., Sievert, J. R. és Ratnayake, M. (1994). Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*, 78(10), 971-974.
- Elad, Y., Yunis, H. és Katan, T. (1992). Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathol*, 41, 41-46.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaks, Y., Zuriel, S. és Chet, I. (1993). Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathol* 42, 324-332.
- Flores, A., Chet, I. és Herrera-Estrella, A. (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr Genet*, 31(1), 30-37.
- Fujimori, F. és Okuda, T. (1994). Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. *I. Fungi. J Antibiot*, 47(2), 173-182.
- Galante, Y.M., De Conti, A. és Monteverdi, R. (1998a). Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industries. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (szerk.), *Trichoderma & Gliocladium*, Taylor & Francis, London, pp. 272–285.
- Galante, Y.M., De Conti, A. és Monteverdi, R. (1998b). Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (szerk.), *Trichoderma & Gliocladium*, Taylor & Francis, London, pp. 286–301.
- Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Viterbo, A. és Yarden, O. (2011). Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Appl Environ Microbiol*, 77(15), 5100-5109.

- Genty B., Briantais J. M. és Baker N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 990, 87-92.
- Georgopoulos, S.G. (1985). The genetic basis of classification of fungicides according to resistance risk. *EPPO Bull* 15, 513-517.
- Gianfreda, L., Xu, F. és Bollag, J.-M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed J*, 3, 1–25.
- Gochev, V. K. és Krastanov, A. I. (2007). Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. *Bulgarian J Agric Sci*, 13(2), 171-176.
- Gravel, V., Antoun, H. és Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*, 39(8), 1968-1977.
- Green, H., Larsen, J., Olsson, P. A., Jensen, D. F. és Jakobsen, I. I. (1999). Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. *Appl Environ Microbiol* 65, 1428–1434.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., Monte, E. és Garcia-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microb*, 63(8), 3189-3198.
- Grosch, R., Faltin, F., Lottmann, J., Kofoet, A. és Berg, G. (2005). Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kühn on lettuce and potato. *Can J Microbiol*, 51(4), 345-353.
- Gupta, K. J., Mur, L. A. és Brotman, Y. (2014). *Trichoderma asperelloides* suppresses nitric oxide generation elicited by *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis* roots. *Mol Plant Microbe Interact*, 27(4), 307-314.
- Hammond-Kosack, K. E. és Parker, J. E. (2003). Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotech*, 14(2), 177-193.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzinum* T-22. *Plant Dis*, 84(4), 377-393.
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194.

- Harman, G. E. (2011a). Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol*, 189(3), 647-649.
- Harman, G. E. (2011b). *Trichoderma*—not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39(2), 103-108.
- Harman, G.E. (2012). *Trichoderma* spp., Including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. kononingii*, *T. hamatum* and Other spp. Deuteromycetes, Moniliales (Asexual Classification System). Retrieved Oct 2, 2012 from <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html>.
- Harman, G. E. és Björkman, T. (1998). Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Harman, G. E., Kubicek, C. P. (szerk): *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2, Taylor and Francis, pp. 229-265.
- Harman, G.E. és Björkman, T. (2005). Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 2. Taylor & Francis Ltd, London, pp. 229–265.
- Harman, G. E., Hayes, C., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Pietro, A., Peterbauer, C. és Tronsmo, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83(3), 313-318.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. és Lorito, M. (2004a). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*, 2(1), 43-56.
- Harman, G. E., Latorre, B., Agosin, E., San Martin, R., Riegel, D. G., Nielsen, P. A., Tronsmo, A. és Pearson, R. C. (1996). Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biol Control*, 7(3), 259-266.
- Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A. és Chen, J. (2004b). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), 147-153.
- Harman, G.E. (2005). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190-194.
- Hatvani, L., Kocsubé, S., Manczinger, L., Antal, Z., Szekeres, A., Druzhinina, I.S., Komon-Zelazowska, M., Kubicek, C.P., Nagy, A., Vágvölgyi, C. és Kredics L. (2008). The green mould disease global threat to the cultivation of oyster mushroom

- (*Pleurotus ostreatus*): a review. In: Gruening, M. (szerk.): Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi: Mushroom Science XVII, pp. 485-495.
- Hatvani, L., Manczinger, L., Kredics, L., Szekeres, A., Antal, Z. és Vágvölgyi, C. (2006). Production of *Trichoderma* strains with pesticide-polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion. *Anton Leeuw Int J G*, 89(3-4), 387-393.
- Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. és Kredics, L. (2013). *Trichoderma* as a human pathogen. In: Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M., Schmoll, M. (szerk.) *Trichoderma - Biology and Applications*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 292-313.
- Herrera-Estrella, A. és Chet, I. (2003). The biological control agent *Trichoderma*: from fundamentals to applications. In: Arora D. K., Bridge, P. D., Bhatnagar, D. (szerk): *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*, CRC Press, pp. 147-156.
- Holford, I. C. R. (1997). Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Austral J Soil Res* 35, 227-239.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis*, 87(1), 4-10.
- Hoyos-Carvajal, L. és Bissett, J. (2011). Biodiversity of *Trichoderma* in neotropics. In: Grillo, O., Venora, G. (szerk): *The dynamical process of biodiversity - case studies of evolution and spatial distribution*. IntechOpen, pp. 303-320.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. és Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet Biol*, 46(9), 615-631.
- Hölker, U., Dohse, J. és Höfer, M. (2002). Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol*, 47(4), 423-427.
- Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D. és Chet, I. (1994). Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *Eur J Plant Pathol*, 100(5), 337-346.
- Inbar, J. és Chet, I. (1996). The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. In : Kahane, I., Ofek, I. (szerk): *Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases*. Springer, . pp. 229-231.



- Jaklitsch, W. M. (2009). European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Stud Mycol*, 63, 1-91.
- Jaklitsch, W. M. (2011). European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Divers*, 48(1), 1-250.
- Jaklitsch, W. M., Gruber, S. és Voglmayr, H. (2008b). *Hypocrea seppoi*, a new stipitate species from Finland. *Karstenia*, 48(1), 1-11.
- Jaklitsch, W. M., Komon, M., Kubicek, C. P. és Druzhinina, I. S. (2006a). *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 98(3), 499-513.
- Jaklitsch, W. M., Kubicek, C. P. és Druzhinina, I. S. (2008a). Three European species of *Hypocrea* with reddish brown stromata and green ascospores. *Mycologia*, 100(5), 796-815.
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S. és Druzhinina, I. S. (2006b). *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud Mycol*, 56, 135-177.
- Jaklitsch, W. M., Stadler, M. és Voglmayr, H. (2012). Blue pigment in *Hypocrea caerulescens* sp. nov. and two additional new species in sect. *Trichoderma*. *Mycologia*, 104(4), 925-941.
- Jalal, M. A., Love, S. K. és van der Helm, D. (1986). Siderophore mediated iron (III) uptake in *Gliocladium virens*: 1. properties of cis-fusarinine, trans-fusarinine, dimerum Acid, and their ferric complexes. *J Inorg Biochem*, 28(4), 417-430.
- Johnson, L. J., Johnson, R. D., Akamatsu, H., Salamiah, A., Otani, H., Kohmoto, K. és Kodama, M. (2001). Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from the *Alternaria alternata* apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity. *Curr Genet*, 40(1), 65-72.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. és Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol*, 187(5), 351-360.
- Kapri, A. és Tewari, L. (2009). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Braz J Microbiol*, 41(3), 787-795.
- Keinath, A. P., Farnham, M. W. és Zitter, T. A. (1995). Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. isolated from cucurbits. *Phytopathology*, 85(3), 364-369.

- Khan, M. R. és Amin, F. (2012). Cellulose of *Trichoderma viride* for biological degradation of cellulosic wastes. *Asian J Chem*, 24(6), 2524.
- Kiiskinen, L. L., Rättö, M. és Kruus, K. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *J Appl Microbiol*, 97(3), 640-646.
- Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G. J. és Kubicek, C. P. (1998). Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genet Biol*, 24(3), 298-309.
- Koike, S., Subbarao, K., Davis, R. M. és Turini, T. (2003). Vegetable diseases caused by soilborne pathogens. UCANR Publications 8099.
- Komoń-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P. és Druzhinina, I. S. (2007). Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Appl Environ Microbiol*, 73(22), 7415-7426.
- Kopchinskiy, A., Komon, M., Kubicek, C. P. és Druzhinina, I. S. (2005). *TrichoBLAST*: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycol Res*, 109(06), 658-660.
- Krastanov, A. I., Gochev, V. K. és Girova, T. D. (2007). Nutritive medium dependent biosynthesis of extracellular laccase from *Trichoderma* spp. *Bulg J Agric Sci*, 13, 349-355.
- Kredics, L., Antal, Z. és 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(5), 310-314.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. és Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol Biotechnol*, 41(1), 37-42.
- Kredics, L., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. és Antal, Z. (2011). Chapter 62. *Trichoderma*. In: Liu, D. (szerk.): *Molecular detection of human fungal pathogens*. London: Taylor és Francis Group, pp. 509-526.
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. és Druzhinina, I. (2014). Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. In: Gupta, V. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S.,

- Druzhinina, I., Tuohy, M. (szerk.) *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Hollandia. pp. 3–24.
- Kredics, L., Manczinger, L., Antal, Z., Péntzes, Z., Szekeres, A., Kevei, F. és Nagy, E. (2004). *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *J Appl Microbiol*, 96(3), 491-498.
- Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W. és Kubicek-Pranz, E. M. (1990). *Trichoderma reesei* cellulases: biochemistry, genetics, physiology and application. Proceedings of a Symposium held at the Technical University of Vienna from September 14 to 16, 1989, Royal Society of Chemistry.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Couplier, F., Deshpande, N., von Döhren, H., Ebbole, D. J., Esquivel-Naranjo, E. U., Fekete, E., Flippin, M., Glaser, F., Gómez-Rodríguez, E. Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández-Oñate, M., Karaffa, L., Kosti, I., Le Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, P. S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E. E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo-Ramos, J. A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H. H., Zhang, M., Coutinho, P. M., Kenerley, C. M., Monte, E., Baker, S. E. és Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol*, 12(4), 1.
- Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M. és Druzhinina, I. S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9(10), 753-763.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T. és Kubicek, C. P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(15), 7755-7760.

- Kullnig, C., Krupica, T., Woo, S. L., Mach, R. L., Rey, M., Benitez, T., Lorito, M. és Kubicek, C. P. (2001). Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol Res*, 105, 770-772.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G. és Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol Res*, 106(7), 757-767.
- Kumar, A., Scher, K., Mukherjee, M., Pardovitz-Kedmi, E., Sible, G. V., Singh, U. S., Kale, S. P., Mukherjee, P. K. és Horwitz, B. A. (2010). Overlapping and distinct functions of two *Trichoderma virens* MAP kinases in cell-wall integrity, antagonistic properties and repression of conidiation. *Biochem Bioph Res Commun*, 398(4), 765-770.
- Laemmlen, F. (2001a). *Alternaria* diseases. *ANR, Oakland*, 8040: 1-5.
- Laemmlen, F. (2001b). Damping-off diseases. *University of California, ANR Publication*, 8041: 1-4.
- Laothanachareon, T., Bunternngsook, B., Suwannarangsee, S., Eurwilaichitr, L. és Champreda, V. (2015). Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation. *Biores Technol*, 198, 682-690.
- Lee, I. Y., Jung, K. H., Lee, C. H. és Park, Y. H. (1999). Enhanced production of laccase in *Trametes vesicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnol Lett*, 21(11), 965-968.
- Lichtenthaler H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Meth Enzymol*, 148, 350-382.
- Lieckfeldt, E. és Seifert, K. A. (2000). An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the *Hypocreales*. *Stud Mycol*, 45, 35-44.
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K. és Muthumeenakshi, S. (1998). Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: Kubicek, C. P., Harman, G. E. (szerk): *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1, Taylor and Francis, pp. 35-56.
- Lieckfeldt, E., Kullnig, C. M., Kubicek, C. P., Samuels, G. J. és Börner, T. (2001). *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. *Mycol Res*, 105(3), 313-322.
- Lindsey, D. L. és Baker, R. (1967). Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57(11), 1262.
- Lockwood, J. L. (1977). Fungistasis in soils. *Biol Rev*, 52(1), 1-43.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. és Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 395-417.

- Lu, B., Druzhinina, I. S., Fallah, P., Chaverri, P., Gradinger, C., Kubicek, C. P. és Samuels, G. J. (2004). *Hypocrea/Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum* and their newly discovered relatives. *Mycologia*, 96(2), 310-342.
- Ma, Z. és Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot*, 24(10), 853-863.
- Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S. L., Zeilinger, S., Kulling, C. M., Lorito, M. és Kubicek, C. P. (1999). Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl Environ Microbiol*, 65(5), 1858-1863.
- Manczinger, L., Antal, Z. és Kredics, L. (2002). Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 49(1), 1-14.
- Mastouri, F., Björkman, T. és Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213-1221.
- McAllister, C. Á., Garcia-Romera, I., Godeas, A. és Ocampo, J. A. (1994). Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biol Biochem*, 26(10), 1363-1367.
- Mesterhazy, A., Bartok, T., Mirocha, C. G. és Komoroczy, R. (1999). Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding*, 118(2), 97-110.
- Migheli, Q., Balmas, V., Komoń-Zelazowska, M., Scherm, B., Fiori, S., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, C. P. és Druzhinina, I. S. (2009). Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environ Microbiol*, 11(1), 35-46.
- Mishra, V. K. (2010). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. *J Phytol*, 2(9), 28-35.
- Mitchell, C. P. és Dix, N. J. (1975). Growth and germination of *Trichoderma* spp. under the influence of soil fungistasis. *Trans Br Mycol Soc*, 64(2), 235-241.

- Mónaco, C., Sisterna, M., Perelló, A. és Dal Bello, G. (2004). Preliminary studies on biological control of the blackpoint complex of wheat in Argentina. *World J Microbiol Biotechnol* 20(3), 285-290.
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol*, 4(1), 1-4.
- Mora, A. A. és Earle, E. D. (2001). Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Mol Breeding*, 8(1), 1-9.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M. és Schmoll, M. (2013). *Trichoderma*: biology and applications. CABI. pp. 1-9.
- Mukherjee, P. K., Latha, J., Hadar, R. és Horwitz, B. A. (2003). TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. *Eukaryot Cell*, 2(3), 446-455.
- Mulaw, B., T., Kubicek, C. P. és Druzhinina, I. S. (2010). The rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. *Diversity*, 2(4), 527-549.
- Naeimi, S. Khodaparast, S.A., Javan-Nikkhah, M. Vágvölgyi, C. és Kredics, L. (2011). Species patterns and phylogenetic relationships of *Trichoderma* strains in rice fields of Southern Caspian Sea, Iran. *Cereal Res Commun* 39, 560-568.
- Naseby, D.C., Pascual, J.A. és Lynch, J.M. (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J Appl Microbiol* 88, 161-169.
- Nehls, U., Göhringer, F., Wittulsky, S. és Dietz, S. (2010). Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol*, 12(2), 292-301.
- Nemec, S., Datnoff, L. E. és Strandberg, J. (1996). Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Prot*, 15(8), 735-742.
- Olmedo-Monfil, V., Mendoza-Mendoza, A., Gomez, I., Cortes, C. és Herrera-Estrella, A. (2002). Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*. *Mol Genet Genom*, 267(6), 703-712.
- Omann, M., Lehner, S., Brunner, K., Delic, M., Stoppacher, N., Schuhmacher, R., Pucher, M. és Zeilinger, S. (2009). A cAMP receptor-like GPCR is involved in *Trichoderma atroviride* mycoparasitism. *IOBC/WPRS Bull*, 43, 105-108.

- Overton, B. E., Stewart, E. L. és Geiser, D. M. (2006a). Taxonomy and phylogenetic relationships of nine species of *Hypocrea* with anamorphs assignable to *Trichoderma* section *Hypocreanum*. *Stud Mycol*, 56, 39-65.
- Overton, B. E., Stewart, E. L., Geiser, D. M. és Wenner, N. G. (2006b). Systematics of *Hypocrea citrina* and allied species. *Stud Mycol*, 56, 1-38.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol*, 23(1), 23-54.
- Papavizas, G. C. és Lumsden, R. D. (1980). Biological control of soilborne fungal propagules. *Annu Rev Phytopathol*, 18(1), 389-413.
- Pappas, A. C. és Fisher, D. J. (1979). A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. *Pestic Sci*, 10(3), 239-246.
- Park, M. S., Bae, K. S. és Yu, S. H. (2006). Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. *Mycobiology*, 34(3), 111-113.
- Parry, D. W., Jenkinson, P. és McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathol*, 44(2), 207-238.
- Paz, Z., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Aveskamp, M. M., Shnaiderman, A., Aluma, Y., Carmeli, S., Ilan, M. és Yarden, O. (2010). Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. *Fungal Divers*, 42(1), 17-26.
- Peberdy, J. F. (1990). Fungal cell walls - a review. In: Kuhn, P. J., Trinci, A. P. J., Jung, M. J., Goosey, M. W., Copping, L. G. (szerk). *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 5-30.
- Persoon, C. H. (1794). *Dispositio methodica fungorum*. *Neues Magazin für die Botanik*, 1(1), 81-128.
- Poór P., Gémes K., Horváth F., Szepesi A., Simon M. L. és Tari, I. (2011). Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO<sub>2</sub> fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biol*, 13: 105-114.
- Qi, W. és Zhao, L. (2013). Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *J Basic Microbiol*, 53(4), 355-364.

- Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L. és Herrera-Estrella, A. (2011). Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. Applied and environmental microbiology, 77(13), 4361-4370.
- Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. A. és Herrera-Estrella, A. (2002). *Trichoderma atroviride* G-protein  $\alpha$ -subunit gene *tg1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. Eukaryot Cell, 1(4), 594-605.
- Roháček, K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. Photosynthetica, 40, 13-29.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L. és Lorito, M. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. Mol Plant Microbe Interact, 22(3), 291-301.
- Russell, P. E. (1995). Fungicide resistance: occurrence and management. J Agr Sci, 124(03), 317-323.
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. és Lin, F. H. (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. Proc Biochem, 43(7), 736-742.
- Sahai, A. S. és Manocha, M. S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host—parasite interaction. FEMS Microbiol Rev, 11(4), 317-338.
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol Res, 100(8), 923-935.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology, 96(2), 195-206.
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A. és Petrini, O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia, 94(1), 146-170.
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S., Petrini, O., Schroers, H. J. és Druzhinina, I. S. (2006a). The *Trichoderma koningii* aggregate species. Stud Mycol, 56, 67-133.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respini, S. és Petrini, O. (2010). *Trichoderma asperellum sensu lato* consists of two cryptic species. Mycologia, 102(4), 944-966.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P. és Jaklitsch, W. M. (2012). The *Longibrachiatum* clade of *Trichoderma*: a revision with new species. Fungal Divers, 55(1), 77-108.



- Samuels, G. J., Suarez, C., Solis, K., Holmes, K. A., Thomas, S. E., Ismaiel, A. és Evans, H. C. (2006b). *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycol Res*, 110(4), 381-392.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E. és Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol*, 60(12), 4364-4370.
- Schmoll, M. (2008). The information highways of a biotechnological workhorse - signal transduction in *Hypocrea jecorina*. *BMC Genom*, 9(1), 1.
- Schuster, A. és Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(3), 787-799.
- Seiboth, B., Ivanova, C. és Seidl-Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei*: a fungal enzyme producer for cellulosic biofuels. In: Marco, A.S.B. (szerk.), *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, InTech Europe, Horvátország, pp. 209-340.
- Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S. E. és Herrera-Estrella, A. (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genom*, 10(1), 1.
- Shores, M., Yedidia, I. és Chet, I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95(1), 76-84.
- Siddiqui, Z. A. és Mahmood, I. (1996). Biological control of *Heterodera cajani* and *Fusarium udum* on pigeonpea by *Glomus mosseae*, *Trichoderma harzianum*, and *Verticillium chlamydosporium*. *Israel J Plant Sci*, 44(1), 49-56.
- Siegel, M. R. (1971). Reactions of the fungicide folpet (N-(trichloromethylthio) phthalimide) with a thiol protein. *Pestic Biochem Phys*, 1(2), 225-233.
- Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S. és Murrell, J. C. (2004). Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends Microbiol*, 12(8), 386-393.
- Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. M. és Dijst, G. (szerk.). (2013). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Springer Science és Business Media.

- Sofo, A., Scopa, A., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore, G., Troisi, J., Di Fiori, R. és Novellino, E. (2011). *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). *Plant Growth Regul*, 65(2), 421-425.
- Soliman, S. A., El-Zawahry, Y. A. és El-Mougith, A. A. (2013). Fungal biodegradation of agro-industrial waste. In: van de Ven, T., Kadla, J. (szerk.) *Cellulose – Biomass Conversion*, InTechOpen, pp. 75-100.
- Stewart, A. és Hill, R., (2014). Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In: Gupta, V. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., Tuohy, M. (szerk.) *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Hollandia, pp. 415–428.
- Suárez, M. B., Vizcaíno, J. A., Llobell, A. és Monte, E. (2007). Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Curr Genet*, 51(5), 331-342.
- Sutton, J. C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can J Plant Pathol*, 4(2), 195-209.
- Szekeres, A., Kredics, L., Antal, Z., Kevei, F. és Manczinger, L. (2004). Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 233(2), 215-222.
- Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Manczinger, L. és Vágvölgyi, C. (2006). A novel, image analysis-based method for the evaluation of *in vitro* antagonism. *J Microbiol Meth*, 65, 619-622.
- Tangarone, B., Royer, J. C. és Nakas, J. P. (1989). Purification and characterization of an endo-(1,3)-β-D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl Environ Microbiol*, 55(1), 177-184.
- Thurston, C. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- Tjamos, E. C., Papavizas, G. C. és Cook, R. J. (szerk.). (2013). *Biological control of plant diseases: progress and challenges for the future* (Vol. 230). Springer Science & Business Media.
- Vargas, W. A., Crutcher, F. K. és Kenerley, C. M. (2011). Functional characterization of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*.

- Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytol*, 189(3), 777-789.
- Vargas, W. A., Mandawe, J. C. és Kenerley, C. M. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol*, 151(2), 792-808.
- Vasconcelos, A. F. D., Barbosa, A. M., Dekker, R. F., Scarminio, I. S. és Rezende, M. I. (2000). Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochem*, 35(10), 1131-1138.
- Vázquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales, C. A. és Herrera-Estrella, A. (1998). Analysis of the  $\beta$ -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*, 64(4), 1442-1446.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. és Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol Biochem*, 40(1), 1-10.
- Viterbo, A. és Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. In: Borkovich, K. A., Ebbole, D. J. (szerk.) *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. American Society of Microbiology, pp. 676-693.
- Viterbo, A., Harel, M., Horwitz, B. A., Chet, I. és Mukherjee, P. K. (2005). *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. *Appl Environ Microbiol*, 71(10), 6241-6246.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. és Chet, I. (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett*, 305(1), 42-48.
- Vyas, S. C. és Vyas, S. (1995). Integrated control of dry root of soybean. In: Lyr, H., Russell, P. E., Sisler, H. D. (szerk.) *Modern fungicides and antifungal compounds*. Intercept, Andover, pp. 565-572.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22(8), 837-845.
- Weindling, R. (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24(1), 153-151.
- Weir, T. L., Huff, D. R., Christ, B. J. és Romaine, C. P. (1998). RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia*, 90(5), 813-821.

- Wilhite, S. E., Lumsden, R. D. és Straney, D. C. (2001). Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol*, 67(11), 5055-5062.
- Williamson, B., Elad, Y., Delen, N. és Tudzynski, P. (2007b). *Botrytis*: biology, pathology and control. Springer.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. és van Kan, J. A. (2007a). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol*, 8(5), 561-580.
- Windham, M. T., Elad, Y. és Baker, R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76(5), 518-521.
- Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet*, 75(2), 225-233.
- Xu, F. (1999). Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production, and applications. In: Flickinger, M. C., Drew, S. W. (szerk.) *The Encyclopedia of Bioprocessing Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, Wiley New York, pp. 1545-1554.
- Yedidia, I., Benhamou, N. és Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*, 65(3), 1061-1070.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. és Chet, I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl Environ Microbiol*, 69(12), 7343-7353.
- Zhang, C. L., Liu, S. P., Lin, F. C., Kubicek, C. P. és Druzhinina, I. S. (2007). *Trichoderma taxi* sp. nov., an endophytic fungus from Chinese yew *Taxus mairei*. *FEMS Microbiol Lett*, 270(1), 90-96.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. és Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7, 203-214.
- Zitter, T. A. és Kyle, M. M. (1992). Impact of powdery mildew and gummy stem blight on collapse of pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Cucurbit Genet Coop*, 15, 93-96.

## 10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A disszertáció "A gombaipari termékpálya ökológiai gazdálkodásra történő átállásának előmozdítása, termésbiztonság fokozása és új, funkcionális gombaalapú élelmiszerek előállítása" (GINOP-2.2.1-15-2016-00006) és a "Mikrobiális génbankoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum" (GINOP-2.3.3-15-2016-00006) című projektek támogatásával készült (Széchenyi 2020 Program).

Elsőként hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek, dr. Kredics Lászlónak, aki szakdolgozó korom óta irányítja a munkámat. Nagyfokú szakmai támogatását, amivel ösztönzött, hogy tovább folytassam a tanulmányaimat.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, hogy lehetővé tette dolgozatom elkészítését a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékén.

Szeretném köszönetemet kifejezni dr. Poór Péter egyetemi adjunktusnak a paradicsomnövényekkel végzett kísérleteinkhez nyújtott hatalmas szakmai és baráti támogatásáért.

Köszönöm a laboratóriumban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét dr. Hatvani Lórántnak, Bóka Bettinának, Vörös Mónikának, Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának, hogy bizalommal fordulhattam hozzájuk, ha segítségre, biztatásra volt szükségem és, hogy általuk sikerült jó hangulatot biztosítani a munkához.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Tanszék összes dolgozójának, hogy munkájukkal és szakértelmükkel segítették dolgozatom elkészítését.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék hálás köszönetet mondani a Családomnak és a Barátaimnak. Megköszönni feleségem támogatását és szakmai segítségét és, hogy mindvégig mellettem állt. Kisfiamnak a szerető mosolyát, amivel minden nap vár rám. Édesanyámnak és Édesapámnak mérhetetlen szeretetét és azt a tanítást, amit útravalóul kaptam tőlük és, hogy ilyen remek példaképek számomra. Szeretném továbbá megköszönni a testvéreim felbecsülhetetlen támogatását is. Köszönöm, hogy ilyen büszkék vagytok rám!