

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Biológia Doktori Iskola

**Hazai talajmintákból izolált *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai
és molekuláris vizsgálata**

készítette

Szekeres András

Témavezető:

dr. Manczinger László

Szegedi Tudományegyetem

Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED

2006

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS	4
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
II.1. <i>Trichoderma</i> törzsek taxonómiája	6
II.2. <i>Trichoderma</i> törzsek ökofiziológiai tulajdonságai	9
II.3. <i>Trichoderma</i> törzsek nemesítése	13
III. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	15
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
IV.1. Mikroorganizmusok és növények	17
IV.2. Tenyésztési körülmények	18
IV.2.1. Izolálás	18
IV.2.2. <i>In vitro</i> antagonizmus-tesztek	19
IV.2.3. Módosított agresszivitás-tesztek	19
IV.2.4. Enzimtermelés-vizsgálatok	19
IV.2.5. Taxonómiai és antibiotikum-termelési vizsgálatok	20
IV.2.6. A <i>Trichoderma</i> törzsek növekedésének mérése	21
IV.3. Taxonómiai vizsgálatok	21
IV.3.1. Morfológiai vizsgálatok	21
IV.3.2. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok	22
IV.3.2.1. Mintaelőkészítés	22
IV.3.2.2. Izoenzim-elektroforézis	22
IV.3.2.2.1. Fehérjekivonás	22
IV.3.2.2.2. Elektroforézis	22
IV.3.2.2.3. A cellulóz-acetát gélek festése	23
IV.3.2.3. DNS-szekvenciák vizsgálata	23
IV.3.2.3.1. Nukleinsavkivonás	23
IV.3.2.3.2. PCR-reakciók	27
IV.3.2.3.3. Elektroforézis és szekvencia meghatározás	27
IV.4. Extracelluláris enzimaktivitások mérése	28
IV.5. Részleges antibiotikum-tisztítás és biológiai aktivitás-vizsgálat	28

IV.6. Nemesítés	29
IV.6.1. UV-fénnyel szembeni érzékenység meghatározása	29
IV.6.2. A p-fluor-fenilalanin érzékenység vizsgálata	30
IV.6.3. Mutánsok izolálása	30
IV.7. Sephadex G-100 oszlopkromatográfia	30
IV.8. Biokontroll vizsgálatok	31
IV.8.1. <i>In vitro</i> antagonizmus-tesztek és a Biokontroll Index meghatározása	31
IV.8.2. Módosított agresszivitás tesztek	32
IV.9. Az adatok elemzése	32
IV.9.1. Filogenetikai elemzések	32
IV.9.1.1. A cellulóz-acetát izoenzim-elektroforézis validálása	32
IV.9.1.2. Az izolált <i>Trichoderma</i> törzsek filogenetikai analízise	33
IV.9.1.2.1. Izoenzim-mintázatok filogenetikai analízise	33
IV.9.1.2.2. ITS 1-2 szekvenciaadatok filogenetikai analízise	33
IV.9.1.2.3. Az izoenzim mintázatok és az ITS 1-2 szekvencia-adatok együttes elemzése	33
IV.9.2. Statisztikai analízisek	34
IV.9.3. Diverzitás	34
V. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	35
V.1. A <i>Trichoderma</i> törzsek izolálása	35
V.2. Izolált <i>Trichoderma</i> törzsek taxonómiai vizsgálata	36
V.2.1. Morfológiai fajazonosítás	36
V.2.2. Molekuláris taxonómia	42
V.2.2.1. Cellulóz-acetát izoenzim elektroforézis	42
V.2.2.1.1. A módszer előzetes tesztelése	42
V.2.2.1.2. Az izolált <i>Trichoderma</i> törzsek izoenzim-analízise	46
V.2.2.2. ITS szekvenciák analízise	49
V.2.2.3. Filogenetikai vizsgálatok	52
V.2.2.3.1. Izoenzim adatok filogenetikai analízise	52
V.2.2.3.2. ITS 1-2 szekvenciák filogenetikai analízise	54
V.2.2.3.3. Összesített filogenetikai analízis	66
V.2.3. A fajok előfordulása az egyes mintahelyeken és Magyarországon	68

V.3. Az izolált <i>Trichoderma</i> törzsek ökofiziológiai vizsgálata	70
V.3.1. Extracelluláris enzimek konstitutív termelése	70
V.3.2. Antibiotikum termelés	79
V.3.3. <i>In vitro</i> antagonizmus	81
V.3.3.1. A Biokontroll Index meghatározásának módszere	81
V.3.3.2. Az izolált <i>Trichoderma</i> törzsek Biokontroll Indexei	85
V.3.4. Módosított agresszivitás-tesztek	87
V.3.5. Az antagonizmus és az extracelluláris enzimtermelés kapcsolata	88
V.4. Mikoparazita <i>Trichoderma</i> törzsek nemesítése UV-mutagenézissel	90
V.4.1. Az UV-mutagenézis optimalizálása	91
V.4.2. A vad típusú törzs proteáztermelésének vizsgálata	92
V.4.3. A mutáns törzsek proteáztermelésének vizsgálata	93
V.4.3.1. A mutáns törzsek proteáztermelése	93
V.4.3.2. A proteázok időbeli megjelenése	94
V.4.3.3. A nemesített törzsek proteázainak vizsgálata oszlopkromatográfiával	95
V.4.4. Nemesített <i>Trichoderma</i> törzsek növénypatogén gombákkal szembeni <i>in vitro</i> antagonizmusa	97
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	100
VII. SUMMARY	104
VIII. IRODALOMJEGYZÉK	108
IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	
X. MELLÉKLET	

I. BEVEZETÉS

A *Trichoderma* nemzetség (Hypocreales, Ascomycota) tagjai talajból és korhadó növényi részekből általánosan izolálható kozmopolita anamorf fonalasgombák [Samuels, 1996; Klein és Eveleigh, 1998]. A talaj biomasszájának jelentős részét teszik ki [Widden és Abitbol, 1980; Nelson, 1982], de gyakran jelen vannak épületek gombafertőzéseinek populációiban is [Thrane és mtsai., 2001]. Kiemelkedő extracelluláris enzimrendszerükkel biopolimerek sokaságát képesek hidrolizálni, pl. xilánt [Gupta és mtsai., 1994], kitint [Uloha, és Peberdy, 1992], fehérjéket [Kredics és mtsai., 2005] és cellulózt [Kubicek és Penttilä, 1998]. A nemzetség emiatt egyrészt ipari szempontból jelentős [Kubicek és mtsai., 1990], másrészt egyes törzsek extracelluláris enzimeik segítségével képesek más gombák sejtfalát feloldani [Ridout és mtsai., 1986; Sivan és Chet, 1989]. Különböző fonalasgombákat tudnak ezáltal parazitálni, köztük a növénypatogén *Fusarium* [Sivan és Chet, 1993], *Pythium* [Naseby és mtsai., 2000], *Rhizoctonia* [Lewis és Larkin, 1997], *Botrytis* [Elad, 2000] és *Sclerotinia* [Elad, 2000; Naár és Kecskés, 1995] fajokat. Számos faj termel különböző típusú antibiotikumokat is [Sivasithamparan és Ghisalberti, 1998; Szekeres és mtsai., 2005], melyek extracelluláris enzimekkel szinergizáló hatása a mikoparazitizmus során már bizonyított [Schirmböck és mtsai., 1994; Lorito és mtsai., 1996]. Gyors kolonizációra képesek a rizoszférában, és hatékony biofertilizáción keresztül segítik a növények növekedését, valamint stimulálják a növények védekezési reakcióit, az így kialakult rezisztencia az indukciótól számítva akár több hónapig is fennmaradhat [Harman és mtsai., 2004]. Meg kell azonban említeni az utóbbi időkben napvilágot látott kedvezőtlen tulajdonságaikat is, egyes *Trichoderma* fajok ugyanis az opportunistáknak humánpatogén gombák egyre népesebb csoportjába sorolhatók [Kredics és mtsai., 2003b], míg mások a termesztett gombákon való kártételeikkel okoznak komoly problémát [Hatvani és mtsai., 2002; Samuels és Dodd, 2002].

A *Trichoderma* fajok az említett előnyös tulajdonságaik révén kiválóan alkalmasak arra, hogy belőlük a növénypatogén gombák elleni biológiai védekezésben felhasználható biofungicid törzseket állítsunk elő [Papavizas, 1985; Benítez és mtsai., 2004; Manczinger és mtsai., 2002]. A folyamat része az ígéretes törzsek izolálása, ökofiziológiai tulajdonságaik feltérképezése és az egyes törzsek nemesítése. A nemesítési programok célja egyrészt az, hogy a gazda gomba sejtfalának bontásában résztvevő extracelluláris kitináz, glukanáz és

proteáz enzimek konstitutívan, nagy mennyiségben termelődjenek, másrészt pedig az, hogy ezek az enzimek időben korán jelenjenek meg a kultiváció során.

Munkánk során célul tűztük ki:

- hazai *Trichoderma* törzsek izolálását őszi búza rizoszférájából,
- az izolátumok morfológiai bélyegek alapján történő azonosítását,
- az izolátumok molekuláris és biokémiai bélyegeken alapuló taxonómiai és faji diverzitás vizsgálatát,
- az izolátumok konstitutív extracelluláris enzimtermelésének és antibiotikum termelésének felmérését,
- jól definiálható módszerek alkalmazását a törzsek biokontroll tulajdonságainak jellemzésére és mérésére,
- a különböző extracelluláris enzimek szintje és a biokontroll tesztek eredményei közötti kapcsolatok keresését statisztikai eszközökkel,
- a biokontroll tulajdonság kialakításáért felelős extracelluláris enzimeket túltermelő törzsek nemesítését UV-mutagenézissel.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

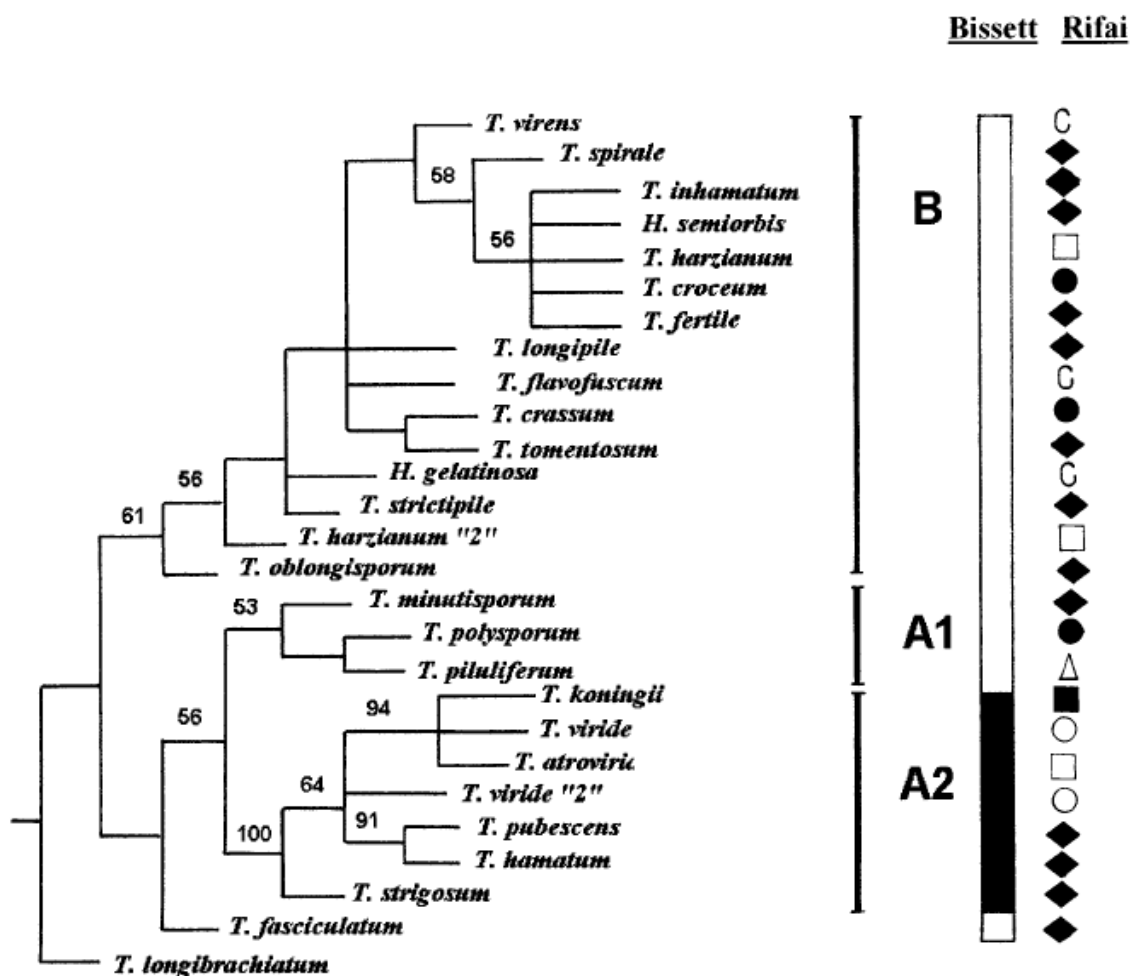
II.1. *Trichoderma* törzsek taxonómiája

Annak ellenére, hogy a *Trichoderma* nemzetséget Persoon már 1794-ben leírta [Persoon, 1794], a nemzetség taxonómiája és tagjainak identifikálása a mai napig nehézkes és ellentmondásokkal terhelt. 1969-ig csaknem minden *Trichoderma* törzset *T. viride*-ként azonosítottak az irodalomban, köszönhetően a Bisby [1939] által bevezetett koncepciónak, mely szerint a *Trichoderma* nemzetséget az előbb említett egy faj alkotja. Rifai [1969] vizsgálatai hozták meg az áttörést, aki bevezette a nemzetség taxonómiájába a „fajaggregátumok” koncepcióját és 9 fajcsoportot különített el. Már Rifai is valószínűsítette, hogy számos aggregátum – különösen a *T. hamatum* - tartalmazhat több, morfológiailag nem elkülöníthető fajt. Bissett munkássága során átdolgozta a folytonos morfológiai jellegek kis különbségeinek felismerésén alapuló Rifai rendszert [Bissett, 1984; 1991a; 1991b; 1991c; 1992; Gams és Bissett, 1998], kiterjesztve más *Hypocrea* anamorfokra és a korábbi *Gliocladium* fajokra. Bizonyos Rifai faj-aggregátumok azonban elég helytállónak bizonyultak az elemzések során, ezért Bissett [1991a] a nemzetség szekciókra (*Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Hypocreanum*) történő felosztását javasolta.

A molekuláris technikák elterjedésével a gombák rendszertana is jelentős változásokon ment keresztül, melynek látható jelei a 90-es évek közepén mutatkoztak meg a *Trichoderma* nemzetség taxonómiájában. Megtörtént a Bissett-féle *Longibrachiatum* szekció revíziója az ITS 1-2 rDNS szekvenciák analízisével és RAPD (random amplified polymorphic DNA), valamint izoenzim mintázatok segítségével [Kuhls és mtsai., 1996; 1997; Samuels, 1996; Samuels és mtsai, 1998; Turner és mtsai, 1997]. A munkák során a szekció monofiletikusnak bizonyult és első ízben igazoltak néhány konkrét anamorf-teleomorf kapcsolatot (*H. schweinitzii*/*T. citrinoviride*; *H. pseudokoningii*/*T. pseudokoningii*; *H. jecorina*/*T. reesei*; *H. orientalis*/*T. longibrachiatum*). A szekcióhoz csatolták a két fajt (*T. saturnisporum* és *T. ghanense* [Doi és mtsai., 1987]) tartalmazó korábbi *Saturnisporum* szekciót is, és az is kiderült, hogy a *T. ghanense* és a *T. parceramosum* azonos fajok.

A *Longibrachiatum* szekció azonban csak egy kis szelete a nemzetségnek, a legkisebb szekció, mely filogenetikailag a legtávolabb helyezkedik el a többi szekciótól. Kindermann és mtsai. tettek először kísérletet a teljes génusz molekuláris filogenetikai elemzésére az ITS 1 szekvenciák alapján, és azt tapasztalták, hogy a legnagyobb szekció, a *Pachybasium*

parafiletikus, és két nagy csoportra ágazik [Kindermann és mtsai.,1998A filogenetikai vizsgálatok ma már több gén együttes elemzésén alapulnak [Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002; Chaverri és mtsai., 2003a], ennek köszönhetően új molekuláris filogenetikai kapcsolatokra derült fény. Bebizonyosodott például, hogy a *T. hamatum* nem tagja a Bissett féle *Pachybasium* kládnak, hanem egy csoportban van a *T. pubescens* és a *T. strigosum* fajokkal és egy klaszterben helyezkedik el más *Trichoderma* szekcióbeli fajokkal is (1. ábra).



1. ábra. Huszonhét *Trichoderma* faj ITS 1 szekvenciájának parszimónia analízise [Kindermann és mtsai.,1998]. Az ágakon lévő számok a bootstrap értékeket jelölik. A függőleges vonalak és a betűk a kapott csoportokat (A, B) és szubkládákat (A1, A2) jelzik. A Bissett által leírt szekciókat üres (*Pachybasium*) és fekete (*Trichoderma*) téglalap jelzi. A Δ a *T. piluliferum*, a $\bullet$ a *T. polysporum*, a $\circ$ a *T. viride*, a $\blacksquare$ a *T. koningii*, a $\square$ a *T. harzianum*, a $\blacklozenge$ a *T. hamatum*, a C a *Gliocladium* Rifai-fajaggregátumokat reprezentálja.

Sajnálatos módon azonban a konkrét morfológiai különbségek hiányában a *Pachybasium* A és B elnevezés továbbra is használatban maradt. Problémás továbbá a *Pachybasium* B szekció fajainak (pl. *T. harzianum*) taxonómiai elemzése, nagyon nagy molekuláris szintű genetikai variabilitásuk ugyanis azt sugallja, hogy egy-egy mai fajnév több további fajt is takarhat, annak ellenére, hogy határozott morfológiai különbségek nem mutathatóak ki közöttük [Kullnig és mtsai., 2000; Kubicek és mtsai., 2003b; Wuczkowski és mtsai., 2003; Gherbawy és mtsai., 2004; Druzhinina és mtsai., 2005ab]. Így szükséges lenne az eredeti morfológiai fajfogalom módosítására és a Taylor [Taylor és mtsai., 2000] által bevezetett, a filogenetikai leszármazással összhangban lévő fajfogalom (GCPSR: Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition) adaptálására a nemzetség taxonómiájában [Druzhinina és Kubicek, 2005b]. Ehhez azonban több független gén analízisére lenne szükség, amire léteznek próbálkozások [Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002; Chaverri és mtsai., 2003a], de az egész génuszra kiterjedő, filogenetikailag maradéktalanul elfogadott összefoglaló mű még nem készült. Druzhinina és Kubicek a GenBank-ban fellelhető különböző DNS szakaszok szekvenciáinak részletes vizsgálata után arra következtetett, hogy a *tef1* (transzlációs elongáció faktor 1-alfa) nagy intronja és utolsó nagy exonja, az *rpb2* (RNS polimeráz B alegység 2) gén, az *ech42* (42 kD endokitináz) utolsó nagy exonja és az ITS 1-2 szekvenciák együttes vizsgálata megbízható filogenetikai eredményre vezethet [Druzhinina és Kubicek, 2005b]. Közleményükben jelent meg a nemzetség jelenleg elfogadott legújabb felosztása is, mely 49 *Hypocrea*, 25 *Trichoderma* és 14 anamorf-telemorf párosított taxont tartalmaz 3 szekcióba és 14 kládba rendezve (*Longibrachiatum*; *Trichoderma*: *Rufa*, *Pachybasium* A; *Pachibasium*: *Pachibasioides*, *Hypocreanum*, *Chlorospora*, *Lixii/catoptron*, *Virens*, *Semiorbis*, *Strictipilis*, *Stromatica*, *Ceramica*, *Lutea*, *Psychrophila*, „Lone lineages”).

Annak ellenére, hogy a filogenetikai elemzések ilyen komplex molekuláris háttér munkát kívánnak, az egyes fajok identifikálása viszonylag egyszerűen kivitelezhető az ITS 1-2 szekvenciák elemzésével. Ezek a szekvenciák nagy számban fordulnak elő a genomban (90 kópia/genom) és könnyen amplifikálhatók [Druzhinina és Kubicek, 2005b]. Növényeknél és más fonalas gombáknál, mint például a közeli rokon *Fusarium* fajoknál is, leírták a rDNS gének paralóg kópiákban való előfordulását, amely a fajazonosítást nem minden esetben teszi lehetővé [O'Donnell, 1992; Buckler és mtsai., 1997; Lieckfeld és Seifert, 2000], a *Trichoderma* fajoknál azonban ilyet nem tapasztaltak [Druzhinina és Kubicek, 2005b]. Druzhinina és mtsai. az ITS 1-2 szekvenciák diagnosztikus oligonukleotid

szekvenciáriszein alapuló „vonalkód”-módszert vezetett be, melynek internetes felülete *TrichOkey* néven bárki számára elérhető (www.isth.info) és nagyban megkönnyíti az egyes izolátumok azonosítását. A módszer 77 vizsgált *Hypocrea* és *Trichoderma* fajból hetvenet tud nagy biztonsággal azonosítani. Bár, nem tud különbséget tenni a *T. crassum* és *T. longipile* fajok és a *T. tomentosum* és *T. cerinum* fajok között, az első esetben azonban a morfológiai különbségek megállapítása egyszerű [Bissett, 1991b; Chaverri és mtsai., 2003b], míg a második esetben a fajok eltérő földrajzi előfordulása segíti az elkülönítést [Druzhinina és Kubicek, 2005b]. A *Rufa* klád tagjaira még nem elérhető a „vonalkód” azonosítás, de nem a diagnosztikus oligonukleotid szekvenciák hiánya, hanem a klád folyamatban lévő revíziója miatt.

II.2. *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai tulajdonságai

Az ökofiziológia, mint tudományos diszciplína egyrészt az egyes élőlények környezeti tényezőkre adott válaszreakcióinak leíró elemzésével, másrészt a megfelelő ökológiai szempontból nem független fiziológiai mechanizmusok ok-okozati kapcsolatainak felderítésével foglalkozik. Az ökofiziológiai megközelítés figyelembe veszi az individuális válaszok polimorfizmusát, amely nagyban felelős az adott egyedekből álló populáció adaptív kapacitásáért. Ebben a tekintetben az ökofiziológiai tanulmányok olyan információk megszerzésére törekednek, amelyek alapvetőek az adaptív stratégiák alapelveinek megértésében (Société d'Écophysiologie, France).

A modern agrártechnológiában nagy a jelentősége a jól jellemzett ökofiziológiai tulajdonságokkal rendelkező biokontroll izolátumok növényvédelemben történő alkalmazásának, velük ugyanis kiválthatóak a környezetszennyező, vegyi alapú szintetikus fungicidek, melyek mezőgazdasági alkalmazása számos szárazföldi- és vízi ökoszisztémát veszélyeztet. A törzsek ökofiziológiai jellemzését megtehetjük a törzsek különböző környezeti stressz-toleranciájának vizsgálatával, vagy az igazoltan környezeti tényezők hatását moduláló fiziológiai kulcselemek konkrét, célzott vizsgálatával. Ilyen környezeti tényező a hőmérséklet, amely hatással lehet a spóracsírázásra és csíratömlő-növekedésre [Magan, 1988], a micélium-növekedésre és kompetitív képességekre [Badham, 1991], a szaprofita képességre [Eastburn és Butler, 1991] és az extracelluláris enzimaktivitásokra [Antal és mtsai., 2000]. Jelentős a törzsek alkalmazhatóságának tekintetében a környező ozmotikus potenciálhoz való viszonyuk és ennek hatására a különböző életfolyamataik (növekedés, szaprofita képességek,

toxintermelés, enzintermelés) változása [Luard és Griffin, 1981; Eastburn és Butler, 1991; Magan és Lynch, 1986; Magan és Lacey, 1984; Cuero és mtsai., 1987; Marin és mtsai., 1997; Sarrette és mtsai., 1992]. A nehézfémek szintén befolyásolják a *Trichoderma* törzsek által elfoglalt niche kiterjedését, hatással vannak a növekedésre, spóráképzésre [Babich és mtsai., 1982; Somashekar és mtsai., 1983] és differenciálódásra [Frank és mtsai., 1993] is. Az abiotikus környezeti hatásokhoz sorolhatók a különböző peszticidek is, melyek *Trichoderma* törzsek általi toleranciájának vizsgálata kiemelkedő jelentőségű a növényvédőszerrel történő kombinált alkalmazás számára. A peszticidek hatással lehetnek a szubsztrátkolonizáló képességre [Davet, 1981] és magára a vitalitásra is [Abdel-Fattah és mtsai., 1982; Kay és Stewart, 1994].

A *Trichoderma* nemzetség tagjainak a környezeti tényezők hatását moduláló egyik legjelentősebb fiziológiai eszköze az összehangoltan szabályozott, egyedi enzimekből álló extracelluláris enzimrendszer, amely mind az abiotikus, mind a biotikus hatásokra adott válaszreakciókban szerepet játszik. Ezen szekretált extracelluláris enzimek alapvető szerepet töltenek be mind a kompetíció, mind a mikoparazitizmus folyamataiban. A kompetíció ebben az esetben az élőhelyen elérhető tápanyagok minél gyorsabb energiává alakítását, míg a mikoparazitizmus a gazdaszervezetet felépítő biopolimerek hatékony enzimes hidrolízisét és sejtbe transzportálható formába alakítását jelenti. A kompetitív sajátságokat demonstrálták Jackson és mtsai. [1991], akik tápanyag-hasznosítási képességeket vizsgáltak *Trichoderma* törzsek esetében. Hasznos adatokat szolgáltatott ebben a témában Manczinger és Polner [1987] közleménye is, melyben 65 *Trichoderma* izolátum szénforrás-hasznosítási képességét regisztrálták 127 különböző szénforráson.

A *Trichoderma* cellulázokat főként ipari jelentőségük miatt tanulmányozzák intenzíven [Kubicek és mtsai., 1990]. A természetben ez az enzimrendszer végzi a növényi sejtfal legelemibb összetevőjének glükózig történő lebontását. A cellulóz több lépcsőben történő fokozatos lebontását három fő enzimsorozat végzi. Az *endoglukanázok* véletlenszerűen hasítanak a β -1,4-glukán láncban, melynek következtében az adott enzim specificitásától függő polimerizációs fokú oligoszacharidok keletkeznek. A *cellobiohidrolázok* az oligoszacharidok nem-redukáló végéről cellobióz egységeket vágnak le, melyet a β -glükozidázok hasítanak glükóz egységekre [Persson és mtsai., 1991]. Az egyes csoportok egymáshoz viszonyított aránya a tápközegben elérhető szubsztrát indukció függvénye, de viszonylagos állandóságot mutat; endoglukanázok ~ 20-36%, cellobiohidrolázok ~ 64-80%, β -glükozidázok ~ 1% [Harkki és mtsai., 1991]. A

cellulóztartalmú sejtfallal rendelkező Oomycota *Pythium* fajok elleni mikoparazitizmusban a *Trichoderma* törzsek cellulázai is fontos szerepet játszhatnak, elősegíthetik az antagonista bejutását a gazda hifájába [Benhamou és Chet, 1997].

A növényi hulladékanyagok legnagyobb mennyiségben jelenlevő alkotói a cellulózon kívül a hemicellulóz és a pektin [Carpita és McCann, 2000]. A növényi sejtfal bonyolult hemicellulóz frakciójának lebontásában a xilanáz enzimszisztéma - endo- β -1,4-xilanázok, β -xilozidázok - játsza a főszerepet [Haltrich és mtsai., 1996]. Ezt egészítik ki a xilánglerincen gyakran, nagy mennyiségben jelenlevő szubsztituensek eltávolítását végző hidrolitikus enzimek, úgymint arabinofuranozidázok (arabinóz), α -glükuronidázok (4-*o*-metil-glükuronsav), acetil-xilán-észterázok (ecetsav), feruloil-észterázok (ferulasav) kumaroil-észterázok (kumársav) [Christov és Prior, 1993]. A hemicellulózok között vannak még további glikozidos kötéstípusokat (β -1,4; α -1,2; α -1,3) tartalmazó polimerek is (arabinoxilánok, xiloglukánok és ezek származékai), ezek lebontása további enzimszisztémákat igényel: β -mannanázok (mannooligoszacharidok), mannozidázok (mannóz), és a celluláz szisztéma néhány nem szűk szubsztrátspecifitású tagja [De Vries és Visser, 2001].

A *Trichoderma* fajok jelentős endo- β -1,4-xilanáz és β -xilozidáz [Ximenes és mtsai., 1996; Antal és mtsai., 2001; Cacaís és mtsai., 2001] és acetil-xilán-észteráz [Biely és mtsai., 1997; Kremnický és mtsai., 2004] szekréciós képességgel rendelkeznek. Ezeknek az enzimeknek a termelése jelentős kooperativitást mutat [Biely és mtsai., 1986]. Mivel a cellulóz hidrolízisében szerepet játszó enzimek részt vehetnek a hemicellulózok lebontásában is, nem meglepő, hogy a celluláz és a xilanáz enzimszisztéma között kölcsönös indukció is felléphet [Caudhary és Tauro, 1986; Royer és Nakas, 1989]. Az arabinofuranozidázok [Poutanen, 1988; Nogawa és mtsai., 1999], az α -glükuronidázok [Siika-aho és mtsai., 1994; Margolles-Clark és mtsai., 1996], a β -mannanázok [Hägglund és mtsai., 2003; Ferreira és Filho, 2004] és a mannozidázok [Kulminskaya és mtsai., 1999] szintén részét képezik a nemzetség hemicellulózbontást végző extracelluláris enzimszisztémájának.

A növényi sejtfalban szintén nagy mennyiségben jelen lévő pektin fő gerincének bontását a pektináz enzimszisztéma végzi, melynek részei a különböző pektin- és pektát-liázok, valamint poligalakturonázok. Mivel a pektin a cellulózzal, a ligninnel és a hemicellulózzal asszociáltan fordul elő komplex polimerhálózatot alkotva, ezért lebontásában részt vehetnek a korábban említett észterázok is [De Vries és Visser, 2001]. A *Trichoderma* fajok is képesek a pektin hidrolízisére, Markovič és mtsai. [1985] pektin észterázt és poligalakturonázt, míg Mohamed és mtsai. [2003] két poligalakturonáz izoenzimet tisztítottak és jellemeztek

Trichoderma reesei törzsekből. A különböző részlegesen hidrolizált növényi poliszacharidok lebontásában, valamint a főbb szénhidrát-polimerek oldalláncainak lehasításában az előbbieket mellett részt vesznek az α - és β -D-galaktozidázok is [De Vries és Visser, 2001], mely enzimek szintén képviseltetik magukat a *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimrendszerében [Zeilinger és mtsai., 1993; Savel'ev és mtsai., 1997; Seiboth és mtsai., 2005].

Az elhullott növényi részekben található keményítő lebontását az amiláz enzimrendszer biztosítja, amelynek jelenléte a *Trichoderma* fajoknál is igazolt [De Azevedo és mtsai., 2000; Pacheco-Chávez és mtsai., 2004].

A *Trichoderma* nemzetség a mikoparazitizmusban mutatott aktivitását a kitináz, glukánáz és proteáz extracelluláris enzimrendszereknek köszönheti, a lehetséges gazda Basidiomycota és Ascomycota gombák sejtfaa ugyanis főleg kitin és β -glukán fibrillumokat tartalmaz amorf fehérjehálózatba ágyazva [Wessels és Sietma, 1981].

Sahai és Manocha [1993] szerint a kitinbontó enzimeket három csoportra oszthatjuk: *endokitinázokra*, melyek internális helyeken véletlenszerűen hasítják a kitin mikrofibrillumot, s működésük nyomán kitotetraóz, kitotrióz és diacetil-kitobióz egységek szabadulnak fel; β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázokra, melyek a kitotetraóz, kitotrióz és diacetil-kitobióz molekulák nem redukáló végéről *N*-acetyl-glükózamin monomereket hasítanak le; valamint *exokitinázokra*, melyek diacetil-kitobióz egységeket hasítanak le a kitin mikrofibrillum nem redukáló végéről. Ulhoa és Peberdy *T. harzianum*ból tisztított és jellemzett egy extracelluláris endokitinázt [1992] és egy, a β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázok csoportjába tartozó extracelluláris kitobiázt [1991]. Haran és mtsai. [1995] hat különböző enzimet azonosítottak: két β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázt, és négy endokitinázt. A *T. harzianum* kitinbontó enzimrendszerének indukciója lehet a mikoparazitizmus korai eseménye [Inbar és Chet, 1995], de az újabb kutatások a kitináz gének biokontroll-specifikus, kaszkádszerű expressziójáról számolnak be [Kubicek, 2003a].

A β -glukanázok szubsztrátjai a glukánok, melyek β -kötéssel kapcsolódó D-glükóz egységekből felépülő homopolimerek. A β -glukanázokat működésük szerint két részre oszthatjuk. Az *endo- β -glukanázok* láncban belüli kötéseket hasítanak véletlenszerűen a poliszacharid gerinc mentén, míg az *exo- β -glukanázok* a lánc nem redukáló végéről glukóz egységeket hasítanak le. A β -glukánt hidrolizáló enzimeket a hasított kötés típusa (β -1,3-, β -1,4-, β -1,6-) alapján is csoportosíthatjuk [Fleet és Phaff 1981; Yamamoto és Nevins 1983; Pitson és mtsai., 1993]. A *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* és *Pythium aphanidermatum* fajok sejtfaaának *Trichoderma* törzsek általi lebontásában a kitinázokat és β -1,3-glukanázokat

találták a legfontosabb enzimeknek [Elad és mtsai., 1982; Sivan és Chet, 1989]. Az első, kizárólag glukánokat hasító *Trichoderma* β -1,3-glukanázt *T. longibrachiatum*-ból tisztították [Tangarone és mtsai., 1989]. A *T. harzianum* β -1,3-glukanbontó rendszere laminarinnal való indukció alapján legalább hét extracelluláris enzimből áll [Vázquez-Garciduenas és mtsai., 1998]. De la Cruz és mtsai. [1995] endo- β -1,6-glukanázt tisztítottak és jellemeztek és igazolták jelentőségét a *T. harzianum* mikoparazitizmusában.

A proteázok a mikoparazitizmus folyamata során mind a korai, mind a késői penetrációs fázisban szerephez jutnak, szubsztrátjaik a fonalas gombák sejtfalában és citoplazmájában megtalálható fehérjék. A gazdaszervezet lízise során felszabaduló peptideket, oligopeptideket aminosavakká bontják, melyeket aztán a törzsek táplálékforrásként hasznosítanak. A preproenzimként szintetizálódott proteázok más enzimeket, valamint *Trichoderma* toxinokat is aktiválnak. Flores és munkatársai [1997] bizonyították, hogy a *T. harzianum* egy proteázt kódoló génjének emelt szintű kifejeződése fokozott biokontroll aktivitást eredményezett, ami arra utal, hogy a proteázok fontos szerepet töltenek be a gazdasejtfal proteinkomponenseinek lebontásában és a gazdasejtek teljes lízisében. Elad és Kapat [1999] a közelmúltban *T. harzianum* proteázok *Botrytis cinerea* elleni biológiai védekezésben betöltött szerepét vizsgálta. A *Trichoderma* fajok extracelluláris proteázainak termelési profiljait, az eddig tisztított enzimek jellemzőit, a leírt proteázokat kódoló géneket, valamint a proteázok mikoparazitizmusban betöltött szerepét és ipari jelentőségét foglalja össze Kredics és mtsai. rendszerező munkája [2005].

II.3. *Trichoderma* törzsek nemesítése

A jövő mezőgazdaságában lehet a jelentősége a növénykártevő gombákkal szemben jó biokontroll aktivitással rendelkező *Trichoderma* fajok felhasználásának. *Trichoderma*-alapú készítmények már ma is kaphatóak a kereskedelmi forgalomban, a készítmények hatásfoka viszont még meglehetősen alacsony. A sikeres biológiai védekezés egy gramm talajban 10^5 - 10^6 propagulum jelenlétét igényli [Adams, 1990], de az ilyen nagy mennyiség sem ökológiai, sem gazdasági, sem közegészségügyi szempontból nem kívánatos. A probléma megoldását fokozott biokontroll aktivitású *Trichoderma* törzsek nemesítése jelentheti. Hatékonyabbak lehetnek azok a nemesített vonalak, melyek nem igényelnek olyan hosszú indukciós folyamatot a lebontó enzimek termeléséhez, mint a kiindulási törzsek, melyek általában konstitutívan termelik a β -1,3-glukanázokat, míg a kitináz és proteáz enzimszisztemek

bizonyos összetevőinek működése indukciót feltételez [Tilburg és Thomas, 1993; Haran és mtsai., 1996].

A nemesítési munkák másik fő célja a fungicidrezisztencia kialakítása vagy fokozása az egyes törzsekben, amely lehetőséget biztosíthat a talajban a már korábbi vegyszeres kezelések során visszamaradt esetleges fungicid szermaradványok toleranciájára, vagy éppen a törzsek fungicidekkel történő együttes alkalmazására [Ahmad és Baker, 1988; Sivan és Chet, 1992].

A fellelhető szakirodalom három nemesítési módszerről tudósít: a protoplasztfúzió, a mutagenézis és a transzformáció.

A protoplasztfúzió az ígéretes törzsek kedvező tulajdonságainak kombinálását teszi lehetővé, melyet sikerrel alkalmaztak *Trichoderma* törzsek nemesítése során kedvezőbb sajátságokkal rendelkező genetikai rekombinánsok létrehozására [Stasz és mtsai., 1988; Stasz, 1990; Pe'er és Chet, 1990; Sivan és Harman, 1991]. A transzformáció lehetőséget biztosít az adott sajátságért felelős gének közvetlen sejtbejuttatására, ehhez azonban szükség van használható transzformációs rendszerekre [Lorito és mtsai., 1993; Lo és mtsai., 1998; De Groot és mtsai., 1998; Herrera-Estrella és mtsai., 1990; Hazel és mtsai., 2000; Te'o és mtsai., 2002; Zeilinger, 2004] és szelekciós rendszerekre [Bae és Knudsen, 2000; Kubodera és mtsai., 2002]. Az irodalomban egyaránt találunk adatokat *Trichoderma* gének, pl. kitinázok [Baek és mtsai., 1999; Deane és mtsai., 1999; Giczey és mtsai., 1998], endoglukanázok [Sanchez-Torres és mtsai., 1994], β -glükoronidáz [Freeman és mtsai., 2002] és proteázok [Flores és mtsai., 1997] klónozásáról és transzformációjáról, és heterológ gének expressziójáról is [Manczinger és mtsai., 1997; Antal és mtsai., 1997; Seiboth és mtsai., 2005; Karaffa és mtsai., 2006].

Viszonylag kevés publikációt találhatunk a mutagenézissel történő nemesítésről. Előfordulnak közlések random izolátumok teszteléséről és fungicidrezisztens mutánsok izolálásáról, de az enzimszekréciós képességek mutagenézissel történő fokozásáról csak néhány adat áll rendelkezésre [Sinha és Upadhyay, 1993; Manczinger és mtsai., 1994], pedig a környezetvédelmi szervek az így előállított törzsek szabadföldi alkalmazását könnyebben engedélyezik, mint a protoplasztfúzióval vagy a transzformációval nemesített törzsekét.

III. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- 6PGDH** – 6-foszfoglükonát dehidrogenáz
- ATCC** – American Type Culture Collection
- Atr I** – magyarországi *T. atroviride* genotípus
- BCI** – Biokontroll Index
- Bre I** – valószínűleg új, *Stromatica* kládhoz tartozó fajokat reprezentáló genotípus
- CAE** – cellulóz-acetát izoenzim-elektroforézis
- CBH** – cellobiohidroláz
- CBS** – Centraalbureau voor Schimmelcultures
- CECT** – Colección Española de Cultivos Tipo
- CEP1** – *N*-acetyl-Leu-p-nitroanilidet hasító kimoelasztáz-típusú proteáz
- CEP2** – *N*-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilidet hasító kimoelasztáz-típusú proteáz
- CM** – Centro Nacional de Microbiología, Immunología y Virología Sanitaria
- col** – telepmorfológiai mutáns törzsek elnevezése (colonial)
- CTP1** – *N*-benzoyl-L-Tyr-p-nitroanilidet hasító kimotripszin-típusú proteáz
- CTP2** – *N*-szukcinil-L-Phe-p-nitroanilidet hasító kimotripszin-típusú proteáz
- CTP3** – *N*-sukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidet hasító kimotripszin-típusú proteáz
- DAOM** – Department of Agriculture, Ottawa, Mycology
- ET** – elektroforetikus típus
- Ex** – extípus
- Ex/a** – második extípus a *T. atroviride* fajnál
- G6PDH** – glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
- Gen 1, 2a, 2b, 3, 4, 5** – genotípusok a *T. harzianum* fajon belül
- GPI** – glükóz-6-foszfát izomeráz
- Har I, II, III, IV** – magyarországi genotípusok a *T. harzianum* fajon belül
- IP** – Institut Pasteur
- ITS** – internal transcribed spacer
- LB** – Luria-Bertani
- LETS** – LiCl, EDTA, Tris, SDS tartalmú puffer

- LPEP** – Leu-aminopeptidáz
- MTT** – metiltiazolil-difenil-tetrazólium-bromid
- NAG** – β -1,4-N-acetil-glükózaminidáz
- NCBI** – National Center for Biotechnology Information
- NRRL** – Agricultural Research Service Culture Collection
- Obl I,II** – *T. oblongisporum* genotípusok
- PCR** – polymerase chain reaction
- PDA** – potato dextrose agar
- PEP A** – peptidáz A
- PEP B** – peptidáz B
- PEP D** – peptidáz D
- pfa*** – a p-fluor-fenilalanin rezisztens mutáns törzsek elnevezése
- pFFA** – p-fluor-fenilalanin
- PGM** – foszfoglükomutáz
- PMS** – fenazin-metaszulfát
- RAPD** – random amplified DNA
- rDNS** – rRNS-t kódoló DNS szekvencia
- Ros I, II** – *T. rossicum* genotípusok
- Ruf I, Ruf II** – a *Rufa* kládon belüli valószínűleg új fajokat reprezentáló genotípusok
- SNA** – Synthetischer Nährstoffarmer agar
- SZMC** – Microbiological Collection of the University of Szeged
- TE** – Tris, EDTA tartalmú puffer
- TRP1** – *N*- α -benzoil-DL-Arg-p-nitroanilidet hasító tripszin-típusú proteáz
- TRP2** – *N*-benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilidet hasító tripszin-típusú proteáz
- UAMH** – University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium
- Vir Ex** – *T. virens* faj extípusa
- Vir I, II, III, IV** – filogenetikai csoportok a *T. virens* fajon belül
- YEG** – élesztőkivonatos táptalaj vagy tápoldat
- α GLU** – α -glükozidáz
- β GAL** – β -galaktozidáz
- β GLU** – β -glükozidáz
- β XYL** – β -xilozidáz

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Mikroorganizmusok és növények

A őszi búza növényeket tartalmazó talajmintákat 5 különböző mezőgazdasági területről gyűjtöttük 18 mintavételi pontból, 5 cm x 5 cm mintavevő segítségével kivitelezett véletlen mintavételi eljárás során. A mintákat azonnal steril polietilén zacskókba helyeztük és a kioltásig 4 °C-on tároltuk. Munkánk során 116 *Trichoderma* nemzetségbe tartozó törzset izoláltunk (**7. táblázat**). A tisztított törzseket a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékének gyűjteményében (Microbiological Collection of the University of Szeged – SZMC) helyeztük el.

A kezdeti cellulóz-acetát elektroforézis vizsgálatokhoz törzsgyűjteményekből származó 10 klinikai és 4 nem-klinikai *Trichoderma* izolátumot alkalmaztunk (**1. táblázat**).

1. táblázat. A törzsgyűjteményekből származó klinikai és nem klinikai törzsek.

Törzsszám ^a	Izolálás helye	Földrajzi eredet
ATCC 201044	bőrlézió	Texas
ATCC 208859	HIV+ beteg	Texas
CBS 446.95	tüdő	Ausztria
IP 2110.92	tüdő, agy, szív, gyomor	Franciaország
UAMH 9515	peritoneális folyadék	Kanada
UAMH 7955	akut invazív szinusztisz	Pennsylvania
UAMH 7956	tüdő, má	Iowa
UAMH 9573	peritoneális katéter	Kanada
CM 382	peritoneális folyadék	Kanári-szigete
043.99 ^b	orrváladék	Graz, Ausztria
UAMH 999	mormota tüdő	Kanada
CECT 2412	gombakomposzt	Wales
CECT 2606	talaj	Sierra Leone
CECT 2937	talaj	Antarktisz

^aATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; IP: Institut Pasteur; UAMH: University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium; CM: Centro Nacional de Microbiología, Immunología y Virología Sanitaria; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

^b Dr. W. Buzina saját gyűjteménye, ENT University Hospital, Karl-Franzens-University

A nemesítési kísérletekben használt *T. harzianum* T334 jelű törzset Manczinger és munkatársai izolálták a dél-magyarországi Ásotthalom közelében lévő erdő talajából [Antal, Z. és mtsai., 2000].

Az egész populációra kiterjedő *in vitro* antagonizmus-vizsgálatokban és a módosított agresszivitási tesztekben az Agricultural Research Service (Magyarország) törzsgyűjteményéből származó, igazoltan jelentős búzakártevő *Fusarium culmorum* NRRL 29371 [Tóth és mtsai., 2004], míg a nemesítési kísérleteknél és az antibiotikum-termelő képesség vizsgálatánál a szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht. törzsgyűjteményéből származó növénypatogén *Fusarium culmorum* 1181, *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryanum* és *Rhizoctonia solani* törzseket használtuk. A gombatörzseket élesztőkivonatos táptalajon tartottuk fenn (1% glükóz, 0,5% élesztő kivonat, 1% KH_2PO_4 , 2% agar, desztillált víz) [Manczinger és Ferenczy, 1985].

A *Trichoderma* törzsek antibiotikum-termelő képességének baktériumokra gyakorolt hatását a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményéből származó Gram-pozitív (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*) és Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) baktériumokon vizsgáltuk. A baktériumtörzseket LB-táptalajon (1% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 1% NaCl; 1,5% agar, desztillált víz) tartottuk fenn.

A módosított agresszivitási tesztekben a Ttj-RC103 jelű, *Fusarium*-fertőzésre érzékeny búzavonalat alkalmaztuk, melyet a Gabonatermesztési Kutató Kht. gyűjteményéből szereztünk be.

IV.2. Tenyésztési körülmények

IV.2.1. Izolálás

A őszi búza mintákból a növények gyökereit használtuk inokulációra. A levágott gyökereket gyors, steril vizes lemosás után 30 ml szelektív táptalajt (0,5% pepton, 0,1% KH_2PO_4 , 1% glükóz, 0,05% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% 0,2%-os diklorán-etanol oldat, 0,025% 5%-os Rose Bengal oldat, 2% agar, desztillált víz; a sterilizálás után kiegészítve: 0,01% oxitetraciklin, 0,01% sztreptomycin, 0,01% klóramfenikol) tartalmazó Petri-csésze felszínére helyeztük. A növekvő *Trichoderma* telepek széléről további átoltásokat végeztünk a szükséges számban a tisztatenyészetek eléréséig a fenti antibiotikumokkal kiegészített, élesztőkivonatos táptalajon (0,2% élesztő kivonat, 0,5% KH_2PO_4 , 2% agar, desztillált víz).

IV.2.2. *In vitro* antagonizmus-tesztek

Az izolált *Trichoderma* törzsek növényparazita gombákkal szembeni antagonista képességét 25°C-on *Fusarium culmorum* NRRL 29371 törzsel szemben, míg a nemesítési kísérleteknél *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryanum* és *Rhizoctonia solani* törzsekkel szemben vizsgáltuk. A tesztekhez a *Trichoderma* izolátumokat 2 napig, a növénypatogén törzseket 3 napig előtenyésztettük élesztőkivonatos táptalajon, majd a telepek a **IV.8.1.** rész alapján kerültek leoltásra. A Biokontroll Index (BCI) meghatározására kidolgozott módszer során a négy *Trichoderma* izolátum (SZMC 1623, SZMC 1670, SZMC 1678, SZMC 1706) növénypatogén gombákkal szembeni antagonizmusát élesztőkivonatos és burgonyakivonatos (potato dextrose agar - PDA, Sigma) táptalajon állandó fényben vagy állandó sötétben inkubálva, a teljes izolátumpopuláció antagonizmusát élesztőkivonatos és minimál (0,2% glükóz, 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% NaNO_3 , 2% agar, desztillált víz) táptalajon fényben inkubálva, a nemesítési kísérletekben alkalmazott *Trichoderma* törzsek antagonizmusát különböző nitrogénforrást (0,1% NaNO_3 vagy 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vagy 0,1% élesztő kivonat) tartalmazó minimál táptalajon természetes fény–sötét fényviszonyok között vizsgáltuk.

IV.2.3. Módosított agresszivitás-tesztek

A *Fusarium culmorum* NRRL 29371 törzset malátás táplemezre (0,25% élesztőkivonat, 0,5% maláta, 1% glükóz, 2% agar, desztillált víz) oltottuk és 3 napig 25 °C-on inkubáltuk. A lemezek felszínét 3 ml steril desztillált vízzel mostuk és az így kapott szuszpenziót használtuk a 200 ml rázatott tenyészetek (0,25% élesztő, 0,5% maláta, 1% glükóz, desztillált víz) leoltására. A tenyészeteket 180 rpm-el rázattuk 25°C-on 4 napig.

A kísérletben a biokontroll tulajdonság tesztelésére a szemi-*in vivo* körülmények között, a *Trichoderma* törzsek élesztős táptalajon nőtt 4 napos telepeiről steril desztillált vizes lemosással készített, 10^6 konídium/ml koncentrációjú szuszpenziót használtuk fel a **IV.8.2.** részben leírtak szerint.

IV.2.4. Enzimtermelés-vizsgálatok

A törzsek tenyésztése az enzimtermelés-vizsgálatokhoz 25 ml tápoldatot tartalmazó 50 ml-es Erlenmeyer-lombikokban történt, melyeket steril desztillált vizes konídiumszuszpenziókkal oltottunk be 10^5 konídium/ml-es végkoncentrációra.

A őszi búza gyökeréről izolált *Trichoderma* törzsek konstitutív enzimtermelésének vizsgálatára élesztőkivonatos (0,2% élesztőkivonat, 0,5% KH_2PO_4 , 2% agar, desztillált víz) és minimál (0,2% glükóz, 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% NaNO_3 , desztillált víz) tápoldatokat alkalmaztunk. A lombikokat 25°C-on inkubáltuk és rázótálcán 5 napig, 200 rpm-es fordulattal ráztattuk.

A nemesítési vizsgálatok során a vad típusú T334-es és a mutáns törzseket tápoldatba (0,3% mannit, 0,1% NaNO_3 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, desztillált víz) oltottuk és 25 °C-on rázótálcán 220 rpm-es fordulattal ráztattuk.

A vad típusú *T. harzianum* T334 törzs proteázszekréciójának szén- és nitrogénforrás függését tápoldatban (1% szénforrás, 0,5% nitrogénforrás, 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, desztillált víz) vizsgáltuk, mely kiegészült a megfelelő szén- (glükóz, mannit, szorbit) és nitrogénforrásokkal (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glutamin), és 25 °C-on rázótálcán 3 napig 220 rpm-es fordulattal ráztattuk.

A Sephadex G-100 oszlopkromatográfiához a kiválasztott törzsek előtenyésztése 100 ml térfogatban élesztőkivonatos tápoldatban (0,1% élesztőkivonat, 0,5% glükóz, 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, desztillált víz) történt, melyet 10^5 konídium/ml-es végkoncentrációban oltottunk le. A tápoldatot 25 °C-on 5 napig 220 rpm-es fordulattal ráztattuk.

IV.2.5. Taxonómiai és antibiotikum-termelési vizsgálatok

Az intracelluláris fehérjék és a DNS kivonásához, valamint az antibiotikum extrakcióhoz a *Trichoderma* izolátumokat 250 ml-es Erlenmeyer-lombikokban 200 ml élesztőkivonatos tápoldatban tenyésztettük, melyeket konídiumszuszpenzióval oltottunk be 10^5 konídium/ml végkoncentrációra. A tenyészedényeket rázótálcán 4 napig inkubáltuk 25°C-on 200 rpm-el.

A morfológiai vizsgálatokhoz a törzseket minimál táplemezekben 25 °C-on 3 napig növesztettük.

Az antibiotikum hatásvizsgálatokra a IV.1. részben felsorolt Gram(-) és Gram(+) baktériumtörzsek egész éjszakán át LB-tápoldatban (1% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 1% NaCl; desztillált víz) rázatott tenyészetének 400 µl-ét 2 ml 1%-os agartartalmú, 40 °C-os LB táptalajba kevertük, amelyet előzetesen kiöntött LB táplemezek felszínére rétegeztünk. A *Fusarium culmorum* 1181, *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani* indikátorként alkalmazott növénypatogén gombatörzsek 4 napos, élesztőkivonatos táptalajon

növesztett tenyészeiből élesztőkivonatos táplemezeket oltottunk be oltókaccsal a csészék közepére pontban oltva.

IV.2.6. A *Trichoderma* törzsek növekedésének mérése

A lineáris növekedési rátát telepátmérő-mérésekkel határoztuk meg PDA táptalajon 35°C-on, SNA táptalajon (0,02% glükóz, 0,02% szaharóz, 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% KNO_3 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% KCl, 2% agar, desztillált víz) pedig 35°C-on. A 9 cm átmérőjű csészékbe öntött 30 ml táptalajt aktívan növekvő telepek széléről dugófúróval kivágott, 5 mm-es korongokkal oltottuk le, majd a lemezeket 3 napig inkubáltuk. A telepátmérőket vonalzóval mértük a hifakorong szélétől a telepszélig. Minden mérést két párhuzamosban végeztünk.

IV.3. Taxonómiai vizsgálatok

IV.3.1. Morfológiai vizsgálatok

A IV.2.5. részben leírtak szerint tenyésztett, búzagyökérről izolált törzsek telepszéleinek felszínéről lándzsatüvel vett fehér színű, kevés konídiumot tartalmazó hifaszövedéket tárgylemezre cseppentett 20 µl desztillált vízben finoman szétörzsöltük és a fedőlemez ráhelyezése után mikroszkópban vizsgáltuk 40x-es ill. 100x nagyításokkal.

2. táblázat. A *Trichoderma* törzsek azonosítása során vizsgált morfológiai jellegek.

Morfológiai képlet	Vizsgált paraméterek	Paraméterek értékei
Konídium	alak	gömbölyű, ovális, ellipszoid
	méret	szélesség, hossz (µm)
	méret arányai	hossz/szélesség
	szín	zöld, szürkészöld, sárga, fehér
Konidiofór	alak	sűrűn-, ritkán elágazó
	pusztulák	van, nincs, elhelyezkedés a telepen
Fialidok	fertilis és sterilis hajtások	van, nincs
	méret	hossz, alapi és középponti szélesség
	méret arányai	hossz/legnagyobb szélesség
	elhelyezkedés	örvös, ujjszerű
Telep	interkaláris fialidok	van, nincs
	telepsugár	PDA-n, SNA-n
	telep illata	kókuszillat, nincs

Az egyes morfológiai képletek mérését objektív- és okulármikrométer segítségével határoztuk meg. Az **2. táblázatban** foglaltuk össze az általunk rögzített paramétereket, melyeket az elérhető legújabb morfológiai határozókulcsok alapján értékeltünk (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/>).

IV.3.2. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok

IV.3.2.1. Mintaelőkészítés

A **IV.2.5.** részben leírtak szerint előtenyésztett törzsek micéliumát Whatman No. 1 szűrőpapíron vákuum-szűrtük, majd háromszori 50 ml-es desztillált vizes mosás után liofilizáltuk. A szárított micéliumot dörzsmozsárban porítottuk és a felhasználásig -20°C-on tároltuk.

IV.3.2.2. Izoenzim-elektroforézis

IV.3.2.2.1. Fehérjekivonás

A fehérjekivonás során Ládai és Szécsi módszerét követtük [Ládai és Szécsi, 2001]. Eppendorf-csövekben (1,5 ml) 25 mg micéliumport 0,3 ml extrakciós pufferrel (0,1 M Tris [pH 8,0], 1 mM EDTA·Na₂, 10 mM KCl, 350 mM polivinil-pirrolidon, 6,5 mM ditiotritol, 0,15 mM NADP) homogenizáltunk és 1 óráig inkubáltuk 4 °C-on. A homogenizátumot 13000 rpm-el 15 percig centrifugáltuk, majd a tiszta felülúszót a zavaros fázishatár megsértése nélkül óvatosan begyűjtöttük. Az extraktumokat 50 µl-es részekre osztva -70°C-on tároltuk.

IV.3.2.2.2. Elektroforézis

A cellulóz-acetát izoenzim-elektroforézis (CAE) vizsgálatokhoz a szükséges felszereléseket a Helena Laboratories-tól (Beaumont, TX, USA) szereztük be és Hebert és Beaton módszerét követtük [Hebert és Beaton, 1993]. A Titan III cellulóz-acetát géleket (Kat. szám: 3024) pufferedényben (Kat. szám: 5093), az elektroforézis-pufferben (0,25 mM Tris-glycine, pH 8,5) áztattuk 30 percig, majd Whatman No. 1 szűrőpapírlapok között szárítottuk. Az elektroforézis-tankot (Kat. szám: 1283) 2x120 ml elektroforézis-pufferrel töltöttük fel, és a tank válaszfalaira Whatman No. 1 szűrőpapírcsíkot helyeztünk. A CAE-géleket az illesztőalapra (Kat. szám: 4094) helyeztük, majd az enzimeket tartalmazó mintákat Super Z-12 applikátorral (Kat. szám: 4090) helyeztük a gélekre. Ha az enzimek aktivitása nem volt jól

detektálható a gél festése során, ezt a műveletet többször is megismételtük. Az elektroforézist 180 V-on 20 percig végeztük.

IV.3.2.2.3. A cellulóz-acetát gélek festése

Az enzimaktivitásokat agarfelülöntéssel (1,6% agar, desztillált víz) technikával detektáltuk [Hebert és Beaton, 1993], a tesztelt enzimeket és az alkalmazott módszereket foglalja össze a **3. és 4 A., B. táblázat**. A reakcióelegy összeállítása során a 60°C-on temperált agar-oldat 2 ml-éhez félkémcsőben hozzámértük a megfelelő összetevőket majd a géltre öntöttük.

Az egyes enzimek futási mintázatait két független fehérjekivonásból származó mintákkal ellenőriztük. Az egyes sávokat és mintázatot mobilitásuk szerint rendszereztük az ábécé betűinek megfelelően, az anódhoz legközelebb lévő sávtól kezdve.

IV.3.2.3. DNS-szekvenciák vizsgálata

IV.3.2.3.1. Nukleinsavkivonás

A teljes nukleinsav izolálására a Leach és mtsai. [Leach és mtsai., 1986] által kidolgozott módszert alkalmaztuk. Eppendorf-csővekbe a törzsek 8 µg elporított micéliumát mértük és 500 µl LETS (0,1 mol LiCl, 10 mmol EDTA, 10 mmol Tris [pH=8,0], 0,5% SDS) pufferrel homogenizáltuk. A homogenizátumokhoz 500 µl fenol : kloroform : izoamilalkohol 25:24:1 arányú keverékét adtuk, majd az újabb homogenizálást követően 10 percig centrifugáltunk 12000 rpm-es fordulattal. A felülúszóhoz 700 µl kloroformot mértünk, majd a keverés után újra centrifugáltuk az előzőek szerint. A felülúszóban lévő nukleinsavakat kétszeres térfogatú 96%-os etanollal kicsaptuk, majd 20 percig -20°C-on inkubáltuk. Újabb centrifugálási lépést (10 perc, 12000 rpm) követően a felülúszó leöntése után a csapadékot 500 ml 70%-os etanollal mostuk, majd 10 perc liofilizálás után a mintákat 300 ml TE pufferben (0,121% Tris [pH= 8,0], 0,037% EDTA) vettük fel.

3. táblázat. Az elektroforézis során vizsgált intracelluláris enzimek.

Enzim	Rövidítés	E.C. szám	Eljárás
6-Foszfoglükonát dehidrogenáz	6PGDH	1.1.1.44	0,6 ml Tris, (pH=8,0) 1,5 ml NADP 6 csepp 6-foszfoglükonsav 6 csepp MgCl ₂ 5 csepp MTT 5 csepp PMS 2 ml agar
Akonitáz	ACN	4.2.1.3	16 csepp cisz-akonitsav (pH 8,0) 1,5 ml NADP 6 csepp MgCl ₂ 5 csepp MTT 5 csepp PMS 10 µl izocitrát dehidrogenáz 2 ml agar
Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz	G6PDH	1.1.1.49	0,6 ml Tris, pH=8,0 1,5 ml NADP 12 csepp D-glükóz-6-foszfát 6 csepp MgCl ₂ 5 csepp MTT 5 csepp PMS 2 ml agar
Glükóz -6- foszfát izomeráz	GPI	5.3.1.9	1,0 ml Tris, pH=8,0 1,5 ml NAD 5 csepp fruktóz-6-foszfát 5 csepp MTT 5 csepp PMS 10 µl glükóz-6-foszfát dehidrogenáz 2 ml agar
Glicerol-3- foszfát dehidrogenáz	GPDH	1.1.1.8	1 ml D-fruktóz-1,6-difoszfát oldat 1,5 ml NAD 5 csepp Na ₂ HAsO ₄ 5 csepp MTT 5 csepp PMS 2 ml agar
Malát dehidrogenáz	MDH	1.1.1.37	1,0 ml Tris, pH=8,0 1,5 ml NAD 13 csepp DL-almasav oldat (pH=8) 5 csepp MTT 5 csepp PMS 2 ml agar

Enzim	Rövidítés	E.C. szám	Eljárás
Peroxidáz	PRX	1.11.1.7	2,0 ml 0,02M Na ₂ HPO ₄ (pH=7,5) 4 csepp H ₂ O ₂ oldat (1%-os) 8 csepp o-dianizidin 2 csepp MnCl ₂ 2 ml agar
Peptidáz A (Gly-Leu), Peptidáz B (Leu-Gly-Gly), Peptidáz D (Phe-Pro)	PEP A, B, D	3.4.11/13	2,0 ml 0,02M Na ₂ HPO ₄ (pH=7,5) 4 csepp peroxidáz 8 csepp o-dianizidin 2 csepp MnCl ₂ 8 csepp dipeptid (15 mg/ml) 4 csepp L-aminosav oxidáz 2 ml agar
Foszfoglükomutáz	PGM	5.4.2.2	1,0 ml Tris, pH=8,0 1,5 ml NAD 5 csepp MgCl ₂ 5 csepp glükóz-1-foszfát oldat 5 csepp MTT 5 csepp PMS 20 µl glükóz-6-foszfát dehidrogenáz 2 ml agar
Shikimát dehidrogenáz	SKDH	1.1.1.25	1,0 ml Tris, pH=8,0 13 csepp shikimát oldat 1,5 ml NADP 5 csepp MTT 5 csepp PMS 2 ml agar
Szukcinát dehidrogenáz	SUD	1.3.99.1	1,0 ml Tris, pH=8,0 13 csepp dinátrium-szukcinát oldat 4 csepp ATP oldat 1,5 ml NAD 5 csepp MTT 5 csepp PMS 2 ml agar

4. A. táblázat. Az elektroforézis során használt vegyszerek és oldatok.

Vegyület	Koncentráció (mg/ml)	Sigma-Aldrich kat. szám
NAD	2	N-7381
NADP	2	N-0505
6-foszfoglükonsav	20	P-7877
MgCl ₂	20	449172
MTT	10	M-2128
PMS	2	P-9625
cisz-akonitsav	10	A-3412
D-glükóz-6-foszfát	20	G-7879
fruktóz-6-foszfát	20	F-3627
D-fruktóz-1,6-difoszfát	100	F-0377
Na ₂ HAsO ₄	10	A-6756
DL-almasav	70	M-153
o-dianizidin	4	D-3252
MnCl ₂	20	244589
glükóz-1-foszfát	50	G-7000
shikimát	100	S-5375
ATP	10	A-5394
dinátrium-szukcinát	20	W-327700

4. B. táblázat. Az elektroforézis során használt enzimek.

Enzimek	Koncentráció (unit/ml)	Sigma kat. szám
izocitrát dehidrogenáz	50	I-1877
glükóz-6-foszfát dehidrogenáz	300	G-5885
peroxidáz	1000	P-8125
L-aminosav oxidáz	10	A-5174

A 3. és 4. táblázat rövidítései: ATP (adenozin-trifoszfát), PMS (fenazin-metaszulfát), MTT (metiltiazolil-difenil-tetrazólium-bromid), NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid), NADP (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát).

IV.3.2.3.2. PCR-reakciók

Az ITS 1-2 (internal transcribed spacer) és az 5,8S rRNS régiókat tartalmazó magi rDNS szakasz amplifikálásához PCR (polymerase chain reaction) technikát alkalmaztunk. A reakció során 5' primerként az ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), 3' primerként az ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') oligonukleotidokat használtuk [White és mtsai., 1990]. Az 50 µl térfogatú reakcióelegy 1,25-1,25 µl primert, 5 µl 10-szeres töménységű reakciópuffert (500 mM KCl, 100 nM Tris-HCl [pH=9,0], 1% TritonX 100 - ZENON), 5 µl 25 mM-os MgCl₂ oldatot (ZENON), 0,5 µl 5 Unit/ml-es *Taq* DNS-polimerázt (Dupl-a-TaqTM - ZENON), 5 µl dNTP mixet (Promega), 5 µl templát DNS-t és 27 µl bidesztillált vizet tartalmazott.

A reakció megfelelő hőmérsékleti lépéseinek biztosítására T3 Thermocycler (Biometra) PCR-készüléket alkalmaztunk. A reakció során a kezdeti denaturáció (94°C, 5 perc) után a 35 ciklusba foglalt denaturációs (94°C, 1 perc), primer bekötődési (annealing; 48°C, 1 perc) és láncpolimerizációs (72°C, 2 perc) lépések következtek majd egy végső polimerizációs lépés (72°C, 7 perc).

IV.3.2.3.3. Elektroforézis és szekvencia meghatározás

A PCR-termékek 5 µl-ét 2 µl futtató (loading) oldathoz (0,1% etídium-bromid, 0,1% brómfenolkék) adtuk hozzá és 0,5 mg/l etídium-bromidot tartalmazó, 1,5%-os agaróz minigélekre vittük, majd 1 óráig elektroforetizáltuk 1 x TBE pufferben (1% Tris [pH 8,0], 5,5% bórsav, 0,1% EDTA·Na₂). Az elektroforézis után a gélben lévő DNS fragmenteket UV-fényben vizsgáltuk. A fenmaradó PCR-termékeket (20 µl) GenElute PCR Clean-Up kit (Sigma) segítségével tisztítottuk és BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Termék szám: 4337456) alkalmazásával Applied Biosystems 3730xl DNA Analyser készüléken szekvenáltattuk. A kapott szekvenciákat a FinchTV v.1.3.1 (Geospiza Inc.) programmal analizáltuk és feltöltöttük a GenBank internetes adatbázisába (www.ncbi.nlm.nih.gov).

IV.4. Extracelluláris enzimaktivitások mérése

Az extracelluláris enzimaktivitások mérésére paranitrofenol- és paranitroanilin tartalmú kromogén szubsztrátokat (Sigma) használtunk (**5. táblázat**). A szubsztrátokat 1 ml dimetil-szulfoxidban oldottuk fel és a koncentrációt desztillált vízzel 200 µg/ml-re állítottuk be. A fermentlevek 100 µl-ét 100 µl szubsztrátoldattal inkubáltuk mikrotiterlapokon 2 órán át 35 °C-on, majd Labsystems Uniskan II mikrotiterlap-spektrofotométer segítségével meghatároztuk a minták optikai denzitását 405 nm-en. A kontroll reakcióelegyben 100 µl desztillált vizet adtunk a mintákhoz. A paranitrofenil szubsztrátok alkalmazása esetén a mérések előtt az enzimreakciókat 50 µl 10% Na₂CO₃ hozzáadásával állítottuk le. Az egyes méréseket háromszor végeztük el. Az enzimaktivitások értékeit unit-ban (U) állapítottuk meg, 1 U az az enzimmennyiség, amely 1 nmol/ml p-nitro-fenol vagy p-nitro-anilin felszabadulását katalizálja 1 perc alatt 35 °C-on.

IV.5. Részleges antibiotikum-tisztítás és biológiai aktivitás-vizsgálat

Az előzetes tesztelések során a **IV.2.5.** részben leírtak szerint előkészített 3 Gram-pozitív, 2 Gram-negatív baktérium és 4 növénypatogén gombatörzs táplemezeibe 5 mm átmérőjű lyukakat fúrtunk steril lyukfúróval, melyekbe a őszi búza gyökeréről izolált *Trichoderma* törzsek fermentleveinek 40 µl-ét pipettáztuk. A táplemezeket 25 °C-on inkubáltuk.

A kiválasztott termelő törzsek tenyészeit Whatman No. 1 szűrőpapíron vákuum-szűrtük. A szűrletet liofilizáltuk, metanolban 10-szeresre töményítettük, majd ennek 10 µl-ét teszteltük a biológiai aktivitásra az előzőek szerint.

Az extraktumok vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatát Kieselgel 60 F254 szilika lapokon végeztük, mobil fázisként kloroform/metanol/ecetsav/víz (65/25/4/3) oldószerek elegyét használtuk, a foltokat UV-fényben és anizaldehid reagens (anizaldehid/kénsav/ecetsav-1/0,5/20) segítségével vizsgáltuk. A kapott foltokat visszaoldottuk 30 µl metanolban és teszteltük a biológiai aktivitást.

5. táblázat. A vizsgált extracelluláris enzimek és a mérések során alkalmazott szubsztrátok.

Szubsztrát	Enzim	E.C. szám	Rövidítés
<i>N</i> -acetyl-Leu- <i>p</i> -nitroanilid	kimoelasztáz-típusú proteáz	EC 3.4.21.-	CEP1
<i>N</i> -szukcinil-Ala-Ala-Pro-Leu- <i>p</i> -nitroanilid	kimoelasztáz-típusú proteáz	EC 3.4.21.-	CEP2
<i>N</i> - α -benzoil-DL-Arg- <i>p</i> -nitroanilid	tripszin-típusú proteáz	EC 3.4.21.4	TRP1
<i>N</i> -benzoil-Phe-Val-Arg- <i>p</i> -nitroanilid	tripszin-típusú proteáz	EC 3.4.21.4	TRP2
<i>N</i> -benzoil-L-Tyr- <i>p</i> -nitroanilid	kimotripszin-típusú proteáz	EC 3.4.21.1	CTP1
<i>N</i> -szukcinil-L-Phe- <i>p</i> -nitroanilid	kimotripszin-típusú proteáz	EC 3.4.21.1	CTP2
<i>N</i> -szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilid	kimotripszin-típusú proteáz	EC 3.4.21.1	CTP3
L-Leu- <i>p</i> -nitroanilid	Leu-aminopeptidáz	EC 3.4.11.1	LPEP
<i>p</i> -nitrofenil- <i>N</i> -acetyl- β -D-glükózaminid	β -1,4- <i>N</i> -acetyl-glükózaminidáz	EC 3.2.1.52	NAG
<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glükozid	α -glükozidáz	EC 3.2.1.20	α GLU
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glükozid	β -glükozidáz	EC 3.2.1.21	β GLU
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid	β -galaktozidáz	EC 3.2.1.23	β GAL
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-xilopiranozid	β -xilozidáz	EC 3.2.1.37	β XYL
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-cellobiozid	cellobiohidroláz	EC 3.2.1.150	CBH

IV.6. Nemesítés

IV.6.1. UV-fénnyel szembeni érzékenység meghatározása

A T334-es *Trichoderma* törzs 10000 konídium/ml-es szuszpenzióját 30 ml élesztőkivonatos táptalajt tartalmazó táplemezre szélesztettük. A leoltott táplemezeket beszáradás után különböző ideig (0-60 s) UV-sugárzásnak tettük ki, 23 cm magasságban lévő Phillips 15W-os germicidlámpával, majd a besugárzott csészéket 25 °C-on négy napig inkubáltuk. Az UV-kezelés nélküli kontroll csészén számolt telepszámot 100%-nak tekintve kiszámoltuk a túlélési százalékot az egyes kezelési idők esetében. A későbbi kísérletekben a sugárzás időtartamát úgy választottuk meg, hogy a túlélési százalék a 10-30%-os tartományban legyen, a szuszpenzió sejtkoncentrációját pedig úgy állítottuk be, hogy az egy csészén növekvő telepek száma hozzávetőlegesen 30 db legyen.

IV.6.2. A p-fluor-fenilalanin érzékenység vizsgálata

Táptalajhígítási módszerrel különböző koncentrációjú (0-1000 µg/mol) p-fluor-fenilalanin (pFFA) táplemezsorozatot (0,5% glükóz, 0,5% (NH₄)₂SO₄, 0,5% KH₂PO₄, 0,1% Mg SO₄ x 7H₂O, 0,5% glutamin, 2% agar, 0,01% sztreptomycin, desztillált víz) készítettünk. A különböző pFFA-koncentrációjú táptalajokat Petri-csészékbe öntöttük, majd pontoltással ráoltottuk a T334-es törzs konídiumait és 72 óra inkubáció után mértük a telepátmérőket. A későbbi nemesítési kísérletekben, a pFFA-érzékenységi görbe alapján (**32. ábra**) az aminosav-analógot 300 µl/ml-es koncentrációban adtuk a táptalajokhoz.

IV.6.3. Mutánsok izolálása

A morfológiai mutáns törzsek esetében a kompakt növekedésű telepeket - melyeknél mikroszkóppal vizsgálva a hifaelágazások kisebb távolságokban helyezkedtek el a vad törzshöz képest -, míg a pFFA-rezisztens mutánsok esetében a jól növekvő telepeket körbevágtuk, és az agarkoronggal együtt szélesztettük élesztő kivonatos táptalajt tartalmazó csészékre. A tiszta mutánstenyészeteket a második, harmadik szélesztéseknél sikerült létrehozni.

IV.7. Sephadex G-100 oszlopkromatográfia

A rázatott tenyészeteket vattával bélelt üvegtölcsér segítségével centrifugacsőbe szűrtük, és 10 perc 6000 rpm-es centrifugálást követően a felülúszót liofilező tálcába gyűjtöttük. Fagyasztás, majd egy éjszakán át tartó liofilezés után a szárított anyagot 10 ml desztillált vízben oldottuk fel, és a felhasználásig – 20 °C-on tároltuk. A liofilezéssel tízszeresére töményített fermentlevek 2 ml-ét Sephadex G-100 gélt tartalmazó K 90 (Pharmacia) kromatográfiás oszlopra (0,9 x 60 cm) vittük fel. Eluensként 0,01% MgCl₂-ot és 0,1% NaCl-ot tartalmazó oldatot használtunk. A minta teljes átfolyása után a 10-10 cseppet tartalmazó frakciókat –20°C-on tároltuk. Az enzimaktivitások mérései a **IV.4.** fejezetben leírt módon történtek. Az aktivitáscsúcsoknak megfelelő frakciótartományokra meghatároztuk a megoszlási koefficiens (K_{av}) értékét:

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

ahol V_e az elúciós térfogat (megfelelő frakció száma × 1 frakció térfogata [0,52 ml]), V₀ a kizárási térfogat (6,24 ml), V_t pedig a gélágy összterfogata (35,6 ml).

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

IV.8. Biokontroll vizsgálatok

IV.8.1. *In vitro* antagonizmus-tesztek és a Biokontroll Index meghatározása

A hagyományos *in vitro* antagonizmus-vizsgálatok során a tesztelt *Trichoderma* törzsek és a növénypatogén törzsek 5 mm átmérőjű hifa-korongjai egymástól pontosan 3 cm távolságban kerültek leoltásra a **IV.2.2.** részben közölt táptalajokra. A *Trichoderma* törzseket a növénypatogének leoltását követő harmadik napon oltottuk le, majd a csészéket 10 napig inkubáltuk és mértük a növénypatogén törzsek telepátmérőjét. A végső telepátmérő-értékeket három független mérés eredményeiből számoltuk.

Az általános BCI módszerének kidolgozásánál a törzsek előtenyésztéséből származó hifakorongok leoltását az előzőekben leírtak szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy a *Trichoderma* törzseket (**IV.2.2.**) 24 órával a növénypatogén leoltása után helyeztük a táplemezre. Az egyes antagonizmus tesztek minden **IV.2.2.** részben leírt inkubációs körülmény beállításával elvégeztük (PDA-állandó sötét, PDA-állandó fény, élesztőkivonatos táptalaj-állandó sötét, élesztőkivonatos táptalaj-állandó fény) három független ismétlésben. Az egyes táplemezekben a törzsek növekedését az antagonizmus folyamata során 24 óránként digitális fényképek készítésével követtük, melyhez 18 cm magasságban rögzített fotóállványra szerelt Kodak DX 3900 digitális fényképezőgépet használtunk. Az eredeti, 1800 x 1200 pixeles képeket az IrfanView v3.95 (www.irfanview.com) szoftverrel 900 x 600 pixeles felbontásra méreteztük át Lanczos filter [Duchon, 1979] felhasználásával. A digitális fényképeken a *Trichoderma* törzsek által elfoglalt és a mindkét gomba által elfoglalt területet Scion Image v.4.02 (Scion Corp., Frederick, MD, USA) program segítségével körberajzoltuk és megmértük.

A törzsek antagonizmusra való képességét dimenzió nélküli BCI értékekben állapítottuk meg az alábbi képlet szerint:

$$BCI = \frac{\text{a } Trichoderma \text{ telep területe}}{\text{a } Trichoderma \text{ és a patogén által elfoglalt terület}} \times 100$$

A módszer kidolgozását követően a BCI értékeket az egész őszi búza gyökeréről izolált *Trichoderma* populációra elvégeztük 10 napos inkubációs idővel, állandó fényben.

IV.8.2. Módosított agresszivitás tesztek

Kísérleteink során az eredeti *Fusarium* törzsekre Mesterházy által kidolgozott [Mesterházy, 1985] agresszivitási teszteket módosítottuk. A *Fusarium* tenyészeteket homogenizáltuk (Mechanika Preczyjna, Homogenizer type 3), majd a zúzalékba steril 9 cm-es szűrőpapírkorongokat (Schleicher & Schnell, Németország) áztattunk és 12 óráig 25 °C-on inkubáltuk. A hifazúzalékot tartalmazó szűrőpapírkorongokat kettesével Petri csészékbe helyeztük. A **IV.2.3.** rész szerint előállított *Trichoderma* törzsek 10 ml konídiumszuszpenzióiban és a kontroll csésze esetében desztillált vízben 50-50 darab búzaszemet csáváztunk egy éjszakán át, majd a szemeket 25-ösével az előkezelt szűrőpapírokra helyeztük. A csészéket 25 °C-on 4 napig inkubáltuk, a megfelelő nedvességet naponta 2 ml/csésze steril desztillált víz hozzáadásával biztosítottuk. A kísérletet két párhuzamossal végeztük és az értékelés során a csírázott búzaszemeket számoltuk.

IV.9. Az adatok elemzése

IV.9.1. Filogenetikai elemzések

IV.9.1.1. A cellulóz-acetát izoenzim-elektroforézis validálása

Az izoenzim-adatokból bináris mátrixot képeztünk az adott mobilitásnál található sávok megléte (1), vagy hiánya (0) szerint. Az egyezési koeficiensek (simple matching coefficient) felhasználásával távolság mátrixot készítettünk, majd a bootstrap-értékeket [Felsenstein, 1985] 1000 ismétlésből számoltuk a PHYLTOOLS [Buntjer, 1997] program segítségével. A legközelebbi szomszéd (neighbor-joining) módszer [Saitou és Nei, 1987] alapján készült filogenetikai fát a PHYLIP (v.3.57c) programcsomag NEIGHBOR és CONSENSE programjainak [Felsenstein, 1995] felhasználásával határoztuk meg. Kulcsoportként a *T. koningii* 043.99 törzset alkalmaztuk. Az ITS-szekvenciákat a GenBank adatbázisból gyűjtöttük (**1. melléklet**). A szekvenciákat a CLUSTAL X 1.83 szoftverrel illesztettük [Thompson és mtsai., 1997], majd manuálisan korrigáltuk az illesztést a Genedoc (v2.6) programmal [Nicholas és Nicholas, 1997]. A filogenetikai fát a CLUSTAL X programmal készítettük, a bootstrap-értékeket 1000 ismétlésből számítottuk.

IV.9.1.2. Az izolált *Trichoderma* törzsek filogenetikai analízise

IV.9.1.2.1. Izoenzim-mintázatok filogenetikai analízise

Az izoenzim-adatokból bináris mátrixot képeztünk az (IV.9.1.1.) részben leírt módon, és ezt használtuk fel a legközelebbi szomszéd és a parszimónia-analízisek során. A bootstrap-értékek számításához az 1000 származtatott mátrixot a Linux alapú PHYLIP (v.3.65) programcsomag [Felsenstein, 2005] SEQBOOT programjával készítettük. Az első módszer során az egyezési koeficiensek (simple matching coefficient) felhasználásával a távolság mátrix előállítására a PHYLTOOLS programot használtuk, majd a IV.9.1.1. részben foglaltak szerint futtattuk a további számolásokat.

A parszimónia-analízis során a származtatott mátrixokat a PARS programmal elemeztük a Wagner-algoritmus szerint [Eck és Dayhoff, 1966; Kluge és Farris, 1969]. Mindkét esetben a konszenzus filogenetikai fát a CONSENSE programmal hoztuk létre.

IV.9.1.2.2. ITS 1-2 szekvenciaadatok filogenetikai analízise

A szekvenciákat a CLUSTAL X 1.83 szoftverrel illesztettük, manuálisan korrigáltuk az illesztést a Cinema 5 v. 0.2.1 beta (Utopia) programmal, majd teszteltük az EMBOSS (v. 3.0.0.) programcsomag [Rice és mtsai., 2000] PLOTCON szoftverével. Az illesztésekből távolságokat számoltunk a DNADIST, majd 1000 ismétlést generáltunk a SEQBOOT programmal, melyeket a legközelebbi szomszéd és a parszimónia analízisekben is felhasználtunk. Az előbbi a NEIGHBOR programmal végeztük az izoenzim-adatok analízisének leírta szerint, míg az utóbbi esetben a DNAPARS programot használtuk. A konszenzus filogenetikai fákat a CONSENSE programmal számoltuk ki.

A Bayesian-analízist a MrBayes (v.3.1) [Huelsenbeck és Ronquist, 2001; Ronquist és Huelsenbeck, 2003] programmal végeztük a rates=invgamma, nst=6 lset, ngen=7000000, samplefreq=100 mcmc paraméterekkel. Az adatok elemzésénél a láncok felfűtése miatt az első 17500 láncot nem vettük figyelembe (sump burnin=17500; sumt burnin=17500).

IV.9.1.2.3. Az izoenzim mintázatok és az ITS 1-2 szekvencia-adatok együttes elemzése

Az együttes analízist a Bayesian módszerrel végeztük a MrBayes (v.3.1) [Huelsenbeck és Ronquist, 2001; Ronquist és Huelsenbeck, 2003] programmal. A beviteli NEXUS file-t [Maddison és mtsai., 1997] az alábbi sorokkal egészítettük ki:

```

begin mrbayes;
charset ITS = 1-419;
charset rest = 420-457;
partition favored = 2: ITS, rest;
set partition = favored;
end.

```

Az analízis során az lset applyto=(1) nst=6 rates=invgamma, lset applyto=(2) rates=equa coding=noabsencesites, unlink statefreq=(all) revmat=(all) shape=(all) pinvar=(all), prset applyto=(all) ratepr=variable paramétereket alkalmaztuk.

IV.9.2. Statisztikai analízisek

Az *in vitro* antagonizmus és a mért konstitutív extracelluláris enzimaktivitások közötti kapcsolatokat regressziós faanalízissel vizsgáltuk, ahol a magyarázó változók az extracelluláris enzimaktivitások, míg a magyarázott változó az antagonizmus volt. Mivel a *Trichoderma* és a *Fusarium* által elfoglalt teljes terület szignifikánsan nem változott a különböző izolátumok esetében, az analízisben a *Trichoderma* törzsek által elfoglalt területértékek átlagának logaritmusát használtuk fel, hogy az adatok eloszlása jobban közelítsen a normál eloszláshoz (minimál táptalaj: Pearson's $r=0,15$, $d_f=90$, $p=0,15$; élesztőkivonatos táptalaj: $r=-0,013$, $d_f=90$, $p=0,90$). A devianciák alapján a „ráfordítás-összetettség” (cost-complexity) modell alkalmazásával a regressziós fákról elhagytuk a kevésbé jelentős particionálásból származó ágakat. Az analízist az R v.2.0.1 [R Developmental Core Team, 2004] szoftver TREE csomagjával végeztük [Ripley, 2005].

Az R v.2.0.1 szoftver STATS csomagjával vizsgáltuk a korrelációt az egyes mért adatsorok között, és a többdimenziós skálázást is ezzel a csomaggal hajtottuk végre.

IV.9.3. Diverzitás

A Shannon-féle diverzitási indexet [Shannon, 1948] használtuk az izolátumaink faji diverzitásának jellemzésére az egyes mintahelyeken és a dél-magyarországi teljes mintaszámra. Az index figyelembe veszi a fajok számát és azok relatív abundanciáját is az alábbi képlet szerint:

$$H = -\sum_{i=1}^k p_i \ln p_i$$

ahol H a diverzitás értéke, p_i az i -edik csoport előfordulásának valószínűsége, amit a relatív gyakorisággal (a csoporthoz tartozó egyedek száma / az összes egyed) közelítettünk.

V. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

V.1. A *Trichoderma* törzsek izolálása

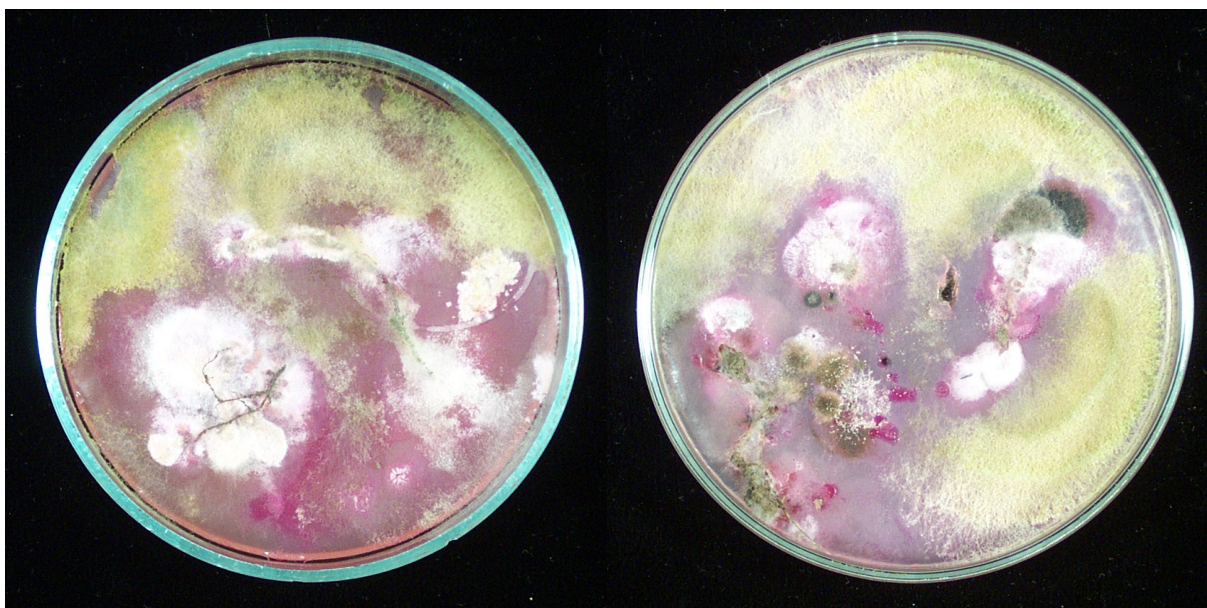
Száztizenhat *Trichoderma* törzset izoláltunk 5 dél-magyarországi mezőgazdasági terület 18 mintavételi helyéről 2002. januárjában (**6. táblázat**). Az izolálás közvetlenül a őszi búza gyökeréről történt.

6. táblázat. Az izolált *Trichoderma* törzsek mintavételi helyek szerinti eloszlása.

Földrajzi hely	Mintavételi helyek	Izolált törzsek száma	Törzsek - mintavételi helyek aránya
Algyő	1	7	7
Deszk	1	5	5
	3	5	
	4	5	
	5	5	
Kunszentmiklós	1	15	10,5
	2	6	
Rúzsa	1	11	5,8
	2	1	
	3	2	
	4	8	
	6	11	
	7	2	
Tiszasziget	1	5	6,6
	2	6	
	3	11	
	4	5	
	5	6	

A talajmintákból való izolálás során a gyorsan növvő járomspórás gombák sok esetben lehetetlenné teszik az egyes fonalgomba telepek felismerését a táplemezeken, azonban az alkalmazott Rose Bengal tartalmú táptalaj jól használhatónak bizonyult a *Trichoderma* törzsek izolálására (**2. ábra**). Az izolált törzsek száma a Kunszentmiklós 1 mintavételi helyen volt a legnagyobb (15 db) a Rúzsa 2 mintavételi helyen a legkisebb (1 db). Az átlagos, egy mintavételi helyre eső izolátumok száma 6,4 volt. Az izolátumszám – mintavételi hely aránya a

kunszentmiklósi mezőgazdasági területen volt a legnagyobb (10,5), a deszki területen (5) pedig a legkisebb.



2. ábra. *Trichoderma* törzsek izolálása őszi búza gyökeréről.

V.2. Izolált *Trichoderma* törzsek taxonómiai vizsgálata

V.2.1. Morfológiai fajazonosítás

A morfológiai kulcsok alapján 89 izolátumot, az izolátumok 76,7 %-át azonosítottuk fajsztinon. A határozás szempontjából a leghasználhatóbb morfológiai bélyegeknék a telepek sugara PDA-n és SNA-n 35°C-on, a telepmorfológia, a konídiofórok és fialidok habitusa, a konídiumok alakja és a pusztulák esetleges előfordulásai bizonyultak. Az izolátumok PDA-n és SNA-n mért telepeinek sugarait a **7. táblázatban** foglaltuk össze.

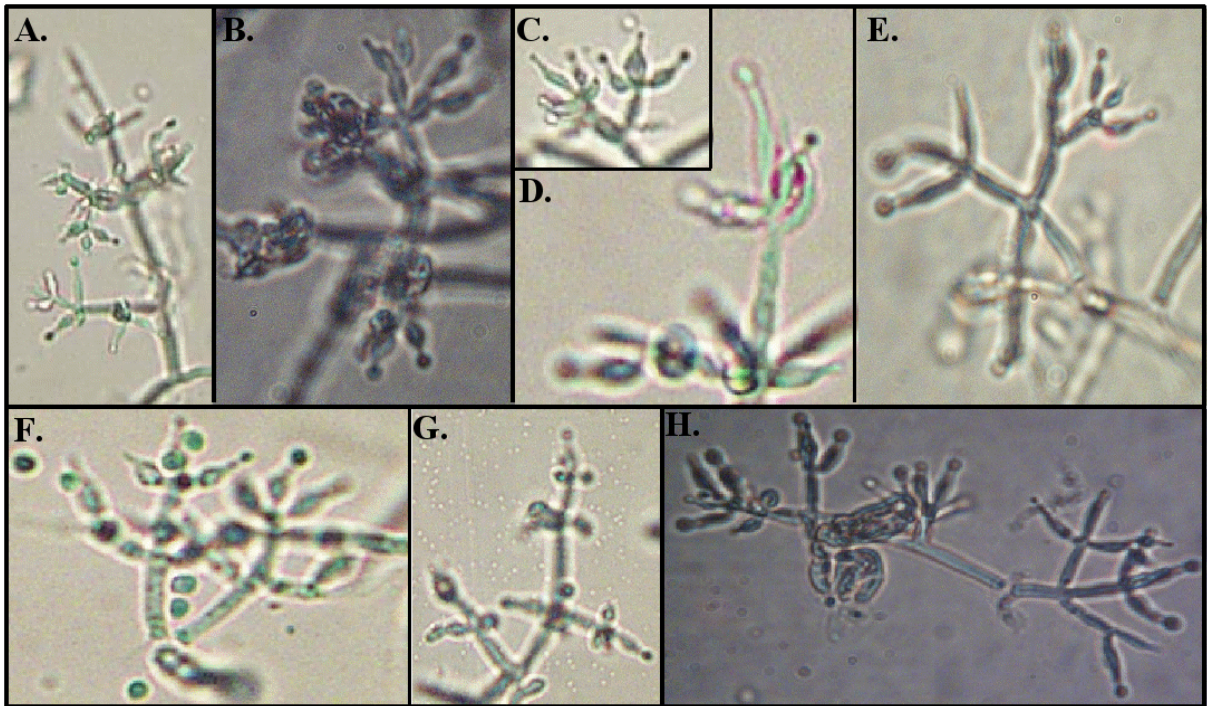
7. táblázat. Az izolált törzsek telepeinek sugarai a határozáshoz használt táptalajokon.

Törzsszám	Telep sugara (mm)		Morfológiai faj	Törzsszám	Telep sugara (mm)		Morfológiai faj
	PDA	SNA			PDA	SNA	
	35 °C	35 °C			35 °C	35 °C	
SZMC 1600	48	19	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1628	55	24	-
SZMC 1601	54	42	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1629	30	24	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1602	48	39	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1630	54	31	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1603	24	42	<i>T. virens</i>	SZMC 1631	2	4	-
SZMC 1604	24	38	<i>T. virens</i>	SZMC 1632	29	26	-
SZMC 1605	33	20	<i>T. virens</i>	SZMC 1633	33	29	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1606	54	39	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1634	53	33	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1607	2	5	<i>T. atroviride</i>	SZMC 1635	34	32	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1608	21	22	<i>T. harzianum</i>	SZMC 2636	55	34	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1609	2	5	<i>T. atroviride</i>	SZMC 2637	52	30	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1012	78	66	<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 1638	38	32	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1610	6	8	-	SZMC 1639	55	25	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1611	2	2	<i>T. atroviride</i>	SZMC 1640	29	22	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1612	25	16	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1641	48	24	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1613	5	5	-	SZMC 1642	52	40	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1614	4	5	<i>T. atroviride</i>	SZMC 1643	36	34	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1615	2	5	<i>T. atroviride</i>	SZMC 1644	53	24	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1158	78	66	<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 1645	3	5	-
SZMC 1616	33	38	<i>T. virens</i>	SZMC 1646	3	2	<i>T. atroviride</i>
SZMC 1159	78	58	<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 1647	55	16	<i>T. harzianum</i>
SZMC 0559	55	42	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1648	14	18	-
SZMC 1617	6	5	-	SZMC 1649	48	25	-
SZMC 1618	1	5	-	SZMC 1650	47	38	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1619	54	33	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1651	39	42	<i>T. virens</i>
SZMC 1620	33	41	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1652	38	32	<i>T. virens</i>
SZMC 1621	32	41	<i>T. virens</i>	SZMC 1653	14	10	-
SZMC 0931	21	35	<i>T. virens</i>	SZMC 1654	3	4	-
SZMC 1622	50	45	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1655	51	24	<i>T. harzianum</i>
SZMC 0560	53	48	<i>T. harzianum</i>	SZMC 0566	53	40	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1623	54	41	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1656	4	6	-
SZMC 1624	36	38	<i>T. virens</i>	SZMC 1657	22	18	-
SZMC 0886	78	65	<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 1658	3	6	-
SZMC 1625	29	35	<i>T. virens</i>	SZMC 1659	1	5	-
SZMC 0887	75	62	<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 1660	8	18	-
SZMC 1626	55	40	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1661	2	5	-
SZMC 1627	3	5	<i>T. atroviride</i>	SZMC 1662	3	5	-

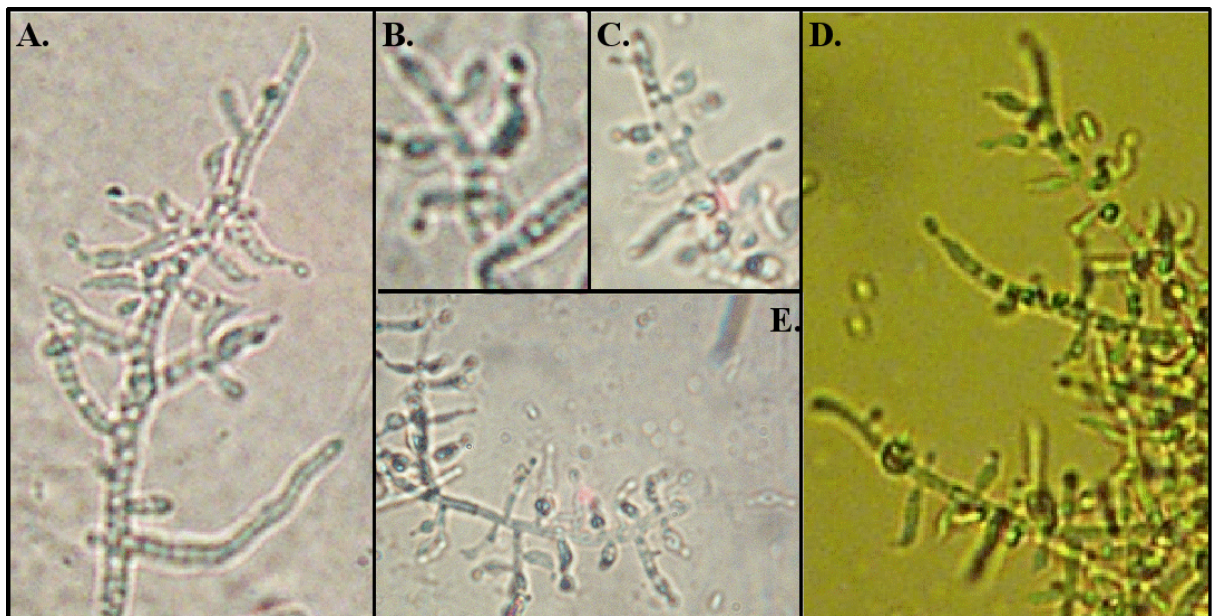
Törzsszám	Telep sugara (mm)		Morfológiai faj	Törzsszám	Telep sugara (mm)		Morfológiai faj
	PDA	SNA			PDA	SNA	
	35 °C	35 °C			35 °C	35 °C	
SZMC 1663	3	2	<i>T. atroviride</i>	SZMC 1683	40	26	<i>T. virens</i>
SZMC 1664	51	36	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1684	33	32	<i>T. virens</i>
SZMC 1665	49	32	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1685	33	38	<i>T. virens</i>
SZMC 1666	42	12	-	SZMC 1686	40	36	<i>T. virens</i>
SZMC 1667	38	20	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1687	3	5	<i>T. atroviride</i>
SZMC 1668	48	35	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1688	43	35	<i>T. virens</i>
SZMC 0561	41	34	<i>T. virens</i>	SZMC 0930	51	13	-
SZMC 1669	4	5	-	SZMC 1689	55	43	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1670	35	33	<i>T. virens</i>	SZMC 1690	54	38	<i>T. harzianum</i>
SZMC 1671	39	37	<i>T. virens</i>	SZMC 1691	38	34	<i>T. virens</i>
SZMC 1672	32	36	<i>T. virens</i>	SZMC 1692	42	35	<i>T. virens</i>
SZMC 0919	50	37	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1693	29	24	-
SZMC 1673	39	41	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1694	34	31	<i>T. virens</i>
SZMC 1674	32	25	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1695	24	32	<i>T. virens</i>
SZMC 1675	38	38	<i>T. virens</i>	SZMC 1696	38	36	<i>T. virens</i>
SZMC 1676	35	31	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1697	39	33	<i>T. virens</i>
SZMC 1677	53	42	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1698	54	34	<i>T. virens</i>
SZMC 1678	29	35	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1699	38	33	<i>T. virens</i>
SZMC 1679	6	15	-	SZMC 1700	41	34	<i>T. virens</i>
SZMC 1680	55	40	<i>T. harzianum</i>	SZMC 1701	33	31	<i>T. virens</i>
SZMC 1681	34	33	<i>T. virens</i>	SZMC 1702	2	4	-
SZMC 1682	28	37	-	SZMC 1703	3	5	-

A meghatározott izolátumok közül 44 a *T. harzianum* fajba tartozott. A PDA-n a mért telepsugarak 21-55 mm közé, míg SNA-n 16-48 mm közé estek, pusztulákat nem képeztek. A telep először sárga színű, később sárgászöld, a sárga pigment esetenként a táptalajba is diffundál. A konídiófor párosan elágazó, a fialidok hossza 6,5-6,7 μm , általában 2-4 áll csigavonalban, de egyedülálló formájuk is megtalálható; a csoportosan állók lombik alakúak, míg az egyedülálló és a terminálisokon lévők hosszúkasak (**3. ábra**). A zöld színű konídium alakja gömbölydedtől tojásdadig változik.

Öt izolátum *T. longibrachiatum*-nak bizonyult a határozás során. A telepsugár PDA-n 75-78 mm, SNA-n 58-66 mm volt.

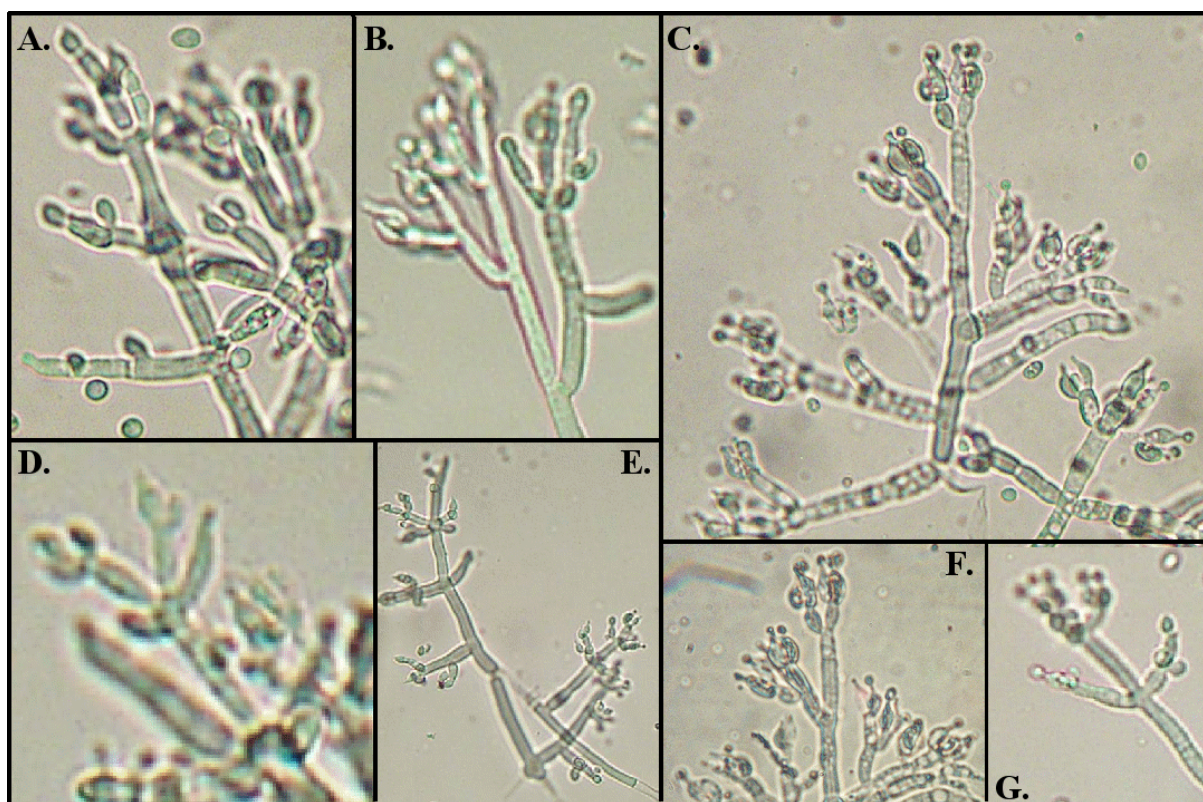


3. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1623 (A., F.), SZMC 1620 (B.), SZMC 1642 (C.), SZMC 1602 (D., E., H.), SZMC 1630 (G.) izolátumok morfológiai képletei.



4. ábra. A *T. longibrachiatum* SZMC 0886 (A., B.), SZMC 1012 (C., E.), SZMC 1159 (D.) izolátumok morfológiai képletei.

A *T. longibrachiatum* telepek felszínén a pusztulák nem tipikusan, de megjelenhetnek apró bolyhok (<0,5 mm) formájában, a konídiumok 35 °C-on 1 nap múlva elborítják a telepet sötétzöld konídium-pázsitot képezve, amely vattaszerű, fehér foltokkal tarkított. A pázsit felszínén alig észrevehető sárga hifaszövedék látható. A konídiofóra jellemző az erősen fejlett centrális tengely, amely csúcsi részen hosszabb, párosan elágazó ágakat tartalmaz. A fialidok a másodlagos ágakról erednek, de interkalárisan gyakoriak, magányosan, esetleg laza örvökben állnak (4. ábra). Hosszuk 2,2-17,2 µm, alakjuk hengeres, amely lehet egyenes vagy görbe, esetleg kampós. A zöld színű konídiumok alakja a lekerekített téglalaptól az ellipszisig változik.

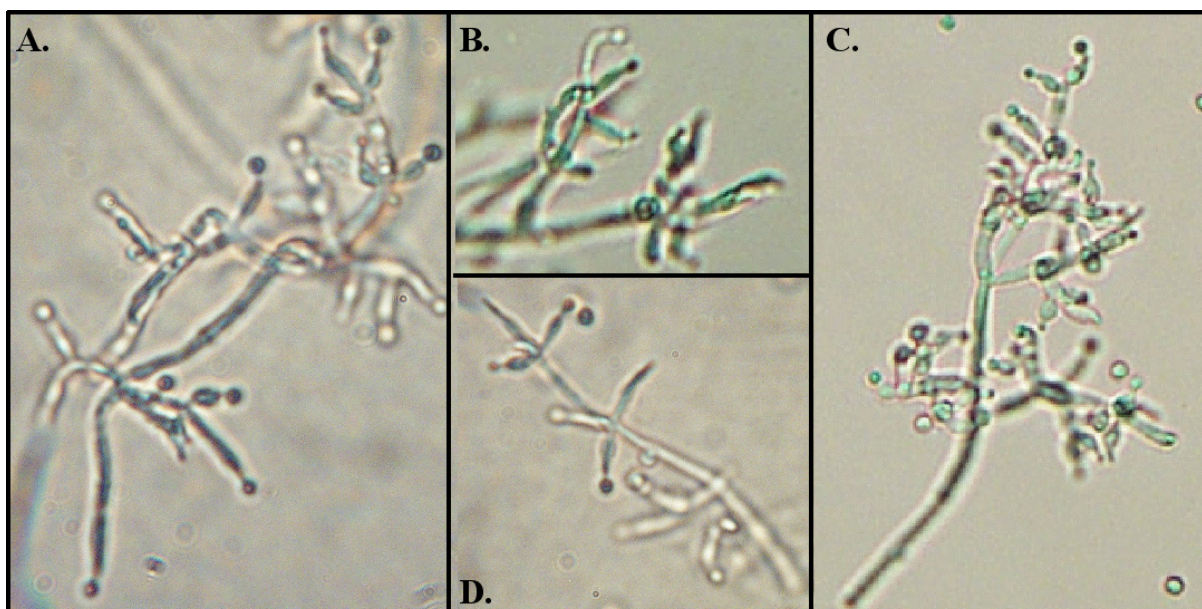


5. ábra. A *T. virens* SZMC 1621 (A., B.), SZMC 0561 (C., E., F.), SZMC 1684 (D.), SZMC 1670 (G.) izolátumok morfológiai képletei.

A morfológiai vizsgálatok során 31 izolátumot *T. virens*-nek azonosítottunk. A telepek sugarai PDA-n 21-43 mm, SNA-n 20-42 mm voltak, pusztulákat nem képeztek. A konídiofórok *Gliocladium*-típusúak, a légmicéliumokról csoportosan erednek, a csúcs felé elágazóak. Az ágak végén csoportosan (3-6), ujjszerűen erednek fialidok, melyek csak ritkán

állnak magányosan vagy párosan (**5. ábra**). A zöld konídiumok széles ellipszis alakúak és teljesen elborítják a telepet 3 nap után a minimál táptalajon.

A *T. atroviride* törzsek telepei (9 izolátum) jellegzetes „kókusz” illatúak, a sugár PDA-n 2-4 mm, SNA-n 2-5 mm volt. A konídiumok a telepek közepén diszperzen jelennek meg 3-4 cm átmérőjű körben és denz zöld pusztulákon a telep szélén. A konidiofór tipikusan unilaterális, de a páros elágazás is előfordul, az elágazások szöge közel 90°-os. A 4,2-15 µm hosszú fialidok örvösen (2-4) vagy magányosan állnak, melyek eredhetnek a központi tengelyről is. Alakjuk általában lombikszerű, a terminálisokon hengeres, lehetnek egyenesek vagy görbék akár az egészen kampósig (**6. ábra**). A zöld színű konídium a gömbölydedtől a tojásdadig változhat.



6. ábra. A *T. atroviride* SZMC 1627 (A., D., C.), SZMC 1615 (B.) izolátumok morfológiai képletei.

V.2.2. Molekuláris taxonómia

V.2.2.1. Cellulóz-acetát izoenzim elektroforézis

V.2.2.1.1. A módszer előzetes tesztelése

A módszer bevezetése során vizsgálatainkat kis mintaszámmal, már meghatározott, törzsgyűjteményekben törzsszámmal rendelkező 10 klinikai és 4 szaprofita *Trichoderma* törzsszel kezdtük, amelyeket saját izolálásból származó, a morfológiai vizsgálatok során *T. virens*-nek (SZMC 0931, 0561) és *T. harzianum*-nak (SZMC 0559, 0560, 0566, 0919) azonosított, illetve nem azonosított (SZMC 0930) törzsekkel egészítettünk ki.

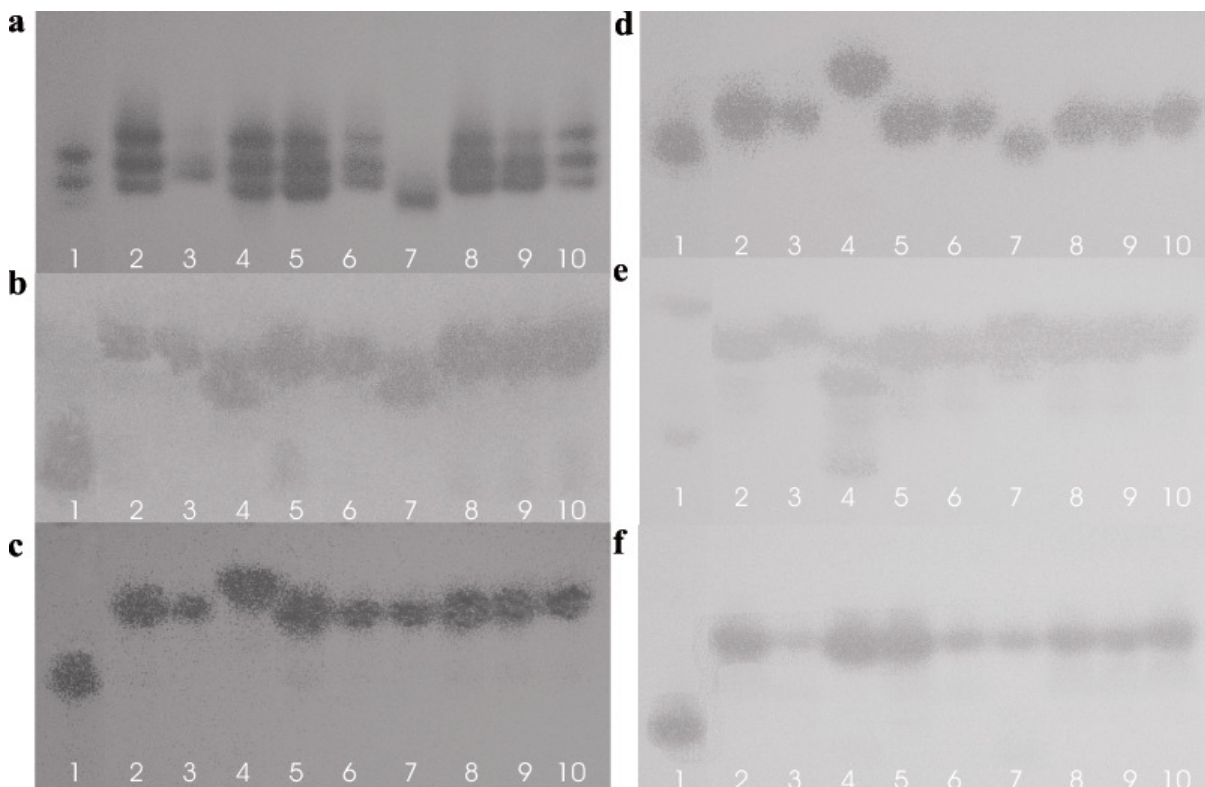
8. táblázat. A tesztelt enzimek aktivitása és az elektroforetikus mintázatok száma.

Enzim	Aktivitás	Elektroforetikus mintázatok száma
6-Foszfoglükonát dehidrogenáz	+	5
Akonitáz	-	-
Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz	+	6
Glükóz-6-foszfát izomeráz	+	6
Glicerol-3-foszfát dehidrogenáz	-	-
Malát dehidrogenáz	-	-
Peroxidáz	-	-
Peptidáz A (Gly-Leu)	+	5
Peptidáz B (Leu-Gly-Gly)	+	5
Peptidáz D (Phe-Pro)	+	8
Foszfoglükomutáz	+	5
Shikimát dehidrogenáz	-	-
Szukcinát dehidrogenáz	-	-

Kezdetben tizenhárom intracelluláris enzimet teszteltünk arra nézve, hogy aktivitásuk, és az egyes mintázatok megfelelőek-e a taxonómiai vizsgálatok céljaira (**3., 8. táblázat**). Hét enzim mutatott jól látható, határozott és jól reprodukálható mintázatot a vizsgált izolátumokban, melyek összesen 40 különböző mintázatot és egyben bináris értéket eredményeztek az *in silico* analízis számára (**8. táblázat**).

A glükóz-6-foszfát izomeráz (GPI), foszfoglükomutáz (PGM), peptidáz A (PEP A), peptidáz B (PEP B) és a 6-foszfoglükonát dehidrogenáz (6PGDH) elektromorfjai egysávosak voltak minden izolátum esetében, míg a peptidáz D (PEP D) mintázata kettő vagy három

sávból állt (7. ábra). A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PDH) futása komplex elektromorfokat eredményezett, de a különböző határozott mintázatokat jól el lehetett különíteni.



7. ábra. Cellulóz-acetát gélek G6PDH (a), GPI (b), PEP A (c), PEP B (d), PEP D (e) és PGM (f) enzimek aktivitására festve. ET IV: 1. oszlop (043.99); ET V: 4. oszlop (UAMH 999); ET VII: 7. oszlop (UAMH 9573); ET VIII: 3. oszlop (CECT 2937); ET X: 2. oszlop (CECT 2412), 5-6. oszlopok (CM 382, IP 2110.92) és 8-10. oszlopok (ATCC 208859, UAMH 9515, CBS 446.95).

A kiválasztott enzimek interspecifikusan polimorfnak mutatkoztak a vizsgált populációban. Magas intraspecifikus polimorfizmust tapasztaltunk a *T. longibrachiatum* törzsek esetében a PEP D, a 6PGDH és a G6PDH enzimek mintázatainak vizsgálata során (4, 3 és 3 elektromorf), ez azonban a PEP A, a PEP B és a GPI enzimek esetében kisebbnek mutatkozott (2 elektromorf). A PEP D és GPI izoenzimek a *T. harzianum* törzsek esetében mutattak magas intraspecifikus polimorfizmust.

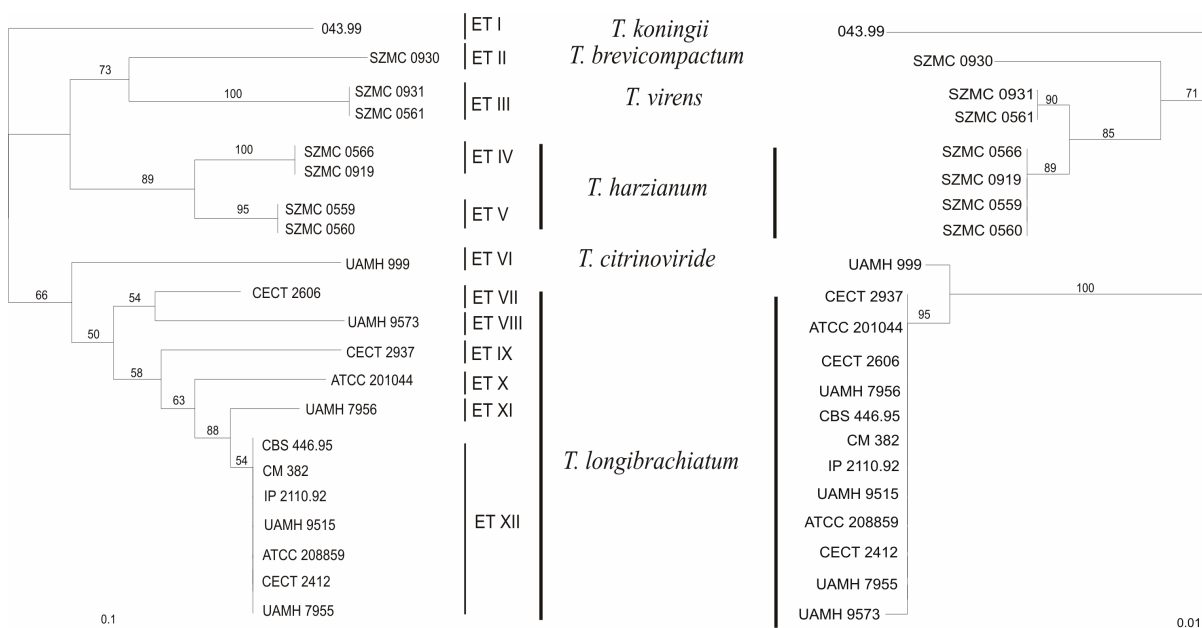
9. táblázat. Izoenzim fenotípusok és a *Trichoderma* törzsek elektroforetikus típusai a 7 vizsgált lókuszon.

Elektroforetikus típus	Izoenzim lókusz						
	PGM	G6PDH	PEP A	PEP B	PEP D	6PGDH	GPI
ET I	A	D	A	A	B	B	A
ET II	C	B	D	B	H	A	C
ET III	E	C	B	D	H	C	C
ET IV	B	A	D	C	A	C	B
ET V	B	A	D	C	B	C	C
ET VI	D	E	E	E	C	E	E
ET VII	D	E	C	C	F	C	D
ET VIII	D	C	C	B	F	B	D
ET IX	D	F	C	C	E	D	F
ET X	D	E	B	C	G	B	F
ET XI	D	E	C	C	D	C	F
ET XII	D	E	C	C	D	B	F

Annak érdekében, hogy az izoenzim-mintázatokból nyert eredményeket felhasználhassuk a későbbi taxonómiai és filogenetikai analízisekben, meg kellett vizsgálni a módszer nemzetségen belüli elkülönítő erejét. Ehhez az enzimmintázatok felhasználva elektroforetikus típusokat (ET) különítettünk el. A vizsgált populációban 12 ET-t tudtunk elkülöníteni (**9. táblázat**). Ezek a csoportok a következőképpen szerveződtek a fajok eredeti leírása szerint: ET I - *T. koningii*, ET II, ET IV és ET V - *T. harzianum*, ET III - *T. virens*, ET VI és ET VIII - *T. citrinoviride*, ET VII és ET X - *T. longibrachiatum*, ET IX és ET XI - *T. pseudokoningii*, és végül az ET XII, amelyhez három különböző fajba tartozó izolátum is tartozott: *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* és *T. koningii*. Ezek az eredmények azt sugallták számunkra, hogy vagy a módszer alkalmatlan taxonómiai célokra a *Trichoderma* nemzetségen belül, vagy pedig azok az izolátumok, amelyek az ET VIII, IX, XI és XII-be tartoznak, helytelenül lettek meghatározva, és valószínűleg a *T. longibrachiatum* faj képviselői.

Filogenetikai fát készítettünk az izoenzim-adatok felhasználásával a legközelebbi szomszéd módszer alapján (**8.a. ábra**). A *T. koningii* 043.99 törzs, amely a *Trichoderma* szekció *Rufa* kládját reprezentálja a nemzetség jelenlegi fajkonceptiója szerint [Druzhinina és Kubicek, 2005b; Chaverri és mtsai., 2004], az izoenzim-mintázatai alapján (ET I) teljesen elkülönült a többi vizsgált izolátumtól (**7.a.-f. ábra**, 1 oszlop), ezért külcsoportnak használtuk

az analízis során. A vizsgált izolátumok két nagy klaszterbe rendeződtek a dendrogramon (8.a. ábra).



8. ábra: (a) Az izoenzim-adatokon alapuló dendrogram a különböző elektroforetikus típusokkal. (b) ITS szekvencia-adatok filogenetikai analízisének alapuló törzsfá. Az ágakon lévő számok a bootstrap értékeket jelölik.

Az első klaszter 7 nem-klinikai izolátumot tartalmazott, melyek a nemzetség *Pachybasium* B szekciójába tartoznak: két *T. virens* izolátum (*Virens* klád, ET III), négy *T. harzianum* izolátum (*Lixii/catoptron* klád, ET IV és ET V), a nem azonosított *Trichoderma* sp. (*Lutea* klád, ET II). A második klaszter az ET VI-XII-vel rendelkező, *Longibrachiatum* szekció képviselőit tartalmazta. A *T. citrinoviride* UAMH 999 (ET VI) külön ágat formált a csoporton belül. Ez a klaszter tartalmazta az összes *T. longibrachiatum* izolátumot, valamint a korábban *T. citrinoviride*-nek leírt UAMH 9573, a *T. koningii*-nek leírt CM 382 és a *T. pseudokoningii*-nek leírt CECT 2412, és az UAMH 7955, UAMH 7956, IP 2110.92 és CECT2937 törzseket. Az VII-XII elektroforetikus típusok jól elkülönülő csoportot alkotnak a fán a köztük lévő nagyfokú biokémiai hasonlóságnak köszönhetően, ami alátámasztja azt a feltevést, hogy a fent említett 5 klinikai és két nem-klinikai izolátum is a *T. longibrachiatum* fajba tartozik.

Hipotézisünk igazolására, és a CAE módszer megbízhatóságának maradéktalan ellenőrzésére szükség volt más molekuláris taxonómiai módszer alkalmazására. A korábbi tanulmányok szerint a *Trichoderma* nemzetség *Longibrachiatum* szekcióján belül a fajok elkülönítésére az ITS régiók analízise megfelelő módszer [Kuhls és mtsai., 1997], ezért a CAE eredmények validálására a vizsgált törzseink korábban általunk [Kredics és mtsai., 2003a] és Kuhls és mtsai. [1999] által szekvenált ITS 1 régióit használtuk fel. Elkészítettük a törzsek ITS 1 szekvenciáján alapuló dendrogramot (**8.b. ábra**), amelyet összehasonlítottunk az izoenzim-adatokkal. Az izoenzim-mintázatokon és az ITS 1 szekvenciákon alapuló csoportok jó egyezést mutattak, a CAE eredmények viszont nagyobb felbontást adtak a *T. longibrachiatum* fajon belül. Elvárásainknak megfelelően a *T. longibrachiatum* izolátumok jól definiált klasztert képeztek, amely tartalmazta azt az öt klinikai és két nem-klinikai izolátumot is, amelyek eredetileg nem *T. longibrachiatum*-ként lettek azonosítva. Elsőként alkalmaztuk tehát a CAE módszerét a *Trichoderma* törzsek izoenzimeinek analízisére, és a kezdeti tesztlések során igazoltuk, hogy a módszer jól használható a későbbi taxonómiai munkák során, továbbá javaslatot tettünk néhány vizsgált izolátum reidentifikálására.

V.2.2.1.2. Az izolált *Trichoderma* törzsek izoenzim-analízise

Az előző részben leírtak alapján a teljes, 116 törzsre kiterjedő izoenzim-analízist öt kiválasztott enzim (**10. táblázat**) mintázatainak vizsgálatával végeztük. Az enzimek minden esetben jól értékelhető aktivitásokat mutattak, a populációban összesen 38 elektromorfot regisztráltunk (**10. táblázat**). Az egyes enzimekhez tartozó különböző mobilitásokat a **11. táblázat** és a **9. ábra** foglalja össze. A vizsgált populációban az ET XIII (32) fordult elő a legnagyobb számmal, az ide tartozó törzsek megfeleltek a morfológiai határozás során *T. harzianum*-ként azonosított faj képviselőinek.

A fennmaradó 11 *T. harzianum* törzs az I-es (1), XII-es (3), XVI-os (3) és XVII-es (5) ET-kbe tartozott. A *T. virens* törzsek a második legnagyobb populációjú XXII-es ET-be (30) és a XXI-es ET-be (2) tartoztak. A ET XV foglalta magába a *T. longibrachiatum* izolátumokat (5), az ET IV, V, VI és VIII pedig a *T. atroviride* izolátumokat. A 31 nem azonosított törzs az izoenzim-analízis során 14 különböző ET-be tartozott (**9. ábra**).

10. táblázat. A vizsgált enzimek elektroforetikus mintázatainak száma.

Enzim	Aktivitás	Elektroforetikus mintázatok száma
6-Foszfoglükonát dehidrogenáz	+	7
Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz	+	6
Glükóz-6-foszfát izomeráz	+	8
Peptidáz B (Leu-Gly-Gly)	+	6
Foszfoglükomutáz	+	11

11. táblázat. Izoenzim-fenotípusok és a *Trichoderma* törzsek elektroforetikus típusai.

Izoenzim lókuszt	Elektroforetikus típusok												
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
PGM	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	C	C	C
G6PDH	A	D	D	D	D	D	D	D	E	E	A	A	A
PEP B	D	B	B	D	D	D	E	D	D	E	C	D	D
6PGDH	F	B	F	B	B	B	F	B	C	C	B	F	F
GPI	E	A	A	A	C	D	C	D	C	C	D	A	D
Törzsek száma	1	3	4	1	3	2	1	1	2	1	1	3	32

Izoenzim lókuszt	Elektroforetikus típusok												
	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI
PGM	D	E	F	F	F	G	G	G	G	H	I	J	K
G6PDH	B	F	A	A	C	A	A	C	C	A	A	A	A
PEP B	C	D	D	F	E	A	D	E	E	D	D	D	D
6PGDH	A	E	G	D	G	F	F	F	F	F	F	G	G
GPI	D	G	D	D	G	F	F	B	D	F	D	G	H
Törzsek száma	3	5	3	5	3	3	1	2	29	1	1	3	2

PGM											G6PDH						PEPB						6PGDH							GPI							ET	
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	H	I

9. ábra. Az egyes elektroforetikus típusokhoz tartozó mintázatok sematikus ábrázolása metagélben. A morfológiai határozás során elkülönített fajokat eltérő színekkel jelöltük. *T. harzianum* (kék), *T. virens* (zöld), *T. longibrachiatum* (barna), *T. atroviride* (sárga).

V.2.2.2. ITS szekvenciák analízise

A IV.3.2.3. szakaszban leírtak szerint felszaporított ITS 1 – 5,8S – ITS 2 rRNS régiót tartalmazó kb. 600 bp-os magi rDNS szakaszok szekvenciáit használtuk a taxonómiai vizsgálatokhoz. A különböző rDNS szakaszok szekvencia-határainak megállapításában (**12. táblázat**) az NCBI internetes adatbázisában (www.ncbi.nlm.nih.gov) megtalálható 18S, 5,8S és 28S rRNS szekvenciák adataira támaszkodtunk.

12. táblázat. A *Trichoderma* fajokra jellemző rDNS szakaszok szekvenciahatárai.

rDNS szakasz	Szekvenciahatárok	
	Kezdet	Vég
18S rRNS	-	ggatcatta
5,8S rRNS	aaactttca	gagcgctattt
28S rRNS	ttgacctcg	-

Az irodalmi adatoknak megfelelően [Kuhls és mtsai., 1997] a vizsgált *Trichoderma* populációban az 5,8S rRNS szakasz szekvenciái minden törzs esetében megegyeztek. Az ITS 1 és ITS 2 szekvenciákban jelentős különbség mutatkozott, melyet fajmeghatározásra az oligonukleotid-„vonalkód” (bar-code) azonosítás során használtunk ki [Druzhinina és mtsai., 2005a]. A „vonalkód”-okon alapuló *TrichO*key 1.0 program (www.isth.info) segítségével 69 izolátumot lehetett fajszerint azonosítani, melyek közül 16 *T. virens*-nek, 40 *T. harzianum*-nak, 4 *T. brevicompactum*-nak, 1 *T. spirale*-nek és 5 *T. longibrachiatum*-nak bizonyult. Három izolátum, a leírás előtt álló – *T. harzianum* faj-aggregátumból kivált – egyelőre egy izolátum nevét viselő *Trichoderma* sp. DAOM 175924 csoportba tartozott. Tizennyolc törzset csak kládszerint határozott meg a módszer, melyek mind a *Rufa* kládba tartoztak, 29 törzs pedig ismeretlen *Trichoderma* faj képviselőjének bizonyult (**13. táblázat**).

13. táblázat. Az izolátumok taxonómiai helyzete az oligonukleotid - „vonalkód”-ok alapján.

Szekció	Klád	Faj	Törzsszám
<i>Pachybasium</i> B	<i>Virens</i>	<i>T. virens</i>	1701, 1675, 1685, 1681, 1605, 1621, 1604, 1700, 1698, 1697, 1696, 1691, 1688, 0931, 1624, 1683
	<i>Lixii/catoptron</i>	<i>T. harzianum</i>	1634, 1600, 1665, 1635, 1689, 1690, 0560, 0559, 0566, 0919, 1606, 1619, 1626, 1620, 1633, 1641, 1642, 1643, 1650, 1664, 1673, 1674, 1680, 1601, 1602, 1622, 1629, 1630, 1636, 1637, 1638, 1639, 1644, 1647, 1655, 1668, 1676, 1677, 1623, 1678
	<i>Lixii/catoptron</i>	<i>Trichoderma</i> sp. DAOM 175924	1608, 1612, 1667
	<i>Lutea</i>	<i>T. brevicompactum</i>	0930, 1693, 1628, 1632
	„Lone lineages”	<i>T. spirale</i>	1649
<i>Longibrachiatum</i>	-	<i>T. longibrachiatum</i>	0887, 0886, 1159, 1158, 1012
<i>Trichoderma</i>	<i>Rufa</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	1609, 1615, 1687, 1614, 1627, 1663, 1607, 1611, 1646, 1682, 1679, 1666, 1656, 1648, 1657, 1653, 1659, 1660
Ismeretlen	Ismeretlen	<i>Trichoderma</i> sp.	1699, 1692, 1616, 1684, 1603, 1651, 1694, 1695, 1686, 1625, 1652, 1671, 0561, 1670, 1672, 1640, 1617, 1613, 1610, 1658, 1618, 1631, 1645, 1661, 1662, 1654, 1703, 1702, 1669

A *Rufa* klád tagjait és az ismeretlen *Trichoderma* fajokat a *Tricho*BLAST lokális BLAST adatbázisában és az NCBI BLAST adatbázisában található szekvenciák illesztésével próbáltuk meg azonosítani, azonban ez nehézségekbe ütközött, ahogy ez a **14. táblázatból** is látszik. Ezek alapján a 15 *T. virens* törzs faji meghatározása elfogadható, de a fennmaradó 32 izolátum fajszerű taxonómiai helye még kérdéses maradt. Meglepő, hogy a *TrichO*key 1.0 által *Rufa* kládba sorolt törzsek a *Tricho*BLAST alapján a *Longibrachiatum* szekció *T. taiwanense* fajához [Bissett és mtsai., 2002] tartoznak, holott mindkét szekvenciaalapú határozókulcsot az ISTH üzemelteti (<http://www.isth.info/>). A lokális BLAST szerint az egyelőre egy izolátum nevét viselő *Trichoderma* sp. PPRI 3559 csoporttal való egyezés is kérdéses, ugyanis az adatbázisban található ITS 1-2 szekvencia nem teljes, számtalan „N”

bázist tartalmaz. Ezek a hiányosságok, és az, hogy a 15 *T. virens* fajba tartozó törzs ITS 1-2 szekvenciáit nem ismerte fel a rendszer, azt mutatja, hogy az oligonukleotid „vonalkód”-okon alapuló azonosítás még tartalmaz hibákat, így fejlesztésre szorul.

14. táblázat. A fennmaradó, nem meghatározott izolátumok taxonómiai helyzete
TRICHOBLAST lokális BLAST és az NCBI BLAST adatbázisa szerint.

ISTH-lokális BLAST	NCBI-BLAST	Törzsszám
<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	1699, 1692, 1616, 1684, 1603, 1651, 1694, 1695, 1686, 1625, 1652, 1671, 0561, 1670, 1672
<i>T. virens</i>	<i>T. harzianum</i>	1640
<i>T. virens</i>	<i>T. tomentosum</i>	1617, 1613, 1610
<i>T. sp. PPRI 3559</i>	<i>T. rossicum</i>	1658, 1618, 1631, 1661, 1654, 1703, 1702
<i>T. sp. PPRI 3559</i>	<i>T. stromaticum</i>	1645, 1662, 1669
<i>T. taiwanense</i>	<i>T. atroviride</i>	1609, 1615, 1687, 1614, 1627, 1663, 1607, 1611, 1646, 1682, 1679, 1656, 1657, 1653, 1659
<i>T. taiwanense</i>	<i>T. viride</i>	1666, 1648, 1660

Az ITS 1-2 szekvenciák, az izoenzim-mintázatok és a morfológiai határozás szerint összehasonlítva az egyes taxonómiai csoportokat, azt tapasztaltuk, hogy mind a *TrichO*key 1.0 szerinti *T. virens* izolátumok, mind a később BLAST adatbázis alapján azonosított *T. virens* izolátumok a morfológiai határozás szerint is a *T. virens* faj képviselői, és az izoenzim-mintázatok szerint a korábban is említett, két jól elkülönülő elektroforetikus típusba tartoztak (**9. ábra**). Ez is alátámasztja, hogy a „vonalkód”-ok alapján nem identifikált 15 törzs valóban a *T. virens* fajba tartozik. A *T. harzianum* törzsek az ET I, XII, XIII, XVII-be tartoztak, köztük az SZMC 1640-es izolátum is (ET XIII) amelynél a BLAST analízissel sem tudtunk konkrét meghatározásig jutni.

A három *Trichoderma* sp. DAOM 175924 izolátum az izoenzim-analízis során is elkülönült (ET XVI), de a morfológiai határozás során tévesen *T. harzianum*-ként azonosítottuk. Ez annak köszönhető, hogy még nem leírt - a *T. harzianum*-hoz közeli - fajról van szó, így morfológiai kulcsok sem állnak rendelkezésre. Az ET XI és az ET XIV tartalmazta a *T. brevicompactum*, az ET XV a *T. longibrachiatum* törzseket. Az ET XVIII-ban jól elkülönültek a SZMC 1617, 1613, 1610 törzsek (*T. virens*/*T. tomentosum* – lokális BLAST/NCBI-BLAST), hasonlóan az SZMC 1645, 1662, 1669 törzsekhez (ET XIX - *T. sp.*

PPRI 3559/*T. stromaticum*). Azonban, a *T. sp.* PPRI 3559/*T. rossicum*, a *T. taiwanense*/*T. atroviride* és a *T. taiwanense*/*T. viride* izolátumok több ET-hez is tartoztak, melyek között átfedések is előfordultak.

A morfológiai-, az izoenzim- és az ITS 1-2 szekvencia-vizsgálatok után még szükség volt az adatok filogenetikai analízisére is, hogy a fennmaradó 32 izolátum fajszerű taxonómiai pozícióját meg tudjuk határozni.

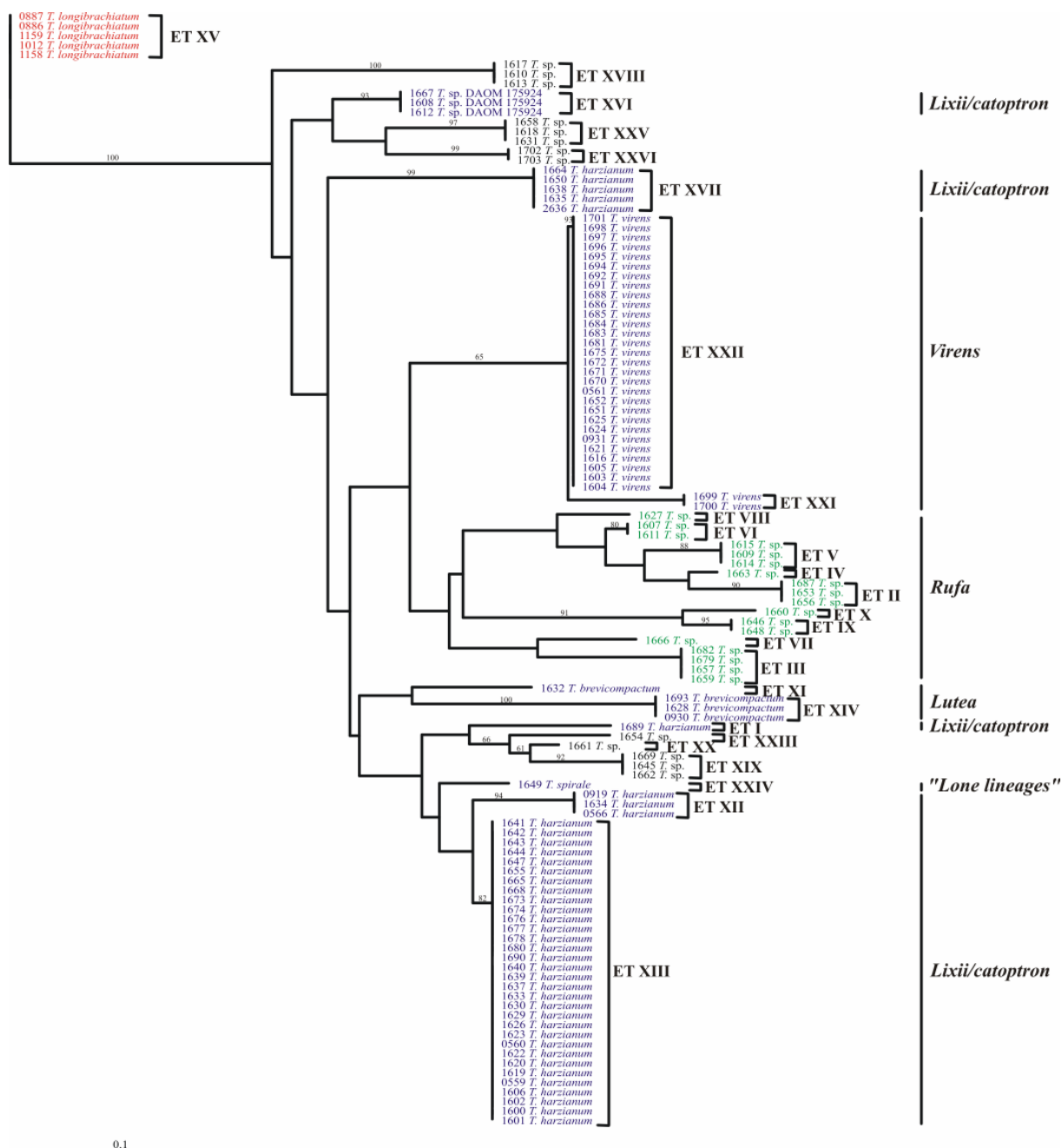
V.2.2.3. Filogenetikai vizsgálatok

V.2.2.3.1. Izoenzim adatok filogenetikai analízise

Az izoenzim-mintázatok filogenetikai analízisét parszimónia és a legközelebbi szomszéd módszer segítségével készítettük el. A két módszer alkalmazása során kapott konszenzus fák jó egyezést mutattak (**10. ábra**, **2. melléklet**). A parszimónia-analízis során az izolátumok két nagy klaszterbe rendeződtek. Az első klaszter tartalmazta a *T. virens* izolátumokat (ET XXII, XXI) és a „vonalkód”-ok alapján besorolt *Rufa* klád képviselőit, melyek az izoenzim-mintázataik alapján is egy szubkládba rendeződtek.

A *T. harzianum* (ET XVII, I, XII, XIII), a *T. sp.* DAOM 175924 (ET XVI), a *T. brevicompactum* (ET XI, XIV) és a *T. spirale* (ET XXIV) izolátumok a második klaszterbe rendeződtek. A tíz nem meghatározott törzs ET-i (XXIII, XX, XIX) egy viszonylag magas (57) bootstrap értékkel elkülönülő, külön csoportba tartoztak, amely a főleg *T. harzianum* fajokat tartalmazó kládba ékelődött.

A kládok jól elkülönültek a fán, de az izoenzim-mintázatok alapján készített dendrogram nem tükrözi a napjainkban elfogadott *Trichoderma* nemzetségen belüli filogenetikai kapcsolatokat. A CAE-mintázatok azonban jól definiálják az egyes fajokat és jól használhatóak a fajon belüli biokémiai diverzitás elemzésére, amint ezt a klinikai izolátumok esetében is tapasztaltuk.



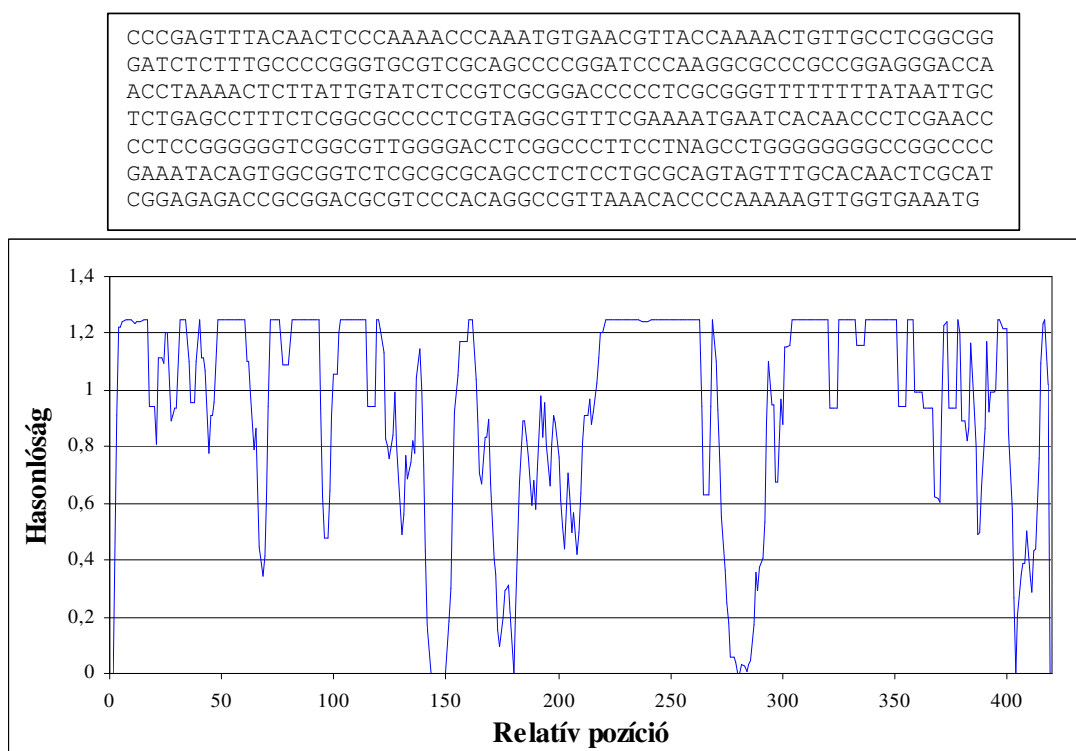
10. ábra. Az izoenzim adatokon alapuló legközelebbi szomszéd dendrogram a különböző elektroforetikus típusokkal. Az ágakon lévő számok a bootstrap értékeket, a függőleges vonalak az egyes kládokat, a színek a szekciókat jelölik. (piros - *Longibrachiatum*, kék - *Pachybasium* B, zöld – *Trichoderma*, fekete – nem meghatározott)

V.2.2.3.2. ITS 1-2 szekvenciák filogenetikai analízise

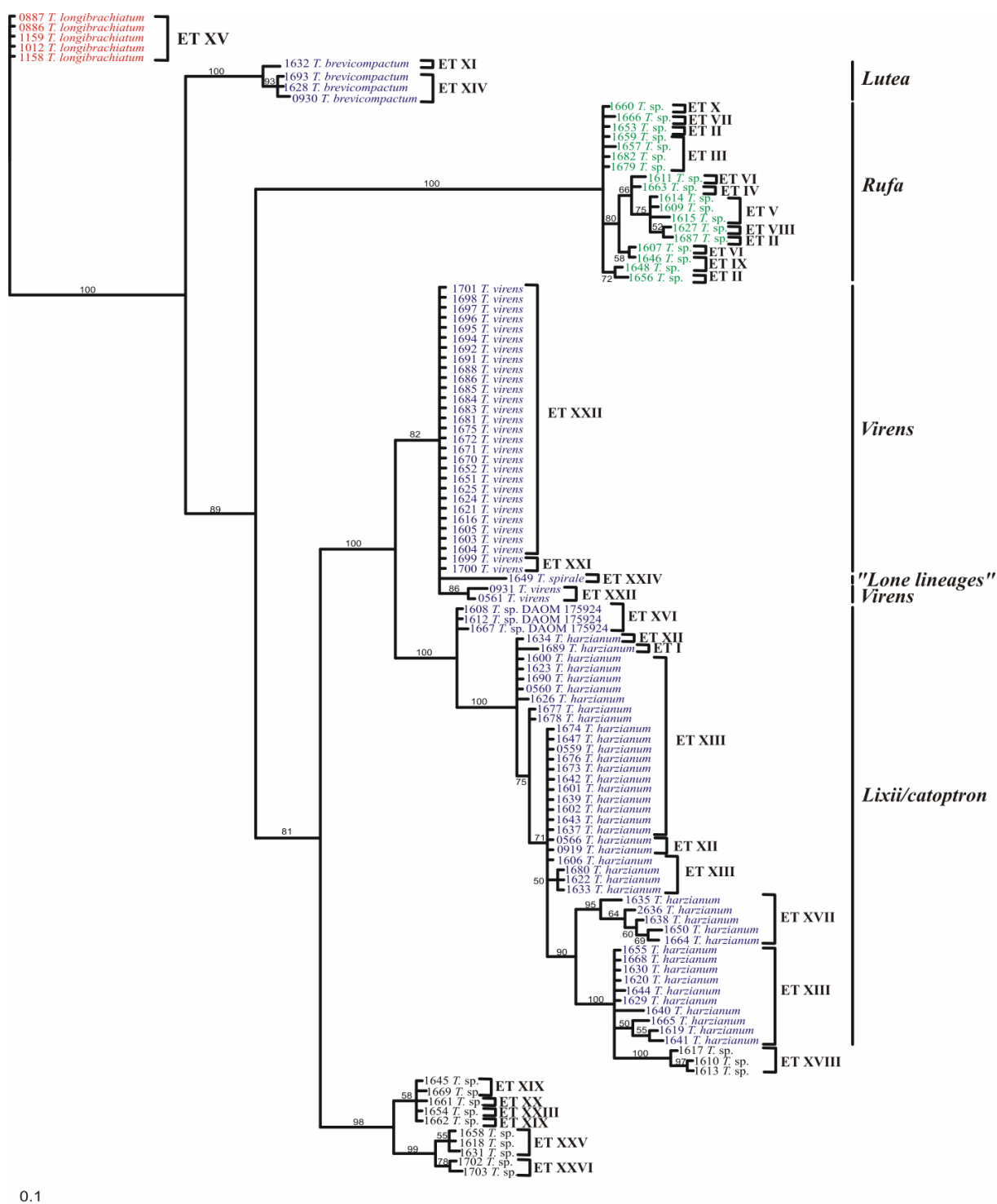
A fajazonosításra is alkalmazott ITS 1-2 szekvenciákat használtuk a filogenetikai analízisek során is, a taxonómiai csoportok között lévő genetikai távolságok vizsgálatára, és a morfológiai-, izoenzim-, és az egyedi szekvenciaelemzések után még nem meghatározott izolátumok nemzetségen belül elfoglalt helyének megállapítására.

Az illesztés során az illesztett szekvenciák hossza 419 bázisnak megfelelő konszenzus szekvencia volt (**11.ábra**), a különböző törzsekhez tartozó tényleges szekvenciahosszakat és az illesztés paramétereit a **3. melléklet** mutatja be.

A parszimónia-analízis alkalmazásakor az előbb említett konszenzus szekvencia elemeit használtuk fel, melyből 300 konstansnak, 12 változónak és parszimónia-uninformatívnak, míg 107 parszimónia-informatívnak bizonyult a számolás során. Száz egyenrangú filogenetikai fát generáltunk a heurisztikus keresés során, a konzisztencia index (CI) 0,6245, a retenciós index (RI) 0,9588, a homopláziás index (HI) pedig 0,3755 volt. A távolság mátrix, a parszimónia és a Bayes-analízis során kapott fák hasonló topológiát mutattak (**12.ábra**, **4.melléklet**).



11.ábra. Az illesztés során kialakult konszenzus szekvencia és az egyes relatív pozíciókban lévő bázisok hasonlóságának mértéke.



12. ábra. Az ITS 1-2 szekvenciák Bayesian analízise, a különböző izoenzim elektroforetikus típusokkal. Az ágakon lévő számok a bootstrap értékeket, a függőleges vonalak az egyes kládokat, a színek a szekciókat jelölik. (piros - *Longibrachiatum*, kék - *Pachybasium B*, zöld – *Trichoderma*, fekete – nem meghatározott)

A kapott filogenetikai fák jól egybevágnak az irodalmi adatokkal a meghatározott fajok tekintetében [Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002]. A *Longibrachiatum* szekció mind ITS 1-2 szekvenciák (**12. ábra**), mind az izoenzim-mintázat alapján (**10. ábra**) jól elkülönült a többi szekciótól. A *Pachybasium* B szekció két nagy klaszterben található a fán, mely megfelel a Kullnig-Gradinger és mtsai. [2002] által megállapított B1 és B2 csoportnak. A *T. brevicompactum* fajok az ITS 1-2 szekvenciák alapján két csoportra tagozódtak, ahol az egyes csoportok között a CAE-mintázatok is különbséget tettek. A *T. harzianum* izolátumok I-es, XVII-es, XVIII-as ET-je külön ágon volt az ITS 1-2 filogenetikai fán is, de az ET XII, XIII és a szekvenciacsoportok között átfedések mutatkoztak az egyes törzseknél.

Az SZMC 1634 törzs (ET XII) egy klaszterben volt az SZMC 1600, 1623, 1690, 0560, 1626 (ET XIII) törzsekkel, míg egy külön csoportot alkottak az SZMC 0566, 0919 (ET XII) és SZMC 1677, 1678, 1674, 1647, 0559, 1676, 1673, 1642, 1601, 1639, 1602, 1643, 1637 (ET XIII) törzsek, valamint egy újabb ágon helyezkedtek el az SZMC 1655, 1668, 1630, 1620, 1644, 1629, 1640, 1665, 1619, 1641 izolátumok (ET XIII). Hasonlókat tapasztaltunk a *T. virens* fajnál is, ahol az SZMC 1699, 1700 törzsek (ET XXI) egy klaszterben voltak az ET XXII izoenzim-típusokkal, az SZMC 0931, 0561 (ETXXII) izolátumok pedig egy oldalágon helyezkedtek el.

A *T. harzianum* faj az irodalmi adatok alapján is valószínűsíthetően több fajt tartalmazó aggregátum, de legalábbis több genotípusra tagolódik [Kullnig és mtsai., 2000; Chaverri és mtsai., 2003a]. Megvizsgáltuk az általunk izolált törzseket, hogy ITS 1-2 szekvenciáik alapján melyik genotípushoz tartoznak (**15. táblázat**).

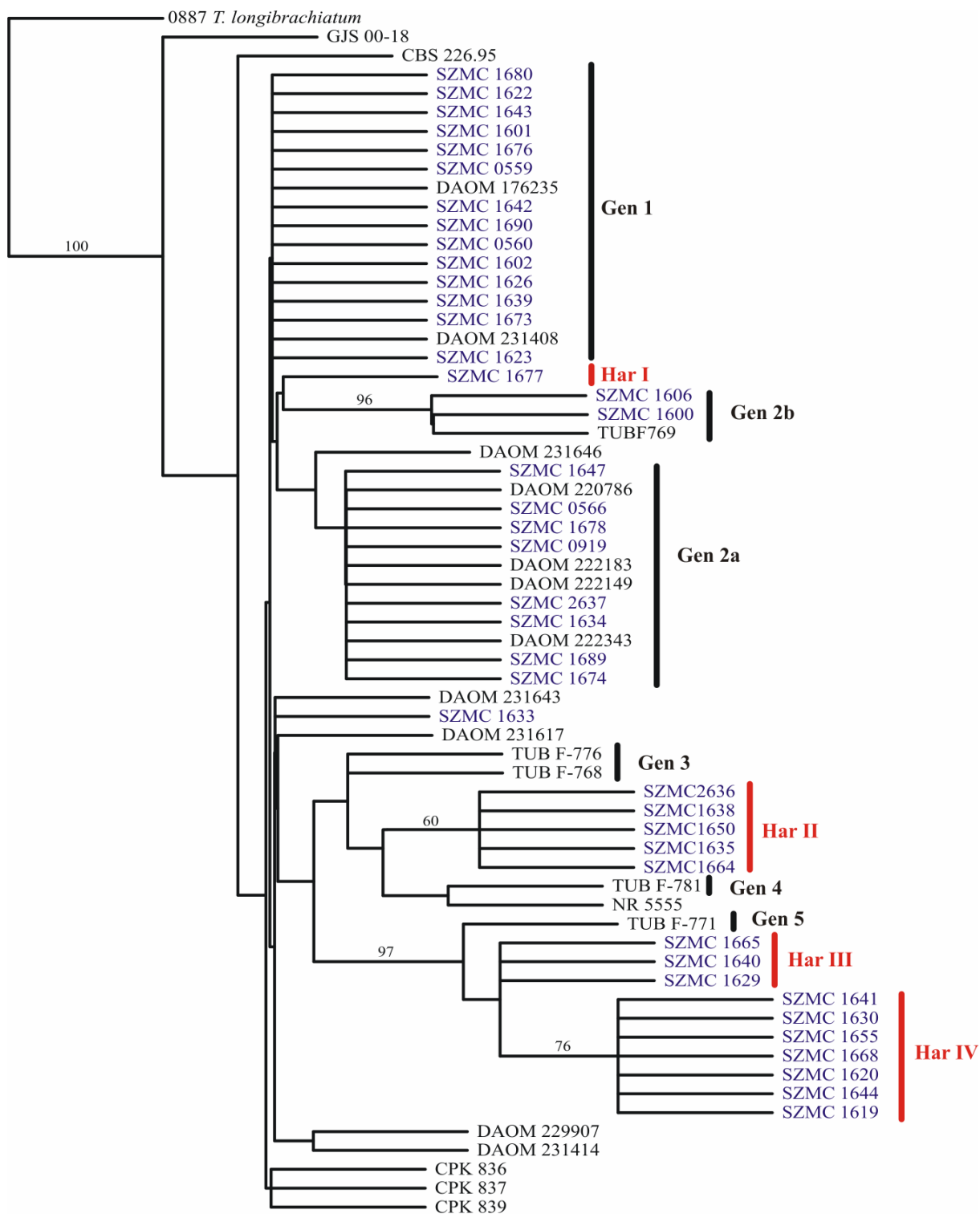
Az illesztés során az értékelésből ki kellett hagyni a szekvenciák első 38 és utolsó 32 nukleotidot tartalmazó részét (5' CCGA....TACC.... 3' és 5'....ACAG....AAATG 3'), mert számos referencia szekvenciából ez a régió hiányzott, valamint a CBS 226.95 törzs szekvenciája tartalmazott nem meghatározott nukleotidokat is (K és M). A filogenetikai elemzésből látszik, hogy a hazai *T. harzianum* fajok közül a legtöbb izolátum (14) a Kullnig és mtsai. által leírt, a szibériai Krasnoyarsk térségéből izolált 1-es genotípust reprezentálja (**Gen 1**) [Kullnig és mtsai., 2000]. Nyolc izolátum a Nyugat-Uráli (2a genotípus - **Gen 2a**), két izolátum a Nepáli (2b genotípus - **Gen 2b**) törzsekkel mutatott egyezést. Az SZMC 1633 törzs csak egy nukleotidban tért el a Druzhinina és mtsai. által izolált DAOM 231643 törzstől (242. pozíció G/-). Tíz izolátum az 5-ös (**Gen 5**), öt izolátum a 3-as és a 4-es genotípusokkal mutatott rokonságot (**Gen 3, 4**). A hazai törzsek számos esetben magas bootstrap értékkel

ágaztak el (**13. ábra**), melyek nagyobbak, mint az egyes korábban leírt genotípusok között megtalálható különbségek, mutatva, hogy a magyar izolátumok „magyar” genotípusokat reprezentálnak, melyeket eddig még nem közöltek az irodalomban. Ezekből a típusokból négyet különítettünk el és **Har**-el jelöltük őket (**13. ábra**).

A *T. virens* izolátumok esetében is végeztünk összehasonlító filogenetikai vizsgálatokat az eddig közölt szekvenciák segítségével (**16. táblázat**). Az illesztés során az értékelésből ki kellett hagyni a szekvenciák első 26 és utolsó 4 nukleotidját (5'....CCGA....CAAT....3' és 5'....AATG....3'), mert a referencia szekvenciákból ez a rész hiányzott, valamint a GL 3, GL 21, GL 20, GLi 39 törzseknél az ITS 1 - 5,8S RNS szekvenciahatárok hibásan voltak definiálva az adatbázisban.

15. táblázat. A *T. harzianum* fajok felhasznált ITS 1-2 szekvenciái.

Törzsszám	Genbank	Referencia
TUB F-769	AF149865	Kullnig és mtsai., 2000
TUB F-768	AF149862	Kullnig és mtsai., 2000
TUB F-776	AF149868	Kullnig és mtsai., 2000
TUB F-781	AF149870	Kullnig és mtsai., 2000
TUB F-771	AF149864	Kullnig és mtsai., 2000
CBS 226.95	AY605713	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 220786	AY605724	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 222343	AY605735	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 222183	AY605747	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 222149	AY605748	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 176235	AY605751	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 231617	AY605754	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 231646	AY605723	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 231408	AY605730	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 229907	AY605734	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
CPK 836	AJ606385	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 231414	AY605729	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
DAOM 231643	AY605722	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
CPK 839	AJ606388	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
CPK 837	AJ606386	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
NR 5555	AF194009	Druzhinina és mtsai., előkész.-1
GJS 00-18	AF443929	Druzhinina és mtsai., előkész.-1



13. ábra. A *T. harzianum* izolátumok és a GenBank-ban található törzsek ITS 1-2 szekvenciáinak parszimónia-analízise. A genotípusok Kulling és mtsai. szerint jelölve - **Gen 1, 2a, 2b, 3, 4, 5; Har** - új magyarországi genotípusok.

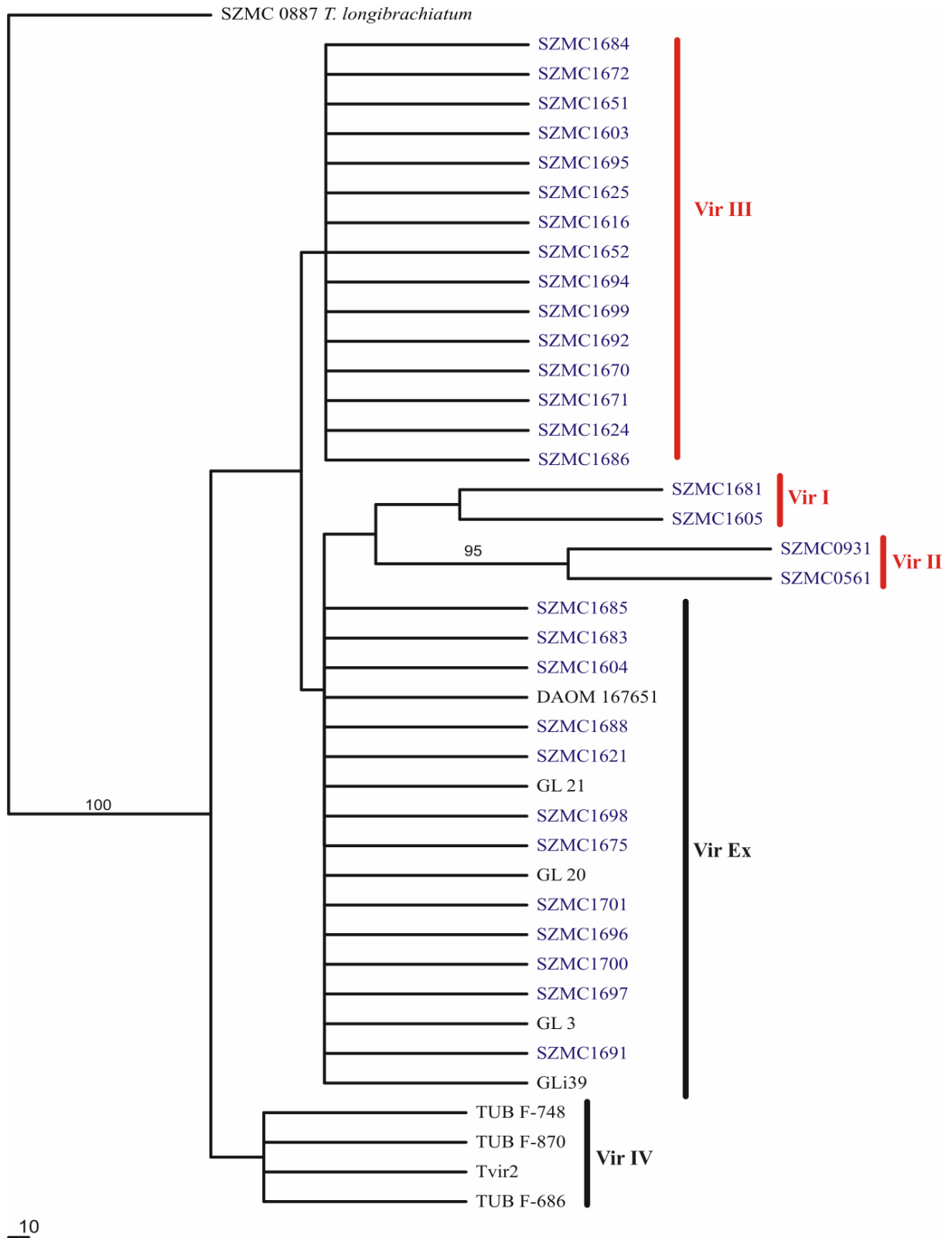
A DAOM 167651 esetében az adatbázisban az ITS 1 szekvencia 3' vége (5'....CGAAAATGAATCA....3') az 5,8S RNS régió 5' végéhez tartozott és az ITS 2 5' vége tartalmazta az 5,8S RNS régió 3' nyolc nukleotidját (5'....AGCGTCAT....3'). Az említett hibákat az illesztés során korrigáltuk.

16. táblázat. A *T. virens* fajok felhasznált ITS 1-2 szekvenciái.

Törzsszám	Genbank szám	Referencia
GL 20	AF099007	Samuels és mtsai., 2000
GLi 39	AF099005	Samuels és mtsai., 2000
Tvir2	AF057603	Ospina-Giraldo és mtsai., 1999
DAOM 167651 (CBS 249.59)	AF222865	Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002
TUB F-748	AF149860	Kullnig és mtsai., 2000
TUB F-686	AF149853	Kullnig és mtsai., 2000
TUB F-870	AF486011	Kullnig és mtsai., 2000
GL 3	AF099006	Chaverri és mtsai., 2001
GL 21	AF099008	Chaverri és mtsai., 2001

Az általunk izolált *T. virens* törzsek közül 12 azonosnak bizonyult az extípus DAOM 167651-es izolátummal (**Vir Ex**), 15 közeli iker-klasztort alkotott (**Vir III**), míg két csoport (**Vir I, II**) az extípus oldalágaként jelent meg, a **Vir II** esetében magas bootstrap értékkel (**14. ábra**). A **Vir IV** csoport nagyrészt szibériai izolátumokat tartalmazott (TUB F-748, TUB F-686, TUB F-870). Az egyes csoportok szekvenciái az illesztés 46. pozíciójában T (**Vir I, II, III, Ex**) vagy C (**Vir IV**) nukleotidot, a 124. pozícióban T (**Vir II, III**) vagy hiányt (gap-et; **Vir I, IV, Ex**) és a szekvenciák 3' terminálisán ...-CTTCT-GAAAT (**Vir III, IV, Ex**) vagy ...-CTTCTTGAAAT (**Vir I**) vagy ...GGTGGT-GAAAT (**Vir II**) nukleotid régiót tartalmaztak.

A *T. spirale* faj taxonómiai pozíciója még bizonytalan az irodalmi adatok alapján, hasonlóan a *T. helicum* („*Lone lineages*”) fajhoz [Druzhinina és mtsai. 2005b], az általunk izolált törzs izoenzim-mintázatai alapján a *T. harzianum* törzsekkel mutatott közelebbi filogenetikai rokonságot, míg az ITS 1-2 szekvenciák alapján a *T. virens* törzsekhez volt közelebb.



14. ábra. A *T. virens* izolátumok és a GenBank-ban található törzsek ITS 1-2 szekvenciáinak parszimónia analízise. **Ex** – extípus; **Vir I, II, III** – új magyarországi genotípusok; **Vir IV** – szibériai típus

A *Rufa* kládba tartozó izolátumok három klaszterbe rendeződtek, mely felbontás szintén nem feleltethető meg teljesen az egyes ET-knek. A kládon belül a törzsek azonosításához az irodalomban közölt referencia törzsek és a BLAST illesztés során legközelebb álló izolátumok GenBankban található ITS 1-2 szekvenciáinak parszimónia-analízisét használtuk fel (**17. táblázat**).

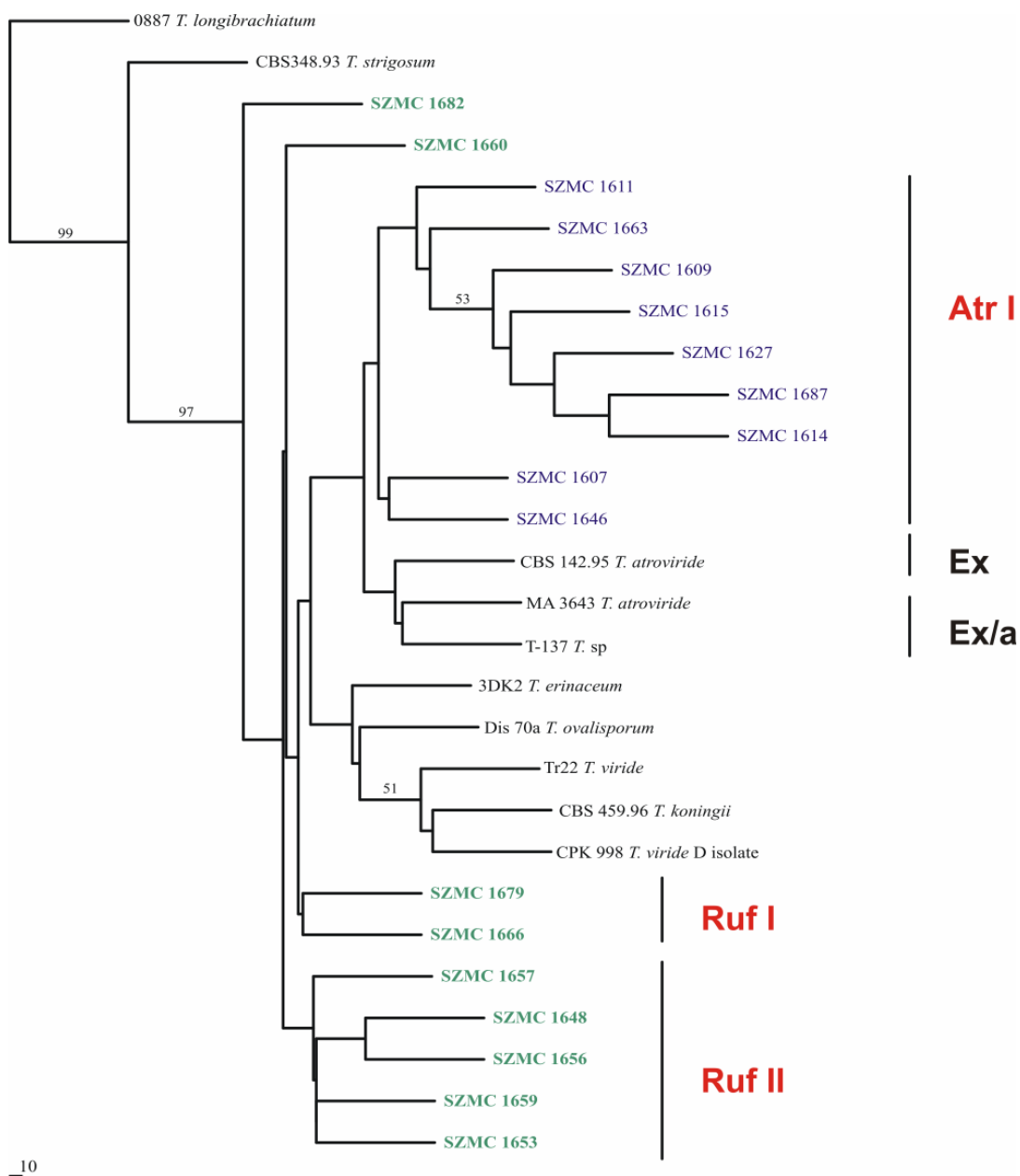
17. táblázat. A *Rufa* kládba tartozó izolátumok azonosításához felhasznált két közeli rokon faj és az extípusok.

Faj	Törzsszám	GenBank szám	Referencia
<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95	AY380906	Dodd és mtsai., 2003
<i>T. atroviride</i>	MA 3643	AJ507136	Wuczskowski és mtsai., 2003
<i>T. erinaceum</i>	3DK2	AY266658	Bissett és mtsai., 2003
<i>T. koningii</i>	CBS 459.96	Z79628	Lieckfeldt és mtsai., 1998
<i>T. ovalisporum</i>	Dis 70a	AY380897	Samuels, előkész.
<i>T. sp.</i>	T-137	AY222341	Maymon és mtsai., 2004
<i>T. strigosum</i>	CBS 348.93	AY387661	Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002
<i>T. viride</i>	Tr22	AJ230678	Lieckfeldt és mtsai., 1999
<i>T. viride</i> D isolate	CPK 998	AY665698	Druzhinina és mtsai., előkész.-2

A filogenetikai fán a *T. strigosum* faj egy gyökérhez közeli ágat alkotott, míg a klád többi tagja egy nagy klaszterbe sorolódott (**15. ábra**). A saját izolátumok egy része a *T. atroviride* törzsek csoportjának (CBS 142.95, extípus-**Ex**; MA 3643, **Ex/a**) egy ikerágaként jelent meg, melyet **Atr I**-el jelöltünk (9 izolátum). Az **Ex** és az **Ex/a** törzsek ITS 1-2 szekvenciái között csak az illesztés 76. (T/C) pozíciójában volt eltérés az **Ex/a**-n belül pedig a 312. pozícióban (T-137/ MA 3643 – G/A). Az **Atr I** csoportban a 76. pozícióban T és C is előfordul, a 312. pozícióban pedig A található. Az SZMC 1614 és 1684 törzs a 339. pozícióban egy C-t tartalmaz, amely a többi **Atr I** és az **Ex**, **Ex/a** törzsekből hiányzik.

Az **Atr I** csoport elkülönülésének fő oka az ITS 2 szekvenciák 3' régiójában található 14 nukleotidot tartalmazó terminális rész. Látható, hogy az **Atr I** csoport egy külön genotípusú csoportot reprezentál, azonban ez a csoport a *T. atroviride* fajon belül helyezkedik el. Ezt jól alátámasztja az izolátumok morfológiai bélyegek alapján történő azonosítása is,

ugyanis a határozott *T. atroviride* sajátságokkal (növekedés, telep- és konídiofór-szerkezet) rendelkező törzsek (V.2.1. rész) az **Atr I** csoportba tartoztak.



_10

15. ábra. A *Rufa* kládba tartozó izolátumok és az extípusok ITS 1-2 szekvenciáinak parszimónia analízise. A valószínűsíthetően új fajokat zöld, az új genotípus-csoportokat piros színnel jelöltük.

A további 9 *Rufa* izolátum teljesen elkülönült az eddig leírt fajoktól, a köztük és a leírt fajok szekvenciái közötti különbség nagyobb, mint a már leírt fajok egymáshoz viszonyított

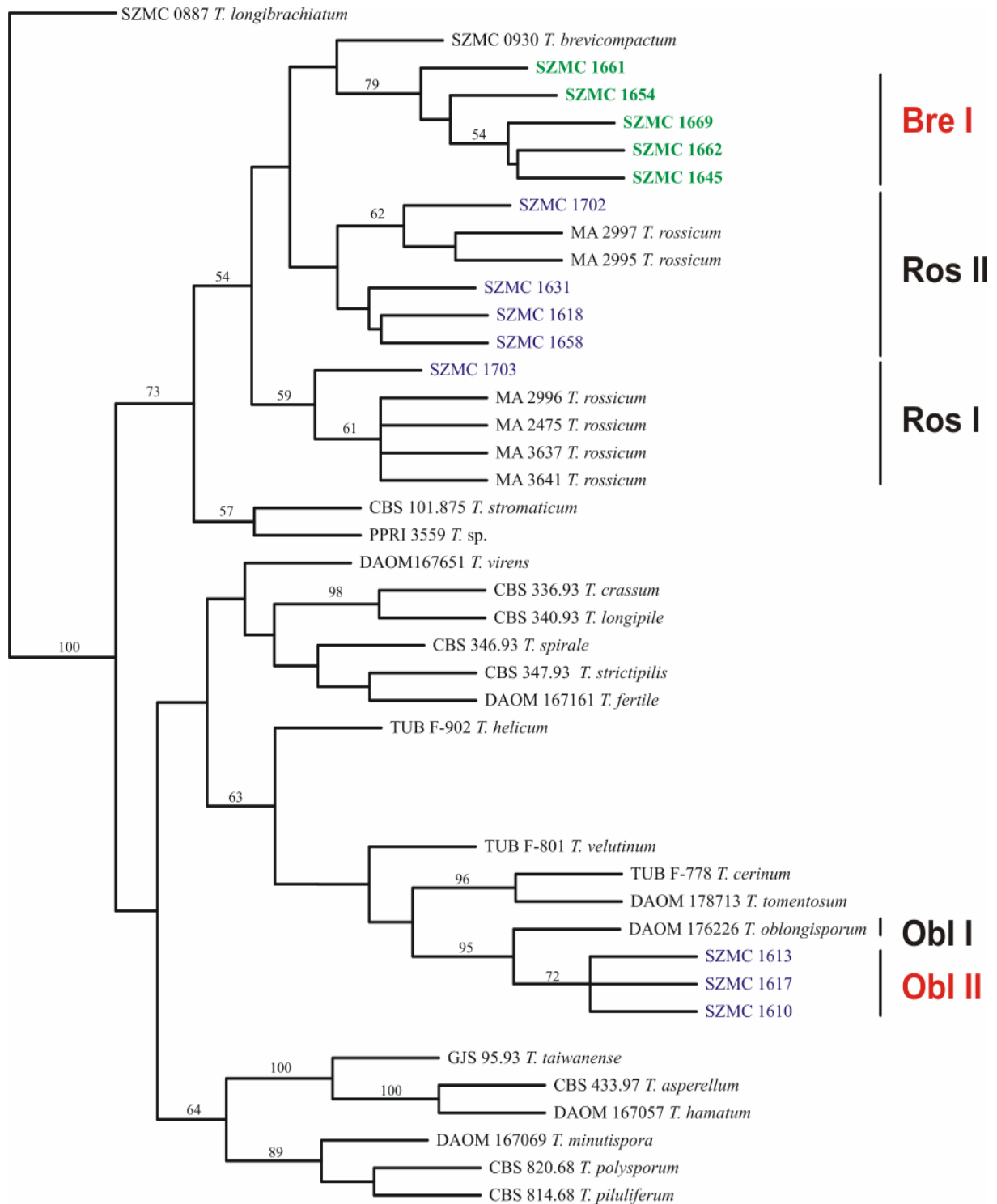
különbsége, tehát ezek valószínűleg új fajokat képviselnek. Az SZMC 1682 és 1660 törzsek egyedi ágakon helyezkedtek el, míg az SZMC 1679, 1666 és az SZMC 1657, 1648, 1656, 1659, 1653 törzsek egy-egy jól körülhatárolt klasztert képeztek (**Ruf I, Ruf II**).

18. táblázat. Az ismeretlen izolátumok azonosításához felhasznált ITS 1-2 szekvenciák.

Klád	Faj	Törzsszám	GenBank szám	Referencia ^b
<i>Pachybasium</i> A ^a	<i>T. hamatum</i>	DAOM 167057	Z48816	1.
	<i>T. asperellum</i>	CBS 433.97	AY380912	1.
<i>Pachybasioides</i>	<i>T. polysporum</i>	CBS 820.68	Z48815	2.
	<i>T. minutisporum</i>	DAOM 167069	AY865634	2.
	<i>T. piluliferum</i>	CBS 814.68	Z48813	2.
<i>Lixii/catoptron</i>	<i>T. tomentosum</i>	DAOM 178713	AF149869	3.
	<i>T. cerinum</i>	TUB F-778	AF149869	4.
	<i>T. velutinum</i>	TUB F-801	AF149873	4.
<i>Virens</i>	<i>T. virens</i>	DAOM 167651	AF222865	1.
	<i>T. crassum</i>	CBS 336.93	AF414317	3.
<i>Semiorbis</i>	<i>T. fertile</i>	DAOM 167161	AF400260	1.
	<i>T. oblongisporum</i>	DAOM 176226	AF149854	1.
<i>Strictipilis</i>	<i>T. strictipilis</i>	CBS 347.93	AF400263	3.
	<i>T. longipile</i>	CBS 340.93	AF414317	3.
<i>Stromatica</i>	<i>T. stromaticum</i>	CBS 101.875	AF098287	3.
	<i>T. sp. PPRI 3559</i>	PPRI 3559	AF011972.1	1.
	<i>T. rossicum</i>	MA 3637	AJ507132	5.
	<i>T. rossicum</i>	MA 2475	AJ507062	5.
	<i>T. rossicum</i>	MA 3641	AJ507134	5.
	<i>T. rossicum</i>	MA 2996	AJ507130	5.
	<i>T. rossicum</i>	MA 2995	AJ507087	5.
	<i>T. rossicum</i>	MA 2997	AJ507131	5.
<i>Lutea</i>	<i>T. brevicompactum</i>	SZMC 0930	DQ118086	6.
"Lone lineages"	<i>T. spirale</i>	CBS 346.93	AF400262	1.
	<i>T. helicum</i>	TUB F-902	AF486020	4.
Nem ismert	<i>T. taiwanense</i>	GJS 95.93	DQ313141	7.

^a A *T. pubescens* faj ITS 1-2 szekvenciája nem elérhető.

^b Jelmagyarázat: 1. Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002; 2. Lu és mtsai., 2004; 3. Chaverri és mtsai., 2004; 4. Bissett és mtsai., 2003; 5. Wuczskowski és mtsai., 2003; 6. Kraus és mtsai., 2004; 7. Bissett és mtsai., 2002.



_10

16. ábra. A „vonalkód”-ok alapján nem identifikált izolátumok és az extípusok ITS 1-2 szekvenciáinak parszimónia-analízise. A valószínűsíthetően új fajokat zöld, az új genotípus-csoportokat piros színnel jelöltük.

A „vonalkód”-ok alapján nem identifikált izolátumok ITS 1-2 szekvenciáinak parszimónia analízisét is elvégeztük a GenBankban elérhető extípusok (**18. táblázat**) szekvenciáinak segítségével (**16. ábra**). Az SZMC 1702, 1631, 1618 és 1658 törzsek ITS 1-2 szekvenciái nagy hasonlóságot mutattak a *T. rossicum* egyik típusával [Wuczkowski és mtsai. 2003], ezt a csoportot **Ros II**-nek neveztük. A csoporton belüli különbségeért az ITS 2 szekvenciák 3' vége felelős, ami az SZMC 1618 és 1658 törzsek esetében 5'....AAAGTTGGTGAAATC...3', míg a SZMC 1631 esetében 5'....AAAGTTTGTGAAATC....3', az SZMC 1702 esetében 5'....AAAGTTC-TGAAATG...3', a referencia törzseknél pedig 5'....AAACTTC-TGAAATG....3'. Az SZMC 1703 izolátum az illesztés 158., 178. és 381. (T/C, C/T és T/-) pozíciójában különbözött a **Ros I** csoportot alkotó referencia törzsektől. Habár a referencia törzsek ITS 1-2 szekvenciáitól való eltérés viszonylag nagy (3-4 nukleotid) – ez a *Longibrachiatum* szekció esetében külön fajokat definiál – mégis úgy gondoljuk, hogy az általunk izolált 5 törzs a *T. rossicum* fajba tartozik.

Három izolátum (SZMC 1613, 1617, 1610) a *T. oblongisporum* faj típustörzsével képezett klasztert. Két törzs (SZMC 1613, 1610) ITS 1-2 szekvenciája teljes egyezést mutatott és az illesztés 393. és 398. pozíciójában (-/G és G/T) tért el az SZMC 1617 szekvenciájától. A törzsek a referencia törzstől egyöntetűen eltértek a 134. és 268. pozícióban (-/T, -/C) és külön-külön eltértek az ITS 2 3' terminális részében. Izolátumaink tehát a *T. oblongisporum* faj magyarországi genotípusai.

A fán elkülönülő és a *T. brevicompactum* fajhoz filogenetikai affinitást mutató **Bre I** izolátumok a Bayes analízis során a *Virens* és a *Lixii/catoptron* kláddal mutattak rokonságot (**16. ábra**). A **Bre I** csoporton belüli izolátumok ITS 1-2 szekvenciái közötti különbségeket mutatja a **19. táblázat**.

19. táblázat. A **Bre I** csoporton belüli izolátumok ITS 1-2 szekvenciái közötti különbségek.

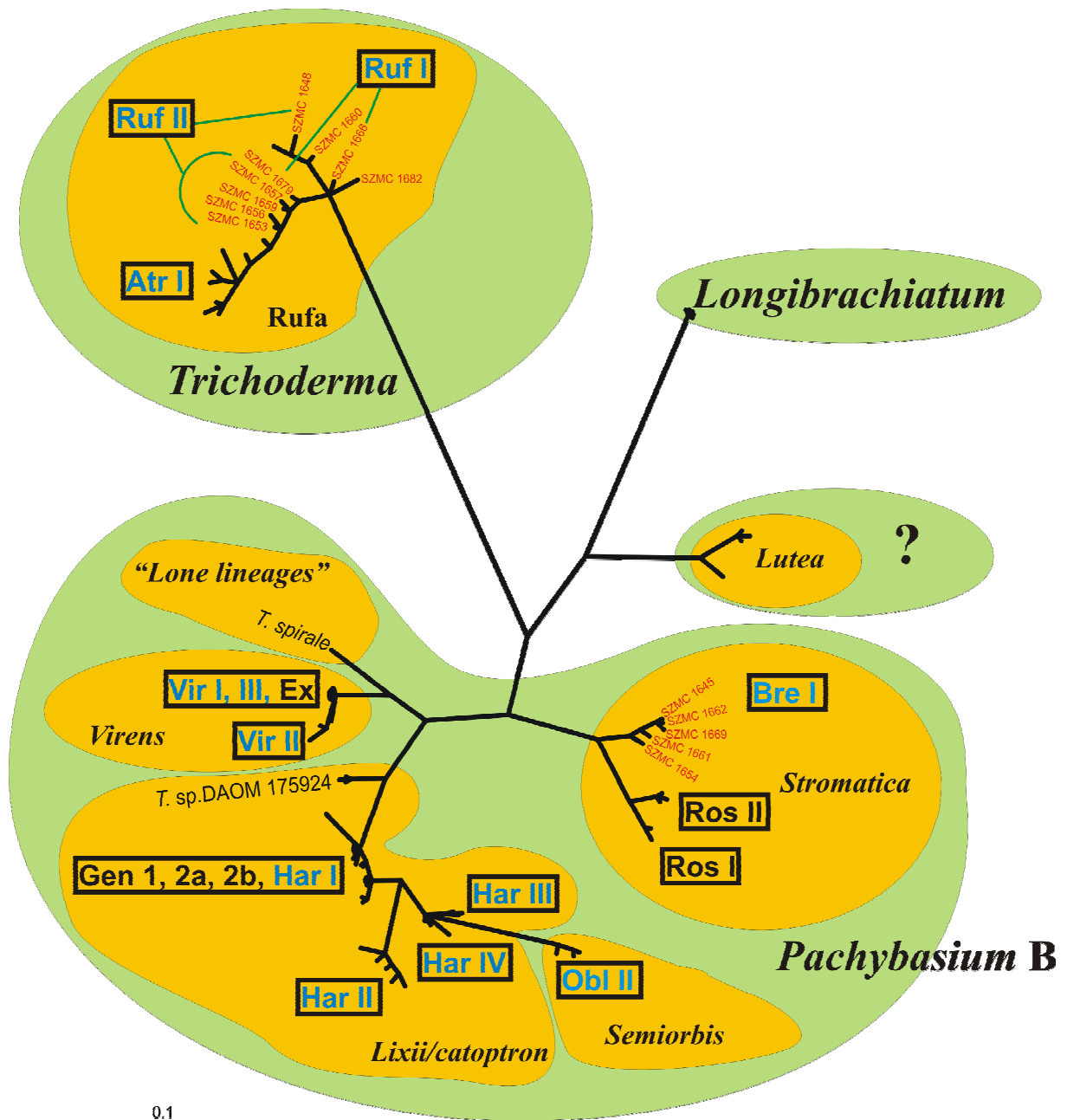
Törzsek	ITS 1-2 szekvencia részletek						
	...	...	...	...	...	...	...
	140	360	370	375	400	405	410
SZMC 1661	5' ..TTT---ACT....AG AC G..	..GT-CC..	..GGTGT G TGAAATC..	3'			
SZMC 1654	5' ..TTT---ACT....AG-CG..	..GT A CC..	..GGTGT G TGAAATG..	3'			
SZMC 1662	5' ..TTT TT ---ACT....AG-CG..	..GT-CC..	..GGTGT G TGAAATG..	3'			
SZMC 1645	5' ..TTT TT ---ACT....AG-CG..	..GT-CC..	..GGTGT-TGAAATG..	3'			
SZMC 1669	5' ..TTT TT ---ACT....AG-CG..	..GT A CC..	..GGTGT C TGAAATG..	3'			

A csoport szekvenciái a *T. brevicompactum* faj szekvenciájától az illesztés során 30 nukleotidnyi eltérést mutattak, a *Virens* és a *Lixii/catoptron* klád tagjaitól pedig esetenként még ennél is nagyobb volt a különbség, ami arra utal, hogy ezen izolátumok esetén is új fajokról lehet szó.

V.2.2.3.3. Összesített filogenetikai analízis

A *Trichoderma* fajok taxonómiája folyamatosan változik. A probléma feloldását a mai tendenciák szerint a több gén szekvenciáján alapuló multigénikus elemzések fogják adni, azonban az egyes potenciális szekvenciák kiválasztásának szempontja továbbra is a fenetikus jegyek által közvetített rendszerekhez való igazodás [Druzhinina és mtsai. 2005b]. A filogenetikai kapcsolatok feltárását ezért segítheti és jól közelítheti egyes kiválasztott szekvenciák és fenetikus jellegek együttes elemzése. A MrBayes program lehetőséget nyújt ilyen vegyes adatok elemzésre [Ronquist és Huelsenbeck, 2003], ezért munkánk során elvégeztük az ITS 1-2 szekvenciák és az izoenzim mintázatok összesített analízisét (**17. ábra**). A dendrogram jó egyezést mutat a jelenleg elfogadott filogenetikai szemlélettel [Druzhinina és mtsai. 2005b]. Az irodalomban a *Lutea* klád helyzete bizonytalan, ugyanis még nem tisztázott, hogy a klád a *Pachybasium* B szekcióba tartozik-e, vagy annak ikerkládja, esetleg a *Trichoderma* kláddal egy ágon található [Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002, Chaverri és mtsai., 2004; Druzhinina és mtsai. 2005b]. A mi esetünkben a *Pachybasium* B és *Trichoderma* kládoktól elkülönülten helyezkedett el a fán. A szintén problémás „*Lone lineages*” csoport a *Virens* kláddal mutatott közeli rokonságot, annak oldalágaként jelent meg. A *Semiorbis* klád (*T. oblongisporum*) az ITS 1-2, 28S rDNS, *tef1*, *ech42* és a mitokondriális rDNS kis alegységének szekvenciái alapján a *T. virens* és a *T. harzianum* fajokat tartalmazó csoport iker-klasztere [Kullnig-Gradinger és mtsai., 2002], a mi esetünkben azonban a *Lixii/catoptron* klád oldalágán helyezkedett el.

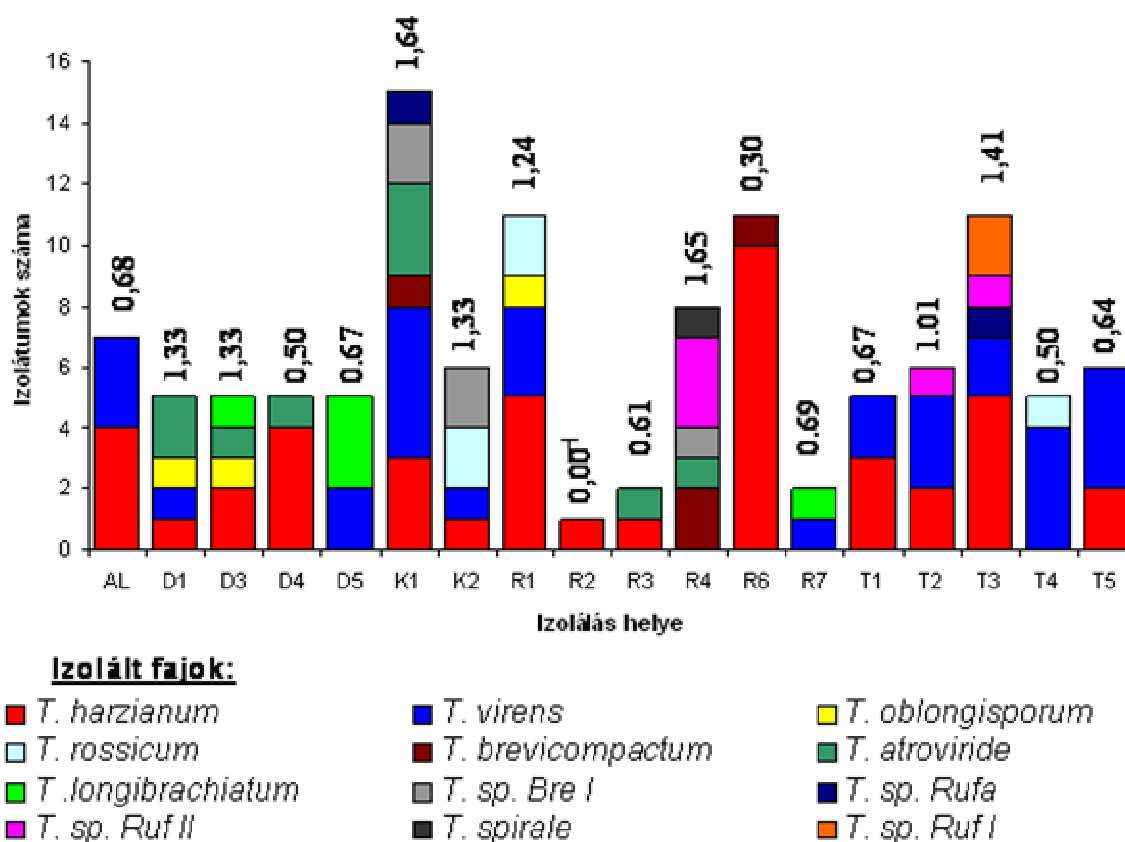
Az ITS 1-2 szekvenciák alapján meghatározott genotípus-csoportok nem minden esetben különültek el a korábban említett ET-átfedések miatt, azonban bizonyos esetekben a csoportok taxonómiai létjogosultságát a fenetikus bélyegek is jól alátámasztották. Az új fajokat tartalmazó **Bre I** csoport a korábbi ITS 1-2 parszimónia analízissel szemben a *Stromatica* kládba tartozott.



17. ábra. Az ITS 1-2 szekvenciák és az izoenzim-mintázatok összesített filogenetikai analízise. A valószínűsíthetően új fajokat piros, az új genotípus-csoportokat kék szín, az egyes klád és szekcióhatárokat sárga és zöld halmazok jelölik.

V.2.3. A fajok előfordulása az egyes mintahelyeken és Magyarországon

A 116 izolált *Trichoderma* törzs 13 fajba tartozott. Ebből nyolc már leírt faj (*T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. brevicompactum*, *T. spirale*, *T. rossicum* és *T. oblongisporum*), 5 pedig nagy valószínűséggel új faj (*T. sp. Bre I*; *T. sp. Ruf I*; *T. sp. Ruf II*; *Rufa* klád: SZMC 1682, SZMC 1660). A fajok és az izolálás helye között nem találtunk korrelációt ($p=95$; Pearson: 0,199). A dél-magyarországi izolátumok faji diverzitása [Shannon, 1948] 1,85 volt. Az egyes mintavételi helyeken izolált törzsek fajok szerinti előfordulását és a mintahelyenkénti faji diverzitást mutatja a **18. ábra**.



18. ábra. A fajok előfordulása mintavételi helyenként. A számok a faji diverzitást jelölik.

(AL - Algyő, D - Deszk, K - Kunszentmiklós, R - Rózsa, T - Tiszasziget)

A legnagyobb számban a *T. harzianum* törzsek fordultak elő a őszi búza rizoszférájában, ami egybevág a *T. harzianum* magyarországi izolátumok között elfoglalt előkelő helyéről tudósító irodalmi adatokkal [Vajna, 1983; Manczinger és Polner, 1987; Bissett, 1991b; Túróczi és mtsai., 1996; Kuhls és mtsai., 1996; Ospina-Giraldo és mtsai.,

1999; Kraus és mtsai., 2004]. Túróczi és mtsai. által hazai mintákból izolált potenciális biokontroll törzsek csaknem 30 %-a volt *T. harzianum*, ami összevethető az általunk izolált 37 %-al. Az említett szerzők szintén több csoportot tudtak elkülöníteni a fajon belül RAPD-mintázatok alapján. Hat százalékban volt jelen a *T. atroviride* a biokontroll izolátumok között (2 törzs) [Túróczi és mtsai., 1996], ami a mi esetünkben 8% volt. Kevés adat található *T. longibrachiatum* előfordulásáról [Vajna, 1983; Thrane és mtsai., 2001] ami a viszonylag kis arányú jelenlétének köszönhető a hazai populációban. Nem találtunk a rizoszférában a Magyarországon már izolált *T. koningii* [Vajna, 1983; Túróczi és mtsai., 1996; Lieckfeldt, 1999], *T. aureoviride* [Vajna, 1983; Manczinger és Polner, 1987], *T. viride* [Vajna, 1983; Manczinger és Polner, 1987; Arisan-Atac, 1995; Túróczi és mtsai., 1996], *T. longipilis* (= *T. longipile*) [Túróczi és mtsai., 1996], *T. hamatum* [Manczinger és Polner, 1987; Túróczi és mtsai., 1996], *T. minutisporum* [Túróczi és mtsai., 1996] és *T. citrinoviride* [Antal és mtsai., 2000] fajokat.

Ismereteink szerint a *T. virens*, *T. rossicum*, *T. spirale*, *T. brevicompactum* és *T. oblongisporum* fajok hazai előfordulásáról mi számolhatunk be először. A *T. virens* faj képviselői általánosan izolálhatók mérsékelt égövi régiókban [Chaverri és mtsai., 2001], és gyakran alkalmazzák őket biológiai védekezés céljára (korábban *Gliocladium virens* néven). A *T. rossicum* fajt, ahogy a neve is mutatja, eredetileg Oroszországban (Krasnojarsk) izolálták és írták le [Bissett és mtsai., 2003], előfordulása viszont már igazolt Közép-Európában is (Mannswörth, Groß-Enzersdorf) [Wuczkowski és mtsai., 2003], ehhez további adalék a mi öt törzsünk. A *T. oblongisporum* szintén megtalálható a szibériai Krasnojarsk-ban [Kulnig és mtsai., 2000], de Kanadában írták le először [Bissett, 1991a], európai előfordulásáról viszont eddig nem volt tudomásunk. A *T. spirale* és *T. brevicompactum* fajokat szintén nem izolálták még Európában, elterjedésük eddig főleg az amerikai kontinensen volt ismert [Bissett., 1991a; Kraus., 2004].

Az irodalomban nem sok adatot találhatunk a *Trichoderma* nemzetség tagjainak őszi búza rizoszférájában való előfordulásáról. Pięta és mtsai. szerint [2000] a *Trichoderma* fajok a őszi búza aratás után vizsgált talajában nagyobb számban fordulnak elő, mint amelybe rozsot, tritikálét vagy burgonyát vetettek. A mintázás három évében *T. hamatum* (36 izolátum), *T. harzianum* (56 izolátum), *T. koningii* (43 izolátum), *T. viride* (62 izolátum) fajokat izoláltak. Bateman és Kwaśna [1999] vizsgálataik során őszi búza gyökeréről az általunk is izolált *T. atroviride*, *T. harzianum* valamint a *T. aureoviride*, *T. crassum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. longipilis*, *T. polysporum*, *T. viride* fajokat tudták kitenyészteni.

V.3. Az izolált *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai vizsgálata

Kutatásaink egyik fő célja olyan *Trichoderma* törzsek izolálása volt, melyek a későbbiekben eredményesen alkalmazhatók biokontroll ágensként a talajszinten támadó, búzanövényeket károsító *Fusarium* fajokkal szemben. Ezt célozta a specifikus helyről, specifikus klimatikus viszonyok mellett történő mintavételezés. A rizoszférából izolált, bizonyos szintű kolonizációban jelenlévő és a téli, fagyos talajban is magas fitnessszel rendelkező törzsek nagyobb hatékonysággal védhetik meg a gombakártevőktől a búzanövényeket. A gyakorlati felhasználás előtt azonban szükséges a potenciális izolátumok kiválasztása, kompetíciós és antagonista képességeik előzetes felmérése. E tulajdonságok kialakításában jelentős szerepet tölt be az egyes extracelluláris enzimek szekréciója [Benítez és mtsai., 2004]. Ezért megvizsgáltuk a őszi búza gyökeréről izolált és fajsztintén azonosított törzsek közül 92 törzs extracelluláris enzimek termelésére való képességét, valamint a gyakorlati felhasználáshoz közelítve különböző beállítású *in vitro* körülmények között teszteltük őket egy kiválasztott *Fusarium culmorum* törzssel szemben.

V.3.1. Extracelluláris enzimek konstitutív termelése

A konstitutívan szekretált extracelluláris enzimek aktivitása nagy variabilitást mutatott mind a minimál, mind az élesztőkivonatos tápoldatokban (**20. táblázat, 5., 6. melléklet**).

A törzseket minimál tápoldatban tenyésztve az alacsony enzimaktivitás általános volt a vizsgált populációban a rövid szubsztrátokat hasító proteázok (CEP1, a TRP1, a CTP1, a CTP2), valamint a kompetíciós folyamatokban szerepet játszó enzimek α GLU, β GLU, β GAL, β XYL, CBH, és LPEP) esetében (**19. ábra, 5. melléklet**).

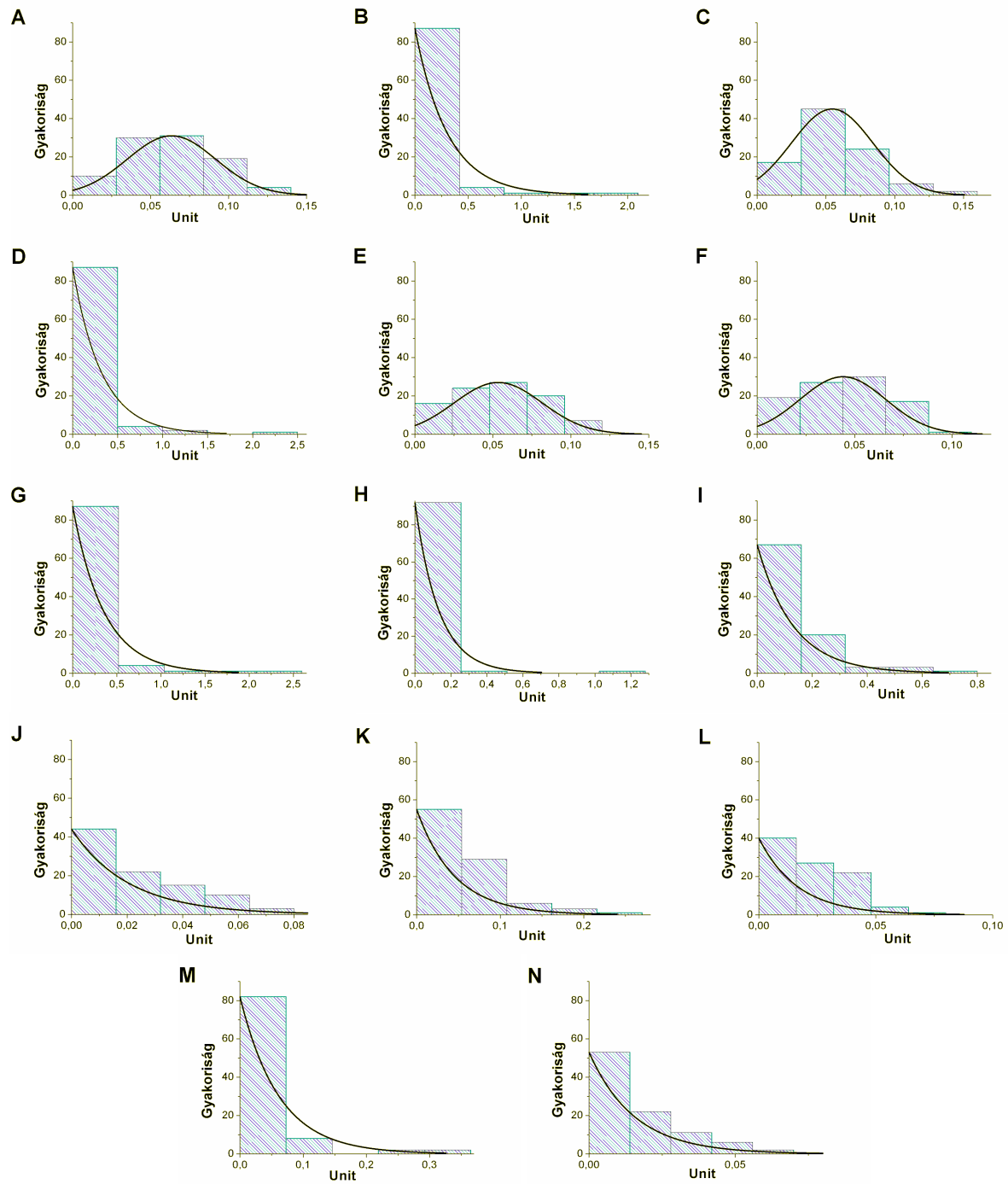
Magas enzimaktivitásokat tapasztaltunk viszont a hosszú (több aminosavat tartalmazó) szubsztrátokat hidrolizálni képes proteázoknál (CEP2, TRP2, CTP3) és a NAG esetében, ahogy ez a változók többdimenziós skálázásán is látszik (**20.A. ábra**). Ezek az enzimek kiemelten fontos szerepet játszanak a biokontroll folyamatokban [Manczinger, 2001; Kubicek, 2001; Kredics, 2005].

20. táblázat. Az izolált *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimeinek jellemző értékei minimál tápközegekben.

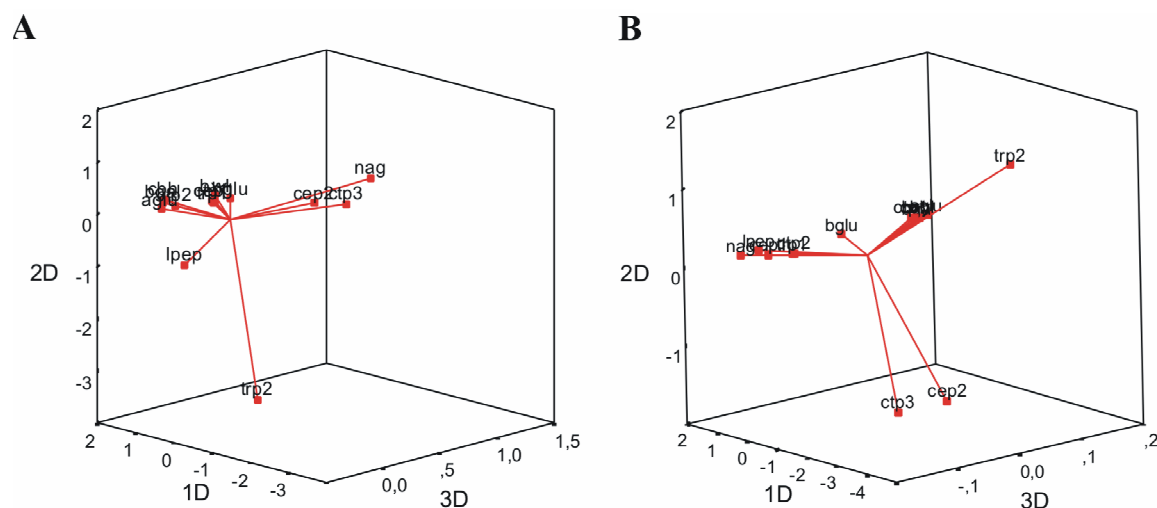
Enzimek	Az aktivitás intervalluma	Átlag	Módusz	Medián
<i>Unit</i>				
CEP1	0 - 0,13	0,063	0,064	0,064
CEP2	0 - 2,03	0,127	0	0,045
TRP1	0 - 0,15	0,055	0,034	0,052
TRP2	0 - 2,41	0,170	0,105	0,076
CTP1	0 - 0,11	0,053	0,053	0,053
CTP2	0 - 0,10	0,044	0,043	0,045
CTP3	0 - 2,50	0,146	0,023	0,041
LPEP	0,01 - 1,28	0,093	0,113	0,081
NAG	0 - 0,73	0,135	0,081	0,096
α GLU	0 - 0,08	0,023	0	0,018
β GLU	0 - 0,27	0,054	0,015	0,047
β GAL	0 - 0,07	0,021	0	0,019
β XYL	0 - 0,34	0,046	0	0,032
CBH	0 - 0,06	0,015	0	0,009

Magas enzimszекреcióval jellemezhető törzsek minden vizsgált enzim esetében előfordultak, amint ez az enzimaktivitások hisztogramjain is jól látható (**19. ábra**). A CEP2, TRP2, CTP3, LPEP, NAG, α GLU, β GLU, β GAL, β XYL és CBH enzimek aktivitásainak eloszlása exponenciális, míg a CEP1, TRP1, CTP1 és CTP2 enzimek eloszlása normál eloszlást mutatott a vizsgált populációban.

Az extracelluláris enzimek aktivitása az élesztőkivonatos tápközegekben általában magasabb volt, mint a minimál tápközegekben, mely jelenség oka valószínűleg az élesztőkivonat hidroláz enzimeket serkentő hatásában keresendő [Fiedurek és mtsai. 1996], kivételt képeztek ez alól a LPEP, a NAG, a β GLU és a β XYL enzimek. Az előzőekhez hasonlóan a CEP2, a TRP2 és a CTP3 aktivitása kiemelkedően magasnak mutatkozott a populációban (**20.B. ábra**), azonban a NAG aktivitása jelentősen lecsökkent (**21. táblázat, 6. melléklet**). Az enzimaktivitások eloszlása ebben a tápközegekben is exponenciális volt a CEP2, a TRP2, a CTP3, a LPEP, a NAG, az α GLU, β GLU, a β GAL, a β XYL és a CBH esetében, és normál eloszlást mutatott a CEP1 és a CTP1 (**21. ábra**). A hisztogramok egyes intervallumaiba eső gyakoriságok azonban eltértek a minimál tápoldatnál tapasztalt értékektől, a TRP1 és a CTP2 pedig exponenciális eloszlást mutatott.



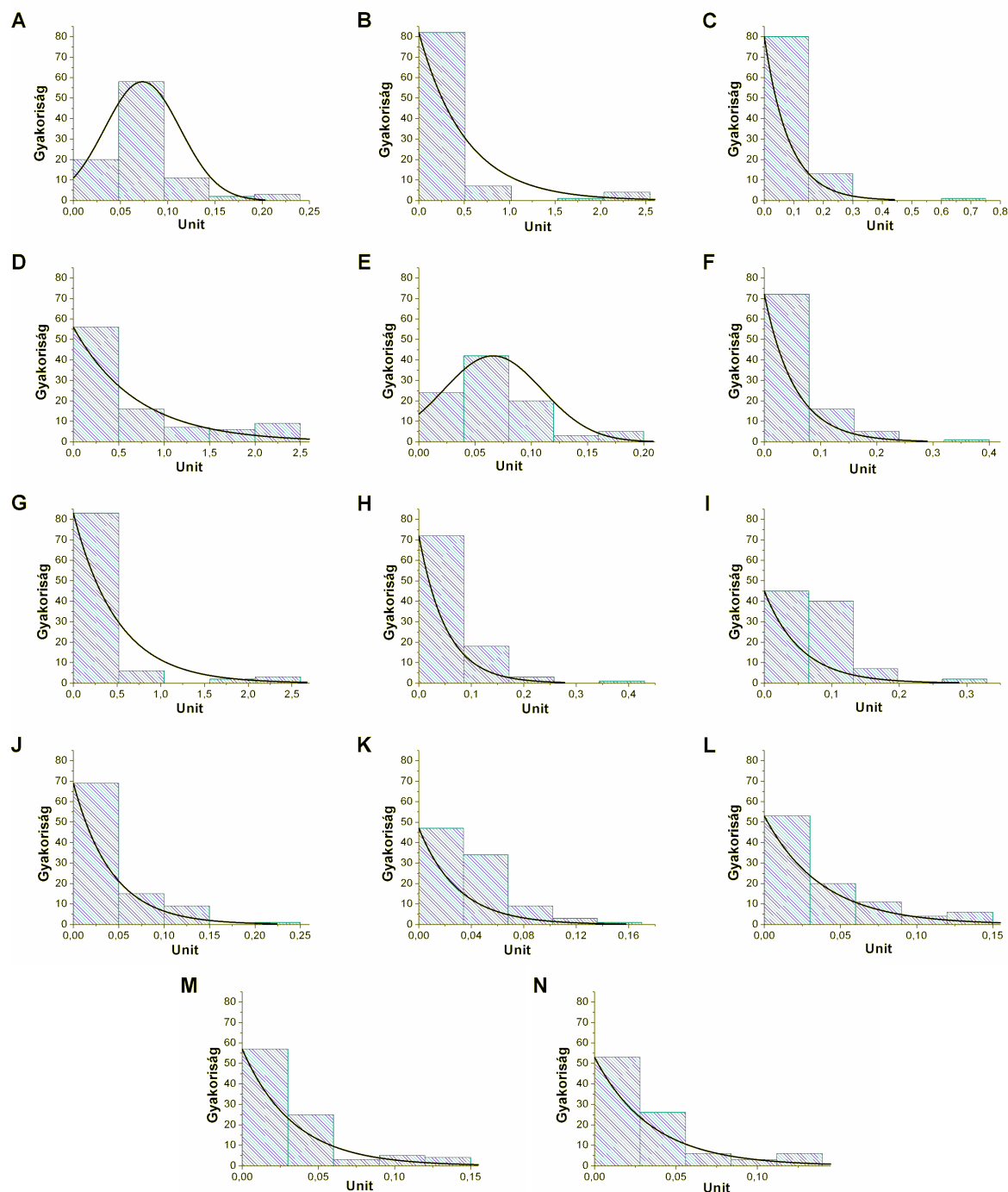
19. ábra A CEP1 (A), CEP2 (B), TRP1 (C), TRP2 (D), CTP1 (E), CTP2 (F), CTP3 (G), LPEP (H), NAG (I), α GLU (J), β GLU (K), β GAL (L), β XYL (M), CBH (N) enzimek aktivitásainak eloszlása minimál tápközegben.



20. ábra Az extracelluláris enzimaktivitások értékeinek többdimenziós skálázása minimál (A) és élesztőkivonatos (B) tápközegben.

21. táblázat. Az izolált *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimeinek jellemző értékei élesztőkivonatos tápközegben.

Enzimek	Az aktivitás intervalluma	Átlag	Módusz	Medián
<i>Unit</i>				
CEP1	0 – 0,23	0,073	0	0,067
CEP2	0 – 2,50	0,225	0	0,054
TRP1	0 – 0,74	0,100	0	0,080
TRP2	0 – 2,45	0,653	0	0,288
CTP1	0 – 0,19	0,066	0	0,065
CTP2	0 – 0,39	0,062	0,063	0,052
CTP3	0 – 2,50	0,236	0	0,073
LPEP	0 – 0,42	0,070	0,070	0,063
NAG	0 – 0,32	0,076	0,031	0,068
α GLU	0 – 0,24	0,038	0	0,031
β GLU	0 – 0,16	0,038	0	0,034
β GAL	0 – 0,14	0,035	0	0,021
β XYL	0 – 0,14	0,031	0	0,025
CBH	0 – 0,14	0,033	0	0,026



21. ábra A CEP1 (A), CEP2 (B), TRP1 (C), TRP2 (D), CTP1 (E), CTP2 (F), CTP3 (G), LPEP (H), NAG (I), α GLU (J), β GLU (K), β GAL (L), β XYL (M), CBH (N) enzimek aktivitásainak eloszlása élesztőkivonatós tápközegekben.

A hisztogramok egyes enzimaktivitási intervallumait vizsgálva mind a minimál, mind az élesztőkivonatós tápközegekben azt tapasztaltuk, hogy az egyes intervallumokhoz tartozó

izolátumok nem feleltethetők meg egymásnak a különböző enzimek között. Ezt mutatja a logaritmikusan transzformált enzimaktivitás-értékek közötti korrelációk vizsgálata is. A páronkénti Pearson korrelációs értékeket mutatja a **22. táblázat**. Az esetek nagy részében nem mutatható ki szignifikáns korreláció az egyes enzimek szekréciója között, és a szignifikáns esetek korrelációs együttható értékei sem tesznek lehetővé minden esetben határozott diszkussziót. Viszonylag magas korrelációs értékkel jellemezhető kapcsolat van azonban a NAG- β GLU, CTP3-CEP2, TRP1-CTP2, TRP2-LPEP enzimpárok között minimál tápközegben, amely a konstitutív állapotot tükrözi, és a β GAL- α GLU, β XYL- β GAL, CBH- β GAL, TRP1-LPEP, TRP1-NAG és az 1-hez közeli értékkel rendelkező CTP3-CEP2 enzimpárok között élesztőkivonatos tápközegben.

Az egyes fajok és az enzimaktivitások szintje között nem volt kimutatható statisztikai összefüggés. Az egyes enzimekhez tartozó tíz legnagyobb enzimaktivitást mutató izolátumot a két alkalmazott tápközegben a **7.a., b. melléklet** mutatja be, jelölve az egyes fajokat. Ezeknél az izolátumoknál minimál tápközegben jellemző volt a magas enzimaktivitás több enzim esetében is (**23. táblázat**). Csak egy enzimre mutatott magas aktivitást az SZMC 1631, 1675, 1700 (CEP1), 1663 (CEP2), 1637 (TRP2), 1622, 1640 (CTP1), 1688 (CTP2), 1629 (CTP3), 1602 (LPEP), 1613 (NAG), 1624, 1646, 1655 (α GLU), 1623, 1658, 0561, 0930 (β GAL). Élesztőkivonatos tápközegben is jelentős volt a több enzim esetében is magas aktivitást mutató izolátumok száma, a tíz legnagyobb aktivitásérték figyelembe vételével (**24. táblázat**). Azonban csak egy enzim aktivitása volt magas az SZMC 1619, 1670 (CEP1), 1694 (TRP1), 1611, 1615, 1678 (TRP2), 1673, 1697 (CTP1), 1606, 1629, 1688 (LPEP), 1661, 1672 (NAG), 1639, 1656, 1664, 1676 (β GLU), 1631 (β GAL) törzseknél.

22. táblázat. A vizsgált extracelluláris enzimek aktivitásainak páronkénti Pearson korrelációi.

α GLU	β GAL	β GLU	β XYL	CBH	CEP1	CEP2	CTP1	CTP2	CTP3	LPEP	NAG	TRP1
<i>Minimál tápközeg (* A korreláció szignifikáns $\alpha=0,05$ szinten. ** A korreláció szignifikáns $\alpha=0,01$ szinten.)</i>												
β GAL	0,114											
β GLU	0,198	0,053										
β XYL	0,298**	0,113	0,282**									
CBH	0,076	0,436**	-0,026	0,076								
CEP1	0,016	0,108	0,19	0,108	-0,005							
CEP2	0,075	0,210*	0,182	0,254*	0,151	0,211*						
CTP1	0,139	-0,081	0,285**	0,158	-0,045	0,185	0,257*					
CTP2	0,139	-0,082	0,097	0,121	-0,13	0,139	0,088	0,374**				
CTP3	0,13	0,035	0,011	0,267*	-0,048	0,343**	0,525**	0,243*	0,234*			
LPEP	0,241*	-0,023	0,17	0,239*	-0,263**	0,152	0,049	0,218*	0,236*	0,207*		
NAG	0,165	0,055	0,504**	0,257*	-0,091	0,19	0,122	0,260*	0,127	0,277**	0,430**	
TRP1	0,022	-0,076	0,310**	0,273**	-0,158	0,189	0,125	0,362**	0,651**	0,300**	0,329**	0,301**
TRP2	0,097	-0,2	0,265*	0,293**	-0,331**	0,209*	0,162	0,207*	0,257*	0,633**	0,443**	0,423**
<i>Élesztős tápközeg (* A korreláció szignifikáns $\alpha=0,05$ szinten. ** A korreláció szignifikáns $\alpha=0,01$ szinten.)</i>												
β GAL	0,554**											
β GLU	0,043	0,05										
β XYL	0,457**	0,543**	0,009									
CBH	0,484**	0,578**	0,121	0,376**								
CEP1	-0,043	0,03	0,147	0,013	0,111							
CEP2	0,235*	0,293**	0,152	0,341**	0,321**	0,14						
CTP1	0,225*	0,250*	-0,01	0,270**	0,172	0,057	0,473**					
CTP2	0,026	0,014	0,365**	-0,044	0,136	0,351**	0,134	-0,115				
CTP3	0,278**	0,338**	0,128	0,327**	0,325**	0,096	0,749**	0,12	0,167			
LPEP	-0,04	0,064	0,360**	-0,076	-0,013	0,142	0,014	-0,038	0,279**	-0,045		
NAG	0,104	0,088	0,193	0,104	0,039	0,306**	0,097	0,214*	0,239*	0,013	0,492**	
TRP1	0,057	0,099	0,312**	0,046	-0,014	0,233*	0,147	0,153	0,153	0,105	0,545**	0,568**
TRP2	-0,091	0,06	0,189	-0,025	-0,11	0,213*	0,345**	0,059	0,066	0,389**	0,283**	0,388**

23. táblázat. Több extracelluláris enzim esetében is magas enzimaktivitást (■) mutató izolátumok minimál tápközegeiben.

Törzsszám	CEP1	CEP2	TRP1	TRP2	CTP1	CTP2	CTP3	LPEP	α GLU	β GLU	β GAL	β XYL	NAG
SZMC 0559		■		■			■					■	■
SZMC 0560	■					■							
SZMC 0886					■	■							
SZMC 1012	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
SZMC 1158	■		■			■							
SZMC 1600			■							■	■	■	■
SZMC 1601								■		■		■	
SZMC 1603		■					■						
SZMC 1604		■		■			■						
SZMC 1605	■					■							
SZMC 1606		■	■	■			■			■			
SZMC 1607		■					■					■	■
SZMC 1609			■			■		■		■			
SZMC 1614	■		■										
SZMC 1616		■					■	■					
SZMC 1617	■									■		■	
SZMC 1620										■			■
SZMC 1628				■				■					
SZMC 1638						■							■
SZMC 1639	■		■							■	■		
SZMC 1641					■						■	■	
SZMC 1647					■				■		■	■	
SZMC 1650					■	■			■		■	■	
SZMC 1652			■		■			■					■
SZMC 1656					■				■	■		■	■
SZMC 1661			■	■					■				
SZMC 1664								■	■				■
SZMC 1665				■				■					
SZMC 1668				■				■					
SZMC 1690					■				■			■	
SZMC 1695		■		■			■						■
SZMC 1699		■					■						

Mindkét tápközegeiben a tíz kiemelkedő törzs közé tartozott a CEP1 aktivitás esetén az SZMC 0560, 1012, 1158, a CTP2 aktivitás esetén az SZMC 0560, 1158, a β GAL aktivitás esetén az SZMC 1600, a NAG aktivitás esetén az SZMC 1638, az α GLU aktivitás esetén az SZMC 1690, és a β XYL aktivitás esetén az SZMC 1600 és 1690. Szintén mindkét táptalajon

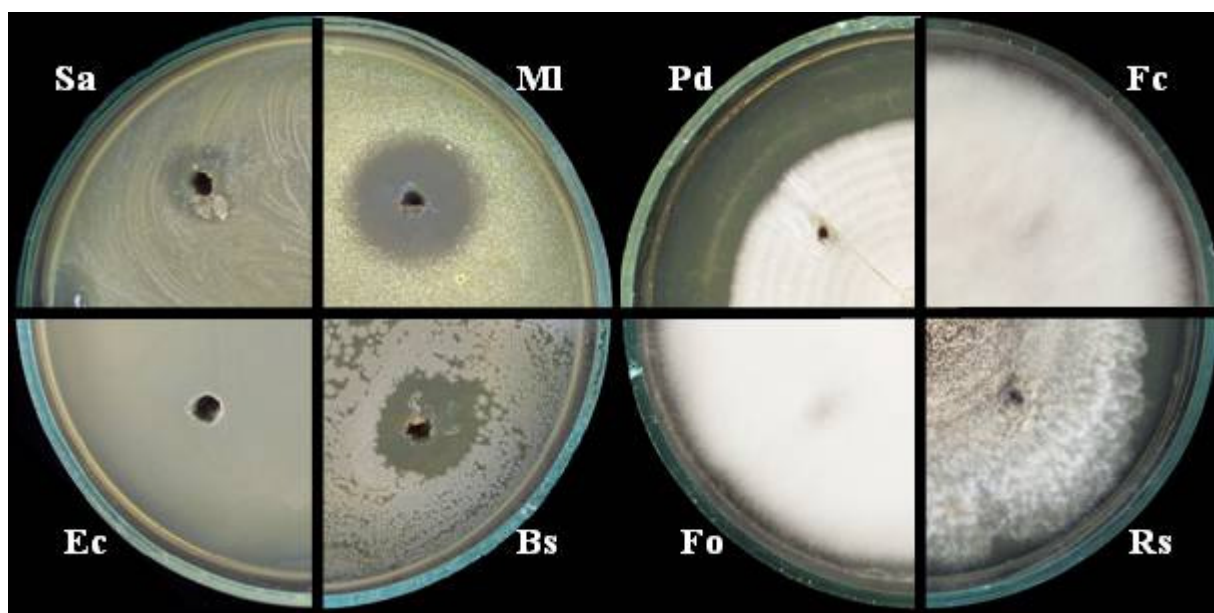
magas aktivitásokat mutatott az SZMC 0886, 1647, 1695, 1631, 1629 és 1688, de különböző enzimek esetében.

24. táblázat. Több extracelluláris enzim esetében is magas enzimaktivitást (■) mutató izolátumok élesztőkivonatós tápközegben.

Törzsszám	CEP1	CEP2	TRP1	TRP2	CTP1	CTP2	CTP3	LPEP	α GLU	β GLU	β GAL	β XYL	NAG
SZMC 0560	■								■		■	■	
SZMC 0561									■		■	■	
SZMC 0886	■	■					■						
SZMC 0887		■					■						
SZMC 0919							■	■					
SZMC 1012	■												■
SZMC 1158	■					■							■
SZMC 1159		■					■						
SZMC 1600					■	■			■		■	■	
SZMC 1612						■		■					
SZMC 1614			■	■									
SZMC 1622	■	■		■		■	■			■			
SZMC 1623	■	■	■	■	■		■		■		■	■	
SZMC 1624					■				■		■	■	
SZMC 1633		■	■	■			■			■			
SZMC 1638								■					■
SZMC 1642		■	■			■				■			■
SZMC 1643								■		■			■
SZMC 1647		■	■	■		■	■	■		■			■
SZMC 1651	■					■			■				
SZMC 1655									■		■		
SZMC 1658		■					■						
SZMC 1675					■				■		■	■	
SZMC 1684	■		■			■		■		■			■
SZMC 1690				■					■			■	
SZMC 1692			■		■	■			■		■	■	
SZMC 1695			■					■					
SZMC 1700					■				■		■	■	■
SZMC 1701					■							■	

V.3.2. Antibiotikum termelés

Az izolátumok közül 17 törzs bizonyult antibiotikum-termelőnek az alkalmazott tenyésztési feltételek mellett a kezdeti vizsgálatokban. A termelt antibiotikumok azonban nem mutattak antifungális hatást, és hatástalanok voltak Gram-negatív baktériumokkal (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) szemben is (**22. ábra**). A tömény metanolos oldatok Gram-pozitív baktériumokon mutatott gátlási értékeit a **25. táblázat** tünteti fel.



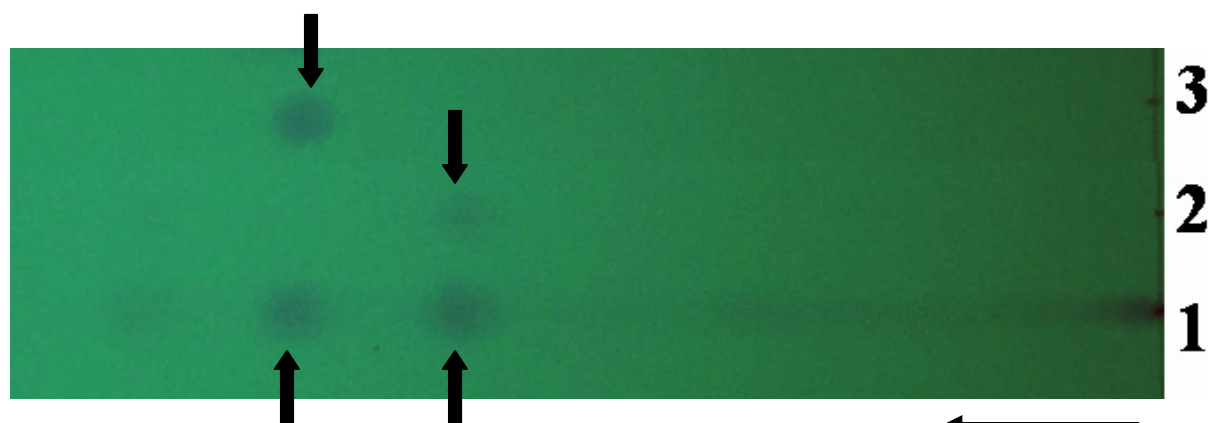
22. ábra. Az SZMC 1692 törzsből részlegesen tisztított antibiotikum-extraktum hatása a vizsgált mikroorganizmusokra. **Bs:** *Bacillus subtilis*; **Ec:** *Escherichia coli*; **MI:** *Micrococcus luteus*; **Sa:** *Staphylococcus aureus*; **Fc:** *Fusarium culmorum*; **Fo:** *Fusarium oxysporum*; **Pd:** *Pythium debaryanum*; **Rs:** *Rhizoctonia solani*

A metanolos kivonatok vékonyréteg kromatográfiás futtatása, és a kapott foltok biológiai aktivitásának tesztelése során azt tapasztaltuk, hogy az egyes izolátumok több antibiotikumot is termelhetnek (**23. ábra**). Az alkalmazott tisztítási lépések és az antibiotikumok mikroheterogén populációkban való előfordulása, valamint az előzetes hidrolízis-kísérletek (az adatok nincsenek feltüntetve) azt sugallják, hogy a termelt antibiotikumok a peptaibolok családjába tartoznak.

Az antibiotikumot termelő izolátumok egy kivétellel (SZMC 1678, *T. harzianum*) a *T. virens* fajhoz tartoztak. Az izolátumok több mint fele (10) tiszaszigeti mintából származott, a többi Kunszentmiklósról (4), Deszkről (1), Rúzsáról (1) és Algyőről (1).

25. táblázat. Az antibiotikum-termelő izolátumok fermentlé-kivonatának gátlási értékei Gram-pozitív baktériumokkal szemben.

Törzsszám	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Gátlási zóna átmérője mm-ben			
SZMC 1692	14	9	21
SZMC 1616	13	8	27
SZMC 1651	20	11	28
SZMC 1700	18	10	24
SZMC 1683	14	6	28
SZMC 1685	18	9	29
SZMC 1671	18	9	28
SZMC 1695	19	8	27
SZMC 0561	23	10	31
SZMC 1672	16	7	15
SZMC 1675	15	6	14
SZMC 1603	9	-	21
SZMC 1691	6	-	14
SZMC 1684	13	6	18
SZMC 1694	13	9	19
SZMC 1652	22	13	24
SZMC 1678	-	8	10

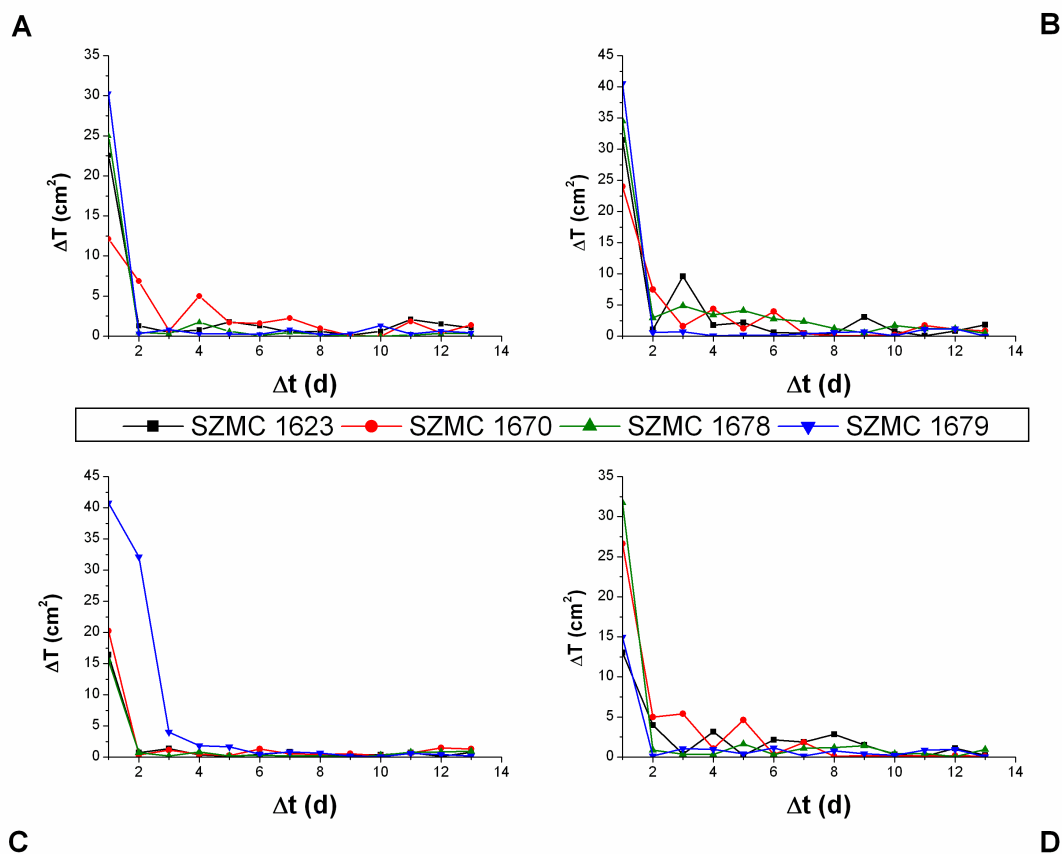


23. ábra. A SZMC 1652 törzsből tisztított antibiotikumok vékonyréteg kromatográfiás vizsgálata. (1. metanolos extraktum; 2., 3. a szilikarétegből eluált bioaktív minták tisztaságának ellenőrzése; $\blacksquare$: bioaktív foltok, $\longrightarrow$: a futás iránya)

V.3.3. *In vitro* antagonizmus

V.3.3.1. A Biokontroll Index meghatározásának módszere

A korábbi tanulmányokban az antagonizmus mértékének megállapítására általános módszerként az *in vitro* agarlemez-es kísérletek szerepeltek [Bell et al., 1982; Sivan and Chet, 1989; Bankole and Adebajo, 1996; Grondona et al., 1997; Melo and Faull, 2000; Antal et al., 2000], melyek információtartalma jól megfeleltethető az *in vivo* vizsgálatok nyújtotta eredményeknek [Arisan-Atac et al., 1995]. Megfelelő, szabványosított mérési módszerek és eszközök hiányában azonban e vizsgálatok kiértékelése nem ad összehasonlítható eredményt a világ távoli laboratóriumaiban vizsgált, különböző potenciális biokontroll izolátumok esetében.

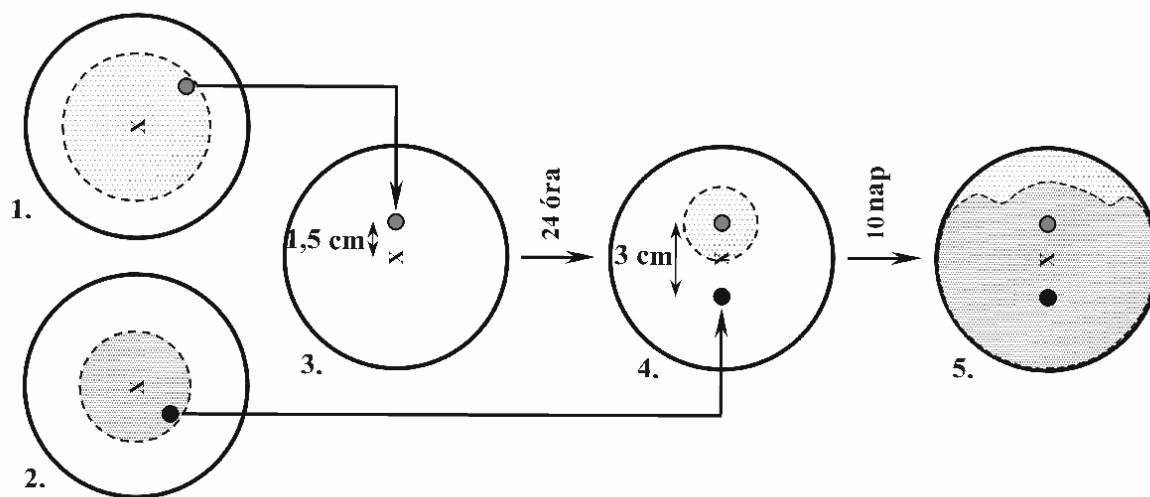


24. ábra A kiválasztott *Trichoderma* telepek területének változása a *F. culmorum* jelenlétében PDA (A) és élesztőkivonatos táptalajokon (B) fényben, valamint PDA (C) és élesztőkivonatos táptalajokon (D) sötétben inkubálva, a tenyésztés idejének függvényében.

Munkánk célja ezért az volt, hogy a *Trichoderma* törzsek biokontroll tulajdonságainak mennyiségi kiértékelésére kifejlesszünk egy pontos képanalízisen alapuló módszert, valamint megfelelő szabványosított körülményeket javasoljunk az *in vitro* antagonizmus-vizsgálatokhoz, hogy a különböző helyszíneken elvégzett tesztek eredményei összehasonlíthatóvá, összevethetővé váljanak.

Négy, az izolátumokból véletlenszerűen kiválasztott *Trichoderma* törzs antagonista képességeit vizsgáltuk az általánosan használt gombatáptalajok két típusán *Fusarium culmorum* NRRL 29371 törzzsel szemben. A növénypatogén gombatörzs kiválasztásában a fő szerepet az játszotta, hogy ez a törzs kiemelkedő károsító képességekkel rendelkezik búzanövényeken [Tóth és mtsai., 2004].

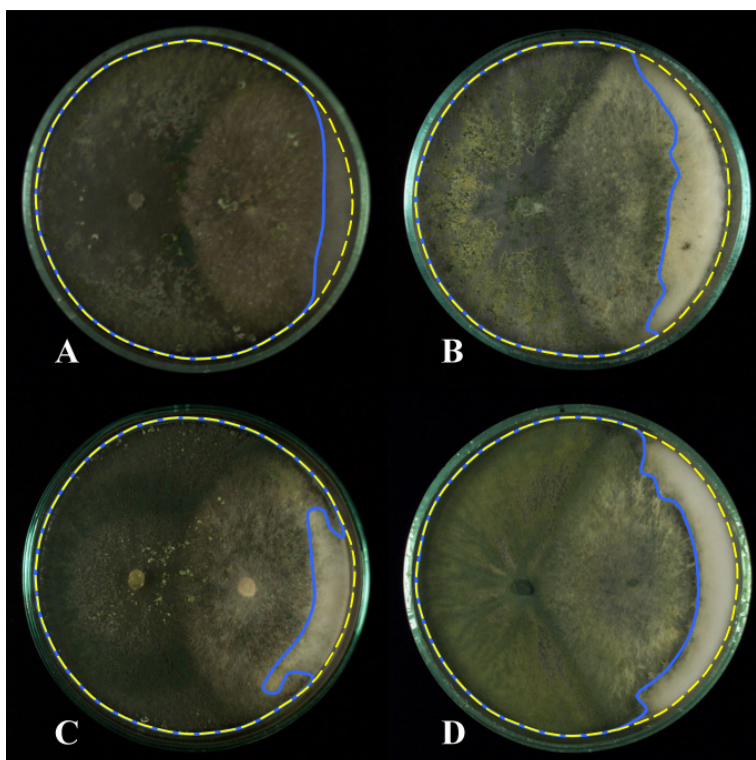
A kezdeti *in vitro* antagonizmus-teszteknél a *Trichoderma* telepek területének változását naponta követtük két héten keresztül a növénypatogén gomba jelenlétében (**24. ábra**). Az első 4-5 napban a telepek erős növekedést mutattak, majd a területük változása a 9-10. napon szinte megállt mind a PDA, mind az élesztőkivonatós táptalajon állandó fényben és sötétben inkubálva. Ezért a továbbiakban a digitális fényképeket a tizedik napon készítettük a BCI számolásához. A vizsgálat sematikus menete a **25. ábrán** látható.



25. ábra A BCI kísérletben alkalmazott lépések sematikus menete. **1.** három napos *Fusarium* telep, **2.** két napos *Trichoderma* telep, **3.** a *Fusarium* törzs leoltása, **4.** a *Trichoderma* törzs leoltása, **5.** a lemezek fényképezése, **X** a Petri-csésze középpontja.

A digitális fényképeken a *Trichoderma* és a *Fusarium* telepek eltérő telepszínüknek köszönhetően jól elkülöníthetők voltak, így a telepterületek határainak megállapítása csak minimális hibát okozott a mérés során (**26. ábra**).

A területek átlagát és a szórást három független ismétlésből számoltuk a négy különböző inkubációs körülmény során két független kísérletben (**26. táblázat**); a megfelelő számított BCI értékeket a **27. táblázat** tartalmazza. A vizsgált törzsek más-más BCI értékeket mutattak a négy alkalmazott táptalaj-fényviszony kombinációban az *in vitro* antagonizmus tesztekben, az értékek azonban az adott törzsekre nézve karakterisztikusnak bizonyultak. A módszer reprodukálhatóságát a **26. táblázat** kicsi szórásértékeinek és a **27. táblázat** megfelelő értékeinek összevetése igazolja. A módszer tehát megfelel annak az igénynek, hogy jól definiált környezeti paraméterek használatával bárhol alkalmazható legyen egy adott laborban izolált *Trichoderma* törzsek antagonista képességeinek a már leírt törzsekkel való összehasonlítására, akár a konkrét összehasonlítani kívánt törzsek beszerzése nélkül is. A korábban használt technikákkal szemben tehát módszerünk jelentős előrelépés a potenciális biokontroll *Trichoderma* izolátumok előzetes tesztelésében.



26. ábra A SZMC 1623 törzs telepei (T_T , kék vonal) és a *Trichoderma* és a *Fusarium* telepek által elfoglalt teljes terület (T_{T+F} , sárga szaggatott vonal) az alkalmazott tenyésztés 10. napján.

(A: PDA/sötét, B: YEG/sötét, C: PDA/fény, D: YEG/fény).

26. táblázat. A vizsgált *Trichoderma* törzsek területeinek átlaga a két *in vitro* antagonizmus kísérletben. T_T : a *Trichoderma* telep területe (kék vonal a **26. ábrán**); T_{T+F} : a *Fusarium* és a *Trichoderma* törzsek által elfoglalt teljes terület (sárga szaggatott vonal a **26. ábrán**)

Első <i>in vitro</i> antagonizmus tesztek				
	Sötétben inkubált			
	PDA		Élesztőkivonatos	
	T_T / cm^2	T_{T+F} / cm^2	T_T / cm^2	T_{T+F} / cm^2
SZMC 1623	$213,52 \pm 2,96$	$223,97 \pm 2,65$	$197,98 \pm 3,83$	$224,08 \pm 3,50$
SZMC 1670	$214,32 \pm 2,28$	$233,26 \pm 1,76$	$149,73 \pm 5,04$	$237,39 \pm 4,74$
SZMC 1678	$131,65 \pm 2,84$	$228,45 \pm 1,80$	$203,96 \pm 5,93$	$233,44 \pm 3,83$
SZMC 1679	$207,26 \pm 2,02$	$229,68 \pm 0,81$	$106,01 \pm 7,63$	$232,22 \pm 2,70$
	Fényben inkubált			
	PDA		Élesztőkivonatos	
	T_T / cm^2	T_{T+F} / cm^2	T_T / cm^2	T_{T+F} / cm^2
SZMC 1623	$218,11 \pm 1,77$	$226,86 \pm 0,16$	$200,18 \pm 7,70$	$234,68 \pm 4,42$
SZMC 1670	$201,29 \pm 6,46$	$228,05 \pm 2,76$	$107,43 \pm 6,16$	$235,01 \pm 4,71$
SZMC 1678	$211,73 \pm 2,15$	$222,12 \pm 3,32$	$204,79 \pm 7,01$	$232,79 \pm 3,32$
SZMC 1679	$208,94 \pm 3,47$	$226,80 \pm 2,48$	$198,46 \pm 6,96$	$232,30 \pm 2,03$
Második <i>in vitro</i> antagonizmus tesztek				
	Sötétben inkubált			
	PDA		Élesztőkivonatos	
	T_T / cm^2	T_{T+F} / cm^2	T_T / cm^2	T_{T+F} / cm^2
SZMC 1623	$213,58 \pm 4,44$	$220,53 \pm 4,61$	$204,60 \pm 2,28$	$225,88 \pm 2,63$
SZMC 1670	$217,48 \pm 2,10$	$233,35 \pm 4,12$	$158,52 \pm 7,22$	$234,43 \pm 1,84$
SZMC 1678	$140,17 \pm 4,63$	$223,43 \pm 2,53$	$200,12 \pm 2,59$	$229,26 \pm 2,82$
SZMC 1679	$209,59 \pm 5,81$	$227,80 \pm 4,70$	$123,54 \pm 0,47$	$235,15 \pm 1,27$
	Fényben inkubált			
	PDA		Élesztőkivonatos	
	T_T / cm^2	T_{T+F} / cm^2	T_T / cm^2	T_{T+F} / cm^2
SZMC 1623	$210,30 \pm 3,07$	$225,25 \pm 0,69$	$188,67 \pm 2,08$	$233,90 \pm 5,55$
SZMC 1670	$186,73 \pm 5,99$	$222,01 \pm 3,87$	$112,17 \pm 9,10$	$229,99 \pm 7,59$
SZMC 1678	$209,16 \pm 1,64$	$222,82 \pm 2,83$	$203,53 \pm 7,91$	$230,51 \pm 0,98$
SZMC 1679	$206,63 \pm 2,02$	$222,73 \pm 6,01$	$201,05 \pm 6,69$	$232,73 \pm 1,75$

27. táblázat. A négy vizsgált *Trichoderma* törzs BCI értékei.

Első <i>in vitro</i> antagonizmus tesztek				
BCI				
	Sötétben inkubált		Fényben inkubált	
	PDA	Élesztőkivonatos	PDA	Élesztőkivonatos
SZMC 1623	95	88	96	85
SZMC 1670	92	63	88	46
SZMC 1678	58	87	95	88
SZMC 1679	90	46	92	85

Második <i>in vitro</i> antagonizmus tesztek				
BCI				
	Sötétben inkubált		Fényben inkubált	
	PDA	Élesztőkivonatos	PDA	Élesztőkivonatos
SZMC 1623	97	91	93	81
SZMC 1670	93	68	84	49
SZMC 1678	63	87	94	88
SZMC 1679	92	53	93	86

V.3.3.2. Az izolált *Trichoderma* törzsek Biokontroll Indexei

A BCI számítás módszerének kidolgozása után a teljes *Trichoderma* populációt vizsgáltuk, és a törzseket rangsoroltuk a *Fusarium culmorum* NRRL 29371 növénypatogén gomba ellen mutatott antagonista képességük szerint élesztős és minimál táptalajon.

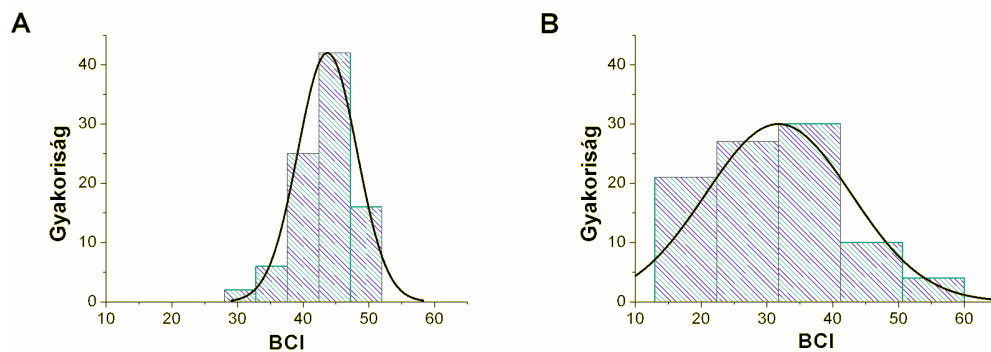
Az *in vitro* tesztek során számos izolátum bizonyult hatásos antagonista partnernek (**28. táblázat, 8. melléklet**), ugyanis képesek voltak ránőni a patogén telep felszínére, és ott esetenként nagy mennyiségű konídiumot képeztek. A BCI-k a minimál táptalajon egy szűkebb intervallumba estek, mint az élesztőkivonatos táptalajon, a populáció átlagos BCI-je azonban a minimál táptalajon magasabb volt. A BCI-értékek normál eloszlást mutattak mindkét táptalajon a populációra nézve (**27. ábra**), de a hisztogramok egyes intervallumai a két táptalajon nem voltak megfeleltethetők egymásnak. A **29. táblázat** a 10 legnagyobb BCI-vel rendelkező izolátumot mutatja be.

28. táblázat. Az izolátumok jellemző BCI értékei a két alkalmazott táptalajon.

Táptalaj	BCI intervallum	Átlag	Módusz	Medián
Minimal	28 – 52	43,690	45	44
YEG	13 – 60	31,760	39	30,5

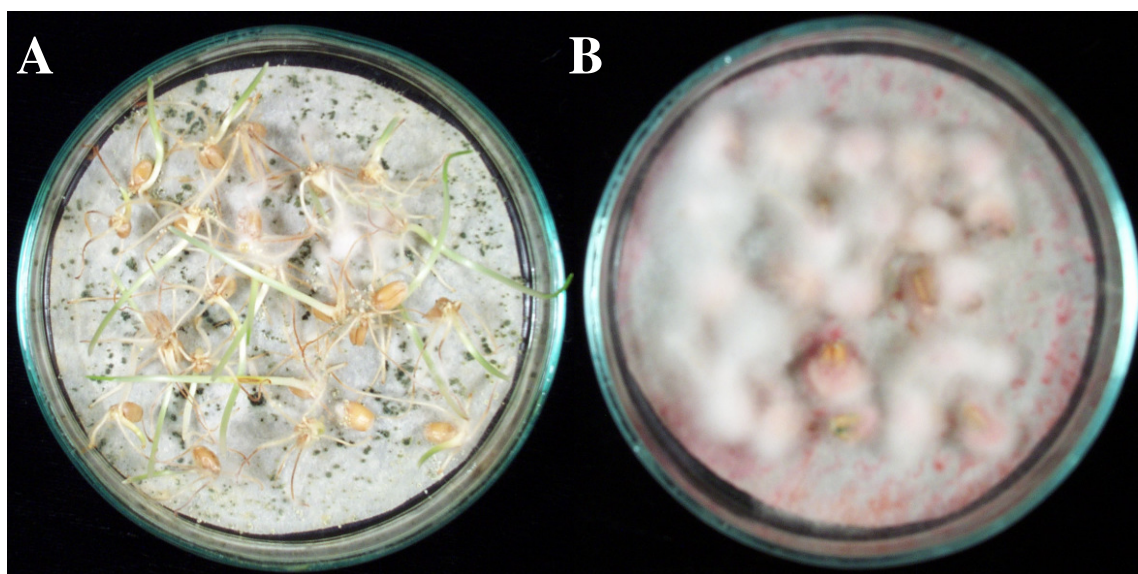
29. táblázat. A tíz legnagyobb BCI-vel rendelkező izolátum az egyes táptalajokon.

Táptalaj	Törzsek	BCI intervallum
Minimál	1617, 1636, 1638, 1649, 1655, 1664, 1666, 1676, 1684, 1692	49 - 52
Élesztős	1607, 1609, 1611, 1614, 1615, 1637, 1646, 1663, 1706, 1684	47 - 60

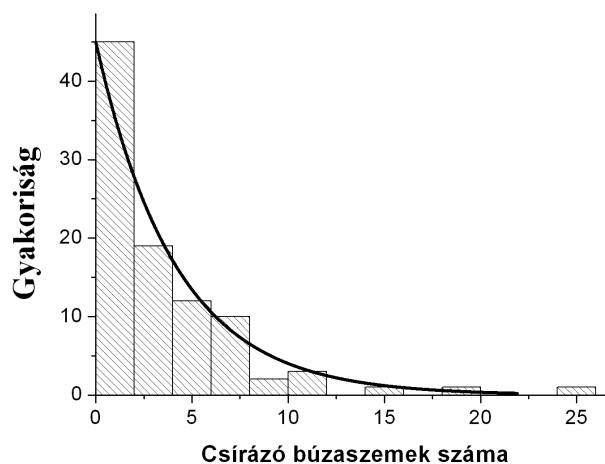
**27. ábra.** A BCI-k eloszlása minimál (A) és élesztőkivonatos (B) táptalajon.

V.3.4. Módosított agresszivitás-tesztek

Az eredeti agresszivitási tesztek a *Fusarium* törzsek fertőző képességének mérésére használták búzanövényeken kvázi *in vivo* körülmények között [Mesterházy, 1985]. Mi az eredeti kísérleti paramétereket módosítva a *Trichoderma* izolátumokat is bevittük a rendszerbe, hogy a szabadföldi történésekhez jobban közelítsük az *in vitro* folyamatot (28. ábra).



28. ábra. Az SZMC 1649 (A) és az SZMC 1672 (B) izolátum viselkedése példázza a módosított agresszivitási tesztekben tapasztalható szélsőséges eseteket.



29. ábra. Az izolátumok *Fusarium culmorum*-ot gátló hatásának eloszlása a módosított agresszivitási tesztekben.

Megállapítható, hogy a kifejlesztett módszer alkalmas a biokontroll tulajdonságok skálázására és az egyes törzsek rangsorolására, de nem ad olyan finom felbontást, mint a BCI számításával kapott értékek sorozata (**9. melléklet**). Azáltal viszont, hogy a kísérleti rendszer jobban közelíti a valós folyamatokat, a jó fertőzési redukciót mutató izolátumok valószínűleg a mezőgazdasági alkalmazás során is megállják a helyüket.

A populációszintű elemzés szerint a csírázó búzaszemek számát tekintve az izolátumok exponenciális eloszlást mutattak (**29. ábra**), összhangban a módszer robusztus jellemzőivel. A vizsgált izolátumok 13%-a a kontrollal egyező fertőzési redukciós hatást fejtett ki, 6 törzs viszont jelentős 46 % feletti búzanövény túlélést biztosított (**9. melléklet**).

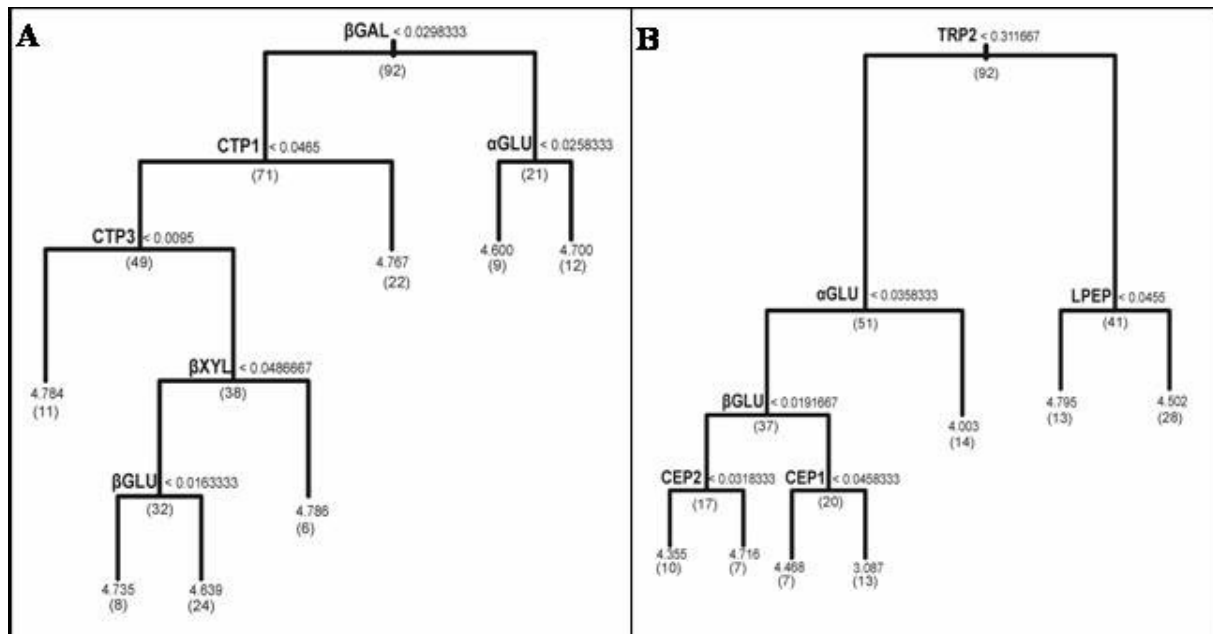
V.3.5. Az antagonizmus és az extracelluláris enzimtermelés kapcsolata

Az izolátumok extracelluláris enzim-szekréciós és *in vitro* antagonista tulajdonságainak mérése után - a két típusú tápközegben - regressziós faanalízissel vizsgáltuk az esetleges kapcsolatokat. Az adatok eloszlásának alapján két izolátumot kihagytunk az analízisből, mind az élesztőkivonatos (SZMC 1663, SZMC 1688), mind pedig a minimál tápközegben (SZMC 0886, SZMC 0887).

Minimál tápközegben az antagonizmus logaritmikus területének átlaga 4,709 volt. Az analízis során a legnagyobb logaritmikus területátlag 4,784 és 4,786, míg a legkisebb 4,600 volt a regressziós fa terminális ágain (**30.A. ábra**). Ez az enzimek viszonylag kis hatását mutatja az antagonizmusban az adott kísérleti körülmények között. A fa elágazásainál lévő logaritmikus antagonizmus átlagait mutatja a **30. táblázat**. A 14 vizsgált enzim közül hat antagonizmusban játszott szerepe tűnik meghatározónak. Az antagonizmus-értékek legnagyobb részét a β GAL aktivitásai magyarázzák meg, majd a további csomópontokért a regressziós fán a CTP1, a α GLU, a CTP3, a β XYL és a β GLU aktivitásai a felelősek. Látható, hogy az adott körülmények között az antagonista képesség kialakulását a vizsgált szinteken, két mikoparazitizmusban és három kompetícióban szerepet játszó enzim konstitutív aktivitása befolyásolta leginkább.

30. táblázat. A regressziós fa extracelluláris enzimekkel jelölt elágazásainál lévő logaritmikus antagonizmus-értékek átlagai.

Elágazás	Log-transzformált területátlag	Elágazás	Log-transzformált területátlag
<i>Minimál tápközeg</i>		<i>Élesztős tápközeg</i>	
β GAL	4.709	TRP2	4.411
CTP1	4.724	α GLU	4.263
CTP3	4.705	LPEP	4.595
β XYL	4.682	β GLU	4.351
β GLU	4.663	CEP2	4.504
α GLU	4.657	CEP1	4.220



30. ábra. Az izolátumok mért extracelluláris enzimeinek hatása az elfoglalt területekre (log-transzformált) az *in vitro* antagonizmus tesztben minimál (A) és élesztőkivonatós táptalajon (B). A fa elágazásainál az enzimek neve, a partícionálás határértéke (OD), és zárójelben az izolátumok száma; a terminálisokon a log-transzformált területátlagok láthatók.

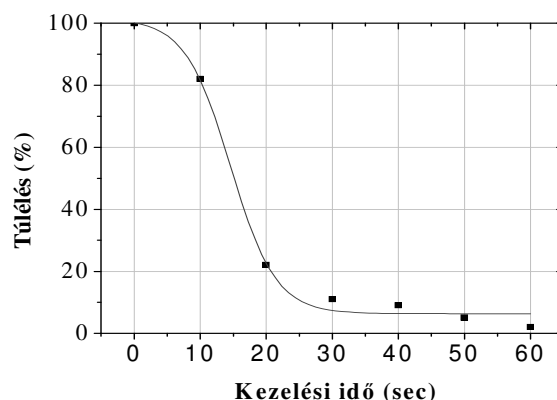
Az élesztőkivonatos tápközegekben az izolált populáció alkalmazott antagonizmus-területeinek átlaga 4,411 volt, 4,795 legnagyobb és 4,003 legkisebb értékkel a terminálisokon (**30.B. ábra**). Az analízis szerint hat vizsgált enzim játszik fontos szerepet az antagonista képesség kialakításában, a TRP2, a α GLU, az LPEP, β GLU, a CEP1 és a CEP2. Ebben az esetben is mind a mikoparazitizmusban szerepet játszó (TRP2, CEP1, CEP2), mind a kompetíciós enzimek (α GLU, β GLU, LPEP) aktivitásai befolyásolták az *in vitro* antagonizmus eredményességét.

V.4. Mikoparazita *Trichoderma* törzsek nemesítése UV-mutagenézissel

A növényvédelemben biofungicidként alkalmazható *Trichoderma* törzsek felhasználását nagyban hátráltatja, hogy a megfelelő hatás eléréséhez nagy propagulummennyiség szükséges a talajban [Adams, 1990]. Ez a tény tette indokolttá olyan új törzsek előállítását, melyeknek antagonizmusban és mikoparazitizmusban szerepet játszó enzimeinek termelése vagy a vad törzsénél emelkedettebb szintet mutat, vagy kevesebb indukciós időt igényel, vagy maga az enzim mutat erősebb aktivitást. Az extracelluláris enzimek túltermelésének hátterében különböző poszttranszlációs eseményekben bekövetkezett változások állhatnak, amelyek az extracelluláris fehérje szekréciós utakkal vannak kapcsolatban. Ilyen változások játszottak szerepet az extracelluláris protein túltermelő, *N*-metil-*N'*-*N*-nitrozoguanidin kezeléssel létrehozott *T. harzianum* mutáns esetében, ahol a membránpermeabilitás megváltozása magas enzimszekrécióval párosult [Rey és mtsai., 2001]. Az összes mutagenizált telep enzimeinek vizsgálata költséges és nehezen kivitelezhető, ezért olyan jól észlelhető markereket kerestünk, amelyek kapcsolatban állhatnak az extracelluláris enzimek termelésével, megváltozásuk így jelezheti annak módosulásait, lehetőséget adva ezzel olyan mutánsok szelektálására, melyek eredményesen alkalmazhatók a biológiai növényvédelemben. Ilyen bélyeg lehet a telepmorfológia megváltozása, amely a morfogenezis során bekövetkező sejtfalszintézis deregulációjára utalhat [Deshpande, 1992], és ilyen lehet egy aminosav-analóg rezisztencia kialakulása, amely a nitrogén anyagcsere derepressziójára [Cohen, 1973; Hanson és Marzluf, 1975], vagy a permeáz funkciók megváltozására utalhat [Rao és mtsai., 1975; DeBusk és DeBusk, 1980].

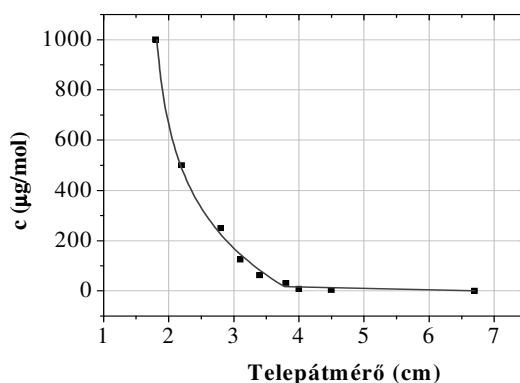
V.4.1. Az UV-mutagenézis optimalizálása

Az UV-sugárzás letalitásának meghatározásához felvettük a besugárzott idő függvényében a *T. harzianum* T334-es törzs telepeinek UV-sugárzás utáni túlélését a kontroll csészéhez képest (31. ábra).



31. ábra. A *T. harzianum* T334-es törzs telepszámának változása UV-sugárzás hatására.

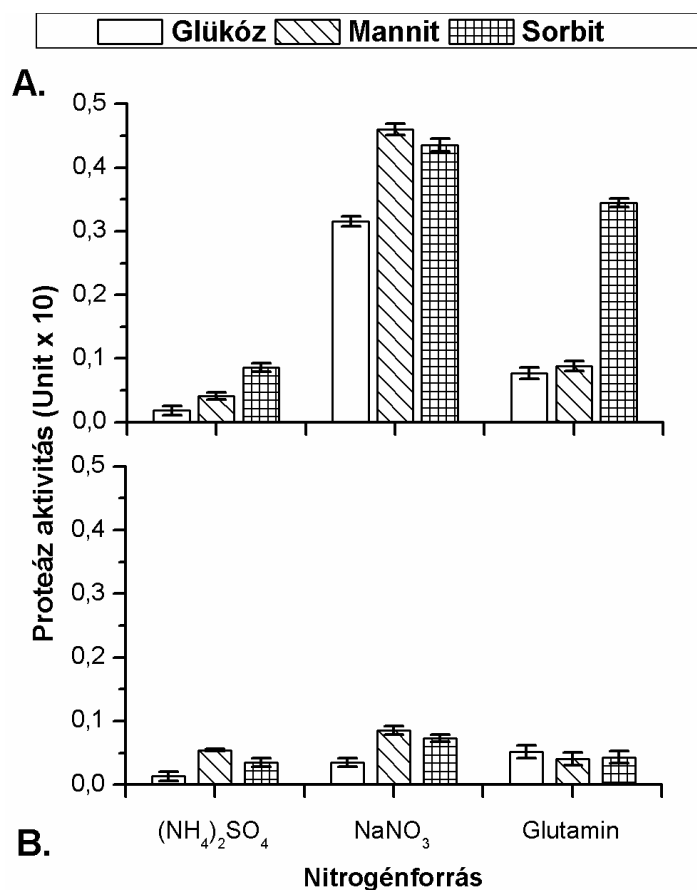
Az ábrán jól látható, hogy az 5-30 másodperces besugárzással kezelt törzsek még viszonylag magas túlélést mutattak, de a magasabb mutációs gyakoriság ennek a tartománynak a nagyobb értékei felé tolódott el a telep-deficiens mutánsok esetében. Ezért a mutagenézist 15-30 másodperces intervallumban végeztük, így a mutációs gyakoriságot 2:100-nak találtuk. A morfológiai mutánsok könnyen elkülöníthetőek voltak a vad törzstől, jól megfigyelhető volt a kompakt növekedés, az adott hifahosszra eső elágazások számának növekedése. A nemesített törzseket az eredeti törzs nevéhez illesztett col (colonial) rövidítéssel jelöltük. A pFFA-érzékenységi görbe alapján (32. ábra) az aminosav-analógot 300 µl/ml-es koncentrációban adtuk a táptalajokhoz. A létrehozott 40 nemesített törzset az eredeti törzs nevéhez illesztett pfa (p-fluor-fenilalanin) rövidítéssel jelöltük.



32. ábra. *T. harzianum* T334-es törzs pFFA-érzékenysége.

V.4.2. A vad típusú törzs proteáztermelésének vizsgálata

A szülői törzsek konstitutív TRP2- és CTP3-termelése mérsékelt aktivitásokat mutatott a NaNO_3 tartalmú táptalajon (**33. ábra**) a őszi búza gyökeréről származó, jó termelőnek számító izolátumokhoz képest. Az ammónium- és a glutamátion gátolta a TRP2 szekréciót mindhárom vizsgált szénforrás jelenlétében (**33.A. ábra**). Hasonló repressziós profilt tapasztaltunk a CTP3 esetében is, kivéve a glutamát-glükóz nitrogénforrás-szénforrás kombinációt (**33.B. ábra**). Az irodalomban már extracelluláris kitinázok esetében igazolták a karbon és a nitrogén katabolit repressziót [Donzelli és Harman, 2001; De las Mercedes Dana és mtsai., 2001], mely szabályozás az extracelluláris proteázok szekréciójában is jelentős.



33. ábra. A *T. harzianum* T334-es törzs TRP2 (A) és CTP3 (B) aktivitása különböző szén- és nitrogénforrásokon az inkubáció 3. napján.

V.4.3. A mutáns törzsek proteáztermelésének vizsgálata

A 100 létrehozott törzs enzimszekrécióját vizsgálva nagy számban találtunk proteáz túltermelő törzseket mind a *pfa* (40) mind a *col* (60) mutánsok között a 3 napos, nem induktív körülmények közötti inkubáció után. Az extracelluláris proteázt kódoló struktúrgén *Neurospora crassa* esetében is több szignál hatására kapcsol be, melyek közt kiemelkedő helyet foglal el a nitrogén elvonása a tápközegből [Hanson és Marzluf, 1975]. Hasonlóan az előzőekhez az *Aspergillus nidulans* is összetett kontroll alatt expresszál neutrális és alkalikus proteázokat, melyek szekrécióját szintén limitálja a nitrogén [Cohen, 1973]. A *pfa* mutánsokat a toxikus aminosav analóg, a pFFA táptalajhoz keverésével szelektáltuk glutamin jelenlétében, amely erős represszora többek között a nitrogén agyagcsere enzimeinek, melyek részt vehetnek az aminosav analóg detoxifikálásában (pl. L-fenilalanin-ammónia-liáz, L-aminosav oxidáz). A pFFA-rezisztencia kialakulása során a mutánsok nitrogénanyagcseréje esetleg derepresszálttá válik, és így az extracelluláris enzimek termelésében is dereguláció léphet fel, ahol a szekréciós rendszer tulajdonképpen felszabadul a glutamin gátlás alól a szimultán derepresszió hatására.

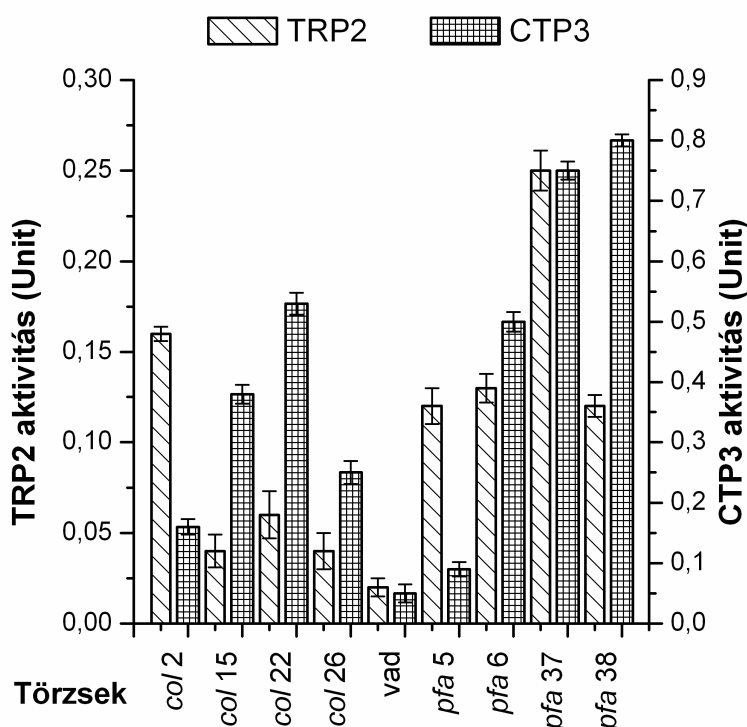
Egy másik lehetséges mechanizmus a pFFA rezisztens törzsek kialakulására a permeáz funkciók megváltozása a sejtmembránban. A *N. crassa* mutációja a *pmg* lókuszon – melyet pFFA rezisztenciára szelektálva értek el – az általános aminosav transzport rendszer (II) működésének károsodásához vezetett [DeBusk és DeBusk, 1980; Rao és mtsai., 1975]. A *Neurospora pmg* génjét később izolálták és jellemezték [Margolis-Clark és mtsai., 2001]; szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutatott a *T. harzianum Inda 1* vélelmezett permeáz génjével, amelyet korábban a biokontroll folyamatokban szerepet játszó *Trichoderma* gének keresésekor írtak le. Az *Inda 1* gén expressziója ugyanis *R. solani* sejtfaltöredékén történő tenyésztés során indukálódott [Vasseur és mtsai., 1995].

A *col* törzsek esetében a megváltozott sejtfal-bioszintézis állhat a telepmorfológia megváltozásának és a proteázszekréció emelkedésének a hátterében.

V.4.3.1. A mutáns törzsek proteáztermelése

A 8 legígéretesebb mutáns törzset választottuk ki a további részletesebb vizsgálatokra. A TRP2 aktivitásának szintje $0,04 \pm 0,02$ U és $0,25 \pm 0,04$ U között változott. A legnagyobb aktivitásokat a *pfa* 5, a *pfa* 6, a *pfa* 37 és a *col* 2 törzsek esetében mértük, amely a vad törzs által mutatott aktivitás 6-12,5-szerese. A mutánsok CTP3 aktivitásai $0,09 \pm 0,02$ U és $0,8 \pm 0,03$ U közé estek, ahol a legnagyobb aktivitásokat a *pfa* 6, a *pfa* 37, a *pfa* 38 és a *col* 22 törzsek

mutatták, amelyek 10-16-szor nagyobbak bizonyultak, mint az eredeti T334-es törzsé (**34. ábra**). Bizonyos *pfa* mutánsok (pl. *pfa* 37) magas aktivitásokat mutattak mind a TRP2, mind pedig a CTP3 esetében is.



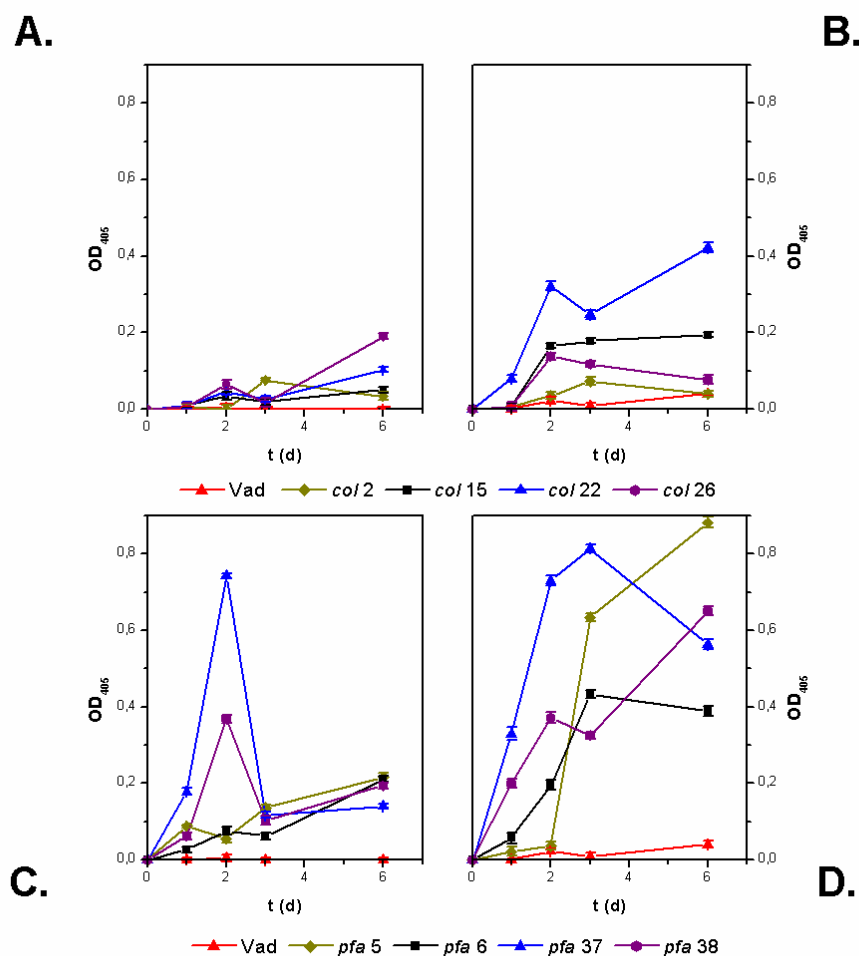
34. ábra. A kiválasztott *col* és *pfa* törzsek és a *T. harzianum* T334 (vad) törzs TRP2 és CTP3 aktivitása 3 napos inkubáció után.

V.4.3.2. A proteázok időbeli megjelenése

Az enzimaktivitások megjelenését az időben a tenyésztés 1., 2., 3. és 6. napján vizsgáltuk, ugyanis a természetes élőhelyen a niche eredményes betöltésének feltétele lehet a már alapszinten szekretált magas enzimmennyiség mellett az enzimek időben korai megjelenése is. A mutánsok szekréciós profilját a **35. ábra** mutatja.

A hatodik napon megjelenő magas aktivitási értékek feltehetően már indukciós állapotot tükröznek, ugyanis a legjobb enzimmennyiséggel rendelkező törzsek a rendelkezésre álló tápanyagforrást felélve önmagukat kezdenek emészteni, az ennek következtében felszabaduló komplex fehérjék és peptidek pedig hatékonyan indukálhatják a szekréciót. A TRP2 maximális aktivitást a *col* törzsek esetében a 2-3. napon mutatott (**35.A. ábra**), míg a CTP3 aktivitása a *col* 2 és a *col* 15 kivételével a 2. napon volt a legmagasabb (**35.B. ábra**). A *pfa*

mutánsoknál mindkét vizsgált proteáz aktivitásának csúcsa a 2-3. nap után volt tapasztalható (35.C., D. ábra).



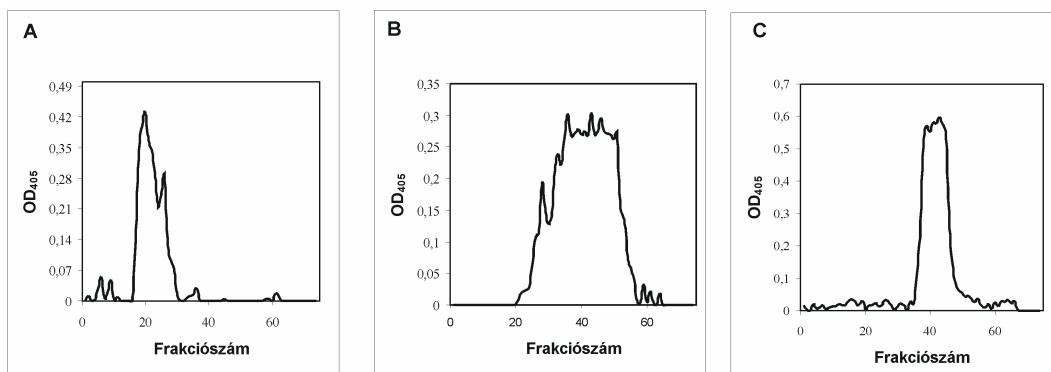
35. ábra. A TRP2 (A, C) és CTP3 (B, D) aktivitásainak időbeni megjelenése a *col* (A, B) és a *pfa* (C, D) mutánsoknál a *T. harzianum* T334 (vad) törzshöz képest.

V.4.3.3. A nemesített törzsek proteázainak vizsgálata oszlopkromatográfiával

A fenti kísérletek alapján a *col* 26 és a *pfa* 37 törzsek - a két mutánsvonal egy-egy legmagasabb proteázszekréciót mutató törzse - tenyészetének felülúszóit Sephadex G-100-as oszlopkromatográfiával frakcionáltuk, majd az egyes frakciókban mértük a TRP2 és a CTP3 aktivitását. A TRP2 (36. ábra) és a CTP3 (37. ábra) aktivitásának profilja is komplex képet mutatott az izoenzimek nagy számának köszönhetően. A *Trichoderma* törzsek proteázainak pH-függését tanulmányozó korábbi munkában a vad törzs mindkét proteáz esetében magas relatív aktivitást mutatott pH 5,0 és 9,0 között. Ez a tapasztalt tág pH optimum valószínűleg

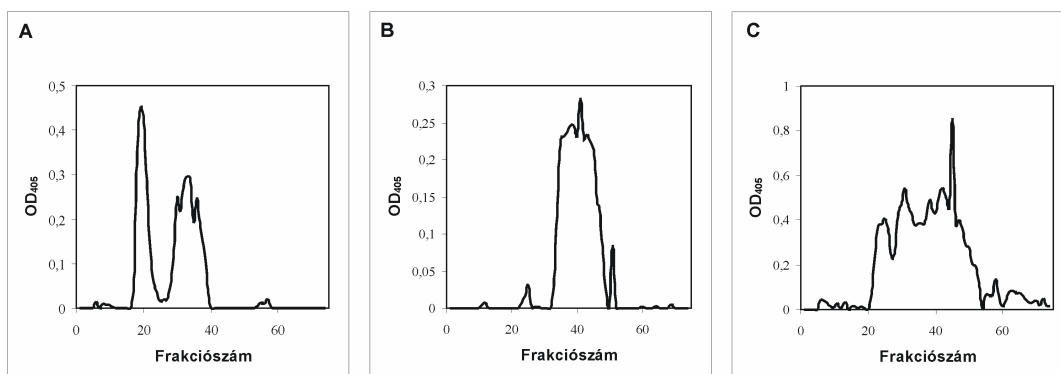
több izoenzim jelenlétének lehet a következménye, melyek különböző pH optimummal rendelkeznek [Kredics és mtsai., 2004].

A vad T334-es törzs legalább két TRP2 izoenzimet termel (hozzávetőleg 90 és 55 kDa; **36.A. ábra**), a *col* 26-os törzs számos izoenzimet szekretál az 5.4 - 90 kDa mérettartományban (**36.B. ábra**), míg a *pfa* 37 esetében egy csúcsot detektáltunk a 11 - 24 kDa-os mérettartományban (**36.C. ábra**).



36. ábra A TRP2 izoenzimek aktivitásának gélzsűrés utáni profilja. **A.** *T. harzianum* T334, **B.** T334 *col* 26, **C.** T334 *pfa* 37.

A vad törzs legalább két, hozzávetőlegesen 99 és a 32 kDa-os CTP3 enzimet termelt (**37.A. ábra**). Az utóbbi valószínűleg megfeleltethető a *T. harzianum* PRB1-nek, amely egy *N*-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid szubsztrátot nagy affinitással hasító, 31 kDa-os bázikus proteáz [Geremia és mtsai., 1993].



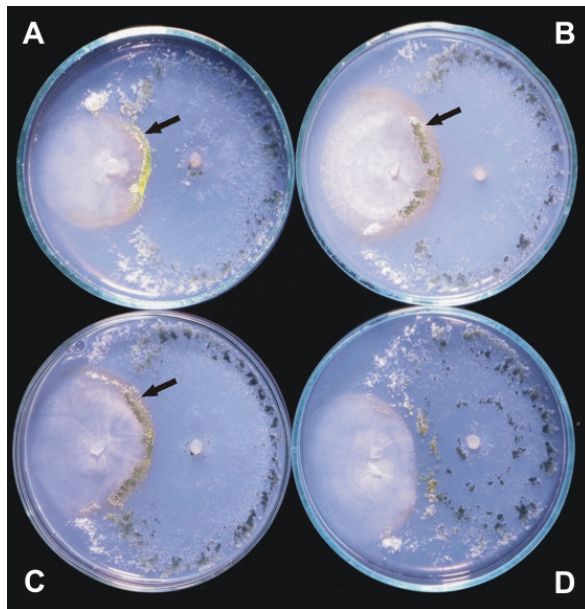
37. ábra A CTP3 izoenzimek aktivitásának gélzsűrés utáni profilja. **A.** *T. harzianum* T334, **B.** T334 *col* 26, **C.** T334 *pfa* 37.

Két csúcsot adott a frakciók CTP3 aktivitása a *col* 26 esetében (hozzávetőlegesen 58 és 16 kDa; **37.B. ábra**), míg a *pfa* 37 esetében legalább 4 izoenzimből álló (hozzávetőlegesen

58, 39, 24 és 5,2 kDa; **37.C. ábra**) intervallumról beszélhetünk. Érdekes, hogy mind a szekretált proteázok aktivitása, mind pedig az izoenzim-profilok erősen eltértek a vad törzshöz képest.

V.4.4. Nemesített *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombákkal szembeni *in vitro* antagonizmusa

A mutáns *Trichoderma* törzsek kompetíciós képességeit *in vitro* antagonizmus-tesztek segítségével vizsgáltuk különböző nitrogénforrások jelenlétében. A 8 kiválasztott törzs antagonizmusa a **31. táblázatban** látható. A mutáns törzsek és a vad törzs antagonista képessége között kicsi volt a különbség az élesztőkivonatós táptalajon, míg az ammóniumion jelenlétében ez az eltérés kifejezettebbnek mutatkozott. A tapasztaltak a nitrogénanyagcsere derepressziójára vezethetők vissza. Számos mutáns törzs hatékony antagonista partnernek bizonyult az alkalmazott növénypatogén gombákkal szemben, képes volt ránőni azok telepére (pl. *pfa* 5, *pfa* 37, *col* 26; **38. ábra**). A magas proteáz produkció azonban nem minden esetben eredményezett jobb antagonista képességet (pl. *col* 2).



38. ábra A *T. harzianum col* 26 (A), *pfa* 37 (B), *pfa* 5 (C) és a szülői T344 (D) törzsek *in vitro* antagonizmusa *R. solani*-val szemben. A nyilak a mutánsok ránövésének zónáit jelölik.

Az általunk létrehozott mutáns törzsek alacsonyabb proteáz aktivitásokkal jellemezhetők, mint a *prb1* gén transzformáció útján történő túlkifejezésével létrehozott nemesített törzsek [Flores, A., 1997]. Az utóbbi, extrém magas proteázszintet produkáló

transzformánsok viszont nem bizonyultak jó biokontroll ágensnek. Ez éppen a túlzott proteázszekrécióval magyarázható, mely más, a mikoparazitizmusban szerepet játszó fehérjék részleges-, vagy teljes proteolíziséhez, degradációjához vezethet [Flores, A., 1997]. Ezért a biokontroll törzsek nemesítésénél inkább az lehet a követendő út, ha csak mérsékelten emeljük az egyes extracelluláris enzimek szintjét a nemesítés során [Rey, M., 2001]. Eredményeink alapján az UV-mutagenézis megfelel ezeknek az elvárásoknak. Meg kell azonban említeni, hogy néhány proteáz-túltermelő törzsünk esetében csak mérsékelt antagonista aktivitást tapasztaltunk, ami a robusztus mutagénkezelés nemkívánatos hatásainak tudható be, melynek során az antagonizmus komplex folyamatában résztvevő más gének is változást szenvedhetnek. Ezért - biokontroll ágensként történő gyakorlati alkalmazásukat megelőzően – a mutagenézissel nemesített *Trichoderma* törzsek ökológiai fitneszének részletes vizsgálatára van szükség.

30. táblázat. A mutáns és a vad törzsek *in vitro* antagonizmusa különböző nitrogénforrásokon.

Az <i>in vitro</i> antagonizmus tesztekben résztvevő törzsek							Nitrogénforrás		
<i>pfa</i> 38	<i>pfa</i> 37	<i>pfa</i> 6	<i>pfa</i> 5	<i>col</i> 26	<i>col</i> 22	<i>col</i> 15	<i>col</i> 2	T334	
<i>Fusarium culmorum</i>									
7,09±0,04	7,03±0,05	7,59±0,03	7,32±0,04	7,52±0,04	6,46±0,03	7,47±0,07	8,03±0,06	7,82±0,03	(NH ₄) ₂ SO ₄
7,82±0,07	8,24±0,07	7,58±0,05	7,46±0,07	8,38±0,02	8,52±0,05	7,83±0,04	8,49±0,05	8,23±0,04	NaNO ₃
8,41±0,02	8,04±0,09	8,41±0,04	7,52±0,07	8,44±0,02	8,58±0,02	8,02±0,01	8,61±0,01	8,47±0,03	élesztős
<i>Pythium debaryanum</i>									
3,09±0,07	3,04±0,06	2,82±0,03	2,86±0,06	3,24±0,04	3,03±0,05	2,72±0,05	3,12±0,02	3,19±0,04	(NH ₄) ₂ SO ₄
3,71±0,07	3,57±0,05	4,72±0,04	4,68±0,06	4,76±0,05	5,43±0,06	3,86±0,08	4,42±0,07	4,63±0,06	NaNO ₃
4,11±0,03	4,36±0,04	3,83±0,04	4,57±0,04	3,44±0,03	5,07±0,03	4,53±0,04	4,88±0,03	4,52±0,04	élesztős
<i>Rhizoctonia solani</i>									
1,38±0,03	1,51±0,08	1,43±0,03	1,26±0,05	1,52±0,05	1,53±0,06	1,27±0,04	1,61±0,02	1,49±0,04	(NH ₄) ₂ SO ₄
6,58±0,06	4,48±0,03	5,01±0,04	4,67±0,03	4,89±0,06	6,51±0,02	5,83±0,05	5,67±0,04	6,21±0,03	NaNO ₃
4,63±0,03	4,62±0,02	4,03±0,04	4,22±0,06	3,67±0,03	5,01±0,05	4,59±0,07	5,02±0,04	4,38±0,05	élesztős

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A biológiai növényvédelemben alkalmazható mikroorganizmusok a környezetbarát növényvédelem legígéretesebb eszközei közé tartoznak. Számos képviselőjük rendelkezik kimagasló antagonizáló képességgel növénypatogén gombákkal szemben, s így sikeresen alkalmazhatóak a kórokozók által előidézett növénybetegségek leküzdésére. Az antagonizmus folyamata különböző mechanizmusokon alapul, melyek közül kiemelkedő jelentőségű az élőhelyért és a tápanyagokért folytatott kompetíció, valamint a mikoparazitizmus. A mezőgazdasági alkalmazás céljaira megfelelő gombafajok közül számos tartozik az Ascomycota törzs Hypocreales rendjének *Trichoderma* nemzetségébe, mely a nemzetség tagjainak kiemelkedően gyors növekedésével, valamint jelentős mennyiségű antibiotikum és extracelluláris enzim termelésére való képességével hozható összefüggésbe.

Munkánk során 5 különböző mezőgazdasági területen, 18 mintavételi pontból gyűjtött őszi búza növények gyökeréről származó 116 *Trichoderma* izolátumot, valamint korábban Manczinger és munkatársai által erdei talajból izolált 9 *Trichoderma* törzset tanulmányoztunk. A tisztított és taxonómiailag meghatározott törzsek a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékének gyűjteményében (Microbiological Collection of the University of Szeged – SZMC) kerültek elhelyezésre.

A mezőgazdasági területekről származó izolátumok fajsztípusú azonosítását és filogenetikai vizsgálatát morfológiai és molekuláris módszerek segítségével végeztük. A morfológiai vizsgálatok során a telepek habitusát, valamint a konídiumok, fialidok és konidiofórok alakját és méretét használtuk fel határozási bélyegként, mely lehetővé tette 89 izolátum fajsztípusú történő meghatározását. A molekuláris diverzitás vizsgálatához cellulóz-acetát izoenzim-elektroforézist (CAE) és a riboszómális DNS szekvenciák analízisén alapuló technikákat alkalmaztunk.

Az cellulóz-acetát géleken végzett izoenzim-analízis módszerének bevezetése során vizsgálatainkat kis mintaszámmal, már meghatározott, törzsgyűjteményekben törzsszámmal rendelkező 10 klinikai és 4 környezeti *Trichoderma* izolátummal kezdtük, melybe bevontunk 7 általunk izolált szaprofita törzset is. Tizenhárom intracelluláris enzimet teszteltünk, hogy aktivitásuk, és az egyes mintázatok megfelelőek-e a taxonómiai vizsgálatok céljaira. Hét enzim (6-foszfoglükonát dehidrogenáz, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, glükóz-6-foszfát izomeráz, peptidáz A, B, D, foszfoglükomutáz) mutatott jól használható mintázatot a vizsgált izolátumok esetében. A módszer felbontásának és megbízhatóságának ellenőrzésére

elkészítettük a törzsek ITS 1 DNS szekvenciáján alapuló dendogramját, amelyet összehasonlítottunk az izoenzim-analízis során kapott adatokkal. Az izoenzim-mintázatokon és az ITS 1 szekvenciákon alapuló csoportok jó egyezést mutattak, ezen túl a CAE eredmények esetenként még nagyobb felbontást is adtak a fajokon belül. A kezdeti kísérletek során igazoltuk, hogy a módszer jól használható a későbbi taxonómiai munkák során, továbbá javaslatot tettünk néhány vizsgált izolátum reidentifikálása.

A teljes, 116 törzsre kiterjedő izoenzim-analízist öt kiválasztott enzím mintázatainak vizsgálatával végeztük, melynek során 26 elektroforetikus típusba tartozó 38 elektromorfot regisztráltunk.

A DNS-szekvencia alapú taxonómiai módszer esetében a PCR technikával felszaporított ITS 1 – 5,8S rRNS – ITS 2 régiókat tartalmazó kb. 600 bp-os magi rDNS szakaszok szekvenciáit használtuk fel az egyes fajok ún. „DNS-vonalkód”-okon alapuló azonosítására, melynek segítségével 69 izolátumot fajszenen 18-at pedig kládszenen lehetett azonosítani. Az izoenzim-mintázatok mutatta nagyfokú biokémiai hasonlóság alapján további 15 törzset sikerült fajszenen meghatározni.

A taxonómiai vizsgálatok során gyűjtött adatok filogenetikai elemzését parszimónia, távolság mátrix és Markov lánc Monte Carlo módszerek segítségével vizsgáltuk külön-külön analízisekben az ITS 1-2 szekvenciák illesztésére és az izoenzim adatokra, végül a Markov lánc Monte Carlo módszerrel közös összevont analízist is végeztünk, melynek segítségével pontosan meghatározhattuk az összes törzs taxonómiai pozícióját.

Az elemzésekben a *Longibrachiatum* szekcióba tartozó 5 jól elkülönülő *T. longibrachiatum* törzset használtuk kulcsoportként. A 41 *T. harzianum*-nak bizonyult törzs 4 már leírt ITS 1-2 genotípust (**Gen 1**, **Gen 2a**, **b**, SZMC 1633) és 4 eddig csak a jelen tanulmányban szereplő magyarországi genotípust reprezentált (**Har I**, **II**, **III**, **IV**). Három izolátum, a *Trichoderma* sp. DAOM 175924 törzsszel mutatott hasonlóságot. Az általunk izolált *T. virens* törzsek (31) a filogenetikai elemzések alapján 4 genotípusba sorolhatók, melyből egy azonos az extípussal (**Vir Ex**), három pedig új genotípusnak bizonyult. A *T. atroviride* izolátumok (9) az elfogadott extípus ikerágaként jelentek meg (**Atr I**). Három izolátum a *T. oblongisporum* fajhoz (**Obl II**), négy a *T. brevicompactum* fajhoz, egy izolátum a *T. spirale* fajhoz, míg öt izolátum két genotípussal (**Ros I**, **II**) a *T. rossicum* fajhoz tartozott. Az eddig leírt fajoktól teljesen elkülönülve, viszonylag nagy filogenetikai távolsággal helyezkedett el 14 izolátum, melyből 9 a *Rufa* kládhoz (**Ruf I**, **Ruf II**, SZMC 1682, SZMC 1660), 5 pedig a *Stromatica* kládhoz tartozott (**Bre I**). Ezek az izolátumok valószínűleg 5 új

faj képviselői. A *T. virens*, *T. rossicum*, *T. spirale*, *T. brevicompactum* és *T. oblongisporum* fajok magyarországi előfordulásáról eddig nem jelent meg közlemény, a jelen tanulmány állapítja meg először jelenlétüket a Kárpát-medencében.

Az ökofiziológiai tanulmányok során a őszi búza gyökeréről származó törzsek extracelluláris enzimtermelését, antibiotikum-termelését és biokontroll tulajdonságait vizsgáltuk.

Az extracelluláris kimoelasztáz-, tripszin- és kimotripszin-típusú proteáz, Leu-aminopeptidáz, β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidáz, α -glükozidáz, β -glükozidáz, β -galaktozidáz, β -xilozidáz és cellobiohidroláz enzimek konstitutív aktivitásait mértük a törzsek fermentleveinek felülúszóiból, mivel ezek az enzimek fontos szerepet játszanak mind a kompetíció, mind a mikoparazitizmus folyamataiban. Jellemeztük az enzimek szekréciójának eloszlását a vizsgált populációban, és statisztikai módszerekkel vizsgáltuk az esetleges kapcsolatokat az egyes enzimek termelődése között. Magas enzimszekrécióval jellemezhető törzsek minden vizsgált enzim esetében előfordultak, de az esetek nagy részében nem volt kimutatható szignifikáns korreláció az egyes enzimek szekréciója között. Az egyes taxonómiai csoportok és a termelt enzimek szintje közötti kapcsolatok tanulmányozása során sem találtunk kimutatható statisztikai összefüggéseket.

Az izolátumok közül 17 törzs bizonyult antibiotikum termelőnek, a termelt vegyületek Gram-pozitív baktériumokkal szemben mutattak jelentős biológiai aktivitást. A fajok és az antibiotikumok termelése között erős összefüggés mutatkozott az antibiotikumot termelő izolátumok ugyanis egy kivétellel (SZMC 1678, *T. harzianum*) a *T. virens* fajhoz tartoztak.

A törzsek biokontroll képességeit két módszerrel határoztuk meg. Egyrészt kidolgoztunk egy új, az *in vitro* antagonizmus tesztek kép-analízisén alapuló módszert, mely lehetőséget teremt a jövőben fonalagomba törzsek biokontroll tulajdonságainak mennyiségi kiértékelésére megfelelő szabványosított körülmények között. Ennek révén a különböző helyszíneken elvégzett tesztek eredményei összehasonlíthatóvá, összevethetővé válnak, lehetőség nyílik az egyes izolátumok skálázására antagonista tulajdonságaik alapján, mely egy relatív Biokontroll Index (BCI) értékkel jellemezhető. Az izolátumok biokontroll képességét az *in vivo* körülményeket közelítő, módosított agresszivitás-tesztekben is regisztráltuk. Megállapítható, hogy a BCI számításával kapott értékek sorozata finomabb felbontást ad, mint a módosított agresszivitás-tesztek eredményei, ami viszont a jó fertőzési redukciót mutató izolátumok természetes körülmények közötti alkalmazhatóságáról szolgáltathat hasznos információt.

A BCI értékeket fő változónak, az extracelluláris enzimaktivitási adatokat magyarázó változónak tekintve regressziós fa-analízissel vizsgáltuk a kapcsolatokat az egyes enzimek termelésének jellemzői és a biokontroll képesség között. Megállapítható, hogy mind a mikoparazitizmusban szerepet játszó mind a kompetíciós enzimek aktivitásai befolyásolták az *in vitro* antagonizmus eredményességét, de azt, hogy mely enzimek játszanak igazán fontos szerepet a folyamatban, az alkalmazott tápközeg is nagymértékben befolyásolja.

Az erdei talajból származó izolátumok antagonista képességének javítására UV-mutagenézissel törzsnemesít végeztünk az extracelluláris proteáz enzimeket túltermelő mutánsok előállítása céljából. Az egyes mutáns törzseket *p*-fluoro-fenilalaninnal szembeni rezisztenciára és megváltozott telepmorfológiára szelektáltuk. Számos proteáztúltermelő mutáns törzs hatásos antagonista partnernek bizonyult az alkalmazott növénypatogén gombákkal szemben, azonban tényleges mezőgazdasági alkalmazásuk előtt szükség van a végső igazolást adó szabadföldi kísérletekre.

Összeségében a természetes élőhelyekről, és a nemesítések során is sikerült kiemelkedő biokontroll képességgel rendelkező *Trichoderma* törzseket izolálni, melyek jó kiindulási alapot teremtenek a biológiai védekezési stratégiák tervezéséhez. Az izolátumok filogenetikai relációit és taxonómiai helyét morfológiai és molekuláris eszközökkel tisztáztuk, és az egyes ökofiziológiai tulajdonságok mérésével - két megközelítésben - magyarázatot kerestünk az előnyös antagonizáló képesség kialakulására.

VII. SUMMARY

There is a worldwide need to adopt the practice of sustainable agriculture, using strategies that are environment-friendly, less dependent on agricultural chemicals and less damaging to soil and water resources. One of the key elements of such sustainable agriculture is the application of biocontrol agents for plant protection. Species in the filamentous fungal genus *Trichoderma* belonging to the Hypocreales order of the Ascomycota division are of great economic importance as sources of enzymes and antibiotics; plant growth promoters; degraders of xenobiotics, and most importantly, as commercial biofungicides, thus they are potential candidates for biocontrol applications. The selection of promising strains, the investigation of antagonistic abilities, the tolerance of environmental parameters, and the production of extracellular enzymes, as well as the improvement of the strains for better antagonistic properties are in progress these days.

In this study we investigated *Trichoderma* strains that were isolated partly from roots of winter wheat grown in five agricultural fields of southern Hungary (116 strains from 18 different defined test holes), partly from forest soil. The purified and taxonomically identified isolates were deposited in the Microbiological Collection of the University of Szeged (SZMC).

The identity and diversity of the strains isolated from the agricultural fields were examined based on morphological and molecular characters, and a detailed phylogenetic analysis was performed. Morphological data were collected by measuring the structure and shape of conidiophores, phialides and conidia as well as the colony morphology and growth characteristics. During these investigations we were able to identify 89 isolates at the species level. For the investigation of molecular diversity, sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region and cellulose-acetate electrophoresis (CAE) mediated isoenzyme analysis were applied.

For the optimization of the CAE method, we started our experiments with a small sample amount including 10 clinical and 4 environmental isolates deriving from culture collections and 7 of our field isolates. After initial testing of 13 enzymes for activity and resolution of bands, 7 of them (glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphate isomerase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, peptidase A, B, D and phosphoglucomutase) proved to be appropriate for the analysis of the full sample set. Comparing the different electrophoretic types, each of these 7 enzymes could be used as a molecular marker for the identification of members of the genus *Trichoderma*. The CAE-based identifications were

supported by previous data from sequence analysis of the internal transcribed spacer region of the isolates. During the phylogenetic analysis, the groups based on isoenzyme patterns and ITS 1 sequence data corresponded well with each other, furthermore, CAE proved to be superior to ITS 1 regarding the discriminatory power of the methods within the species *T. longibrachiatum*. Our results support the hypothesis that most of the *Trichoderma* strains involved in opportunistic infections are restricted to the *Longibrachiatum* section of the genus, and that previous reports about the isolation of other *Trichoderma* species from immunocompromised patients may not have been correct.

After this optimization experiment, the CAE-based isoenzyme analysis was subsequently expanded to the full set of strains isolated from root of winter wheat. We were able to determine 38 electromorphs belonging to 26 electrophoretic types based on the running patterns of five selected enzymes.

The approx. 600 bp long ITS 1 - 5.8S rRNS- ITS 2 region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and applied as a marker to identify the strains at the species level with the aid of oligonucleotide barcodes. This method enabled the identification of 69 isolates at the species level and 18 isolates at the clade level. The comparison of the CAE and barcode results enabled the identification of further 15 strains at the species level.

Data collected during the taxonomical investigations were analysed phylogenetically with the methods of parsimony, distance matrix and Markov chain Monte Carlo in separated analysis of ITS 1-2 sequences and isoenzyme data. Finally, to identify the taxonomic position of all examined isolates, a combined phylogenetic analysis was carried out with the Bayesian method using the Markov chain Monte Carlo algorithm.

In the analysis, five well separated *T. longibrachiatum* strains belonging to the section *Longibrachiatum* were used as the outgroup. Forty-one strains proved to be *T. harzianum* representing 4 ITS-genotypes that have been described already (**Gen 1**, **Gen 2a, b**, SZMC 1633) and 4 further Hungarian genotypes that were firstly obtained during this study (**Har I**, **II**, **III**, **IV**). Three isolates were related with the *Trichoderma* sp. DAOM 175924 ex-type strain. The isolated *T. virens* strains (31) could be classified into 4 genotypes, one from these is identical with the ex-type (**Vir Ex**), while three proved to be novel genotypes. The *T. atroviride* isolates (9) formed a twin-branch of the ex-type strain on the phylogenetic trees (**Atr I**). Three isolates proved to belong to *T. oblongisporum*, four to *T. brevicompactum*, one to *T. spirale*, while five isolates to two genotypes (**Ros I**, **II**) of *T. rossicum*.

Fourteen strains appeared to be completely separated from the species described previously in the literature. Nine of them proved to be members of the *Rufa* clade (**Ruf I**, **Ruf II**, SZMC 1682, SZMC 1660), while 5 belonged to the *Stromatica* clade (**Bre I**). Based on our investigations, these isolates probably represent five new species. To our knowledge, our study is the first to demonstrate the occurrence of the *T. virens*, *T. rossicum*, *T. spirale*, *T. brevicompactum* and *T. oblongisporum* species in Hungary.

During the ecophysiological experiments we studied the secretion of extracellular enzymes, production of antibiotics and determined the biocontrol properties of the isolates.

The strains were investigated for the production of β -xylosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -galactosidase, cellobiohydrolase, trypsin-, chymotrypsin- and chymoelastase-like proteases and *N*-acetyl- β -glucosaminidase, which are extracellular enzymes important for the processes of competition and mycoparasitism. The secretion of enzymes was followed by the means of specific chromogenic *p*-nitroanilide and *p*-nitrophenyl substrates. The distributions of the secretions of the examined extracellular enzymes were characterised in the isolated population and the occurring relationships between the produced enzymes were investigated by statistical tools. Some of the examined enzymes were secreted constitutively, their amounts showed high variability within the isolates. However, there were no significant correlations between the secretions of the enzymes. Similarly, no correlation could be found between the taxonomical positions and the enzyme productions of the strains.

Biocontrol properties were tested *in vitro* against *Fusarium culmorum* NRRL 29371, a significant pathogen of wheat. *In vitro* confrontation assays performed on agar plates are generally applied for the evaluation of antagonistic abilities of *Trichoderma* strains, as results of these assays correlate well with *in vivo* studies. A direct confrontation assay was applied for recording the inhibition effect, which was expressed as the value of biocontrol index (BCI) calculated from the image analysis of ratio of the area occupied by *Trichoderma* and the total area of *Trichoderma* and the plant pathogen. A modified plant pathogen aggressiveness test was carried out on wheat seeds for the investigation of reduction in disease severity in the presence of *Trichoderma* strains.

The presence of antibiotics-producing strains (17) among the isolates was examined by biological tests, the detected antibiotics were partially purified. These compounds showed antimicrobial activity against the tested Gram-negative bacteria. The detection of antibiotics was in correlation with the taxonomical positions of the isolates: except for a single strain (SZMC 1678, *T. harzianum*), all of the producers proved to belong to *T. virens*.

After collecting the data about biocontrol properties and extracellular enzyme secretion, the relationships and regression were examined by statistical analysis. Statistical methods were used to predict the values of the target variable (areas of colonies in *in vitro* antagonistic tests) with values of the extracellular enzyme activities as explanatory variables. The enzymes playing a role both in the competition and mycoparasitism influenced the *in vitro* antagonisms, but the enzymes, which are important in these processes depended on the applied media.

To improve the antagonistic capacity of some *Trichoderma* strains isolated from forest soil, a mutagenetic program was undertaken for the isolation of derivatives that are overproducing extracellular proteases. The mutant strains were obtained by means of UV-irradiation and were selected for *p*-fluorophenyl-alanine resistance or altered colony morphology. Both trypsin-like and chymotrypsin-like protease secretion was elevated in most of the mutant strains. The profiles of protease isoenzymes were different between the mutants and the wild-type strain, when examined by gel filtration chromatography. Certain mutants proved to be better antagonists against plant pathogens in *in vitro* antagonism experiments.

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

- Abdel-Fattah, H.M., Abdel-Kader, M.I.A., Hamida, S. (1982) Selective effects of two systemic fungicides on soil fungi. *Mycopathologia* **79**, 93-99.
- Adams, P.B. (1990) The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 59-72.
- Ahmad, J.S., Baker, R. (1988) Rhizosphere competence of benomyl-tolerant mutants of *Trichoderma* spp. *Can. J. Microbiol.* **34**, 694-696.
- Antal, Zs., Manczinger, L., Ferenczy, L. (1997) Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Tech.* **11**, 205-208.
- Antal, Zs., Manczinger, L., Szakács, Gy., Tengerdy, R.P., Ferenczy, L. (2000) Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycol. Res.* **104**, 545-549.
- Antal, Zs., Kredics, L., Manczinger, L., Ferenczy, L. (2001) Extracellular enzyme profiles of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *IOBC/WPRS Bull.* **24**, 337-340.
- Arisan-Atac, I., Heidenreich, E., Kubicek, C.P. (1995) Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 249-256.
- Babich, H., Gamba-Vitalo, C., Stotzky, G. (1982) Comparative toxicity of nickel to mycelial proliferation and spore formation of selected fungi. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **11**, 465-468.
- Badham, E.R. (1991) Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. *Mycologia* **83**, 455-463.
- Bae, Y.S., Knudsen, G.R. (2000) Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with β -glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. *App. Environ. Microbiol.* 810-815.
- Baek, J.-M., Howell, C.R., Kenerley, C.M. (1999) The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* **35**, 41-50.
- Bankole, S.A., Adebajo, A., (1996) Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*. *Crop Prot.* **15**, 633-636.
- Bateman, G.L., Kwaśna, H. (1999) Effects of number of winter wheat crops grown successively on fungal communities on wheat roots. *App. Soil Ecol.* **13**, 271-282.
- Bell, D.K., Wells, H.D., Markham, C.R. (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* **72**, 379-382.
- Benhamou, N., Chet, I. (1997) Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2095-2099.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* **7**, 249-260.

- Biely, P., MacKenzie, C.R., Puls, J., Schneider, H. (1986) Cooperativity of esterases and xylanases in the degradation of acetyl xylan. *Nature Biotechnol.* **4**, 731-733.
- Biely, P., Côté, G.L., Kremnický, L., Greene, R.V., Tenkanen, M. (1997) Action of acetylxylin esterase from *Trichoderma reesei* on acetylated methyl glycosides. *FEBS Lett.* **420**, 121-124.
- Bisby, G.R. (1939) *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **23**, 149-168.
- Bissett, J. (1984) A revision of the genus *Trichoderma*. I. Sect. *Longibrachiatum* sect. nov. *Can. J. Bot.* **62**, 924-931.
- Bissett, J. (1991a) A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* **69**, 2357-2372.
- Bissett, J. (1991b) A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* **69**, 2373-2417.
- Bissett, J. (1991c) A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can. J. Bot.* **69**, 2418-2420.
- Bissett, J. (1992) *Trichoderma atroviride*. *Can. J. Bot.* **70**, 639-641.
- Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P. (2002) Expansion of the genus *Trichoderma*: addition of seven new species from Eurasia. In: IMC7, Book of Abstracts, The 7th International Mycological Congress
- Bissett, J., Szakacs, G., Nolan, C.A., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C.M., Kubicek, C.P. (2003) Seven new taxa of *Trichoderma* from Asia. *Can. J. Bot.* **81**, 570-586.
- Buckler, E.S., Ippolito, A., Holtsfort, T.E. (1997) The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* **145**, 821-832.
- Buntjer, J.B. (1997) Phylogenetic computer tools (PhylTools). Version 1.32 for Windows. Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, The Netherlands.
- Cacais, A.O.G., Silveira, F.Q.P., Filho, E.X.F. (2001) Production of xylan-degrading enzymes by a *Trichoderma harzianum* strain. *Braz. J. Microbiol.* **32**, 141-143.
- Carpita, N.C., McCann, M.C. (2000) The cell wall. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, p. 52-108.
- Caudhary, K., Tauro, P. (1986) Synthesis of xylanase by *Trichoderma reesei*. *Mircen J.* **2**, 399-403.
- Chaverri, P., Samuels, G.J., Stewart E.L. (2001) *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* **93**, 1113-1124.
- Chaverri, P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J., Geiser, D. (2003a) Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* **27**, 302-313.
- Chaverri, P., Castlebury, L.A., Overton, B.E., Samuels, G.J., (2003b) *Hypocrea*/*Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia* **95**, 1100-1140.

- Chaverri P, Candoussau F, Samuels G.J. (2004) *Hypocrea phyllostachydis* and its *Trichoderma* anamorph, a new bambusicolous species from France. *Mycol. Progr.* **3**, 29–36.
- Christov, L.P., Prior, B.A. (1993) Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**, 460–475.
- Cohen, B.L. (1973) The neutral and alkaline proteases of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 521–528.
- Cuero, R.G., Smith, J.E., Lacey, J. (1987) Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **89**, 221–226.
- Davet, P. (1981) The effects of some pesticides upon substrate colonization by *Trichoderma harzianum* Rifai in the presence of other soil fungi. *Soil Biol. Biochem.* **13**, 513–517.
- Deane, E.E., Whipps, J.M., Lynch, J.M., Peberdy, J.F. (1999) Transformation of *Trichoderma reesei* with a constitutively expressed heterologous fungal chitinase gene. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 419–424.
- De Azevedo, A.M.C., De Marco, J.L., Felix, C.R. (2000) Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosus*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 171–175.
- De Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J., Beijersbergen, A.G.M. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnol.* **16**, 839–842.
- De la Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benitez, T., Llobell, A. (1995). Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitisms. *J. Bacteriol.* **177**, 1864–1871.
- De las Mercedes Dana M., Limon, M.C, Mejias, R., Mach R.L., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A., Kubicek, C.P., (2001) Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* **38**, 335–342.
- De Vries, R.P., Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 497–522.
- DeBusk, R.M., DeBusk, A.G. (1980) Physiological and regulatory properties of the general amino acid transport system of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **143**, 188–197.
- Desphande, M.V. (1992) Proteinases in fungal morphogenesis. *Word J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 242–250.
- Dodd, S.L., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., (2003) *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* **95**, 27–40.
- Doi, Y., Abe, Y., Sugiyama, J. (1987) *Trichoderma* sect. *Saturnisporum*, sect. nov. and *Trichoderma ghanense*, sp. nov.. *Bull. Nat. Sci. Museum., Ser B (Botany)* **12**, 1–9.
- Donzelli, B.G., Harrnan, G.E. (2001) Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell walldegrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain Pl. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5643–5647.

- Druzhinina, I.S., Koptchinski, A., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C.P. (2005a) A DNA-barcode for strain identification in *Trichoderma*. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 813-828.
- Druzhinina, I., Kubicek C.P. (2005b) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J. Zhejiang Univ. SCI.* **6B**, 100-112.
- Druzhinina, I.S., Bissett, J., Kubicek, C.P. (előkész.-1) Modeling the evolution of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and its close relatives using a Bayesian approach.
- Druzhinina, I.S., Chaverri, P., Fallah, P., Kubicek, C.P., Samuels, G.J. (előkész.-2) *Hypocrea flavoconidia*, a new species with yellow conidia from Costa Rica.
- Duchon, C.E. (1979) Lanczos filtering in one and two dimensions. *J. Appl. Meteorol.* **18**, 1016-1022.
- Eastburn, D.M., Butler, E.E. (1991) Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* **83**, 257-263.
- Eck, R.V., Dayhoff, M.O. (1966) Atlas of protein sequence and structure 1966. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* **28**, 719-725.
- Elad, Y., Kapat, A. (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 177-189.
- Elad, Y. (2000) *Trichoderma harzianum* T39 Preparation for Biocontrol of Plant Diseases- Control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Sci. Technol.* **10**, 499- 507.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein J. (1995) PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.57c. Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Felsenstein, J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Ferreira, H.M., Filho, E.X.F. (2004) Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Carbohydr. Polym.* **57**, 23-29.
- Fiedurek, J., Gromada, A., Jamroz, J. (1996) Effect of medium components and metabolic inhibitors on β -galactosidase production and secretion by *Penicillium notatum* 1. *J. Bas. Microbiol.* **36**, 27-32.
- Fleet, G.H., Phaff, H.J. (1981) Fungal glucans- structure and metabolism. In: Tanner, W., Loewus, F. A. (Eds.), *Encyclopedia of plant physiology*, 13B, Springer- Verlag, Berlin p. 416- 440.
- Flores, A., Chet, I., Herrera-Estrella, A. (1997) Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr. Genet.* **31**, 30-37.

- Frank, V., Tamova, G., Takacsova, L. (1993) Effects of cadmium and mercury on growth and differentiation of *Trichoderma viride*. *Zentralbl. Mikrobiol.* **148**, 229-232.
- Freeman, S., Maymon, M., Kirshner, B., Rav-David, D., Elad, Y. (2002) Use of GUS transformants of *Trichoderma harzianum* isolate T39(TRICHODEX) for studying interactions on leaf surfaces. *Biocont. Sci. Technol.* **12**, 401-407.
- Gams, W., Bissett, J., (1998) Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd., London, p. 3-34.
- Geremia, R., Goldman, G.H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S.B., Van-Montagu, M., Herrera-Estrella, A. (1993) Molecular characterization of the proteinase-encoding gene *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* **8**, 603-613.
- Gherbawy, Y., Druzhinina, I., Shaban, G.M., Wuczkowsky, M., Yaser, M., El-Naghy, M.A., Prillinger, H.J., Kubicek, C.P. (2004) *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycol Prog*, **3**, 211-218.
- Giczey, G., Kerényi, Z., Dallmann, G., Hornok, L. (1998) Homologous transformation of *Trichoderma hamatum* with an endochitinase encoding gene, resulting in increased levels of chitinase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 247-252.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M.D., Mateos, P.F., Bridge, P.D., Monte, E., Garcia-Acha, I. (1997) Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3189-3198.
- Gupta, M.N., Guoqiang, D., Kaul, R., Mattiasson, B. (1994) Purification of xylanase from *Trichoderma viride* by precipitation with an anionic polimer. *Eudratias 100. Biotechnol. Technol.* **8**, 117-122.
- Häggglund, P., Eriksson, T., Collén, A., Nerinckx, W., Claeysens, M., Ståhlbrand, H. (2003) A cellulose-binding module of the *Trichoderma reesei* β -mannanase Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex substrates. *J. Biotechnol.* **101**, 37-48.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W., Župančič, S. (1996) Production of fungal xylanases. *Bioresour. Technol.* **58**, 137-161.
- Hanson, M.A., Marzluf, G.A (1975) Control of the synthesis of a single enzyme by multiple regulatory circuits in *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 1240-1244.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I. (1995) New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* **99**, 441-446.
- Haran, S., Schickler, H., Chet, I. (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* **142**, 2321-2331.
- Harkki, A., Mäntylä, A., Penttilä, M., Muttillainen, S., Bühler, R., Suominen, P., Knowles, J., Nevalainen, H. (1991) Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles. *Enzyme Microbiol. Technol.* **13**, 227-233.
- Harman, G.E., Howel C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species – opportunist, avirulent plant symbionts. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 43-55.

- Hatvani, N., Kredics, L., Antal, Z., Mécs, I. (2002) Activity changes of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 415–423.
- Hazell, B.W., Te'o, V.S.J., Bradner, J.R., Bergquist, P.L., Nevalainen, K.M.H. (2000) Rapid transformation of high cellulase-producing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. *Lett. App. Microbiol.* **30**, 282-286.
- Hebert P.D.N., Beaton M.J. (1993) Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis. A Practical Handbook. Helena Laboratories, Beaumont, Texas.
- Herrera-Estrella, A., Goldman, G.H., Van-Montagu, M. (1990) High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* ssp. *Mol. Microbiol.* **4**, 839-844.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J.P. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294, 2310-2314.
- Jackson, A.M., Whipps, J.M., Lynch, J.M. (1991) Nutritional studies of four fungi with disease biocontrol potential. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 456-461.
- Karaffa, L., Fekete, E., Gamauf, C., Szentirmai, A., Kubicek, C.P., Seiboth, B. (2006) D-Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiol.* **152**, 1507-1514.
- Kay, S.J., Stewart, A. (1994) The effect of fungicides on fungal antagonists of onion white rot and selection of dicarboximide-resistant biotypes. *Plant Pathol.* **43**, 863-871.
- Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G.J., Kubicek, C.P., (1998) Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA clade. *Fungal Genet. Biol.* **24**, 298-309.
- Klein, D., Eveleigh, D.E. (1998) Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd., London, p.57-74.
- Kluge, A.G., Farris J.S. (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**, 1-32.
- Kraus, G., Druzhinina, I., Bissett, J., Zafari, D., Prillinger, H.J., Szakacs, G., Zare, R., Gams, W., Kubicek, C.P. (2004) *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia* **96**, 1057-1071.
- Kredics L, Antal Z, Varga J, Manczinger L, Szekeres A, Kocsubé S, Dóczy I, Láday M, Kevei F, Nagy E. (2003a) Genetic variability and antifungal susceptibilities of clinical *Trichoderma* isolates. In: *Proceedings of Trends in Medical Mycology, 9th Congress of the European Confederation of Medical Mycology and 7th Trends in Invasive Fungal Infections*, Amsterdam, The Netherlands, Monduzzi Editore, p. 133-136.
- Kredics, L., Antal, Z., Doczi, I., Manczinger, L., Kevei, F., Nagy, E. (2003b) Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **50**, 105-117.
- Kredics, L., Manczinger, L., Antal, Z., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E. (2004) Water activity- and pH-dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 491-498.

- Kredics, L., Antal, Z., Szekeres, A., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Nagy, E. (2005) Extracellular proteases of *Trichoderma* species – a review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **52**, 169–184.
- Kremnický, L., Mastihuba, V., Côté, G.L. (2004) *Trichoderma reesei* acetyl esterase catalyzes transesterification in water. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **30**, 229–239.
- Kubicek, C.P., Eveleigh, D.E., Esterbauer, H., Steiner, W., Kubicek-Pranz, E.M. (Eds.) (1990) *Trichoderma reesei* cellulases: biodiversity, genetics, physiology and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Kubicek, C.P., Penttilä, M.E. (1998) Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis Ltd., London, p.49-71.
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Lorito, M. (2001) *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* **83(S2)**, 11–23.
- Kubicek C.P. (2003a) Molecular biology of biocontrol *Trichoderma* In: Arora D.K., Bridge P.D., Bhatnagar, D. (Eds.), *Fungal biotechnology in agricultural food and environmental applications*, Marcel Dekker Inc., New York, p. 135-145.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G. (2003b) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.* **38**, 310-319.
- Kubodera, T., Yamashita, N., Nishimura, A. (2002) Transformation of *Aspergillus* sp. and *Trichoderma reesei* using the pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 404-406.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T., 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**, 7755-7760.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Meyer, W., Kubicek, C.P., Börner, T. (1997) Revision of *Trichoderma* section *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on an analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, **89**, 442-460.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Börner T, Guého E. (1999) Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *J. Med. Mycol.* **37**, 25–33.
- Kullnig, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P. (2000) Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol. Res.* **104**, 1117-1125.
- Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P. (2002) Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma*-a multigene approach. *Mycol. Res.* **106**, 757-767.
- Kulminskayaa, A.A., Eneiskayaa, E.V., Isaeva-Ivanovaa, L.S., Savel'ev, A.N., Sidorenkoa, I.A., Shabalina, K.A., Golubeva, A.M., Neustroeva, K.N. (1999) Enzymatic activity and β -galactomannan binding property of β -mannosidase from *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 372–377.

- Inbar, J., Chet, I. (1995) The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* **141**, 2823-2829.
- Láday, M., Szécsi, Á. (2001) Distinct electrophoretic isoenzyme profiles of *Fusarium graminearum* and closely related species. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 67-75.
- Leach, J., Finkelstein, D.B., Rambosek, J. A. (1986) Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. *Fungal Genet. Newslett.* **33**, 32-33.
- Lewis, J.A., Larkin, R.P. (1997) Extruded granular formulation with biomass of biocontrol *Gliocladium virens* and *Trichoderma* spp. to reduce damping-off of eggplant caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soil-less mix. *Biocontrol Sci. Technol.* **7**, 49- 60.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Börner, T., Gams, W. (1998) *Trichoderma koningii*: neotypification and *Hypocrea* teleomorph. *Can. J. Bot.* **76**, 1507-1522.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Nirenberg, H.I., Petrini, O. (1999) A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2418-2428.
- Lieckfeldt, E., Seifert, K.A. (2000) An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the *Hypocreales*. *Stud. Mycol.* **45**, 35-44.
- Lo, C.T., Nelson, E.B., Hayes, C.K., Harman, G.E. (1998) Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathol.* **88**, 129-136.
- Lorito, M., Hayes, C.K., Di-Pietro, A., Harman, G.E. (1993) Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr. Genet.* **24**, 349-356.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., Kubicek, C.P. (1996) Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* **178**, 6382-6385.
- Lu, B.S., Druzhinina, I., Chaverri, P., Fallah, P., Gradinger, C., Kubicek, C.P., Samuels, G.J. (2004) *Hypocreal/Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum*, and their newly discovered relatives. *Mycologia* **96**, 310-342.
- Luard, E.J., Griffin, D.M. (1981) Effect of water potential on fungal growth and turgor. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **76**, 33-40.
- Maddison, D.R., Swofford, D.L., Maddison, W.P. (1997) NEXUS: an extensible file format for systematic information. *Syst. Biol.* **46**, 590-621.
- Magan, N. (1988) Effects of water potential and temperature on spore germination and germ-tube growth *in vitro* and on straw leaf sheaths. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **90**, 97-107.
- Magan, N., Lacey, J. (1984) Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **82**, 83-93.
- Magan, N., Lynch, J.M. (1986) Water potential, growth and cellulolysis of fungi involved in decomposition of cereal residues. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1181-1187.
- Manczinger, L., Ferenczy, L. (1985) Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 72-76.

- Manczinger, L., Polner, G. (1987) Cluster analysis of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates. *System. Appl. Microbiol.* **9**, 214-217.
- Manczinger, L., Antal, Zs., Ferenczy, L. (1994) Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains by UV-mutagenesis. In: IUMS Congresses Praha, Poster Abstracts.
- Manczinger, L., Komonyi, O., Antal, Zs., Ferenczy, L. (1997) A method for high- frequency transformation of *Trichoderma viride*. *J. Microbiol. Methods* **29**, 207-210.
- Manczinger, L., Antal, Z., Kredics, L. (2001) Characterization of the extracellular enzyme systems of *Trichoderma viride* AH124. *Acta Biol. Hung.* **52**, 223-229.
- Manczinger, L., Antal, Zs., Kredics, L. (2002) Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains (a review). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **49**, 1-14.
- Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., Magan, N. (1997) Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* on maize grain. *Cereal Res. Commun.* **25**, 499-500.
- Margolles-Clark, E., Saloheimo, M., Siika-aho, M., Penttilä, M. (1996) The α -glucuronidase-encoding gene of *Trichoderma reesei*. *Gene* **172**, 171-172.
- Margolis-Clark, E., Hunt, I., Espinosa, S., Bowman B.J. (2001) Identification of the gene at the *pmg* locus, encoding system II, the general amino acid transporter in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **33**, 127-135.
- Markovič, O., Slezárik, A., Labudová, I. (1985) Purification and characterization of pectinesterase and polygalacturonase from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **27**, 267-271.
- Maymon, M., Minz, D., Barbul, O., Zveibil, A., Elad Y., Freeman S. (2004) Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to up-PCR and ITS sequence analyses. *Phytoparasitica* **32**, 370-375.
- Melo, I.S., Faull, J.L. (2000) Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Sci. Agric.* **57**, 55-59.
- Mesterházy, Á. (1985) Effect of seed production area on the seedling resistance of wheat to *Fusarium* seedling blight. *Agronomie* **5**, 491-497.
- Mohamed, S.A., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J.D. (2003) New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. *Carbohydr. Res.* **338**, 515-524.
- Naár, Z., Kecskés, M. (1995) A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotinia minor*. *Microbiol. Res.* **150**, 239-246.
- Naseby, D.C., Pascual, J.A., Lynch, J.M. (2000) Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. App. Microbiol.* **88**, 161-169.
- Nelson, E.E. (1982) Occurrence of *Trichoderma* in a Douglas-fir soil. *Mycologia* **74**, 280-284.
- Nicholas, K.B, Nicholas, H.B Jr. (1997) Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.

- Nogawa, M., Yatsui, K., Tomioka, A., Okada, H., Morikawa, Y. (1999) An α -L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* containing a noncatalytic xylan-binding domain. *App. Environ. Microbiol.* **3964**–3968.
- O'Donnell, K. (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.* **22**, 213-220.
- Ospina-Giraldo, M.D., Royse, D.J., Chen, X., Romaine, C.P. (1999) Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology* **89**, 309-313.
- Pacheco-Chávez, R.A., Carvalho, J.C.M., Converti, A., Perego, P., Tavares, L.C., Sato, S. (2004) Production of α -amylase and glucoamylase from different starches by a new *Trichoderma* sp. isolate. *Ann. Microbiol.* **54**, 169-180.
- Papavizas, G.C. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* **23**, 23-54.
- Pe'er, S., Chet, I. (1990) *Trichoderma* protoplast fusion: A tool for improving biocontrol agents. *Can. J. Microbiol.* **36**, 6-9.
- Persoon, C.H. (1794) Dispositio methodica fungorum in classes, ordines, familias et genera. In: Römer, J.J. (Ed.), Neues Magazin für Botanik. Ziegler und Söhne, Zürich, p.63-128.
- Persson, I., Tjerneld, F., Hahn-Hägerdal, B. (1991) Fungal cellulolytic enzyme production: A review. *Process Biochem.* **26**, 65-74.
- Piêta, D., Pastucha, A., Patkowska, E. (2000) Bacteria and fungi communities occurring in the soil after the cultivation of cereals and potato. *Electr. J. Polish Agric. Univ.* **3**, Horticulture, 2.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J., McDougall, B.M. (1993) Non-cellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme. Microb. Technol.* **15**, 178-192.
- Poutanen, K. (1988) An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.* **7**, 271-282.
- R Development Core Team (2004) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria <http://www.R-project.org>.
- Rao, E.Y., Rao, T.K., DeBusk, A.G. (1975) Isolation and characterization of a mutant of *Neurospora crassa* deficient in general amino acid permease activity. *Biochim. Biophys. Acta* **413**, 45–51.
- Rey, M., Delgado-Jarana, J., Benítez, T. (2001) Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 604–608.
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite.
- Ridout, C.J., Colery-Smith, J.R., Lynch, J.M. (1988) Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *T. harzianum*. *Enzyme. Microb. Technol.* **10**, 180-187.
- Rifai, M.A. (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* **116**, 1-116.
- Ripley, B. (2005) Tree: Classification and regression trees. R package version 1.0-19.

- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572-1574.
- Royer, J.C., Nakas, J.P. (1990) Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *App. Environ. Microbiol.* 2535-2539.
- Sahai, A.S., Manocha, M.S. (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**, 317-338.
- Saitou N, Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Samuels, G.J. (1996) *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* **100**, 923-935.
- Samuels, G.J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Kubicek, C.P. (1998) The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Stud. Mycol.* **41**, 1-54.
- Samuels, G.J., Pardo-Schultheiss, R., Hebar, K.P., Lumdsen, R.D., Bastos, C.N., Costa, J.C., Bezerra, J.L. (2000) *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.* **104**, 760-764.
- Samuels, G.J., Dodd, S.L. (2002) *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **94**, 146-170.
- Samuels, G.J. (előkész.) *Trichoderma ovalisporum*: A new endophytic species with potential to control frosty pod rot of cocoa. *Mycol. Prog.*
- Sanchez-Torres, P., Gonzalez, R., Perez-Gonzalez, J.A., Gonzalez-Candelas, L., Ramon, D. (1994) Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *egl1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 440-446.
- Sarrette, M., Nout, M. J.R., Gervais, P., Rombouts, F.M. (1992) Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 420-425.
- Savel'ev, A.N., Eneyskaya, E.V., Isaeva-Ivanova, L.S., Shabalin, K.A., Golubev, A.M., Neustroev, K.N. (1997) The carbohydrate moiety of α -galactosidase from *Trichoderma reesei*. *Glycoconj. J.* **14**, 897-905.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., 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. Env. Microbiol.* **60**, 4364-4370.
- Seiboth, B., Hartl, L., Pail, M., Fekete, E., Karaffa, L., Kubicek, C.P. (2004) The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Mol. Microbiol.* **51**, 1015-1025.
- Seiboth, B., Hartl, L., Salovuori, N., Lanthaler, K., Robson, G.D., Vehmaanpera, J., Penttilä, M.E., Kubicek, C.P. (2005) Role of the *bga1*-encoded extracellular {beta}-galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 851-857.

- Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication, *Bell Syst. Tech. J.* **27**, 379–423, 623–656.
- Siika-aho, M., Tenkanen, M., Buchert, J., Puls, J., Viikari, L. (1994) An α -glucuronidase from *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 813-819.
- Sinha, I., Upadhyay, R.S. (1993) Modification of biocontrol potential of *Trichoderma viride*. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* **28**, 209-214.
- Sivan, A., Chet, I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 675-682.
- Sivan, A., Harman, G.E. (1991) Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 23-30.
- Sivan, A., Chet, I. (1992) Microbial control of plant diseases. In: Mitchell, R. (Ed.) *Environmental Microbiology*, Wiley-Liss Inc., New York, p. 335.
- Sivan, A., Chet, I. (1993) Integrated control of fusarium crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization. *Crop Prot.* **12**, 380-386.
- Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L. (1998) Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd., London, p.139-191.
- Somashekar, R.K., Kulashekar, M.D., Satsihchandra Prabhu, M. (1983) Toxicity of heavy metals to some fungi. *Int. J. Environ. Stud.* **21**, 277-280.
- Stasz, T.E., Harman, G.E., Weeden, N.F. (1988) Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* **80**, 141-150.
- Stasz, T.E. (1990) Genetic improvement of fungi by protoplast fusion for biological control of plant pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* **12**, 322-327.
- Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. (2005) Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma* – a review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **52**, 137-168.
- Tangarone, B., Royer, J.C., Nakas, J.P. (1989) Purification and characterization of an endo-(1,3)- β -D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 177-184.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **31**, 21-32.
- Te'o, V.S.J., Bergquist, P.L., Nevalainen, K.M.H. (2002) Biolistic transformation of *Trichoderma reesei* using the Bio-Rad seven barrels Hepta Adaptor system. *J. Microbiol. Met.* **51**, 393-399.
- Tilburg, A-U.B. van, Thomas, M.D. (1993) Production of extracellular proteins by the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 236-242.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.

- Thrane, U., Poulsen, S.B., Nirenberg, H.I., Lieckfeldt, E. (2001) Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 249-255.
- Tóth, B., Mesterházy, Á., Nicholson, P., Téren, J., Varga J. (2004) Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **110**, 587-599.
- Turner, D., Kovacs, W., Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Peter, B., Arisan-Atac, I., Strauss, J., Samuels, G.J., Börner, T., Kubicek, C.P. (1997) Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. *Mycol. Res.* **101**, 449-459.
- Túróczy, Gy., Fekete, Cs., Kerényi, Z., Nagy, R., Pomázi, A., Hornok, L. (1996) Biological and molecular characterisation of potential biocontrol strain of *Trichoderma*. *J. Basic Microbiol.* **36**, 63-71.
- Ulhoa, C.J., Peberdy, J.F. (1991) Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Curr. Microbiol.* **23**, 285-289.
- Ulhoa, C.J., Peberdy, J.F. (1992) Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**, 236-240.
- Vajna, L. (1983) *Trichoderma* species in Hungary. *Acta Phytopathol. Acad. Scient. Hung.* **18**, 291-301.
- Vasseur, V., Van Montagu, M., Goldman, G.H. (1995) *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls. *Microbiology* **141**, 767-774.
- Vázquez-Garciduenas, S., Leal-Morales, C.A., Herrera-Estrella, A. (1998) Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1442-1446.
- Wessels, J.G.H., Siestma, J.H. (1981) Fungal cell walls: a survey. In: Tanner, W., Loewus, F.A. (Eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology*, 13B, Springer-Verlag, Berlin, p. 352-394.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego p. 315-322.
- Widden, P., Abitbol, J.J., (1980) Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia* **72**, 775-784.
- Wuczkowski, M., Druzhinina, I., Gherbawy, Y., Klug, B., Prillinger, H., Kubicek, C.P. (2003) Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiol. Res.* **158**, 125-133.
- Ximenes, F.A., Silveira, F.Q.P., Filho, E.X.F. (1996) Production of β -xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. *Curr. Microbiol.* **33**, 71-77.
- Yamamoto, R., Nevins, D.J. (1983) Degradation of glucan containing β -(1,3) and β -(1,6) linkages by exo-(1,3)- β -D-glucanase. *Carbohydr. Res.* **122**, 217-226.
- Zeilinger, S., Kristufek, D., Arisan-Atac, I., Hodits, R., Kubicek, C.P. (1993) Conditions of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Appl. Environ. Microbiol.* 1347-1353.

- Zeilinger, S. (2004) Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr. Genet.* **45**, 54-60.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki:

Dr. Manczinger László egyetemi docensnek, aki témavezetőként a kísérletek megtervezésében, értékelésében hasznos információkat nyújtott, valamint tapasztalataival, tanácsaival és türelmével segítette munkámat és dolgozatom elkészülését,

Dr. Kevei Ferenc tanszékvezető egyetemi docensnek, **Prof. Ferenczy Lajosnak**, akik ma már sajnos nem lehetnek velünk,

dr. Kredics Lászlónak és **dr. Antal Zsuzsannának** valamint **Hatvani Lórántnak** az eredményekben gazdag közös munkáért,

Leitgeb Baláznak a közös ötletelésekért,

dr. Rákhely Gábornak a szekvenálásban, **dr. Pénzes Zsoltnak** a statisztikai kiértékelésekben nyújtott segítségéért,

dr. Varga Jánosnak, hogy kalauzolt a filogenetika ösvényein a kezdetekben,

Lele Máriának a laboratóriumi munkában, feladatkörét messze meghaladóan nyújtott technikai segítségéért, **Nagy Lajos Gergelynek**, hogy megpróbált bevezetni a fotózás rejtelmeibe,

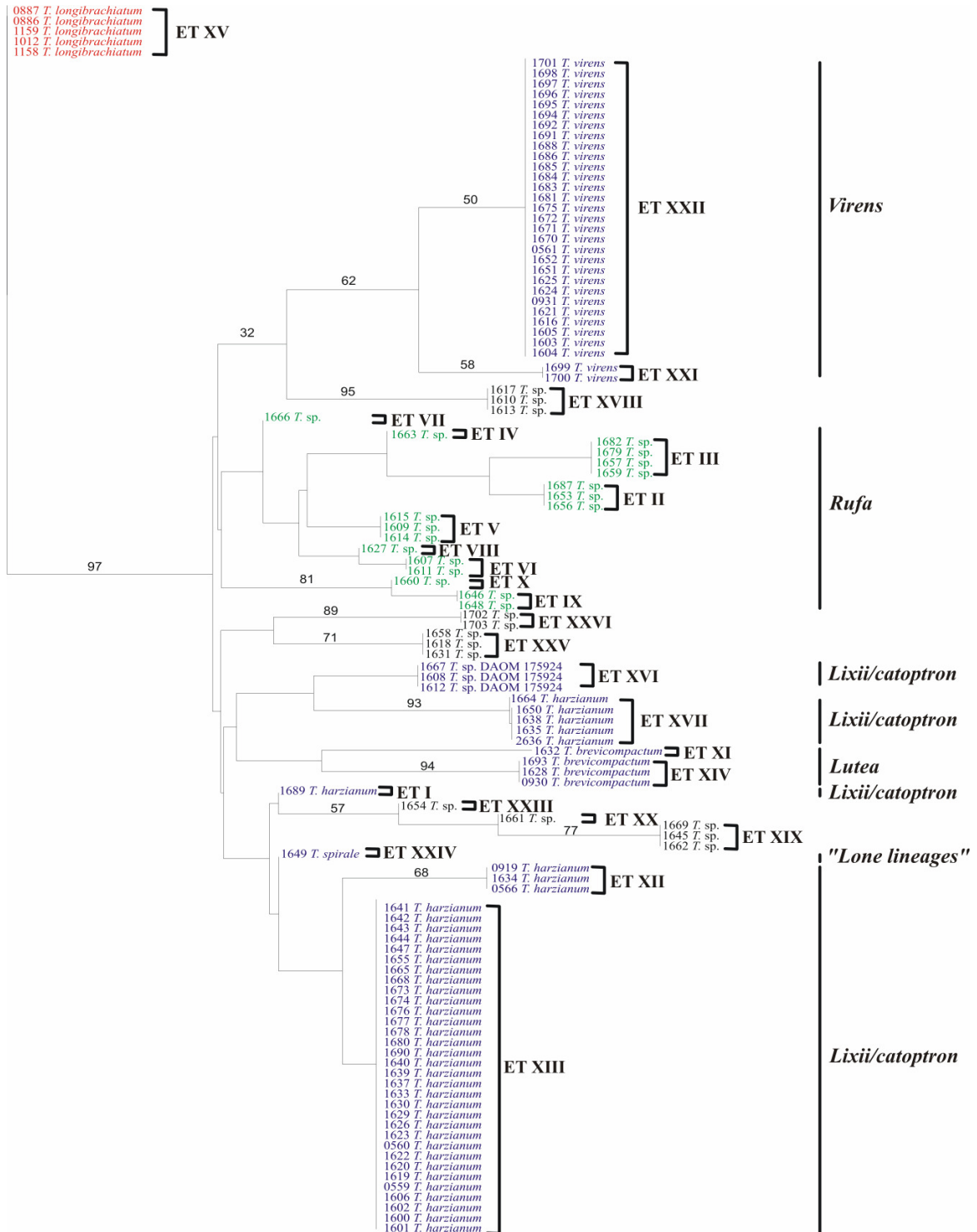
továbbá kollégáimnak, hallgatótársaimnak akik információik és tapasztalataik átadásával, segítőkészségükkel, emberségükkel hozzájárultak munkám sikeres elvégzéséhez.

X. MELLÉKLET

1. melléklet. A cellulóz-acetát izoenzim-elektroforézis validálásához felhasznált klinikai és nem klinikai izolátumok.

Fajok az eredeti morfológiai leírás szerint	Törzsszám	Fajok az ITS 1 szekvenciák alapján	Genbank szám
<u>Klinikai izolátumok</u>			
<i>T. citrinoviride</i>	UAMH 9573	<i>T. longibrachiatum</i>	AY328038
<i>T. longibrachiatum</i>	ATCC 201044	<i>T. longibrachiatum</i>	AY585879
	CBS 446.95	<i>T. longibrachiatum</i>	AY328039
	UAMH 9515	<i>T. longibrachiatum</i>	AY328035
	ATCC 208859	<i>T. longibrachiatum</i>	AY328042
<i>T. koningii</i>	CM 382	<i>T. longibrachiatum</i>	AY328034
<i>T. pseudokoningii</i>	UAMH 7955	<i>T. longibrachiatum</i>	AY328040
	UAMH 7956	<i>T. longibrachiatum</i>	AY328041
	IP 2110.92	<i>T. longibrachiatum</i>	Z82902
<i>T. viride</i>	043.99	<i>T. koningii</i>	AY328036
<u>Nem klinikai izolátumok</u>			
<i>T. citrinoviride</i>	UAMH 999	<i>T. citrinoviride</i>	X93940
<i>T. koningii</i>	CECT 2412	<i>T. longibrachiatum</i>	AF027216
<i>T. longibrachiatum</i>	CECT 2606	<i>T. longibrachiatum</i>	X93929
<i>T. pseudokoningii</i>	CECT 2937	<i>T. longibrachiatum</i>	Z82912
<i>T. virens</i>	SZMC 0931	<i>T. virens</i>	DQ118083
<i>T. virens</i>	SZMC 0561	<i>T. virens</i>	DQ118085
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0559	<i>T. harzianum</i>	DQ118087
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0560	<i>T. harzianum</i>	DQ118084
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0566	<i>T. harzianum</i>	DQ118088
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0919	<i>T. harzianum</i>	DQ118089
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0930	<i>T. brevicompactum</i>	DQ118086

2. melléklet. Az izoenzim-adatokon alapuló parszimónia dendrogram a különböző elektroforetikus típusokkal. Az ágakon lévő számok a bootstrap értékeket, a függőleges vonalak az egyes kládokat, a színek a szekciókat jelölik (piros - *Longibrachiatum*, kék - *Pachybasium* B, zöld – *Trichoderma*, fekete – nem meghatározott).



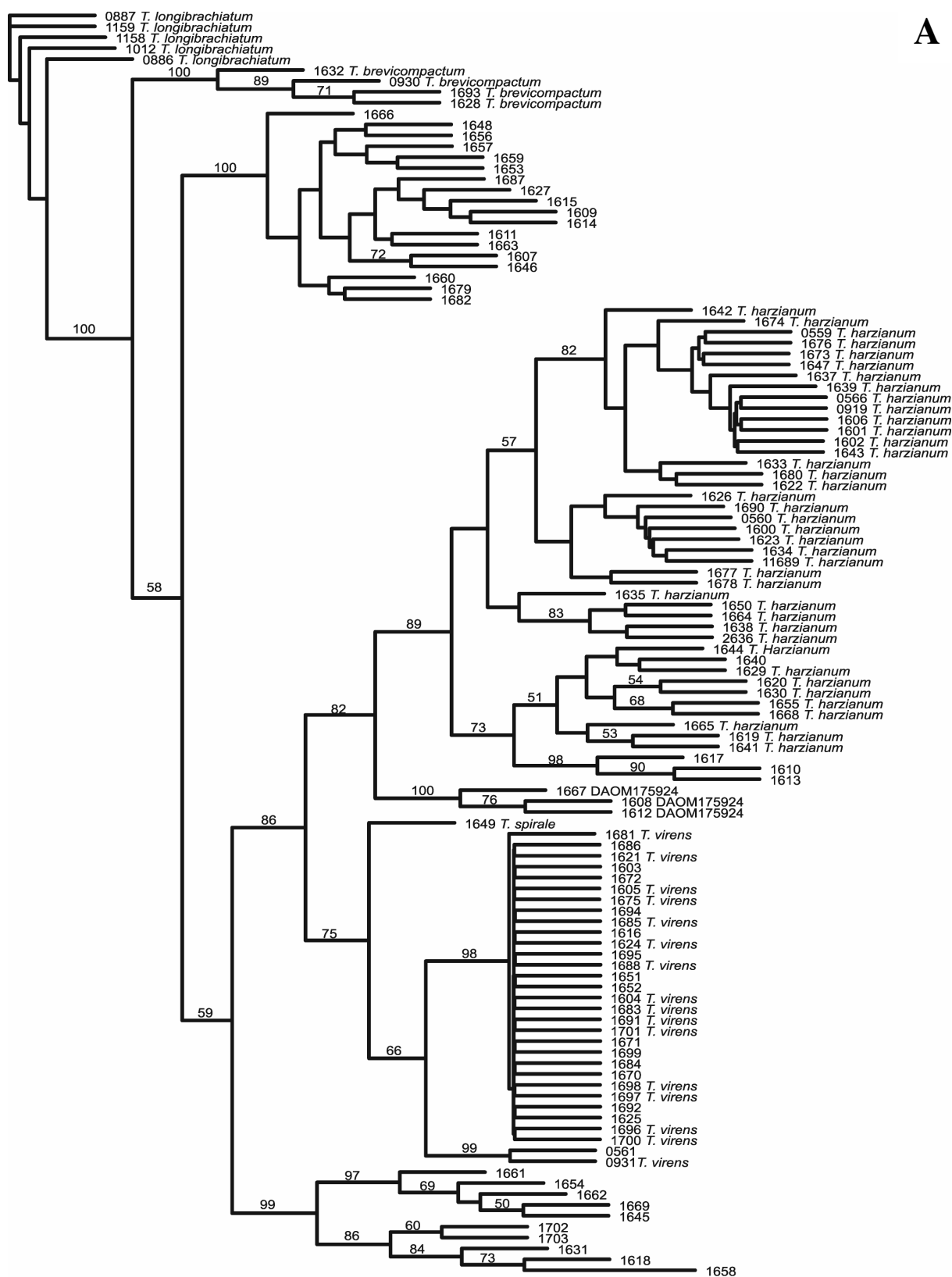
3. melléklet. A téli búza rizoszférából izolált *Trichoderma* törzsek ITS 1-2 szekvenciáinak és illesztésének paraméterei a „vonalkód” alapján meghatározott, és a végleges faji kategóriákkal.

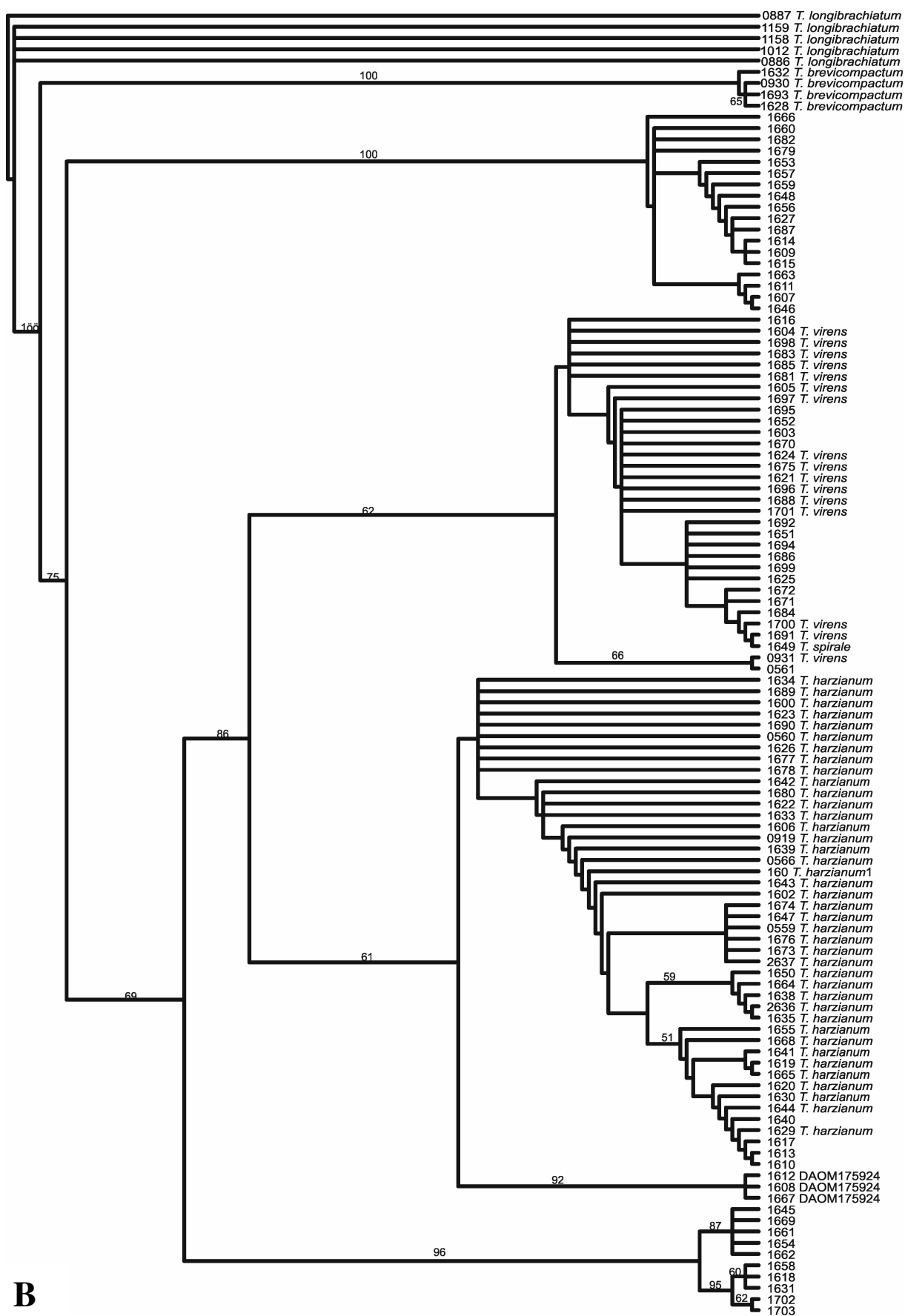
Fajnév („vonalkód”)	Törzsszám	Genbank szám	Fajnév	Hossz	Gap- szám	Gap- hossz
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0559	DQ118087	<i>T. harzianum</i>	377	20	41
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0560	DQ118084	<i>T. harzianum</i>	375	20	43
<i>T. sp.</i>	SZMC 0561	DQ118085	<i>T. virens</i>	370	21	48
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0566	DQ118088	<i>T. harzianum</i>	377	20	41
<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 0886	DQ345821	<i>T. longibrachiatum</i>	391	15	27
<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 0887	DQ345823	<i>T. longibrachiatum</i>	391	15	27
<i>T. harzianum</i>	SZMC 0919	DQ118089	<i>T. harzianum</i>	377	20	41
<i>T. brevicompactum</i>	SZMC 0930	DQ118086	<i>T. brevicompactum</i>	370	18	48
<i>T. virens</i>	SZMC 0931	DQ118083	<i>T. virens</i>	371	20	47
<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 1012	DQ345803	<i>T. longibrachiatum</i>	391	15	27
<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 1158	DQ345810	<i>T. longibrachiatum</i>	391	15	27
<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 1159	DQ345812	<i>T. longibrachiatum</i>	391	15	27
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1600	DQ345793	<i>T. harzianum</i>	374	21	44
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1601	DQ345794	<i>T. harzianum</i>	376	21	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1602	DQ345795	<i>T. harzianum</i>	376	21	42
<i>T. sp.</i>	SZMC 1603	DQ345796	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. virens</i>	SZMC 1604	DQ345797	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. virens</i>	SZMC 1605	DQ345798	<i>T. virens</i>	369	21	49
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1606	DQ345799	<i>T. harzianum</i>	377	21	41
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1607	DQ345800	<i>T. atroviride</i>	361	18	57
<i>T. sp. DAOM</i> 175924	SZMC 1608	DQ345801	<i>T. sp. DAOM</i> 175924	374	21	44
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1609	DQ345802	<i>T. atroviride</i>	361	18	57
<i>T. sp.</i>	SZMC 1610	DQ345804	<i>T. oblongisporum</i>	375	22	43
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1611	DQ345805	<i>T. atroviride</i>	361	18	57
<i>T. sp. DAOM</i> 175924	SZMC 1612	DQ345806	<i>T. sp. DAOM</i> 175924	374	21	44
<i>T. sp.</i>	SZMC 1613	DQ345807	<i>T. oblongisporum</i>	375	22	43
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1614	DQ345808	<i>T. atroviride</i>	362	17	56
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1615	DQ345809	<i>T. atroviride</i>	360	18	58
<i>T. sp.</i>	SZMC 1616	DQ345811	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. sp.</i>	SZMC 1617	DQ345813	<i>T. oblongisporum</i>	377	20	41
<i>T. sp.</i>	SZMC 1618	DQ345814	<i>T. rossicum</i>	373	19	45
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1619	DQ345815	<i>T. harzianum</i>	376	21	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1620	DQ345816	<i>T. harzianum</i>	377	21	41
<i>T. virens</i>	SZMC 1621	DQ345817	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1622	DQ345818	<i>T. harzianum</i>	376	21	42

Fajnév („vonalkód”)	Törzsszám	Genbank szám	Fajnév	Hossz	Gap- szám	Gap- hossz
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1623	DQ345819	<i>T. harzianum</i>	373	22	45
<i>T. virens</i>	SZMC 1624	DQ345820	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. sp.</i>	SZMC 1625	DQ345822	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1626	DQ345824	<i>T. harzianum</i>	375	20	43
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1627	DQ345825	<i>T. atroviride</i>	361	18	57
<i>T. brevicompactum</i>	SZMC 1628	DQ345826	<i>T. brevicompactum</i>	371	16	47
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1629	DQ345827	<i>T. harzianum</i>	374	22	44
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1630	DQ345828	<i>T. harzianum</i>	377	21	41
<i>T. sp.</i>	SZMC 1631	DQ345829	<i>T. rossicum</i>	373	19	45
<i>T. brevicompactum</i>	SZMC 1632	DQ345830	<i>T. brevicompactum</i>	368	19	50
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1633	DQ345831	<i>T. harzianum</i>	375	22	43
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1634	DQ345832	<i>T. harzianum</i>	377	19	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1635	DQ345833	<i>T. harzianum</i>	372	22	46
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1638	DQ345836	<i>T. harzianum</i>	373	23	45
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1639	DQ345837	<i>T. harzianum</i>	376	21	42
<i>T. sp.</i>	SZMC 1640	DQ345838	<i>T. harzianum</i>	375	22	43
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1641	DQ345839	<i>T. harzianum</i>	377	20	41
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1642	DQ345840	<i>T. harzianum</i>	376	21	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1643	DQ345841	<i>T. harzianum</i>	376	21	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1644	DQ345842	<i>T. harzianum</i>	376	22	42
<i>T. sp.</i>	SZMC 1645	DQ345843	<i>T. sp. Bre I</i>	375	20	43
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1646	DQ345844	<i>T. atroviride</i>	362	17	56
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1647	DQ345845	<i>T. harzianum</i>	379	18	39
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1648	DQ345846	<i>T. sp. Ruf II</i>	359	19	59
<i>T. spirale</i>	SZMC 1649	DQ345847	<i>T. spirale</i>	365	23	53
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1650	DQ345848	<i>T. harzianum</i>	375	21	43
<i>T. sp.</i>	SZMC 1651	DQ345849	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. sp.</i>	SZMC 1652	DQ345850	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1653	DQ345851	<i>T. sp. Ruf II</i>	360	18	58
<i>T. sp.</i>	SZMC 1654	DQ345852	<i>T. sp. Bre I</i>	375	18	43
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1655	DQ345853	<i>T. harzianum</i>	377	21	41
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1656	DQ345854	<i>T. sp. Ruf II</i>	360	18	58
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1657	DQ345855	<i>T. sp. Ruf II</i>	360	18	58
<i>T. sp.</i>	SZMC 1658	DQ345856	<i>T. rossicum</i>	374	18	44
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1659	DQ345857	<i>T. sp. Ruf II</i>	360	18	58
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1660	DQ345858	<i>T. sp. Rufa</i>	360	18	58
<i>T. sp.</i>	SZMC 1661	DQ345859	<i>T. sp. Bre I</i>	375	19	43
<i>T. sp.</i>	SZMC 1662	DQ345860	<i>T. sp. Bre I</i>	377	18	41
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1663	DQ345861	<i>T. atroviride</i>	361	18	57
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1664	DQ345862	<i>T. harzianum</i>	374	22	44
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1665	DQ345863	<i>T. harzianum</i>	373	22	45
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1666	DQ345864	<i>T. sp. Ruf I</i>	358	20	60

Fajnév („vonalkód”)	Törzsszám	Genbank szám	Fajnév	Hossz	Gap- szám	Gap- hossz
<i>T. sp.</i> DAOM 175924	SZMC 1667	DQ345865	<i>T. sp.</i> DAOM 175924	375	20	43
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1668	DQ345866	<i>T. harzianum</i>	378	20	40
<i>T. sp.</i>	SZMC 1669	DQ345867	<i>T. sp.</i> Bre I	377	18	41
<i>T. sp.</i>	SZMC 1670	DQ345868	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. sp.</i>	SZMC 1671	DQ345869	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. sp.</i>	SZMC 1672	DQ345870	<i>T. virens</i>	370	21	48
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1673	DQ345871	<i>T. harzianum</i>	376	21	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1674	DQ345872	<i>T. harzianum</i>	376	20	42
<i>T. virens</i>	SZMC 1675	DQ345873	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1676	DQ345874	<i>T. harzianum</i>	376	21	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1677	DQ345875	<i>T. harzianum</i>	377	18	41
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1678	DQ345876	<i>T. harzianum</i>	376	19	42
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1679	DQ345877	<i>T. sp.</i> Ruf I	359	19	59
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1680	DQ345878	<i>T. harzianum</i>	377	20	41
<i>T. virens</i>	SZMC 1681	DQ345879	<i>T. virens</i>	369	21	49
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1682	DQ345880	<i>T. sp.</i> Rufa	359	19	59
<i>T. virens</i>	SZMC 1683	DQ345881	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. sp.</i>	SZMC 1684	DQ345882	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. virens</i>	SZMC 1685	DQ345883	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. sp.</i>	SZMC 1686	DQ345884	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. sp. /Rufa</i>	SZMC 1687	DQ345885	<i>T. atroviride</i>	364	15	54
<i>T. virens</i>	SZMC 1688	DQ345886	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1689	DQ345887	<i>T. harzianum</i>	377	19	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 1690	DQ345888	<i>T. harzianum</i>	375	20	43
<i>T. virens</i>	SZMC 1691	DQ345889	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. sp.</i>	SZMC 1692	DQ345890	<i>T. virens</i>	368	23	50
<i>T. brevicompactum</i>	SZMC 1693	DQ345891	<i>T. brevicompactum</i>	371	16	47
<i>T. sp.</i>	SZMC 1694	DQ345892	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. sp.</i>	SZMC 1695	DQ345893	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. virens</i>	SZMC 1696	DQ345894	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. virens</i>	SZMC 1697	DQ345895	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. virens</i>	SZMC 1698	DQ345896	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. sp.</i>	SZMC 1699	DQ345897	<i>T. virens</i>	369	22	49
<i>T. virens</i>	SZMC 1700	DQ345898	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. virens</i>	SZMC 1701	DQ345899	<i>T. virens</i>	368	22	50
<i>T. sp.</i>	SZMC 1702	DQ345900	<i>T. rossicum</i>	372	20	46
<i>T. sp.</i>	SZMC 1703	DQ345901	<i>T. rossicum</i>	370	22	48
<i>T. harzianum</i>	SZMC 2636	DQ345834	<i>T. harzianum</i>	376	20	42
<i>T. harzianum</i>	SZMC 2637	DQ345835	<i>T. harzianum</i>	375	21	42

4. melléklet. Az ITS 1-2 szekvenciák távolság mátrix (**A**) és parszimónia (**B**) analízise. Az ágakon lévő számok a bootstrap értékeket jelölik.





5. melléklet. A téli búza rizoszférájából izolált törzsek mért extracelluláris enzimeinek aktivitása minimál tápoldatban.

Törzsszám	CEP1		CEP2		TRP1		TRP2	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1600	0,0371	0,0026	0,0529	0,0052	0,1083	0,0019	0,1420	0,0019
1601	0,0704	0,0052	0,1241	0,0026	0,0749	0,0025	0,2927	0,0040
1602	0,0033	0,0058	0,0154	0,0063	0,0000	0,0000	0,0928	0,0059
1603	0,0962	0,0045	0,3177	0,0044	0,0704	0,0062	0,1815	0,0029
1604	0,0783	0,0058	0,8007	0,0045	0,0679	0,0073	0,6970	0,0045
1605	0,0987	0,0066	0,0071	0,0031	0,0658	0,0038	0,1212	0,0054
1606	0,0978	0,0052	0,4634	0,0033	0,1407	0,0071	0,7682	0,0037
1607	0,0924	0,0045	0,7320	0,0065	0,1103	0,0040	0,1345	0,0038
1609	0,0958	0,0029	0,0675	0,0057	0,1262	0,0045	0,0841	0,0007
1012	0,1228	0,0031	1,6692	0,0071	0,1486	0,0045	0,3835	0,0057
1610	0,0679	0,0029	0,0408	0,0019	0,0683	0,0038	0,1053	0,0014
1611	0,0537	0,0057	0,0025	0,0043	0,0346	0,0056	0,0745	0,0019
1612	0,0612	0,0033	0,0167	0,0014	0,0762	0,0057	0,0870	0,0052
1613	0,0712	0,0045	0,0650	0,0057	0,0625	0,0057	0,1053	0,0050
1614	0,1203	0,0050	0,0962	0,0045	0,0949	0,0050	0,0916	0,0019
1615	0,0908	0,0059	0,0450	0,0033	0,0816	0,0038	0,0495	0,0019
1158	0,1324	0,0057	0,0600	0,0037	0,1108	0,0038	0,2278	0,0038
1616	0,0974	0,0062	1,1513	0,0052	0,0708	0,0050	0,2919	0,0019
1159	0,0533	0,0040	0,0158	0,0047	0,0429	0,0019	0,1478	0,0007
0559	0,0421	0,0052	0,4413	0,0144	0,0329	0,0019	0,4767	0,0052
1617	0,1062	0,0037	0,0575	0,0070	0,0862	0,0050	0,2581	0,0062
1619	0,0749	0,0025	0,0096	0,0047	0,0699	0,0057	0,1882	0,0069
1620	0,0845	0,0064	0,0096	0,0052	0,0595	0,0056	0,2223	0,0082
1621	0,0637	0,0033	0,1145	0,0044	0,0558	0,0050	0,0221	0,0019
0931	0,0916	0,0064	0,1262	0,0025	0,0683	0,0031	0,0458	0,0052
1622	0,0695	0,0050	0,1191	0,0038	0,0595	0,0056	0,0600	0,0033
0560	0,1153	0,0036	0,1882	0,0029	0,0737	0,0045	0,0046	0,0040
1623	0,0741	0,0007	0,1291	0,0064	0,0654	0,0026	0,0500	0,0033
1624	0,0712	0,0045	0,1087	0,0037	0,0533	0,0029	0,0808	0,0031
0886	0,0733	0,0019	0,1008	0,0050	0,0237	0,0045	0,0470	0,0069
0887	0,0308	0,0040	0,0670	0,0056	0,0162	0,0070	0,0283	0,0031
1628	0,0495	0,0029	0,0829	0,0044	0,0337	0,0022	1,2778	0,0062
1629	0,0816	0,0062	0,1091	0,0044	0,0904	0,0056	0,0192	0,0031
1630	0,0928	0,0069	0,1045	0,0052	0,0833	0,0019	0,0162	0,0033
1631	0,1020	0,0050	0,0200	0,0012	0,0308	0,0019	0,3035	0,0076
1633	0,0650	0,0045	0,0554	0,0056	0,0466	0,0050	0,1274	0,0033
1635	0,0758	0,0038	0,0383	0,0031	0,0429	0,0059	0,1041	0,0248

Törzsszám	CEP1		CEP2		TRP1		TRP2	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
2636	0,0587	0,0054	0,0429	0,0040	0,0470	0,0031	0,0804	0,0026
2637	0,0691	0,0069	0,1270	0,0064	0,0575	0,0062	0,5438	0,0038
1638	0,0724	0,0057	0,0154	0,0040	0,0550	0,0057	0,0749	0,0057
1639	0,0983	0,0007	0,0512	0,0022	0,0928	0,0052	0,0791	0,0050
1640	0,0196	0,0056	0,0537	0,0054	0,0179	0,0052	0,0171	0,0038
1641	0,0462	0,0057	0,0266	0,0050	0,0508	0,0040	0,0920	0,0026
1642	0,0787	0,0025	0,0000	0,0000	0,0712	0,0012	0,0729	0,0019
1643	0,0175	0,0057	0,0350	0,0033	0,0092	0,0038	0,0421	0,0044
1646	0,0724	0,0025	0,0208	0,0056	0,0583	0,0026	0,0508	0,0069
1647	0,0720	0,0014	0,0354	0,0047	0,0762	0,0025	0,1120	0,0029
1649	0,0466	0,0040	0,0000	0,0000	0,0379	0,0019	0,0391	0,0014
1650	0,0774	0,0025	0,0595	0,0040	0,0787	0,0045	0,2365	0,0019
1651	0,0670	0,0050	0,0204	0,0148	0,0533	0,0038	0,0829	0,0052
1652	0,0637	0,0057	0,0820	0,0040	0,0962	0,0054	0,0916	0,0036
1653	0,0516	0,0026	0,0083	0,0056	0,0321	0,0040	0,0554	0,0062
1655	0,0300	0,0054	0,0304	0,0052	0,0325	0,0045	0,0400	0,0045
1656	0,0516	0,0019	0,0604	0,0052	0,0495	0,0040	0,0595	0,0044
1658	0,0312	0,0057	0,0575	0,0045	0,0446	0,0026	0,0762	0,0033
1661	0,0666	0,0031	0,0500	0,0045	0,1103	0,0031	2,4120	0,0033
1663	0,0341	0,0026	0,2219	0,0071	0,0458	0,0040	0,0966	0,0031
1664	0,0683	0,0019	0,0516	0,0050	0,0100	0,0050	0,0629	0,0019
1665	0,0341	0,0059	0,0650	0,0057	0,0679	0,0031	0,6437	0,0040
1666	0,0075	0,0045	0,0645	0,0044	0,0200	0,0025	0,0625	0,0037
1667	0,0462	0,0050	0,0362	0,0045	0,0454	0,0050	0,0620	0,0044
1668	0,0804	0,0019	0,0470	0,0069	0,0774	0,0050	0,4538	0,0040
0561	0,0637	0,0050	0,0000	0,0000	0,0337	0,0057	0,0733	0,0019
1670	0,0325	0,0037	0,0121	0,0050	0,0625	0,0025	0,0208	0,0052
1671	0,0241	0,0056	0,0179	0,0050	0,0046	0,0040	0,0158	0,0019
1672	0,0217	0,0026	0,0316	0,0031	0,0100	0,0022	0,0358	0,0047
0919	0,0908	0,0040	0,0050	0,0043	0,0516	0,0026	0,0908	0,0038
1673	0,0862	0,0045	0,0321	0,0038	0,0562	0,0050	0,2273	0,0033
1674	0,0791	0,0052	0,0212	0,0057	0,0325	0,0025	0,0479	0,0076
1675	0,1062	0,0065	0,0029	0,0026	0,0379	0,0019	0,0358	0,0019
1676	0,0691	0,0040	0,0366	0,0059	0,0416	0,0031	0,0308	0,0050
1677	0,0974	0,0037	0,0000	0,0000	0,0054	0,0052	0,0008	0,0014
1678	0,0550	0,0045	0,0137	0,0033	0,0058	0,0040	0,0641	0,0059
1680	0,0516	0,0007	0,0458	0,0019	0,0183	0,0026	0,0708	0,0052
1684	0,0416	0,0050	0,0279	0,0031	0,0316	0,0031	0,0433	0,0029
1685	0,0470	0,0050	0,0000	0,0000	0,0387	0,0037	0,0250	0,0066
1686	0,0396	0,0056	0,0529	0,0026	0,0337	0,0054	0,0304	0,0040
1687	0,0462	0,0025	0,0100	0,0057	0,0595	0,0031	0,0225	0,0012

Törzsszám	CEP1		CEP2		TRP1		TRP2	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1688	0,0458	0,0038	0,0400	0,0050	0,0583	0,0059	0,0762	0,0054
0930	0,0629	0,0040	0,0296	0,0059	0,0645	0,0050	0,1357	0,0038
1689	0,0108	0,0056	0,0071	0,0056	0,0366	0,0052	0,0167	0,0019
1690	0,0362	0,0045	0,0816	0,0040	0,0600	0,0050	0,0833	0,0007
1691	0,0175	0,0043	0,0183	0,0029	0,0291	0,0038	0,0495	0,0052
1692	0,0171	0,0026	0,0325	0,0057	0,0358	0,0047	0,0412	0,0033
1693	0,0537	0,0043	0,0291	0,0038	0,0629	0,0019	0,1045	0,0058
1694	0,0179	0,0019	0,0774	0,0033	0,0487	0,0037	0,0208	0,0019
1695	0,0441	0,0047	2,0310	0,0037	0,0441	0,0044	1,2479	0,0066
1696	0,0379	0,0019	0,0108	0,0019	0,0137	0,0045	0,0092	0,0063
1697	0,0333	0,0044	0,0371	0,0161	0,0337	0,0057	0,0117	0,0019
1699	0,0558	0,0019	0,2132	0,0064	0,0641	0,0052	0,0516	0,0019
1700	0,1058	0,0062	0,0529	0,0038	0,0479	0,0026	0,0520	0,0026
1701	0,0933	0,0050	0,0371	0,0031	0,0454	0,0050	0,0375	0,0025

Törzsszám	CTP1		CTP2		CTP3		LPEP	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1600	0,0583	0,0059	0,0058	0,0044	0,0620	0,0019	0,0891	0,0038
1601	0,0579	0,0007	0,0325	0,0045	0,1536	0,0025	0,3722	0,0076
1602	0,0554	0,0062	0,0000	0,0000	0,0396	0,0044	0,1703	0,0058
1603	0,0446	0,0038	0,0433	0,0047	0,3318	0,0040	0,1116	0,0109
1604	0,0754	0,0058	0,0446	0,0031	0,8511	0,0050	0,1033	0,0106
1605	0,0550	0,0025	0,0745	0,0059	0,0204	0,0044	0,0824	0,0043
1606	0,0854	0,0038	0,0296	0,0031	0,4871	0,0012	0,0833	0,0056
1607	0,0820	0,0052	0,0354	0,0031	0,7948	0,0038	0,1049	0,0065
1609	0,0824	0,0057	0,0724	0,0045	0,0733	0,0050	0,1282	0,0050
1012	0,0983	0,0044	0,0774	0,0045	1,7533	0,0056	0,1466	0,0031
1610	0,0566	0,0050	0,0537	0,0025	0,0387	0,0045	0,0862	0,0012
1611	0,0450	0,0025	0,0300	0,0057	0,0279	0,0026	0,0866	0,0085
1612	0,0504	0,0052	0,0554	0,0052	0,0167	0,0007	0,0983	0,0038
1613	0,0529	0,0052	0,0675	0,0045	0,0708	0,0050	0,0937	0,0050
1614	0,0529	0,0007	0,0591	0,0019	0,1149	0,0037	0,1224	0,0082
1615	0,0366	0,0014	0,0495	0,0052	0,0537	0,0025	0,0654	0,0056
1158	0,0845	0,0044	0,0741	0,0038	0,0695	0,0047	0,1262	0,0070
1616	0,0416	0,0058	0,0666	0,0062	1,2354	0,0057	0,1299	0,0066
1159	0,0225	0,0033	0,0579	0,0014	0,0296	0,0019	0,0545	0,0059
0559	0,0454	0,0052	0,0142	0,0040	0,5471	0,0054	0,0787	0,0050
1617	0,0362	0,0045	0,0637	0,0025	0,1890	0,0019	0,0824	0,0070

Törzsszám	CTP1		CTP2		CTP3		LPEP	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1619	0,0291	0,0031	0,0500	0,0025	0,0146	0,0036	0,0545	0,0059
1620	0,0300	0,0057	0,0704	0,0050	0,0092	0,0047	0,0991	0,0031
1621	0,0845	0,0044	0,0587	0,0033	0,0287	0,0022	0,0200	0,0022
0931	0,0779	0,0056	0,0770	0,0040	0,0629	0,0064	0,0504	0,0007
1622	0,1003	0,0038	0,0533	0,0056	0,1149	0,0070	0,0541	0,0069
0560	0,0466	0,0047	0,1045	0,0047	0,2282	0,0031	0,0325	0,0045
1623	0,0729	0,0044	0,0716	0,0036	0,1690	0,0044	0,0687	0,0066
1624	0,0795	0,0044	0,0554	0,0052	0,1083	0,0040	0,0612	0,0050
0886	0,0995	0,0040	0,0749	0,0054	0,0745	0,0031	0,0321	0,0047
0887	0,0841	0,0044	0,0291	0,0050	0,0745	0,0019	0,0058	0,0052
1628	0,0841	0,0031	0,0429	0,0026	0,0962	0,0033	1,2753	0,0050
1629	0,0579	0,0038	0,0608	0,0026	0,2860	0,0033	0,0104	0,0062
1630	0,0687	0,0045	0,0579	0,0063	0,1232	0,0062	0,0112	0,0033
1631	0,0408	0,0052	0,0462	0,0050	0,0462	0,0082	0,1212	0,0054
1633	0,0904	0,0038	0,0433	0,0050	0,0512	0,0045	0,0945	0,0059
1635	0,0791	0,0052	0,0479	0,0056	0,0271	0,0038	0,1053	0,0026
2636	0,0654	0,0040	0,0433	0,0007	0,0396	0,0047	0,1116	0,0040
2637	0,0675	0,0057	0,0437	0,0025	0,1212	0,0070	0,0849	0,0033
1638	0,0799	0,0022	0,0745	0,0062	0,0229	0,0031	0,1191	0,0071
1639	0,0354	0,0059	0,0491	0,0044	0,0529	0,0019	0,1195	0,0059
1640	0,0949	0,0070	0,0129	0,0019	0,0325	0,0033	0,0774	0,0025
1641	0,0941	0,0044	0,0591	0,0029	0,0529	0,0026	0,0762	0,0033
1642	0,0529	0,0050	0,0516	0,0038	0,0229	0,0026	0,1108	0,0029
1643	0,0675	0,0050	0,0154	0,0044	0,0092	0,0038	0,0770	0,0071
1646	0,0829	0,0026	0,0691	0,0014	0,0033	0,0031	0,1103	0,0019
1647	0,0991	0,0031	0,0620	0,0026	0,0304	0,0040	0,1128	0,0073
1649	0,0162	0,0057	0,0416	0,0014	0,0021	0,0019	0,0837	0,0066
1650	0,1078	0,0031	0,0770	0,0052	0,0520	0,0038	0,1270	0,0026
1651	0,0495	0,0031	0,0708	0,0062	0,0000	0,0000	0,1128	0,0052
1652	0,1103	0,0052	0,0691	0,0019	0,0437	0,0070	0,1407	0,0019
1653	0,0708	0,0069	0,0171	0,0029	0,0354	0,0052	0,1103	0,0014
1655	0,0054	0,0019	0,0192	0,0044	0,0304	0,0052	0,1003	0,0062
1656	0,0928	0,0063	0,0458	0,0019	0,0670	0,0014	0,1041	0,0058
1658	0,0483	0,0044	0,0450	0,0062	0,0117	0,0038	0,1149	0,0022
1661	0,0545	0,0050	0,0258	0,0019	0,0421	0,0052	0,1128	0,0059
1663	0,0187	0,0012	0,0079	0,0031	0,2469	0,0069	0,0953	0,0038
1664	0,0687	0,0033	0,0421	0,0062	0,0679	0,0052	0,1307	0,0031
1665	0,0720	0,0050	0,0391	0,0052	0,0433	0,0052	0,1370	0,0019
1666	0,0371	0,0031	0,0379	0,0029	0,0462	0,0057	0,1187	0,0037
1667	0,0375	0,0057	0,0079	0,0047	0,0541	0,0050	0,1099	0,0054
1668	0,0675	0,0033	0,0529	0,0019	0,0429	0,0047	0,1557	0,0038

Törzsszám	CTP1		CTP2		CTP3		LPEP	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
0561	0,0446	0,0056	0,0612	0,0025	0,0308	0,0038	0,0396	0,0063
1670	0,0291	0,0029	0,0371	0,0047	0,0183	0,0168	0,0150	0,0012
1671	0,0246	0,0019	0,0033	0,0038	0,0229	0,0019	0,0233	0,0026
1672	0,0104	0,0040	0,0054	0,0044	0,0004	0,0007	0,0241	0,0031
0919	0,0037	0,0037	0,0537	0,0043	0,0271	0,0069	0,0587	0,0033
1673	0,0183	0,0007	0,0387	0,0062	0,0375	0,0022	0,0829	0,0050
1674	0,0666	0,0056	0,0100	0,0045	0,0300	0,0045	0,0421	0,0062
1675	0,0104	0,0064	0,0329	0,0014	0,0412	0,0025	0,0645	0,0063
1676	0,0604	0,0052	0,0079	0,0056	0,0179	0,0040	0,0412	0,0022
1677	0,0316	0,0031	0,0146	0,0044	0,0000	0,0000	0,0400	0,0012
1678	0,0012	0,0022	0,0071	0,0062	0,0058	0,0044	0,0462	0,0037
1680	0,0446	0,0069	0,0400	0,0025	0,0350	0,0037	0,0316	0,0064
1684	0,0087	0,0057	0,0575	0,0057	0,0241	0,0040	0,0341	0,0007
1685	0,0512	0,0043	0,0454	0,0069	0,0042	0,0019	0,0117	0,0059
1686	0,0291	0,0019	0,0371	0,0019	0,0804	0,0059	0,0429	0,0031
1687	0,0583	0,0050	0,0570	0,0052	0,0633	0,0040	0,0541	0,0031
1688	0,0221	0,0031	0,0724	0,0012	0,0620	0,0044	0,0529	0,0056
0930	0,0366	0,0019	0,0533	0,0047	0,0408	0,0069	0,0749	0,0025
1689	0,0071	0,0031	0,0458	0,0056	0,0241	0,0026	0,0421	0,0036
1690	0,0983	0,0038	0,0429	0,0050	0,0587	0,0050	0,0491	0,0014
1691	0,0483	0,0031	0,0192	0,0031	0,0008	0,0014	0,0375	0,0025
1692	0,0454	0,0050	0,0275	0,0066	0,0017	0,0029	0,0416	0,0031
1693	0,0283	0,0040	0,0391	0,0056	0,0308	0,0026	0,0654	0,0014
1694	0,0616	0,0044	0,0450	0,0022	0,2352	0,0038	0,0151	0,0027
1695	0,0162	0,0087	0,0391	0,0014	2,4982	0,0000	0,0791	0,0052
1696	0,0029	0,0050	0,0017	0,0029	0,0037	0,0037	0,0162	0,0057
1697	0,0304	0,0029	0,0346	0,0038	0,0271	0,0019	0,0250	0,0033
1699	0,0075	0,0045	0,0321	0,0052	0,5725	0,0038	0,0645	0,0026
1700	0,0820	0,0040	0,0192	0,0038	0,0408	0,0007	0,0479	0,0019
1701	0,0550	0,0045	0,0712	0,0057	0,0329	0,0062	0,0570	0,0026

Törzsszám	NAG		α GLU		β GLU		β GAL	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1600	0,4680	0,0058	0,0316	0,0026	0,1780	0,0026	0,0470	0,0470
1601	0,1978	0,0075	0,0525	0,0057	0,1103	0,0044	0,0217	0,0217
1602	0,0720	0,0062	0,0308	0,0044	0,0450	0,0057	0,0237	0,0237
1603	0,0829	0,0044	0,0042	0,0052	0,0425	0,0050	0,0175	0,0175
1604	0,0941	0,0036	0,0383	0,0038	0,0650	0,0057	0,0400	0,0400

Törzsszám	NAG		α GLU		β GLU		β GAL	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1605	0,0729	0,0059	0,0196	0,0044	0,0724	0,0050	0,0291	0,0291
1606	0,1403	0,0056	0,0475	0,0057	0,1636	0,0045	0,0404	0,0404
1607	0,2844	0,0050	0,0525	0,0012	0,1761	0,0037	0,0337	0,0337
1609	0,2748	0,0022	0,0346	0,0059	0,1341	0,0050	0,0300	0,0300
1012	0,2332	0,0038	0,0637	0,0057	0,1095	0,0050	0,0520	0,0520
1610	0,1070	0,0038	0,0458	0,0505	0,0533	0,0019	0,0229	0,0229
1611	0,1894	0,0069	0,0000	0,0000	0,0895	0,0031	0,0033	0,0033
1612	0,0446	0,0031	0,0087	0,0057	0,0446	0,0050	0,0137	0,0137
1613	0,5184	0,0025	0,0150	0,0012	0,0774	0,0012	0,0054	0,0054
1614	0,1686	0,0033	0,0275	0,0025	0,0912	0,0070	0,0058	0,0058
1615	0,1282	0,0069	0,0129	0,0019	0,0421	0,0014	0,0000	0,0000
1158	0,1270	0,0059	0,0312	0,0054	0,0724	0,0045	0,0396	0,0396
1616	0,1153	0,0050	0,0058	0,0040	0,0200	0,0045	0,0154	0,0154
1159	0,0479	0,0044	0,0000	0,0000	0,0208	0,0069	0,0004	0,0004
0559	0,2860	0,0070	0,0217	0,0038	0,0754	0,0014	0,0146	0,0146
1617	0,2049	0,0062	0,0058	0,0056	0,1378	0,0038	0,0192	0,0192
1619	0,1807	0,0019	0,0042	0,0044	0,0704	0,0059	0,0025	0,0025
1620	0,3789	0,0088	0,0000	0,0000	0,1420	0,0047	0,0000	0,0000
1621	0,0241	0,0038	0,0266	0,0056	0,0217	0,0038	0,0142	0,0142
0931	0,0645	0,0040	0,0158	0,0038	0,0670	0,0071	0,0366	0,0366
1622	0,0450	0,0043	0,0333	0,0071	0,0458	0,0076	0,0192	0,0192
0560	0,1740	0,0052	0,0129	0,0031	0,0699	0,0050	0,0142	0,0142
1623	0,1058	0,0062	0,0321	0,0059	0,0733	0,0029	0,0433	0,0433
1624	0,0675	0,0033	0,0620	0,0071	0,0379	0,0019	0,0425	0,0425
0886	0,0271	0,0056	0,0300	0,0025	0,0462	0,0066	0,0300	0,0300
0887	0,0125	0,0022	0,0017	0,0029	0,0154	0,0026	0,0029	0,0029
1628	0,0304	0,0026	0,0458	0,0064	0,0087	0,0045	0,0383	0,0383
1629	0,2340	0,0063	0,0004	0,0007	0,0604	0,0094	0,0000	0,0000
1630	0,1541	0,0059	0,0067	0,0062	0,0870	0,0044	0,0250	0,0250
1631	0,2536	0,0045	0,0008	0,0014	0,0475	0,0037	0,0033	0,0033
1633	0,1382	0,0019	0,0366	0,0052	0,0358	0,0019	0,0308	0,0308
1635	0,1578	0,0059	0,0167	0,0014	0,0591	0,0038	0,0325	0,0325
2636	0,1724	0,0050	0,0283	0,0031	0,0287	0,0037	0,0175	0,0175
2637	0,2515	0,0062	0,0183	0,0056	0,0537	0,0066	0,0229	0,0229
1638	0,4917	0,0069	0,0187	0,0057	0,0991	0,0069	0,0208	0,0208
1639	0,0666	0,0031	0,0325	0,0045	0,1141	0,0031	0,0487	0,0487
1640	0,0000	0,0000	0,0217	0,0026	0,0000	0,0000	0,0192	0,0192
1641	0,1087	0,0025	0,0321	0,0040	0,0271	0,0050	0,0470	0,0470
1642	0,0999	0,0054	0,0008	0,0014	0,0533	0,0056	0,0321	0,0321
1643	0,1116	0,0026	0,0371	0,0050	0,0733	0,0052	0,0425	0,0425
1646	0,0812	0,0022	0,0570	0,0063	0,0699	0,0025	0,0391	0,0391

Törzsszám	NAG		α GLU		β GLU		β GAL	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1647	0,0983	0,0007	0,0604	0,0026	0,0720	0,0036	0,0479	0,0479
1649	0,0570	0,0050	0,0121	0,0031	0,0508	0,0113	0,0000	0,0000
1650	0,1083	0,0063	0,0633	0,0044	0,0891	0,0075	0,0724	0,0724
1651	0,0812	0,0033	0,0150	0,0045	0,0695	0,0040	0,0167	0,0167
1652	0,7307	0,0062	0,0150	0,0062	0,0924	0,0045	0,0179	0,0179
1653	0,0554	0,0031	0,0017	0,0029	0,0217	0,0014	0,0196	0,0196
1655	0,0824	0,0033	0,0774	0,0070	0,0142	0,0031	0,0000	0,0000
1656	0,5417	0,0038	0,0754	0,0050	0,2677	0,0056	0,0421	0,0421
1658	0,0341	0,0038	0,0012	0,0022	0,0187	0,0045	0,0479	0,0479
1661	0,1220	0,0040	0,0625	0,0045	0,1024	0,0050	0,0033	0,0033
1663	0,2640	0,0038	0,0520	0,0052	0,0758	0,0026	0,0212	0,0212
1664	0,3443	0,0040	0,0608	0,0026	0,0983	0,0047	0,0266	0,0266
1665	0,2298	0,0057	0,0167	0,0050	0,0633	0,0026	0,0350	0,0350
1666	0,1486	0,0070	0,0000	0,0000	0,0321	0,0047	0,0212	0,0212
1667	0,0904	0,0019	0,0379	0,0031	0,0379	0,0019	0,0121	0,0121
1668	0,1474	0,0050	0,0017	0,0019	0,0595	0,0044	0,0146	0,0146
0561	0,0550	0,0076	0,0092	0,0059	0,0454	0,0069	0,0487	0,0487
1670	0,0341	0,0056	0,0221	0,0062	0,0196	0,0044	0,0062	0,0062
1671	0,0512	0,0057	0,0021	0,0036	0,0075	0,0045	0,0000	0,0000
1672	0,0087	0,0054	0,0050	0,0050	0,0000	0,0000	0,0029	0,0029
0919	0,0695	0,0062	0,0079	0,0056	0,0229	0,0038	0,0212	0,0212
1673	0,1578	0,0038	0,0050	0,0045	0,0550	0,0043	0,0000	0,0000
1674	0,0192	0,0044	0,0062	0,0057	0,0154	0,0031	0,0154	0,0154
1675	0,0087	0,0025	0,0258	0,0031	0,0416	0,0052	0,0154	0,0154
1676	0,1187	0,0033	0,0254	0,0026	0,0337	0,0043	0,0075	0,0075
1677	0,0071	0,0050	0,0000	0,0000	0,0033	0,0031	0,0000	0,0000
1678	0,1657	0,0059	0,0158	0,0038	0,0100	0,0025	0,0075	0,0075
1680	0,0795	0,0047	0,0291	0,0019	0,0075	0,0045	0,0379	0,0379
1684	0,0321	0,0031	0,0158	0,0026	0,0187	0,0037	0,0225	0,0225
1685	0,0158	0,0062	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1686	0,0466	0,0059	0,0404	0,0040	0,0012	0,0012	0,0233	0,0233
1687	0,0358	0,0038	0,0092	0,0040	0,0167	0,0076	0,0158	0,0158
1688	0,1978	0,0071	0,0296	0,0026	0,0516	0,0126	0,0400	0,0400
0930	0,0783	0,0056	0,0446	0,0029	0,0200	0,0022	0,0504	0,0504
1689	0,0187	0,0012	0,0204	0,0063	0,0087	0,0054	0,0212	0,0212
1690	0,1378	0,0047	0,0670	0,0044	0,0654	0,0038	0,0358	0,0358
1691	0,0291	0,0019	0,0033	0,0014	0,0054	0,0040	0,0017	0,0017
1692	0,0354	0,0044	0,0008	0,0014	0,0183	0,0038	0,0021	0,0021
1693	0,0458	0,0063	0,0104	0,0019	0,0475	0,0050	0,0004	0,0004
1694	0,0654	0,0056	0,0058	0,0056	0,0350	0,0062	0,0071	0,0071
1695	0,2802	0,0036	0,0383	0,0056	0,0366	0,0031	0,0042	0,0042

Törzsszám	NAG		α GLU		β GLU		β GAL	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1696	0,0346	0,0044	0,0008	0,0014	0,0287	0,0054	0,0000	0,0000
1697	0,0017	0,0019	0,0012	0,0022	0,0029	0,0026	0,0050	0,0050
1699	0,0321	0,0040	0,0017	0,0019	0,0346	0,0040	0,0258	0,0258
1700	0,0591	0,0059	0,0254	0,0031	0,0362	0,0025	0,0408	0,0408
1701	0,0475	0,0043	0,0154	0,0026	0,0533	0,0038	0,0042	0,0042

Törzsszám	bXYL		CBH	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1600	0,2669	0,0031	0,0379	0,0031
1601	0,3402	0,0040	0,0133	0,0036
1602	0,0650	0,0045	0,0087	0,0045
1603	0,0308	0,0040	0,0121	0,0019
1604	0,0537	0,0022	0,0508	0,0014
1605	0,0358	0,0062	0,0042	0,0044
1606	0,0575	0,0033	0,0062	0,0057
1607	0,2515	0,0044	0,0221	0,0038
1609	0,0833	0,0050	0,0221	0,0040
1012	0,0616	0,0029	0,0321	0,0056
1610	0,0225	0,0012	0,0033	0,0007
1611	0,0212	0,0025	0,0025	0,0043
1612	0,0175	0,0037	0,0029	0,0040
1613	0,0217	0,0052	0,0100	0,0025
1614	0,0233	0,0038	0,0046	0,0040
1615	0,0029	0,0050	0,0000	0,0000
1158	0,0433	0,0026	0,0400	0,0050
1616	0,0000	0,0000	0,0062	0,0050
1159	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0559	0,1133	0,0050	0,0079	0,0056
1617	0,1103	0,0040	0,0042	0,0044
1619	0,0017	0,0029	0,0025	0,0025
1620	0,0087	0,0037	0,0154	0,0047
1621	0,0146	0,0059	0,0062	0,0054
0931	0,0400	0,0033	0,0437	0,0025
1622	0,0316	0,0050	0,0237	0,0022
0560	0,0079	0,0047	0,0025	0,0043
1623	0,0662	0,0054	0,0258	0,0036
1624	0,0437	0,0037	0,0562	0,0037
0886	0,0229	0,0007	0,0125	0,0057
0887	0,0012	0,0022	0,0012	0,0022

Törzsszám	bXYL		CBH	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1628	0,0341	0,0040	0,0037	0,0037
1629	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1630	0,0200	0,0000	0,0000	0,0000
1631	0,0212	0,0012	0,0179	0,0050
1633	0,0516	0,0007	0,0429	0,0038
1635	0,0279	0,0026	0,0068	0,0048
2636	0,0699	0,0033	0,0321	0,0038
2637	0,0275	0,0062	0,0004	0,0007
1638	0,0475	0,0022	0,0087	0,0045
1639	0,0283	0,0059	0,0071	0,0062
1640	0,0570	0,0038	0,0221	0,0040
1641	0,3339	0,0056	0,0192	0,0052
1642	0,0616	0,0031	0,0104	0,0069
1643	0,0321	0,0058	0,0179	0,0044
1646	0,0562	0,0050	0,0192	0,0044
1647	0,0987	0,0025	0,0158	0,0036
1649	0,0046	0,0050	0,0000	0,0000
1650	0,1058	0,0026	0,0629	0,0038
1651	0,0371	0,0044	0,0208	0,0056
1652	0,0595	0,0056	0,0458	0,0031
1653	0,0275	0,0025	0,0075	0,0057
1655	0,0000	0,0000	0,0112	0,0082
1656	0,1182	0,0038	0,0337	0,0057
1658	0,0067	0,0059	0,0308	0,0040
1661	0,0000	0,0000	0,0025	0,0033
1663	0,0446	0,0056	0,0321	0,0040
1664	0,0766	0,0047	0,0421	0,0038
1665	0,0154	0,0019	0,0083	0,0050
1666	0,0675	0,0050	0,0183	0,0059
1667	0,0308	0,0047	0,0021	0,0019
1668	0,0391	0,0031	0,0042	0,0052
0561	0,0454	0,0026	0,0008	0,0007
1670	0,0266	0,0029	0,0192	0,0269
1671	0,0021	0,0036	0,0000	0,0000
1672	0,0092	0,0069	0,0046	0,0079
0919	0,0075	0,0045	0,0225	0,0045
1673	0,0000	0,0000	0,0017	0,0029
1674	0,0237	0,0057	0,0254	0,0038
1675	0,0529	0,0038	0,0312	0,0050
1676	0,0375	0,0025	0,0054	0,0050
1677	0,0196	0,0026	0,0000	0,0000

Törzsszám	bXYL		CBH	
	<i>Aktivitás (U)</i>	<i>Szórás</i>	<i>Aktivitás (U)</i>	<i>Szórás</i>
1678	0,0316	0,0052	0,0021	0,0036
1680	0,0337	0,0022	0,0512	0,0033
1684	0,0042	0,0019	0,0254	0,0007
1685	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1686	0,0125	0,0054	0,0033	0,0038
1687	0,0025	0,0043	0,0012	0,0022
1688	0,0362	0,0045	0,0229	0,0063
0930	0,0408	0,0019	0,0192	0,0062
1689	0,0196	0,0052	0,0025	0,0043
1690	0,1453	0,0019	0,0408	0,0019
1691	0,0079	0,0047	0,0000	0,0000
1692	0,0200	0,0045	0,0033	0,0038
1693	0,0154	0,0064	0,0012	0,0022
1694	0,0408	0,0038	0,0171	0,0019
1695	0,0371	0,0026	0,0142	0,0056
1696	0,0079	0,0019	0,0000	0,0000
1697	0,0483	0,0050	0,0266	0,0026
1699	0,0412	0,0025	0,0354	0,0063
1700	0,0366	0,0040	0,0054	0,0050
1701	0,0600	0,0033	0,0391	0,0047

6. melléklet. A téli búza rizoszférájából izolált törzsek mért extracelluláris enzimeinek aktivitása élesztőkivonatos tápoldatban.

Törzsszám	CEP1		CEP2		TRP1		TRP2	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1600	0,0729	0,0031	0,2956	0,0665	0,1062	0,0033	0,8889	0,0019
1601	0,0516	0,0038	0,0928	0,0044	0,1058	0,0019	0,5471	0,0070
1602	0,0716	0,0052	0,0283	0,0038	0,1078	0,0062	0,6275	0,0050
1603	0,0537	0,0033	0,0429	0,0058	0,0783	0,0047	0,1936	0,0070
1604	0,0529	0,0063	0,0362	0,0057	0,0600	0,0057	0,0829	0,0014
1605	0,0396	0,0040	0,0004	0,0007	0,0446	0,0044	0,0604	0,0014
1606	0,0849	0,0037	0,0421	0,0026	0,0616	0,0052	0,7332	0,0045
1607	0,0208	0,0031	0,0854	0,0029	0,0616	0,0026	1,4756	0,0052
1609	0,0221	0,0038	0,0629	0,0052	0,0733	0,0040	0,7799	0,0050
1012	0,1241	0,0038	0,0000	0,0000	0,1182	0,0038	0,1253	0,0044
1610	0,0525	0,0012	0,0566	0,0050	0,0675	0,0045	1,1300	0,0031
1611	0,0000	0,0000	0,0666	0,0031	0,0949	0,0033	1,9111	0,0025
1612	0,0928	0,0038	0,0192	0,0038	0,0662	0,0045	0,3481	0,0031
1613	0,0745	0,0040	0,0283	0,0062	0,0841	0,0031	0,5509	0,0062
1614	0,0000	0,0000	0,0945	0,0062	0,1682	0,0031	2,1093	0,0071
1615	0,0662	0,0025	0,0908	0,0056	0,1503	0,0026	1,8753	0,0052
1158	0,2323	0,0012	0,0600	0,0070	0,1524	0,0012	0,1262	0,0050
1616	0,0766	0,0062	0,0000	0,0000	0,0533	0,0038	0,0795	0,0069
1159	0,0812	0,0050	0,6616	0,0050	0,0483	0,0040	0,2377	0,0036
0559	0,0937	0,0062	0,3818	0,0050	0,0666	0,0014	1,5277	0,0054
1617	0,0629	0,0038	0,2032	0,0058	0,0749	0,0033	1,0601	0,0031
1619	0,1441	0,0047	0,0429	0,0044	0,0516	0,0031	0,3901	0,0062
1620	0,0924	0,0022	0,0204	0,0059	0,0412	0,0033	0,2327	0,0050
1621	0,1182	0,0038	0,0550	0,0057	0,0995	0,0026	0,2815	0,0026
0931	0,0841	0,0019	0,0042	0,0038	0,0841	0,0047	0,1903	0,0026
1622	0,2165	0,0044	2,4016	0,0071	0,1486	0,0065	2,0027	0,0056
0560	0,1491	0,0040	2,1272	0,0033	0,1728	0,0052	2,1951	0,0040
1623	0,1224	0,0054	2,4982	0,0000	0,7353	0,0059	2,4961	0,0007
1624	0,0795	0,0019	0,1203	0,0047	0,0770	0,0062	0,0225	0,0050
0886	0,1282	0,0019	0,9393	0,0066	0,0350	0,0045	0,2844	0,0031
0887	0,0808	0,0038	0,6150	0,0063	0,0483	0,0040	0,2486	0,0045
1628	0,0675	0,0037	0,0154	0,0019	0,0187	0,0033	0,1391	0,0040
1629	0,0208	0,0038	0,0437	0,0037	0,1478	0,0052	0,9106	0,0050
1630	0,0724	0,0057	0,0000	0,0000	0,0387	0,0025	0,2740	0,0044
1631	0,0629	0,0026	0,0525	0,0062	0,1033	0,0029	0,7128	0,0019
1633	0,0450	0,0033	0,7203	0,0026	0,1674	0,0054	2,0031	0,0026
1635	0,0337	0,0043	0,0133	0,0056	0,0408	0,0038	0,0187	0,0037

Törzsszám	CEP1		CEP2		TRP1		TRP2	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
2636	0,0475	0,0057	0,0100	0,0078	0,0454	0,0014	0,0654	0,0026
2637	0,0666	0,0069	0,0953	0,0050	0,0737	0,0054	0,8781	0,0070
1638	0,0966	0,0047	0,0450	0,0045	0,1474	0,0062	0,2669	0,0052
1639	0,0691	0,0019	0,0100	0,0033	0,1099	0,0022	1,4519	0,0052
1640	0,0645	0,0047	0,0271	0,0056	0,1320	0,0044	0,1203	0,0036
1641	0,0670	0,0062	0,0408	0,0071	0,0079	0,0047	0,3206	0,0029
1642	0,0662	0,0045	0,6208	0,0057	0,1611	0,0037	1,6517	0,0052
1643	0,0849	0,0045	0,5275	0,0056	0,1262	0,0045	0,8644	0,0045
1646	0,0562	0,0043	0,0042	0,0044	0,0683	0,0014	0,0279	0,0038
1647	0,1128	0,0044	2,4982	0,0000	0,2502	0,0031	2,4824	0,0050
1649	0,0321	0,0040	0,0000	0,0000	0,0554	0,0019	0,1078	0,0014
1650	0,0583	0,0050	0,0000	0,0000	0,0321	0,0044	0,0662	0,0054
1651	0,2036	0,0043	0,0233	0,0047	0,0316	0,0038	0,2581	0,0052
1652	0,1070	0,0038	0,0262	0,0078	0,0491	0,0038	0,1478	0,0044
1653	0,0650	0,0057	0,0695	0,0029	0,0262	0,0045	0,0654	0,0038
1655	0,0791	0,0019	0,0341	0,0038	0,1436	0,0033	0,5850	0,0029
1656	0,0404	0,0059	0,0558	0,0044	0,0724	0,0012	0,1316	0,0026
1658	0,0658	0,0044	1,6093	0,0050	0,0729	0,0050	0,4980	0,0075
1661	0,0287	0,0057	0,0804	0,0038	0,0962	0,0066	1,5372	0,0026
1663	0,0670	0,0036	0,0704	0,0038	0,0645	0,0038	0,2053	0,0040
1664	0,0308	0,0056	0,0154	0,0038	0,1174	0,0045	0,2919	0,0031
1665	0,0516	0,0019	0,0337	0,0033	0,0625	0,0045	0,1869	0,0080
1666	0,0699	0,0037	0,0000	0,0000	0,0487	0,0057	0,6549	0,0038
1667	0,0608	0,0026	0,0928	0,0056	0,0683	0,0038	0,6091	0,0036
1668	0,0675	0,0119	0,0579	0,0031	0,0854	0,0044	0,2840	0,0050
0561	0,0916	0,0038	0,1153	0,0019	0,1453	0,0014	0,0953	0,0059
1670	0,1237	0,0033	0,0321	0,0031	0,1445	0,0026	0,1220	0,0044
1671	0,0895	0,0019	0,0508	0,0038	0,1611	0,0033	0,2311	0,0070
1672	0,0841	0,0031	0,0337	0,0025	0,1520	0,0040	0,1786	0,0057
0919	0,0899	0,0045	0,5196	0,0054	0,1195	0,0036	1,3773	0,0044
1673	0,0641	0,0104	0,2515	0,0050	0,1212	0,0037	1,4918	0,0031
1674	0,0475	0,0043	0,3056	0,0056	0,0770	0,0062	0,9239	0,0031
1675	0,0608	0,0320	0,1166	0,0047	0,0558	0,0050	0,0612	0,0012
1676	0,0716	0,0031	0,0766	0,0036	0,0691	0,0026	0,3793	0,0062
1677	0,0737	0,0082	0,3031	0,0007	0,1058	0,0026	1,3873	0,0052
1678	0,0554	0,0255	0,0017	0,0029	0,0733	0,0059	2,1943	0,0056
1680	0,0679	0,0175	0,3277	0,0047	0,0791	0,0059	1,4431	0,0038
1684	0,1936	0,0218	0,0037	0,0037	0,2344	0,0050	0,3381	0,0052
1685	0,0666	0,0163	0,0387	0,0045	0,0666	0,0038	0,1407	0,0050
1686	0,0604	0,0019	0,0171	0,0050	0,0641	0,0050	0,2219	0,0052
1687	0,0895	0,0026	0,0400	0,0037	0,1062	0,0025	0,9943	0,0033

Törzsszám	CEP1		CEP2		TRP1		TRP2	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1688	0,0604	0,0090	0,0387	0,0043	0,0595	0,0036	0,6083	0,0037
0930	0,0712	0,0094	0,0354	0,0007	0,0833	0,0052	0,2844	0,0052
1689	0,0953	0,0076	0,2282	0,0069	0,0695	0,0040	1,7837	0,0054
1690	0,1062	0,0062	0,1270	0,0040	0,1424	0,0054	2,0377	0,0040
1691	0,0537	0,0065	0,0679	0,0038	0,1012	0,0022	0,1424	0,0012
1692	0,1045	0,0100	0,1199	0,0022	0,1670	0,0014	0,3885	0,0045
1693	0,0462	0,0181	0,0541	0,0038	0,0475	0,0012	0,1062	0,0045
1694	0,0887	0,0206	0,0012	0,0022	0,1861	0,0054	0,2365	0,0062
1695	0,0854	0,0052	0,0533	0,0056	0,2019	0,0026	0,1411	0,0050
1696	0,0412	0,0078	0,0666	0,0063	0,0666	0,0026	0,1903	0,0056
1697	0,0737	0,0045	0,0616	0,0044	0,1257	0,0019	0,2323	0,0066
1699	0,0483	0,0038	0,0495	0,0029	0,1478	0,0052	0,3856	0,0059
1700	0,1053	0,0036	0,1357	0,0056	0,1411	0,0043	0,2844	0,0052
1701	0,0408	0,0069	0,0570	0,0019	0,1370	0,0044	0,0704	0,0019

Törzsszám	CTP1		CTP2		CTP3		LPEP	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1600	0,1845	0,0069	0,1262	0,0050	0,1116	0,0056	0,1033	0,0056
1601	0,0749	0,0045	0,0341	0,0050	0,0787	0,0066	0,0529	0,0044
1602	0,0891	0,0019	0,0891	0,0026	0,0629	0,0058	0,0845	0,0052
1603	0,0391	0,0040	0,0441	0,0014	0,0366	0,0038	0,0537	0,0062
1604	0,0366	0,0014	0,0654	0,0007	0,0296	0,0026	0,0162	0,0037
1605	0,0254	0,0044	0,0283	0,0029	0,0196	0,0026	0,0396	0,0007
1606	0,0462	0,0062	0,1074	0,0025	0,1024	0,0057	0,1424	0,0012
1607	0,0708	0,0058	0,0004	0,0007	0,0666	0,0026	0,0512	0,0050
1609	0,0612	0,0022	0,0341	0,0026	0,0533	0,0050	0,0144	0,0108
1012	0,0000	0,0000	0,0333	0,0040	0,1636	0,0012	0,0949	0,0043
1610	0,1170	0,0069	0,0108	0,0050	0,0791	0,0019	0,0500	0,0012
1611	0,0841	0,0056	0,0012	0,0022	0,0654	0,0026	0,0404	0,0062
1612	0,0250	0,0025	0,1282	0,0050	0,0300	0,0037	0,1295	0,0064
1613	0,0504	0,0031	0,0758	0,0019	0,0054	0,0047	0,0654	0,0059
1614	0,0824	0,0045	0,0000	0,0000	0,0733	0,0071	0,0454	0,0038
1615	0,0433	0,0007	0,0583	0,0019	0,0816	0,0056	0,0495	0,0031
1158	0,0287	0,0022	0,2078	0,0026	0,0366	0,0047	0,0974	0,0012
1616	0,0000	0,0000	0,0841	0,0019	0,0733	0,0059	0,0658	0,0007
1159	0,0341	0,0056	0,0633	0,0026	0,5983	0,0045	0,0446	0,0031
0559	0,0520	0,0050	0,1128	0,0007	0,3606	0,0044	0,0633	0,0047
1617	0,0408	0,0038	0,0429	0,0050	0,1566	0,0038	0,0670	0,0059

Törzsszám	CTP1		CTP2		CTP3		LPEP	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1619	0,0570	0,0056	0,0629	0,0052	0,0770	0,0031	0,0600	0,0033
1620	0,0241	0,0007	0,0633	0,0019	0,0379	0,0044	0,0250	0,0054
1621	0,0362	0,0062	0,0600	0,0057	0,0308	0,0047	0,0712	0,0012
0931	0,0167	0,0047	0,0408	0,0073	0,0037	0,0033	0,0720	0,0038
1622	0,0966	0,0059	0,2307	0,0019	2,1938	0,0056	0,0770	0,0040
0560	0,1903	0,0050	0,3910	0,5160	1,9844	0,0026	0,0658	0,0052
1623	0,1757	0,0026	0,0533	0,0038	2,4982	0,0000	0,0928	0,0019
1624	0,1695	0,0019	0,0437	0,0033	0,0766	0,0056	0,0158	0,0038
0886	0,0924	0,0022	0,0749	0,0022	0,8989	0,0036	0,0487	0,0033
0887	0,0737	0,0045	0,0408	0,0014	0,5771	0,0057	0,0566	0,0040
1628	0,0470	0,0052	0,0533	0,0044	0,0716	0,0056	0,0129	0,0059
1629	0,0412	0,0033	0,0791	0,0036	0,0450	0,0065	0,4184	0,0033
1630	0,0533	0,0050	0,0724	0,0045	0,0000	0,0000	0,0254	0,0019
1631	0,0470	0,0044	0,0296	0,0036	0,0762	0,0045	0,0666	0,0019
1633	0,0724	0,0050	0,0437	0,0022	0,5267	0,0044	0,0895	0,0071
1635	0,0408	0,0038	0,0183	0,0047	0,0012	0,0012	0,0346	0,0052
2636	0,0408	0,0019	0,0633	0,0026	0,0087	0,0054	0,0554	0,0026
2637	0,0421	0,0040	0,0541	0,0031	0,1407	0,0072	0,0808	0,0026
1638	0,0275	0,0022	0,0879	0,0056	0,0533	0,0047	0,1411	0,0033
1639	0,0691	0,0036	0,0641	0,0050	0,0620	0,0052	0,0941	0,0040
1640	0,0604	0,0050	0,0425	0,0000	0,0516	0,0019	0,1070	0,0059
1641	0,0437	0,0033	0,0450	0,0050	0,0879	0,0031	0,0246	0,0019
1642	0,0741	0,0050	0,1757	0,0047	0,5221	0,0062	0,0880	0,0654
1643	0,0000	0,0000	0,0650	0,0050	0,4114	0,0059	0,1382	0,0050
1646	0,0004	0,0007	0,0974	0,0057	0,0000	0,0000	0,0566	0,0073
1647	0,0658	0,0056	0,1287	0,0012	2,4982	0,0000	0,1961	0,0057
1649	0,0000	0,0000	0,0287	0,0012	0,0483	0,0038	0,0558	0,0031
1650	0,0000	0,0000	0,0346	0,0050	0,0000	0,0000	0,0042	0,0052
1651	0,0354	0,0031	0,1957	0,0050	0,0579	0,0063	0,0583	0,0069
1652	0,0600	0,0025	0,0812	0,0033	0,0158	0,0047	0,0874	0,0037
1653	0,0683	0,0036	0,0429	0,0029	0,0845	0,0052	0,0300	0,0050
1655	0,1137	0,0057	0,0799	0,0012	0,0204	0,0040	0,0824	0,0045
1656	0,0833	0,0059	0,0475	0,0033	0,0616	0,0047	0,0774	0,0025
1658	0,0662	0,0037	0,0824	0,0057	1,9727	0,0040	0,0233	0,0038
1661	0,1033	0,0031	0,0250	0,0045	0,0745	0,0036	0,0312	0,0054
1663	0,0658	0,0019	0,0991	0,0019	0,0749	0,0045	0,0620	0,0038
1664	0,0169	0,0062	0,0683	0,0019	0,0883	0,0038	0,0937	0,0033
1665	0,0733	0,0052	0,0479	0,0014	0,0558	0,0056	0,0520	0,0056
1666	0,0075	0,0037	0,0545	0,0050	0,0000	0,0000	0,0291	0,0019
1667	0,0904	0,0063	0,0504	0,0026	0,0837	0,0033	0,0670	0,0044
1668	0,0504	0,0038	0,0841	0,0026	0,0229	0,0019	0,0662	0,0057

Törzsszám	CTP1		CTP2		CTP3		LPEP	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
0561	0,1133	0,0064	0,0945	0,0052	0,1128	0,0050	0,0829	0,0059
1670	0,0625	0,0045	0,0633	0,0026	0,0117	0,0050	0,0849	0,0033
1671	0,0741	0,0040	0,0504	0,0059	0,0437	0,0054	0,0816	0,0050
1672	0,0000	0,0000	0,0316	0,0485	0,0604	0,0050	0,0512	0,0050
0919	0,0879	0,0026	0,0841	0,0050	0,5559	0,0062	0,1303	0,0071
1673	0,1199	0,0070	0,0608	0,0058	0,3243	0,0052	0,0699	0,0022
1674	0,0633	0,0038	0,0333	0,0019	0,3373	0,0062	0,0766	0,0019
1675	0,1491	0,0040	0,0117	0,0040	0,1216	0,0058	0,0541	0,0056
1676	0,0699	0,0050	0,0371	0,0026	0,0566	0,0056	0,0587	0,0012
1677	0,1141	0,0056	0,0329	0,0019	0,2952	0,0058	0,0687	0,0057
1678	0,0458	0,0044	0,0175	0,0025	0,0321	0,0014	0,0142	0,0038
1680	0,0916	0,0031	0,0271	0,0050	0,3289	0,0038	0,0337	0,0025
1684	0,0558	0,0056	0,1603	0,0044	0,0008	0,0014	0,1757	0,0031
1685	0,0670	0,0064	0,0433	0,0044	0,0283	0,0069	0,0462	0,0022
1686	0,0396	0,0019	0,0421	0,0026	0,0271	0,0014	0,0699	0,0057
1687	0,0470	0,0038	0,0217	0,0026	0,0196	0,0026	0,0558	0,0038
1688	0,0879	0,0019	0,0637	0,0057	0,1141	0,0036	0,1840	0,0050
0930	0,1187	0,0022	0,0296	0,0047	0,0341	0,0052	0,0412	0,0025
1689	0,1049	0,0043	0,0296	0,0014	0,2153	0,0036	0,0579	0,0038
1690	0,0708	0,0050	0,0512	0,0033	0,1632	0,0029	0,0983	0,0062
1691	0,0787	0,0043	0,0379	0,0058	0,1632	0,0050	0,0529	0,0007
1692	0,1191	0,0026	0,1207	0,0026	0,1403	0,0047	0,0758	0,0056
1693	0,0983	0,0026	0,0308	0,0031	0,0733	0,0056	0,0379	0,0031
1694	0,0287	0,0062	0,0620	0,0069	0,0675	0,0054	0,0874	0,0045
1695	0,1170	0,0069	0,0633	0,0052	0,0608	0,0050	0,1095	0,0063
1696	0,0766	0,0044	0,0412	0,0012	0,0799	0,0057	0,0371	0,0038
1697	0,1270	0,0050	0,0525	0,0045	0,0675	0,0037	0,0699	0,0045
1699	0,0829	0,0081	0,0075	0,0025	0,1162	0,0033	0,0475	0,0057
1700	0,1757	0,0080	0,0383	0,0019	0,1445	0,0050	0,0662	0,0043
1701	0,1207	0,0038	0,0029	0,0026	0,0241	0,0038	0,0404	0,0052

Törzsszám	NAG		α GLU		β GLU		β GAL	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1600	0,0633	0,0064	0,1237	0,0054	0,0512	0,0070	0,1253	0,0026
1601	0,0595	0,0050	0,0279	0,0031	0,0266	0,0026	0,0200	0,0062
1602	0,0795	0,0050	0,0429	0,0038	0,0512	0,0045	0,0279	0,0026
1603	0,0699	0,0033	0,0321	0,0050	0,0304	0,0007	0,0225	0,0043
1604	0,0308	0,0026	0,0000	0,0000	0,0062	0,0054	0,0017	0,0029

Törzsszám	NAG		α GLU		β GLU		β GAL	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1605	0,0421	0,0047	0,0000	0,0000	0,0087	0,0066	0,0012	0,0022
1606	0,0237	0,0054	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1607	0,0096	0,0036	0,0308	0,0031	0,0008	0,0014	0,0416	0,0019
1609	0,0029	0,0031	0,0350	0,0057	0,0000	0,0000	0,0208	0,0026
1012	0,1924	0,0033	0,0000	0,0000	0,0146	0,0047	0,0000	0,0000
1610	0,0937	0,0043	0,0620	0,0044	0,0158	0,0031	0,0612	0,0033
1611	0,0570	0,0052	0,0446	0,0044	0,0346	0,0038	0,0441	0,0059
1612	0,0454	0,0007	0,0008	0,0014	0,0346	0,0026	0,0000	0,0000
1613	0,0987	0,0037	0,0346	0,0059	0,0346	0,0019	0,0200	0,0037
1614	0,1062	0,0012	0,0391	0,0059	0,0408	0,0040	0,0558	0,0056
1615	0,0508	0,0059	0,0121	0,0044	0,0466	0,0031	0,0175	0,0050
1158	0,3131	0,0038	0,0050	0,0045	0,0000	0,0000	0,0012	0,0012
1616	0,0704	0,0031	0,0000	0,0000	0,0192	0,0044	0,0000	0,0000
1159	0,1166	0,0059	0,0000	0,0000	0,0225	0,0057	0,0000	0,0000
0559	0,0604	0,0056	0,0262	0,0045	0,0258	0,0007	0,0083	0,0038
1617	0,0554	0,0019	0,0283	0,0038	0,0333	0,0044	0,0366	0,0007
1619	0,0329	0,0026	0,0425	0,0022	0,0241	0,0026	0,0387	0,0057
1620	0,0308	0,0014	0,0291	0,0071	0,0171	0,0044	0,0096	0,0056
1621	0,0729	0,0026	0,0104	0,0026	0,0683	0,0038	0,0029	0,0014
0931	0,1074	0,0012	0,0221	0,0038	0,0354	0,0044	0,0217	0,0040
1622	0,1207	0,0029	0,0558	0,0044	0,0779	0,0050	0,0733	0,0044
0560	0,0562	0,0057	0,1312	0,0054	0,0446	0,0019	0,1170	0,0031
1623	0,0958	0,0050	0,1436	0,0033	0,0504	0,0038	0,1282	0,0050
1624	0,0641	0,0050	0,1033	0,0059	0,0075	0,0045	0,1387	0,0045
0886	0,0883	0,0062	0,0154	0,0044	0,0196	0,0056	0,0142	0,0040
0887	0,1070	0,0031	0,0125	0,0025	0,0187	0,0037	0,0662	0,0050
1628	0,0112	0,0033	0,0150	0,0025	0,0079	0,0014	0,0046	0,0059
1629	0,0970	0,0058	0,0591	0,0050	0,0695	0,0031	0,0429	0,0052
1630	0,0167	0,0050	0,0062	0,0012	0,0000	0,0000	0,0062	0,0057
1631	0,0741	0,0019	0,0412	0,0045	0,0550	0,0045	0,0928	0,0047
1633	0,0916	0,0026	0,0958	0,0050	0,0937	0,0057	0,0000	0,0000
1635	0,0175	0,0033	0,0300	0,0025	0,0192	0,0044	0,0167	0,0052
2636	0,0350	0,0025	0,0067	0,0056	0,0179	0,0026	0,0033	0,0031
2637	0,0591	0,0026	0,0050	0,0057	0,0325	0,0033	0,0629	0,0019
1638	0,1457	0,0038	0,0000	0,0000	0,0316	0,0044	0,0679	0,0038
1639	0,1045	0,0052	0,0416	0,0052	0,0733	0,0059	0,0412	0,0033
1640	0,0862	0,0033	0,0017	0,0029	0,0666	0,0040	0,0075	0,0050
1641	0,0175	0,0043	0,0437	0,0050	0,0017	0,0019	0,0037	0,0037
1642	0,1232	0,0047	0,0416	0,0056	0,0754	0,0044	0,0117	0,0038
1643	0,1262	0,0037	0,0000	0,0000	0,1141	0,0044	0,0000	0,0000
1646	0,0479	0,0064	0,0000	0,0000	0,0600	0,0022	0,0000	0,0000

Törzsszám	NAG		α GLU		β GLU		β GAL	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1647	0,1557	0,0040	0,0916	0,0026	0,1599	0,0025	0,0779	0,0038
1649	0,0762	0,0037	0,0000	0,0000	0,0625	0,0033	0,0000	0,0000
1650	0,0541	0,0059	0,0000	0,0000	0,0458	0,0047	0,0000	0,0000
1651	0,0304	0,0056	0,0000	0,0000	0,0262	0,0045	0,0000	0,0000
1652	0,0837	0,0057	0,0087	0,0033	0,0441	0,0059	0,0000	0,0000
1653	0,0050	0,0057	0,0008	0,0014	0,0025	0,0043	0,0283	0,0069
1655	0,0670	0,0038	0,2369	0,0038	0,0579	0,0062	0,1378	0,0031
1656	0,0637	0,0037	0,0192	0,0050	0,0774	0,0022	0,0079	0,0058
1658	0,0366	0,0044	0,0329	0,0044	0,0266	0,0014	0,0520	0,0044
1661	0,3219	0,0038	0,0699	0,0057	0,0150	0,0022	0,0387	0,0045
1663	0,0433	0,0052	0,0150	0,0025	0,0262	0,0025	0,0237	0,0033
1664	0,0953	0,0052	0,0000	0,0000	0,0849	0,0022	0,0000	0,0000
1665	0,0500	0,0025	0,0079	0,0019	0,0346	0,0026	0,0171	0,0050
1666	0,0083	0,0047	0,0000	0,0000	0,0304	0,0026	0,0000	0,0000
1667	0,1008	0,0029	0,0383	0,0026	0,0458	0,0059	0,0212	0,0054
1668	0,0529	0,0069	0,0121	0,0063	0,0233	0,0007	0,0012	0,0022
0561	0,1203	0,0038	0,1262	0,0078	0,0641	0,0031	0,0962	0,0045
1670	0,1212	0,0025	0,0558	0,0031	0,0612	0,0050	0,0466	0,0044
1671	0,0937	0,0057	0,0529	0,0044	0,0241	0,0038	0,0504	0,0014
1672	0,1765	0,0050	0,0000	0,0000	0,0466	0,0019	0,0000	0,0000
0919	0,1103	0,0056	0,0421	0,0044	0,0583	0,0040	0,0618	0,0026
1673	0,0695	0,0040	0,0741	0,0038	0,0495	0,0038	0,0858	0,0031
1674	0,0350	0,0045	0,0391	0,0052	0,0358	0,0056	0,0208	0,0031
1675	0,0595	0,0026	0,1287	0,0050	0,0308	0,0040	0,1291	0,0059
1676	0,0804	0,0031	0,0512	0,0045	0,1058	0,0050	0,0200	0,0033
1677	0,0670	0,0050	0,0749	0,0054	0,0595	0,0026	0,0387	0,0000
1678	0,0308	0,0019	0,0050	0,0054	0,0046	0,0040	0,0000	0,0000
1680	0,0529	0,0038	0,0662	0,0025	0,0133	0,0026	0,0433	0,0026
1684	0,1591	0,0026	0,0037	0,0045	0,1166	0,0044	0,0037	0,0045
1685	0,0974	0,0062	0,0375	0,0125	0,0167	0,0026	0,0325	0,0066
1686	0,0650	0,0070	0,0004	0,0007	0,0246	0,0038	0,0033	0,0058
1687	0,0795	0,0031	0,0012	0,0022	0,0337	0,0025	0,0017	0,0019
1688	0,0595	0,0063	0,0387	0,0012	0,0000	0,0000	0,0192	0,0029
0930	0,0625	0,0045	0,0358	0,0071	0,0724	0,0043	0,0125	0,0066
1689	0,0350	0,0054	0,0687	0,0050	0,0391	0,0007	0,0795	0,0056
1690	0,0920	0,0031	0,1083	0,0040	0,0458	0,0007	0,0675	0,0022
1691	0,0450	0,0033	0,0400	0,0045	0,0391	0,0040	0,0341	0,0058
1692	0,0716	0,0050	0,1074	0,0043	0,0545	0,0026	0,0966	0,0071
1693	0,0021	0,0019	0,0662	0,0050	0,0300	0,0033	0,0491	0,0059
1694	0,1124	0,0045	0,0108	0,0059	0,0458	0,0038	0,0208	0,0040
1695	0,0791	0,0007	0,0466	0,0050	0,0033	0,0047	0,0466	0,0069

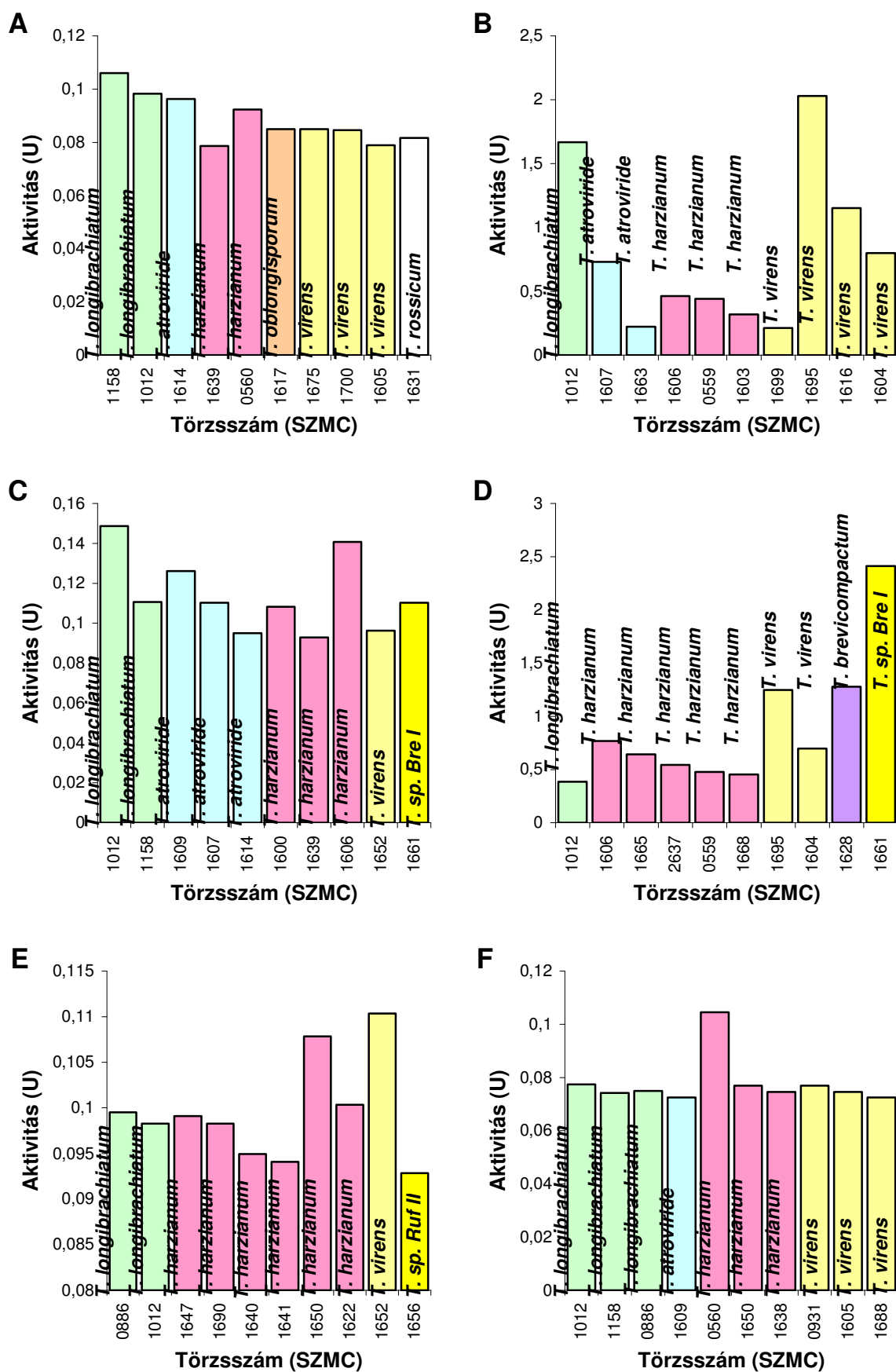
Törzsszám	NAG		α GLU		β GLU		β GAL	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1696	0,0554	0,0062	0,0458	0,0069	0,0033	0,0026	0,0383	0,0007
1697	0,1153	0,0036	0,0508	0,0019	0,0525	0,0012	0,0512	0,0025
1699	0,0479	0,0044	0,0491	0,0026	0,0033	0,0026	0,0391	0,0062
1700	0,1332	0,0031	0,1228	0,0050	0,0192	0,0052	0,1224	0,0057
1701	0,0691	0,0040	0,0895	0,0044	0,0591	0,0026	0,0854	0,0064

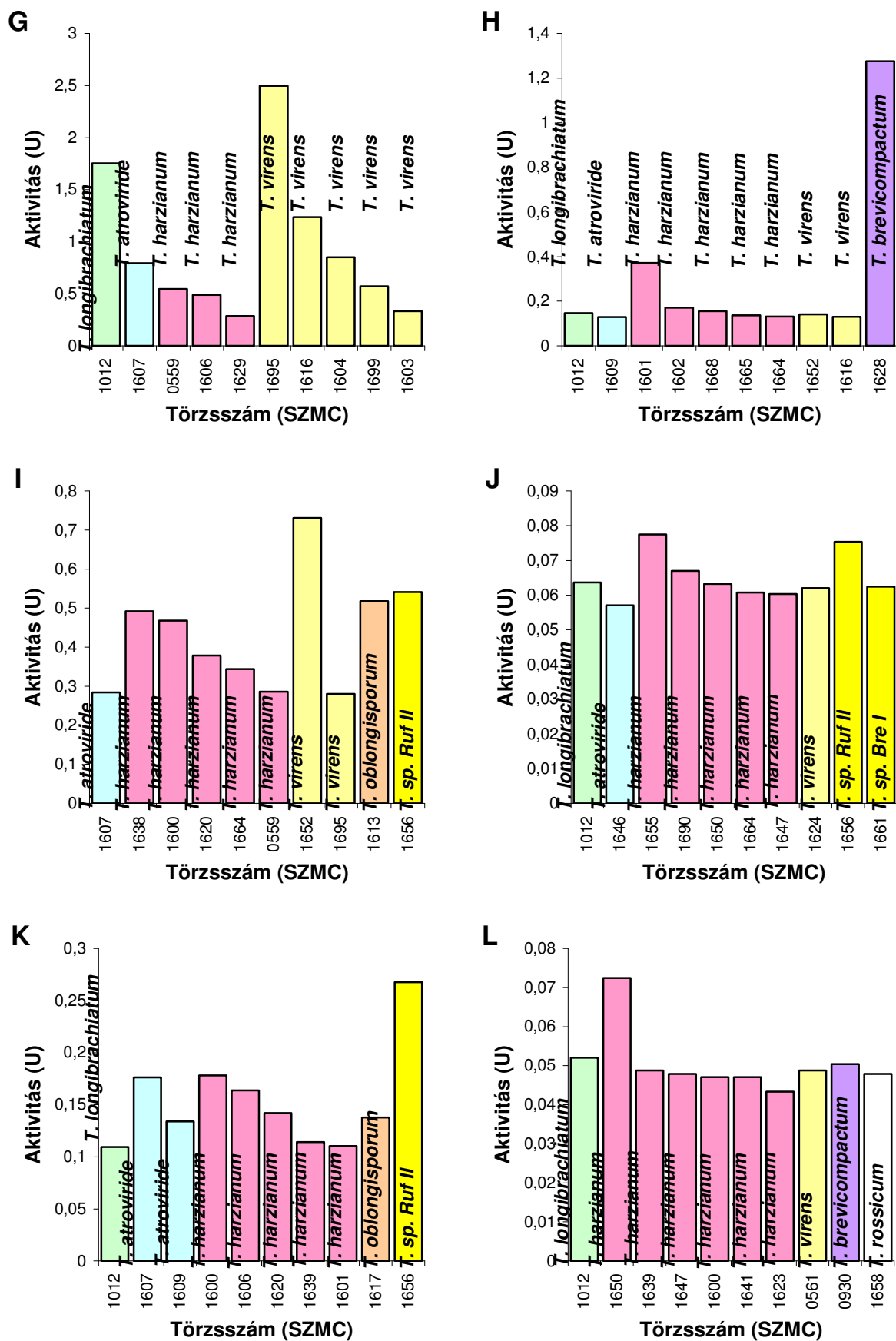
Törzsszám	β XYL		CBH	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1600	0,1049	0,0045	0,1291	0,0071
1601	0,0108	0,0038	0,0250	0,0057
1602	0,0171	0,0040	0,0179	0,0031
1603	0,0004	0,0007	0,0012	0,0022
1604	0,0033	0,0029	0,0000	0,0000
1605	0,0029	0,0050	0,0025	0,0043
1606	0,0004	0,0007	0,0000	0,0000
1607	0,0371	0,0031	0,0308	0,0026
1609	0,0346	0,0044	0,0225	0,0057
1012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1610	0,0387	0,0045	0,0558	0,0019
1611	0,0608	0,0050	0,0458	0,0050
1612	0,0042	0,0038	0,0000	0,0000
1613	0,0341	0,0038	0,0341	0,0031
1614	0,0458	0,0019	0,0579	0,0007
1615	0,0279	0,0040	0,0437	0,0022
1158	0,0000	0,0000	0,0271	0,0050
1616	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1159	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0559	0,0071	0,0040	0,0208	0,0038
1617	0,0037	0,0037	0,0458	0,0063
1619	0,0312	0,0050	0,0337	0,0057
1620	0,0021	0,0019	0,0171	0,0040
1621	0,0154	0,0050	0,0304	0,0052
0931	0,0283	0,0047	0,0042	0,0038
1622	0,0437	0,0045	0,0266	0,0026
0560	0,0945	0,0044	0,1149	0,0057
1623	0,1232	0,0058	0,1249	0,0022
1624	0,1257	0,0044	0,1366	0,0056
0886	0,0383	0,0007	0,0096	0,0056
0887	0,0350	0,0054	0,0866	0,0014

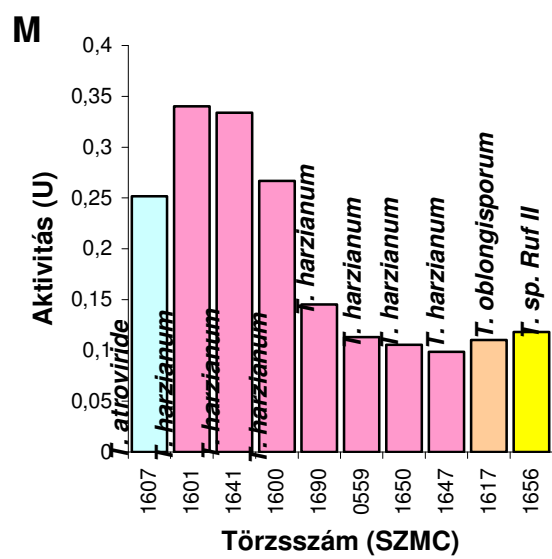
Törzsszám	β XYL		CBH	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1628	0,0329	0,0059	0,0221	0,0056
1629	0,0000	0,0000	0,0250	0,0057
1630	0,0187	0,0033	0,0000	0,0000
1631	0,0258	0,0019	0,0554	0,0038
1633	0,0296	0,0038	0,0167	0,0036
1635	0,0142	0,0050	0,0021	0,0036
2636	0,0067	0,0059	0,0050	0,0050
2637	0,0237	0,0012	0,0000	0,0000
1638	0,0129	0,0062	0,0196	0,0062
1639	0,0296	0,0026	0,0012	0,0022
1640	0,0425	0,0033	0,0125	0,0057
1641	0,0375	0,0045	0,0441	0,0056
1642	0,0208	0,0056	0,0670	0,0052
1643	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1646	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1647	0,0562	0,0045	0,0183	0,0026
1649	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1650	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1651	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1652	0,0158	0,0038	0,0000	0,0000
1653	0,0258	0,0073	0,0271	0,0019
1655	0,0675	0,0062	0,0508	0,0047
1656	0,0050	0,0054	0,0375	0,0037
1658	0,0425	0,0043	0,0483	0,0007
1661	0,0271	0,0007	0,0466	0,0050
1663	0,0037	0,0033	0,0341	0,0019
1664	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1665	0,0158	0,0050	0,0025	0,0025
1666	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1667	0,0266	0,0059	0,0541	0,0047
1668	0,0133	0,0059	0,0275	0,0057
0561	0,1370	0,0026	0,1324	0,0045
1670	0,0554	0,0038	0,0441	0,0079
1671	0,0171	0,0031	0,0437	0,0012
1672	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0919	0,0387	0,0050	0,0208	0,0059
1673	0,0570	0,0047	0,0783	0,0031
1674	0,0000	0,0000	0,0375	0,0075
1675	0,1387	0,0062	0,1158	0,0038
1676	0,0262	0,0037	0,0258	0,0050
1677	0,0724	0,0045	0,0633	0,0038

Törzsszám	β XYL		CBH	
	Aktivitás (U)	Szórás	Aktivitás (U)	Szórás
1678	0,0000	0,0000	0,0012	0,0022
1680	0,0429	0,0038	0,0150	0,0022
1684	0,0008	0,0014	0,0146	0,0069
1685	0,0321	0,0044	0,0329	0,0040
1686	0,0054	0,0050	0,0021	0,0036
1687	0,0208	0,0038	0,0325	0,0065
1688	0,0233	0,0029	0,0104	0,0031
0930	0,0575	0,0045	0,0042	0,0062
1689	0,0575	0,0045	0,0691	0,0044
1690	0,0770	0,0007	0,0858	0,0047
1691	0,0516	0,0031	0,0533	0,0031
1692	0,0912	0,0012	0,0833	0,0058
1693	0,0554	0,0056	0,0462	0,0050
1694	0,0008	0,0014	0,0000	0,0000
1695	0,0354	0,0062	0,0541	0,0071
1696	0,0391	0,0052	0,0266	0,0044
1697	0,0512	0,0045	0,0529	0,0038
1699	0,0275	0,0033	0,0366	0,0052
1700	0,1103	0,0044	0,1062	0,0043
1701	0,0953	0,0050	0,0779	0,0062

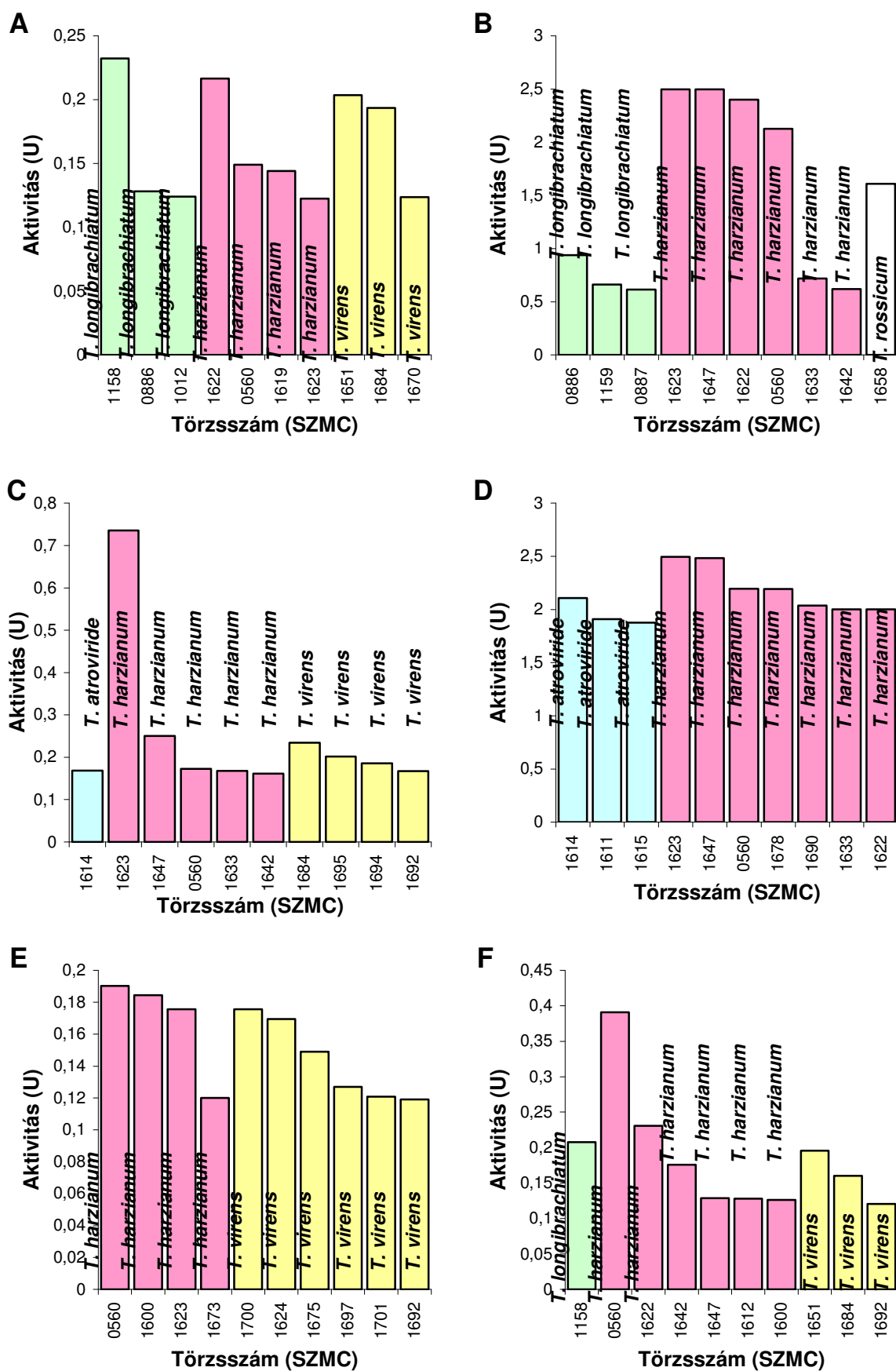
7.a. Melléklet. Az egyes enzimekhez tartozó tíz legnagyobb enzimaktivitást mutató izolátum minimál tápközegben.

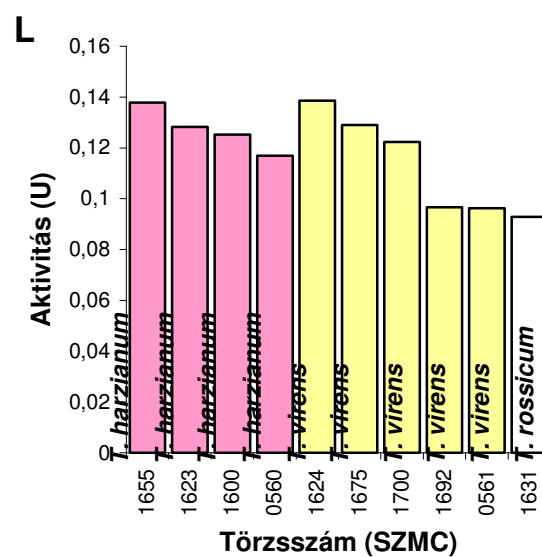
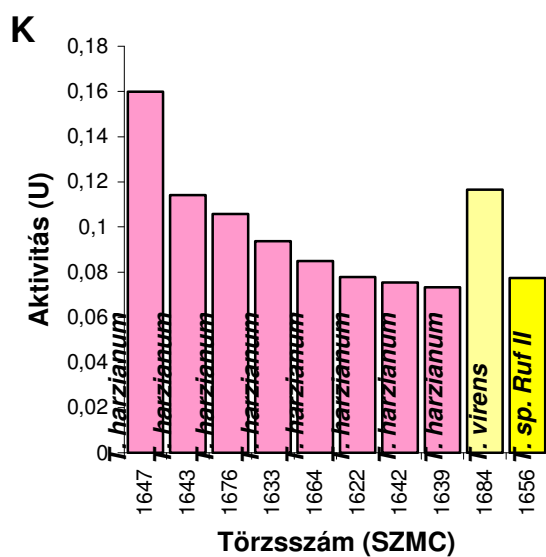
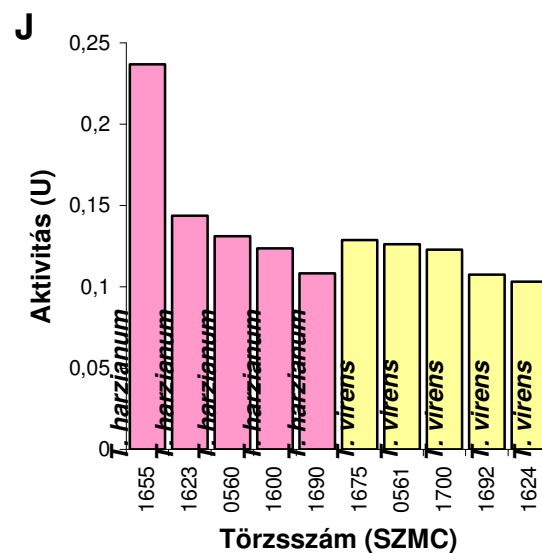
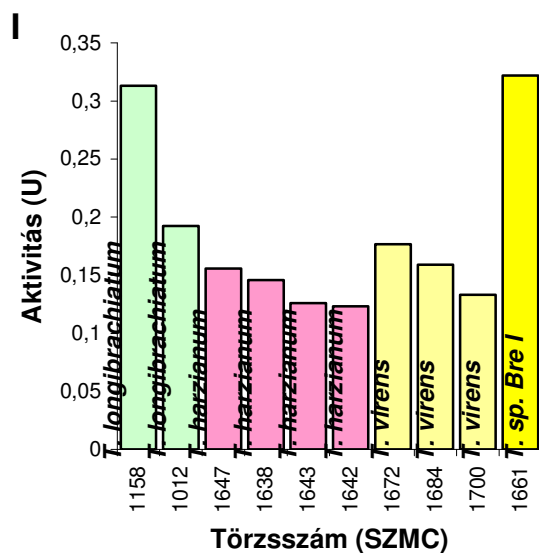
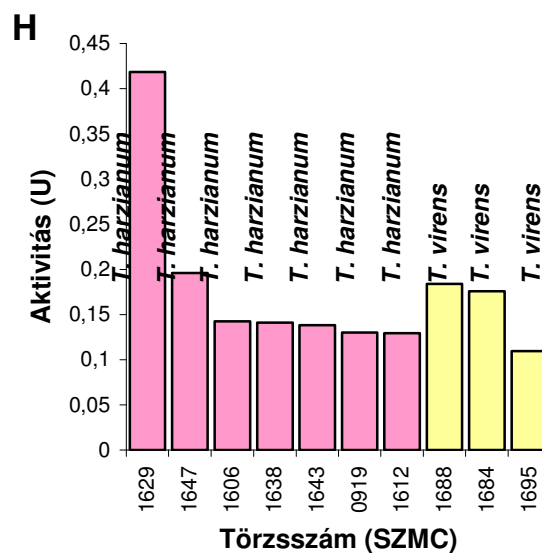
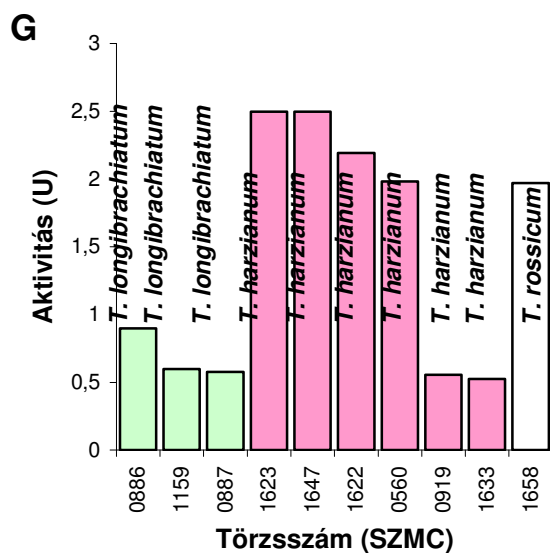


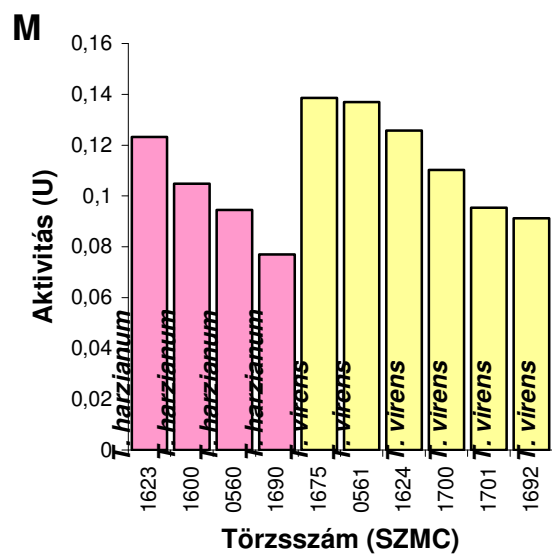




7.b. Melléklet. Az egyes enzimekhez tartozó tíz legnagyobb enzimaktivitást mutató izolátum élesztőikivonatos tápközegben.







8. melléklet. A téli búza rizoszférájából izolált törzsek BCI-értékei minimál és élesztőkivonatós táptalajon.

Törzsszám	Minimál táptalaj		Élesztőkivonatós táptalaj	
	BCI	Szórás	BCI	Szórás
1600	43	2,9	33	1,7
1601	45	1,8	28	0,9
1602	43	0,1	33	0,6
1603	42	0,7	25	0,9
1604	46	3,6	16	1,0
1605	45	1,6	20	0,7
1606	42	1,7	34	0,6
1607	45	2,3	53	0,1
1609	41	1,0	54	0,8
1012	39	2,2	31	0,9
1610	43	2,4	32	0,3
1611	40	1,1	59	2,9
1612	38	0,2	21	1,8
1613	41	0,6	37	0,8
1614	40	1,1	53	2,0
1615	39	1,3	60	0,4
1158	35	1,5	44	0,7
1616	46	3,6	24	0,2
1159	36	0,4	39	0,6
0559	48	1,3	36	2,0
1617	49	0,3	35	1,9
1619	44	4,2	39	0,6
1620	45	0,9	29	0,2
1621	46	0,9	14	0,2
0931	45	1,8	21	0,0
1622	47	0,1	30	1,4
0560	42	0,7	35	3,0
1623	40	2,4	30	1,3
1624	43	1,3	28	1,4
0886	31	1,1	42	1,3
0887	28	1,7	40	0,2
1628	42	2,1	24	0,5
1629	43	0,4	32	1,5
1630	48	1,0	38	2,3
1631	39	3,3	24	1,2
1633	45	1,0	35	1,2
1635	46	1,3	40	1,5

Törzsszám	Minimál táptalaj		Élesztőkivonatós táptalaj	
	BCI	Szórás	BCI	Szórás
2636	52	1,4	39	0,1
2637	47	0,3	48	0,8
1638	51	2,8	37	1,5
1639	44	2,1	27	2,6
1640	39	1,8	21	1,4
1641	40	0,3	40	2,7
1642	47	2,0	37	0,2
1643	42	1,9	26	4,2
1646	45	2,6	47	4,2
1647	48	2,6	33	1,8
1649	49	0,7	34	1,8
1650	43	2,0	25	1,8
1651	47	0,7	19	1,1
1652	47	2,5	24	0,3
1653	47	1,6	42	0,2
1655	49	1,7	46	1,6
1656	46	3,8	30	2,5
1658	39	1,9	47	1,4
1661	44	2,1	21	1,4
1663	41	0,5	50	2,4
1664	52	1,5	35	0,2
1665	43	0,5	34	0,3
1666	50	0,3	43	1,0
1667	39	1,9	18	0,3
1668	48	5,9	37	1,6
0561	42	2,5	15	0,2
1670	40	0,5	23	2,3
1671	48	2,1	20	0,1
1672	39	0,5	17	0,1
0919	43	1,2	30	1,4
1673	44	2,5	29	0,0
1674	45	3,3	36	2,0
1675	37	0,2	13	1,3
1676	50	1,9	39	0,4
1677	46	3,1	39	1,3
1678	48	0,9	34	2,0
1680	48	0,1	49	1,6
1684	50	1,9	18	1,7
1685	45	3,5	28	0,6
1686	46	0,7	17	2,2
1687	47	0,1	60	1,4

Törzsszám	Minimál táptalaj		Élesztőkivonatos táptalaj	
	<i>BCI</i>	<i>Szórás</i>	<i>BCI</i>	<i>Szórás</i>
1688	36	2,5	29	1,1
0930	43	0,1	30	1,6
1689	44	0,3	26	1,1
1690	44	0,3	29	1,1
1691	49	4,9	22	2,3
1692	52	0,8	24	5,0
1693	38	1,0	28	0,3
1694	47	1,2	25	2,5
1695	44	2,2	21	1,7
1696	48	2,7	23	2,6
1697	40	1,7	14	2,5
1699	45	1,2	17	2,3
1700	45	1,6	19	1,8
1701	36	2,5	15	2,4

9. melléklet. A téli búza rizoszférájából izolált törzsek aktivitása a módosított agresszivitás vizsgálatokban.

Törzsszám	Csírázó búzaszemek száma	Szórás
1600	0	0,00
1601	7,5	0,71
1602	3,5	0,71
1603	0	0,00
1604	2,5	0,71
1605	1,5	0,71
1606	4	1,41
1607	1	0,00
1609	7,5	0,71
1012	0	0,00
1610	0	0,00
1611	11,5	0,71
1612	0	0,00
1613	3	0,00
1614	2,5	0,71
1615	7,5	2,12
1158	0	0,00
1616	0,5	0,71
1159	0,5	0,71
0559	6	1,41
1617	2	1,41
1619	0,5	0,71
1620	6	1,41
1621	0,5	0,71
0931	1	0,00
1622	11,5	0,71
0560	7	0,00
1623	3,5	0,71
1624	1	0,00
0886	2	0,00
0887	1	0,00
1628	0,5	0,71
1629	1	0,00
1630	4	1,41
1631	5	1,41
1633	2	1,41
1635	1,5	0,71
2636	4	1,41
2637	1,5	0,71

Törzsszám	Csírázó búzaszemek száma	Szórás
1638	1,5	0,71
1639	1,5	0,71
1640	3	0,00
1641	3	0,00
1642	1,5	0,71
1643	6,5	0,71
1646	1	0,00
1647	4,5	0,71
1649	25	0,00
1650	1,5	0,71
1651	2	0,00
1652	0,5	0,71
1653	0,5	0,71
1655	1	1,41
1656	19	1,41
1658	4,5	0,71
1661	0	0,00
1663	4	0,00
1664	0	0,00
1665	4,5	0,71
1666	15,5	0,71
1667	0	0,00
1668	2,5	0,71
0561	3,5	0,71
1670	8,5	0,71
1671	2,5	0,71
1672	0	0,00
0919	6	1,41
1673	3,5	0,71
1674	1,5	0,71
1675	1,5	0,71
1676	1	0,00
1677	4,5	0,71
1678	5	1,41
1680	11,5	2,12
1684	7	0,00
1685	7	0,00
1686	0,5	0,71
1687	1,5	0,71
1688	0	0,00
0930	0,5	0,71
1689	1	0,00
1690	4,5	0,71

Törzsszám	Csírázó búzaszemek száma	Szórás
1691	1	0,00
1692	0	0,00
1693	0,5	0,71
1694	2	0,00
1695	1	1,41
1696	2,5	0,71
1697	2,5	0,71
1699	3,5	0,71
1700	1	0,00
1701	5	1,41