

A TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM QM 9414 TÖRZS
HETEROKARIONJAINAK VIZSGÁLATA GENETIKAI RE-
KOMBINÁNSOK NYERÉSE CÉLJÁBÓL

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készítette és a József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Karához benyújtja:

Manczinger László

Készült

a szegedi József Attila Tudományegyetem Mikro-
biológiai Tanszékén

1980.

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	1
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
Mikroorganizmus	15
Táptalajok, tenyésztési körülmények, oldatok	16
Módszerek	19
Mutánsok előállítása	19
Heterokarion előállítása anasztomózissal ..	23
Heterokarion előállítása fúzióval	23
Heterokarion protoplasztálása	24
EREDMÉNYEK	25
A túlélési görbe	25
Az előállított mutánsok	25
Heterokarionok előállítása és vizsgálata ...	27
Pozitív szelekciós rendszer kidolgozása	41
MEGVITATÁS	54
ÖSSZEFOGLALÁS	57
FÜGGELÉK: A szűrési dúsítási módszer matemati-	
kai modellje	60
IRODALOMJEGYZÉK	65
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	80



BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A *Trichoderma* genuszt Persoon alapította még 1794-ben /Persoon, 1794/. Az azóta eltelt csaknem 200 év alatt a *Trichoderma* fajok rendszerezésében viharos változások történtek. Az egyes fajok nagy morfológiai hasonlósága miatt történhetett meg az, hogy 1939-ben Bisby csak 3 faj létezését ismeri el: A fehér konidiumos izolátumok *T. album* a zöld konidiumosok *T. viride* vagy *T. koningii* néven kerülnek leírásra /Bisby, 1939/. Ez a felfogás egészen 1969-ig tartotta magát és azt eredményezte, hogy szép számmal jelentek meg /és még jelenleg is jelennek meg/ közlemények, amelyekkel kapcsolatban nem tudhatjuk, hogy a szerzők kísérleteiket végül is melyik *Trichoderma* fajjal végezték. Rifai 1969-ben elvégzett széleskörű vizsgálatai alapján morfológiai bélyegek figyelembevételével 9 faj-aggregátumot különített el: *T. pululiferum*, *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum* /Rifai, 1969/. Meghatározó kulcsa némi gyakorlás után valóban jól használható. Közleménye óta 1 új *Trichoderma* fajt írtak le a szakirodalomban. A *T. saturnisporium*-nak elnevezett új fajt az U.S.A.-ban izolálták /Hammill, 1970/. A Szovjetúnióból 1967-ben, tehát Rifai közleménye előtt új faj /*T. arachnoidea*/ mibenlétének tisztázására még

további vizsgálatok lennének szükségesek /Kuritsyna és Sizova, 1967/.

A kísérleteim alanyául szolgáló törzs nomenklaturájával kapcsolatosan a fent vázolt okok miatt teljes a zűrzavar. A törzs őseit a II. Világháború végén izolálták és akkor *T. viride*-nek nevezték el. Rifai 1969-ben a törzset *T. longibrachiatum*-nak határozta meg, ezt azonban a törzssel celluláz termelési szempontból foglalkozó kutatók nem hajlandók még ma sem tudomásul venni /ld. pl. Hakansson és mtsi, 1978/, sőt újjabban Elwyn T. Reese tiszteletére *T. reesei*-nek hívják, növelve az így is elég nagy nomenklátúra zavart

/Sternberg és Dorval, 1979; Ghose és Sakai, 1979/.

Dolgozatomban ragaszkodtam a rendszertanilag helyes

T. longibrachiatum QM 9414 elnevezéshez. A QM 9414

törzs őseit /QM6a/ mint fentebb már említettem a

II. Világháború végén Új-Guinea Solomon nevű szigetén

állomásozó amerikai katonák sátraihoz vásznáról izo-

lálták és később bebizonyították, hogy a sátrak gyors

megrongálódásáért valóban ez a gomba a felelős. Ugya-

nis ez a mikroorganizmus egy rendkívül aktív extra-

celluláris enzimkomplexet termel, amely még a kristá-

lyos állapotban levő cellulázt is képes glükózig le-

bontani. Az akkori katonai problémából fontos ipari-

-mikrobiológiai ágazat született az azóta eltelt 33 év

alatt /Reese, 1976/.

Egyre szélesebb körű vizsgálatok kezdődtek a celluláz komplex mibenlétének felderítésére. Különösen Japán, Svédország és India érdeklődött a téma iránt az Egyesült Államokom és a Szovjetúnión kívül. Vizsgálták a celluláz-komplex komponenseit /Okada és mtsi, 1968; Wood, 1968; Hong és mtsi, 1976; Wood és McCrae, 1972; Okada, 1975/. Az endo- és exo- β -1,4 glukánázok számát illetően sok ellentmondó eredmény jelent meg /Gum és Brown, 1976; Berghem és Pettersson, 1974; Gum és Brown, 1977; Sternberg, 1976/. Nakayama szerint a sokféle glukánáz nem izozimje egymásnak, hanem a gomba saját extracelluláris proteázainak hatására jön létre egy endo- és egy exo- β -1,4 glukánázból /Nakayama, 1975a,b/. Széleskörűen vizsgálták az egyes enzimek indukcióját és represszióját a tenyésztési kör-
és mtsi.
rűlmények hatására /Nisizawa, 1972; Gupta és mtsi, 1972/, valamint a cellulóz lebontási mechanizmusát /Berghem és mtsi, 1973, 1975, 1976/. A vizsgálatokból kiderült, hogy a cellulázt a glükóz represszálja, a cellobióz rossz inducer, viszont a Sophora japonica-ból izolált diszacharid, a szofaróz kiváló inducernek bizonyult /Nisizawa és mtsi, 1971; Loewenberg és Chapman, 1977/. Ezek a főleg elméleti kutatások megte-

remtették az alapot az ipari méretű kísérletek végzéséhez, melyek közül a folyamatos üzemű rendszerek váltak be a legjobban /Ghose, 1969; Mitra és Wilke, 1975; Brown és Zainudeen, 1977; Peitersen, 1977; Ghose és Sahai, 1979/. A viszonylag tiszta cellulózzal folyó kísérleteken kívül megpróbálkoztak különböző hulladék cellulóz és cellulóz tartalmú mezőgazdasági melléktermékek cellulázos hidrolizisével is, bizonyos esetekben biztató eredményekkel /Mandels és mtsi, 1974; Griffin és mtsi, 1974; Gupta és mtsi, 1973; Vilela és mtsi, 1977; Dhawan és Gupta, 1977; Ben-Ghedalia és Marcipar, 1979, Peitersen, 1975b/. Hogy a téma iránt az érdeklődés egyre inkább fokozódik, azt mutatja az elmúlt 3 évben megjelenő sok értékes közlemény /pl. Gong és mtsi, 1977; Shoemaker és Brown, 1978a,b; Wood és McCrae, 1978; Hakkansson és mtsi, 1978; Sternberg és Dorval 1979; Gupta és Gupta, 1979/. A celluláz felhasználás két különösen érdekes lehetőségét mutatja be két közlemény. Peitersen *T. viride*-t és *Candida utilis*-t együtt tenyésztve próbálta a cellulózt élesztőfehérjévé átalakítani /Peitersen, 1975b/. *Trichoderma* enzim felhasználásával egy gyors növekedésű *Cosmarium* zöldmoszatból nyertek könnyen protoplasztokat. Ennek még nagy jelentősége lehet a jövőben jól hasznosítható állattakarmányok előállításában /Berliner

és Wenc, 1976/.

A *Trichoderma* genusz azonban nem csak celluláz termelése miatt jelentős. A cellulázon kívül egyes fajok termelnek polygalakturonázt /Fanelli és Cervone, 1977; Fanelli és mtsi, 1978/, xylanázt /Hashimoto és mtsi, 1971; Baker és mtsi, 1977/. Annak révén, hogy $\text{exo-}\alpha/1-3/$, $\text{endo-}\alpha/1-3/$ és $\text{endo-}\beta/1-3/$ glukánázokat termelnek, nagy jelentőségük van a gombák-protoplasztológiai kutatásában /Jones és mtsi, 1974; Hasegawa és mtsi, 1969; Tsunoda és mtsi, 1977; DeVries és Wessels, 1972, 1973; Bastide és mtsi, 1977; Sápiczki és Ferenczy, 1978/.

Bizonyos fajok, főleg a *T. viride* és a *T. harzianum* nagy jelentőségre tett szert az erdészeti és mezőgazdasági ökológiában, annak révén, hogy a *Trichoderma* fajok a legelterjedtebb talajlakó fonalas gombák közé tartoznak /Danielson és Davey, 1973a; Reeves és Horn, 1976/. Fentebb felsorolt enzimeikkel részt vesznek az elhalt növényi részek lebontásában. Ezen kívül egyrészt extracelluláris bontóenzimeiknek köszönhetően, másrészt antibiotikum termelésük következtében más mikroorganizmusokkal antagonizálnak /Dennis és Webster, 1971a, /. Így az erdészetben jelentősek azért, hogy bizonyos farontó gombák szaporodását gátolják két antibiotikum, trichodermin és trichodermaol termelésük révén.

/Hashioka és mtsi, 1961 a,b; Komatsu és Hashioka, 1964 a,b; Sierota, 1976/. A trichoderminről kimutatták, hogy az eukariota citoplazmatikus fehérjeszintézisnél hat. azáltal, hogy a peptidiltranszferázt gátolja. /Tate és Caskey, 1973/. A mezőgazdasági jelentőségük abban áll, hogy bizonyos növénypatogén gombák szaporodását gátolják. Például: *Fusarium culmorum* /Lai és Bruehl, 1968/, *Pythium* fajok /Fajola és Alasoadura, 1975; Lang, 1975/ *Rhizoctonia* fajok /Lang, 1975;/ *Typhula incarnata* /Harder és Troll, 1973/. Ennek megfelelően kísérletek kezdődtek a *Trichoderma* fajok biológiai védekezésben történő felhasználását illetően, a legtöbb esetben sikerrel /Dubos és Ricard, 1974; Corke, 1974; De Trogoff és Ricard, 1976; Pottle és mtsi, 1977; Hadar és mtsi, 1979/. Előzetes vizsgálatok szerint bizonyos növényparazita nematodákkal szemben a *Trichoderma* fajok szintén felhasználhatók lesznek /Singh és mtsi, 1976; Miller és Anagnostakis, 1977/. Talajlakó gombák lévén jelentős szerepük van bizonyos inszekticidek lebontásában /Matsumura és mtsi, 1968; Tabet és Lichtenstein, 1976/. Fokozott érzékenységüket bizonyos szteroid szaponinokkal szemben különböző lucerna fajták mérgező naponin tartalmának mikrobiológiai mérésére használják fel /Scardavi és Elliott, 1967; Quazi, 1975; Pedersen, 1975/.

Fotoindukciót igénylő sporulációjuk következtében a morfogenetikai kutatások gyakori alanyai.

/Gressel és Hartmann, 1968; Gressel és Galun, 1967; Kumagai és Oda, 1969; Betina és Spisiakova, 1976; Betina és Zajacova, 1978 ab/. Vizsgálták a *T. viride* falszintézisét is intakt micéliumok, /Galun, 1972/, valamint protoplasztok esetében /Benitez és mtsi, 1975 a,b/. A gombacsoport ökológiai szerepét korán felismerve és Rifai cikkét megfelelően felhasználva Danielson és Davey csaknem valamennyi faj bevonásával átfogó fiziológiai vizsgálatot végzett és azt találta, hogy a cukorasszimiláció esetleg felhasználható lehet a fajok biztonságos azonosítására /Danielson és Davey, 1973 b,c,d/.

A fentebb említett trichodermin-en kívül a *Trichoderma* még több más antibiotikumot is termelnek, így a baktériumellenes trichoviridint és dermadint /Tamura és mtsi, 1975/, trichorin-A-t /Katayama és mtsi, 1977/, valamint a kutatások homlokterében álló peptid antibiotikumokat: cyclosporin A-t /Ruegger és mtsi, 1976; Borel és mtsi, 1976;/ cyclosporin C-t, /Traber és mtsi, 1977/, szukacillint /Ooka és Takeda, 1972, 1974/, alamethicint /Mohr és Kainkauf, 1978/, valamint trichotoxin A-40-et /Irscher és mtsi, 1978/. Valamennyi peptid antibiotikum közös jellemzője az erős

immunoszuppresszív sajátság és az, hogy hatásukat a leukociták membránjának kilyukasztása révén érik el /Bessler és mtsi, 1979/.

Kétségtelen jelentősége ellenére a gomba genuszban komolyabb genetikai vizsgálatok még nem történtek. Beszámoltak már mutánsokról a celluláz produkciót illetően /Mandels és mtsi, 1971; Morozova, 1973; Morozova és mtsi, 1975; Montenecourt és Eveleigh, 1977; Nevalainen és Palva, 1978/, ám a szerzők részletesebb genetikai vizsgálatokat nem végeztek. Auxotróf erősítő markerek segítségével tanulmányozták heterokarionok viselkedését konidium képzésben sérült /Weinman és Galun, 1969/, valamint pigment képzésben sérült mutánsok esetén /Greenshpan - Galun, 1971/ *T. viride* -vel, bár a faj azonossága kétséges.

Ahhoz, hogy egy gombából rekombinánsokat állítsunk elő két út kínálkozik: a szexuális életciklus, ha egyáltalán létezik és a paraszexuális ciklus, ha létrejöttének nincs valamilyen akadálya.

A mikológusok viszonylag korán felfedezték, hogy bizonyos *Hypocrea* fajok askospóráiból nem *Hypocrea* fajlódik ismét, hanem egy egészen más morfológiájú gomba, mely morfológiája teljesen azonos a *Trichoderma* génuszra leírtakkal /Tulasne és Tulasne, 1865; Brefeld és von Tavel, 1891/. Azóta ezt a kapcsolatot később

még sokan megerősítették /Bisby, 1939; Dingley, 1957; Webster, 1964; Rifai és Webster, 1966; Doi, 1966, 1968; Roth, 1969; Webster és Hale, 1972/. Tehát a *Trichoderma* fajok szexuális folyamattal bíró, az Ascomycetes *Hypocrea*-les sorozatába *Hypocreaceae* családjába tartozó gombák, melyek "perfect" alakjai a *Hypocrea* génuszba tartoznak. Ennek ellenére a kutatók a mai napig nem használták fel ezt a lehetőséget genetikai vizsgálatok céljára. Ennek fő oka az lehet, hogy a *Trichoderma* fajok heterotallikusak azaz az ivaros folyamat lejátszódásához két különböző párosodási típus szükséges /Webster, 1964/. A rendszertannal foglalkozók viszont, akik a természetben megtalálják és meghatározzák a *Hypocrea* alakot és ezáltal birtokában lehetnének a két párosodási típusnak, nem foglalkoznak a genetikai aspektusokkal, a genetikusok viszont rendszertannal nem foglalkoznak, s így képtelenek a *Hypocrea* faj begyűjtésére, illetve még azt is megkockáztatom, hogy feltételezzem, nem is tudnak a létezéséről, nem olvasván a rendszertani irodalmat belenyugodnak, hogy mikroorganizmusuk "fungi imperfecti" /ld. pl. Weinmann és Galun, 1969/.

A szakirodalom szerint /Rifai, 1969/ a *T. longibrachiatum* perfect alakja ismert és *Hypocrea sweinitzii* néven írták le, ám sajnos annak idején Új-Guineában csak az egyik párosodási típust izolálták, s ráadásul a

T. longibrachiatum igen ritka faj és kifejezetten trópusi elterjedésű /Rifai, 1969/. Pedig a perfect alak minden *Trichoderma* faj esetén rendkívül kedvező morfológiai felépítésű a genetikai célzatú aszkospóra analízis számára, ugyanis az érett aszkospórák a termőtest felületére préselődnek és a termőtest felületén nincsenek konidiumok, amelyek zavarhatnák a genetikai analízist. Emellett a meiózisban levő sejtmagokat megfestve a haploid kromoszómaszám 4-nek adódott, ami szintén kedvezően alacsony érték a genetikai analízis számára /Hanlin, 1965/.

A fentebb ismertetett akadályok miatt a szexuális út helyett a paraszexuális út tűnt járhatóbbnak rekombinációk előállítására.

Szomatikus diploidon keresztül létrejött rekombinációkat már sok gomba esetében előállítottak J.A. Roper klasszikus kísérletei óta /Roper, 1952/. Ezek közül sorolok fel néhány példát az I. táblázatban a megfelelő irodalmi hivatkozással, kifejezetten csak fonalas gombákra korlátozódva. A széleskörű vizsgálatokból kiderült, hogy a fonalgombák mind a szomatikus diploid létrejöttének gyakoriságát, mind pedig a létrejött diploid stabilitását illetően igen eltérő módon viselkednek. A szomatikus diploid gyakorisága általában 10^{-4} és 10^{-8} közötti érték /Caten és Day, 1977;



Pontecorvo és Käfer, 1958/, a diploid stabilitását tekintve pedig két fő csoportba sorolhatók:

név	hivatkozás
Basidiomycetes	
<i>Ustilago maydis</i>	Holliday, 1961
<i>Ustilago violacea</i>	Day és Jones, 1968
<i>Schizophyllum commune</i>	Mills és Ellingboe, 1969
<i>Coprinus lagopus</i>	Casselton, 1965
Ascomycetes	
<i>Aspergillus nidulans</i>	Roper, 1952
<i>A. sojae</i>	Ishitani és mtsi, 1956
<i>A. oryzae</i>	Ishitani és mtsi, 1956
<i>A. amstelodami</i>	Lewis és Barron, 1964
<i>A. niger</i>	Pontecorvo és mtsi, 1953
<i>A. fumigatus</i>	Strømnaes és Garber, 1963
<i>Penicillium expansum</i>	Beraha és Garber, 1965; Barron, 1962
<i>P. italicum</i>	Strømnaes és mtsi, 1964
<i>P. digitatum</i>	Strømnaes és mtsi, 1964
<i>P. chrysogenum</i>	Pontecorvo és Sermonti, 1954
<i>Fusarium oxysporum</i>	Buxton, 1956
<i>Verticillium albo-atrum</i>	Hastie, 1962
<i>Ascochyta imperfecta</i>	Sanderson és Srb, 1965
<i>Cochliobolus sativus</i>	Tinline, 1962
<i>Cephalosporium mycophilum</i>	Tuveson és Coy, 1961
<i>Neurospora crassa</i>	Smith, 1974

I. táblázat

Néhány példa szomatikus rekombináns előállítására

- 1./ Stabil diploid képzés: a diploid szétesésének gyakorisága $< 0,1 \%$

/Pl.: *Aspergillus nidulans*, *Penicillium expansum*/

2./ Haploidizálódásra hajlamos diploid a diploid spontán szétesésének gyakorisága $> 0,1\%$.

/Pl.: *Verticillium albo-atrum*, *Cephalosporium mycophilum*, *Neurospora crassa*/

A genetikai rekombinánsok nyerése a 2. típusnál nem jelent különösebb technikai nehézséget /ld. pl. Smith, 1974; Tuveson és Coy, 1961/, ám az 1-es típusnál úgynevezett haploidizáló ágensek alkalmazására van szükség ahhoz, hogy genetikai analízist végezhesünk. Így például kiterjedten alkalmazzák a p-fluorfenilalanint /Lhoas, 1961, 1968/, valamint a benomylt és származékait /Hastie, 1970/. Ezek a vegyületek a kromoszómák mozgásában résztvevő mikrotubulusok fehérjéihez kötődve megzavarják a mitózis normális rendjét és aneuploidokon keresztül haploidokat hoznak létre a szomatikus diploidból /Morris és Oakley, 1979; Davidse és Flach, 1977/. A diploid sejtmagban bizonyos gyakorisággal úgynevezett mitotikus crossing-over megy végbe, mely azt eredményezi, hogy a haploidizáció után haploid rekombinánsokat kapunk. A rendszer jól felhasználható genetikai térképezésre is. /Pontecorvo és Käfer, 1958; Typas és Heale, 1978/

A szomatikus diploid előállításának legegyszerűbb és legtöbbet alkalmazott módszere Roper auxotrófia-komplementációs rendszerének használata /Roper, 1952/.

E módszer rutinszerű alkalmazhatóságának feltételei:

- 1./ a vizsgált gombafaj vegetatív szaporítóképletekkel birjon /konidium/.
- 2./ ezeket nagy mennyiségben termelje
- 3./ a szaporító képletek többségükben genetikai szempontból egyféle sejtmagot tartalmazzanak, azaz homokariotikusak legyenek.

Mint azt a későbbiekben látni fogjuk a *T. longibrachiatum* esetében a 3. ponttal kapcsolatosan merülnek fel problémák, ezért szomatikus diploid előállítása szempontjából nem ideális rendszer. Roper módszerének egymást követő lépései a következők:

- 1./ Minimum 2 db egymást komplementálni képes stabil auxotróf mutáns előállítása.
- 2./ A két mutáns törzs keresztezésével minimál táptalajon növő heterokarion előállítása.
- 3./ A heterokarionról konidiumérés után 10^6 - 10^8 konidium minél tisztábban /zavaró heterokariotikus elemektől mentesen/ történő összegyűjtése.
- 4./ A konidium szuszpenzió szélesztése minimál táptalajra.
- 5./ A minimálon növő telepek vizsgálata.

A heterokarion előállítására két lehetőség van. Az egyik a spontán anasztomózis, amely különösen álló folyadéktenyészetben nagy gyakoriságú. Bizonyos gombák

illetve mutánsok nem képesek az anasztomózisra. Ezekben az esetekben protoplasztfúzió felhasználásával lehet előállítani a heterokariont. Ez a fiatal technika még különböző fajok keresztezését is lehetővé teszi /pl. Kevei és Peberdy, 1977; Peberdy, és mtsi, 1977; Anné és mtsi, 1976; Anné és Eyssen, 1978/.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A/ Mikroorganizmus:

Trichoderma longibrachiatum, Rifai;

QM 9414

Eredete: Ezt a *Trichoderma* törzset az U.S. Army Natick Laboratories munkatársa az eredeti Solomon szigeti QM 6a jelzésű vad izolátumból elektron besugárzással fokozott celluláztermelésre nemesítették E.T. Reese vezetésével.

Kapcsolata a többi törzssel: /Reese, 1976/

ATCC 13 631 QM 6a /vad izolátum/

↑
elektron sugárzás

ATCC 24 449 QM 9123 /2-szeres celluláz produkció/

↑
UV

ATCC 26 921 QM 9414 /4-szeres celluláz produkció

Egyéb jellegetességek:

A törzs morfológiáját az 1. ábrán figyelhetjük meg. A fialidokba mindig csak 1 sejtmag kerül és ezután a fialid a micéliumtól egy pórus nélküli válaszfallal teljesen elhatárolódik a konidiofor többi sejtjétől /Hammill, 1974/. Ez azt eredményezi, hogy bár nem ritka a 3-4 sejtmagú konidium sem, a konidiumok homokarionotikusak lesznek. A kétsébbekben a diploid izolálást megnehezítő hetero-

kariotikus zavaró elemeket nem a többmagvú konidiumok jelentik, hanem a méretükben a konidiumokhoz közel álló heterokariotikus klamidospórák /2. ábra/. A törzse jellemző klamidospórák 6-10 μ átmérőjű, gömbalakú, vastagfalú kitartó spórák, melyek a hifa sejtekről apikálisan vagy interkalárisan fűződnek le, 3-8 sejtmagvúak. A perfect alak, a *Hypocrea sweinitzii* morfológiáját és fejlődését illetően utalok Hanlin munkájára /Hanlin, 1965/.

B/ Táptalajok, tenyésztési körülmények, oldatok

1. Minimál táptalaj

0,5 % glükóz

0,5 % ammónium szulfát

0,1 % kálium-dihidrogen-foszfát

0,05 % magnézium szulfát /7H₂O/

1,5 % Bacto agar

Desztillált víz

Nagyon fontos, hogy a minimál glükóz tartalma kisebb legyen mint 1 %, különben a törzs konidium képzése szupresszálódik.

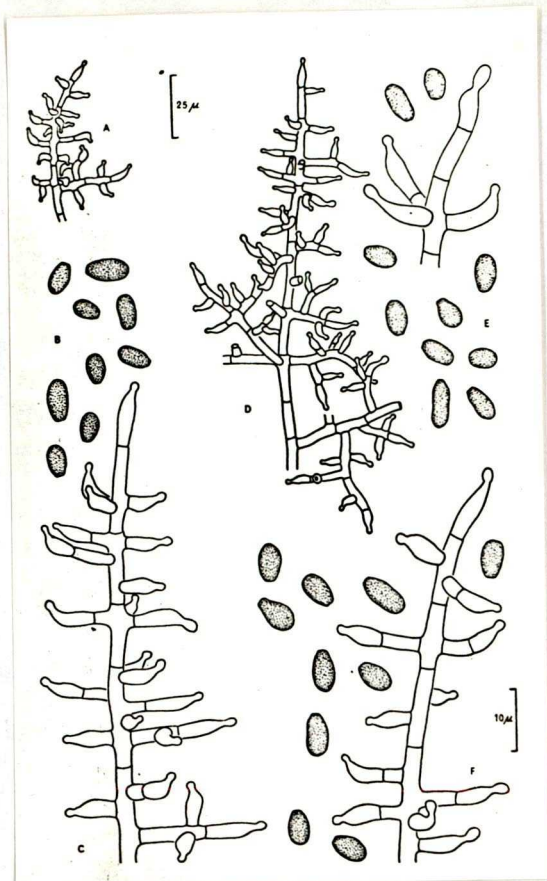
2. Kiegészített minimál táptalaj

Összetétel mint 1. kiegészítve szükségletnek megfelelően

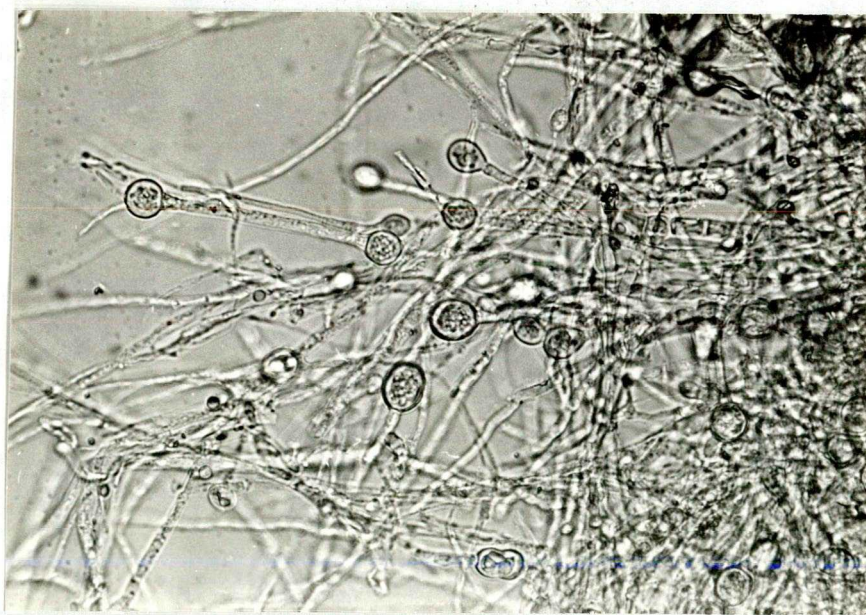
aminosavval 50 γ /ml

bázisokkal 50 γ /ml

vitaminokkal /Lodder, 1970/



1. ábra: *Trichoderma longibrachiatum*
Konidiumtartók és konidiumok. /Rifai, 1969/



2. ábra: *Trichoderma longibrachiatum* Qm 9414 klamidospórák
2 %-os glükóz 0,5 % ammóniumsulfát tartalmú
minimálon. 600 x-os nagyítás.

3. Élesztőkivonatos táptalaj

1 % glükóz

0,5 % élesztőkivonat /Oxoid/

1,5 % Bacto agar v. 2 % szálas agar

desztilált víz

4. Digitoninos táptalajok

Mivel ez a *Trichoderma* törze rendkívül gyorsan és szétterülve nő, ahhoz, hogy egyes telepeket kapjak szükségessé vált telepösszeyomó vegyület alkalmazása. A digitonin a *Digitális purpurea* szterán vázas glükozidja erre a törzsre már igen kis koncentrációban is erősen morfogén hatású: kolonial növekedést vált ki, 6 μ /ml minimál táptalajban 40-60 különálló telep létrehozását teszi lehetővé. /ld. 3. ábra/

5. Tápoldat muténs dúsításhoz és diploid dúsításhoz

0,1 % glükóz

0,1 % ammóniumsulfát

0,1 % káliumdihidrogénáfoszfát

0,05 % magnézium szulfát

desztilált víz

+ 20 μ /ml streptomycin + 5 μ /ml oxitetraciklin

6. Rutin tenyésztési körülmények

A tenyészetek leoltás után 48 órára 30°-ra sötétbe kerültek, majd szabahőre fényre, hogy a konidiumképzés létrejöhessen /fotoindukált sporuláció/



3. ábra: A digitonin morphogén hatása a *Trichoderma longibrachiatum* Qm 9414 törzse. Bal oldalt 6 μ /ml digitonin, jobb oldalt kontrol. Élesztőkivonat táptalaj.

7. Táptalaj koloniál mutánsok előállításához

0,5 % élesztőkivonat /oxoid/

1,5 % Bacto agar

desztillált víz

8. Stabilizált táptalajok

A protoplasztok regenerációjához 0,6 M kálium-klorid jelenléte biztosította a megfelelő ozmotikus közeget valamennyi alkalmazott táptalaj esetén. A protoplasztok, illetve a PEG-el /polietilén-glikol/ fúzionáltatott protoplasztok 0,6 M KCl és 1 % Bacto agar tartalmú felülöntőbe lettek bekeverve 40 °C-on / 8 ml felülöntő nagycsészénként/

9. Protoplasztképzési puffer /PKP/ /steril/

0,6 M KCl

1/15 M foszfát puffer pH = 6

streptomycin, OTC /oxitetracin/

10. Protoplasztképző elegy

1 % csigaenzim

0,1 % merkaptóetanol

PKP-ben oldva, sterilre centrifugálva

11. Fúziós oldat /steril/

25 % PEG 4000

50 mM Kalcium klorid

pH 7,8-ra állítva 5 % NaOH-val

12. A dolgozatban szereplő "kiscsésze" megnevezés 5,5 cm, "nagycsésze" megnevezés 9,5 cm átmérőjű Petricésészét jelent.

C/ MÓDSZEREK

1. Mutánsok előállítása és meghatározása

a./ A túlélési görbe felvétele

Valamennyi mutánst UV fénnnyel történő besugárzással állítottam elő.

UV lámpa: Philips lxT UV 15 W

táptalaj felszín - lámpa távolság: 23 cm

A túlélési görbe felvételénél élesztőkivonatos táptalajt használtam digitonin jelenlétében. 3 párhuzamossal dolgozva 5 másodpercenkénti időközökkel történt a besugárzás. Így a besugárzási idők 0, 5, 10 ... 105 másodperc voltak.

A csészék kiértékelésére 3 napig 30 °C-on történő inkubáció után került sor.

b./ Mutánsdúsítás

A dúsításra a jól bevált szűréses dúsítási technikát használtam /ld. pl. Catcheside, 1954/ bizonyos módosításokkal:

10 ml konidium szuszpenzió
/3·10⁷/ml konidium/

2,5-2,5 ml-enként besugározva nagy
csészében UV-val 90 másodpercig

szűrés G-2 szűrőn keresztül

átmosás centrifugálással

5 x 100 ml dúsító tápoldatba szétosztva

rázgatás 30 °C-on

20 óráig, 200 fordulat/perc

szűrés G-2 szűrőn

összegyűjtés

egyenletes szétosztás

4 x 100 ml dúsító tápoldatban

rázgatás 30 °C-on

20 óráig, 200 fordulat/perc

szűrés /G-2/

centrifugálás

+ 4 ml sterilvíz

0,1 ml

20-szoros hígítás

0,1-0,1 ml-ek digitoninos
élesztő kivonat táptalajra

telepizolálás

100 ml dúsító tápoldat-
ban rázgatás
18 óra

szűrés, centrifu-
gálás + 4 ml ste-
ril víz

0,1-0,1 ml-ek
élesztő kivonat-di-
gitonin táptalajra

telepizolálás

A többi mutáns előállítása hasonló elveknek megfelelően történt. Megfigyelhető volt, hogy a vad törzsenél elérhető magas szintű dúsitás a 3 dúsitási kör alkalmazása révén nem valósítható meg olyan törzsenél, melyek már hordoznak 1 vagy 2 auxotrófiát, ugyanis ezek a törzsek könnyebben elpusztulnak a rázgatás körülményei között.

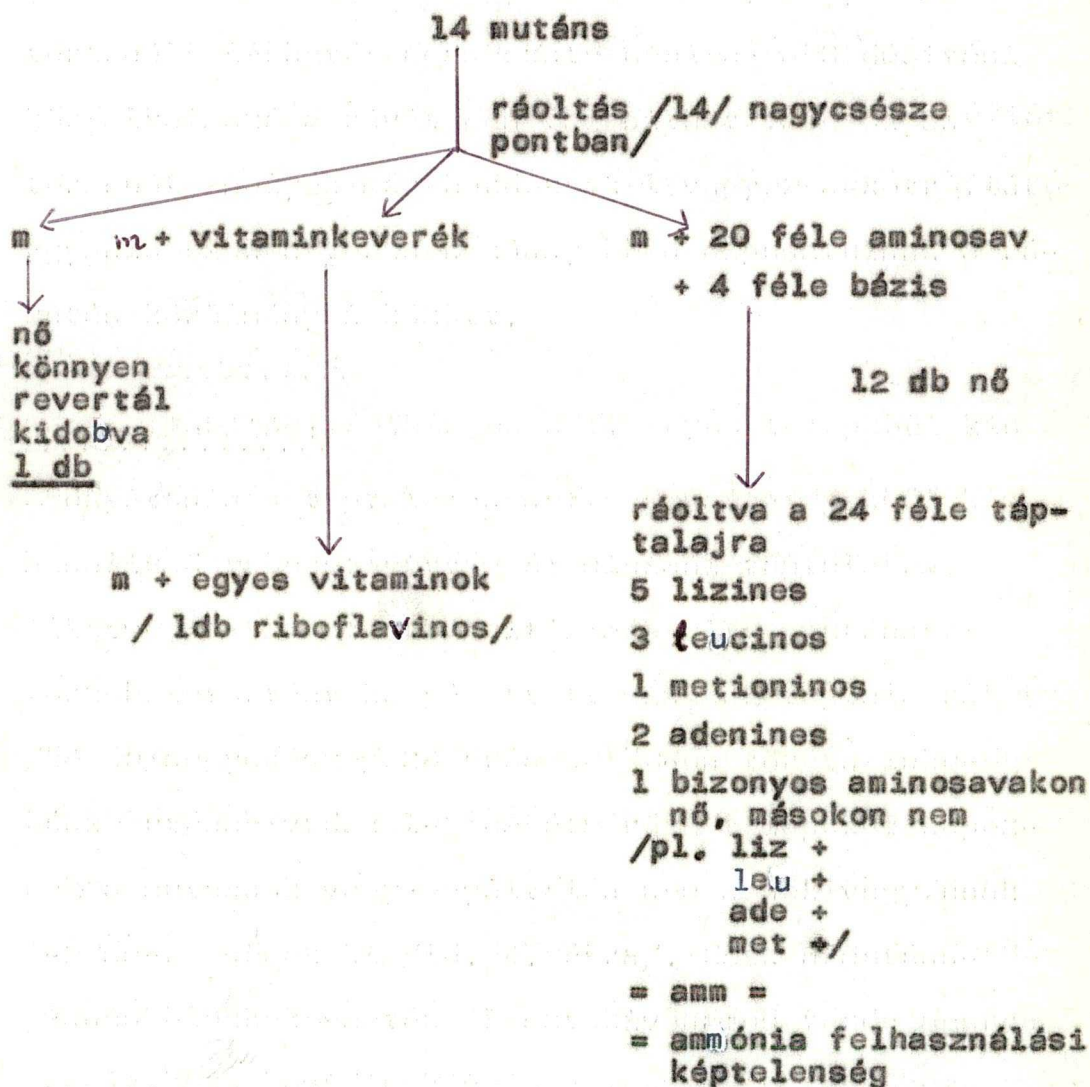
c./ Mutánsizolálás:

A digitoninos táptalajon nőtt egyes telepekből kis micéliumdarabokat vittem át minimál táptalajra, illetve, ha a mutánskészítés már eleve mutáns törzsből történt, kiegészített minimál táptalajra /14 db/nagycsésze/ 24 óra 30 °C-on történt inkubáció után a vadak 1-2 cm átmérőjű telepeket képeznek, a mutánsok vagy egyáltalán nem nőnek vagy csak 1-2 mm-re nőnek ki. Ezek a mutáns-
gyanús blokkok ezután élesztőkivonatos ferde agarra kerültek és konidiumképzésig tenyésztettem őket.



d./ A hiánymarkerek megállapítása

/m=minimál táptalaj/



Ezután a többi meghatározásra kerülő mutánst először csak m + lizin; m + leucin; m + adenin; m táptalajokra oltottam le és csak amelyek a 4 mutáns csoport egyikébe sem tartoztak, kerültek kioltásra további táptalajokra.

2. Heterokarion előállítás anasztomóziással

2 ml élesztőkivonatós tápoldatot félkémcsőbe mértem /1 % gl, 0,5 % élesztőkivonat, deszilált víz/. Lezártam kémcsőkupakkal. 10'-ig kuktában sterilizáltam. Leoltás a két partner 1-1 Kocenyi konidigmával.

Ezután inkubálás következik 3-4 napig 30 °C-on. A képződött micélium korongot steril csapvizben ki-mostam, majd minimális nagycsésze közepére helyeztem. A kinövő szektorok mibenlétét /heterokarion vagy revertáns/ konidiumainak minimálisan történő viselkedése alapján dönthetjük el.

3. Heterokarion előállítása protoplaszt-fúzióval

Mindkét partnerrel:

tenyésztés: 0,1 % glükózos 0,5 % élesztőkivonat
tápoldat 200 ford/min 30 °C /16-18 óra/



szűrés és átmosás DV-el 0,5 mm átmérőjű
műanyag szűrőn

átmosás protoplasztképzési pufferrel

+ 20 ml protoplasztáló oldat

1,5 óra múlva

szűrés 0,5 cm vastag steril vattán

0,5 óra állás

centrifugálás átmosás PKP-val



protoplasztszám megállapítás Bürkerezéssel

A : B partner 10^7 : 10^7 protoplaszt összekeverése
10 ml-es centrifugacsőben

5' 4000 g

a PKP teljes leöntése

↓
üledék + fúziós oldat /1 ml/

kémcső keverővel felszuszpendálás 10 perc állás után

↓
megfelelő hígításban felülöntőbe keverés

↓
kiöntés különféle alaptáplálajokra

4. Heterokarion protoplasztálása

steril celofán körlapok minimál táptalajra

heterokarion ráoltás a kis micéliumblokkal

inkubálás 24^h

a tenyészetek áthelyezése a celofánnal

steril protoplasztáló ^{cel egybe} /4 lap/20 ml elegy/

protoplasztálás 2 óra

szűrés vatán

átmosás PKP-val

↓
protoplasztszám megállapítás bürkerezéssel

EREDMÉNYEK

1. A túlélési görbe felvétele

A törzs eléggé **érzékenynek** bizonyult UV fénnel szemben:

besugárzási idő /másodperc/	túlélési %
0	100
5	97,1
10	95,5
15	86,2
20	70,0
25	60,1
30	50,2
35	43,4
40	33,5
45	28,2
50	23,2
55	21,0
60	18,4
65	15,0
70	13,5
75	12,5
80	11,0
85	8,7
90	8,0
95	7,5
100	5,5
105	3,2

A mutánsok előállításához 90 másodperces /8,0 % túlélés/ besugárzást használtam.

2. Az előállított mutánsok

Az anyagok és módszerek részben ismerttetett módon 821 egymarkeres törzset állítottam elő egyetlen dúsitási menetben a prototróf Qm 9414-es törzsből; ezek marker szerinti megoszlása a következő:

lizin	336	146 AAA + ; 190 AAA -
leucin	153	
adenin	137	25 pigmentképző; 11 adenin specifikus
metionin	85	2 metionin specifikus
ammónia	33	
riboflavin	40	/AAA = L α -aminoacidipinsav/
izoleucin	6	
arginin	13	
threonin	1	
egyéb	17	/ezek egyike: leu ⁻ met ⁻ dupla/

A dúsitás rendkívül eredményes volt; 2 dúsitási kör után a telepek 11,4 %-a volt auxotróf, 3 dúsitási kör után pedig 87,2 %-a.

A 100/3-as jelű ade⁻ törzsből készültek a következő dupla mutánsok:

ade ⁻ met ⁻	/22/1/	
ade ⁻ met ⁻	/12/2/	
ade ⁻ lys ⁻	/6/1/	
ade ⁻ lys ⁻	/6/3/	
ade ⁻ pdx ⁻	/20/2/	/pdx = piridoxin/

Az első mutánsizolálási kísérletben kapott leu⁻ met⁻ dupla és az ade⁻pdx⁻ /20/2/ duplából kiindulva történt a 3 markeres törzsek előállítása:
leu⁻ met⁻-ből;

leu ⁻ met ⁻	col ₁	
"	col ₆	col: colonial
"	col ₈	W : white
"	col ₁₀	
"	W ₁	
"	W ₂	

ade⁻pdx⁻-ből:

ade ⁻ pdx ⁻ lys ⁻	32 db
egyéb	<u>32 db</u>
összesen	64 db

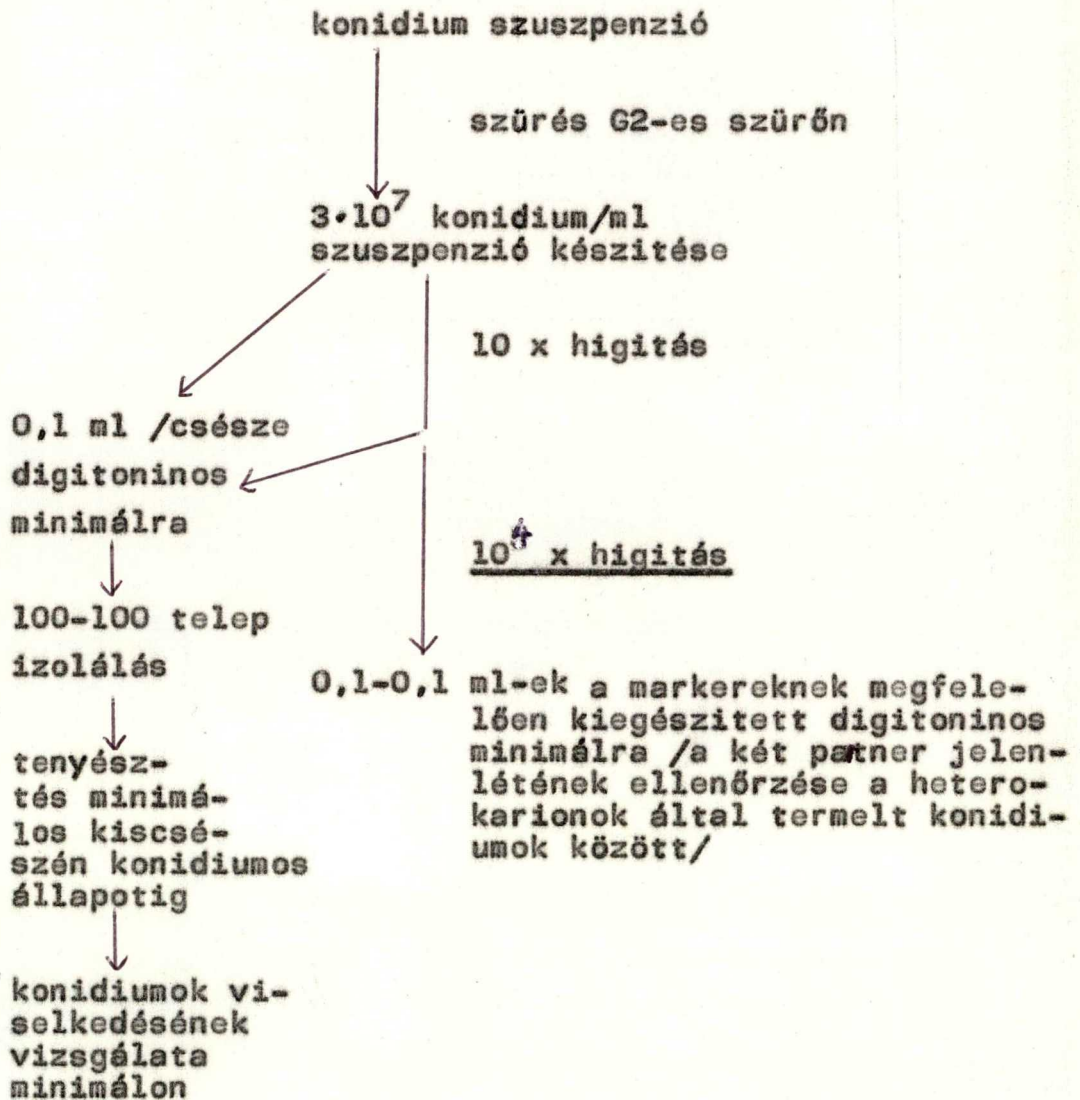
3. Heterokarionok előállítása és vizsgálata

1. Egymarkeres stabil törzsek felhasználásával készült heterokarionok

A következő heterokarionokat hoztam létre anasztomózissal:

H 1	leu ⁻	14/3	+	ade ⁻	9/1
H 2	leu ⁻	21/1	+	ade ⁻	11/2
H 3	leu ⁻	5/3	+	lys ⁻	2/2
H 4	leu ⁻	21/3	+	lys ⁻	19/1
H 5	lys ⁻	13/3	+	ade ⁻	4/3
H 6	lys ⁻	12/2	+	ade ⁻	11/4

A heterokarionok mindegyikét új minimális csésze közepébe oltottam át, majd miután a telep a csészét benőtte és bekonidiumosodott, mindegyik heterokarion konidiumait megvizsgáltam a következő módon:



Eredményként azt kaptam, hogy:

- a./ A heterokarionokról olyan konidiumsuszpenzió készíthető, melynek telepképző gyakorisága igen magas minimál táptalajon.

minimálisan növe telep/kiszélesztett
konidium /átlagosan/

H01	$5,2 \cdot 10^{-5}$
H02	$3,2 \cdot 10^{-5}$
H03	$8,4 \cdot 10^{-5}$
H04	$5,0 \cdot 10^{-5}$
H05	$4,2 \cdot 10^{-5}$
H06	$3,1 \cdot 10^{-5}$

Sajnos viszont a levizsgált összesen 600 telep egyike sem bizonyult diploidnak, konidiumai egyiknek sem nőttek minimálisan. Ebből az következik, hogy ha létezik ebből a törzsből stabil diploid, akkor előfordulási gyakorisága a heterokarionok konidiumai között

$$< 10^{-7}$$

b./ A két partner előfordulási aránya a heterokarionok konidiumai között minden esetben közel 1:1 volt.

2. Három markeres mutánsok között létrehozott heterokarionok vizsgálata

Az előállított mutánsok közül a legigértebbnek az igen stabilan viselkedő $leu^{-}met^{-} w_1$, $leu^{-}met^{-} col_6$ és az $ade^{-}pdx^{-}lys^{-} /42/$ törzs bizonyult. A kísérletek zömét a

$$H07 = leu^{-}met^{-} col_6 + ade^{-}pdx^{-}lys^{-} /42/$$

heterokarionnal végeztem el, mivel a colonial marker

használata a zavaró heterokarionok jelenléte ellenére is gyors rekombináció bizonyítást tesz lehetővé. Bizonyos esetekben viszont például protoplaszt fúzióhoz a $leu^-met^- w_1$ törzs vált be jobban, mivel ezt könnyebb protoplasztálni, mint a colonia törzset. Ilyen esetben tehát a

$$H_8 = leu^-met^- w_1 + ade^- pdx_1^{ys}/42/$$

heterokariont használtam.

A három markeres mutánsokkal a következő diploid vagy rekombinans előállítására irányuló kísérleteket végeztem el:

- a./ totálizoláció
- b./ szűréses dústítás diploidra vagy haploid rekombinansra
- c./ protoplaszt fúzió utáni heterokarion vizsgálata
- d./ heterokarion összenyomása hiperozmotikus közegben
- e./ hidegben tartás
- f./ a heterokarion UV-vel történő besugárzása

Az egyes kísérletek elméleti háttere a következő volt:

a./ Totálizolálási módszer:

A minimálon növény telepek között bizonyos gyakorisággal jelen lehet a diploid telep is. Ha ez a még nem túl sok munkát igénylő 100 izolátum között biztonságosan megtalálható, akkor ez a módszer

megfelelő lehet a rutin vizsgálatok céljaira.

b./ Szűréses dúsitási módszer

A módszer saját ötletem volt, és minden olyan esetben jól alkalmazhatónak tűnik, ahol a diploid telep jó konidiumképző sajátságokkal bír, azaz megközelítőleg átlagosan ugyanannyit fűz le, mint egy heterokarion telep.

A módszer azon alapul, hogy egyrészt, ha stabil mutánsok heterokarionjának konidiumszűrletét minimál tápoldatban rázatjuk, akkor csak a heterokarionok, a diploidok, valamint a prototróf rekombinánsok képeznek micéliumot, a konidiumok többsége viszont a két stabil auxotróf genom egyikét hordozván nem csirázik ki.

A rázatott tenyészetet megfelelő szűrőn átszűrve a szűrőn fennakadt hifaszövedéket minimál táptalajba keverve előállíthatunk egy következő konidium generációt, mellyel ezt a procedurát megismételhetjük. Másrészt triviális dolog, hogy ha a heterokarion és a diploid átlagosan azonos számú konidiumot fűz le, akkor ha a diploid stabil, minden egyes konidium diploid utódot hoz létre, tehát reprodukálási rátája = 1, a heterokarion viszont konidiumképzése során szegregál és koni-

diumainak többsége ebben a szelekciós rendszerben elveszik. Esetünkben igen kis gyakorisággal reprodukálja önmagát a heterokarion $/5 \cdot 10^{-5}/$. Ez ahhoz vezet, hogy a procedurát ismételve a diploid feldúsul a rendszerben a heterokarionokhoz képest. Természetesen ez csak akkor lehetséges, ha a kezdeti konidiumszámot akkorára választjuk meg, hogy már kezdetben is lehessen benne diploid. A felső határ ilyen szempontból, amellyel még kényelmesen lehet dolgozni 10^9 db konidium. Ezt 10×100 ml-ben rázatva a konidium koncentráció 10^6 /ml lesz és ez már elég alacsony érték ahhoz, hogy az a konidium, amely genetikailag erre képes, a minimál tápoldatban valóban kicsirázzon. A kiszűrt hifaszövedéket célszerű nagy felületű táptalajba keverni alacsony szénforrás koncentráció mellett, hogy egyrészt biztosítva legyen hogy valamennyi telep konidiumot termeljen, másrészt ez a konidium mennyiség összességében csak olyan tömegű legyen, hogy valamennyit továbbvihessük a következő dúsítási körbe, ha egy dúsítási kör nem bizonyul elegendőnek.

A módszerrel kapcsolatban sikerült levezetni egy olyan összefüggés - rendszert, amellyel a dúsítási körök számának és a rendszer egyéb paramétereinek

birtokában becsülhető a diploid tényleges gyakorisága. Sajnos általános képlet nem adható meg. A képletek az első 3 dúsitási kör után a következők: /Az összefüggések részletes levezetését lásd a függelékben 60. oldal/

$$\frac{D}{H+P} = \frac{r_d}{r_h + p_w \cdot r_d (1-\xi) \left(\frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} \right)}$$

$$\frac{D}{H+P} = \frac{r_d (\xi + r_h)}{r_h^2 + p_w \cdot r_d \cdot (1-\xi) [1 + (r_h + 1) \left(\frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} \right)]}$$

$$\frac{D}{H+P} = \frac{r_d (\xi^2 + r_h \cdot \xi + r_h^2)}{r_h^3 + p_w \cdot r_d \cdot (1-\xi) [1 + \xi + r_h + (r_h^2 + r_h + 1) \left(\frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} \right)]}$$

$$\frac{D}{H+P} = \frac{r_d (\xi^3 + r_h \cdot \xi^2 + r_h^2 \cdot \xi + r_h^3)}{r_h^4 + p_w \cdot r_d \cdot (1-\xi) [1 + \xi^2 + r_h \cdot \xi + r_h^2 + r_h + 1 + \xi + r_h + \xi \dots + (r_h^3 + r_h^2 + r_h + 1) \left(\frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} \right)]}$$

Jelmagyarázat:

$$\frac{D}{H+P} = \frac{\text{diploid}}{\text{heterokarion} + \text{prototróf rekombináns}}$$

r_d = a diploid gyakorisága a heterokarion konidiumai között

r_h = a heterokarion gyakorisága a heterokarion konidiumai között

ξ = a diploid sejtmag stabilitási rátája
tehát, ha x diploid sejtmag osztódása után y diploid marad $\xi = \frac{y}{x}$

p_w = Attól függően, hogy a használt auxotróf markerek milyen mértékű transzhelyzetű kapcsoltságban vannak a haploid rekombinánsok között, különböző gyakorisággal jelennek meg prototróf, rekombinánsok. p_w azt mutatja meg, hogy a haploid rekombinánsok között mekkora a prototróf rekombináns gyakorisága, tehát

$$p_w = \frac{\text{prototróf rekombináns}}{\text{összes haploid rekombináns}}$$

A képlet levezetésénél eltekintettem attól, hogy a diploid szétesése során heterokarionná alakulhat, mivel ezek gyakorisága a kezdeti konidium-szuszpenzióban már eleve jelen levő heterokarionékhöz képest elenyésző.

c./ Protoplaszt fúziós módszer

Tanszékünkön többen tapasztalták, hogy a diploid kialakulási hajlam a protoplaszt fúzió sajátos körülményei között a regenerálódó fúziós termékben megnövekszik. A magyarázat valószínűleg abban rejlik, hogy a PEG- Ca^{++} együttes kezelés hatására a fúzió után létrejött heterokariotikus protoplasztok sok vizet veszítenek és ezáltal a bennük levő sejtmagok egymáshoz nyomódnak. Ez a körülmény elősegítheti a sejtmagok fúziójának nagyobb gyakorisággal történő lejátszódását.

d./ Összenyomás hiperozmotikus közegben

A módszer lényege ugyanaz, mint a c. esetben, azzal a különbséggel, hogy sokkal nagyobb tömegű sejtmagot magában foglaló heterokariotikus protoplazma is könnyen kezelhető, és hogy a vízelvonást nem PEG-gel, hanem magas CaCl_2 , illetve KCl koncentráció alkalmazásával valósítottam meg. A hiperozmózisos kezelést egyaránt alkalmaztam fiatal heterokarion tenyészetekre, valamint a belőlük képzett protoplasztokra.

e./ Hidegben tartás

Tanszékünkön a *Geotrichum candidum*-mal kapcsolatosan megfigyelték, hogy hosszabb ideig a fúzióval belőle előállított heterokarionokat hidegben tartva, azok nagy gyakorisággal diploidizálódtak. /Dr. Ferenczy Lajos: szóbeli közlés/. Ez a megfigyelés indított arra, hogy ezt a lehetőséget is kipróbáljam a *T. longibrachiatum* esetében.

f./ A heterokarion UV besugárzása

Clements és munkatársai 1969-ben az *Ustilago violacea* dikarionjait UV fénnel besugározva rendkívül erőteljes diploid gyakorisági ráta növekedést tapasztaltak /Clements és mtsi, 1969/. A jelenséget mind-

eddig még nem sikerült kielégítően megmagyarázni, ám ez nem tartott vissza attól, hogy a módszer alkalmazhatóságát a *T. longibrachiatum* esetében megvizsgáljam. Az egyes módszerek elméleti háttérének ismertetése után a következőkben részletesen ismertetem, hogy az egyes kísérleteket hogyan végeztem el:

a./ Totálizoláció: Digitoninos minimálra szélesztve a heterokarion konidium szűrletét, 100 telepet kicsésesze minimálok közepére leoltottam, majd a telepek megnövése és konidiumképzése után az egyes tenyészeteket a 40. oldalon vázolt munkasémának megfelelően levizsgáltam.

b./ Szűrési és dúsítási módszer:

A módszer lényege sematikusán a következő:

6 db 1 hetes heterokarion
/nagycsésze/

konidium teljes lemosás
80 ml sterilvízzel

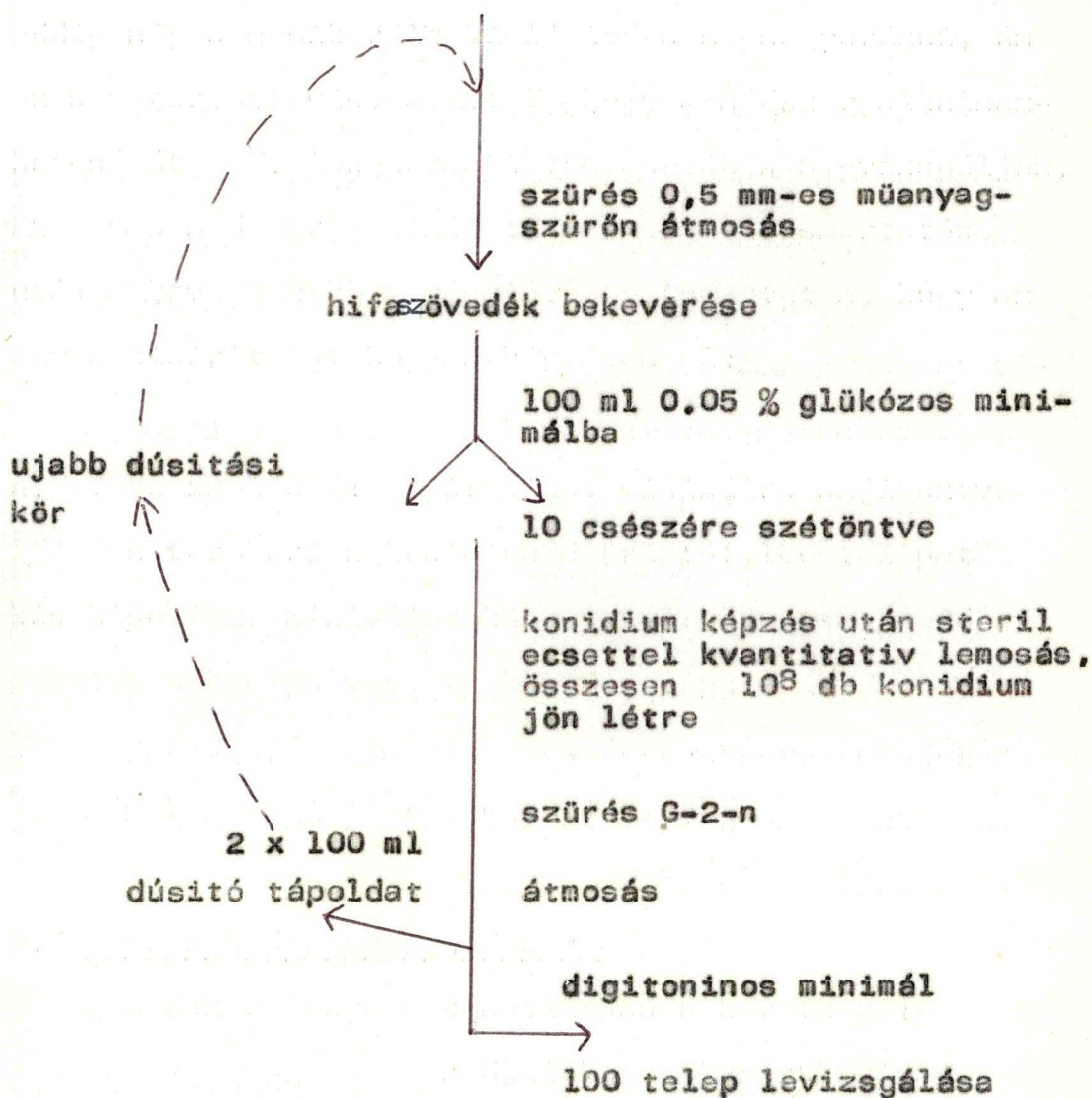
szűrés G-1-en

átmosás centrifugálással

10^9 konidium

egyenletes szétosztás
10 x 100 ml /dúsító minimálba

48 óra, 30 °C, 200 ford/perc
rázatás



c./ Protoplaszt fúziós módszer

A két partnerből protoplasztokat készítettem; a szokásos módon fuzionáltattam őket és csészénként 10^5 - 10^6 fúziós terméket konidium képzésig felnevelve, a konidiumokat digitoninos minimálra szélesztve a kinőtt telepek közül 100-at megvizsgáltam.

d./ Összenyomás hiperozmotikus közegben

1. micéliummal

A heterokarionból celofánon 24 órás micélium-szövedéket neveltem, majd a celofánnal együtt 1 M CaCl_2 oldatba helyeztem 8 órára. Ezután steril csapvizben kimostam, majd a celofánnal együtt minimál táptalajra fektettem és 40°C -ra hűtött minimál táptalajjal a tenyészetet leöntöttem. A heterokarion a vékony felülöntő rétegen könnyen átnőtt és konidiumokat termelt. A konidiumokat digitoninos minimálra szélesztve 100 telepet megvizsgáltam.

2. protoplasztal

A módszerek részben leírt módon a heterokarionból protoplasztokat készítettem 1 M illetve 1,2 M KCl-ban. 10^7 protoplasztot 4 óráig állni hagytam, majd stabilizált minimál táptalajra felülöntőben felvittem. Regeneráció és konidium képzés után a szokásos módon digitoninos minimálra szélesztettem, majd 100-100 telepet vizsgáltam meg.

e./ Hidegben tartás

Minimál felületén megnevelt heterokarionokat a konidiumképzés előtti stádiumban hűtőszekrénybe, $4-8^\circ\text{C}$ -ra helyeztem és 1 illetve 2 hónap múlva

25 °C-ra. A tenyészetek konidiumot képeztek. Digitoninos minimálra történő szélesztés után 100-100 telepet vizsgáltam.

f./A heterokarion UV besugárzása

Minimál felületén megnevelt heterokarionokat konidium képzés előtti stádiumban 45, 60, és 90 másodpercig UV fénnel besugároztam, /UV lámpa:

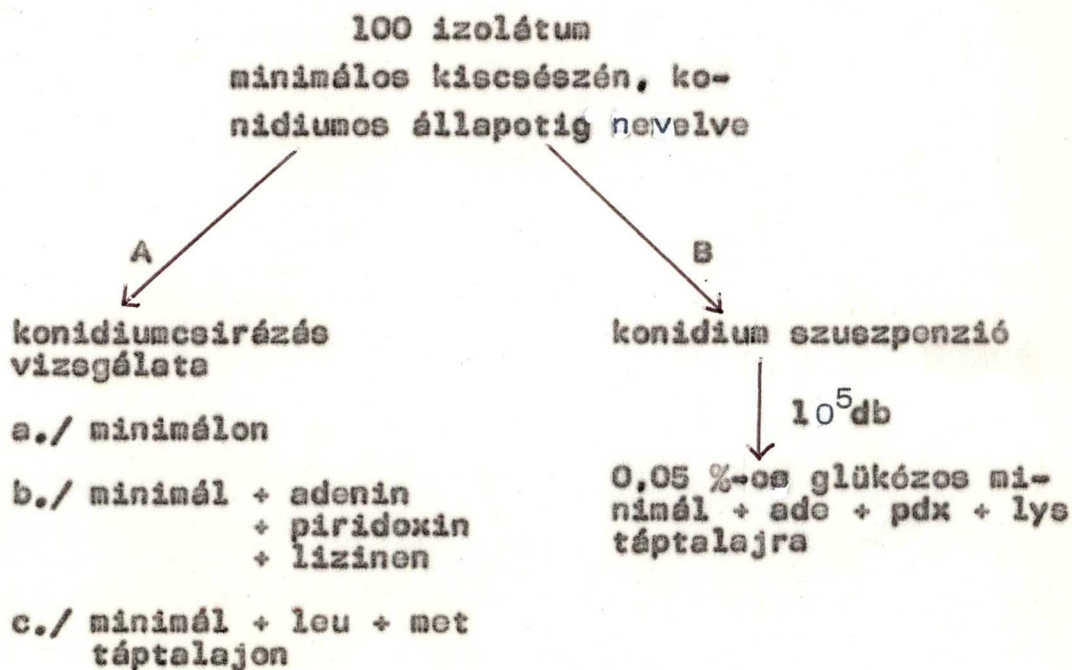
táptalaj felszín távolsága 23 cm./

Ezután hagytam, hogy konidiumokat hozzanak. A képződött konidiumokból megjelenő mennyiségeket digitoninos minimálra szélesztettem, majd 100-100 telepet megvizsgáltam.

Az a./, b./, d./, e./, f./ kísérleteket a $H70\ leu^- met^- col_6^+ ade^- pdx^- lys^- /42/$ heterokarionnal végeztem el, a c./ protoplasztfúziós kísérletet a $H80\ leu^- met^- w_1^+ ade^- pdx^- lys^- /42/$ heterokarionnal.

Valamennyi kísérlet eredményeképpen a minimálon növő telepek vizsgálata a következő módon történt:





A konidiumcsírázás vizsgálattal el lehetett dönteni, hogy a minimálön növe tenyészet heterokarion-e.

A "B" vizsgálatsorozattal egy esetleges gyors diploid képződést követő rekombinációt lehetett volna kimutatni azáltal, hogy a col_6 marker a nem rekombináns szülői genotípusra szelektív táptalajon /minimál + ade + pdx + lys/ megjelent volna, mint apró tömör telep, a szülői típusú telepek pók hálószerű szövedékének háttérén.

Valamennyi kísérlet végeredménye negatív volt, azaz sem diploidot, sem rekombinánst nem lehetett kimutatni. A szűrőes dúsítási módszer esetében a kiindulási konidium koncentráció 10^9 db volt. Ha figyelembe vesszük, hogy a módszerek lehetnek hibái és hogy a passzálás során diploid tenyészetek elveszhetnek, akkor azt lehet

mondani, hogy, ha ebből a mikroorganizmusból létezik stabil szomatikus diploid, akkor ennek gyakorisága 10^9 körüli érték.

3. Pozitív szelekciós rendszer kidolgozása

Mivel a rutinmódszerek nem vezettek eredményre, szükségessé vált egy olyan rendszer kidolgozása, amely alkalmazása a diploid telepeket a heterokarionok között morfológiai vagy növekedés intenzitásbeli különbség folytán vizuálisan közvetlenül észrevehetővé teszi.

Ilyen rendszer kidolgozására megfelelőnek mutatkozott az intracisztronikus komplementáció azon sajátossága, hogy a komplementáció során ha a két egymást komplementáló gén azonos sejtmagban van /diploid, vagy aneuploid akkor sokkal több aktív enzim képződik, mintha külön sejtmagban foglal helyet. Ennek magyarázata az, hogy ez a komplementáció típus a fehérjék negyedleges szerkezeténél érvényesül. Tegyük fel például, hogy a szóban forgó enzim dimér állapotban létezik a sejtben, tehát két teljesen azonos polipeptidlánc összekapcsolódásával jön létre a negyedleges szerkezete. Ha most a mikroorganizmusból sok olyan mutánst készítünk, amely ezen enzim struktúrgénjében sérült és a sérülés csak egy-két aminosavcserét vagy kisebb deléciót jelent, ezekből páronként heterokariont létrehozva

kaphatunk olyan kombinációkat, amely esetekben a mutáció okozta konformációs hibát a dimérré történő összeállítás valamelyest korrigálja és így a két különböző mutációt hordozó monomerekből létrejövő dimerek enzimaktivitása részben helyreáll. Ez a heterokarion növekedését bizonyos fokig már biztosítani tudja /általában a normál heterokarionok növekedésének 1-70 %-a Woodward és mtsi, 1958/.

De vajon miért eredményez magasabb aktív enzimszintet az, ha a két mutációt hordozó gén azonos sejt-magba kerül?

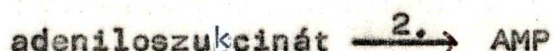
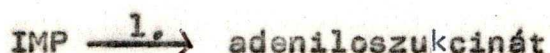
A jelenség úgy magyarázható, hogy mivel a két rossz génnek megfelelő m-RNS azonos pontból diffundál ki a citoplazmába, megnő annak a valószínűsége, hogy két különböző mutációt hordozó fehérje monomer és nem azonos mutációt hordozó álljon össze dimerre és hogy aktivitását viszonylagosan visszanyerő enzim jöjjön létre /Foley és mtsi, 1965/.

A szakirodalomban már igen sok aminosav bioszintézisben résztvevő génről kimutatták, hogy képes fehérje komplementációra. Nekem elsősorban azokkal az esetekkel volt érdekes foglalkoznom, melyekből már eleve sok mutáns állt rendelkezésemre.

Igy lizin, adenin, leucin és metionin auxotrófok. Ezek közül a metionin auxotrófok erős háttorességük

és back-mutációs hajlamuk miatt már eleve kihagyásra kerültek. A maradék három auxotrófiával kapcsolatosan a szakirodalomban több közleményt is találtam, amelyek intracisztronos komplementációról számolnak be más gombák esetében. Így *Neurospora crassa*: lys-5 /Ahmad és Catcheside, 1965/ ad-3B /de Serres, 1966/ leu-2 /Gross, 1962/ ad-8 /Ishikawa, 1962/ ad-4 /Woodward és mtsi, 1958/. Tehát mindhárom auxotrófia csoportban meg volt az esély arra, hogy céljaimnak megfelelő két törzset találjak. A munkát eleve le-
szűkíthettem biokémiai megközelítéssel. Így a lys-5 géntermék a lizin bioszintézis út első lépéséért felelős homocitrát szintetáz, tehát az ilyen mutánsok nőnek L- α -amino-adipinsavon.

Igy csak az L- α -amino-adipinsavon növő törzseket vizsgáltuk, de nem találtunk lassú heterokariont. A leucinos törzsek a heterokarion képzési vizsgálatokban túlzottan háttértesnek bizonyultak, így a figyelmem az adenines mutánsok felé fordult. Itt is mód volt előzetes biokémiai beszűkítésre, ugyanis a *Neurospora* ad-8 és ad-4 mutánsok adenin specifikusak, tehát nem nőnek hipoxantinton, viszont minden adenin specifikus mutáns vagy ad4 vagy ad-8 mutáns, mivel az IMP $\longrightarrow$ AMP bioszintézis útszakaszon már csak két enzimatis lépés van:



1. adeniloszukcinát szintetáz $\longrightarrow$ ad-8 /Neurospora/

2. adeniloszukcinát liáz $\longrightarrow$ ad-4 /Neurospora/

A rendelkezésre álló 137 adenin auxotrófból 11 bizonyult adenin specifikusnak. Ezeket páronként anasztomózisra készítetve egyetlen esetben kaptam egy lassú, eleinte pókhálószerűen növekedő heterokariont, amely hosszú, 10-12 napos inkubáció után is csak lassan vastagodott és javarészt szintelen konidiumokat fűzött le gyér számban. A két mutáns partner a 155/3 és a 89/1 jelű ade^- törzs volt. A két törzsből a már megszokott módon UV besugárzással dupla auxotrófokat állítottam elő, ezeket stabilitás vizsgálat után anasztomózissal bizonyos kombinációkban összekerezteztem, s így előállítottam a következő lassú heterokarionokat:

H_3	ade^-	155/3	lys-25	+	ade^-	89/1	leu ⁻ -12
H_4	ade^-	155/3	arg-11	+	ade^-	89/1	lys ⁻ -15
H_5	ade^-	155/3	arg-11	+	ade^-	89/1	leu ⁻ - 5
H_6	ade^-	155/3	met-2	+	ade^-	89/1	lys -15
H_7	ade^-	155/3	arg-21	+	ade^-	89/1	leu - 5

// H_1 és H_2 -ben az egyik ade^- marker revertált./

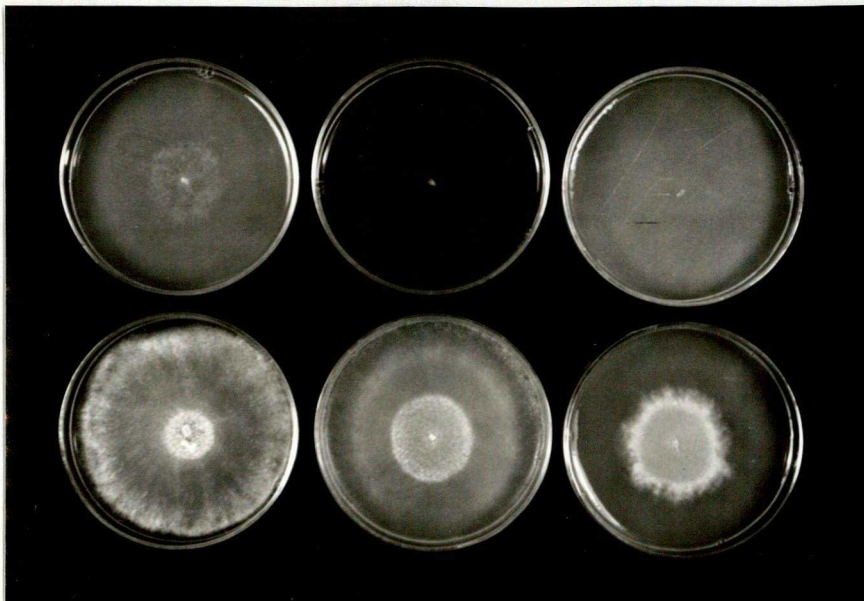
A további részletes diploid illetve rekombináció izlálására irányuló kísérleteket a H_3 -as heterokarionnal végeztem el.

A 4. ábrán látható, hogy a heterokarion hőérzékeny, de csak minimálisan, adeninnel kiegészített minimálisan már nem. A hőérzékenység egyik fő jellemzője a fehérje komplementációnak. A 155/3 és a 89/1 törzsszel végzett akkumulációs vizsgálatok arra utaltak, hogy mindkét törzse hipoxantint halmoz fel, tehát valószínűleg mindkét mutáns az adeniloszükséglet^{szintézis} aktivitásában sérült.

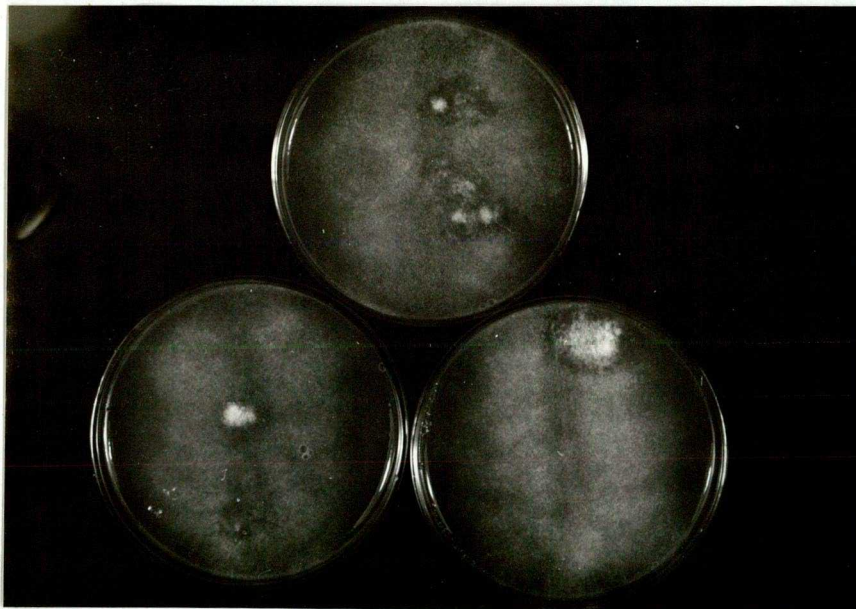
Ezek a tulajdonságok, a lassú növekedés, mely adenin jelenlétében helyreáll, a hőérzékenység és az alap törzsek hipoxantin felhalmozása arra utalt, hogy valóban intracisztronikus komplementációról van szó.

Diploid keresés a H_3 konidium szuszpenziójában:

A kísérlet megtervezésénél figyelembe vettem azt az eshetőséget, hogy esetlegesen a diploid nagyon instabil vagy csak lassan tudja reprodukálni önmagát. Ha ez a helyzet, akkor olyan heterokarionokkal dolgozva, melyeknél az 1 phialidra vonatkoztatott konidiumszám alacsony, nagyobb az esély a diploid izolálására. Ilyen megfontolásból a minimálisan megnevelt heterokarionokból kis kockákat 0,1 % glükózos



4. ábra: A 155/3 ade^- + 89/1 ade^- törzs között létrejött heterokarion hőérzékenysége.
Balról jobbra 25 °C, 30 °C, 40 °C.
Felső sor minimál táptalaj, alsó sor adeninnel kiegészített minimál.



5. ábra: A pókhálószerű heterokarionok között megjelenő "furcsa" telepek.

minimálra ültettem át a szokásos 0,5 %-os helyett, majd fényben 25 °C-on inkubáltam. Konidium érés után steril ecsettel 6 nagycsészét teljesen lemostam, 6-2-n szűrtem, majd centrifugálással átmostam. Az eredmény: $1,28 \cdot 10^9$ db konidiumot /+ klamidosporát/ kaptam.

Ezt 10 ml-ben felfuszpendáltam és 0,1 ml-enként csikban 100 nagycsésze minimál közepén átlós csikban felvittem. 6 napos 25 °C-on fényben történő inkubálás után a gyér pókhálószerű heterokariotikus micélium között $2,9 \cdot 10^{-8}$ gyakorisággal vastagabban növő, bizonyos fokig colonial morfológiájú telepek jelentek meg, melyek konidiumképzése a heterokarionokéhoz hasonlóan gyér volt /ld. 5. ábra/. A konidiumok mikroszkópiusan nem bizonyultak eltérőnek a heterokarionról izolált konidiumokhoz viszonyítva. A "furcsa" telepek konidiumtartóinak morfológiája kétségtelenül tette a faj azonosságát, befertőződésről tehát nem volt szó.

A "furcsa" telepek konidiumai nem mutattak nagyobb csírázási hajlamot minimálisan, mint a heterokarion konidiumai.

Triple rekombinációk izolálása a "furcsa" telepek konidiumai közül; bizonyíték átmeneti diploid képződésre:

A furcsa " telepek konidiumainak genotípusát a következő módon vizsgáltam meg:

steril tárgylemezre kis csepp
steril vízbe kis kacsnyi konidium → koni-
diamezám becslése /3-4000 db/

↓ hígítás 10-es léptékben
szélesztés 2 g/ml digitoninos élesztőkivonat
táptalajra /estreptomicin + OTC jelenl/

48 óra után egyes telepek képződtek, ezeket válogatás nélkül kiscsésze élesztőkivonatos táptalajok közepébe áttoltottam, majd 6 napig fényben 25 °C-on inkubáltam. Ezután levizsgáltam az egyes izolátumok növekedését a következő táptalajokon:

- A: minimál /m/
- B: m+adenin /m+a/
- C: m+a+lizin
- D: m+a+ leucin
- E: m+a+leucin+lizin

Az eredmények a következők voltak:

Izolátum	T á p t a l a j					hiánymarker
	A	B	C	D	E	
1	-	2	2	2	2	ade
2	-	-	-	+	1	ade, leu és ade leu lys
3	-	2	2	2	2	ade
4	-	-	-	+	3	ade, leu és ade leu lys

Izolátum	T á p t a l a j					hiánymarker
	A	B	C	D	E	
6	-	2	2	2	2	ade
7	-	2	3	1	1	ade
8	-	1	1	3	3	ade
9	-	-	3	-	2	ade lys
10	-	2	2	2	2	ade
11	-	1	1	1	1	ade
12	-	1	1	1	1	ade
13	/+/-	2	2	3	3	ade
14	/+/-	1	1	2	2	ade
15	-	2	3	3	3	ade
16	/+/-	3	3	3	3	ade
17	-	1	1	1	2	ade
18	/+/-	3	2	2	2	ade
19	-	2	2	3	3	ade
20	-	3	3	3	3	ade
21	-	3	3	3	3	ade
22	-	2	2	2	2	ade
23	-	-	-	3	3	ade lou
24	-	-	-	-	3	ade lys lou
25	-	2	2	2	2	ade
26	-	2	2	2	2	ade
27	-	-	1	-	2	ade lys
28	-	-	-	2	1	ade lou
29	-	-	2	-	3	ade lys
30	-	2	2	2	2	ade
31	-	-	-	2	1	ade lou
32	-	-	1	-	1	ade lys
33	/+/-	3	2	3	2	ade
34	-	2	3	1	1	ade
35	-	2	2	2	2	ade

Izolátum	T á p t a l a j					hiánymarker
	A	B	C	D	E	
36	/+/-	3	3	3	3	ade
37	/+/-	2	2	2	2	ade
38	/+/-	2	2	2	2	ade
39	-	-	-	2	2	ade leu
40	-	2	2	2	2	ade
42	-	-	2	-	2	ade lys
42	-	1	1	1	2	ade
43	-	2	2	1	2	ade
44	-	-	-	x	2	ade, leu és ade, lys, leu
45	-	-	-	1	2	ade leu
46	-	-	1	-	3	ade lys
47	-	3	3	2	3	ade
48	-	-	1	-	1	ade lys
49	-	-	-	2	1	ade leu
50	-	2	2	2	2	ade
51	-	-	-	3	3	ade leu
52	-	-	3	-	3	ade lys
53	-	-	-	3	3	ade leu
54	-	2	2	2	2	ade
55	-	3	2	2	3	ade
56	-	3	2	2	3	ade
57	-	-	-	-	1	ade lys leu
58	-	3	3	3	3	ade
59	-	2	2	2	2	ade
60	-	-	-	x	1	ade, leu és ade, lys, leu
61	-	3	2	2	3	ade
62	-	3	3	2	3	ade
63	-	2	2	2	3	ade

Jelmagyarázat:

* = a konidiumok 10-20 %-a képez csak hifát, a többi csirázatlan marad

/+/- = csak néhány "konidium" indul meg és az tipikus lassú heterokariont fejleszt

1, 2, 3, = erős növekedés növekvő intenzitással, minden konidium hifát hajt.

A táblázatból látható, hogy a legkülönbözőbb auxotróf rekombinánsokat fűzi le a "furcsa" telep, de stabil diploidot nem. Tehát az időlegesen létrejövő szomatikus diploid sejtmag rendkívül instabil. A szétesés kromoszóma veszteséssel aneuploid képződésen keresztül megy végbe. A felismerhető genotípusok a következők:

1./ $ade^- lys^- leu^-$ tripla auxotróf

/24. 57. izolátum/

2./ $ade^- leu^- \begin{smallmatrix} + \\ lys^- \end{smallmatrix}$ vagy $\begin{smallmatrix} ade^- \\ ade^- \end{smallmatrix} leu^- \begin{smallmatrix} + \\ lys^- \end{smallmatrix}$

aneuploid /2. 4. 44. 60. izolátum/

3./ $ade^- leu^-$ és $ade^- lys^-$ szülői típusok

/bár ade^- -re nézve rekombinánsok is lehetnek/

9. 23. 25. 28. 29. ... stb izolátum

4./ $\begin{smallmatrix} ade^- \\ ade^- \end{smallmatrix} +$ aneuploid

amely konidium szinten a két szülői ade^- markert

termeli és kis gyakorisággal önmagát / 13. 14. 16. 18.

33. 36. 37. 38. izolátum/

5./ A látszólag csak ade^- törzsek egy része valószínűleg $/ade^- 155/3 + ade^- 89/1/$ heterokarion, a többi pedig igazi egymarkeres ade^- genotipusú rekombináns.

A 2. típusu aneuploid gyanus telepek már élesztőkivonaton is másképp viselkednek. A telepek sokáig fehérek maradnak, konidium képzésük lassabban indul meg mint a többi telepé.

Előzetes vizsgálatok történtek már arra nézve is, hogy az egyes izolátumokban levő ade^- marker a 89/1 vagy a 155/3-e. Ennek eldöntésére a 63 izolátumot anasztomózissal megpróbáltam keresztezni mindkét ade^- törzzsel /89/1 és 155/3/. Ahol az anasztomózis egyáltalán létrejött az eredmények a következők:

Izolátum száma	jelen levő ade^- marker	teljes genotípus
2	89/1 + 155/3	$\frac{ade}{ade} leu \frac{+}{lys}$
4	155/3	$ade leu \frac{+}{lys}$
6	89/1	ade
7	155/3	ade
8	89/1	ade
10	89/1	ade
13	89/1 + 155/3	ade/ade diszom
14	89/1 + 155/3	ade/ade diszom
15	89/1	ade
16	89/1 + 155/3	ade/ade diszom
17	155/3	ade
18	89/1 + 155/3	ade/ade diszom

Izolátum száma	jelen levő ade ⁻ marker	teljes genotípus
20	89/1	ade
26	89/1 + 155/3	ade + ade heterokarion
28	89/1	ade leu /szülői/
33	89/1 + 155/3	ade/ade diszom
34	155/3	ade
36	89/1 + 155/3	ade/ade diszom
37	89/1 + 155/3	ade/ade diszom
38	89/1 + 155/3	ade/ade diszom
40	89/1	ade
41	89/1	ade lys dupla rekombináns
44	89/1 + 155/3	$\frac{ade}{ade}$ leu $\frac{+}{lys}$
45	89/1	ade leu /szülői/
47	89/1	ade
51	155/3	ade leu dupla rekombináns
52	89/1	ade lys dupla rekombináns
54	155/3	ade
56	89/1	ade
57	89/1	ade lys leu
59	89/1	ade
60	89/1	ade leu $\frac{+}{lys}$
62	89/1	ade
63	89/1	ade

Bár az adatsor még nem teljes, annyi már most is látható, hogy a 89/1 és 155/3 ade markerek ugyancsak könnyen alkotnak új típusú dupla auxotróf rekombináns, mind leu mind a lys markerrel. Valószínűnek látszik, hogy mind a három lokusz /ade, leu, lys/ más-más kromoszómán van.

Mivel a 155/3 és a 89/1 között + rekombináns nem jött létre, ez is alátámasztja, hogy a két marker vagy azonos, vagy szorosan kapcsolt és hogy valóban intracisztronikus komplementációról van szó.

A többi izolátumban levő ade markerek azonosítása ismételt anasztomózis teszttel, illetve protoplaszt fúzióval jelenleg van folyamatban.

A többi lassú heterokarion vizsgálatára a közeljövőben kerül sor.

MEGVITATÁS

A somatikus diploid konidiumok gyakorisága fajtól függően változik az egyes gombák esetében. Általában 10^{-4} és 10^{-8} közötti érték /Casselton, 1965; Day és Jones, 1968/. Ezt az értéket különböző külső agensek alkalmazásával növelni lehet. Például, ha a heterokariont kámfor gőzével kezelték, a diploid gyakoriság 10^{-10} - 10^{-3} -szorosára nőtt *Aspergillus* és *Penicillium* fajok esetében, mindamellett a kámforkezelés sok más esetben nem vált be /Barron, 1962; Berg és Garber, 1962/. A heterokarion UV besugárzása még hatásosabbnak bizonyult *Aspergillus sojae* /Ishitani és mtsi, 1956/, valamint bazidiumos *Ustilago violacea* esetében /Clements és mtsi, 1969/. Az általam kidolgozott szűréses dúsitási módszer esetleg még hatékonyabb lehet. Ennek eldöntésére a jövőben modell kísérleteket tervezek elvégezni. Kísérleteim során a sokféle módszer alkalmazása közül csak az intracisztronikus komplementáció hozta meg a kívánt eredményt a *T. longibrachiatum* Qm 9414 törzse esetében. A minimálisan nagy tömegben növő diploid és rekombináns izolálást erősen zavaró heterokariotikus elemektől többféle módon próbáltam megszabadulni /szűrés, differencial centrifugálás, csigaenzimes emésztés/, sikertelenül.

Sajnos ennek a fajnak a konidiummérete csaknem akkora, mint a klemidospóraké, így szétválasztásuk igen nehéznek tűnik. Más, apró konidiumú *Trichoderma* fajok ilyen szempontból biztatóbbak /pl. *T. harzianum*/. Mikroorganizmusom nagyon hasonló a *Neurospora crassa*-hoz. A *N. crassa* esetében nem lehetett mindeddig somatikus diploidot előállítani heterokarionok felhasználásával, hanem csak sokmarkeres törzsek segítségével a szexuális ciklus során a meiózis hibáit kihasználva /Smith, 1974/. Az így nyert diploidok rendkívül instabillnak bizonyultak.

Mivel a sejtmagok fúziója genetikailag meghatározott folyamat /Day és Day, 1974; Koltin és Raper, 1968; Byers és Goetsch, 1975/, nem kizárt az, hogy esetleg más *Trichoderma* fajokban illetve a *T. longibrachiatum* más törzseiben a somatikus diploid képződés jóval gyakoribb jelenség.

Munkáim során rutin genetikai vizsgálatok céljára a *T. longibrachiatum* Qm 9414 törzsre egy pozitív, diploidra illetve aneuploidra szelektív genetikai rendszert dolgoztam ki.

A módszer lényege, hogy az intracisztonikus komplementáció diploidban nagyságrendekkel erősebb és ezáltal a diploid növekedése jóval gyorsabb, mint a heterokarionoké /Foley és mtsi, 1965; Day és Roberts, 1969/.

Másik megközelítési lehetőség az úgynevezett sejt-maghoz között kontroll kihasználása. Többen beszámoltak arról, hogy bizonyos mutációk heterokarionban egyáltalán nem, diploidban viszont teljesen komplementálják egymást /Pontecorvo, 1963; Apirion, 1962; Roberts, 1964; Scazzocchio, 1970/. Ha ilyen mutánsokat sikerülne előállítani *T. longibrachiatum*-ból és előzőleg biokémiailag igazolni azt, hogy a komplementációra diploid esetén meg van a lehetőség, akkor egy nagyon tiszta pozitív diploid szelekciós rendszer kidolgozására nyílna mód. Ezért munkámat a jövőben ilyen irányban is folytatom.

E munka során előállított sokféle auxotróf mutáns kiterjedt komplementációs analízist tesz lehetővé ennél a törzsnél és a felhasználásukkal létrehozott heterokarionok tanulmányozása lehetőséget teremt az általa termelt celluláz komplex genetikai hátterének mélyebb tanulmányozására, melynek gazdasági jelentőségéhez nem férhet kétség.

A 155/3 és a 89/1 számú ade^- törzsek felhasználásával a legkülönbözőbb új rekombinánsok állíthatók elő és tanulmányozhatóvá vált a somatikus crossing-over. A közeljövő feladatai lesznek: a kapcsoltsági csoportok számának megállapítása, a celluláz produktivitási génnek kromoszómális lokalizálása, valamint az enzimermelés szabályozásának genetikai vizsgálata.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám főbb eredményei a következők:

1. UV mutagenézissel mintegy 900 auxotróf mutánst /köztük 2 és 3 markeres törzsek/ állítottam elő a *Trichoderma longibrachiatum* QM 9414 magas celluláz produkciójú törzsből.
2. Anasztomózissal és protoplaszt fúzióval a mutáns törzsek felhasználásával heterokarionokat hoztam létre és tanulmányoztam ezek tulajdonságait. Megállapítottam, hogy ez a gombatörzs stabil heterokarionokat képez, melyek csak konidium szinten szegregálnak a szülői törzsekre. A heterokarionok morfológiája, növekedésbeli intenzitása, konidium képzési rátája azonos a kiindulási prototróf alap törzsszel. A lefűzött konidiumok között a szülői törzsek gyakorisága 1:1.
3. A további vizsgálatokból az derült ki, hogy a *T. longibrachiatum* nem ideális rendszer a szomatikus diploid előállítására, mivel heterokarionjainak konidium szűrletében viszonylag magas $5 \cdot 10^{-5}$ gyakoriságú a heterokariotikus elem, s mivel ezek minimálisan növekedni képesek erősen megnehezítik a diploid törzs megtalálását a csészén. Totálizolációs módszerrel 500 levizsgált minimálisan növény telep közül

egyetlen egy sem bizonyult diploidnak.

4. Megpróbáltam különböző külső agensek alkalmazásával a diploid gyakoriságát növelni.

A következő módszereket alkalmaztam: szűrési dúsítás /melynek matematikai modelljét is kidolgoztam/, protoplaszt fúzió után létrejött heterokarion vizsgálata, heterokarion összenyomása hiperozmotikus közegben, hidegben tartás, a heterokarion ultrabolya fénnel történő besugárzása.

E módszerek alkalmazása nem eredményezett sem diploidot, sem rekombinánt.

5. Munkám további részében pozitív szelekciós rendszert dolgoztam ki. A módszer lényege az, hogy az intracisztronikus komplementáció diploid illetve aneuploid állapotban gyorsabb, erőteljesebb növekedést eredményez, mint heterokarionban. A rendszer kidolgozásához adeniloszukcinát szintetáz-ban sérült ade^{-} -os törzseket használtam fel. Ezek közül a 155/3 és a 89/1 jelű törzs hozott létre lassú, pókháló szerű heterokariont. Ezen törzsek mellé segéd auxotróf markereket építettem be UV mutagenézissel, majd megfelelő kombinációkban heterokarionokat hoztam létre. Ezeket adeninnel kiegészített minimál konidiumképzésre készítettem, majd a lemosott konidiumszűrletet megfelelő arányokban minimál táptalajra csikban felvittem. 6 napos inkubáció után $2,9 \cdot 10^{-8}$

gyakorisággal a csészében a normális heterokariontól kissé eltérő, valamivel vastagabban és colonialszerűbben növő "furcsa" telepek jelentek meg. Ezek közül egy telep konidiumaiból egyes tenyészeteket felnevelve lehetővé vált a furcsa telep által lefűzött konidiumok genotípusának meghatározása. Kiderült, hogy a "furcsa" telep a legkülönbözőbb rekombinánsokat termeli. Ezen kívül aneuploidokat is létrehoz, de képtelen stabil diploidot létrehozni.

Az eredmények azt mutatták, hogy a *T. longibrachiatum* Qm 9414 törzsében a sejtmagfúzió viszonylag ritka folyamat. A létrejött szomatikus diploid átmeneti, rendkívül instabil és továbbtenyésztve azonnal aneuploidokon keresztül haploid rekombinánsokat hoz létre.

FÜGGELÉK

A szűrési dúsítási módszer matematikai modellje

Tegyük fel, hogy a sejtekben levő sejtmagféleségek /diploid sejtmag, haploid vad típusú rekombináns sejtmag, auxotróf rekombináns sejtmag, szülői auxotróf sejtmag/ a heterokarion fialidjaiba gyakoriságukkal arányosan kerülnek. Ha ezenkívül még feltételezzük, hogy minden fialid függetlenül attól, hogy milyen sejtmagot tartalmaz, azonos mennyiségű konidiumot fiz le és hogy az egyes sejtmagféleségek osztódási rátája azonos, a következők adódnak:

Ha r_d = a diploid elemek gyakorisága a heterokarion által termelt telepképző egységek között és a heterokarion T db telepképző egységet termel, akkor ezek között $T \cdot r_d$ diploid van.

Jelölje γ a diploid sejtmag stabilitási rátáját, akkor ugyanezen T telepképző egység között levő haploid prototróf rekombinánsok száma két rész összegként adható meg. Egyrészt létrejönnek haploid prototróf rekombinánsok annak következtében, hogy a fialidokba kerülő diploid sejtmagok $1-\gamma$ gyakorisággal haploidizálódnak, másrészt a fialidok egy részébe már eleve haploid prototróf mag kerül, mivel a rekombináció még a testi sejtekben lejátsszódik.

Az első rész a következő módon számítható: legyen x kezdetben diploid, ϕ sejtmag a heterokarion fialidjaiban és történjék K osztódás addig az állapotig, amíg a konidium analízist végezzük, akkor igaz:

$$x \cdot K \cdot \phi = T \cdot rd \longrightarrow x = \frac{T \cdot rd}{K \cdot \phi} \quad /1/$$

ugyanakkor az ezen kezdetben diploid sejtmagok haploidizációjából eredő haploid rekombinánsok száma: $/x\text{-et } 1\text{-ből behelyettesítve}/$

$$R_1 = x \cdot K \cdot /1-\phi/ = \frac{T \cdot rd}{\phi} /1-\phi/ \quad /2/$$

Attól függően, hogy a használt markerek a kromoszómában hogyan oszlanak meg, ezek között különböző gyakorisággal lehetnek prototrófok. Ha ezt a gyakoriságot P_w -vel jelöljük:

$$P_1 = \frac{T \cdot P_w \cdot rd}{\phi} \quad /1-\phi/ \quad /3/$$

A prototrófok második része a következő módon számítható:

Mivel a fialidokba kerülő x diploid ϕ sejtmag arányos a testi sejtekben valaha is kialakuló diploid sejtmagok $/k/$ számával, akkor a fialidokba kerülő haploid rekombinánsok száma is arányos ezzel,



Mégpedig:

$$k = \gamma : X = k \cdot /1-\gamma/ : \frac{R_2}{K}$$

$$\frac{R_2}{K} = \frac{\frac{T \cdot rd}{K \cdot \gamma} \cdot k \cdot /1-\gamma/}{k \cdot \gamma} = \frac{T \cdot rd \cdot /1-\gamma/}{K \cdot \gamma^2}$$

$$R_2 = \frac{T \cdot rd \cdot /1-\gamma/}{\gamma^2}$$

$$\text{és } P_2 = R_2 \cdot P_w = \frac{T \cdot rd \cdot P_w \cdot /1-\gamma/}{\gamma^2} \quad /4/$$

Igy a T telepképző egység között

$$P = P_1 + P_2 = \frac{T \cdot P_w \cdot rd}{\gamma} /1-\gamma/ + \frac{T \cdot rd \cdot P_w \cdot /1-\gamma/}{\gamma^2}$$

$$= TP_w \cdot rd /1-\gamma/ \left[\frac{1}{\gamma} + \frac{1}{\gamma^2} \right] \text{ prototróf van.}$$

Ily módon dúsitás előtt

$$\text{Heterokarion } H_0 = rh \cdot T$$

$$\text{Diploid } D_0 = rd \cdot T$$

$$\text{Prototróf rekombináció } P_0 = T \cdot pw \cdot rd \cdot /1-\gamma/ \left[\frac{1}{\gamma} + \frac{1}{\gamma^2} \right]$$

Igy a számunkra lényeges arány:

$$\frac{D}{H + P}_0 = \frac{rd}{rh + pw \cdot rd /1-\gamma/ \left[\frac{1}{\gamma} + \frac{1}{\gamma^2} \right]}$$

Egy dúsitási kör után:

$$\frac{D}{H + P}_1 = \frac{rd \cdot \xi + rd \cdot rh}{rh^2 + pw \cdot rd \cdot /1 - \xi/ + /rh + 1/ \cdot \left[\frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} \right] \cdot pw \cdot rd / 1 - \xi /}$$

figyelembe véve, hogy a prototrófokat mostmár T.rh heterokarion termeli, illetve T.ra diploid.

Kettő dúsitási kör után:

$$\frac{D}{H + P}_2 = \frac{rd \cdot \xi^2 + rd \cdot rh \cdot \xi + rh^2 \cdot rd}{rh^3 + /rd \cdot \xi + rd \cdot rh/ \cdot /1 - \xi/ pw + pw \cdot rd / 1 - \xi / + \dots + /rh^2 + rh + 1/ \cdot \left[\frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} \right] pw \cdot rd \cdot / 1 - \xi /}$$

Három dúsitási kör után:

$$\frac{D}{H + P}_3 = \frac{rd \cdot \xi^3 + rd \cdot rh \cdot \xi^2 + rh^2 \cdot rd \cdot \xi + rh^3 \cdot rd}{rh^4 + /rd \cdot \xi^2 + rd \cdot rh \cdot \xi + rh^2 \cdot rd/ \cdot /1 - \xi / \cdot pw + pw \cdot /1 - \xi/ \cdot /rd \cdot \xi + rd \cdot rh/ + pw \cdot rd / 1 - \xi / + /rh^3 + rh^2 + rh + 1/ \cdot \left[\frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} \right] pw \cdot rd / 1 - \xi /}$$

Egyszerűsítve:

$$\frac{D}{H + P}_1 = \frac{rd \cdot \xi + rh}{rh^2 + pw \cdot rd \cdot /1 - \xi/ \left[1 + /rh + 1/ \cdot \left[\frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} \right] \right]}$$

$$\frac{D}{H+P}_2 = \frac{rd/\xi^2 + rh \cdot \xi + rh^2/}{rh^3 + pw \cdot rd \cdot /1-\xi / [1 + \xi + rh + /rh^2 +$$

$$+ rh + 1/ / \frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} /]}$$

$$\frac{D}{H+P}_3 = \frac{rd/\xi^3 + rh \cdot \xi^2 + rh^2 \cdot \xi + rh^3/}{rh^4 + pw \cdot rd \cdot /1-\xi / [1 + \xi^2 + rh \cdot \xi + rh^2 +$$

$$+ \xi + rh + /rh^3 + rh^2 + rh + 1/ / \frac{1}{\xi} + \frac{1}{\xi^2} /]}$$

Példa

Ha a diploid teljesen stabil $\xi = 1$ következésképp
 $pw = 0$ a képletek leegyszerűsödnek. Ebben az eset-
 ben, ha $pl. rd = 10^{-8}$ $rh = 10^{-4}$, akkor

$$\frac{D}{H}_0 = 10^{-4} ; \quad \frac{D}{H}_1 = 1 ; \quad \frac{D}{H}_2 = 10^4$$

Tehát már egy dúsitási kör is elegendő.

Ahmad, M. - D.G. Catcheside, 1965. In "The fungi" Volume I. /Eds. G.C. Ainsworth and A.S. Sussman/ p. 681. Academic Press.

Anne, J.-H. Eyssen, 1978. Isolation of interspecies hybrids of *Penicillium citrinum* and *Penicillium cyaneo-fulvum* following protoplast fusion. FEMS Microbiol. Lett. 4: 87-90

Anne, J.-H. Eyssen, P. De Somer, 1976. Somatic hybridisation of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. Nature 262: 719-721.

Apirion, D., 1966. Recessive mutants at unlinked loci which complement in diploids but not in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. Genetics 53: 935-941.

Baker, C.J., C.H. Whalen, D.F. Bateman, 1977. Xylanase from *Trichoderma pseudokoningii*: Purification, characterization and effects on isolated plant cell walls. Phytopathology 67: 1250-1258.

Barron, G.L., 1962. The parasexual cycle and linkage relationships in the storage rot fungus *Penicillium expansum*. Can.J.Bot. 40: 1603-1613.

Bastide, M.-E. Hadibi, J.M. Bastide, 1977. Study of the taxonomy of the genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula*: Sensitivity of the wall to endo- β -1-3/-D-glucanase Bull.Soc.Fr.Mycol.Med. 6: 163-166.

Benitez, T.- S.Ramos,-I.Garcia Acha, 1975a: Protoplasts of *Trichoderma viride*: Formation and regeneration. Arch. Microbiol. 103: 191-204.

Benitez, T.-T.G. Villa,-I. Garcia Acha, 1975b: Chemical and structural differences in mycelial and regeneration walls of *Trichoderma viride*. Arch. Microbiol. 105: 277-282.

Ben-Ghedalia, D., A. Marcipar, 1979. The effect of chemical pretreatments and subsequent enzymatic treatments on the organic matter digestibility in vitro of wheat straw. Nutr. Rep. Int., 19, 499-506.

Beraha, L., E.D. Garber, 1965. Genetics of phytopathogenic fungi XI. A genetic study of avirulence due to auxotrophy in *Penicillium expansum* by means of the parasexual cycle. Am.J.Bot., 52, 117-119.

- Berg, C.M., E.D. Garber, 1962. A genetic analysis of color mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Genetics*, 47, 1139-1146.
- Berghem, L.E.R., L.G. Pettersson, 1973. The mechanism of enzymatic cellulose degradation; Purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose. *Eur. J. Biochem.*, 37, 21-30.
- Berghem, L.E.R., L.G. Pettersson, 1974. The mechanism, of enzymatic cellulose degradation: Isolation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* 46, 295-305.
- Berghem, L.E.R., L.G. Pettersson., U.B. Axio-Fredriksson, 1975. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Characterization and enzymatic properties of a β -1,4-glucan-cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.*, 53, 55-62.
- Berghem, L.E.R., L.G. Pettersson, U.B. Axio-Fredriksson, 1976. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Purification and some properties of two different β -1,4-glucan glucanohydrolases from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.*, 61, 621-630.
- Berliner, M.D., K.A. Wenc, 1976. Protoplasts of *Cosmarium* as a potential protein source. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 436-437.
- Bessler, W.G., B. Ottenbreit, G. Irmscher, G. Jung, 1979. Interaction of membrane modifying peptide antibiotics from *Trichoderma viride* with leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 99-105.
- Betina, V., J. Spisiakova, 1976. Suppression of photo-induced sporulation in *Trichoderma viride* by inhibitors. *Folia Microbiol.* 21, 362-370.
- Betina, V., J. Zajacova, 1978a. Regulation of periodicity and intensity of photo-induced conidiation of *Trichoderma viride*. *Folia Microbiol.* 23, 453-459.
- Betina, V., J. Zajacova, 1978b. Inhibition of photo-induced *Trichoderma viride* conidiation by inhibitors of RNA synthesis. *Folia, Microbiol.*, 23, 149-168.
- Bisby, G.R., 1939. *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 23, 149-168.

- Borel, J.F., C. Feurer, H.U. Gubler, H. Stahelin, 1976. Biological effects of cyclosporin A, a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468-475.
- Brefeld, O., F. von Tavel, 1891. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mycologie. 10. Münster.
- Brown, D.E., M.A. Zainudeen, 1977. Growth kinetics and cellulase biosynthesis in the continuous culture of *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 941-958.
- Buxton, E.W. 1956. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *J.Gen.Microbiol.*, 15, 133-139.
- Byers, B., L. Goetsch, 1975. Behaviour of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 124, 511-523.
- Casselton, L.A., 1965. The production and behavior of diploids of *Coprinus lagopus*. *Genet.Res.*, 6, 190-208.
- Catcheside, D.G., 1954. Isolation of nutritional mutants of *Neurospora crassa* by filtration enrichment. *J.Gen.Microbiol.*, 11, 34-36
- Caten, C.E., A.W. Day, 1977. Diploidy in plant pathogenic fungi. *Ann.Rev.Phytopathol.*, 15, 295-318.
- Clements, L., A.W.Day, J.K. Jones, 1969. Effect of ultraviolet light on nuclear fusion in *Ustilago violacea*. *Nature*, 223, 961-963.
- Corke, A.T.K., 1974. The prospect for biotherapy in trees infected by silver leaf. *J. Hortic.Sci.*, 49, 391-394.
- Danielson, R.M., C.B. Davey, 1973a. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 485-494.
- Danielson, R.M., C.B. Davey, 1973b. Non-nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 495-504.

- Danielson, R.M., C.M. Davey, 1973c. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 505-515
- Danielson, R.M., C.B. Davey, 1973d. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma* in vitro. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 517-524.
- Davidse, L.C., W. Flach, 1977. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.*, 72, 174-193.
- Day, A.W., L.L. Day, 1974. The control of karyogamy in somatic cells of *Ustilago violacea*. *J. Cell Sci.*, 15, 619-632.
- Day, A.W., J.K. Jones, 1968. The production and characteristics of diploids in *Ustilago violacea*. *Genet. Res.*, 11, 63-81.
- Day, P.R., C.F. Roberts, 1969. Complementation in dikaryons and diploids of *Coprinus lagopus*. *Genetics* 62, 265-270.
- Dennis, C., J. Webster, 1971a. Antagonistic properties of species - groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57, 363-369.
- de Serres, F.S., 1966. The utilization of leaky ad-3 mutants of *Neurospora crassa* in heterokaryon tests for allelic complementation. *Mutat. Res.*, 3, 3-12.
- De Trogoff, H., J.L. Ricard, 1976. Biological control of *Verticillium dahliae* by *Trichoderma viride* spray on casing soil in commercial mushroom production. *Plant. Dis. Rep.*, 60, 677-680.
- De Vries, O.M.H., J.G.H. Wessels, 1972. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.*, 73, 13-22.
- De Vries, O.M.H., J.G.H. Wessels, 1973. Effectiveness of a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride* in releasing spheroplasts from fungi, particularly basidiomycetes. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 39, 397-400.

- Dhawan, S., J.K.Gupta, 1977. Enzymic hydrolysis of common cellulosic wastes by cellulase. J.Gen.Appl. Microbiol., 23, 155-162.
- Dingley, J.M., 1957. Life history studies in the genus *Hypocrea* Fr. Trans.Roy.Soc.N.Z., 84, 689-693.
- Doi, Y., 1966. A revision of Hypocreales with cultural observation I. Some Japanese species of *Hypocrea* and *Podostroma*. Bull.Nat.Sci.Mus.Tokyo, 9, 345-357.
- Doi, Y., 1968. Revision of the Hypocreales with cultural observations II. *Hypocrea dichromospora*, sp. nov. and its *Trichoderma* state. Bull.Nat.Sci.Tokyo, 11, 185-189.
- Dubos, B., J.L.Ricard, 1974. Curative treatment of peach trees against silver leaf disease /*Stereum purpureum*/ with *Trichoderma viride* preparations. Plant.Dis.Rep., 58, 147-149.
- Fajola, A.O., S.O. Alasoadura, 1975. Antagonistic effects of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum* causing the damping-off disease of tobacco in Nigeria. Mycopathologia, 57, 47-52.
- Fanelli, C., M.G.Cacace, F. Cervone, 1978. Purification and properties of two polygalacturonases from *Trichoderma koningii*. J.Gen.Microbiol. 104, 305-310.
- Fanelli, C., F. Cervone, 1977. Polygalacturonase and cellulase production by *Trichoderma koningii* and *Trichoderma pseudokoningii*. Trans.Br.Mycol.Soc., 68, 291-294.
- Foley, J.M., N.H.Giles, C.F.Roberts, 1965. Complementation at the adenylsuccinase locus in *Aspergillus nidulans* Genetics, 52, 1247-1263.
- Galun, E., 1972. Morphogenesis of *Trichoderma*: Autoradiography of intact colonies labelled by ³H N-acetylglucosamine as a marker of new cell wall biosynthesis. Arch.Microbiol., 86, 305-314.
- Ghose, T.K., 1969. Continuous enzymatic saccharification of cellulose with culture filtrates of *Trichoderma viride* QM 6a. Biotechnol.Bioeng., 11, 239-261.

- Ghose, T.K., V.Sahai, 1979. Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous-flow culture with cell recycle. *Biotechnol.Bioeng.*, 21, 283-296.
- Gong, C.S., M.R.Ladisch, G.T.Tsao, 1977. Cellobiase from *Trichoderma viride*: Purification properties, kinetics and mechanism. *Biotechnol.Bioeng.* 19, 959-982.
- Greenshpan, D., E.Galun, 1971. Morphogenesis in *Trichoderma*: Autonomous and nonautonomous pigmentation in heterokaryons of color mutants in *Trichoderma viride*. *Amer. J. Bot.*, 58, 287-291.
- Gressel, J., E. Galun, 1967. Morphogenesis in *Trichoderma*: Photoinduction and RNA. *Develop. Biol.*, 15, 575-598.
- Gressel, J.B., K.M.Hartmann, 1968. Morphogenesis in *Trichoderma*: Action spectrum of photoinduced sporulation. *Planta*, 79, 271-274.
- Griffin, H.L., J.H.Sloneker, G.E.Inglett, 1974. Cellulase production by *Trichoderma viride* on feedlot waste. *Appl. Microbiol.*, 27, 1061-1066
- Gross, S.R. 1962. On the mechanism of complementation at the leu-2 locus of *Neurospora*. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.* 48, 922-930
- Gum, E.K.Jr., R.D.Brown Jr., 1976. Structural characterization of a glucoprotein cellulase, 1,4 β -D-glucan cellobiohydrolase C from *Trichoderma viride*. *Biochim.Biophys.Acta*, 446, 371-386
- Gum, E.K.Jr., R.D.Brown Jr., 1977. Comparison of four purified extracellular 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase enzymes from *Trichoderma viride*. *Biochim. Biophys. Acta*, 492, 225-231
- Gupta, J.K., N.B.Das, Y.P.Gupta, 1972. Effect of cultural conditions on cellulase formation by *Trichoderma viride*. *Agric.Biol.Chem.*, 36, 1961-1967.
- Gupta, J.K., Y.P.Gupta, N.B.Das, 1973. Degradation of cellulosic materials by *Trichoderma viride* cellulase. *Agric.Biol.Chem.*, 37, 2657-2662
- Gupta, J.K., Y.P.Gupta, 1979. Properties of cellulase from *Trichoderma viride*. *Folia Microbiol.*, 24, 269-272.

- Hadar, Y., I. Chet, Y. Henis, 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 69, 64-68.
- Hakansson, U., L. Fagerstam, G. Pettersson, L. Andersson, 1978. Purification and characterization of a low molecular weight 1,4 β glucan glucanohydrolase from the cellulolytic fungus *Trichoderma viride* QM 9414. *Biochim. Biophys. Acta*, 524, 385-392.
- Hammill, T.M., 1970. *Paecilomyces clavisporus* sp. nov., *Trichoderma saturnisporium* sp. nov., and other noteworthy soil fungi from Georgia. *Mycologia*, 62, 107-122.
- Hammill, T.M., 1974. Electron microscopy of phialides and conidiogenesis in *Trichoderma saturnisporium*. *Am. J. Bot.*, 61, 15-24.
- Hanlin, R.T., 1965. Morphology of *Hypocrea schweinitzii*. *Am. J. Bot.*, 52, 570-579.
- Harder, P.R., J. Troll, 1973. Antagonism of *Trichoderma* spp. to sclerotia of *Typhula incarnata*. *Plant. Dis. Rep.*, 57, 924-926.
- Hasegawa, S., J.H. Nordin, S. Kirkwood, 1969. Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. I. Purification and properties of an endo- α D- β -1-3-glucanase from *Trichoderma viride*. *J. Biol. Chem.*, 244, 5460-5470.
- Hashimoto, S., T. Muramatsu, M. Futanatsu, 1971. Studies on xylanase from *Trichoderma viride*. I. Isolation and some properties of crystalline xylanase. *Agric. Biol. Chem.*, 35, 501-508.
- Hashioka, Y.-M. Komatsu, I. Arita, 1961a. *Trichoderma viride*, as an antagonist of the wood-inhabiting Hymenomycetes I. Ecology and physiology of *Trichoderma* occurring on the log-wood of *Lentinus edodes*. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 1, 1-8.
- Hashioka, Y., H. Ishikawa, M. Komatsu, I. Arita, 1961b. *Trichoderma viride*, as an antagonist of the wood-inhabiting Hymenomycetes II. A metabolic product of *Trichoderma* fungistatic to the Hymenomycetes. *Rep. Tottori Mycol. Inst.*, 1, 9-18.
- Hastie, A.C., 1962. Genetic recombination in the hop-wilt fungus, *Verticillium albo-atrum*. *J. Gen. Microbiol.*, 27, 373-382.

- Holliday, R., 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet. Res.*, 2, 231-248
- Hong, S.W., K.H. Min, Y.H. Rhee, 1976. Partial purification and some properties of cellulase components from *Trichoderma koningii*. *Korean J. Microbiol.*, 14, 84-94
- Irmischer, G., G. Bouermann, G. Boheim, G. Jung, 1978. Trichotoxin A-40, a new membrane-exciting peptide: A. Isolation, characterization and conformation. *Biochim. Biophys. Acta* 507, 470-484
- Ishikawa, T., 1962. Genetic studies of ad-8 mutants in *Neurospora crassa* II. Interallelic complementation at the ad-8 locus. *Genetics*, 47, 1755-1770
- Ishitani, C., Y. Ikeda, K. Sakaguchi, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-molds /*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*/VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2, 401-430
- Jones, D., H. Gordon, J.S.D. Bacon, 1974. Co-operative action by endo- and exo- α -1-3/ glucanases from parasitic fungi in the degradation of cell-wall glucans of *Sclerotinia sclerotiorum* /Lib./ de Bary. *Biochem. J.* 140, 47-55
- Katayama, T., H. Minato, K. Ishii, E. Kondo, 1977. A new antibiotic trichodin A. *J. Antibiot./Tokyo/*, 30, 430-431
- Kevei, F., J.F. Peberdy, 1977. Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.*, 102, 255-262
- Koltin, Y., J.R. Raper, 1968. Dikaryosis: Genetic determination in *Schizophyllum*. *Science*, 160, 85-88
- Komatsu, M., Y. Hashieka, 1964a. *Trichoderma viride*, as an antagonist of the wood-inhabiting Hymenomycetes IV. Physiological properties of the different forms of *Trichoderma* derived from the different *Hypocrea* species and soil. *Rep. Tottori Mycol. Inst.*, 4, 6-10

- Komatsu, M., Y. Hashioka, 1964b, *Trichoderma viride*, as an antagonist of the wood-inhabiting Hymenomycetes V. Lethal effect of the different *Trichoderma* forms on *Lentinus edodes* inside log-woods. Rep.Tottori Mycol. Inst. 4, 11-18
- Kumagai, T., Y. Oda, 1969, An action spectrum for photoinduced sporulation in the fungus *Trichoderma viride*. Plant. Cell. Physiol., 10, 387-392
- Kuritsyna, D.S., T.P. Sizova, 1967, New *Sporotrichum* Fr. and *Trichoderma* Fr. species isolated from works of fine art. Mikol. Fitopatol., 1, 342-344
- Lai, P., G.W. Bruehl, 1968, Antagonism among *Cephalosporium gramineum*, *Trichoderma* spp. and *Fusarium culmorum*. Phytopathology, 58, 562-566
- Lang, K.J., 1975, Experiments with fungi causing damping-off: I. Interrelation between *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. and races of pathogenic fungi in the genera *Pythium*, *Fusarium* and *Rhizoctonia*. Eur. J. For. Pathol., 5, 225-240
- Lewis, L.A., G.L. Barron, 1964, The pattern of the parasexual cycle in *Aspergillus anstelodami*. Genet. Res., 5, 162-163
- Lhoas, P., 1961, Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluoro-phenylalanine. Nature, 190, 744-
- Lhoas, P., 1968, Growth rate and haploidization of *Aspergillus niger* on medium containing p-fluorophenylalanine. Genet. Res., 12, 305-315
- Lodder, J., 1970, The yeasts /Second edition/. North-Holland, Amsterdam, 75, oldal
- Loewenberg, J.R., C.M. Chapman, 1977, Sophorose metabolism and cellulase induction in *Trichoderma*. Arch. Microbiol., 143, 61-64
- Mandels, M., L. Hontz, J. Nystrom, 1974, Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol. Bioeng. 16, 1471-1493
- Mandels, M., J. Weber, R. Parizek, 1971, Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol., 21, 152-154

- Matsumura, F., G. Mallory Boush, 1968. Degradation of insecticides by a soil fungus *Trichoderma viride*. J.Econ.Entomol., 61, 610-612
- Miller, P.M., S.Anagnostakis, 1977. Suppression of *Pratylenchus penetrans* and *Tylenchorhynchus dubius* by *Trichoderma viride*. J.Nematol., 9, 182-183
- Mills, D.I., A.H.Ellingboe, 1969. A common-AB diploid of *Schizophyllum commune*. Genetics, 62, 271-279
- Mitra, G., C.R. Wilke, 1975. Continuous cellulase production. Biotechnol. Bioeng., 17, 1-13
- Mohr, H., H.Keinkauf, 1978. Alamethicin biosynthesis: Acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. Biochim.Biophys.Acta, 526, 375-386
- Montenecourt, B.S., D.E.Eveleigh, 1977. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Appl.Environ.Microbiol., 34, 777-782
- Morozova, E.S., 1973. Biosynthesis of cellulolytic enzymes in various groups of morphological mutants of *Trichoderma viride*. Genetika, 9, 155-157
- Morozova, E.S., G.A.Trenina, E.A.Pletneva, 1975. Comparative study of mutant strains of *Trichoderma viride* producing cellulolytic enzymes. Genetika, 11, 113-120
- Morris, N.R., C.E.Oakley, 1979. Evidence that p-fluorophenylalanine has a direct effect on tubulin in *Aspergillus nidulans*. J.Gen.Microbiol., 114, 449-454
- Nakayama, M., 1975a. Changes in the multiplicity patterns of extracellular cellulase of *Trichoderma viride* with the cultural age. Mem.Osaka Kyoiku Univ. Nat. Sci.Appl.Sci., 24, 55-66
- Nakayama, M., 1975b. The possible proteolytic modification of cellulase components in the aqueous solutions of a crude enzyme preparation from *Trichoderma viride*. Mem.Osaka Kyoiku Univ. Nat.Sci.Appl.Sci., 24, 127-143

- Nevalainen, K.M.H., E.T.Palva, 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride*: unable to hydrolyze cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 11-16
- Nisizawa, T., H.Suzuki, M.Nakayama, K.Nisizawa, 1971. Inductive formation of cellulase by sophorose in *Trichoderma viride*. *J. Biochem./Tokyo/*, 70, 375-385
- Nisizawa, T., H.Suzuki, K.Nisizawa, 1972. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. *J. Biochem./Tokyo/*, 71, 999-1007
- Okada, G., 1975. Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*: II. Purification and properties of two cellulases. *J. Biochem./Tokyo/*, 77, 33-42
- Okada, G., K.Nisizawa, H.Suzuki, 1968. Cellulase components from *Trichoderma viride*. *J. Biochem./Tokyo/*, 63, 591-607
- Ooka, T., I. Takeda, 1972. Studies of the peptide antibiotic suzukacillin. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 112-119
- Ooka, T., I. Takeda, 1974. The relationship between γ -amino isobutyrate and L-valine for the suzukacillin formation. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 12-27
- Peberdy, J.F., H.Eyssen, J.Anne, 1977. Interspecific hybridization between *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium cyaneo-fulvum* following protoplast fusion. *Molec. Gen. Genet.* 157, 281-284
- Pedersen, M.W., 1975. Relative quantity and biological activity of saponins in germinated seeds, roots and foliage of alfalfa. *Crop. Sci.* 15, 541-543
- Peitersen, N., 1975a. Production of cellulase and protein from barley straw by *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 361-374
- Peitersen, N., 1975b. Cellulase and protein production from mixed cultures of *Trichoderma viride* and a yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1291-1299



- Peitersen, N., 1977. Continuous cultivation of *Trichoderma viride* on cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 337-348
- Persoon, C.H., 1794. *Dispositio metodica fungorum*. Römer's neues Mag. Bot., 1, 81-128
- Pontecorvo, G., 1963. Microbial genetics: retrospect and prospect. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.*, 158, 1-23
- Pontecorvo, G., E. Käfer, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Adv. Genet.*, 9, 71-104
- Pontecorvo, G., J.A. Roper, E. Forbes, 1953. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 8, 198-210
- Pontecorvo, G., G. Sermonti, 1954. Parasexual recombination in *Penttillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, 111, 94-104
- Pottle, H.W., A.L. Shigo, R.O. Blanchard, 1977. Biological control of wound hymenomycetes by *Trichoderma harzianum*. *Plant. Dis. Rep.*, 61, 687-690
- Quazi, H.M., 1975. Effect of cultivar and season on the concentration of saponins in lucerne /*Medicago sativa* L./ *N.Z. J. Agric. Res.*, 18, 227-232
- Reese, E.T., 1976. History of the cellulase program at the U.S. Army Natick Development Center. *Biotechnol. Bioeng. Symposium*, 6, 9-20
- Reeves, F.B., C. Horn, 1976. *Trichoderma* in Colorado. *Mycotaxon* 3, 337-344
- Rifai, M.A., 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Commonw. Mycol. Inst. Mycol. Pap.* 116, 1-56
- Rifai, M.A., J. Webster, 1966. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* II. *H. aureo-viridis* and *H. rufa* f. *sterilis* f. nov. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 49, 289-296
- Roberts, C.F., 1964. Complementation in balanced heterokaryons and heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.*, 5, 211-219
- Roper, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8, 14-15
- Roth, G., 1969. *Trichoderma viride* as a hyperparasite of a stem rot disease on sugarcane. *Phytopathol. Z.*, 65, 176-182

- Ruegger, A., M. Kuhn, H. Lichti, H.R. Loosli, R. Huguenin, C. Quiquerez, A. von Wartburg, 1976. Cyclosporin A, a peptide metabolite from *Trichoderma polysporum* /Link.ex Pers./ Rifai with a remarkable immunosuppressive activity. *Helv. Chim. Acta*, 59, 1075-1092
- Sanderson, K.E., A.M. Srb, 1965. Heterokaryosis and parasexuality in the fungus *Ascochyta imperfecta*. *Am. J. Bot.*, 52, 72-81
- Scardavi, A., F.C. Elliott, 1967. A review of saponins in alfalfa and their bioassay utilizing *Trichoderma* sp. *Mich. Agr. Exp. Stat. Quart. Bull.*, 50, 163-177
- Scazzocchio, C., 1970. Nuclear compartmentalisation in the control of gene action in *Aspergillus nidulans* *Heredity*, 25, 683
- Shoemaker, S.P., R.D. Brown Jr., 1978a. Enzymic activities of endo- β -1,4-D-glucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 133-146
- Shoemaker, S.P., R.D. Brown, Jr., 1978b. Characterization of endo- β -1,4-D-glucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biochim. Biophys. Acta*, 523 147-161
- Sierota, Z.H., 1976. Influence of acidity on the growth of *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. and on the inhibitory effect of its filtrates against *Fomes annosus* /Fr./Cke. in artificial cultures. *Eur. J. For. Pathol.* 6, 302-311
- Singh, K.P., P. Gupta, J.C. Edward, 1976. Effect of culture filtrates of rhizophete and rhizplane fungi on two important phytoparasitic nematodes. *Indian J. Microbiol.* 16, 57-60
- Sipiczki, M., L. Ferenczy, 1978. Enzymic methods for enrichment of fungal mutants: I. Enrichment of *Schizosaccharomyces pombe* mutants. *Mutat. Res.* 50, 163-164
- Smith, D.A., 1974. Unstable diploids of *Neurospora* and a model for their somatic behavior. *Genetics*, 76, 1-17

- Sternberg, D., 1976. Beta-glucosidase of *Trichoderma*: Its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 648-654
- Sternberg, D., S. Dorval, 1979. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 181-192
- Strømnaes, Ø., E.D. Garber, 1963. Heterokaryosis and the parasexual cycle in *Aspergillus fumigatus*. *Genetics* 48, 653-662
- Strømnaes, Ø., E.D. Garber, L. Beraha, 1964. Genetics of phytopathogenic fungi IX. Heterokaryosis and the parasexual cycle in *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Can. J. Bot.*, 42, 423-427
- Tabet, J.C.K., E.P. Lichtenstein, 1976. Degradation of 14C-photodieldrin by *Trichoderma viride* as affected by other insecticides. *Can. J. Microbiol.* 22, 1345-1356
- Tamura, A., H. Kotani, S. Naruto, 1975. Trichoviridin and dermadin from *Trichoderma* sp. Tk.-1 *J. Antibiot./Tokyo/*, 28, 161-162
- Tate, W.P., C.T. Caskey, 1973. Peptidyltransferase inhibition by trichodermin. *J. Biol. Chem.* 248, 7970-7972
- Tinline, R.D., 1962. *Cochliobolus sativus*. V. Heterokaryosis and parasexuality. *Can. J. Bot.*, 40, 425-437
- Traber, R., M. Kuhn, A. Ruegger, H. Lichti, H.R. Loosli, A. von Wartburg, 1977. The structure of cyclosporin C. *Helv. Chim. Acta*, 60, 1247-1255
- Tsunoda, A., T. Nagaki, Y. Sakano, T. Kobayashi, 1977. Purification and properties of an exo- α -1,3 glucanase from *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.*, 41, 939-944
- Tulasne, L.R., C. Tulasne, 1865. *Selecta Fungorum Carpologia*, III. Paris.
- Tuveson, R.W., D.O. Coy, 1961. Heterokaryosis and somatic recombination in *Cephalosporium mycophyllum* *Mycologia*, 53, 244-253

- Typas, M.A., J.B. Heale, 1978. Heterozygous diploid analyses via the parasexual cycle and a cytoplasmic pattern of inheritance in *Verticillium* spp. *Genet.Res.*, 31, 131-144
- Vilela, L.C., A.R.Torillo, A.T.De Ocampo, E.J. Del Rosario, 1977. Cellulase production in semisolid cultures of *Trichoderma viride*. *Agric.Biol. Chem.*, 41, 235-238
- Webster, J., 1964. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* I. Comparison of perfect and imperfect states of *H. gelatinosa*, *H.rufa* and *Hypocrea* sp.l. *Trans.Br.Mycol.Soc.*, 47, 75-96
- Webster, J., R.Hale, 1972. Perithecia of *Hypocrea rufa* in soil plates. *Trans.Br. Mycol.Soc.*, 58, 531-532
- Winman, D., E.Galun, 1969. Complementation in nonconidiating mutants of *Trichoderma*. *J. Bacteriol.*, 99, 802-806
- Wood, T.M., 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*: Separation of components attacking native cotton. *Biochem. J.*, 109, 217-227
- Wood, T.M., S.L.McCrae, 1972. The purification and properties of the C₁ component of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochem.J.*, 128, 1183-1192
- Wood, T.M., S.Mc Crae, 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*: Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochem.J.*, 171, 61-72
- Woodward, D.O., C.W.H.Partridge, N.H.Giles, 1958. Complementation at the ad-4 locus in *Neurospora crassa*. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.* 44, 1237-1244

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte köszönetet mondok mindazoknak, akik munkámban valamilyen módon támogattak. Külön köszönet illeti Dr. Ferenczy Lajos tanszékvezető docenst értékes szakmai tanácsaiért, Kórácz Lászlónét és Nagy Lajos Gergelyt hozzáértő technikai segítségükért.