B3599

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

Gombaparazita *Trichoderma* törzsek biokémiai jellemzése és genetikai transzformációja

készítette

Antal Zsuzsanna

Témavezetők

dr. Ferenczy Lajos, dr. Manczinger László

József Attila Tudományegyetem

Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED

1999

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke:

ATCC:	American Type Culture Collection
atp9:	ATP szintetáz 9. alegységének génje
cob:	apocitokróm b génje
DNS:	dezoxiribonukleinsav
kbp:	kilóbázispár
MU:	metilumbelliferon
mtDNS:	mitokondriális DNS
ndh5:	NADH-dehidrogenáz 5. alegységének génje
OTC-áz:	ornitin-karbamoil transzferáz
rnl:	nagy riboszómális alegység RNS-ének génje
RNS:	ribonukleinsav
rns:	kis riboszómális alegység RNS-ének génje
TIR szekvencia:	terminal inverted repeat (végálló helyzetű, fordított sorrendben megismételt) szekvencia
tRNS:	transzfer (szállító) RNS
UV:	ultraibolya fény
U:	enzim egység

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS 2
II. ELMÉLETI HÁTTÉR 4
II.1. A *Trichoderma* nemzetség általános jellemzése 4
II.2. *Trichoderma* törzsek alkalmazása a növényvédelemben 6
II.3. Fonalasgombák transzformációja 8
II.4. A mitokondriumok általános jellemzése 11
II.4.1. Gombák mitokondriális DNS-ének általános jellemzése 11
II.5. Fonalasgombák mitokondriális plazmidjainak általános jellemzése 13
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 16
III.1. Alkalmazott törzsek és tenyésztési körülményeik 16
III.2. A transzformációs kísérletekben alkalmazott plazmidok 17
III.3. A mtDNS funkcionális térképezéséhez használt heterológ génpróbák 17
III.4. Mikrobiológiai és enzimológiai módszerek 18
III.5. Molekulárisbiológiai módszerek 23
IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS 26
IV.1. *Trichoderma* törzsek izolálása, extracelluláris enzim termelési, és *in vitro* antagonizmus vizsgálata 26
IV.1.1. *Trichoderma* törzsek vizsgálata 20°C-on 26
IV.1.1.1. *Trichoderma* törzsek izolálása 26
IV.1.1.2. *Trichoderma* törzsek enzim termelésének vizsgálata 26
IV.1.1.3. *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizáló képessége növénypatogén gombákkal szemben 27
IV.1.2. Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek vizsgálata 28
IV.1.2.1. *Trichoderma* törzsek izolálása, hidegtűrő törzsek kiválasztása 28
IV.1.2.2. A hidegtűrő *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizáló képessége növénypatogén gombákkal szemben 29
IV.1.2.3. A hidegtűrő *Trichoderma* törzsek ß-glükozidáz, exokitináz és proteináz termelése valamint ezek aktivitása alacsony hőmérsékleten 31
IV.2. *Trichoderma* törzsek nemesítése UV mutagenezissel 35
IV.2.1. Mutánsok előállítása UV mutagenezissel 35
IV.2.2. *In vitro* antagonizmus vizsgálatok 37
IV.2.3. Enzimtermelési vizsgálatok nem induktív és induktív körülmények között 38
IV.3. Transzformációs kísérletek 41
IV.3.1. Hygromycin B rezisztencia 43
IV.3.2. Uracil auxotrófia komplementáció 45
IV.3.3. Arginin auxotrófia komplementáció 51
IV.3.4. Jelző gén alkalmazása 54
IV.4. *Trichoderma* törzsek mtDNS-ének jellemzése 59
IV.4.1. *Trichoderma* törzsek mtDNS-ének restrikciós mintázata 59
IV.4.2. A mtDNS részletes vizsgálata a *Trichoderma harzianum* T95 törzs esetében 61
IV.4.2.1. A *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének fizikai tulajdonságai 61
IV.4.2.2. A *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének funkcionális elemzése 66
IV.5. A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális plazmidjának vizsgálata 70
IV.5.1. A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális plazmidjának fizikai tulajdonságai 70
IV.5.2. A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális plazmidjának funkcionális elemzése 72
V. ÖSSZEFOGLALÁS 77
VI. SUMMARY 81
VII. IRODALOMJEGYZÉK 85
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 97

I. BEVEZETÉS

Bár a mikroorganizmusok mindennapi életben való alkalmazásának gyakorlata hosszú évszázadokra nyúlik vissza, a molekuláris biológia fejlődése csak az utóbbi évtizedekben tette lehetővé biológiai és genetikai tulajdonságaik alaposabb megismerését, képességeik genetikai módosítással való kiterjesztését, melyek hatására felhasználásuk mértéke robbanásszerű növekedésnek indult.

A mezőgazdasági és ipari szempontból egyaránt jelentős mikroorganzimusok közé tartoznak a *Trichoderma* fonalasgomba nemzetség tagjai. Gyakorlati felhasználásukat tekintve, kiemelkedő növénypatogén gombákkal szembeni antagonista képességük. Több izolátummal végeztek szántóföldi vizsgálatokat, melyek során megfigyelték, hogy csökkent a megbetegedett növények száma, a betegség intenzitása, s ennek megfelelően növekedett a terméshozam. E tulajdonságukkal a környezetet és az emberi egészséget egyaránt veszélyeztető kémiai növényvédelem alternatíváját nyújtják. Mezőgazdaságban történő gyakorlati felhasználásukra már többféle *Trichoderma* tartalmú készítmény kapható a kereskedelemben. Ipari szempontból extracelluláris enzimtermelő képességüket vizsgálják illetve hasznosítják, különös tekintettel celluláz és xilanáz enzimrendszereikre.

A változatos mezőgazdasági környezethez, ipari elvárásokhoz legjobban illeszkedő *Trichoderma* törzsek izolálása és nemesítése, az antagonista képességeknek és extracelluláris enzimek termelődésének vizsgálata, a rokonsági viszonyok tisztázása, valamint a törzsazonosításra alkalmas markerek kutatása napjainkban is folyik. E témákhoz kapcsolódik kutatócsoportunk munkája, melynek során célul tűztük ki:

- törzsek izolálását, saját törzsállomány létrehozását,
- a törzsek extracelluláris enzimei termelődésének és *in vitro* antagonista képességeiknek vizsgálatát,
- az extracelluláris enzimtermelés és az antagonista képességek UV mutagenezissel történő fejlesztését,
- transzformációs rendszerek kiépítését, a heterológ génexpresszió, és az idegen DNS beépülésének tanulmányozását,

- a mitokondriális DNS szerveződésének vizsgálatát, valamint
- a mitokondriumban általunk felfedezett plazmid fizikai térképezését és funkcionális elemzését.

II. ELMÉLETI HÁTTÉR

II.1. A *Trichoderma* nemzetség általános jellemzése

Rendszertan. A *Trichoderma* nemzetség tagjai mikroszkópikus fonalasgombák, melyek teleomorf alakjai az *Ascomycota* törzs *Euascomycetes* osztálya *Pyrenomycetes* alosztályának *Hypocreales* rendjébe, a *Hypocreaceae* családba tartoznak. Heterotallikusak, a szexuális folyamathoz két párosodási típus szükséges. Anamorfjaikat, melyeknél az ivaros szakasz hiányzik, korábban a *Deuteromycota* törzs *Hyphomycetes* osztályába, újabban a fent említett *Hypocreaceae* családon belül elkülönített mitospórás *Hypocreaceae* egységbe sorolják (a Nemzetközi Biotechnológiai Információs Központ rendszertani honlapja: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html). A nemzetségbe tartozó fajok első átfogó, morfológiai bélyegeken alapuló rendszerét Rifai (1969) dolgozta ki, aki a fajok morfológiai variabilitása, két faj között átmenetet képező formák sora, valamit különböző *Hypocrea* fajok *Trichoderma* alakjainak egymáshoz hasonló morfológiai megjelenése miatt a határozásban fajcsoportok használatát javasolta. Azóta a rendszeren több finomítást eszközöltek, de a fajok elkülönítése és rokonsági viszonyaik pontos feltérképezése még továbbra is folyamatban van. Tekintve hogy e dolgozatban leírt munkák nem rendszertani jellegűek, és a nemzetközi folyóiratokban elfogadott a közleményekben szereplő *Trichoderma* törzsek Rifai (1969) rendszere szerint történő besorolása, a törzsek meghatározásánál ezt a határozókulcsot alkalmaztuk.

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

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

A genetikai módosítás lehetőségei. Mivel a szexuális ciklus a legtöbb *Trichoderma* fajnál hiányzik, és ahol mégis megfigyeltek ivaros szaporodást, laboratóriumi körülmények között nem, vagy nehezen volt reprodukálható, genetikai összefüggések vizsgálatára, megváltozott tulajdonságú törzsek előállítására a klasszikus rekombináns nyerési mechanizmusok helyett a mutagenezist, a protoplasztfúziót és a transzformációt alkalmazzák. A mutagenezisnél, illetve a gombák paraszexuális ciklusa során bekövetkező rekombinációs eseményeket kihasználó protoplasztfúziónál a véletlen igen nagy szerepet játszik az utódok tulajdonságainak kialakításában, így az egyes gének transzformációval történő bejuttatása lényegesen egyszerűbbé teszi vizsgálatukat illetve a célzott törzsátalakításokat. A szabadföldi felhasználás céljából végzett törzsátalakításoknál azonban mindenképpen figyelembe kell venni, az idegen DNS-t tartalmazó törzsek alkalmazását korlátozó jogszabályokat.

Jelentőség. A *Trichoderma* nemzetség tagjainak ökológiai jelentőségét az adja, hogy csaknem minden, szerves anyagot tartalmazó talajban és természetes élőhelyen megtalálhatóak, és az élő szervezetek hulladékanyagainak lebontásával résztvesznek a biogén elemek körforgalmában. Gyakorlati szempontból nevük sokszor merül fel növénypatogén gombákkal szembeni antagonizmusuk révén, de igen jelentős cellulóz bontó képességük is. A *T. reesei* olyan enzimkomplexet termel, mely még a kristályos állapotban levő cellulózt is képes lebontani glükózig (Kubicek, 1992). Ez a tulajdonsága felhasználható cellulóz tartalmú anyagok hasznosítására, például fermentálható cukrok szalma és fa hulladékból történő előállítására (Zayed és Meyer, 1996), a cukorrépa feldolgozásából származó melléktermékek állati takarmányozásban való felhasználására (Nigam, 1994), de alkalmazható a papíriparban is, fapépek fehérítésére (Buchert és mtsai, 1994). Ipari méretekben termeltetett xilanázait felhasználják az élelmiszer-, és a papíripar, valamint a takarmányozás területén (Haltrich és mtsai, 1996). Molekuláris biológiai kutatásokban a *Trichoderma* enzimeket tartalmazó Novozyme 234 készítményt protoplasztok előállítására alkalmazzák.

Mindezek mellett a *Trichoderma* törzsek károkozásáról is jelentek meg közlemények. Bár a *Trichoderma* nemzetség tagjai az emberi egészségre általában veszélytelenek,

legyengült immunredszerű, szervátültetésen átesett emberek esetében már figyeltek meg halálos kimenetelű fertőzéseket, melyeket *Trichoderma longibrachiatum* illetve *Trichoderma pseudokoningii* törzsek okoztak (Gautheret és mtsai, 1995a, 1995b; Richter és mtsai, 1999). Ezen kívül az étkezési gombák termesztésével foglalkozó gazdálkodók számoltak be, elsősorban csiperke gombákat támadó, zöld penész okozta betegségről, ami a legtöbb esetben *Trichoderma* törzseknek volt tulajdonítható (Castle és mtsai, 1998; Mumpuni és mtsai, 1998).

II.2. *Trichoderma* törzsek alkalmazása a növényvédelemben

Az első *in vitro* és szabadföldi kísérletek óta nagy számban jelentek és jelennek meg közlemények a *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombákkal szembeni hatékony antagonizmusáról. A kísérletek eredményeiről időnként összefoglaló munkák készülnek (Papavizas, 1985; Sivan és Chet, 1992; Lumsden, 1992), de folyamatosan jelennek meg az új cikkek is (Chambers és Scott 1995; Naár és Kecskés 1995; Carver és mtsai, 1996; Kok és mtsai, 1996; Tattar és mtsai, 1996; Grondona és mtsai, 1997; Bailey és Gilligan 1997; Abraham és Gupta, 1998; Das és mtsai, 1998; Antal és mtsai, 1999a), melyekből kitűnik hogy (a teljesség igénye nélkül) *Armillaria mellea, Corticium rolfsii, Cryphonectria parasitica, Cytospora rubescens, Fusarium culmorum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Helminthosporium sativum, Macrophomina phaseolina, Phymatotrichum omnivorum, Phytophthora cinnamomi, Phytophthora citricola, Pythium aphanidermatum, Phytium ultimum, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Sclerotinia trifoliorum, Sclerotium cepivorum, Sclerotium delphinii, Sclerotium rolfsii, Stereum purpureum, Typhula incarnata, Ustilago hordei* és *Verticillium dahlia* patogén gombák által parazitált borsó, burgonya, búza, cukorrépa, dohánypalánta, gesztenyefa, görögdinnye, gyapot, hagyma, kukorica, őszi árpa, őszibarackfa, padlizsán, paradicsom, retek, sárgadinnye, szamóca, szegfű, szilvafa és uborka növények megbetegedésének mértékét csökkentették sikeresen az alkalmazott *Trichoderma* törzsek. Az antagonizmus vizsgálatokban a *Trichoderma hamatum*, *T. harzianum* és *T. viride* fajcsoportba tartozó törzsek bizonyultak leghatékonyabbnak, de *T. koningii, T. polysporum* és *T. pseudokoningii* törzsekkel is folytak sikeres kísérletek. Egy ideje már a kereskedelemben is

megjelentek *Trichoderma* tartalmú készítmények, mint például a Bio-Fungus, Binab T, RootShield, T-22G, T-22 Planter Box, Bio-Trek, Promote, Supresivit, Trichodex, Trichopel, Trichoject, Trichodowels, Trichoseal, és a Trichoderma 2000 (a Beltsville Mezőgazdasági Kutató Központ honlapja: http://www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bpdlprod/bioprod.html).

Az antagonizmus hatásmechanizmusa. A *Trichoderma* törzsek más gombákkal szembeni antagonizmusának több eleme különböztethető meg (Papavizas, 1985; Sivan és Chet, 1992). Számos izolátum esetében figyelték meg antibiotikumok termelését, melyek növekedésükben gátolták illetve elpusztították az arra érzékeny törzseket. Extracelluláris enzimeik segítségével a *Trichoderma* törzsek résztvesznek az elhalt szerves anyagok lebontásában, így mint táplálék-konkurensek visszafogják a fakultatív parazita gombák (pl. *Rhizoctonia*, *Fusarium* fajok) terjeszkedését, illetve fás növények sérült, elhaló szöveteiben megtelepedve, védelmet nyújthatnak sebparaziták okozta betegségekkel szemben. Végül, az igazán hatékonynak bizonyuló törzsek esetében, a mikoparazitizmus jelenségét is megfigyelték, mely több részből álló, összetett folyamat. Első lépésként a parazita törzs kémiai ingerek alapján érzékeli a megtámadásra alkalmas gomba jelenlétét, és növekedni kezd irányába. A találkozást követően a célbavett gombafonál mellett hosszanti irányban kezd növekedni, vagy hifáival többszörösen körécsavarodik, majd a megcélzott gomba sejtfalában lévő lektinek indukciós hatására megkezdődik a vékony szívóhifák differenciálódása (Inbar és Chet, 1992). Gombasejtfal-bontó enzimeivel részlegesen emészti a megcélzott hifát, majd a képződött lyukon behatol, és áldozata belsejében növekedve hasznosítja annak tápanyagait, ezzel pusztulását okozva. Az extracelluláris enzimek hatását növelhetik az antagonista gomba által termelt antibiotikumok, a megtámadott gomba sejtfalépítő enzimeinek gátlása révén (Lorito és mtsai, 1996).

A *Trichoderma* törzsek antagonizmusában, gombasejtfal-bontó és spóra-csírázás gátló aktivitásuk révén, kiemelkedő szerepet játszanak extracelluláris β-1,3 glukanáz, kitináz és proteináz enzimrendszereik (Sivan és Chet, 1989; Geremia és mtsai, 1993; Lorito és mtsai, 1994; Elad és Kapat, 1999), melyek részletes tanulmányozásával kapcsolatban számtalan publikáció jelent meg (Inbar és Chet, 1995; Haran és mtsai, 1996a; Benhamou és Chet, 1997;

Vázquez-Garcidueñas és mtsai, 1998; De La Cruz és Llobell, 1999; Soler és mtsai, 1999; Zeilinger és mtsai, 1999). Emelkedett enzimszekréciót, megnövekedett antagonista képességeket mutató törzsek létrehozására kiterjedt kutatások folynak (Manczinger és mtsai, 1994; Meza és mtsai, 1995; Flores és mtsai, 1997; Giczey és mtsai, 1998; Carsolio és mtsai, 1999).

II.3. Fonalasgombák transzformációja

Módszerek. Az idegen DNS célsejtbe juttatásának nehézségei és így technikai kivitelezése eltérő a különböző élőlényekben. Fonalasgombákban a sejtfal jelenti a legnagyobb problémát. Az első gomba-transzformálásról beszámoló cikk 1973-ban jelent meg (Mishra és Tatum, 1973). Itt egy inozitolt igénylő *Neurospora crassa* mutánst transzformáltak a vad típusú törzsből nyert DNS-sel. Ez a rendszer azonban nem volt alkalmas arra, hogy szélesebb körben elterjedjen, mivel a DNS felvételét a mutáns törzs inozitol éheztetés hatására fellazult sejfala és -membránja tette lehetővé. Igazi áttörést a sejtfaluktól megfosztott gombasejtek, a protoplasztok alkalmazása hozott. Először 1978-ban figyelték meg, hogy $CaCl_2$ és PEG jelenlétében az íly módon előkészített élesztősejtek könnyebben fel tudják venni a DNS-t (Hinnen és mtsai, 1978). Ezután egyre több fajra írtak le protoplaszt-képzési technikákat.

A protoplasztálási technika mellett történtek erőfeszítések a DNS sejtbe juttatása alternatív módozatainak kifejlesztésére is (Fincham, 1989). Ilyenek például a nagy ozmotikus nyomással szemben érzékeny mutánsok kialakítása, a transzformálandó sejtek DNS és üveggyöngy jelenlétében történő erőteljes keverése, a DNS-t közvetlenül a sejtmagba juttató mikroinjekció, vagy DNS-sel bevont wolfram mikrolövedékek sejtbe lövése. Ezek a technikák azonban nem mutatkoztak eredményesebbnek, így fonalasgombák esetében mind a mai napig a protoplasztok transzformációja maradt az általánosan alkalmazott módszer.

Szelekció (Fincham, 1989). A plazmidot felvett sejteknek, nem transzformáns jellegű társaik közül való kiválasztására, a plazmid által hordozott gén expressziójával megnyilvánuló tulajdonság nyújt lehetőséget. 1. Domináns szelekciós markerek esetében, megfelelő

szelekciós táptalajon, csak a transzformáns telepek képesek növekedésre. A géntermék vagy valamilyen gátló szerrel szemben nyújt rezisztenciát, vagy auxotróf törzsek anyagcsere-útjának sérült illetve hiányzó elemét pótolja. 2. Vizuális szelekció esetén minden életképesen maradt sejt telepet képez, azonban megfelelő körülmények között a transzformációval bejuttatott gén expressziója szemmel látható módon megváltoztatja a transzformáns telepek megjelenését. 3. A kotranszformációs módszer, a szelekciós lehetőséget nem nyújtó plazmidot tartalmazó transzformánsok kiválasztását könnyíti meg. Lényege, hogy a külső DNS felvételére csak a protoplasztok egy része képes, viszont ezekbe a folyamat során egyszerre több molekula is bejuthat, ennek köszönhetően jó eséllyel fogják mindkét féle plazmidot hordozni. Így ha a kérdéses plazmiddal együtt alkalmazunk egy másik, szelekcióra alkalmas plazmidot, a második plazmidra nézve transzformáns tulajdonságú telepek között nagy számban lesznek az első plazmidot is tartalmazók.

A transzformánsok stabilitása. A transzformációval sejtbe juttatott plazmidok kétféle módon maradhatnak fenn. Egyrészt tartalmazhatnak olyan szekvencia elemeket, melyek gombákban replikációs origóként viselkedve biztosítják a plazmidmolekulák önálló megsokszorozódását, másrészt beépülhetnek a genomba, s így a sejt saját DNS-ével együtt készülnek róluk az utódsejtekbe átkerülő másolatok.

1. Fonalasgombákban önálló replikálódásra képes plazmidok előállítását kromoszómális, mitokondriális és mitokondriális plazmid eredetű szekvenciákból is megkísérelték már.

- *Neurospora crassa* genomjából származó fragmentek ugyan nyújtottak némi korlátozott önállóságot a hordozó plazmidnak, azonban a vegetatív növekedés során ez nem bizonyult elegendőnek, és a viszonylag nagyra megnövő telepek végül is elveszítették transzformáns jellegüket (Buxton és Radford, 1984). *Aspergillus nidulans* genomjából önállóan replikálódó szekvenciák keresése során izolált, a transzformációs gyakoriságot jelentősen emelő *ans1* szekvenciáról kiderült, hogy hatását éppen a beépülés elősegítésével fejti ki (Ballance és Turner, 1985). A szintén *Aspergillus nidulans* génbankból származó AMA1 fragment amellett hogy jelentősen megnövelte transzformáció gyakoriságát, a vegetatív növekedés során is képes volt autonóm replikációval fennmaradni, bár a konídiumokba

jutása csak 35%-os volt (Gems és mtsai, 1991). Ezt a szekvenciát azóta sikeresen alkalmazták génklónozásra, *A. niger*-ben (Verdoes és mtsai, 1994).

- Bár *Podospora anserina* illetve *Cephalosporium acremonium* mitokondriális DNS-éből, valamint *Podospora anserina* mitokondriális plazmidjából származó szekvenciát hordozó, önálló replikálódásra képes plazmidokról szintén jelentek meg közlemények (Stahl és mtsai, 1980; Stahl és mtsai, 1982; Tudzynski és Esser, 1982), további vizsgálatukról nincs tudomásunk.

2. A gombasejtben replikációra nem képes plazmidok sorsa kétféle lehet. Abban az esetben, ha nem épülnek be a gazdasejt genomjába, számuk nem növekszik, így az egyre több sejtből álló telep genetikai állományából "kihígulnak". Ekkor a transzformáns törzsek növekedése szelektív körülmények között igen lassú, végül leáll. Ezek az úgynevezett "abortív" transzformánsok. Abban az esetben, ha a homológiát mutató szekvenciáknál beépülnek a gazdasejt genomjába, a transzformáns többnyire stabil lesz, bár a plazmid kivágódásával vagy mutációjával ekkor is elveszhet a transzformáns jelleg. A plazmidbeépülésnek gombákban négy típusa különíthető el (Fincham, 1989):

- Homológ hozzáadódó beépülés: a genomban előforduló homológ helyre beépül az egész plazmid. Ilyenkor a beépülés helyén kétoldalt elhelyezkedő homológ szekvenciák közrefogják a plazmid többi részét.
- Homológ áthelyeződés: a genomban előforduló homológ helyre csak az a része épül be a plazmidnak, mely homológiát mutat vele.
- Szétszórt beépülés: a genomban található rövid kis homológ szakaszok hatására, több különböző helyen jön létre egyszerre a beépülés.
- Tandem ismételt beépülés: több plazmid egység ugyanazon helyre történő fej-farok beépülését jelenti. Ez a típus kétféle módon jöhet létre. Lehetséges hogy a plazmid egységek először cirkuláris oligomereket képeznek és csak ezután épülnek be, de egy plazmid egység beépülését is követheti továbbiak homológ integrálódása.

II. 4. A mitokondriumok általános jellemzése

Az oxidatív foszforiláció helyszínéül szolgáló mitokondriumok, a sejtek citoplazmájában elhelyezkedő gömb, ovális vagy pálcika alakú sejtorganellumok, melyek nagysága a néhány mikrométeres nagyságrendbe esik. Felépítésükben két membrán vesz részt, egy sima felszínű külső, és egy redőkkel, nyúlványokkal erősen tagolt belső. Ez utóbbiba ágyazódva találjuk a légzési lánc négy enzimkomplexét, melyek a tápanyagokból származó elektronok áthaladásakor elvégzik az ADP molekulák ATP-vé történő foszforilációját. A belső membrán által határolt félfolyékony mátrix nyújt teret a mitokondrium saját fehérjeszintetizáló rendszerének, tRNS-eknek, a prokariótákéhoz hasonló riboszómáinak, valamint a mitokondriális DNS-nek. Ezek léte megerősíti a mitokondriumok eredetére felállított endoszimbionta elméletet (Gray, 1989), mely egy ősi eukarióta sejt által egykoron bekebelezett, majd azzal szimbiózist kialakító baktériumtól eredezteti e sejtorganellumokat. Az idők folyamán e baktériumból, genetikai állománya nagy részének sejtmagba történő átáramlásával és ezzel együtt önállóságának csökkenésével alakult ki a ma ismert sejtorganellum (Saccone, 1994), melynek DNS állománya a felépítéséhez és működéséhez szükséges fehérjéknek mindössze 5%-át kódolja (Lloyd, 1974). Bár a nem sejtmaghoz kötött örökítő anyag létezését már 1949-ben kimutatták (Ephrussi és mtsai, 1949), a mitokondriális DNS felfedezése még tizenöt évet váratott magára (Schatz és mtsai, 1964).

II.4.1. Gombák mitokondriális DNS-ének jellemzése

Az eukarióta szerveződésű élőlények mtDNS-ének nagyságát vizsgálva, igen nagy méretbeli különbségekkel találkozhatunk. A viszonylag kicsi állati (9-34 kbp) és a nagy növényi (218-2400 kbp) genomok mellett köztes helyet foglal el a gombáké (*Schizosaccharomyces pombe:* 17,6 kbp - *Agaricus bitorquis*: 175 kbp) (Hudspeth, 1992). A méret azonban kisebb evolúciós távolságok esetén, rokon fajokat összehasonlítva is igen nagy eltérést mutathat (Grossman és Hudspeth, 1985). A közel azonos génkészlet ellenére tapasztalható különbségek okaként élesztőgombákban elsősorban a gének között található,

AT-gazdag, nem kódoló szakaszok eltérő hosszúsága hozható fel (Clark-Walker, 1992). Ezeken a gének közötti szakaszokon élesztőgombákban és fonalasgombákban is előfordulhatnak fajra jellemző, nagy GC sűrűségű szekvencia elemek (Ragnini és Fukuhara 1988; Weiller és mtsai, 1989; Koll és mtsai, 1996; Belcour és mtsai, 1997), melyeknek szerepük lehet a mitokondriális genom átrendeződésében. A genomok méretében fellelhető különbségek oka fonalasgombák esetében inkább a géneket felszabdaló intronok számában keresendő, melyekből főleg az I. típusba tartozók jelenlétét mutatták ki, de *Podospora anserina* mtDNS-ében II. típusú intronokat is felfedeztek (Cummings és mtsai, 1989a).

A mitokondriális DNS alakjának kérdésében megoszlik a kutatók véleménye. A gyűrű formára restrikciós enzimekkel végzett emésztések eredményei és elektronmikroszkópos megfigyelések utalnak, ugyanakkor a felfedezett "hairpin loop" szerkezetek (Dinouël és mtsai, 1993), illetve tandem elrendeződésű TIR szekvenciák (Nosek és mtsai, 1995) a nyitott formát valószínűsítik. A két álláspont közötti ellentmondást oldhatja fel az az elmélet, mely szerint a nyitott alakú mtDNS molekulák átmeneti gyűrűs formán keresztül sokszorozódnak meg, s így alakjuk a replikáció szakaszainak megfelelően változhat (Bendich, 1993).

A mtDNS által hordozott gének, az egyenlőre még ismeretlen szerepű leolvasási kereteken (URF - unidentified reading frame) túl, három fő csoportba sorolhatóak.

1. A mitokondriumok saját fehérjeszintetizáló rendszerének elemei:
   - kis és nagy riboszómális alegység RNS-ének génjei
   - riboszómák felépítésében résztvevő egyes fehérjék génjei
   - transzfer RNS-ek génjei
2. A mitokondriumok működésével, az energiatermeléssel kapcsolatos fehérjék génjei:
   a) az elektrontranszportlánc elemei:
      - NADH dehidrogenáz alegységek génjei
      - apocitokróm b génje
      - citokróm c-oxidáz alegységek génjei
   b) az oxidatív foszforilációban résztvevő fehérjék génjei:
      - ATP szintetáz alegységeinek génjei
3. A gének intronjaiban található nyitott leolvasási keretek által kódolt fehérjék génjei:

Egyetemi Könyvtár SZEGED

- endonukleázok (I. típusú intronok)
- reverz transzkriptázok (II. típusú intronok)

II.5 Fonalasgombák mitokondriális plazmidjainak általános jellemzése.

Plazmidokat először baktériumokban fedeztek fel az ötvenes évek végén (Smith 1985), később növényekben és gombákban is kimutatták hasonló molekulák jelenlétét. A gombák világán belül vizsgálódva, szembetűnő különbségek figyelhetők meg az élesztőgombák és a fonalasgombák plazmidjai között. Míg az előbbiekben citoplazmatikus és sejtmagi elhelyezkedésű plazmidokat találhatunk, fonalasgombákban mitokondriumhoz kötötten fordulnak elő e genetikai elemek (Griffiths, 1995).

A fonalasgombák plazmidjainak eredetéről kevés bizonyított adat áll a kutatók rendelkezésére. Egyes plazmidokat a mtDNS-ből kivágódott defektív szekvenciák alkotnak, melyek felsokszorozódva és a mtDNS működését elnyomva mutáns fenotípust hoznak létre (Griffiths, 1992). Ezek közül legismertebbek az *Aspergillus amstelodami* és a *Podospora anserina* gyors öregedést kiváltó szeneszcencia plazmidjai (Stahl és mtsai, 1978; Lazarus és mtsai, 1980). A "valódi" plazmidok genetikai anyaga azonban nem a mtDNS-ből származik. Az eukarióta élőlények kialakulásának endoszimbiózisos elmélete felveti annak a lehetőségét, hogy a valódi mitokondriális plazmidok e sejtorganellum őseként szolgáló baktérium fágjai lehettek (Griffiths, 1995).

A mitokondriális plazmidok alakjukat tekintve nyitottak vagy gyűrűbe zártak. A legalaposabban vizsgált *Neurospora* fajokban mindkét forma megtalálható. A nyitott típust képviselő kalilo (*N. intermedia*) és maranhar (*N. crassa*; Court és mtsai, 1991) plazmidok felépítésére általánosan jellemző a különböző hosszúságú TIR szekvenciák, valamint az 5' végükhöz kötött fehérje molekulák jelenléte (Vierula és mtsai, 1990). Ez utóbbit primerként használva, adenovírusokhoz (Sakaguchi, 1990) és a $\phi 29$ fághoz (Salas és mtsai, 1978) hasonlóan történhet sokszorozódásuk (Kempken és mtsai, 1989). A TIR szekvenciák területéről indulva két, egymással szemben futó, átfedéstől mentes nyitott leolvasási keretet találhatunk, melyek vírus típusú DNS polimerázt illetve bakteriofágok és élesztők RNS

polimerázához hasonló fehérjéket kódolhatnak (Chan és mtsai, 1991; Court és Bertrand 1992), és bizonyítottan átíródnak (Court és Bertrand, 1993; Vickery és Griffiths, 1993). A két nyitott leolvasási keret között elhelyezkedő szakasz megléte szintén jellemző, szerepe azonban még nem tisztázott.

A gyűrű alakú *Neurospora* plazmidokról teljes hosszúságú RNS másolat képződik, melyről a Mauriceville plazmid (*N. crassa*; Collins és mtsai, 1981) esetében megállapították, hogy RNS polimeráz által létrehozott, egységnyi hosszúságúnál nagyobb másolat megfelelő méretre vágásával jön létre (Kennell és mtsai, 1994). Ez a plazmid, és a vele közeli rokonságban álló Varkud plazmid (*N. intermedia*; Akins és mtsai, 1988) az általuk kódolt reverz transzkriptáz segítségével sokszorozódnak meg. Részletes vizsgálatuk intronokkal és vírusokkal való rokonságot tárt fel. A kutatási eredmények alapján e plazmidok reverz transzkripciós lépésen keresztül a mtDNS-be beépülni képes, mozgékony intronok is lehetnek (Lambowitz, 1989). A Mauriceville plazmidot tartalmazó szeneszcens törzsek, melyek mtDNS-ük hiányai vagy plazmid eredetű többletei mellett, 5′ végükkel mitokondriális tRNS-sel kapcsolódott plazmidmolekulákat tartalmaztak, bizonyították a mtDNS-be RNS köztiterméken keresztül történő beépülést (Akins és mtsai, 1986; 1989). A Mauriceville plazmid reverz transzkriptáza, mely 3′ végén tRNS-szerű, "lóherelevél" alakú szerkezetet hordoz, más reverz transzkriptázokkal ellentétben tRNS primer nélkül is képes DNS-t létrehozni (Kuiper és Lambowitz, 1988), ekkor az utolsó előtti nukleotidról indul a szintézis (Kennel és mtsai, 1994; Wang és Lambowitz, 1993). Az enzim további vizsgálata kimutatta, hogy *in vitro* körülmények között rövid, nem komplementer DNS primereket is fel tud használni működéséhez (Wang és mtsai, 1992). Wang és Lambowitz (1993) elmélete szerint a mai DNS polimerázok az RNS világ, 3′ végi '"lóherelevél" szerkezetet felismerő, RNS másoló enzimeiből alakultak ki, a Mauriceville típushoz hasonló reverz transzkriptázokon keresztül, melyek egyben a többi reverz transzkriptáz evolúciós előfutárának is tekinthetők. A szintén gyűrű alakú LaBelle (*N. intermedia*; Stohl és mtsai, 1982) plazmid nyitott leolvasási kerete hat helyen mutat hasonlóságot élesztők sejtmagban kódolt RNS polimerázával, hét helyen reverz transzkriptázokkal, és csak három helyen DNS polimerázokkal, ennek ellenére nem reverz transzkriptáz aktivitás, hanem DNS polimeráz aktivitás volt köthető a plazmid

jelenlétéhez (Schulte és Lambowitz, 1991). Bár ezek alapján vonzó lenne ezt az enzimet a reverz transzkriptázok és a DNS polimerázok közötti evolúció hiányzó láncszemének tekinteni, mindez még nem kellően megalapozott (Griffiths, 1995).

Egyes nyitott és gyűrűbe zárt DNS plazmidok RNS és DNS polimerázának illetve reverz transzkriptázának vírusok hasonló aktivitású enzimeivel közös tulajdonságai a DNS plazmidok virális leszármazásának elméletét támasztják alá. Ez történhetett több őstől, ekkor az egyes plazmidok nyitott leolvasási keretei között aminosav szinten megfigyelhető hasonlóságot, mely DNS szinten több esetben hiányzik, a mitokondriumon belüli sajátos életformához való alkalmazkodás eredményezhette. Elképzelhető azonban az egy közös őstől származás is, ekkor a plazmidok között fennálló nagyfokú különbségek létrejöhettek az evolúció során, a gazdaszervezetekhez való alkalmazkodás eredményeképpen is. Ebben az esetben rokonsági kapcsolataik a hordozóik közti rokonsági kapcsolatokat tükrözik (Rohe és mtsai, 1992).

A valódi mitokondriális plazmidok gazdasejtre gyakorolt hatása még nagyrészt felderítetlen terület, s csupán néhány esetben nyert megállapítást. *Neurospora* fajok nyitott kalilo és maranhar plazmidjainak gyakori mtDNS-be épülése (Griffiths és mtsai, 1986), valamint gyűrű alakú Mauriceville plazmidjának esetenkénti mtDNS-sel történő rekombinációja (Akins és mtsai, 1986) gyors öregedést eredményez. Ezzel éppen ellentétes hatású a *Podospora anserina* pAL2-1 plazmidja, mely meghosszabbítja a hordozó törzs életét (Hermanns és mtsai, 1994). A járomspórás *Absidia glauca* esetében a pozitív párosodási típusú törzsek sejtjeinek felszínéhez egy plazmid által kódolt fehérje kötődik, míg az ellentétes párosodási típusúak sejtjeiből a fehérje is és a plazmid is hiányzik (Hanfler és mtsai, 1992). A legtöbb plazmid azonban nem befolyásolja megfigyelhető módon a növekedés sebességét, mintázatát, így biológiai szerepük egyenlőre tisztázatlan (Griffiths, 1995).

Számos kutató foglalkozik e természetes gombaplazmidok szekvenciáinak vizsgálatával, mely egyrészt előrehaladást nyújt az intronok eredetének felkutatásában (Nargang és mtsai, 1984; Griffiths, 1995), másfelől e szekvenciák felhasználása reményt adhat olyan vektorok készítésére, melyek önálló replikációs képességgel rendelkeznek fonalasgombákban (Tudzynski és Esser, 1985).

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Alkalmazott törzsek és tenyésztési körülményeik

Trichoderma törzsek:

- A 20°C-on végzett vizsgálatoknál alkalmazott törzsek az Ásotthalmi Emlékerdő talaj- és avarmintájából származtak. Ezek közül kerültek ki az UV mutagenezises nemesítési, és a genetikai transzformációs kísérletekben alkalmazott törzsek.
- A hidegtűrő törzsek kiválasztásánál megvizsgált 360 törzsből 352 tizennégy féle magyarországi talaj illetve avar mintából, további nyolc pedig a Budapesti Műszaki Egyetem törzsgyűjteményéből származott.
- A mitokondrium DNS tartalmának vizsgálatát a benomil rezisztens, *T. harzianum* T95 törzsön végeztük el (ATCC 60850) (Ahmad és Baker, 1987).

Az *in vitro* antagonizmus tesztekben a szegedi Gabona Kutató Intézetből származó növénypatogén gombákat használtuk:

- *Fusarium culmorum* 1181
- *Fusarium graminearum*
- *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*
- *Pythium debaryanum*
- *Rhizoctonia solani*

Escherichia coli törzsek:

- A transzformációs kísérletekben, a plazmidok felszaporításához a HB101 jelzésű törzset használtuk.
- A mitokondriális plazmid klónozásakor a DH5α jelzésű törzset alkalmaztuk.

A *T. harzianum* T95 törzset 4 μg/ml benomil tartalmú szintetikus minimál táptalajon (0,5% glükóz; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz), a többi gombatörzset élesztőkivonatos táptalajon (0,3% élesztőkivonat; 1% glükóz; 1% KH_2PO_4; 2% baktoagar; desztillált víz) tartottuk fenn.

Az *E. coli* törzsek fenntartására LB táptalajt (1% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 1% NaCl; 1,5% baktoagar; desztillált víz) alkalmaztunk.

III.2. A transzformációs kísérletekben alkalmazott plazmidok

Plazmid	A hordozott gén	Hivatkozás
pCSN43	*E. coli* hygromycin B foszfotranszferáz	Staben és mtsai, 1989
pKIM7	*Neurospora crassa pyr*4	Osman, 1987
pPAura-510	*Podospora anserina ura*5	Bergés és Barreau, 1991
pTRura-5-3	*Trichoderma reesei ura*5	Bergés és Barreau, 1991
pSal23	*Aspergillus nidulans arg*B	Dmochowska és mtsai, 1986
pAN5-41B	*A. nidulans arg*B és *E. coli lacZ*	Van Gorcom és mtsai, 1986

III.3. A mtDNS funkcionális térképezéséhez használt heterológ génpróbák

A mtDNS funkcionális térképezéséhez *Aspergillus* törzsek mitokondriális DNS-ének különböző restrikciós fragmentjeit használtuk, melyek az alábbi géneket hordozták (Hamari és mtsai, 1999):

Aspergillus nidulans (Glasgow törzs):

- nagy riboszómális alegység RNS-e: 6,7 kb *Eco*RI fragment
- kis riboszómális alegység RNS-e: 1,44 kb *Hin*dIII-*Bgl*II fragment
- apocitokróm b: 1,17 kb *Bgl*II fragment
- ATP-szintáz gén 9. alegysége: 198 bp-os *Eco*RI-*Xho*I fragment

Aspergillus carbonarius 1118-as izolátum:

- NADH-dehidrogenáz gén 5. alegysége: 1,66 kb *Eco*RI-*Bam*HI fragment

III.4. Mikrobiológiai és enzimológiai módszerek

Trichoderma törzsek izolálása

Trichoderma törzsek izolálásához 0,2% glükózt tartalmazó szintetikus minimál táptalajt (0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz) alkalmaztunk. A száraz minták táplemezekre szórása közvetlenül -szuszpenzió készítése nélkül- vonalban történt. A táptalaj a baktériumok növekedésének megakadályozása céljából 0,02% sztreptomicint tartalmazott. Öt-tíz nap, 20°C-on, fényben történt inkubáció után a létrejött telepek vizsgálata egyenként, mikroszkóp segítségével valósult meg, majd a *Trichoderma*-nak bizonyuló törzsek kitisztítása szintetikus minimál táptalajon folytatódott. A törzseket Rifai (1969) határozókulcsa alapján fajcsoport szintig határoztuk meg.

In vitro antagonizmus teszt

A hidegtűrő törzsek növényparazita gombákkal szembeni antagonista képességét 10°C-on *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi, Pythium debaryanum* és *Rhizoctonia solani* törzsekkel szemben vizsgáltuk. A tesztelt *Trichoderma* törzsek és a növénypatogén törzsek 3 mm átmérőjű hifa-korongjai szintetikus minimál (0,5% glükóz; 0,1% $NaNO_3$; 0,1% KH_2PO_4; 0,1% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz), illetve élesztőkivonatos (0,2% élesztőkivonat; 0,5% glükóz; 2% baktoagar; desztilállt víz) táptalajra, egymástól pontosan 3 cm távolságra kerültek leoltásra, majd a csészéket 12 napig inkubáltuk.

A 20°C-on végzett antagonizmus vizsgálatokat hasonló módon hajtottuk végre *Fusarium culmorum* 1181, *F. graminearum* és *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* törzsekkel szemben, mannitos táptalajon (2% mannit; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,8% KH_2PO_4; 0,15% Na_2HPO_4; 0,1% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz). Az inkubáció 7 napig tartott.

Extracelluláris enzimek szekréciója és aktivitása alacsony hőmérsékleten

Az extracelluláris enzimek termeltetéséhez a hidegtűrő *Trichoderma* törzsek 5×10^6 mennyiségű konídiumát 20 ml szintetikus minimál tápsókeverék oldatba (0,1% mannit; 0,1% $NaNO_3$; 0,1% KH_2PO_4; 0,01% $MgSO_4 \times 7H_2O$; csapvíz) oltottuk be. A tápoldatokat

kiegészítettük 0,3% lefölözött tejporral (Skim milk powder, Fluka) a proteináz, 0,3% kolloid itinnel az exokitináz és 1% cellulóz porral a β-glükozidáz aktivitás indukálására. A 10°C-on rázatott tenyészetekből 3-4 naponként vettünk mintát. A hifa-darabok centrifugálással (10.000g, 10 perc) történő eltávolítása után nyert felülúszóból került sor az aktivitásmérésre. A β-glükozidáz aktivitás méréséhez p-nitrofenil-β-D-glükozid, exokitináz aktivitás méréséhez p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glükózaminid (Gupta és mtsi. 1991), tripszin aktivitás méréséhez N-benzoil-phe-val-arg-p-nitroanilid (Gupta és mtsi. 1991), kimotripszin aktivitás méréséhez pedig N-szukcinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilid szubsztátot alkalmaztunk (DelMar és mtsai, 1979). A szubsztrátokat 1%-os koncentrációban foszfát pufferben (0,8% KH_2PO_4; 0,15% Na_2HPO_4; desztillált víz, pH 6) oldottuk fel. Fél ml fermentlé és 0,5 ml szubsztrát oldat összekeverése, majd a β-glükozidáz aktivitás mérés esetében 24 órás, az N-acetil-β-glükózaminidáz és proteináz aktivitások mérése esetében pedig 3 órás, 5°C-on történő inkubáció után, a reakciókat 2 ml 10%-os Na_2CO_3 oldattal állítottuk le. Az enzim aktivitások mérése 405 nm-es hullámhosszúságnál, mikrotiterlap-fotométerrel történt. Egy egységnyinek (U) tekintettük azt az enzim mennyiséget, mely egy perc alatt 1 μmol p-nitrofenol illetve p-nitroanilin felszabadulását katalizálta.

Kémcső-teszt extracelluláris enzimek kimutatására

Trichoderma törzsek β-1,3-glukanáz, kitináz illetve proteáz aktivitásának kimutatására konídium szuszpenziójukkal 1,5% bolti élesztőt, 1% lefölözött tejport (Skim milk powder, Fluka) illetve 0,4% kolloid kitint tartalmazó, kémcsőbe öntött táptalajokat (0,2% élesztő; 1% KH_2PO_4; 1,5% baktoagar) oltottunk le. A táptalaj felületén növekedő telep alatt, extracelluláris enzimei által létrehozott, szabad szemmel megfigyelhető, feltisztult zóna képződött.

Ultraibolya sugárzással szembeni érzékenység meghatározása

Az ultraibolya sugárzással szembeni érzékenység méréséhez 1-2 hetesnél nem idősebb tenyészet friss konídium szuszpenziójából 10^2 konídiumot szélesztettünk egy-egy csésze élesztőkivonatos táptalajra (0,5% élesztőkivonat; 1% KH_2PO_4; 2% agar; desztillált víz). A besugárzást Phillips 15 W-os germicid lámpával végeztük el, 23 cm-es távolságból, minden

lépésnél 5 másodperccel növelve a besugárzási idő hosszát. A vizsgált tartomány 0-tól 60 másodpercig terjedt. A fényindukált javító-mechanizmus működését megelőzendő, besugárzás után a csészéket azonnal sötét termosztátba helyeztük.

Emelkedett extracelluláris enzimszintű mutánsok előállítása UV mutagenezissel

β-1,3-Glukanázok. A nem induktív táptalajra (2% mannit; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,1% KH_2PO_4; 0,1% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 3 μg/ml digitonin; 2% baktoagar; csapvíz) szélesztett konídiumokat 90%-os pusztulási arányt biztosító ideig besugároztuk (*T. hamatum* AH22: 50 mp; AH310: 55 mp; *T. harzianum* AH48: 45 mp; AH356: 55 mp; *T. viride* 70 mp), majd a csészéket a telepek megjelenéséig sötétben, 20°C-on inkubáltuk. Ezután a táptalaj tetejére 5 ml 40°C-os fedőagart (1 mg/ml laminarin; 1,5% agar) rétegeztünk. Újabb inkubációt követően (6 óra) a csészéket 10 ml kongóvörös oldattal (1mg/ml) öntöttük le (Teather és Wood, 1982), majd fél óra múlva, a nem kötött festéket 1M-os NaCl oldattal távolítottuk el. A bontási zónát szabad szemmel figyeltük meg.

Kitinázok. A szintetikus minimál táptalajra (0,2% glükóz; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,1% KH_2PO_4; 0,1% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 3 μg/ml digitonin; 2% baktoagar; csapvíz) szélesztett konídiumokat a fent leírtak szerint besugároztuk, majd a csészéket a telepek megjelenéséig sötétben, 20°C-on inkubáltuk. Négy nap múlva a telepekre 4-metilumbelliferil-triacetil-kitotrióz illetve 4-metilumbelliferil-N-acetil-β-D-glükózaminid oldatot (20 μg/ml) öntöttünk és 365 nm-es fénnyel megvilágítva a csészéket, vizsgáltuk a telepek fluoreszcenciáját.

Extracelluláris enzimek szekréciója 20°C-on és aktivitása 30°C-on

Az extracelluláris enzimek termeltetéséhez a vad és a mutagénkezelt *Trichoderma* törzsek 10^6 mennyiségű konídiumát 20 ml nem induktív (2% mannit; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,8% KH_2PO_4; 0,15% Na_2HPO_4; 0,1% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz) illetve induktív (2% mannit; 2% *Fusarium culmorum* hifa; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,8% KH_2PO_4; 0,15% Na_2HPO_4; 0,1% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz) tápoldatba oltottuk be, majd a 20°C-on 6 napig rázatott mintákból a hifa-darabok centrifugálással (10.000g, 10 perc) történő eltávolítása után nyert felülúszóból került sor az aktivitásmérésre, melyeket 30°C-on, a szubsztrátokat foszfát

pufferben felvéve (pH6; 0,8% KH_2PO_4; 0,15% Na_2HPO_4; desztillált víz) végeztük el. A β-1,3-glukanáz aktivitás méréséhez 1 ml laminarin oldathoz (1mg/ml) 0,2 ml fermentlevet adtunk, majd 1 óra inkubáció után 2 ml dinitroszalicilsav-reagenssel (1% 3,5-dinitroszalicilsav; 0,2% fenol; 0,05% Na_2SO_3; 1% NaOH; 20% K-Na-tartarát; desztillált víz) leállítottuk a reakciót. Forralás után (15 perc) a lehűlt minta elnyelését 540 nm-nél mértük meg. Exokitináz aktivitás méréséhez a 0,5 ml p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glükózaminid (1mg/ml) oldathoz 0,1 ml fermentlevet, majd 2 óra inkubáció után 2 ml 10%-os Na_2CO_3 oldatot adtunk. A mérést 405 nm-es hullámhossznál végeztük el. Endokitináz aktivitás méréséhez 0,5 ml 4-metilumbelliferil-triacetil-kitotrióz oldathoz (20 μg/ml) 0,1 ml fermentlevet, majd 30 perc inkubálás után 2 ml glicin-NaOH puffert (pH10,1) adtunk, és a fluoreszcenciát 366 nm-es gerjesztés mellett mértük. A proteáz aktivitás vizsgálatához 1 ml azokazein oldathoz (2 mg/ml) 0,2 ml fermentlevet, majd 4 óra inkubáció után, 2 ml 15%-os triklórecetsavat adtunk. A képződött csapadék kicentrifugálása után a felülúszó abszorpcióját 366 nm-nél mértük. Az enzimaktivitások értékeit a felülúszó fehérjetartalmának Biuret-reagenssel meghatározott mennyiségére vonatkoztattuk. Egy egységnyinek (U) tekintettük azt az enzim mennyiséget, mely egy óra alatt 1 μmol glükóz ekvivalens (β-1,3-glukanáz aktivitás), 1 μmol p-nitrofenol (exokitináz aktivitás) illetve 1 nmol metilumbelliferon (endokitináz aktivitás) felszabadulását katalizálta.

Auxotróf mutánsok előállítása

Szűréses mutáns dúsítás: (Manczinger és Ferenczy, 1985)

A szűréses mutáns-dúsításhoz 10^7 mennyiségű konídiumot szuszpendáltunk fel 5 ml desztillált vízben, majd a korábban meghatározott, 90%-os pusztulási arányt biztosító ideig UV fénnyel sugároztuk be. A szintetikus minimál tápodatba (0,5% glükóz; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz) leoltott konídiumok közül a 24, majd 12 órás inkubáció alatt kicsírázott prototróf részeket szűréssel távolítottuk el. A ki nem csírázott konídiumokat digitonint tartalmazó élesztőkivonatos táptalajra (0,5% élesztőkivonat; 1% KH_2PO_4; 2% agar; desztillált víz) szélesztettük. A megjelenő telepeket szintetikus

minimál táptalajra (0,5% glükóz; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz) áthelyezve, az auxotróf mutánsok elkülönítése lehetővé vált.

Direkt szelekció uracil auxotróf mutánsok előállítására: (Bergés és Barreau, 1991)
Az uracil auxotróf mutánsok előállításához 1% 5-fluoro-orotsavat, valamint 0,1-0,1% uracilt és uridint tartalmazó kiegészített szintetikus minimál táptalaj (0,5% glükóz; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz) felületére csíkban leoltott konídiumokat 90%-os pusztulást eredményező ideig UV fénnyel sugároztuk be, majd a megjelenő telepek uracil auxotrófiájának jellegét megvizsgáltuk.

Anasztomózisos heterokarion teszt

A vizsgálandó törzsek konídiumaiból 10^5 mennyiséget szuszpendáltunk fel 1 ml élesztőkivonatos tápoldatban (0,3% élesztőkivonat; 1% glükóz; 1% KH_2PO_4; desztillált víz). A 12×8 felviteli helyet tartalmazó mikrotiterlap 0,3 ml űrtartalmú lyukaiba 0,1-0,1 ml-t mértünk be két-két törzs konídium-szuszpenziójából. Minden törzs-párosítást ötször hajtottunk végre. Egy hét 25°C-on történő inkubáció után a micélium-korongokat szintetikus minimál táptalaj (0,5% glükóz; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz) felületére helyeztük, és a teszt eredményét újabb egy hét, 25°C-on való tenyésztés után kiértékeltük.

***Trichoderma* törzsek protoplasztálása és transzformációja**

A transzformálandó törzs számára megfelelően kiegészített szintetikus minimál tápoldat (0,5% glükóz; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,05% $MgSO_4 \times 7H_2O$; csapvíz) 20 ml-ébe leoltott 5×10^6 konídiumból 24 órás 25°C-on történő rázatás után kifejlődő fiatal micéliumot centrifugálással (4.000g, 10 perc) összegyűjtöttük, és 20 ml pufferelt csigaenzim oldatban (2% csigaenzim és 0,1% merkaptoetanol; KCl-os foszfát pufferben: 4,5% KCl; 0,8% KH_2PO_4; 0,15% Na_2HPO_4; desztillált víz) 1-1,5 órán át inkubáltuk. Az emésztetlen micélium részeket szűréssel eltávolítottuk, a képződött protoplasztokat centrifugálással (4.000g, 10 perc) összegyűjtöttük és 5,2% KCl oldattal mostuk. A 0,2 ml TN1 oldatban (5,2% KCl; 0,55%

$CaCl_2$; desztillált víz) felvett protoplasztokhoz 5 µg DNS-t valamint 50 µl TN2 oldatot (60% PEG 6000; 1,2% TRIS HCl pH8; 0,55% $CaCl_2$; desztillált víz) adagoltunk. Inkubációt (30 perc, 4°C) követően 1 ml TN2 oldatot adtunk a protoplasztokhoz, majd 5 percnyi várakozás után 100-100 ml 40°C-ra előhűtött regeneráltató táptalajba (1% glükóz; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,05% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 1,6% baktoagar; ozmotikum; csapvíz) kevertük őket, és a még folyékony táptalajt 3-3 Petri-csészében szétterítettük. A kontroll kísérleteket hasonlóan hajtottuk végre, a transzformáló DNS hozzáadása nélkül.

β-Galaktozidáz aktivitás kimutatása és mérése fonalasgomba micéliumból

A β-galaktozidáz aktivitás kimutatásához a transzformáns telepeket 2% glükózt és 3µg/ml digitonint tartalmazó szintetikus minimál táptalajra (0,5% glükóz; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2% baktoagar; csapvíz) oltottuk. A harmadik napon a csészéket 0,02% 6-bromo-2-naftil-β-D galaktopiranozidot és 0,1% Fast Blue B-t tartalmazó reagenssel öntöttük le. A β-galaktozidáz aktivitást jelző barna színt 5 óra 25°C-on történő inkubáció után figyeltük meg.

A β-galaktozidáz aktivitás mennyiségi méréséhez a törzsek 5×10^6 mennyiségű konídiumát 20 ml, 2% glükózt tartalmazó szintetikus minimál tápoldatba (0,5% KH_2PO_4; 0,1% $(NH_4)_2SO_4$; 0,1% $MgSO_4 \times 7H_2O$; csapvíz) oltottuk le. Három nap, 25°C-on történő rázatás után, a szűréssel összegyűjtött micéliumot 4°C-on, 0,37M TRIS puffer (pH 7,5) hozzáadásával, dörzsmozsárban, üveggyönggyel tártuk fel. A sejttörmeléket centrifugálással (10.000g, 10 perc) eltávolítottuk, majd a felülúszó fehérjetartalmát spektrofotométerrel, 280 nm-es hullámhossznál mért abszorpciójából meghatároztuk. Fél ml felülúszó és 1 ml 0,1%-os 4-metilumbelliferil-β-D-galaktopiranozid oldat összekeverése után a keletkező metilumbelliferon fluoreszcenciáját 360 nm hullámhosszúságú fénnyel gerjesztve mértük.

III.5. Molekulárisbiológiai módszerek

Mikroorganizmusok DNS molekuláinak kinyerése

Genomiális DNS kinyerése fonalasgomba micéliumból Leach és munkatársai (1986) módszere alapján történt.

A mtDNS fonalasgomba micéliumból való kinyerésére Osman (1987) módszerét használtuk, Varga és munkatársai (1993) által javasolt változtatásokkal.

Plazmidmolekulák *Escherichia coli* tenyészetből történő kinyerésekor Birnboim (1983) által leírt módszert alkalmaztuk.

DNS molekulák méretének meghatározása

A mitokondriális DNS térképezése során, az agaróz gélben horizontális elektroforézissel (Sambrook és mtsai 1989) elválasztott DNS molekulák méretének meghatározását, molekulasúlymarker (Lambda-pUC Mix Marker, Fermentas) segítségével a "GelBase/GelBlot Pro" (Ultra Violet Product Ltd) géldokumentáló- és kiértékelő szoftverrel végeztük el.

DNS-DNS hibridizáció és előkészítése

Southern blottolás: A gélelektroforézissel (Sambrook és mtsai 1989) molekulasúly szerint szétválasztott DNS fragmenteket az agaróz gélből 1,6% NaOH-os oldatot használva, kapilláris blottolással Hybond N+ filterre vittük át (Reed és Mann 1985).

DNS molekulák jelölése digoxigeninnel: A DNS molekulák jelölését a Boehringer cég (Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, P.O.Box 310120, D-6800 Mannheim 31, Germany) "DIG DNA labeling and detection kit"-jéhez mellékelt leírásnak megfelelően hajtottuk végre.

Hibridizáció: Az egy órás előhibridizálást és a 24 órás hibridizálást a mitokondriális plazmid vizsgálata és a transzformációs kísérletek esetében 68°C-on, a mtDNS heterológ génpróbákkal

történő térképezése során 60°C-on végeztük el. A hibridizálás többi lépése a Boehringer cég "DIG DNA labeling and detection kit"-jéhez mellékelt leírás alapján történt.

A mtDNS fizikai térképezése

A fizikai térkép készítése során, az egyik restrikciós enzimmel létrehozott és 0,8%-os gélben elválasztott fragmenteket visszaizolálás után (Benore és Anderson, 1995) egy másik enzimmel is megemésztettük, majd a képződött fragmenteket gélben ismét elválasztottuk. Az emésztést a restrikciós enzimek fordított sorrendjében is elvégeztük, és a két eredményt egymással illetve a kettős emésztési képpel összevetve, megállapítottuk a fragmentek egymáshoz kapcsolódási sorrendjét. A háromféle (*Cfo*I, *Eco*RI és *Eco*RV) restrikciós enzimmel készített fizikai térkép készítésénél a kettős emésztéseket mindhárom párosításban elvégeztük, majd az eredményeket egymással, illetve az egyszerre három enzimmel emésztett mintázattal vetettük össze.

A mitokondriális DNS plazmid klónozása

Az *Eco*RV restrikciós enzimmel felnyitott plazmidmolekulákat 0,8%-os gélben történt gélelektroforézis után gélből visszaizoláltuk (Benore és Anderson, 1995), T4 DNS ligáz alkalmazásával, a szintén *Eco*RV restrikciós enzimmel felnyitott, pBluescript SK vektorral építettük össze, majd a ligátummal *Escherichia coli* DH5α, $CaCl_2$ oldattal kompetenssé tett sejtjeit transzformáltuk (Mandel és Higa, 1970). A fragmentet felvett rekombináns plazmidokat tartalmazó *E. coli* telepeket a *lacZ* gén működésének vizsgálatával különítettük el.

A mitokondriális plazmid szekvenciájának meghatározása és elemzése

A nukleotid szekvencia meghatározása Maxam-Gilbert módszere alapján történt automata DNS szekvenátorban (Abiprism, 2.1.0 modell) a Szegedi Biológiai Központban. A DNS szekvencia elemzését a Nemzetközi Biotechnológiai Információs Központ on-line szolgáltatása (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) "BLAST" és "ORF Finder" programjainak segítségével hajtottuk végre a GenBank adatbázist használva.

IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS

IV.1. *Trichoderma* törzsek izolálása, extracelluláris enzim termelési, és *in vitro* antagonizmus vizsgálata

IV.1.1. *Trichoderma* törzsek vizsgálata 20°C-on

IV.1.1.1. *Trichoderma* törzsek izolálása

Az Ásotthalmi Emlékerdőből származó avar- és talajmintákból 150 *Trichoderma* törzset izoláltunk. Rifai (1969) határozókulcsa alapján fajcsoport szintig meghatározott izolátumok öt különböző fajcsoportot képviseltek (**IV.1.1.1. táblázat**).

	Izolált törzsek száma
T. aureoviride	16
T. hamatum	42
T. harzianum	56
T. koningii	10
T. viride	26

IV.1.1.1. táblázat Az izolált *Trichoderma* törzsek fajcsoport szerinti megoszlása

IV.1.1.2. *Trichoderma* törzsek enzimtermelésének vizsgálata

A növénypatogén gombák *Trichoderma* törzsek általi parazitálásának alapfeltétele, hogy a támadó gomba szívóhifáival áldozata hifasejtjeibe tudjon hatolni. Mivel a nagy mezőgazdasági károkat okozó gombák jelentős része az *Ascomycota* törzsbe tartozik, és ezek sejtfalát többnyire β-1,3-glukán, kitin és fehérje alkotja, ezért egy jó biokontroll törzsnek rendelkeznie kell ezek bontására alkalmas enzimekkel. Az izolált 150 *Trichoderma* törzs β-1,3-

glukanáz, kitináz és proteáz enzimeinek termelődését kémcső-tesztben mértük fel 20°C-on tenyésztve, majd összesen 48, egyrészt legalább kétféle enzimet közepes szinten termelő, másrészt a mindhárom enzimet még megfelelőnek tűnő szinten termelő törzset választottuk ki a további vizsgálatokra.

IV.1.1.3. *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizáló képessége növénypatogén gombákkal szemben

Az enzimtermelési kísérletekben biztatónak bizonyult *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonista képességeit *Fusarium culmorum* 1181-es törzsével szemben mértük fel, Petri-csészében létrehozott közös tenyészetben, 20°C-on inkubálva. Az antagonizmus makroszkóposan észlelhető jelensége a tesztorganizmus növekedésének gátlása, illetve az antagonizálandó törzs telepére való ránövés képessége. E szempontból három csoport volt kialakítható. Az első kettőbe azok a törzsek tartoztak, amelyeknél a *Fusarium* vagy beborította az inkubáció tizedik napjára a csésze egész felületét, vagy 1:1 arányban osztozott a két törzs a táptalaj felületén. Ezek a törzsek hatékony antagonistaként nem jöhettek szóba. A harmadik csoportba azonban olyan *Trichoderma* törzsek kerültek, amelyek visszaszorították a *Fusarium* telepet a terjeszkedésben sőt, egyes esetekben rá is nőttek.

Az enzimtermelési és antagonizmus vizsgálatok alapján öt törzs bizonyult ígéretesnek, melyek közül kettő a *T. hamatum* (AH22, AH310), kettő a *T. harzianum* (AH48, AH356) és egy a *T. viride* (AH124) fajcsoportba tartozott. Azonban még ez az öt, legjobb tulajdonságú törzs sem volt képes a *Fusarium culmorum* törzs elpusztítására, ami jelezte nemesítésük szükségességét.

IV.1.2. Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek vizsgálata (Antal és mtsai, 1999a)

A hőmérséklet, mely alapvetően megszabja a mikroorganizmusok elterjedését, növekedését és enzimtermelését, lényeges korlátozó tényező lehet az antagonista kapcsolatokban is. A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó törzsek nagy része mezoterm, melyek a hideg őszi, kora tavaszi időszakban kevéssé nyújtanak védelmet a növénypatogén gombák már alacsony hőmérsékleten is támadó, hidegtűrő törzseivel szemben. Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek izolálása és mezőgazdasági termelésben történő alkalmazása ezenkívül hasznos lehet a talajban történő lebontó folyamatok elősegítése és a peszticid maradványok hidegebb időszakokban végbemenő hatástalanítása miatt is. Ezért célul tűztük ki hidegtűrő, alacsony hőmérsékleten is hatékony antagonizmusra képes törzsek szelektálását, valamint az antagonizmusban szerepet játszó extracelluláris ß-glükozidáz, exokitináz és proteináz enzimeik alacsony hőmérsékleten való termelődésének és aktivitásának mérését.

IV.1.2.1. *Trichoderma* törzsek izolálása, hidegtűrő törzsek kiválasztása

Tizennégy magyarországi talaj- illetve avarmintából 352 *Trichoderma* törzset izoláltunk. A törzseket Rifai (1969) határozókulcsa szerint fajcsoport szintig meghatároztuk és így megállapíthatóvá vált, hogy e törzsek hat különböző fajcsoportot képviselnek (**IV.1.2.1. táblázat**).

Fajcsoport	Izolátumok száma	BME törzsek száma	Hidegtűrő törzsek száma
T. aureoviride	24	0	1
T. citrinoviride	11	0	0
T. hamatum	84	0	0
T. harzianum	137	5	6
T. koningii	21	0	0
T. viride	75	3	7

IV.1.2.1. táblázat A vizsgálatok során izolált, és a BME törzsgyűjteményéből származó *Trichoderma* törzsek, valamint a köztük talált hidegtűrő törzsek fajcsoport szerinti megoszlása.

A Budapesti Műszaki Egyetem törzsgyűjteményéből származó nyolc, valamint az általunk izolált 352 *Trichoderma* törzset mind szintetikus minimál, mind élesztőkivonatos táptalajon megvizsgáltuk alacsony hőmérsékleten való növekedési képesség szempontjából. Közöttük 14 olyan törzset találtunk, melyek jelentékeny sebességgel nőttek 5°C-on, mindkét táptalajon egyaránt. Ezek a törzsek a *T. aureoviride* (T 122), *T. harzianum* (T 14, T 19, T 66, T 334, T 342, T 415) illetve a *T. viride* (T 114, T 128, T 223, T 227, T 228, T 407, T 421) fajcsoportba tartoznak (**IV.1.2.1. táblázat**). Növekedésük sebességét 5°C-on mind szintetikus minimál, mind élesztőkivonatos táptalajon tizenhét napon át követtük, majd kiszámoltuk a növekedési rátát, mely szintetikus minimál táptalajon 1,03-1,97 mm/nap, élesztőkivonatos táptalajon 0,97-1,97 mm/nap értékek között változott. A leggyorsabban növekedő törzsek a T122, T128, T223, T227, T228, T342, T407 és a T421 voltak.

A *T. viride* törzsek alacsony hőmérsékleten való viszonylagos gyorsabb, valamint a *T. citrinoviride*, *T. hamatum* és *T. koningii* törzsek lassabb növekedése összhangban áll Danielson és Davey (1973) eredményeivel, akik megállapították, hogy a *T. viride* törzsek növekedésének optimum és maximum értékei általában alacsonyabbak, mint a többi felsorolt fajcsoportba tartozó törzseké. Egy lucfenyő erdő talaját vizsgálva Widden és Abitbol (1980) kora tavasszal és ősszel a *T. viride* törzseket találta a leggyakoribbaknak, míg a *T. koningii* törzsek nyáron fordultak elő a legnagyobb számban. A *T. harzianum* fajcsoportba tartozó törzsek növekedésének szintén a magasabb hőmérsékleti értékek kedveznek (Danielson és Davey, 1973), ami megmagyarázza az ebbe a csoportba tartozó hidegtűrő törzseknek a *T. viride* törzsekénél kisebb előfordulási gyakoriságát az általunk vizsgált mintában (6/142 illetve 7/78).

IV.1.2.2. A hidegtűrő *Trichoderma* törzsek *in vitro* antagonizáló képessége növénypatogén gombákkal szemben

A kiválasztott 14 hidegtűrő *Trichoderma* törzs antagonista képességeit 10°C-on növénypatogén *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi, Pythium debaryanum* és *Rhizoctonia solani* gombákkal szemben mértük fel, szintetikus minimál és élesztőkivonatos táptalajon egyaránt. Az antagonizmus makroszkóposan észlelhető jelensége a törzsek azon képessége, hogy Petri-

Törzsek	Növénypatogén gombák					
	F. oxysporum		*P. debaryanum*		*R. solani*	
	MM	YEG	MM	YEG	MM	YEG
Kontroll	18,0±0,8	21,7±1,2	29,0±2,9	31,0±2,9	8,3±0,5	15,7±1,2
T. aureoviride						
T 122	16,3±0,5	9,0*±0,8	15,3±1,2	13,0**±1,4	6,0*±0,0	7,0**±0,8
T. harzianum						
T 14	18,0±2,9	11,0*±2,9	18,6±2,5	15,0±3,3	6,0*±0,0	7,6*±0,5
T 19	11,3±1,2	9,3*±1,2	18,6±2,9	18,3±0,9	5,7*±0,5	11,3*±1,2
T 66	14,6±1,2	7,3*±0,5	17,3±1,7	19,3±4,5	7,0*±1,4	6,0*±0,0
T 334	10,3±0,5	12,0±2,2	19,3±4,5	17,3±1,7	6,3±0,9	8,3*±1,2
T 342	8,0±0,8	15,7±4,0	10,6±1,7	17,0±2,2	6,0*±0,0	6,0*±1,4
T 415	15,3±1,7	8,0*±0,8	16,3±1,2	13,3±3,1	6,6*±0,5	6,6*±0,5
T. viride						
T 114	15,6±1,2	14,3±0,9	15,6±0,9	24,3±3,3	5,3*±0,5	8,6±1,7
T 128	7,6±0,9	19,6±4,6	15,3±0,5	16,6±0,9	7,0*±0,8	11,3*±0,9
T 223'	13,6±2,6	8,7*±1,2	12,6*±2,5	11,3**±0,5	6,3*±0,5	6,3**±0,5
T 227	12,3±0,5	10,3*±2,0	15,0±0,8	14,6**±2,8	6,3*±0,5	6,6**±0,5
T 228	10,6±1,7	11,3*±1,2	16,6±1,2	17,0*±1,4	7,3*±0,9	5,3**±0,5
T 407	15,6±1,7	10,3*±2,5	14,3±3,7	12,6*±1,2	6,3*±0,5	5,0**±0,0
T 421	14,3±1,2	7,6**±0,5	13,3±0,5	18,3±2,9	6,3±1,2	5,6*±0,5

IV.1.2.2. táblázat A hidegtűrő *Trichoderma* törzsek antagonizmusa növénypatogén *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi, Pythium debaryanum* és *Rhizoctonia solani* törzsekkel szemben 10°C-on, szintetikus minimál és élesztőkivonatos táptalajon. A növénypatogén gomba telepátmérőjét milliméterben tüntettük fel, 12 napos inkubáció után.

MM: szintetikus minimál táptalaj; YEG: élesztőkivonatos táptalaj; * a tesztmikróba telepén *Trichoderma* konídium-képzés figyelhető meg, **a tesztmikróba telepén vastag *Trichoderma* tenyészet alakult ki intenzív konídium képzéssel. Az értékek három mérés átlagát mutatják, ahol ± az átlagok szórását jelzi.

csészére leoltva közös tenyészetben képesek-e gátolni az antagonizálandó törzs növekedését és ránövekedni a telepére. E szempontból három szint volt megkülönböztethető. 1. A *Trichoderma* törzs vastag micélium szövedéket hozott létre a növényparazita gomba telepén és nagy mennyiségű konídiumot termelt. 2. A *Trichoderma* törzs vékony rétegben növekedett a patogén törzs telepén és kevés konídiumot termelt. 3. A *Trichoderma* törzs nem nőtt rá a növényparazita gomba telepére. A kiértékelésnél ezen kívül mértük még a növényparazita gomba telepátmérőjét (**IV.1.2.2. táblázat**). Az antagonista képességben nemcsak az egyes törzsek, hanem a fajcsoportok között is különbség mutatkozott. Bár mindegyik megvizsgált *Trichoderma* törzs képes volt jelentős mértékben gátolni a növénypatogén gombák telepeinek növekedését, a *T. aureoviride* és a *T. viride* törzsek élesztőkivonatos táptalajon többnyire rájuk is nőttek (T122, T223, T227, T228 és T407), míg a *T. harzianum* törzsek erre nem voltak képesek. Az antagonizáló képesség különböző szintjeinek hátterében valószínűleg a hifák mikoparazita kölcsönhatásainak eltérései lehettek. Bár vékony szívóhifák létrehozására valamennyi törzs képes volt alacsony hőmérsékleten is, azok az izolátumok, amelyek hatékonyabban be tudtak hatolni a növénypatogén gombák hifájába, és ezzel tápanyagforrásként hasznosítani azokat, az első és a második csoportba tartoztak, amelyek erre nem voltak képesek, nem tudtak a növénypatogén gombák telepén növekedni, és a harmadik csoportba kerültek.

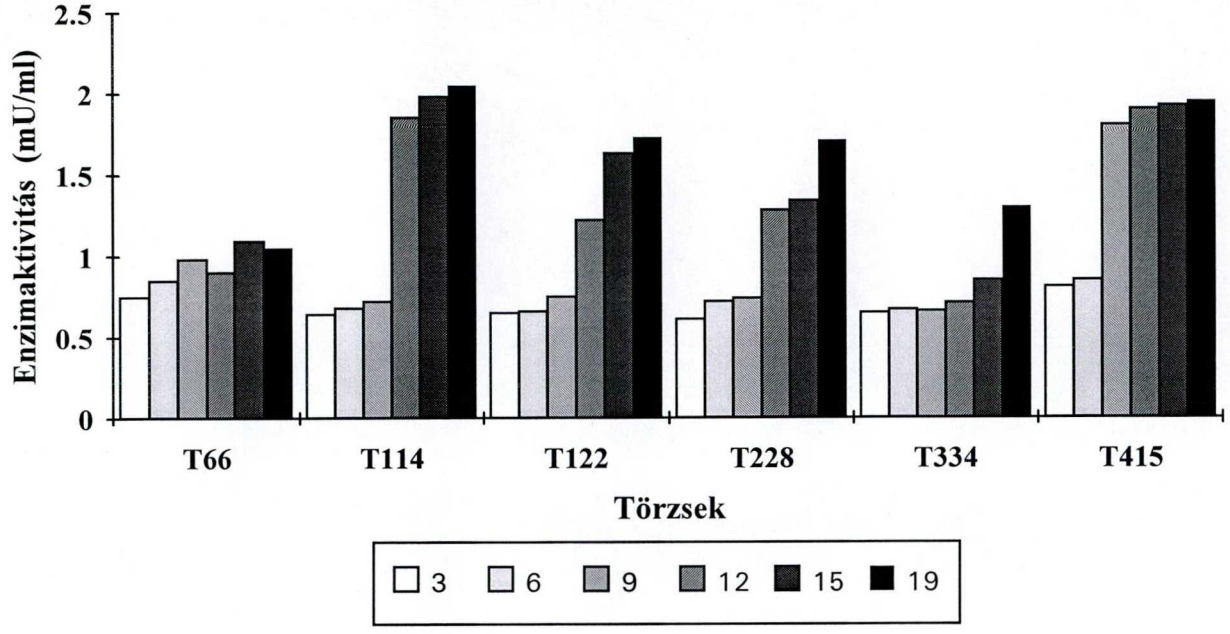
IV.1.2.3. A hidegtűrő *Trichoderma* törzsek ß-glükozidáz, exokitináz és proteináz termelése valamint ezek aktivitása alacsony hőmérsékleten.

Alacsony hőmérsékleten az élőlények növekedése és az általuk termelt enzimek működési aktivitása eltérést mutathat. Előfordulhat, hogy azon a hőmérsékleten, ahol a pszichrofil mikroorganizmus még növekedésre képes, enzimtermelése már nem figyelhető meg, így a fiziológiai állapotról csak a növekedés és az enzimszekréció együttes vizsgálata ad megfelelő képet (Feller és mtsai, 1996). A részletesebb enzimtermelési és aktivitási vizsgálatokhoz hat hidegtűrő *Trichoderma* törzset választottunk ki, melyek a *T. aureoviride* T122, *T. harzianum* T66, T334, T415, valamint a *T. viride* T114 és T228 törzsek voltak. A 10°

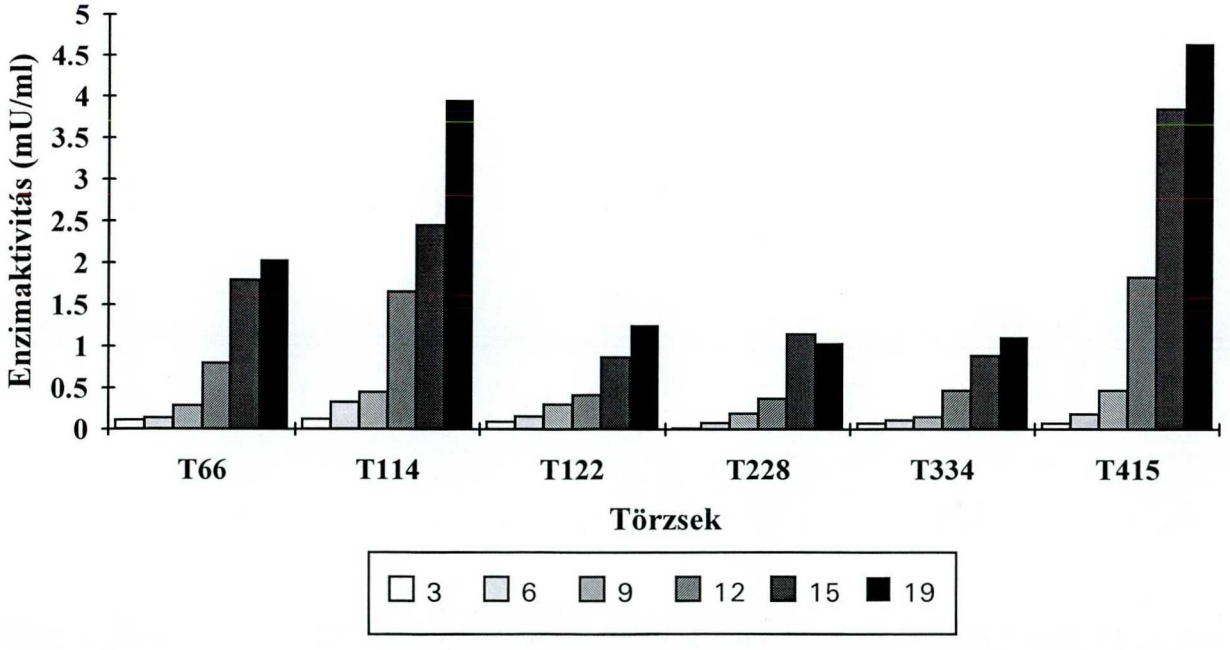
C-on megtermelt fermentlevekben levő extracelluláris enzimek aktivitását 5°C-on történő inkubáció után mértük.

- Valamennyi törzs esetében jelentős β-glükozidáz aktivitás (EC 3.2.1.21) volt megfigyelhető már a tenyésztés harmadik napjától kezdve (**IV.1.2.3.1. ábra**). Maximum értékei 1,09-2,05 mU/ml fermentlé között változott. Itt a T114 és a T415 törzsek mutatták a legnagyobb aktivitást.
- A fermentlébe kiválasztott exokitinázok (EC. 3.2.1.30) aktivitása a vizsgált időszak alatt folyamatosan emelkedett (**IV.1.2.3.2. ábra**). Legmagasabb szintet a T415 és a T114 törzseknél mutatott. Maximális szintje az egyes törzseknél 1,12-4,65 mU/ml fermentlé érték közé esett.
- A proteinázok a többi extracelluláris enzimétől alapvetően eltérő időbeli mintázatot mutattak (**IV.1.2.3.3.** és **IV.1.2.3.4. ábrák**). Aktivitásuk egy csúcsponton túljutva az inkubációs idő előrehaladásával csökkenni kezdett. Ez a jelenség különösen a kimotripszin típusú proteinázoknál (EC. 3.4.21.1) volt szembetűnő, de kisebb mértékben a tripszin típusú proteinázokat (EC. 3.4.21.4.) is érintette. A tripszin típusú proteinázok legnagyobb aktivitása a 9-15. napon (0,6-1,02 U/ml fermentlé), a kimotripszin típusúaké a 6-9. napon (0,21-0,58 U/ml fermentlé) volt mérhető. Legjobb termelőnek a T66, illetve a T114 és a T66 törzsek bizonyultak.

Bár hidegtűrő *Trichoderma* törzsek és növénypatogén gombák közös tenyészetében a szívóhifák megjelenésére (Tronsmo és Dennis, 1978; Goldfarb és mtsai, 1989), illetve különböző illékony és nem illékony vegyületek termelődésének hőmérséklet függésére is végzett vizsgálatokat (Tronsmo és Dennis, 1978), a hifák közötti kölcsönhatásban résztvevő, sejtfalbontó extracelluláris enzimek termelődésének kérdésével nem foglalkoztak. Az általunk elvégzett kísérletekből megállapítható, hogy mindegyik megvizsgált hidegtűrő törzs képes alacsony hőmérsékleten a mikoparazitizmusban kulcsfontosságú ß-glükozidáz, exokitináz és proteináz enzimek termelésére, és ezek az enzimek még 5°C-on is igen jelentős aktivitást mutatnak.

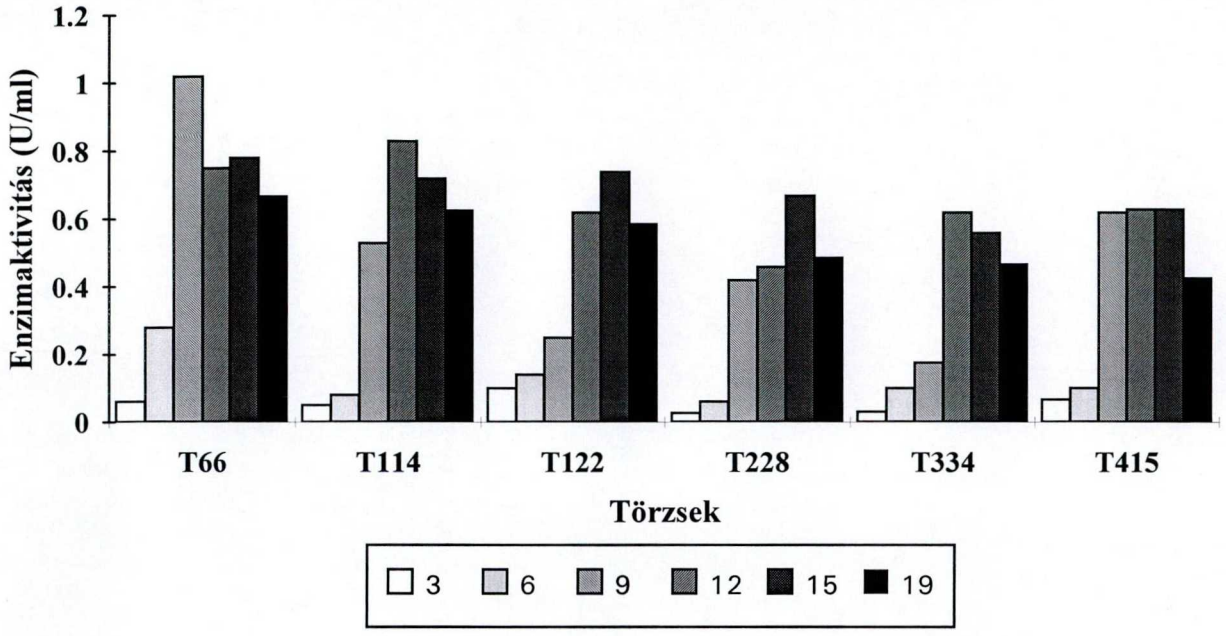


IV.1.2.3.1. ábra Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek 10°C-on szekretált β-glükozidázainak aktivitása 5°C-on. A mintavételek a 3. 6. 9. 12. 15. és 19. napon történtek.

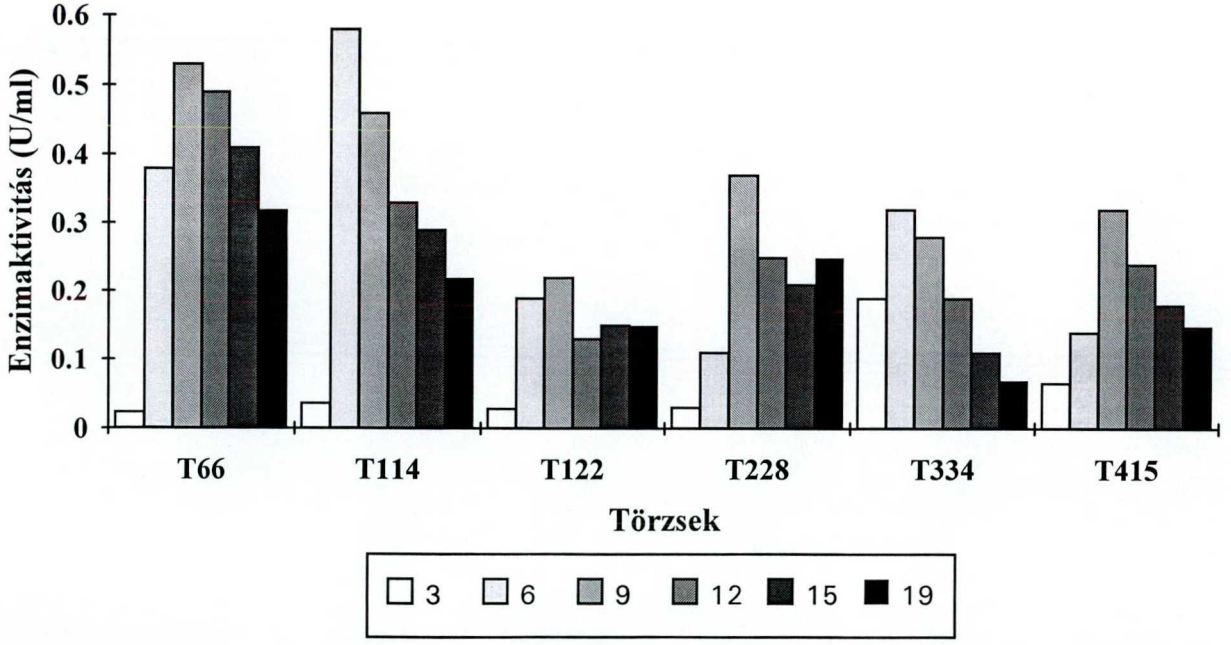


IV.1.2.3.2. ábra Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek 10°C-on szekretált exokitinázainak aktivitása 5°C-on. A mintavételek a 3. 6. 9. 12. 15. és 19. napon történtek.

Egyetemi Könyvtár SZEGED



IV.1.2.3.3. ábra Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek 10°C-on szekretált tripszin típusú proteinázainak aktivitása 5°C-on. A mintavételek a 3. 6. 9. 12. 15. és 19. napon történtek.



IV.1.2.3.4. ábra Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek 10°C-on szekretált kimotripszin típusú proteinázainak aktivitása 5°C-on. A mintavételek a 3. 6. 9. 12. 15. és 19. napon történtek.

IV.2. *Trichoderma* törzsek nemesítése UV mutagenezissel (Manczinger és mtsai, 1994)

Az OMFB "Biopeszticid gombakészítmények előállítása növénykórokozó gombák ellen" című fejlesztési munka kapcsán, a mikoparazitizmusban szerepet játszó extracelluláris enzimek termelésében, valamint az *in vitro* antagonizmusban 20°C-on legjobbnak mutatkozó *T. hamatum* AH22, AH310, *T. harzianum* AH48, AH356 és *T. viride* AH124 törzsek mutagenezissel történő nemesítésének lehetőségét kutattuk. Mivel a kifejlesztett biokontroll törzsek hatékonysága nagymértékben múlhat azon, milyen mennyiségben és milyen körülmények között képesek a növénypatogén gombák sejtfalában levő β-1,3-glukán és kitin bontására, ezért célul tűztük ki ezen polimerek bontásában résztvevő enzimek termelődésében mutáns törzsek előállítását.

IV.2.1. Mutánsok előállítása UV mutagenezissel

A glukanázok és a kitinázok többféle szerepet töltenek be a fonalasgombák életfolyamataiban, ezért gyakran sokféle módon szabályozottak, indukcióval és represszióval egyaránt. Egy részükre, mint a sejtek növekedéséhez, alakváltozásához szükséges enzimekre, konstitutív termelődés jellemző, a tartalék tápanyagok mozgósításához illetve a külvilág szerves anyagainak hasznosításához szükséges enzimeket a glükóz jelenléte gátolhatja, ugyanakkor extracelluláris tápanyagok, parazitálható élőlények jelenléte az utóbbiak termelődésére serkentőleg hatnak (Pitson és mtsai, 1993; Haran és mtsai, 1996b).

Az általunk megvizsgált törzsek egy részénél β-1,3-glukanázokat valamint exokitinázokat inducer nélküli körülmények között is ki tudtunk mutatni, és a nemesítés során e konstitutív enzimszintek fokozását tűztük ki célul. Bár a β-1,3-glukanázoknál és a kitinázoknál kimutatható a nagy mennyiségben (>5 mg/ml) jelenlevő monoszacharidok gátló hatása, ezek magas koncentrációban való előfordulása a talajban nem jellemző, ezért derepresszált mutánsok előállításától nemesítési munkánk során eltekintettünk.

A mutánsok előállításához megfelelő besugárzási idő megállapításához a nemesítésre kiválasztott öt törzs mindegyikének meghatároztuk UV sugárzással szembeni érzékenységét.

Előzetes tapasztalatok alapján erre az az időhossz a legalkalmasabb, melynél a konídiumok 10-30%-a marad életképes a kezelést követően.

A β-1,3-glukanázokat emelkedett szinten kiválasztó törzseket, a laminarin tartalmú fedőagarban az átlagosnál nagyobb bontási zónát képező mutáns telepek kiválasztásával izoláltuk (**IV.2.1. ábra**). Az előállított törzsek morfológiájában illetve konídiumtermelő képességében változást nem tapasztaltunk.

IV.2.1. ábra β-1,3-Glukanáz aktivitás kimutatása.

A kitinázokat emelkedett szinten kiválasztó mutánsok előállítása során mintegy százszoros volt a különbség a megnövekedett exokitináz illetve endokitináz aktivitást mutató törzsek létrejöttének gyakoriságában, az előbbiek javára. Az exokitináz mutánsok morfológiája alig változott a vad típushoz képest. Ezzel szemben az endokitináz mutánsok mind rendkívül kompakt növekedést mutattak, konídiumtermelésük erősen lecsökkent, és a mikroszkópos vizsgálatok alapján úgy tűnt, elvesztették szívóhifa fejlesztési képességüket is. Az előnytelen változások miatt e törzseket a további vizsgálatokban nem szerepeltettük.

IV.2.2. *In vitro* antagonizmus vizsgálatok

		Antagonizmus foka
T. hamatum	AH22	++
	EC2	++
	EC4	++
	AH310	++
	BG1	+
	BG2	+
	BG3	+
T. harzianum	AH48	++
	EC1	+
	EC2	+
	EC3	+++
	EC4	+
	EC5	+
	BG1	+
	BG2	+++
	BG3	++
	AH356	++
	BG1	++
	BG2	+++
	BG3	++
	BG5	+
	BG6	++
T. viride	AH124	+++
	EC1	++
	EC2	++++
	EC4	+
	EC5	+
	EC6	++
	EC7	++
	EC8	+
	EC12	+
	BG1	++
	BG2	++
	BG3	++
	BG4	++
	BG7	++++

IV.2.2. táblázat A vad és a mutáns törzsek *in vitro* antagonizmusának hatásfoka *Fusarium culmorum* 1181 törzzsel szemben. EC: emelkedett exokitináz aktivitásra; BG: emelkedett glukanáz aktivitásra nemesített törzs.

Az öt vad, valamint harmincegy megváltozott enzimtermelésű törzsnek *Fusarium culmorum* 1181 törzsével szembeni *in vitro* antagonista képességét mértük fel (**IV.2.2. táblázat**). A legjobb törzsek képesek voltak a növénypatogén gomba növekedését gátolni és annak tenyészetére ránőni. A *T. hamatum* AH22 törzs mutánsai közül az EC2; a *T. harzianum* AH48 törzs mutánsai közül az EC2, BG2; a *T. harzianum* AH356 törzs mutánsai közül a BG2, BG6; a *T. viride* AH124 törzs mutánsai közül pedig az EC2 és a BG7 voltak a leghatékonyabbak, bár ez utóbbi vad törzs nemesítés nélkül is kiemelkedő képességekkel rendelkezett. A *T. hamatum* AH310 törzs mutánsai között nem találtunk kiemelkedő antagonista képességűt.

A legjobbnak mutatkozó törzsekkel *in vitro* antagonizmus vizsgálatokat végeztünk *Fusarium graminearum* és *Fusarium oxysporum* fajok egy-egy kukoricáról izolált törzsével szemben is. A nyolc, *Fusarium culmorum*-mal szemben hatásos törzs közül a *T. harzianum* AH48 törzs BG2 mutánsa és a *T. harzianum* AH356 törzs BG2 mutánsa *Fusarium graminearum* ellen, a *T. viride* AH124 vad, valamint a belőle készült EC2 és BG7 törzsek pedig mindkét *Fusarium* törzzsel szemben is hatékonynak bizonyultak.

IV.2.3. Enzimtermelési vizsgálatok nem induktív és induktív körülmények között

A vad és a mutagenezissel előállított törzsek extracelluláris enzimtermelését rázatott tenyészetekben mind nem induktív, mind pedig induktív körülmények között meghatároztuk (**IV.2.3. táblázat**).

Nem induktív körülmények között β-1,3-glukanáz aktivitás a legtöbb mutáns törzs esetében mérhető volt, bár szintje sokszor alacsonyabbnak mutatkozott a vad törzsénél. Konstitutív exokitináz aktivitást csak a törzsek egyharmada mutatott, endokitináz aktivitás pedig egyetlen esetben sem volt mérhető. Induktív körülmények között a legtöbb enzimtípus mérhető aktivitásának emelkedése mellett minden mutáns törzs esetében megfigyelhető a proteázok mennyiségének növekedése is, ami alapján úgy tűnik, hogy a mutációk az extracelluláris enzimek indukcióját illetve szekrécióját szabályozó belső biokémiai regulációs hálózatokkal kapcsolatosak. Különösen igaz lehet ez a *T. harzianum* AH356 törzs BG6

Törzsek			β-1,3-Glukanáz		Exokitináz		Endokitináz		Proteáz	
			N	I	N	I	N	I	N	I
T. hamatum	AH22		0,00	1,2	0,06	1,3	0,00	0,5	-	0,01
		EC2	0,04	15,9	0,13	4,9	0,00	9,1	-	0,06
		EC4	0,02	0,4	0,61	1,7	0,00	1,4	-	0,54
	AH310		0,00	16,4	0,00	7,9	0,00	12,8	-	0,06
		BG1	0,01	10,5	0,00	4,9	0,00	13,3	-	0,25
		BG2	0,10	14,6	0,00	9,2	0,00	13,5	-	0,40
		BG3	0,01	11,8	0,00	7,6	0,00	21,4	-	0,51
T. harzianum	AH48		0,21	11,1	0,00	6,1	0,00	8,7	-	0,06
		EC1	0,00	8,2	0,04	5,3	0,00	0,0	-	0,44
		EC2	0,20	9,0	0,00	20,3	0,00	0,9	+	0,52
		EC3	0,27	22,1	0,00	12,8	0,00	3,8	+	0,33
		EC4	0,00	10,3	0,00	9,1	0,00	5,2	-	0,35
		EC5	0,22	12,4	0,00	15,5	0,00	0,9	+	0,70
		BG1	0,18	13,5	0,00	34,4	0,00	7,6	-	0,40
		BG2	0,12	4,3	0,00	9,3	0,00	2,8	-	0,45
		BG3	0,34	1,9	0,00	6,9	0,00	3,6	-	0,28
	AH356		0,11	14,4	0,08	33,8	0,00	5,0	-	0,02
		BG1	0,07	7,1	0,00	10,7	0,00	1,1	-	0,24
		BG2	0,20	27,2	0,00	34,3	0,00	11,0	-	1,53
		BG3	0,10	15,8	0,16	21,3	0,00	9,5	-	0,62
		BG5	0,05	1,2	0,07	10,7	0,00	0,0	-	0,21
		BG6	0,07	72,8	0,13	124,2	0,00	94,0	-	2,02
T. viride	AH124		0,05	27,4	0,00	14,5	0,00	28,5	-	0,00
		EC1	0,02	2,7	0,02	16,4	0,00	0,0	+	0,48
		EC2	0,04	25,5	0,00	13,1	0,00	30,0	-	1,56
		EC4	0,04	14,0	0,00	7,0	0,00	0,0	-	1,07
		EC5	0,01	8,0	0,00	22,2	0,00	0,0	-	0,63
		EC6	0,05	10,8	0,02	3,3	0,00	0,0	-	1,26
		EC7	0,03	10,5	0,00	3,3	0,00	0,0	-	0,79
		EC8	0,05	6,9	0,00	2,2	0,00	0,0	-	0,42
		EC12	0,07	6,1	0,03	2,2	0,00	0,0	-	0,38
		BG1	0,03	17,7	0,02	11,5	0,00	24,2	+	0,52
		BG2	0,02	12,9	0,02	4,0	0,00	2,4	+	0,21
		BG3	0,06	11,0	0,00	3,2	0,00	1,2	-	0,26
		BG4	0,06	20,2	0,00	4,1	0,00	0,3	-	0,58
		BG7	0,08	20,0	0,00	8,4	0,00	20,0	-	0,67

IV.2.3. táblázat A vad és a mutagenezissel előállított törzsek enzimtermelése nem induktív (N) és induktív (I) körülmények között. EC: emelkedett kitináz aktivitásra; BG: emelkedett glukanáz aktivitásra nemesített törzs. Az értékek enzim egységben (U) megadva.

mutánsára, melynél mind a négy enzim mérhető aktivitása 4-100-szoros emelkedést mutatott. Ugyanakkor e törzs jó példa arra is, hogy a vizsgált extracelluláris enzimek szekréciója nem a legjobb *in vitro* antagonista törzsek esetében mutatkozott a legnagyobbnak. Valószínűleg a túlzottan magas sejtfalbontó aktivitás károsan hat a *Trichoderma* törzsek szívóhifáinak kialakulására, így a legjobb biokontroll jelöltek azok közül a mutánsok közül kerültek ki, melyekben a három sejtfalbontáshoz szükséges enzimtípus aránya összehangoltan, de még nem gátló mértékben emelkedett meg.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy mutagenezissel valamennyi, a biológiai védekezésben fontos enzimrendszerrel kapcsolatban sikerült előnyösen megváltozott termelőképességű törzseket előállítanunk a vad törzsekből. A mutációk a β-1,3-glukanáz, kitináz és proteáz enzimrendszerek szabályozottságát érintik és elősegítik, hogy a mutáns törzs a bontóenzimeket a vad törzshöz képest megnövekedett mértékben szekretálja.

A törzsek antibiotikum és toxin termelési vizsgálatából (Manczinger L.) kiderült, hogy a kiemelkedően jó antagonista tulajdonságot mutató *T. viride* AH124 és mutánsai nem termeltek sem baktérium sem fonalasgomba gátló anyagokat, ugyanakkor az igen gyenge mikoparazitának bizonyult *T. hamatum* AH310 fermentleve erős fonalasgomba-ellenes aktivitást mutatott. Ezek alapján vizsgálatainkban a törzsek antagonista képesség szerinti rangsorának kialakításában az antibiotikum temelő képességnek elhanyagolható jelentősége volt, abban inkább a törzsek gombasejtfal-oldó enzimtermelő képessége volt a döntő.

A Gabona Kutató Intézet munkatársai a törzsek *in vivo* antagonista képességeinek felmérésére kukorica-mag csávázási és csíráztatási kísérleteket végeztek melyek révén megállapítást nyert, hogy sok törzs képes volt a csírázó kukoricát megvédeni *Fusarium culmorum* támadásával szemben. Az eredményekből az is kiderült, hogy az *in vitro* körülmények között kiemelkedő képességű törzsek nem bizonyultak minden esetben *in vivo* is a leghatékonyabbnak, viszont a legjobb *in vivo* hatással rendelkező törzsek *in vitro* is a szülői törzs tulajdonságait felülmúló hatást mutattak.

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

IV.3. Transzformációs kísérletek

Egyes gének, szabályozó szekvenciák vagy egyéb DNS fragmentek tulajdonságainak, hatásainak és az adott sejtben való expresszálódásának vizsgálatára, illetve bizonyos anyagcsere termékeket megnövekedett mennyiségben termelő törzsek célzott előállítására legalkalmasabb módszer a transzformáció, melynek során izolált DNS molekulákat juttatunk a sejtekbe. Ennek kivitelezéséhez transzformációs rendszer kidolgozása szükséges, mely áll egyrészt egy plazmidból, melynek a felszaporításában résztvevő szekvenciákon kívül tartalmaznia kell még a vizsgált transzformáns sejtek elkülönítésére lehetőséget nyújtó szekvenciákat, másrészt megfelelő befogadó sejtekből, melyek kezelése után a transzformáns sejtekből fejlődő telepek a plazmid által nyújtott szelekciós lehetőségnek köszönhetően elkülöníthetővé válnak a többi sejttől illetve teleptől.

Az OMFB "Biopeszticid gombakészítmények előállítása növénykórokozó gombák ellen" című fejlesztési munka során a *T. harzianum* AH48 és AH356-BG2 valamint a *T. viride* AH124-BG7 törzsek további nemesítéséhez transzformációs rendszerek kidolgozását tűztük ki célul. A külföldi kutatócsoportoktól beszerzett vektorok közül a *N. crassa* β tubulin génjét hordozó pSV50 vektorral nem sikerült eredményt elérnünk, hygromycinnel szemben pedig csak a *T. viride* AH124-BG7 törzs volt elegendően érzékeny. Így a *T. harzianum* AH48 és AH356-BG2 törzsek transzformációjához auxotrófia komplementációra alkalmas vektorokat választottunk ki, melyekhez UV mutagenezissel állítottuk elő a megfelelő befogadó törzseket.

Mutánsok előállítása. Szűréses mutáns-dúsítási módszerrel a *T. harzianum* AH48 törzs arginin bioszintézisében sérült mutánsai viszonylag nagy mennyiségben képződtek, így ígéretesnek tűntek az argB gént hordozó plazmidokkal történő transzformációs kísérletekhez (**IV.3.1. táblázat**). Mivel uracil auxotróf mutánsok ezzel a módszerrel nem jöttek létre, előállításukhoz 5-fluoro-orotsavat használtunk. A *T. harzianum* AH356-BG2 törzsből kilenc uracil auxotróf mutánst sikerült előállítani.

Az auxotrófia jellege	AH48	AH356-BG2
Adenin	0	1
Arginin	16	6
Leucin	3	1
Lizin	1	1
Metionin	2	5
Vitamin	0	3
Egyéb	1	3

IV.3.1. táblázat A *T. harzianum* AH48 és AH356-BG2 törzsekből szűréses mutánsdúsítással előállított mutánsok az auxotrófia jellege szerint csoportosítva.

Regeneráció. A plazmidok sejtbe juttatására a protoplasztok transzformációját választottuk. Mivel a protoplasztok ozmotikusan igen érzékenyek, szükséges hogy a regeneráltató táptalaj megfelelő koncentrációban tartalmazzon stabilizátorként szerves vagy szervetlen anyagokat.

Ozmotikum	AH356-BG2	AH48	AH124-BG7
Galaktóz 15,8%	0	32,0	8,6
Glicerin 10%	0	0	0,4
Glükóz 17,4%	14,0	16,0	12,0
Mannit15,8%	21,0	7,2	3,0
PEG 6000 17%	0,05	0	0,4
Szacharóz 26%	24,0	42,0	16,0
Szorbit 16,7%	0,7	4,8	4,0
$CaCl_2$ 5,9%	20,0	40,0	24,0
KCl 4,5%	0,3	16,0	1,0
$MgCl_2$ 6,3%	3,2	16,0	4,4
NaCl 3,4%	1,2	28,0	2,0
NH_4Cl 3%	0,5	8,0	3,2
$Ca(NO_3)_2$ 10,6%	15,0	72,0	30,0
KNO_3 7,6%	0,1	3,0	0,6
$Mg(NO_3)_2$ 10%	72,0	60,0	11,0

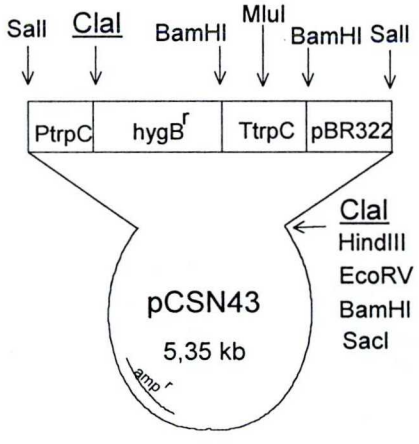
IV.3.2. táblázat. A *T. harzianum* AH356-BG2, és AH48, valamint a *T. viride* AH124-BG7 törzsek protoplasztjainak regenerációs gyakorisága különböző ozmotikumok jelenlétében, a kiindulási protoplasztszám százalékában meghatározva.

E célra elvileg többféle anyag alkalmas lehet, gyakorlatilag azonban a regenerációs gyakoriság nagymértékben függ az alkalmazott ozmotikumtól, és a törzsekre jellemző egyedi tulajdonság, ezért mind a három törzsnél külön megvizsgáltuk (**IV.3.2. táblázat**). A regenerálódási érték

$Mg(NO_3)_2$ és $Ca(NO_3)_2$ esetében ugyan magasnak mutatkozott, azonban mikroszkópban követve a regeneráció folyamatát megfigyelhető volt, hogy a protoplasztok előbb osztódtak, majd utána jelentek meg a hifa-kinövések. Mindez makroszkóposan erős telepösszenyomó hatással járt együtt, és a telepek növekedése igen lassú volt. E kedvezőtlen jelenségek miatt inkább a valamennyi törzs esetében jó eredményt adó, szacharózt választottuk ki ozmotikumnak a további kísérletekhez.

IV.3.1. Hygromycin B rezisztencia (Manczinger és mtsai, 1997)

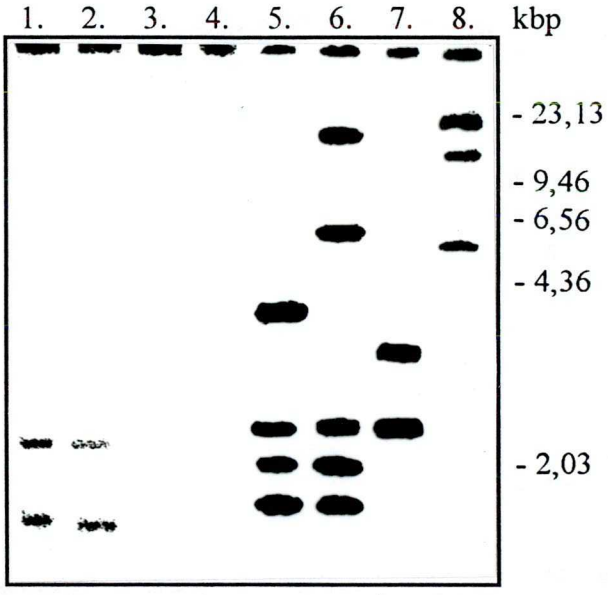
A hygromycin B aminoglükozid típusú antibiotikum, melyet a *Streptomyces hygroscopicus* termel. A rezisztenciának két fő típusa létezik: vagy a 30S riboszómális alegység szerkezete változik meg, vagy egy inaktiváló fehérje termelődik. Ez utóbbi a hygromycin B foszfotranszferáz, mely plazmidon kódolt.



IV.3.1.1. ábra A pCSN43 plazmid térképe. Az 5,35 kbp nagyságú plazmid *Escherichia coli* hygromycin B foszfotranszferáz génjét hordozza *Aspergillus nidulans* triptofán C génje promóter és terminátor szekvenciájának szabályozása alatt (Staben és mtsai, 1989).

A *Trichoderma viride* AH124-BG7 törzs 10^6-10^7 mennyiségű protoplasztjának 1 μg pCSN43 plazmid DNS-sel való transzformációját követő ötödik napon 200-500 rezisztens telep jelent meg, az antibiotikumot 0,3% töménységben tartalmazó szelektív táptalajon. A transzformáló plazmid sorsának nyomonkövetésére a transzformánsokból és a szülői törzsből származó DNS-t valamint a plazmid DNS-t *Cla*I restrikciós endonukleázzal kezeltük. Ez az enzim két helyen hasítja el a plazmidot: a promóter szekvencia és a hygromycin B foszfotranszferáz gén határán, valamint a hygromycin rezisztencia génen kívül (**IV.3.1.1.**

ábra). Ennek megfelelően két sáv jelent meg az emésztett plazmid oszlopában (**IV.3.1.2. ábra**, 7. oszlop). A kontrollként felvitt szülői *T. viride* AH124-BG7 törzs DNS-éhez nem kötött a jelölt plazmid DNS (3. és 4. oszlop), így az 1., 2., 5. és 6. oszlopban megjelenő valamennyi sáv a transzformánsokba bekerült plazmidmolekuláktól származik. Ezek egy részének mérete hasonló a plazmidmolekula méretéhez (6. oszlop), de megfigyelhetők olyan kis molekulasúlyú egységek is, amelyek *Cla*I hasítóhelyet már nem is tartalmaznak (1. és 5. oszlop). Ezeket a formákat a szabadon replikálódó plazmidmolekulák közötti rekombinációs események hozhatták létre.



IV.3.1.2. ábra A pCSN43 plazmiddal nyert transzformánsok hibridizációs mintázata
Az oszlopokban található minták a következők: Transzformáns törzs DNS-e *Cla*I enzimmel kezelve (1) és emésztetlenül (2); a *T. viride* AH124-BG7-es törzs DNS-e *Cla*I enzimmel kezelve (3) és emésztetlenül (4); egy másik transzformáns törzs DNS-e *Cla*I enzimmel kezelve (5) és emésztetlenül (6); a pCSN43 plazmid *Cla*I enzimmel emésztve (7) és kezeletlenül (8).

Giczey és munkatársai (1998) a pCSN43 plazmid endokitináz gént tartalmazó származékával *T. hamatum* törzset transzformáltak. A plazmidok beépülése nagyrészt homológ

helyre történt, a transzformációs gyakoriság 300/μg DNS volt, ami megfelelt az általunk tapasztaltaknak. Nagyságrendjében hasonló eredményt értek el *Trichoderma viride* törzs pAN7-1 plazmiddal való transzformációjánál. Ez a plazmid *E. coli* hygromycin B foszfotranszferáz génjét *A. nidulans* gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén promóter és terminátor szekvenciákkal tartalmazza. Itt 200-800/μg DNS transzformációs gyakoriságot figyeltek meg (Herrera-Estrella és mtsai, 1990). *T. hamatum* törzs pAN7-1 plazmiddal történt transzformációja során szintén megfigyelték az általunk is tapasztalt szabad plazmid-származékok jelenlétét, melyről úgy gondolták hogy integrálódás után kivágódott elemek lehetnek (Ulhoa és mtsai, 1992).

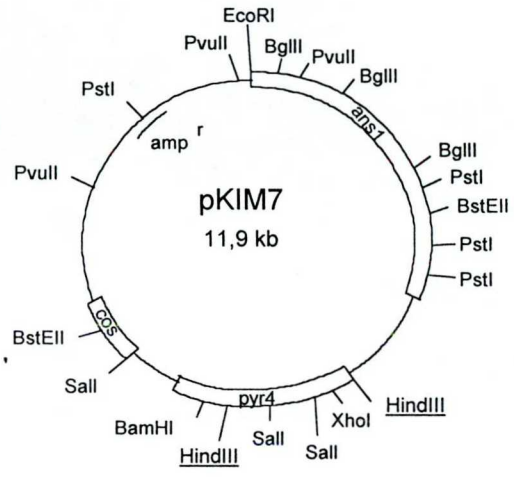
IV.3.2. Uracil auxotrófia komplementáció (Manczinger és mtsai, 1995)

Az uracil auxotróf mutánsok előállításához alkalmazott 5-fluoro-orotsav segítségével az orotát pirofoszforibozil transzferáz és az orotidin-5-foszfát dekarboxiláz enzimek szintézisében sérült mutánsok hozhatók létre. A *T. harzianum* AH356-BG2 törzsből a kezelések során nyert kilenc uracil auxotróf mutáns anasztomózisos heterokarion teszttel két komplementációs csoportba volt osztható. Nyolc mutáns tartozott az ura1 jelzésű csoportba, míg csupán egy az ura2-be. A transzformációs kísérletekhez az ura1 csoport egyik mutánsából és az ura2 csoportba tartozó mutánsból létrehozott protoplasztokat egyaránt kezeltük, a pKIM7 (**IV.3.2.1. ábra**), a pTRura5-3 (**IV.3.2.2. ábra**) és a pPAura510 (**IV.3.2.3. ábra**) plazmidokkal (**IV.3.2.1. táblázat**).

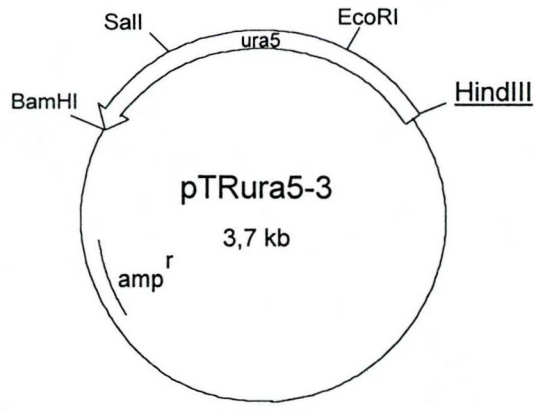
Mutánsok	pKIM7	pTRura5-3	pPAura510
ura1	62-220	0	0
ura2	0	446-1420	169-422

IV.3.2.1. táblázat Az egyes plazmidokkal nyert transzformánsok mennyisége ismételt kísérletekben $1\text{-}3\times10^7$ protoplasztra és 1 μg DNS-re vonatkoztatva.

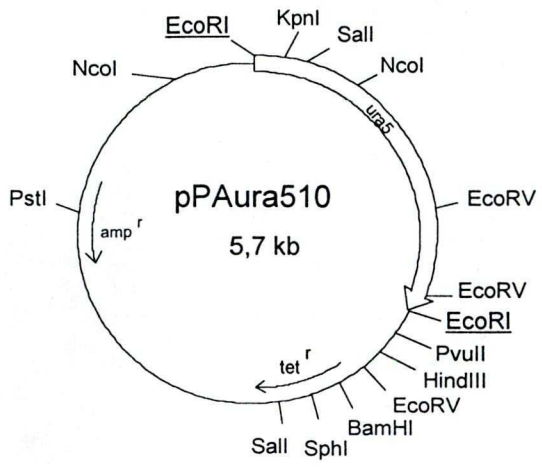
Az eredmények alapján azonosíthatóvá váltak a mutáns-csoportok. Így az ura1 csoportba tartozó mutánsok az orotidin-5-foszfát dekarboxiláz enzim génjében, az ura2 csoportba tartozó mutáns pedig az orotát-pirofoszforibozil transzferáz enzim génjében sérültek.



IV.3.2.1. ábra A pKIM7 plazmid térképe (Osman, 1987). A 11,9 kbp terjedelmű plazmid vektor alapját a 6,1 kbp nagyságú pBR325 klónozó vektor adja. A 3,5 kbp méretű *ans*1 szekvencia *A. nidulans* kromoszómális DNS-éből származik, szerepe a hordozó plazmid integrációs gyakoriságának növelésével az abortív transzformánsok számának csökkentése. A λ fágból származó 0,9 kbp méretű *cos* régió lehetővé teszi a plazmid vektor fágfejekbe pakolódását. A *Neurospora crassa* orotidin-5-foszfát dekarboxiláz enzimét kódoló *pyr*4 jelzésű gén saját promóterével és terminátorával együtt található a plazmidon.

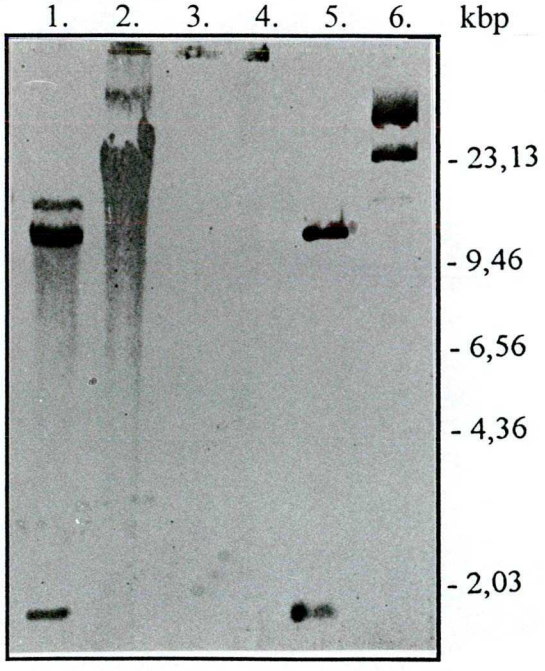


IV.3.2.2. ábra A pTRura5-3 plazmid térképe (Bergés és Barreau, 1991). A 3,7 kbp nagyságú plazmid alapja a 2,7 kbp nagyságú pUC8 klónozó vektor. Ebbe ágyazódik egy 1 kbp méretű fragment, mely *Trichoderma reesei* orotát pirofoszforibozil transzferáz enzimét kódoló *ura*5 jelzésű gént hordozza, saját promóterével és terminátorával együtt.



IV.3.2.3. ábra A pPAura510 plazmid térképe (Bergés és Barreau, 1991). Az 5,7 kbp nagyságú plazmid 4,4 kbp-nyi részét a pBR322 vektor adja, melynek *Eco*RI klónozó helyére építették be az 1,3 kbp nagyságú fragmentet. Ez *Podospora anserina* orotát pirofoszforibozil transzferáz enzimét kódoló *ura5* jelzésű gént hordozza, saját promóterével és terminátorával.

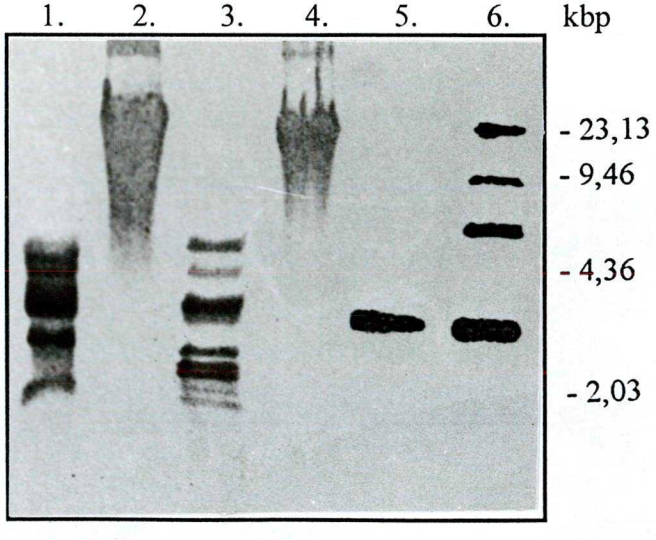
A *Hin*dIII restrikciós endonukleáz két helyen hasítja a pKIM7 plazmidot (**IV.3.2.1. ábra**). Az egyik hasítóhely a *pyr*4 gén és a pBR325 szekvencia határán található, a másik a *pyr*4 génben. Így egy 1,2 kbp nagyságú fragment vágódik ki a *pyr*4 génből, illetve a plazmidból, és megmarad egy 10,7 kbp-nyi szakasz (**IV.3.2.4. ábra**; 5. oszlop). A plazmid DNS egy része szabadon replikálódó formában található meg, míg nagyobbik része beépült a



IV.3.2.4. ábra A pKIM7 plazmiddal nyert transzformánsok hibridizációs mintázata. Az oszlopokba felvitt minták a következők: a K11 transzformáns törzs DNS-e *Hin*dIII restrikciós enzimmel emésztve (1) és kezeletlenül (2), a szülői törzs DNS-e *Hin*dIII restrikciós enzimmel emésztve (3), és kezeletlenül (4), a pKIM7 plazmid DNS *Hin*dIII restrikciós enzimmel emésztve (5) és kezeletlenül (6).

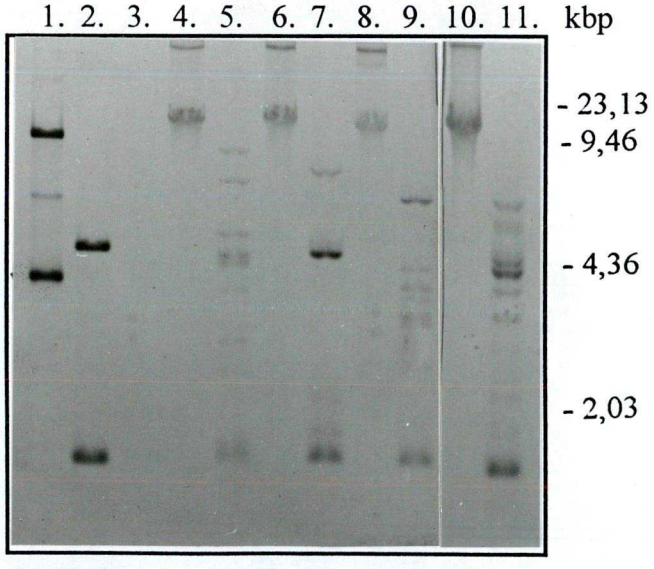
genomba (2. oszlop). A restrikciós enzimmel kezelt minta három jól elkülönülő sávot mutat (1. oszlop), melyek közül az alsó kettő elhelyezkedése megfelel az emésztett plazmid sávjainak. A harmadik, méretéhez képest gyengébb jelet adó sáv, szegélyező régiónak feleltethető meg. Így e mintázat alapján valószínűsíthető, hogy tandem ismétlődő típusú beépülés történt.

A pTRura5-3 plazmidon, egyetlen *Eco*RI hasítóhely található, az *ura5* génben (**IV.3.2.2. ábra**). Ennek megfelelően az emésztett plazmid oszlopában egyetlen sáv jelent meg (**IV.3.2.5. ábra**; 5. oszlop). A transzformáns törzsek emésztetlen DNS-ében a jel a genomiális DNS-nek megfelelő magasságban és alakban helyezkedik el (2. és 4. oszlop), tehát a plazmidmolekulák beépültek a genomba. A restrikciós enzimmel kezelt minták sok, egymástól többé-kevésbé elkülöníthető sávot adnak, amelyek több szegélyező régiónak feleltethetők meg (1. és 3. oszlop). Ez több helyre történő, szétszórt beépülésre utal. A nyitott plazmid magasságában elhelyezkedő, erősebb jelölődésű sávok tandem ismétlődő beépüléstől eredhetnek.



IV.3.2.5. ábra A pTRura5-3 plazmiddal nyert transzformánsok hibridizációs mintázata
Az oszlopokba felvitt minták a következők: a TR3 transzformáns törzs DNS-e *Eco*RI restrikciós enzimmel emésztve (1) és kezeletlenül (2), a TR1 transzformáns törzs DNS-e *Eco*RI restrikciós enzimmel emésztve (3) és kezeletlenül (4), a pTRura5-3 plazmid DNS *Eco*RI restrikciós enzimmel emésztve (5) és kezeletlenül (6).

A pPAura510 jelű plazmidon két *Eco*RI restrikciós enzim hasítóhely található, mindkettő az *ura5* gén és a pBR322 szekvencia határán (**IV.3.2.3. ábra**). Így ezzel az endonukleázzal kezelve két fragment keletkezik (**IV.3.2.6. ábra**; 2. oszlop). A kisebbik fragmenten található az *ura5* gén, a nagyobbik pedig a klónozó vektornak felel meg. A transzformáns tulajdonságú törzsekből tisztított emésztetlen DNS mintákban a hibridizációs jel a genomiális DNS-nek megfelelő magasságban és alakban látható, tehát a plazmidmolekulák beépültek a genomba. Az *ura5* génnek megfeleltethető fragment mindegyik, restrikciós enzimmel kezelt mintában megtalálható. A PA2 és a PA8 transzformánsok esetében a pBR322 vektor méretének megfelelő magasságban található erős jel, tandem ismétlődő beépülést jelez, mely a PA8 transzformánsnál több különböző helyen, a PA2 esetében egy vagy két helyen történhetett. A PA1 és PA3 transzformánsoknál szintén sokféle helyre beépült plazmidmolekulákat jelez a hibridizáció, mely a PA3 esetében csak egyedi molekulákkal



IV.3.2.6. ábra A pPAura510 plazmiddal nyert transzformánsok hibridizációs mintázata
Az oszlopokba felvitt minták a következők: A pPAura510 plazmid DNS kezeletlenül (1) és *Eco*RI restrikciós enzimmel emésztve (2), az AH356-BG2 törzs DNS-e emésztetlenül (3), és a transzformáns törzsek DNS-e kezeletlenül és *Eco*RI restrikciós enzimmel emésztve. PA1 (4, 5), PA2 (6, 7), PA3 (8, 9) PA8 (10, 11).

történt, a PA1 esetében azonban talán két-három plazmid tandem kapcsolódására utal, a pBR322 vektor méretének megfelelő magasságban található halvány jel.

T. reesei esetében többen beszámoltak uracil auxotrófia komplementáción alapuló, hatékony transzformációs rendszerekről. A transzformációs gyakoriság *A. niger pyr*A génjével 700-800, *N. crassa pyr*4 génjével 1500, *T. reesei pyr*G (*ura*3) és *ura*5 génjével 10000-12000/μg DNS volt (Gruber és mtsai, 1990a, 1990b; Bergés és Barreau, 1991). Bár a homológ génnel végzett transzformáció mintegy 8-16-szorosára emelte a transzformációs gyakoriságot, ugyanakkor a transzformánsok egy részében csak géncsere történt és a plazmid többi részét nem hordozták. A beépülés a homológ génnel végzett kísérletekben is elsősorban szétszórtan történt, egy vagy több, tandem kapcsolódó molekulával, és négy transzformánsból csak egy tartalmazta a plazmidot homológ helyen. A transzformánsoknak körülbelül a fele volt stabil, ezek csak beépült plazmidot tartalmaztak, míg az instabil transzformánsokban szabad plazmidok jelenlétét is ki lehetett kimutatni. Ezekről nem sikerült egyértelműen eldönteni, vajon "tökéletlen" beépülés után kivágódótt elemek lehettek-e, vagy olyan molekulák, melyek sohasem integrálódtak, az azonban bebizonyosodott, hogy átrendeződött molekulákról volt szó, melyekben az ampicillin rezisztencia gén már nem működött. A mi kísérleteinkben a pKIM7 plazmiddal nyert öt megvizsgált transzformáns mindegyike instabilnak mutatkozott, konídiumaik nem csíráztak ki szintetikus minimál táptalajon. Ez a jelenség együtt járt a beépült plazmidok mellett feltűnt, szabadon replikálódó plazmidmolekulák jelenlétével (**IV.3.2.4. ábra**; K11 törzs). Mivel a transzformációs gyakoriság is ebben a rendszerben volt a legalacsonyabb, úgy tűnik hogy a hordozó plazmid integrációs gyakoriságának növelése céljából beépített *ans*1 szekvencia, *Trichoderma* gazdában nem működik hatékonyan. A pPAura510 plazmiddal nyert transzformánsok közül kilencnek a stabilitását vizsgáltunk meg. Ezek közül négynek a konídiumai 90-100%-ban csíráztak ki szintetikus minimál táptalajon, a többi öt törzs azonban instabilnak bizonyult. Ez utóbbiak hibridizációs vizsgálatánál kizárólag genomba beépült plazmidmolekulákat lehetett kimutatni (**IV.3.2.6. ábra**; PA1, PA2, PA3, PA8). Itt tehát valamilyen egyéb jelenség okozhatja az instabilitást, bár nem lehet kizárni az észlelhetőség határa alatti mennyiségű szabad plazmidok jelenlétét sem. A legnagyobb

transzformációs gyakoriságot a pTRura5-3 plazmiddal tudtuk elérni. Kilenc megvizsgált transzformáns mindegyike nagyfokú stabilitást mutatott, konídiumaik 90-100%-ban kicsíráztak szintetikus minimál táptalajon. A hibridizációval vizsgált törzsekben csak beépült plazmidmolekulák voltak megfigyelhetők, szabad állapotúak nem.

IV.3.3. Arginin auxotrófia komplementáció (Antal és mtsai, 1997)

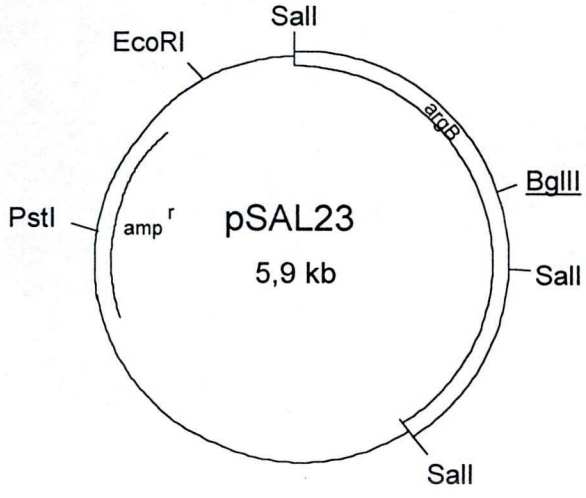
Az arginin auxotróf mutánsok transzformációjára olyan plazmidok álltak rendelkezésünkre, melyek az ornitin-karbamoil transzferáz (OTC-áz) enzimet kódoló *arg*B gént hordozták. Az OTC-áz a citrullin ornitinből és karbamoil-foszfátból való szintézisét végzi el, így a *T. harzianum* AH48 törzs 16 arginin auxotróf mutánsa közül azokat a törzseket választottuk ki, melyek konídiumai ornitinnel kiegészített minimál táptalajon csírázásra képtelenek voltak, ugyanakkor citrullinnal kiegészített minimál táptalajon gyorsan növekedő telepeket hoztak létre. A 16 mutánsból 10 mutatott ilyen fenotípust. Mivel a karbamoil-foszfát szintetáz működésében sérült mutánsok ezzel a módszerrel nem különíthetők el, anasztomózisos heterokarion teszttel osztottuk őket további csoportokra. Az eredmények alapján a feltételezett OTC-áz mutáns törzsek három komplementációs csoportba tartoztak. Ezek egy-egy tagját (m1, m5, és m7) választottuk ki, a transzformációs kísérletek alanyául. A mutánsokból 10^6-10^7 mennyiségben előállított protoplasztokat pSal23 plazmiddal (**IV.3.3.1. ábra**) transzformáltuk (**IV.3.3.1. táblázat**).

Mutánsok:	m1	m5	m7
Transzformánsok száma:	1-4	2-6	0

IV.3.3.1. táblázat Az egyes kísérletekben 1 μg pSal23 plazmid DNS-re vonatkoztatott transzformációs gyakoriságok.

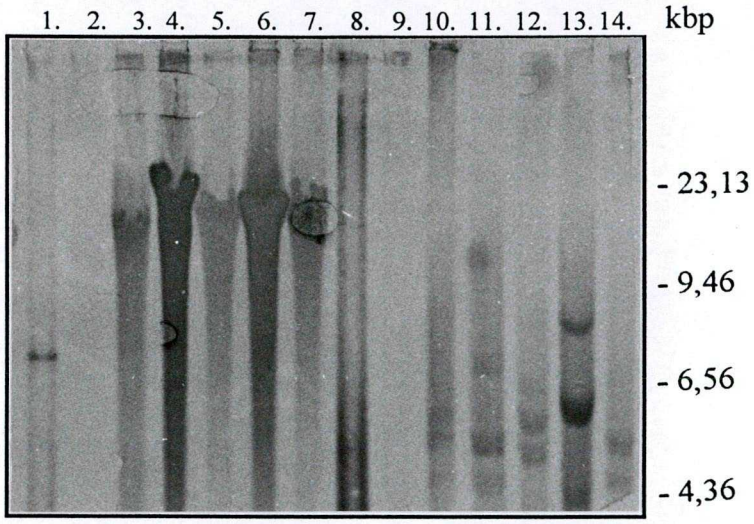
Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a harmadik komplementációs csoportba tartozó m7 mutáns a karbamoil-foszfát szintetáz génjében sérült, az első két komplementációs

csoportba tartozó m1 és m5 pedig az ornitin-karbamoil transzferázében. Az ugyanazon enzim-működésben sérült két csoport léte allélikus komplementációval magyarázható. Ezek szerint az OTC-áz, *T. harzianum*-ban, egynél több alegységből felépülő enzim. Ez az eredmény nem meglepő, mivel az OTC-ázt három alegységes enzimként írták le *A. nidulans*-ban (Upshall és mtsai, 1986) és *N. crassa*-ban (Davis, 1986).



IV.3.3.1. ábra A pSal23 plazmid térképe (Dmochowska és mtsai, 1986). Az 5,9 kbp nagyságú plazmid nagyobbik részét a 3,3 kbp-os pBR327-es klónozó vektor adja. A tetraciklin rezisztencia génben található *Sal*I restrikciós endonukleáz hasítóhelyre klónozták be azt a 2,6 kbp hosszúságú fragmentet, mely *Aspergillus nidulans arg*B génjét hordozza, saját promóterével és terminátorával együtt.

A pSal23 plazmidon egyetlen *Bgl*II restrikciós endonukleáz hasítóhely található (**IV.3.3.1. ábra**), az *arg*B gént hordozó fragmenten. A transzformálatlan törzsből származó DNS mintához nem hibridizált hozzá a plazmid DNS (**IV.3.3.2. ábra** 2. és 9. oszlop). A transzformáns törzsek kezeletlen DNS mintájában a jel a genomiális DNS-nek megfelelő magasságban és alakban helyezkedik el, tehát a plazmidmolekulák beépültek a genomba. Ugyanezen törzsek *Bgl*II restrikciós endonukleázzal emésztett mintáiban igen nagyszámú, különböző méretű fragment tűnt fel. Ez a jelenség két módon magyarázható. Egyrészt e sávok eredhetnek a különböző helyekre beépült plazmidmolekulákat szegélyező régióktól. Ebben az esetben több helyre, szétszórtan történt a beépülés. Másfelől a pSal23 plazmid nagyfokú rekombinációs készséget mutatott. Így a sávok származhatnak a létrejött, különböző méretű, rekombináns plazmid-formák beépülésétől is.



IV.3.3.2. ábra A pSal23 plazmiddal nyert transzformánsok hibridizációs mintázata

Az oszlopokba felvitt minták a következők: kezeletlen pSal23 plazmid DNS (1), transzformálatlan törzs DNS-e (2), transzformáns törzsek DNS-e emésztetlenül S14 (3), S15 (4), S16 (5), S54 (6) és S55 (7), pSal23 plazmid DNS-e *Bgl*II restrikciós enzimmel kezelve (8), transzformálatlan törzs DNS-e *Bgl*II restrikciós enzimmel kezelve (9), transzformáns törzsek DNS-e *Bgl*II restrikciós enzimmel kezelve S14 (10), S15 (11), S16 (12), S54 (13) és S55 (14).

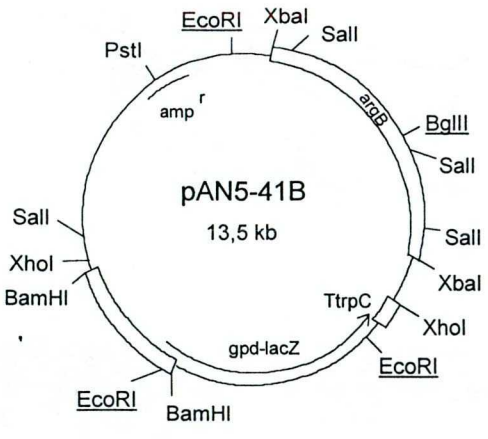
Arginin auxotróf *Trichoderma* törzsek transzformációjáról kevés közlemény látott napvilágot. Pentilla és munkatársai (1987) *T. reesei* törzs *A. nidulans arg*B génjét hordozó plazmiddal (pSal43) való transzformációjánál a mi eredményeinknél jóval nagyobb transzformációs gyakoriságról számoltak be (150-400/μg DNS), ami azért érdekes, mivel ez a plazmid *A. nidulans*-ban is mindössze 1-5 transzformánst eredményezett (Goc és mtsai, 1987). A pSal23 plazmiddal szintén nem volt magas az elért transzformációs gyakoriság *A. nidulans*-ban, (4-29/μg DNS), így ez érthetőbbé teszi az általunk tapasztalt alacsony gyakoriságot. Megfigyeléseik szerint a plazmidmolekulák több különböző helyre épültek be a genomba, nagyrészt tandem ismétlődő módon. A pSal23 plazmiddal nyert transzformánsok közül nyolcnak vizsgáltuk meg a stabilitását szintetikus minimál táptalajon. Két törzs konídiumai 90-100%-ban kicsíráztak, a többi hat törzs azonban instabilnak bizonyult. Pentilla és munkatársai

(1987) a *T. reesei* törzs transzformációjánál a pSal43 plazmid tandem ismétlődő formában történt genomba épülését, és a transzformánsok 100%-os stabilitását figyelték meg.

IV.3.4. Jelző gén alkalmazása (Antal és mtsai, 1997)

Az előzőekben ismertetett transzformációs rendszerek közös tulajdonsága, hogy a regenerálódó protoplasztokból kifejlődő telepek valamennyien hordozzák a transzformáló plazmid egységeit. Külön válogatásra nincs szükség, hiszen azok a protoplasztok, melyek plazmidot nem vettek fel, vagy amelyekben a plazmidon levő gén expressziója nem tud megvalósulni, -eltekintve a revertánsoktól és a ritka spontán mutánsoktól- nem képeznek telepet. A transzformációs kísérletekben azonban nem mindig nyílik mód ilyen szelekciós módszerek alkalmazására. Ekkor hasznos, ha valamilyen jelző gént tudunk expresszáltatni, mivel ezek transzformáns törzsekbeli jelenléte fenotípusosan megjelenik.

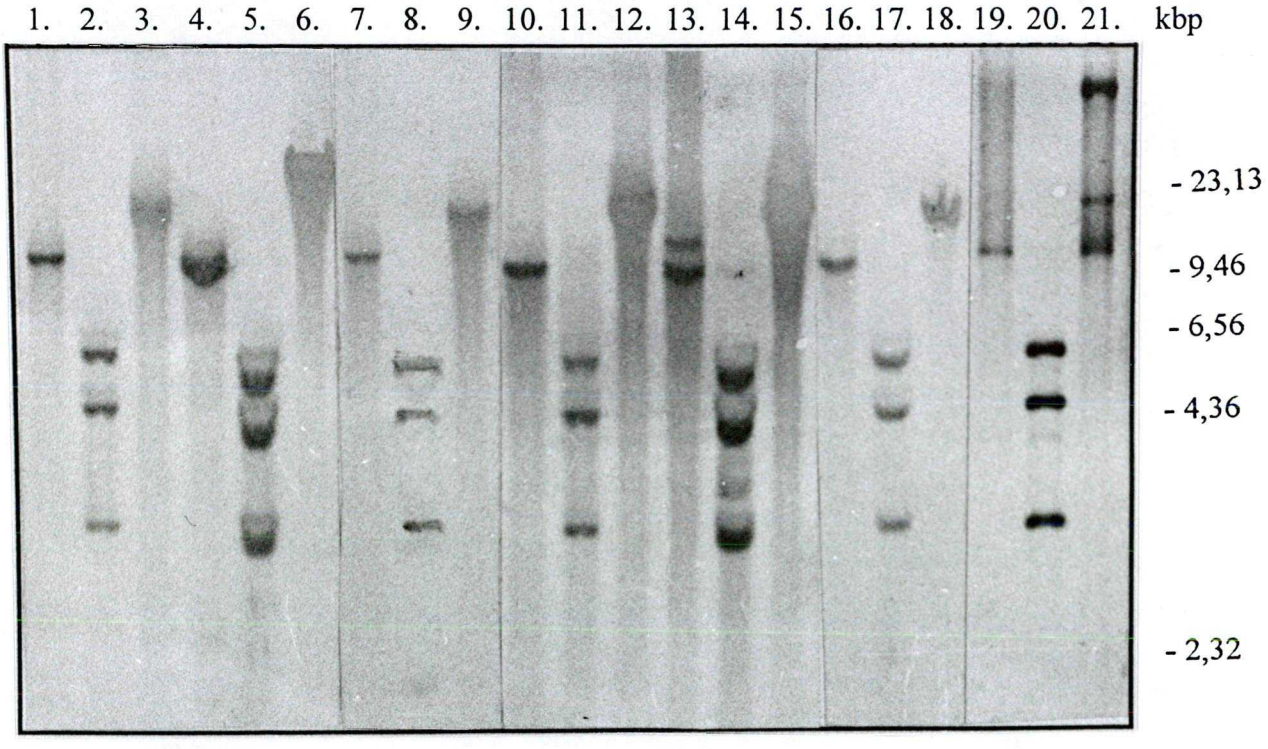
Az alább ismertetendő transzformációs rendszerben két szelekciós módszer állt rendelkezésünkre. Ezek az arginin auxotrófia komplementációján és *E. coli lacZ* génje expresszióján alapultak. A transzformánsok kiválasztásához a direkt szelekciós arginin auxotrófia komplementációt választottuk. Az m1 és m5 jelű mutánsokból előállított 10^6-10^7 mennyiségű protoplasztot transzformáltuk a pAN5-41B plazmiddal. Az egyes kísérletekben 1 μg DNS-re vonatkoztatva az m1 mutáns esetében 1-3, az m5 mutáns esetében 3-6 transzformáns telep jelent meg.



IV.3.4.1. ábra A pAN5-41B plazmid térképe (Van Gorcom és mtsai, 1986). A 13,5 kbp hosszúságú plazmid alapját a 4,2 kbp-os pBR329 klónozó vektor adja. A kloramfenikol rezisztencia gén területére klónozták be *A. nidulans argB* génjét valamint saját promóterét és terminátorát hordozó 3,5 kbp hosszúságú *Xba*I fragmentet. *E. coli lacZ* génje *A. nidulans* gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz génjének promóterével és

triptofán C génjének terminátorával összekapcsolva egy 5,8 kbp nagyságú fragmentet alkotnak, melyet a pBR329 vektor tetraciklin rezisztencia génjének területére illesztettek be.

A pAN5-41B plazmiddal nyert transzformáns törzsek emésztetlen DNS mintáiban a hibridizációs jel a genomiális DNS-sel megegyező magasságban és alakban jelent meg, jelezve a plazmidmolekulák beépülését a genomba (**IV.3.4.2. ábra**). A *Bgl*II restrikciós endonukleáz



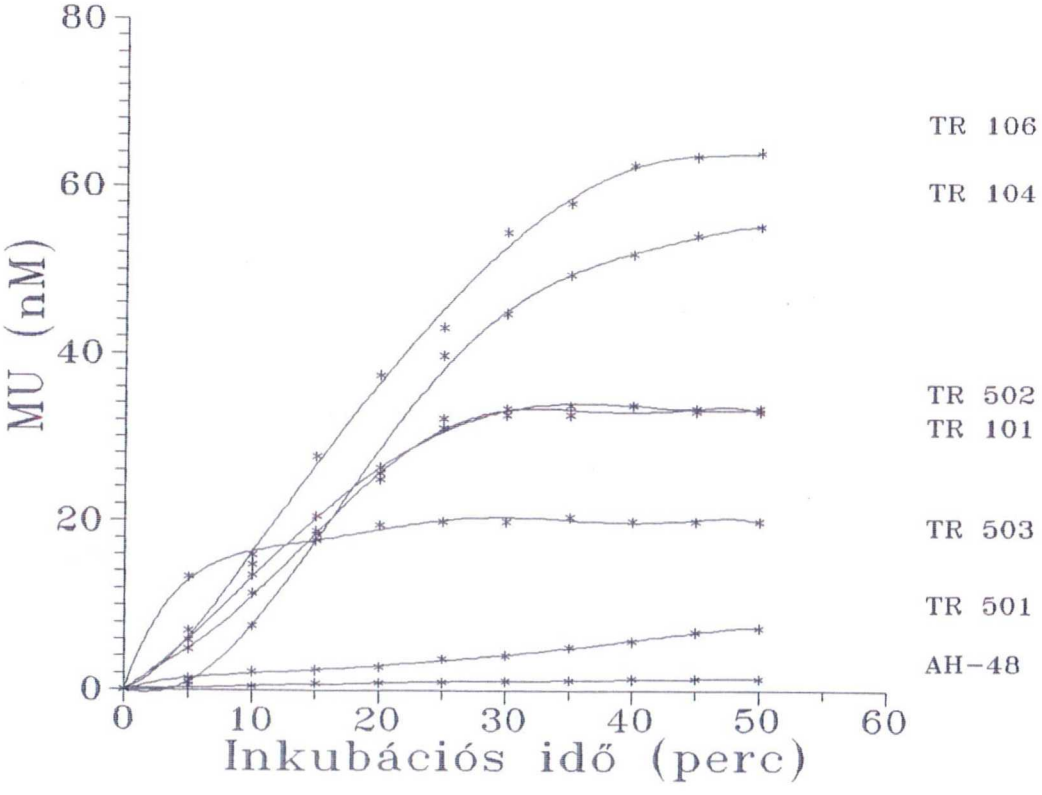
IV.3.4.2. ábra A pAN5-41B plazmiddal nyert transzformánsok hibridizációs mintázata
Az oszlopokba felvitt minták a következők: a TR503 (1), TR502 (4), TR501 (7), TR106 (10), TR104 (13) és TR101 (16) jelzésű transzformáns törzsek, valamint a pAN5-41B plazmid DNS-e (19) *Bgl*II restrikciós enzimmel kezelve. A TR503 (2), TR502 (5), TR501 (8), TR106 (11), TR104 (14) és TR101 (17) jelzésű transzformáns törzsek, valamint a pAN5-41B plazmid DNS-e (20) *Eco*RI restrikciós enzimmel kezelve. A TR503 (3), TR502 (6), TR501 (9), TR106 (12), TR104 (15) és TR101 (18) jelzésű transzformáns törzsek, valamint a pAN5-41B plazmid DNS-e (21) emésztetlenül.

egy hasítóhellyel rendelkezik a plazmidon, mégpedig az *arg*B génen (**IV.3.4.1. ábra**). Az ezzel az enzimmel kezelt DNS mintákban -a TR104 jelzésű törzs kivételével- egyetlen sáv jelent meg, melyek azonos magasságban helyezkednek el a felnyitott plazmiddal. A három hasítóhellyel rendelkező *Eco*RI restrikciós enzim által létrehozott fragmentek valamennyi transzformáns emésztett DNS mintáiban megfigyelhető. A szegélyező régióknak megfeleltethető sávok nem láthatóak. Mindez azt sugallja, hogy a beépülés tandem ismétlődő formában, nagy példányszámban történt. A TR104 jelzésű törzs hibridizációs mintázata ettől kissé eltérő jellegzetességeket mutat. Mind az egyszeres emésztésnél (13. oszlop), mind pedig a három helyen hasító *Eco*RI enzim esetében (14. oszlop) megjelentek a felnyitott plazmid sávjai, ami tandem ismétlődő beépülést jelez, valamint további sávok is, melyek a szegélyező régióknak feleltethetők meg. A sávok egymáshoz viszonyított intenzitásbeli különbözőségei arra utalnak, hogy az ismétlődés mértéke ennél a törzsnél jóval alacsonyabb.

A pAN5-41B plazmiddal nyert transzformáns törzsekben a *lac*Z gén expresszálódását két módszerrel vizsgáltuk. A β-galaktozidáz aktivitás kimutatása során a táptalaj felületére oltott transzformáns telepek barnára színeződtek, míg a kontrollként leoltott szülői törzs fehér maradt (**IV.3.4.3. ábra**).

A β-galaktozidáz aktivitás mennyiségi mérését 4-metilumbelliferil-β-D-galaktopiranozid szubsztráttal végeztük el, melyből az enzimműködés eredményeként metilumbelliferon keletkezett. A *T. harzianum* AH48 törzs fehérje preparátuma igen kevés reagenst alakított át (**IV.3.4.4. ábra**). A transzformáns törzsek mindegyikében emelkedett β-galaktozidáz aktivitás volt kimutatható, de a mérték nagyon változónak bizonyult. Ennek okát a plazmidmolekulák beépülésének eltéréseiben kereshetjük. Bár a hibridizációs kísérletekben (**IV.3.4.2. ábra**) igyekeztünk azonos mennyiségű DNS mintát felvinni minden oszlopba, az egyes törzsek mintái között mégis felfedezhetők intenzitásbeli különbségek, melyek a beépült plazmidok eltérő számából eredhetnek. Így például a TR503 (1.-3. oszlop) és a TR502 (4.-6. oszlop) jelzésű törzseknél egyenes arányosság áll fenn a hibridizációs jel erőssége, és a β-galaktozidáz aktivitások között. A β-galaktozidáz aktivitásokban mérhető különbségek kialakulásában azonban a génmennyiségen kívül szerepet játszanak más tényezők is. A különböző

IV.3.4.3. ábra A szülői és néhány transzformáns törzs β-galaktozidáz aktivitásának kimutatása. Középen a szülői törzs.



IV.3.4.4. ábra A törzsek β-galaktozidáz aktivitása az idő függvényében.

MU: metilumbelliferon

szabályozási környezetek, melyekbe a törzsek genomjának más-más helyére beépült plazmidmolekulák kerültek, igen jelentős módon befolyásolják a *lacZ* gén expressziójának hatásfokát. *T. reesei*-ben és *T. longibrachiatum*-ban szintén kimutatták *E. coli lacZ* génjének sikeres expresszióját (Pentilla és mtsai, 1987; Sánchez-Torres és mtsai, 1994), és a β-galaktozidáz aktivitás a *T. longibrachiatum* esetében ugyancsak eltért az integrálódott génmennyiség alapján várhatótól, amit a kutatók hozzánk hasonlóan a beépülés helyén ható szabályozási környezettel magyaráztak. Érdekes megfigyelés volt, hogy a legalacsonyabb β-galaktozidáz aktivitást mutató TR501 törzs volt mitotikusan a legstabilabb (30-40%), míg a többi törzs konídiumai nem csíráztak ki szintetikus minimál táptalajon.

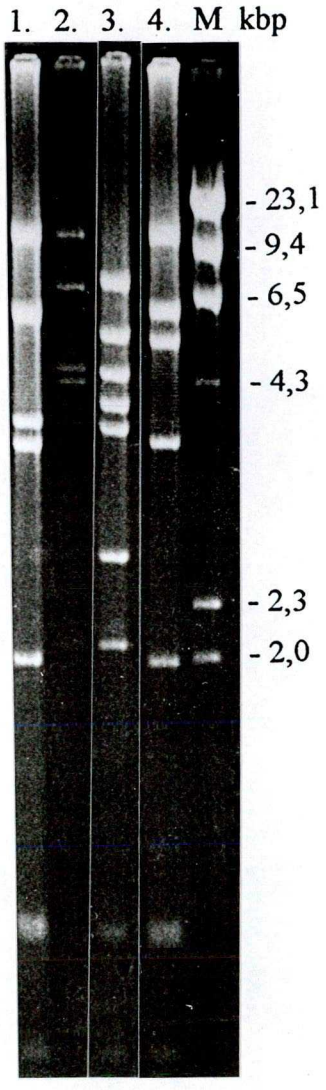
IV.4. *Trichoderma* törzsek mtDNS-ének jellemzése

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fajok mitokondriumának genetikája még teljesen feltáratlan terület. Egyetlen publikáció jelent meg eddig, melyben tizenkét *T. viride* törzs mtDNS-ének méretét és restrikciós enzimekkel nyert fragmenjeik mintázatát hasonlították össze (Meyer, 1991), de a mtDNS fizikai térképét, géntartalmát, génjeinek exonális-intronális felépítését, sorrendjét, szekvenciáját, a mtDNS öröklődését, az esetleges rekombinációs eseményeket eddig még nem vizsgálták. Holott a mtDNS, a mitokondriális gének konzervativitásának következtében, alkalmas lehet rendszertani kapcsolatok feltárására, a nem kódoló részek nagyobb változékonyságának felhasználásával pedig törzsek azonosítására. A mitokondrium genetikai állományának vizsgálata a *Trichoderma* törzsek ipari felhasználása szempontjából is érdekes lehet. Mivel az extracelluláris enzimek termelődése nagy energiaigényű folyamat, minden olyan hatás, mely gátolja a mitokondriumok működését, csökkenti az előállított enzimek mennyiségét. Ilyen hatással rendelkezik például a cellulóz bontása során felszabaduló glükóz is, mely akadályozza a cellulázok további termelődését (Abrahao-Neto és mtsai, 1995). A gátló tényezőkkel szemben ellenállóbb mitokondriális mutánsok előállításánál is hasznos lehet a mitokondriális DNS szerveződésének alaposabb ismerete.

IV.4.1. *Trichoderma* törzsek mtDNS-ének restrikciós mintázata

Trichoderma törzsek mtDNS-ének variabilitási vizsgálatához *T. harzianum* illetve *T. viride* fajcsoportba tartozó törzsek mtDNS-ének *Hpa*II restrikciós enzimmel nyert fragmentjeinek mintázatát hasonlítottuk össze (**IV.4.1.1. ábra**). A *T. harzianum* AH356, T66 és T95 törzsek esetében a sávok mintázata jelentős eltérést mutatott, legalábbis a nagy molekulasúlyú régióban. A kis molekulasúlyú régióban azonban a T66 és T95 törzsek esetében három fragment hasonló elhelyezkedésűnek bizonyult (az AH356 törzs esetében ez a tartomány nem vizsgálható, mivel túl kevés DNS került felvitelre). Érdekes hogy e három fragment a *T. viride* fajcsoportba tartozó AH228 törzs esetében is megfigyelhető, továbbá a *T. harzianum* T66

és *T. viride* AH228 törzsek esetében a teljes mintázat mindössze egy sáv elhelyezkedésében mutat eltérést.



IV.4.1.1. ábra *Trichoderma* törzsek mtDNS-ének *Hpa*II restrikciós enzimmel nyert fragmentjeinek mintázata. Az oszlopokban található minták: *T. viride* AH228 (1); *T harzianum* AH356 (2), T95 (3) és T66 (4) törzsek mtDNS-e, valamint *Hin*dIII emésztett λ DNS molekulasúly marker (M).

Az általunk vizsgált törzsek mindegyike tehát különböző mintázatot mutatott, de a vizsgálatokba bevont törzsek alacsony száma miatt a variabilitást tekintve messzemenőbb következtetést nem vonhatunk le. Meyer (1991) aki 12 *T. viride* törzs mtDNS-ének restrikciós enzimekkel nyert fragmentjeinek mintázatát hasonlította össze azt találta, hogy bár a legtöbb törzs egyedi mintázattal rendelkezett, két, egymástól távoli helyről származó izolátum azonos mintázatot mutatott. Ezek alapján arra a következtetésre jutott, hogy ez a módszer *Trichoderma* törzsek azonosítására önmagában nem alkalmazható biztonságosan. E megállapítást azzal a

megjegyzéssel egészítenénk ki, hogy kiválasztott törzsek mtDNS-ének mintázata elvileg akár mutagenezissel, akár célzottabb beavatkozással egyedivé tehető, és ekkor az adott törzs molekuláris szintű törzsazonosításához megfelelő markerhez juthatunk. Ez a gyakorlatban segítséget nyújthat a szántóföldi kísérletekbe bevont biokontroll *Trichoderma* törzsek elterjedésének vizsgálatában.

IV.4.2. A mtDNS részletes vizsgálata a *Trichoderma harzianum* T95 törzs esetében (Antal és mtsai, 1999b)

A kémiai és biológiai fungicideket együtt használó integrált növényvédelem számára, az alkalmazott vegyszerekkel szemben rezisztens biokontroll tulajdonságú törzseket fejlesztenek ki. Ezek egyike benomil rezisztens *T. harzianum* T95 törzs (ATCC 60850) (Ahmad és Baker, 1987), melyet nemzetközi szakirodalomban való ismertsége okán választottunk ki a részletesebb mtDNS vizsgálatokhoz.

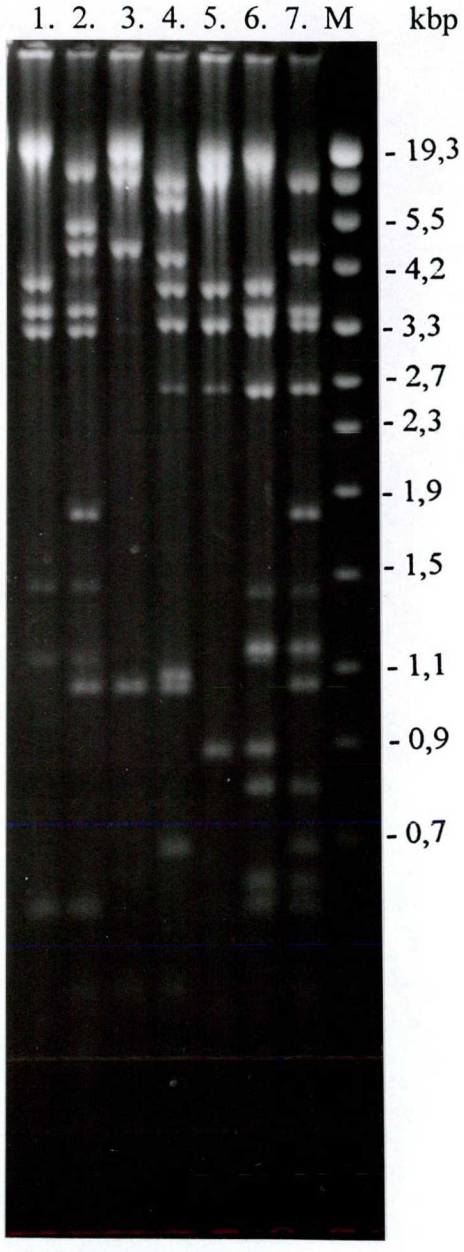
IV.4.2.1. A *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének fizikai tulajdonságai

Méret. A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális DNS-ének méretét *Cfo*I, *Eco*RI és *Eco*RV restrikciós enzimekkel nyert fragmentjeinek nagysága alapján határoztuk meg (**IV.4.2.1.1. táblázat, IV.4.2.1.1. ábra**). A csak egyféle enzimmel történt emésztések 29,61-29,90 kbp nagyságú mtDNS-t sejtettek. Mivel ekkor kevés számú, de igen nagy molekulasúlyú fragment keletkezett, melyek esetében a méretet kisebb pontossággal lehet megállapítani, elvégeztük a mtDNS minták többféle restrikciós enzimmel egyszerre történő emésztését is, melynél a nagy méretű fragmentek kisebb darabokra váltak szét. A kettős emésztések alapján a mtDNS mérete 28,78-29,39 kbp, míg a hármas emésztésnél 28,50 kbp-nyi méretűnek adódott. Mivel ez utóbbi esetben vált szét a mtDNS a legtöbb darabszámú és legkisebb átlagos méretű fragmentekké, vizsgálati eredményeink alapján ezt tekinthetjük a legpontosabban megadott méretnek.

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

Fragmentek	*Cfo*I	*Cfo*I + *Eco*RI	*Eco*RI	*Eco*RI + *Eco*RV	*Eco*RV	*Eco*RV + *Cfo*I	*Cfo*I + *Eco*RI + *Eco*RV
1	18,840	8,356	14,600	7,320	12,390	12,390	7,320
2	3,767	5,100	8,570	6,530	9,610	3,746	4,190
3	3,380	4,540	4,540	4,190	3,746	3,335	3,380
4	3,120	3,380	(3,356)	3,746	3,210	3,210	3,210
5	(1,447)	3,120	1,140	3,210	(2,622)	2,540	2,540
6	(1,175)	1,811	0,412	(2,622)	0,947	(1,423)	1,811
7	0,566	(1,447)	0,352	1,200		1,213	(1,423)
8		(1,175)		1,140		(1,175)	1,213
9		1,140		0,710		0,947	(1,175)
10		0,566		0,412		0,839	1,140
11		0,412		0,352		0,612	0,839
12		0,352		0,210		0,566	0,710
13						(0,024)	0,612
14							0,566
15							0,412
16							0,352
17							0,210
18							(0,024)
Összesen:	29,673	28,777	29,614	29,020	29,903	29,398	28,505

IV.4.2.1.1. táblázat A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális DNS-ének *Cfo*I, *Eco*RI és *Eco*RV restrikciós enzimekkel nyert fragmentjeinek nagysága kilóbázispárban megadva. A zárójelben szereplő adatok a mitokondriumban található plazmid által létrehozott sávokat jelzik.



IV.4.2.1.1. ábra A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális DNS-ének restrikciós enzimek emésztésével nyert fragmentjei. Az oszlopokban található minták: a mitokondriumból származó DNS minta *Cfo*I (1), *Cfo*I+*Eco*RI (2), *Eco*RI (3), *Eco*RI+*Eco*RV (4), *Eco*RV (5), *Cfo*I+*Eco*RV (6), *Cfo*I+*Eco*RI+*Eco*RV (7) restrikciós enzimekkel emésztve, és a molekulasúly marker (M)

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó törzsek mtDNS-ének méretéről kevés tanulmány jelent meg. Meyer (1991) a *T. viride* fajcsoport két alcsoportjába tartozó 12 törzs esetében 32,6 illetve 32,8 kbp nagyságú mtDNS-t talált. Bár ez körülbelül 4 kbp-ral nagyobb mint amit a *T. harzianum* fajcsoportba tartozó T95 jelzésű törzs esetében mértünk, még ezt figyelembe véve is megállapítható hogy a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fajok mtDNS-ének mérete,

összhasonlítva az *Ascomycota* törzsbe tartozó más nemzetségbeli fajokkal, a kisebbek közé tartozik (**IV.4.2.1.2. táblázat**).

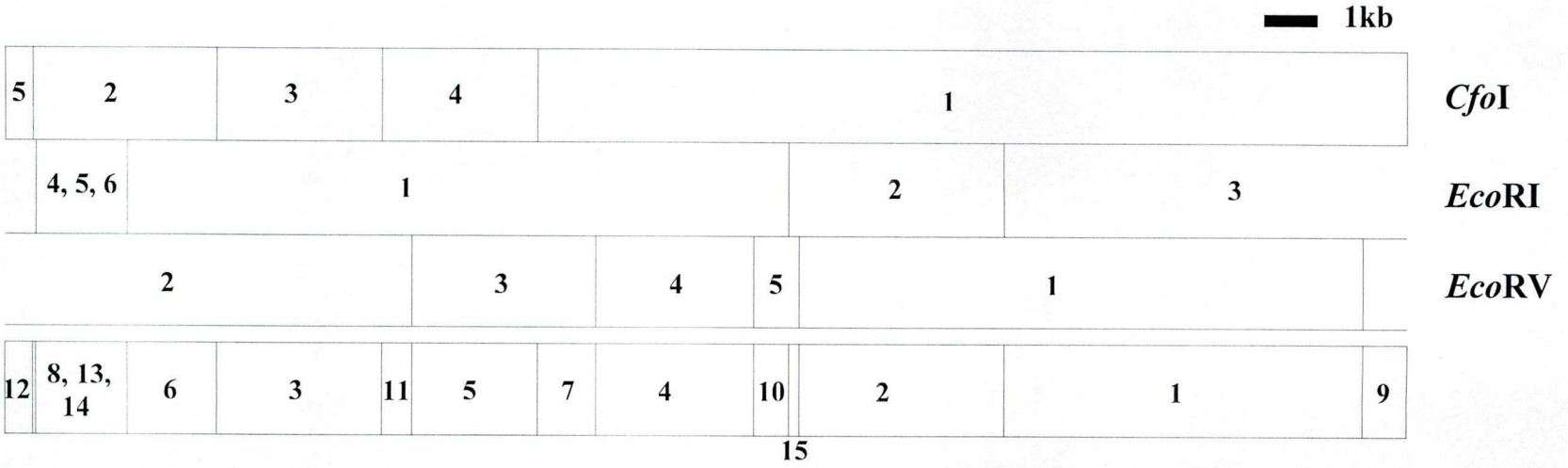
Fajnév	A mtDNS mérete (kbp)	Hivatkozás
Aspergillus carbonarius	45-57	Kevei és mtsai (1996)
Aspergillus nidulans	33	Brown és mtsai (1985)
Claviceps purpurea	45	Tudzynski és mtsai (1983)
Fusarium oxysporum	45-55	Fernandez és mtsai (1994)
Neurospora crassa	63,5	Taylor és Smolich (1985)
Penicillium urticae	27,8	Sekiguchi és mtsai (1990)
Podospora anserina	85-102	Cummings és mtsai (1979)
		Kuck és mtsai (1985)
Trichoderma viride	32,6-32,8	Meyer (1991)

IV.4.2.1.2. táblázat Néhány példa az *Ascomycota* törzsbe tartozó fajok mtDNS-ének méretére.

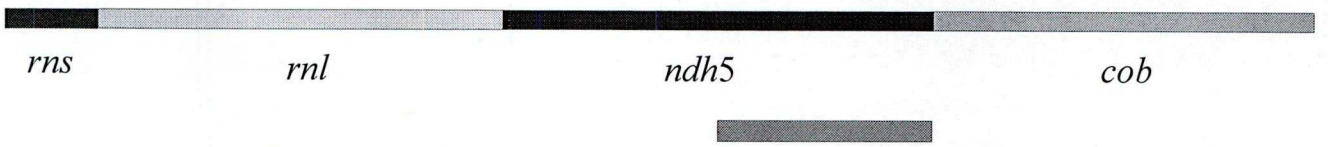
Meyer (1991) megvizsgálta a mtDNS restrikciós enzimekkel nyert fragmentjeinek mintázatát is és azt találta, hogy a mintázatokban fellelhető hasonlóságok alapján felállított törzsfa megfelelt a morfológiai tulajdonságok alapján létrehozottal. Azonban az is nyilvánvalóvá vált, hogy a módszer önmagában nem elég biztonságos törzsazonosításhoz, illetve a törzsek közötti rokonsági viszonyok tisztázásához, tehát szükség van a mtDNS részletesebb térképezésére, illetve szekvenciájának vizsgálatára. Az ily módon nyert adatok már összehasonlíthatóak lehetnek a *Trichoderma* nemzetség tagjainak molekuláris szintű vizsgálatában alkalmazott egyéb módszerek eredményeivel.

Fizikai térkép. A *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének részletesebb feltérképezéséhez meghatároztuk a *Cfo*I, *Eco*RI és *Eco*RV restrikciós enzimek hasítási helyeinek egymáshoz viszonyított helyzetét, s elkészítettük fizikai térképét (**IV.4.2.2.1.A. ábra**).

A.



B.



C.

Aspergillus nidulans: **rns**-ndh6-cox3-**rnl**-cox1-**atp9**-ndh3-cox2-ndh4L-**ndh5**-ndh2-**cob**-ndh1-ndh4-atp8-atp6
Neurospora crassa: **rns**-cox3-ndh6-**rnl**-ndh2-ndh3-ndh4L-**ndh5-cob**-cox1-ndh1-ndh4-atp8-atp6-**atp9**-cox2
Podospora anserina: **rns**-cox3-ndh6-atp6-**cob**-cox1-ndh4L-**ndh5**-cox2-ndh4-atp8-ndh1-**rnl**-ndh2-ndh3

IV.4.2.2.1. ábra A. A *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének fizikai térképe, a *Cfo*I, *Eco*RI és *Eco*RV restrikciós enzimek hasítóhelyeinek ábrázolásával. **B.** A fizikai térkép egyes szakaszaihoz rendelhető gének, és sorrendjük. **C.** A gének sorrendje *A. nidulans* (Brown és mtsai, 1985), *N. crassa* (Collins, 1993) és *P. anserina* (Cummings és mtsai, 1990a) mtDNS-ében, vastag betűvel kiemelve a vizsgálati körünkbe bevont gének.

IV.4.2.2. A *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének funkcionális elemzése

Géntartalom. Bár a különböző élőlények mitokondriumainak géntartalma meglehetősen hasonló, bizonyos gének jelenlétében eltérések tapasztalhatóak. Az *Ascomycota* törzsön belül a NADH dehidrogenáz alegységeinek génjeit a fonalas szerveződésű tagok többnyire hordozzák, míg az élesztőgombákból hiányoznak (**IV.4.2.2.1. táblázat**). A sejtmagba irányuló génáramlást mutatja az ATP szintetáz 9. alegysége génjének jelenléte vagy hiánya. Ez a gén *Saccharomyces cerevisiae* esetében csak a mitokondriumban, *Podospora anserina* esetében csak a sejtmagban, *Neurospora crassa* esetében pedig mindkét genomban megtalálható egy-egy példányban (Ridder és mtsai, 1991; Brown és mtsai, 1984).

	atp			*cob*	*cox*			*ndh*							*rn*	
Fajnév	6	8	9	a	1	2	3	1	2	3	4	4L	5	6	*l*	*s*
A. nidulans	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N. crassa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. anserina	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. cerevisiae	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+

IV.4.2.2.1. táblázat A mtDNS által hordozott gének néhány *Ascomycota* törzsbe tartozó gomba esetében (Hudspeth, 1992; Collins, 1993).

Mivel a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó törzsek mitokondriális DNS-éről nem áll rendelkezésre szakirodalmi adat, felhasználva a mitokondriális génekre jellemző nagyfokú konzervativitást, *Aspergillus nidulans* illetve *A. carbonarius* mitokondriális DNS-éből származó heterológ génpróbákat (Hamari és mtsai, 1999) hibridizáltattunk a *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-éhez, géntartalmának megállapítására. A génpróbák az ATP szintetáz 9. alegységének (*atp*9), az apocitokróm b-nek (*cob*), a NADH dehidrogenáz 5. alegységének (*ndh*5) valamint a kicsi (*rns*) és nagy (*rnl*) riboszómális alegység RNS-ének génjeit hordozták. Valamennyi alkalmazott génpróba hibridizált a *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-éhez, jelezve ezen öt gén jelenlétét.

Génsorrend. A *T. harzianum* T95 törzs esetében a génsorrend meghatározásához mtDNS-ének *Cfo*I, *Eco*RI és *Eco*RV restrikciós enzimek kettős illetve hármas emésztésével létrehozott, majd gélben elválasztott fragmentjeihez hibridizáltatott génpróbákkal kapott eredményeket összevetettük a fizikai térképpel (**IV.4.2.2.1.B. ábra**). Ez a génsorrend mindegyik felsorolt, a *Trichoderma* fajokkal közeli rokonságban álló, feltérképezett mitokondriális genomú *Ascomycota* faj génsorrendjétől eltér (**IV.4.2.2.1.C. ábra**).

A gombák esetében megfigyelhető, igen változatos mtDNS génsorrendek hátterében a genomban szétszórtan, a géneket szegélyező nem kódoló szakaszokon elhelyezkedő, GC gazdag szekvenciák állhatnak, melyek elősegítik a mtDNS molekulák közötti, vagy molekulán belüli átrendeződéseket (Grossman és Hudspeth, 1985). Mivel a mtDNS-en nem minden gén előtt található promóter, hanem több gén együtt, egy promóterről íródik át, így az átrendeződéssel létrejött új változatok közül csak azok maradtak fenn, ahol egy elmozdult létfontosságú gén megfelelően épült be egy másik promóter mögé. A gombák esetében megfigyelt mtDNS génsorrendek néhány feltételezett átrendeződéssel egymásból levezethetők.

Génméret. A fonalasgomba fajok mtDNS-ének méretbeli sokfélesége elsősorban az eltérő számú intronok jelenlétének köszönhető. A mitokondriális térképek adatai alapján a 33 kbp méretű *A. nidulans* genom három intronos gént tartalmaz (*rnl*; *cob*; *cox*1), a 63,5 kbp méretű *N. crassa* nyolcat (*rnl*; *atp*6; *cob*; *ndh*1, 3, 4, 4L, 5), a 85-102 kbp méretű *P. anserina* pedig tizet (*rnl*; *atp*6; *cob*; *cox*1, 2; *ndh*1, 3, 4, 4L, 5). Az egy génben elhelyezkedő intronok száma is igen változó lehet. Jó példa erre a *cox*1 gén, mely *A. nidulans* esetében három intront, *P. anserina*-nál pedig tizenhatot tartalmaz (Cummings és mtsai, 1989a), ugyanakkor bizonyos gének általában nem tartalmaznak intronokat (*rns*, *atp*9). Bár a gének exonális részének nagysága is mutathat különbségeket, akár rokon fajok esetében is **(IV.4.2.2.2. táblázat)**, a *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének kicsi mérete (28,5 kpb) alacsony intron-tartalmat sejtet. A mindössze 4,5 kbp-ral nagyobb *A. nidulans* mtDNS három génben összesen öt intront tartalmaz, s valószínűsíthető hogy a *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének felépítése is hasonló lehet.

Gén		*A. nidulans*	*N. crassa*	*P. anserina*
*atp*9	teljes	225	225	-
cob	teljes	2211	2038	5959
	exon	507, 654 (1161)	97, 665 (762)	201, 192, 430, 341 (1164)
	intron	1050	1276	2499, 1306, 990
*ndh*5	teljes	1974	4694	9934
	exon	1974	327, 393, 1431 (2151)	248, 76, 246, 102, 1287 (1959)
	intron	-	1408, 1135	2298, 1452, 1602, 2623
rnl	teljes	4541	5760	7663
	exon	2449, 415 (2865)	2900, 565 (3465)	1741, 1416, 558 (3715)
	intron	1678	2295	1544, 2406
rns	teljes	1437	1971	1980

IV.4.2.2.2. táblázat *Aspergillus nidulans, Neurospora crassa* és *Podospora anserina* mitokondriális génjeinek mérete bázispárban megadva (zárójelben az exonok összesített mérete).

A. nidulans: *atp*9, Brown és mtsai, (1984); *cob*, Waring és mtsai, (1981); *ndh*5, Brown és mtsai, (1989); *rnl*, Netzker és mtsai, (1982); *rns*, Kochel és Kuntzel (1981)

N. crassa: *atp*9, van den Boogaart és mtsai, (1982); *cob*, Burke és mtsai, (1984); *ndh*5, Nelson és Macino (1987); *rnl,* Abdel-Malik és mtsai, (1990), Burke és RajBhandary (1982); *rns*, Chiang és mtsai, (1994)

P. anserina: *cob*, Cummings és mtsai, (1989b); *ndh*5, Cummings és mtsai, (1990b); *rnl*, Cummings és mtsai, (1989c); *rns*, Cummings és mtsai, (1989d)

Az eddigi hibridizációs kísérletekből, nehéz feladat a *T. harzianum* T95 törzs vizsgált mitokondriális génjeinek nagyságát meghatározni. Ennek egyik oka, hogy a beszerzett génpróbák nem minden esetben tartalmazzák a teljes gént. Így az *rns* génpróba *A. nidulans* kis

riboszómális alegység RNS-e génjének csak a háromnegyed részét tartalmazza. Ez a *T. harzianum* T95 törzs mtDNS-ének egy 1811 pb nagyságú fragmentjéhez hibridizált, de lehetséges hogy a gén fennmaradó egynegyed részével homológ szakaszok átnyúlnak a szomszédos fragmentre. A másik problémát az jelenti, hogy nem áll rendelkezésünkre olyan módszer, amellyel meg lehetne határozni, egy adott fragment mekkora részéhez hibridizált hozzá a génpróba. Ez alól kivételt jelent azoknak a fragmenteknek az esete, melyek a fizikai térkép' alapján közbülső helyet foglalnak el három vagy több, egyazon génpróbával homológiát mutató fragment között, mivel ezek teljes hosszukban az adott gén szakaszait hordozzák. Ez figyelhető meg a nagy riboszómális alegység RNS-ének génjét hordozó fragmentek esetében (**IV.4.2.2.1. ábra A és B**). A négy fragment közül kettő középső helyzetű, ezek együttes mérete 3152 bp, a két szélsőé együtt 4593 bp, így az *rnl* gén mérete 3152 és 7745 bp közé esik. Hasonlóképpen az *ndh*5 gén mérete nagyobb mint 947 és kisebb mint 8347 bp, az *atp*9 gén kisebb mint 4190 bp és a *cob* gén kisebb mint 7320 bp. A gének méretének pontosabb meghatározása egyrészt teljes géneket tartalmazó génpróbák beszerzésével, másrészt a mtDNS további restrikciós enzimekkel történő, kisebb fragmentekre bontásával valósítható meg. A teljesebb funkcionális térkép elkészítéséhez folytatjuk a többi, általánosan előforduló mtDNS gén jelenlétének és helyzetének hibridizációs kísérletekkel történő meghatározását. A gének pontos méretének, exonális-intronális összetételének és más fajok homológ génjeivel való hasonlóságának meghatározására a hordozó fragmentek megszekvenálásával kerülhet majd sor.

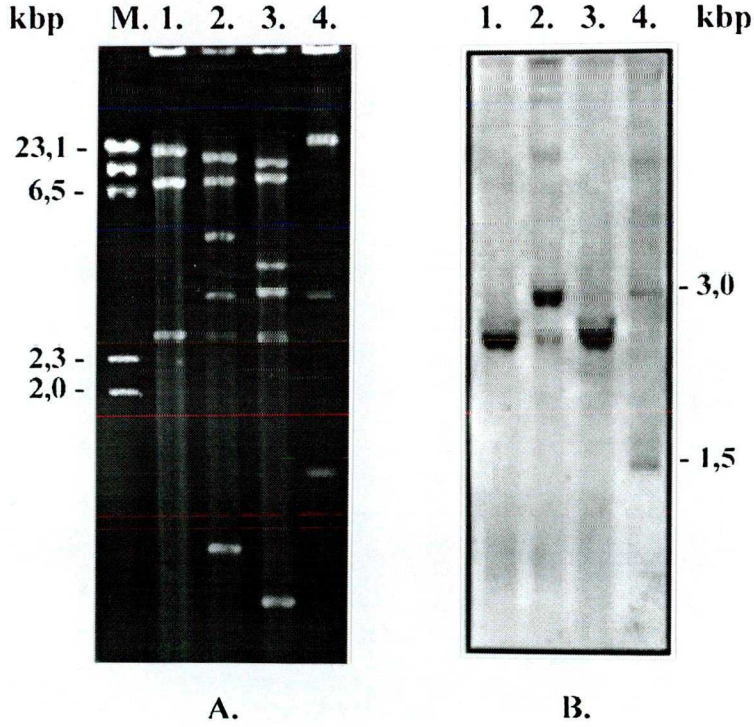
IV.5. A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális plazmidjának vizsgálata (Antal és mtsai, 1999c)

Fonalasgombák plazmidjainak vizsgálata, a nemzetközi szakirodalom alapján, több szempontból is nagy érdeklődésre tart számot. Vizsgálják e genetikai elemeket az intronok vírusokkal való rokonságának tisztázása, a DNS és RNS polimerázok evolúciója, genetikai elemek különböző rendszertani kategóriákba tartozó törzsek közötti horizontális átadása, a sejtöregedés genetikai alapjainak kutatása, valamint fonalasgombákban önálló replikációs képességgel rendelkező klónozó vektorok létrehozása kapcsán. Mivel *Trichoderma* törzsek mitokondriális plazmidjairól eddig csak egy érintőleges tanulmány jelent meg (Meyer, 1991), megkezdtük a *T. harzianum* T95 törzs mitokondriumában jelenlevő, általunk pThr1-nek elnevezett plazmid molekuláris szintű vizsgálatát.

IV.5.1. A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális plazmidjának fizikai tulajdonságai

A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriumaiból kivont, emésztetlen DNS minta gélelektroforézises elválasztását követően két, kis molekulasúlyú sáv jelent meg, a mtDNS-nek megfeleltethető, nagy molekulasúlyú sáv alatt (**IV.5.1.A. ábra**, 4. oszlop). A két sáv a 1,5 illetve 3,0 kbp méretű tartományban helyezkedett el, és a megismételt kísérletekben is megjelentek. S1 nukleáz kezelés hatására a mintázat nem változott meg, jelezve a DNS molekula dupla szálú természetét. A hibridizációs kísérletekben a kis sávokat alkotó molekulák homológiát mutattak egymással, és egy nagy molekulasúlyú tartományban található sávval (**IV.5.1.B. ábra**, 4. oszlop). A mitokondriumokból izolált DNS mintát *Eco*RV enzimmel emésztve a mintázat eltűnt, és a képződött hat fragment közül (**IV.5.1.A. ábra**, 3. oszlop), csak egyetlen, 2,622 kbp nagyságú molekulák által alkotott sáv mutatott homológiát a kis sávokkal (**IV.5.1.B. ábra**, 3. oszlop). Így az emésztetlen mintában megfigyelhető összes sáv, 2,622 kbp nagyságú plazmid molekulák különböző felcsavarodottsági állapotú illetve egymással összekapcsolódott molekuláitól ered. *Eco*RI restrikciós enzimmel történt kezelés hatására az 1,5 kbp nagyságú fragment eltűnt, ezzel párhuzamosan megerősödött a 3,0 kbp

nagyságú fragment jelerőssége, és halvány sáv jelent meg a felnyitott plazmidnak megfelelő magasságban (**IV.5.1.B. ábra**, 3. oszlop). Ez a restrikciós enzim tehát nem nyitotta fel a plazmidmolekulák döntő részét. A mintázat megváltozását így ezen enzim nem specifikus DNS-szál hasító aktivitása eredményezheti. Ennek megfelelően a 3,0 kbp nagyságú fragmentet gyűrű alakú, felcsavarodás mentes plazmid molekulák alkotják. Az *Eco*RI restrikciós enzim hasítási mintázatának hibridizációs képén megfigyelhetők gigantikus molekulák által alkotott sávok is, melyek jelerőssége igen gyenge, az etidium bromiddal festett gél fényképén nem is láthatóak. Ezek elvileg lehetnek beépült plazmidot tartalmazó, nem emésztődött, csak kitekeredett vagy kinyílt mtDNS molekulák is, ám mivel a minta többi része tökéletesen emésztődött, valószínűbb hogy az enzim nem specifikus DNS-szál hasító hatására kitekeredett vagy kinyílt sokmolekulás plazmid gyűrűkből állnak. Ennek kísérletes bizonyítására további vizsgálatokat tervezünk.



IV.5.1. ábra A *Trichoderma harzianum* T95 törzs mitokondriumából kivont, agaróz gélben elválasztott DNS minta. **A.** Etidium bromiddal festett gél. **B.** Az átblottolt DNS mintához hibridizált, jelölt plazmid DNS. Az oszlopokban található minták: molekulasúly marker (M), a mitokondriumból származó DNS minta *Cla*I (1), *Eco*RI (2) és *Eco*RV (3) restrikciós enzimekkel emésztve, valamint emésztetlenül (4).

Amennyiben sokmolekulás plazmid gyűrűkről van szó, felépülésüknek elvileg kétféle módja lehetséges, a fej-farok illetve a fej-fej kapcsolódás. Az *Eco*RV enzimmel emésztett mintában egyetlen sáv jelent meg, ami egyrészt jelzi hogy mindössze egyetlen hasítóhely található a plazmidon, másrészt sugallja a fej-farok összekapcsolódást. Azonban elképzelhető, hogy az enzim hasítóhelye a molekulák kapcsolódási helyétől mindkét irányban azonos távolságra esik, ezért ez még nem zárja ki egyértelműen a fej-fej típusú struktúrát. Az *Eco*RV restrikciós endonukleáz hasítóhelyétől 675 bp-ra helyezkedik el a *Cla*I enzim hasítóhelye (**IV.5.2.2. ábra**), melyből szintén egy található a plazmidon. Mivel az ezzel az enzimmel végzett emésztés eredményeképpen sem kaptunk két különböző nagyságú plazmid fragmentet (**IV.5.1.B. ábra,** 1 oszlop), így a fej-farok kapcsolódás valószínűsíthető.

A hibridizációs kísérletek alapján a pThr1 plazmid DNS-e nem mutat hasonlóságot a restrikciós enzimekkel feldarabolt mtDNS egyik fragmentjével sem, ami utal ez utóbbitól független eredetére. Ezek alapján Nargang (1985) által valódi plazmidoknak nevezett kategóriába sorolható.

Trichoderma viride fajcsoportba tartozó törzsek mitokondriális DNS preparátumában már írtak le létra-szerű plazmid struktúrákat, melyek szintén gyűrű alakú molekuláktól származtak (Meyer, 1991), azonban e plazmidok szekvenálását nem végezték el, így alaposabb összehasonlításra nem nyílt lehetőségünk. Mindenesetre, a három plazmid (pTR3, pTR8 és pTR44) restrikciós térképe nem mutat hasonlóságot a pThr1 plazmidéval.

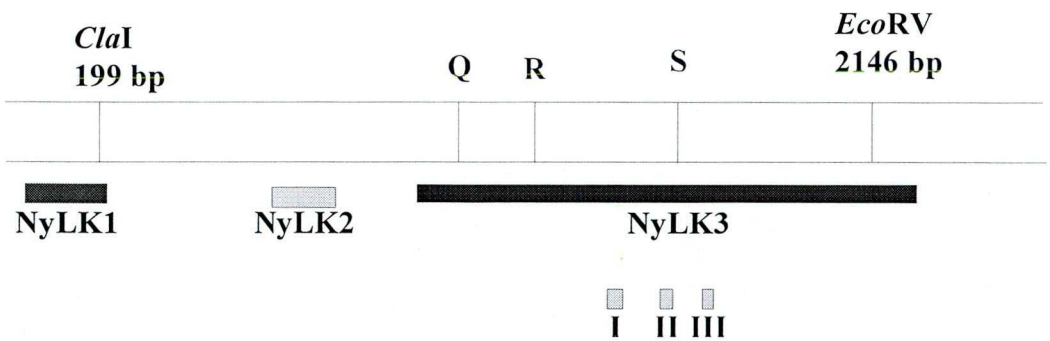
IV.5.2. A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriális plazmidjának funkcionális elemzése

Az *Eco*RV enzimmel felnyitott, majd gélben elválasztott, onnan visszaizolált és pBluescript SK vektorba épített pThr1 plazmid 2622 bp-nyi szekvenciáját meghatároztuk (**IV.5.2.1. ábra**). Elvileg lehetséges, hogy az *Eco*RV enzimmel végzett emésztésnél másik, általunk nem észlelt, 200 bp-nál kisebb fragment vagy fragmentek is keletkeztek, ezért ennek eldöntésére a továbbiakban el fogjuk végezni a plazmid egy másik enzimmel emésztett mintájának vektorba építését és szekvenálását is.

```
1    gtgtttggtt tccgtaatgt catgtttgca aatagatgac tgggtcaaat gatcacgccc
61   tagaagatca acttaaagga aagcttcgtc aaatgaagtc ggtacataaa aaggctctag
121  taagtagatt accaaccaac ttggactcaa gtaaatccat tccattctta gataaagtga
181  tgacaaaaat catgaaaaaa tcgatagatt aataatgaat atgtttccaa tcgaacgcct
241  tattgtaaga atgctcaaga attgcgacgt taatttagct aataaaagtt aattatctag
301  tttgacgaat tacatagttg ttgtacgacg tagctctgtt caactttgta gtaataagaa
361  cgatatattt aactaatgct gattaatagt aaccaaatct ataaataaag gtggtaatcc
421  ataaattatc caatagaaag tgctattaag tgtggtgtaa ttccacaaat taacaagaga
481  tattatggtg tctcaacgca acgtattgaa ctttgttatg ttgatagtag ctcacactat
541  tgtcaatatc caggtctggt aacacagaca ttggtacaac ataacaagat ctcaggctct
601  aggagcttgt aggttggttc tgtgccaaac agaatgagat caatatattg tttctggtta
661  tgctccgcct ttgtgaagtg agagaaaatc aaatccctaa cttagctaga gaaatcgtaa
721  gctgtaggta tggttcgtga aaaactaatc acgccgaccc gcttctaggg aagttcttat
781  ctaattgatt ggcaacaaga aataggtagg tagcgaccaa ttagattgcg aactgggggt
841  atccgctcct tgtagaaagc cctaactagg ctttctccgg cgtgaagttc aaagctaacc
901  gcaaatatta agagaaatat acaaatatct aaaagtatat tgtctagcgc ctgtaaaaca
961  tccaagggtg tagaatctac cgagctggat gaaaggccta attacttttc ataatgaaga
1021 aaacaactag ttttaacctg ctgtgagcga tgaagaaaca gttgttatcc ttatcacaga
1081 aaaaaggatc tgtgggaaga ctgctaagag atagtccttt tagaagatta cccgcagttt
1141 gaaagtatca agtaattaca caaccataca acccactttt agaaggattc ggtataaagc
1201 ttcgtcttcc gaagaaaact atacgtcaac gtattgaaga gactgagaaa atgaataaat
1261 atatggagca tgtgttgttg cgtataagaa atgcagtttc caaaggtgac tattcaaaag
1321 cttgaaaaat agcatcggat aatataaaac actcaaaatg ctttagaatg acagcgttta
1381 actttgtatg caaaggttga tactacaaaa tggctcaatc tgaggtatac aaactaaacc
1441 gtagagttca aagaataatc gaagatgaaa aaagtaatct agattacaaa agagtttata
1501 ttccaaaaac taatggtaaa ctaagacctc ttggtgtgcc aacagtagag tgaagaatag
1561 ttttacatct tttcaatggt ttctttgtag aaatactaag aaataagttg ttaactagtc
1621 aacatgcata tgtaccatta aaaggaacta tgtcagcttg acgagaagta atagctaaaa
1681 tacaacgtta tagatttgtc tttgaaaccg atctaaaggg cttctttaat gaagtttccg
1741 tgtgaaaggt agtggagtta cttagagaaa caaaatcagt ctttgataac tgaatagtaa
1801 atctaagtaa atcaataccg aaatttccta gcaagaaatt actagatgaa agtaagtttg
1861 atatgccatt aaacaaagat tcaggttttt attctcctaa tgttcgtagc ttgttaacaa
1921 agatctgaaa cacagatgag ttaactaaaa caccaaaaat aagtgttcca gtattcaaga
1981 gatacaacag taatattact ggggaaacag aaatgaatac tgattttata tctattccac
2041 ttatggtgga aggtagagtg aaactacaca agaagaaagt gttttataac aacattatgg
2101 attcgggtac accaatgttt cgcgccttag gtgaggagca tttaagatat ctgaattatg
2161 ggataatacc aggaggattt ccgcaaggaa atgccaatgt caccgttctt gtcaatttta
2221 gcacttgaga aatacttaag tcaacaagac agtacaagtt acgctgatga tccactcttt
2281 tattctaata cagatttcaa ggtggttgat gagccagaaa atggtgtaat taactcacca
2341 gaaaaaagta gttgagtaat tagaaatgga atctgaaatc caaaaggatt aaaattcttg
2401 ggattcagac tactacctaa ctgagagtga agatcagaaa ccagaaatgg tgtgacagca
2461 gaagtaaaca aattcatcaa agctatttac tcaaatcgtg gaatatcttt actaaaacaa
2521 gttactaata atttagagct ggtgaaatat tcagatctta tagtagagaa aaattgagaa
2581 tttgaaaaca aagaagtttt atcaaatctt tcttcaagaa ag
```

IV.5.2.1. ábra A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriumában elhelyezkedő pThr1 plazmid szekvenciája.

A pThr1 plazmid rendelkezésünkre álló szekvencia adatait összevetve az interneten elérhető, nukleinsav és fehérje adatokat tároló "GenBank" adatbázis anyagával, a BLAST keresőprogram (Basic Local Alignment Search Tool: Altschul és mtsai, 1990; 1997) semmilyen eddig megismert DNS szekvenciával nem mutatott ki számottevő hasonlóságot. A lehetséges kódoló régiók azonosítását, a nyitott leolvasási keretet kereső programmal (ORF Finder) végeztük el. Annak ellenére, hogy a genetikai kód nagyrészt egységes az élőlényekben, jelenleg is tartó evolúciója eredményeként létrejöttek kódhasználati eltérések (Osawa és mtsai, 1992; Jukes és Osawa, 1993). Így az általános genetikai kódon kívül 14 féle egyéb, szűkebb körben érvényes kódot tartanak nyilván, melyek közül kilenc változat különböző rendszertani egységbe tartozó élőlények mitokondriális DNS-ére vonatkozik. A fonalasgombák mitokondriális plazmidjainak vizsgálata esetében általánosan használt, gombák mitokondriális DNS-ére leírt, négyes számú genetikai kódtáblázat alapján, a pThr1 plazmidon három, egyenként 1275, 177 és 150 bp hosszúságú nyitott leolvasási keret található (**IV.5.2.2. ábra**).



IV.5.2.2. ábra A *Trichoderma harzianum* T95 törzs 2622 bp hosszúságú pThr1 plazmidjának térképe, nyitott formában ábrázolva. A jelek a *Cla*I és *Eco*RV restrikciós enzimek hasítási helyeit, a nyitott leolvasási kereteket (NyLK), a reverz transzkriptázokban fellelhető konzervatív aminosav részleteket (I, II, III), valamint az egyes csoportbeli intronokra jellemző Q, R és S szekvencia elemek elhelyezkedését mutatják.

A DNS szekvencia számítógépes fordításával létrehozott aminosavláncot a BLAST program segítségével összehasonlítottuk az adatbázisokban tárolt aminosav szekvenciákkal. Ez alapján a leghosszabb nyitott leolvasási keretről leíródó fehérje, 650 bp (217 aminosav) hosszúságban, *Neurospora* fajok Mauriceville és Varkud plazmidjainak reverz transzkriptázával mutat hasonlóságot. Az említett plazmidok esetében bizonyították az enzim replikációban betöltött szerepét. Michel és Lang (1985) retrovírusok reverz transzkriptázának aminosav szekvenciáját hasonlították össze mitokondriális intronok illetve plazmidok által kódolt RNS függő polimerázokéval. Hét konzervatív szekvenciájú aminosav blokkot találtak, melyek közül hármat tartalmaz az általunk felfedezett plazmid is. A Mauriceville plazmid vizsgálatakor I. csoportbeli intronokra jellemző szekvencia elemek közül kimutatták az E, P, Q, R, E′ és S elemek jelenlétét (Nargang és mtsai, 1984). Az általunk felfedezett plazmid szintén tartalmazza a Q, R és S elemeket, megfelelő sorrendben. Ezen adatok alapján a pThr1 plazmid a mtDNS intronok őseiként számon tartott genetikai elemekhez (Nargang és mtsai, 1984) hasonló tulajdonságokkal rendelkezik.

A *Trichoderma harzianum* T95 törzs mitokondriális plazmidjának *Neurospora* fajok plazmidjaihoz való hasonlósága nem egyedülálló jelenség. *Fusarium oxysporum*-ból izolált, nyitott formájú mitokondriális pFOXC1, pFOXC2 és pFOXC3 plazmidok esetében szintén kimutatható a Mauriceville és Varkud plazmidok reverz transzkriptázával (Kistler és mtsai,

	pThr1		Mauriceville	
	Hasonlóság	Hossz	Hasonlóság	Hossz
pThr1	/	/	54%	217 As
pFOXC2	45%	225 As	47%	278 As
pFOXC3	45%	220 As	47%	290 As

IV.5.2.1. táblázat Mitokondriális eredetű plazmidok nyitott leolvasási kereteinek aminosav-szinten megnyilvánuló hasonlósága, valamint a hasonlóságot mutató szakasz hossza aminosavban meghatározva.

1997), továbbá a pThr1 plazmid 650 bp-os nyitott leolvasási keretével való, aminosav-szinten megnyilvánuló hasonlóság (**IV.5.2.1. táblázat**). E jelenségre kétféle magyarázat is adódik. Egyrészt, mind a *Neurospora,* mind a *Fusarium* fajok mitokondriális plazmidjairól kimutatták, hogy változatos megoszlásban fordulnak elő az adott nemzetség illetve faj izolátumai között (Arganoza és mtsai, 1994; Kistler és mtsai, 1997), és a mitokondriális genomtól függetlenül átjuttathatók más fajokba (Collins és Saville, 1990; Momol és Kistler, 1992). Sőt, a mitokondriális plazmidok horizontális átadását már ennél nagyobb rendszertani távolságok esetén is megfigyelték. Kempken (1995) *Ascobolus immersus* mitokondriális plazmidjának *Podospora anserina* mitokondriumába történő átjutását mutatta ki a hifák érintkezését követően. Talán a pThr1, a Mauriceville és a pFOXC plazmidok hasonlóságának hátterében is egy ilyen folyamat áll, és DNS szekvenciájuk sokfélesége ellenére egy közös őstől származtak. Másrészt az is elképzelhető, hogy a közöttük fellelhető hasonlóság csupán a mitokondriumban folytatott "életformához" való alkalmazkodás eredményeként alakult ki.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Trichoderma* nemzetség, egyes tagjai növénypatogén gombákkal szembeni antagonista tulajdonságának, illetve kiemelkedő extracelluláris enzimtermelő képességének köszönhetően, kiterjedt kutatások tárgyát képezi. Mivel az antagonista tulajdonság nem fajhoz, hanem egyes törzsekhez köthető tulajdonság, így napjainkban is folyik a változatos mezőgazdasági környezethez, ipari elvárásokhoz legjobban illeszkedő *Trichoderma* törzsek normál, vagy éppen nagyon is speciális természetes vagy mesterséges környezetből történő izolálása, az ígéretes törzsek kiválasztása, az antagonista képességeknek és extracelluláris enzimek termelődésének vizsgálata, a törzsek genetikai átalakítása valamint a törzsazonosításra alkalmas markerek kutatása. E témákhoz kapcsolódik kutatócsoportunk munkája is.

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó törzsek nagy része mezoterm, melyek az őszi, kora tavaszi időszakban kevéssé képesek védelmet nyújtani a növénypatogén gombák hidegben is növekedésre képes törzseivel szemben. Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek felkutatásához 360, a *T. aureoviride*, *T. citrinoviride*, T. *hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii* és *T. viride* fajcsoportokba tartozó törzset vizsgáltunk meg. A 14 hidegtűrő képességű, 5°C-on is növekedésre képes izolátum a *T. aureoviride*, a *T. harzianum* és a *T. viride* fajcsoportokból került ki. Az alacsony hőmérsékleten elvégzett *in vitro* antagonizmus tesztben mindegyikük képes volt a növénypatogén gombák növekedését gátolni. A *T. aureoviride* és a *T. viride* törzsek nagy része ezenkívül a növénypatogén gombák telepére ránőve nagy mennyiségű konídiumot is termelt, mely hatékony mikoparazita kölcsönhatást sejtet. Mivel alacsony hőmérsékleten a növekedés és az enzimek működési aktivitásában eltérés mutatkozhat, vizsgálatnak vetettük alá a ß-glükozidáz, exokitináz és proteináz enzimek termelődését 10°C-on és megállapítottuk, hogy ezek a mikoparazitizmusban fontos szerepet játszó enzimek a hidegtűrő izolátumoknál magas szinten voltak jelen. A törzsek nemcsak szekretálják ezeket az enzimeket hidegben, de az aktivitások még 5°C-on is igen jelentősek, vagyis esetükben igazi hidegtűrő enzimekről beszélhetünk. Más kutatók is beszámoltak már bizonyos hidegtűrő *Trichoderma* törzsek azon képességéről, hogy gombaparazita képességüket hidegben is

megtartják, de egyikük sem bizonyította eddig, hogy ez a képesség kapcsolatban áll hidegtűrő extracelluláris enzimeikkel.

Az OMFB "Biopeszticid gombakészítmények előállítása növénykórokozó gombák ellen" című fejlesztési munka kapcsán, az Ásotthalmi Emlékerdőből izolált 150 *Trichoderma* törzs extracelluláris enzimtermelését és egy *Fusarium culmorum* törzzsel szembeni *in vitro* antagonista képességét mértük fel 20°C-on. Ezt követően megvizsgáltuk a legígéretesebb törzsek UV mutagenezissel történő nemesítésének lehetőségeit. Ehhez a *T. hamatum* AH22, AH310; *T. harzianum* AH48, AH356 és *T. viride* AH124 törzsekből mutánsokat hoztunk létre, melyek között a mikoparazitizmusban szerepet játszó extracelluláris β-1,3-glukanáz és kitináz enzimek emelkedett szintjét mutató törzseket kerestünk. A létrehozott mutáns törzsek *F. culmorum, F. graminearum* és *F. oxysporum* törzsekkel szembeni antagonizmus tesztje alapján megállapítottuk, hogy egy részük *in vitro* hatékonyabbnak bizonyult a kiindulási törzsekhez képest. A Gabona Kutató Intézet munkatársai a törzseket *in vivo* kísérletekben vizsgálva megerősítették megfigyeléseinket.

A *T. harzianum* AH48 törzs és az UV mutagenezises kísérletekben létrehozott *T. harzianum* AH356-BG2 valamint *T. viride* AH124-BG7 törzsek további nemesítéséhez illetve vizsgálatához genetikai transzformációs rendszereket dolgoztunk ki. A *T. viride* AH124-BG7 törzs, viszonylag magas hygromycin érzékenysége miatt, alkalmas befogadó törzsnek bizonyult *Escherichia coli* hygromycin B foszfotranszferáz génjét hordozó, pCSN43 plazmiddal történő transzformációhoz. A transzformációs gyakoriság viszonylag magas volt, azonban a plazmidmolekulák nem épültek be a genomba, és rekombináns formák is létrejöttek, ami a transzformáns jelleg instabilitásra utalt. Bár a rezisztencián alapuló módszereknek megvan az az előnyük, hogy nem igénylik a törzsek előzetes módosítását, a *Trichoderma harzianum* AH48 és AH356-BG2 törzsek számára, kis fokú hygromycin érzékenységük miatt, auxotrófia komplementáló rendszereket választottunk ki. Ehhez szűréses mutáns-dúsítással, illetve direkt szelekcióval auxotróf mutánsokat állítottunk elő. Az AH356-BG2 törzs uracil auxotróf mutánsait sikeresen transzformáltuk *Neurospora crassa* orotidin-5-foszfát dekarboxiláz enzimének génjét hordozó pKIM7, *Podospora anserina* orotát pirofoszforibozil transzferáz enzimének génjét hordozó pPAura510 és *Trichoderma reesei* orotát pirofoszforibozil

transzferáz enzimének génjét hordozó pTRura5-3 plazmidokkal. A transzformációs gyakoriság a pKIM7 plazmid esetében volt a legalacsonyabb, és bár a plazmid DNS egy része beépült a genomba, szabad plazmidmolekulák jelenlétét is meg lehetett figyelni, és a transzformánsok instabilnak mutatkoztak. A beépülési gyakoriság növelése céljából a plazmidba beépített *ans*1 szekvencia ebben a törzsben nem működött hatékonyan. A pPAura510 plazmid esetében már nagyobb transzformációs gyakoriságot tapasztaltunk, és a kilenc transzformáns utód közül négynek a konídiumai 90-100%-ban kicsíráztak szintetikus minimál táptalajon. A legmagasabb transzformációs gyakoriságot a pTRura5-3 plazmiddal tudtuk elérni, és ebben a rendszerben a megvizsgált kilenc transzformáns mindegyike nagyfokú stabilitást mutatott, konídiumaik 90-100%-ban szintén transzformáns jellegűek voltak. A hibridizációval vizsgált törzsekben, genomba beépült plazmidmolekulák voltak megfigyelhetők. Az elért transzformációs gyakoriságok mind a hygromycin rezisztencián, mind pedig az uracil-auxotrófia komplementáción alapuló rendszerben elegendően nagyok, kotranszformációs rendszerként való alkalmazásukhoz. Az AH48 törzs esetében arginin auxotrófia komplementáción alapuló rendszert dolgoztunk ki, ahol egyrészt a pSal23, másrészt a pAN5-41B plazmidot alkalmaztuk, melyek *Aspergillus nidulans arg*B, illetve *A. nidulans arg*B és *Escherichia coli lac*Z génjét tartalmazták. A transzformációs gyakoriság alacsony volt, és nyolc transzformáns törzsből kettő bizonyult stabilnak, a pSal23 plazmiddal történt transzformáció esetében. A pAN5-41B plazmiddal történt transzformáció szintén alacsony gyakoriságú volt, és a transzformáns törzsek nagyrészt instabilnak mutatkoztak, de bizonyítottuk hogy *Escherichia coli lac*Z génjének terméke, *Aspergillus nidulans* szabályozó szekvenciák kontrollja alatt aktív formában expresszálódik a *T. harzianum* AH48 törzsben, így jelző génként használható. Ez nagy segítséget nyújt azokban a transzformációs rendszerekben, ahol direkt szelekciós marker nem áll rendelkezésre. A transzformációs kísérletek során közelebbi illetve távolabbi rokonságban álló fajokból, így *T. reesei*-ből, *Aspergillus nidulans*-ból, *Neurospora crassa*-ból, *Podospora anserina*-ból és *Escherichia coli*-ból származó géneket expresszáltattunk sikeresen a kiválasztott *Trichoderma* törzsekben. A transzformáns törzsek hibridizációs mintázatainak elemzésével megállapítottuk hogy a plazmidmolekulák nagyrészt beépültek ezen *Trichoderma* törzsek genomjába, egyes esetekben azonban szabad formában is jelen voltak. Típusát tekintve

a plazmidmolekulák egyedi és tandem ismétlődő módon, a genomba egy illetve több helyre történő beépülését egyaránt kimutattuk.

Bár a gombák körében kiterjedt kutatások foglalkoznak a mitokondriális DNS fizikai és funkcionális tulajdonságainak vizsgálatával, a *Trichoderma* nemzetség esetében ez a terület még feltáratlan, így megkezdtük az ATCC törzsgyűjteményből származó, mikoparazita képességű, benomil rezisztens *Trichoderma harzianum* T95 törzs mitokondriális DNS-e szerveződésének vizsgálatát. Az izolált mitokondriumokból tisztított, restrikciós enzimekkel feldarabolt DNS minta fragmentjeinek mérete alapján, a mtDNS-t 28,5 kbp nagyságúnak határoztuk meg, majd elkészítettük a mtDNS három enzimes fizikai térképét. A géntartalom vizsgálata során az általános mitokondriális gének közül a kis és nagy riboszómális alegység RNS-e, az apocitokróm b, az ATP-áz 9. alegysége és a NADH dehidrogenáz 5. alegysége génjének jelenlétét mutattuk ki. A fizikai térkép segítségével megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált gének sorrendje különbözik a rokon fajokban megállapított génsorrendektől.

A *Trichoderma harzianum* T95 törzs mitokondriumaiból kinyert DNS emésztetlen mintájának elektroforetikus elválasztását követően egy egyszerű "létra-szerű" sávozat is megfigyelhető volt, a mtDNS-nek megfeleltethető nagy molekulasúlyú sáv alatt. A sávok S1 nukleáz kezeléssel szembeni ellenállása kétszálú DNS molekulára utalt. A további vizsgálatok alapján bebizonyosodott, hogy a mintázatot 2,6 kbp nagyságú, különböző csavarodottsági fokú plazmidmolekulák hozták létre, melyek a mtDNS-sel szekvencia homológiát nem mutattak. Az általunk pThr1-nek elnevezett plazmid nyitott leolvasási keretei közül a legnagyobb olyan fehérjét kódolhat, mely aminosav szinten homológiát mutat *Neurospora* fajok Mauriceville és Varkud plazmidjainak reverz transzkriptázával. Ugyanezen a szakaszon, I. csoportbeli intronokra jellemző, konzervált szekvencia elemek is megtalálhatók. E tulajdonságai alapján a pThr1 plazmid azon genetikai elemekkel hozható rokonságba, melyeket az mtDNS intronok őseiként tartanak számon. A gyakorlat számára a megklónozott és megszekvenált pThr1 plazmid hasznos szekvenciákat és információkat szolgáltathat olyan klónozó illetve transzformációs vektorok létrehozásához, melyek önálló replikációs képességgel rendelkeznek *Trichoderma* törzsekben.

VI. SUMMARY

The *Trichoderma* genus, due to the antagonistic features of some of its members against phytopathogen fungi, and their outstanding extracellular enzyme production abilities, is the subject of extensive investigations. Since antagonism is a feature associated not with the species, but with certain strains, the isolation of *Trichoderma* strains best suited to the varied agricultural environment, industrial expectations, from normal or even very special natural or artificial environment, the selection of promising strains, the investigation of antagonistic abilities and the production of extracellular enzymes, the genetic modification of the strains, and the search for markers suitable for strain identification, are in progress to this day. The work of our research group is also connected to these topics.

Most of the strains belonging to the *Trichoderma* genus are mesophilic, which during autumn and early spring can offer less protection against strains of phytopathogenic fungi capable of growing in cold. In order to find cold-tolerant *Trichoderma* strains, 360 isolates belonging to the *T. aureoviride, T. citrinoviride*, *T. hamatum, T. harzianum, T. koningii* and *T. viride* species aggregates were investigated. The fourteen cold-tolerant strains, exhibiting growth at 5 °C, were identified as *T. aureoviride, T. harzianum* and *T. viride* species. All of them could retard the growth of phytopathogenic fungi in *in vitro* antagonism tests carried out at low temperature. Moreover, most of the *T. aureoviride* and *T. viride* strains grew on the surface of the colony of the phytopathogen, and produced many conidia, suggesting effective mycoparasitic interaction. Since at low temperature there can be differences in growth and the activities of enzymes, the production of β-glucosidases, chitinases, and proteases was investigated at 10°C, and high levels of these enzymes, which are important in the mycoparasitic process, were found in the cold-tolerant isolates. These enzymes were not only secreted under cold conditions, but their activities were still significant at 5°C, indicating that they are really cold-tolerant enzymes. Other studies have already reported the retained mycoparasitic abilities of cold-tolerant *Trichoderma* strains under cold conditions, but they have not proved the relationship between this ability and the cold-tolerant extracellular enzymes.

Within the scope of OMFB development work entitled "Production of biopesticide mycopreparations against phytopathogenic fungi", 150 *Trichoderma* isolates, derived from the "Ásotthalmi Emlékerdő (Ásotthalom Memorial Forest)", were investigated for ability to produce extracellular enzymes and *in vitro* antagonism against a *Fusarium culmorum* strain at 20°C. After that, the most promising strains were investigated for the possibilities of breeding with UV mutagenesis. For this, mutants were created from the *T. hamatum* strains AH22, AH310; *T. harzianum* strains AH48, AH356 and *T. viride* strain AH124, which were searched for strains with increased levels of extracellular β-1,3-glucanase and chitinase, enzymes that are involved in mycoparasitism. On the basis of the antagonism test of the created mutants against *F. culmorum, F. graminearum* and *F. oxysporum* strains, it was established that some of them proved to be more effective *in vitro* in comparison to the initial strains. Research workers at the "Gabona Kutató Intézet (Institute for Grain Research)" confirmed our observations by investigating the strains in *in vivo* experiments.

Genetic transformation systems were developed for the further breeding and investigation of *T. harzianum* strain AH48, and *T. harzianum* strain AH356-BG2 and *T. viride* strain AH124-BG7, created during UV mutagenesis experiments. *T. viride* strain AH124-BG7, because of its relatively high hygromycin sensitivity, proved to be a suitable recipient strain for transformation with plasmid pCSN43, carrying the gene of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase. The transformation frequency was relatively high, but the plasmid molecules did not integrate into the genome, and recombinant forms occurred, suggesting the instability of the transformant character. Although methods based on resistance have the advantage of not requiring the preliminary modification of the strains, for *T. harzianum* strains AH48 and AH356-BG2, because of their low level hygromycin sensitivity, auxotrophic complementation systems were chosen. For this auxotrophic mutants were isolated by filtration enrichment and direct selection. The uracil auxotrophic mutants of strain AH356-BG2 were successfully transformed with plasmids pKIM7, pPAura510 and pTRura5-3, carrying the genes of *Neurospora crassa* orotidine-5-phosphate decarboxylase, *Podospora anserina* orotate pyrophosphoribosyl transferase and *Trichoderma reesei* orotate pyrophosphoribosyl transferase, respectively. The transformation frequency was the lowest

in the case of pKIM7, and although a part of the plasmid molecules integrated into the genome, free plasmid molecules were also detectable, and the transformants proved to be unstable. The *ans*1 sequence, built into the plasmid to increase the frequency of integration, did not function effectively in this strain. In the case of plasmid pPAura510 a higher transformation frequency was found, and 90-100% of the conidia of four out of the nine transformant progeny germinated on synthetic minimal agar medium. The highest transformation frequency was achieved in the case of plasmid pTRura5-3, and in this system all of the nine investigated transformant strains showed a high level of stability, 90-100% of their conidia also had the transformant character. The hybridization investigation of the strains showed plasmid molecules integrated into the genome. The transformation frequencies achieved in both systems, one based on hygromycin resistance and the other on auxotrophic complementation, were sufficiently high for their applications as cotransformation systems. For strain AH48, a transformation system based on arginin auxotrophy complementation was developed, in which plasmids pSal23 and pAN5-41B were used, carrying the *Aspergillus nidulans arg*B gene, and both the *Aspergillus nidulans arg*B and *Escherichia coli lac*Z genes, respectively. In the case of transformation with plasmid pSal23, the transformation frequency was low, and two out of the eight transformants proved to be stable. The transformation with plasmid pAN5-41B had also low frequency, and most of the transformant strains proved to be unstable, but it was proved that the product of the *lac*Z gene of *Escherichia coli* is expressed in an active form under the control sequences of *Aspergillus nidulans*, so it is useful as a reporter gene. It is of great help in those transformation systems, where direct selection markers are not available. During the transformation experiments, genes from closely or distantly related strains, like *T. reesei*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Podospora anserina* and *Escherichia coli,* were successfully expressed in the selected *Trichoderma* strains. It was established, by analysing the hybridization patterns of the transformant strains, that the plasmid molecules mostly integrated into the genome of these *Trichoderma* strains, but in certain cases they were also present in free form. With respect to the types of integration of the plasmid molecules into the genome, both single and tandem repeat modes were demonstrated, at one or more sites.

Although there are extensive investigations about the physical and functional features of the mitochondrial DNA of fungi, in the case of the *Trichoderma* genus this field is unexplored, so we have started the investigation of the organization of the mitochondrial DNA of the mycoparasitic, benomyl resistant *Trichoderma harzianum* strain T95, derived from the ATCC strain collection. Based on the size of fragments of the DNA sample, purified from the isolated mitochondria and cut up by restriction enzymes, the mtDNAs were found to be 28.5 kbp in size. After that, the physical map was constructed using three restriction enzymes. In the investigation of the gene content, from the general mitochondrial genes, the presence of the genes of small and large ribosomal RNA subunits, apocytochrome b, ATP-ase subunit 9 and NADH dehydrogenase subunit 5 was established. With the help of the physical map it was found, that the order of the investigated genes was not identical to that observed in any of the related species.

After the separation of the undigested DNA sample derived from the mitochondria of the *Trichoderma harzianum* strain T95 by gel electrophoresis, a simple ladder-like banding pattern was also observed under the large molecular weight band corresponding to the mtDNA. The resistance of the bands against S1 nuclease suggests a double stranded DNA molecule. On the basis of further investigations it was proved, that the pattern was produced by molecules, 2.6 kbp in size, that were supercoiled to various degrees, and had no sequence homologies with the mtDNA. The longest one of the open reading frames of this plasmid, named pThr1 by us, could encode a protein, that has a sequence homology at amino acid level with the reverse transcriptase of the Mauriceville and Varkud plasmids from *Neurospora* spp. In the same sequence, conserved sequence elements characteristic of group I introns can also be found. On the basis of these features, plasmid pThr1 could be related to the genetic elements thought to be the progenitors of mtDNA introns. In practice, the cloned and sequenced plasmid pThr1 can provide useful sequences and information for the construction of transformation vectors having autonomous replicating ability in *Trichoderma* strains.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

Abdel-Malik MS, Court DA, Cheng CK, Bertrand H (1990) Nucleotide sequence of the exons of the large subunit rRNA of *Neurospora crassa* mitochondria. Nucleic Acids Res. 18, 7440.

Abraham MK, Gupta SK (1998) Biological control of root rot of French bean caused by *Rhizoctonia solani*. J Mycol. Plant Pathol. 28, 202-205.

Abrahao-Neto J, Rossini CHB, El-Gogary S, Henrique-Silva F, Crivellaro O, El-Dorry H (1995) Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in T*richoderma reesei.* Biochemistry 34, 10456-10462.

Ahmad JS, Baker R (1987) Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum.* Phytopathol. 77, 182-189.

Akins RA, Kelley RL, Lambowitz AM (1986) Mitochondrial plasmids of *Neurospora*: integration into mitochondrial DNA and evidence for reverse transcription in mitochondria. Cell 47, 505-516.

Akins RA, Grant DM, Stohl LL, Bottorff DA, Nargang FE, Lambowitz AM (1988) Nucleotide sequence of the Varkud mitochondrial plasmid of *Neurospora* and synthesis of a hybrid transcript with a 5' leader derived from mitochondrial RNA. Mol. Biol. 204, 1-25.

Akins RA, Kelley RL, Lambowitz AM (1989) Characterization of mutant mitochondrial plasmids of *Neurospora* spp. that have incorporated tRNAs by reverse transcription. Mol. Cell. Biol. 9, 678-691.

Antal Zs, Manczinger L, Ferenczy L (1997) Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *arg*B gene of *Aspergillus nidulans*. Biotechnol. Lett. 11, 205-208.

Antal Zs, Manczinger L, Szakács Gy, Tengerdy RP, Ferenczy L (1999a) Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. (Mycol. Res., közlésre elfogadva)

Antal Zs, Manczinger L, Kredics L, Ferenczy L (1999b) Investigation of the mitochondrial DNA organization of a *Trichoderma harzianum* strain. 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Abstract book pp. 2.

Antal Zs, Manczinger L, Kredics L, Ferenczy L (1999c) Mitochondrial plasmid in a *Trichoderma harzianum* strain. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 46, pp. 331.

Arganoza MT, Min J, Hu Z, Akins RA (1994) Distribution of seven homology groups of mitochondrial plasmids in *Neurospora*: evidence for widespread mobility between species in nature. Curr. Genet. 26, 62-73.

Atschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Atschul SF, Thomas LM, Alejandro AS, Jinghui Z, Zheng Z, Webb M, David JL (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.

Bailey DJ, Gilligan CA (1997) Biological control of pathozone behaviour and disease dynamics of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma viride*. New Phytologist 136(2), 359-367.

Ballance DJ, Turner G (1985) Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. Gene 36, 321-331.

Belcour L, Rossignol M, Koll F, Sellem CH, Oldani C (1997) Plasticity of the mitochondrial genome in *Podospora*. Polymorphism for 15 optional sequences: group-I, group-II introns, intronic ORFs and an intergenic region. Curr. Genet. 31, 308-317.

Bendich AJ (1993) Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. Curr. Genet. 24, 279-290.

Benhamou N, Chet I (1997) Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. Appl. Environ. Microbiol. 63(5), 2095-2099.

Benore-Parsons M, Anderson L (1995) Purification of DNA fragments from lyophilized agarose gels. Nucleic Acids Res. 23, 4926-4927.

Berges T, Barreau C (1991) Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura*3 and *ura*5 genes. Curr. Genet. 19, 359-365.

Birnboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 100, 243-255.

Bissett (1984) Revision of the genus *Trichoderma*. Can. J. Botany 69, 924-931.

Brown TA, Ray JA, Waring RB, Scazzocchio C, Davies RW (1984) A mitochondrial reading frame which may code for a second form of ATPase subunit 9 in *Aspergillus nidulans.* Curr. Genet. 8, 489-492.

Brown TA, Waring RB, Scazzocchio CRW Davies (1985) The *Aspergillus nidulans* mitochondrial genome. Curr. Genet. 9, 113-117.

Brown TA, Constable A, Ray JA, Waring RB, Scazzocchio C, Davies RW (1989) Nucleotide sequence of the *Aspergillus nidulans* mitochondrial gene for subunit 5 of NADH dehydrogenase. Nucleic Acids Res. 17, 4371.

Buchert J, Ranua M, Siika-aho M, Pere J, Viikari J (1994) *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 941-945.

Burke JM, RajBhandary UL (1982) Intron within the large rRNA gene of *N. crassa* mitochondria: a long open reading frame and a consensus sequence possibly important in splicing. Cell 31, 509-520.

Burke JM, Breitenberger C, Heckman JE, Dujon B, RajBhandary UL (1984) Cytochrome b gene of *Neurospora crassa* mitochondria. Partial sequence and location of introns at sites

different from those in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*. J. Biol. Chem. 259, 504-511.

Buxton FP, Radford A (1984) The transformation of mycelial spheroplasts of *Neurospora crassa* and the attempted isolation of an autonomous replicator. Mol. Gen. Genet. 196, 337-344.

Carsolio C, Benhamou N, Haran S, Cortes C, Gutierrez A, Chet I, Herrera-Estrella A (1999) Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl. Environ. Microbiol. 65, 929-935.

Carver CE, Pitt D, Rhodes DJ (1996) Aetiology and biological control of *Fusarium* wilt of pinks (*Dianthus caryophyllus*) using *Trichoderma aureoviride*. Plant Pathol. 45, 618-630.

Castle A, Speranzini D, Rghei N, Alm G, Rinker D, Bissett J (1998) Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. Appl. Environ. Microbiol. 64, 133-137.

Chambers SM, Scott ES (1995) In vitro antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. J. Phytopathol. 143, 471-477.

Chan BS, Court DA, Vierula PJ, Bertrand H (1991) The kalilo linear senescence-inducing plasmid of *Neurospora* is an invertron and encodes DNA and RNA polymerases. Curr. Genet. 20, 225-237.

Chiang CC, Kennell JC, Wanner LA, Lambowitz AM (1994) A mitochondrial retroplasmid integrates into mitochondrial DNA by a novel mechanism involving the synthesis of a hybrid cDNA and homologous recombination. Mol. Cell. Biol. 14, 6419-6432.

Clark-Walker GD (1992) Evolution of mitochondrial genomes in fungi. Int. Rev. Cyt. 141, 89-127.

Collins RA, Stohl LL, Cole MD, Lambowitz AM (1981) Characterization of a novel plasmid DNA found in mitochondria of *Neurospora crassa*. Cell 24, 443-452.

Collins RA, Saville BJ (1990) Independent transfer of mitochondrial plasmids during unstable vegetative fusion in *Neurospora*. Nature 345, 177-179.

Collins RA (1993) *Neurospora crassa* mitochondrial genes. Genetic maps: locus maps of complex genomes (Szerk. O'Brien SJ) pp. 3.33-3.35.

Court DA, Griffith AJF, Kraus SR, Russell PJ, Bertrand H (1991) A new senescence-inducing mitochondrial linear plasmid in field-isolated *Neurospora crassa* strains from India. Curr. Genet. 19, 129–137.

Court DA, Bertrand H (1992) Genetic organization and structural features of *maranhar*, a senescence-inducing linear mitochondrial plasmid of *Neurospora crassa*. Curr. Genet. 22, 385-397.

Court DA, Bertrand H (1993) Expression of the open reading frames of a senescence-inducing linear mitochondrial plasmid of *Neurospora crassa*. Plasmid 30, 51-66.

Cummings DJ, Belcour L, Grandchamp C (1979) Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. I. Isolation and characterization. Mol.Gen.Genet.171, 229-238.

Cummings DJ, Michel F, McNally KL (1989a) DNA sequence analysis of the 24.5 kilobase pair cytochrome oxidase subunit I mitochondrial gene from *Podospora anserina*: a gene with sixteen introns. Curr. Genet. 16, 381-406.

Cummings DJ, Michel F, McNally KL (1989b) DNA sequence analysis of the apocytochrome b gene of *Podospora anserina*: a new family of intronic open reading frame. Curr. Genet. 16, 407-418.

Cummings DJ, Domenico JM, Nelson J (1989c) DNA sequence and secondary structures of the large subunit rRNA coding regions and its two class I introns of mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. J. Mol. Evol. 28, 242-255.

Cummings DJ, Domenico JM, Nelson J, Sogin ML (1989d) DNA sequence, structure, and phylogenetic relationship of the small subunit rRNA coding region of mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. J. Mol. Evol. 28, 232-41.

Cummings DJ, McNally KL, Domenico JM, Matsuura ET (1990a) The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. Curr. Genet. 17, 375-402.

Cummings DJ, Michel F, Domenico JM, McNally KL (1990b) DNA sequence analysis of the mitochondrial ND4L-ND5 gene complex from *Podospora anserina*. Duplication of the ND4L gene within its intron. J. Mol. Biol. 212, 269-286.

Danielson RM, Davey CB (1973) Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. Soil Biol. Biochem. 5, 485-494.

Das BC, Khairuzzaman ASM, Bora LC (1998) Biological seed treatment for management of sheath blight of rice. J. Mycol. Plant Pathol. 28, 45-47.

Davis RH (1986) Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 50, 280-313.

De La Cruz J, Llobell A (1999) Purification and properties of a basic endo-beta-1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 265, 145-151.

DelMar EG, Largman C, Brodrick JW, Geokas MC (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. Anal.Biochem.99, 316-320.

Dinouël N, Drissi R, Miyakawa N, Sor F, Rousset S, Fukuhara H (1993) Linear mitochondrial DNAs of yeasts: closed-loop structure of the termini and possible linear-circular conversion mechanisms. Mol. Cell. Biol. 13, 2315-2323.

Dmochowska A, Berse B, Kowalska I, Skrzypek M, Weglenski P (1986) Expression of the *Aspergillus nidulans arg*B gene in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 132, 1729-1737.

Elad Y, Kapat A (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. 105, 177-189.

Ephrussi B, Hottinguer H, Chimenes Y (1949) Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur 76, 351.

Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Aittaleb M, Baise E, Genicot S, Gerday C (1996) Enzymes from psychrophilic organisms. FEMS Microbiol. Rev. 18, 189-202.

Fernandez D, Assigbese K, Dubois MP, Geiger JP (1994) Molecular characterization of races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4039-4046.

Fincham JRS (1989) Transformation in fungi. Microbiological Reviews 53, 148-170.

Flores A, Chet I, Herrera-Estrella A (1997) Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb*1. Curr. Genet. 31, 30-37.

Gautheret A, Dromer F, Bourhis JH, Andremont A (1995a) *Trichoderma pseudokoningii* as a cause of fatal infection in a bone marrow transplant recipient. Clin. Infect. Dis. 20, 1063-1064.

Gautheret A, Dromer F, Bourhis JH, Andremont A (1995b) *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia. J. Clin. Microbiol. 35, 499-503.

Gems D, Johnstone IL, Clutterbuck AJ (1991) An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. Gene 98, 61-67.

Geremia R, Goldman GH, Jacobs D, Ardiles W, Vila SB, Van Montagu M, Herrera Estrella A (1993) Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb*1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Mol. Microbiol. 8, 603-613.

Giczey G, Kerenyi Z, Dallmann G, Hornok L (1998) Homologous transformation of *Trichoderma hamatum* with an endochitinase encoding gene, resulting in increased levels of chitinase activity. FEMS Microbiol. Lett. 165, 247-252.

Goc A, Dmochowska A, Weglenski P (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the *arg*B gene. Acta Microbiol. Pol. 36, 29-38.

Goldfarb B, Nelson EE, Hansen EM (1989) *Trichoderma* spp.: Growth rates and antagonism to *Phellinus weirii in vitro*. Mycologia 81, 375-381.

Gray TR, Jones JG, Wright SJL (1978) Microbiological aspects of the soil, plant, aquatic, air and animal endvironments. Pesticide Microbiology, Academis press, London.

Gray MW (1989) The evolutionary origins of the organelles. Trends Genet. 5, 294-299.

Griffiths AJF, Kraus SR, Bertrand H (1986) Expression of senescence in *Neurospora intermedia*. Can. J. Genet. Cytol. 28, 459-467.

Griffiths AJF (1992) Fungal senescence. Annu. Rev. Genet. 26, 351-372.

Griffiths AJF (1995) Natural plasmids of filamentous fungi. Microbiol. Rev. 59, 673-685.

Grondona I, Hermosa R, Tejada M, Gomis MD, Mateos PF, Bridge PD, Monte E, Garcia-Acha I (1997) Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*,

a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3189-3198.

Grossman LI, Hudspeth MES (1985) Fungal mitochondrial genomes. Gene manipulation in fungi. (Szerk. Bennett JW, Lasure LL) Academic Press, London, 65-103.

Gruber F, Visser J, Kubicek CP, de Graaff LH (1990a The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyr*G-negative mutant strain. Curr. Genet. 18, 71-76.

Gruber F, Visser J, Kubicek CP, de Graaff LH (1990bCloning of *Trichoderma reesei pyr*G gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. Curr. Genet. 18, 447-451.

Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM (1991) Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media insecta cuticule. Exp. Mycol. 15, 310-315.

Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, Steiner W, Zupancic S (1996) Production of fungal xylanases. Biores. Technol. 58, 137.

Hamari Z, Pfeiffer I, Ferenczy L, Kevei F (1999) Interpretation of variability of mitochondrial genomes in the species *Aspergillus carbonarius*. Ant. Leeuw. 75, 225-231.

Hanfler J, Teepe H, Weigel C, Kruft V, Lurz R, Wostemeyer J (1992) Circular extrachromosomal DNA codes for a surface protein in the (+) mating type of the zygomycete *Absidia glauca*. Curr. Genet. 22, 319-325.

Haran S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I (1996a) Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathol. 86, 980-985.

Haran S, Schickler H, Chet I (1996b) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiol. 142, 2321-2331.

Hermanns J, Asseburg A, Osiewacz HD, (1994) Evidence for a life span-prolonging effect of a linear plasmid in a longevity mutant of *Podospora anserina*. Mol. Gen. Genet. 243, 297-307.

Herrera-Estrella A, Goldman GH, Van Montagu M (1990) High-efficiency transformation system for the biocontrol agents *Trichoderma* spp. Mol. Microbiol. 4, 839-843.

Hinnen A, Hicks JB, Fink GR (1978) Transformation of yeast chimaeric ColE1 plasmid carrying LEU2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933.

Hudspeth MES (1992) The fungal mitochondrial genom - A broader perspective. Handbook of Applied Mycology Vol. 4, (Szerk. Arora DK, Elander RP, Mukerji KG) Marcel Dekker Inc. 213-241.

Inbar J, Chet I (1992) Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. J. Bacteriol. 174, 1055-1059.

Inbar J, Chet I (1995) The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Microbiology 141, 2823-2829.

Jukes TH, Osawa S (1993) Evolutionary changes in the genetic code. Comp. Biochem. Physiol. [B] 106, 489-494.

Kempken F, Meinhardt F, Esser K (1989) In organello replication and viral affinity of linear, extrachromosomal DNA of the ascomycete *Ascobolus immersus*. Mol. Gen. Genet. 218, 523-530.

Kempken F (1995) Horizontal transfer of a mitochondrial plasmid. Mol. Gen. Genet. 248, 89-94.

Kennell JC, Wang H, Lambowitz AM (1994) The Mauriceville plasmid of *Neurospora* spp. uses novel mechanisms for initiating reverse transcription in vivo. Mol. Cell. Biol. 14, 3094-3107.

Kevei F, Hamari Z, Varga J, Kozakiewicz Z, Croft JH (1996) Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. Ant. Leeuw. 70, 59-66.

Kistler HC, Benny U, Powell WA (1997) Linear mitochondrial plasmids of *Fusarium oxysporum* contain genes with sequence similarity to genes encoding a reverse transcriptase from *Neurospora* spp. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3311-3313.

Kochel HG, Kuntzel H (1981) Nucleotide sequence of the *Aspergillus nidulans* mitochondrial gene coding for the small ribosomal subunit RNA: homology to *E. coli* 16S rRNA. Nucleic Acids Res. 9, 5689-5696.

Kok CJ, Hageman PEJ, Maas PWT, Postma J, Roozen NJM, Van-Vuurde JWL (1996) Processed manure as carrier to introduce *Trichoderma harzianum*: Population dynamics and biocontrol effect on *Rhizoctonia solani*. Biocontrol Science Technol. 6, 147-161.

Koll F, Boulay J, Belcour L and d'Aubenton-Carafa Y (1996) Contribution of ultra-short invasive elements to the evolution of the mitochondrial genome in the genus *Podospora*. Nucleic Acids Res. 24, 1734-1741.

Kubicek CP (1992) The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 45, 1-27.

Kuck U, Osiewacz HD, Schmidt U, Kappelhoff B, Schulte E, Stahl U, Esser K (1985) The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospora anserina*. Curr. Genet. 9, 373-382.

Kuiper MT, Lambowitz AM (1988) A novel reverse transcriptase activity associated with mitochondrial plasmids of *Neurospora*. Cell 18, 693-704.

Lambowitz AM (1989) Infectious introns. Cell 56, 323-326.

Lazarus CM, Earl AJ, Turner G, Kuntzel H (1980) Amplification of a mitochondrial DNA sequence in the cytoplasmically inherited 'ragged' mutant of *Aspergillus amstelodami*. Eur. J. Biochem. 106, 633-641.

Leach J, Finkelstein DB, Rambosek JA (1986) Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. Gen. Newsl. 33, 32-33.

Lloyd D (1974) The mitochondria of microorganisms. Academic Press, London New York San Francisco.

Lorito M, Hayes CK, Zoina A, Scala F, Del Sorbo G, Woo SL, Harman GE (1994) Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides. Mol. Biotechnol. 2, 209-218.

Lorito M, Farkas V, Rebuffat S, Bodo B, Kubicek CP (1996) Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. J. Bacteriol. 178, 6382-6385.

Lumsden RD (1992) Mycoparasitism of soilborne plant pathogens. The fungal community (Szerk. Carroll GC, Wicklow DT) 275-293.

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

Manczinger L, Antal Zs, Ferenczy L, (1994) Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains by UV mutagenesis. 7. Int. Congr. Mycol. Div. IUMS, Prague, Abstracts, 467.

Manczinger L, Antal Zs, Ferenczy L (1995) Isolation of uracil auxotrophic mutants of *Trichoderma harzianum* and their transformation with heterologous vectors. FEMS Microbiol. Lett. 130, 59-62.

Manczinger L, Komonyi O, Antal Zs, Ferenczy L (1997) High-frequency transformation of *Trichoderma viride* with a hygromycin B resistance vector. J. Microbiol. Methods 29, 207-210.

Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 159.

Meyer RJ (1991) Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2269-2276.

Meza V, Moreno P, Tengerdy RP, Gutierrez-Correa M (1995) Transfer of a benomyl resistance marker by heat-inactivated *Trichoderma reesei* protoplasts. Biotechnol. Lett. 17, 827-832.

Michel F, Lang BF (1985) Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses. Nature 316, 641-642.

Mishra NC, Tatum EL (1973) Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3875-3879.

Momol EA, Kistler HC (1992) Mitochondrial plasmids do not determine host range in crucifer-infecting strains of *Fusarium oxysporum*. Plant Pathol. 41, 103-112.

Mumpuni A, Sharma HSS, Brown AE (1998) Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. Appl. Environ. Microbiol. 64, 5053-5056.

Naár Z, Kecskés M (1995) A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotinia minor*. Microbiol. Res. 150, 239-246.

Nargang FE, Bell JB, Stohl LL, Lambowitz AM (1984) The DNA sequence and genetic organization of a *Neurospora* mitochondrial plasmid suggest a relationship to introns and mobile elements. Cell 38, 441-453.

Nargang FE (1985) Fungal mitochondrial plasmids. Exp. Mycol. 9, 285-293.

Nelson MA, Macino G (1987) Structure and expression of the overlapping ND4L and ND5 genes of *Neurospora crassa* mitochondria. Mol. Gen. Genet. 206, 307-317.

Netzker R, Kochel HG, Basak N, Kuntzel H (1982) Nucleotide sequence of *Aspergillus nidulans* mitochondrial genes coding for ATPase subunit 6, cytochrome oxidase subunit 3, seven unidentified proteins, four tRNAs and L-rRNA. Nucleic Acids Res. 10, 4783-4794.

Nigam P (1994) Process selection for protein-enrichment: fermentacion of the sugar industry by-products molasses and sugar beet pulp. Proc. Biochem. 29, 337-342.

Nosek J, Dinouël N, Kovac L, Fukuhara H (1995) Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. Mol. Gen. Genet. 247, 61-72.

Osawa S, Jukes TH, Watanabe K, Muto A (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. Microbiol. Rev. 56, 229-264.

Osman KE (1987) Genetic and molecular studies of *Aspergillus*. Ph.D. Thesis, University of Birmingham.

Papavizas G.C. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potencial for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23, 23-54.

Penttila M, Nevalainen H, Ratto M, Salminen E, Knowles J (1987) A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene 61, 155-164.

Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM (1993) Noncellulolytic fungal β-glucanases: Their physiology and regulation. Enzyme Microbiol. Technol. 15, 178-192.

Ragnini A, Fukuhara H (1988) Mitochondrial DNA of the yeast *Kluyveromyces*: guanine-cytosine rich sequence clusters. Nucleic Acids Res. 16, 8433-8442.

Reed KC, Mann DA (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucleic Acids Res. 13, 7207-7221.

Richter S, Cormican MG, Pfaller MA, Lee CK, Gingrich R, Rinaldi MG, Sutton DA (1999) Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: species identification and review of the literature. J. Clin. Microbiol. 37, 1154-1160.

Ridder R, Kunkele KP, Osiewacz HD (1991) Sequence of the nuclear ATP synthase subunit 9 gene of *Podospora anserina*: lack of similarity to the mitochondrial genome. Curr. Genet. 20, 349-351.

Rifai MA (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Papers 116, 1-56.

Rohe M, Schründer J, Tudzynski P, Meinhardt F (1992) Phylogenetic relationships of linear, protein-primed replicating genomes. Curr. Genet. 21, 173-176.

Saccone C (1994) The evolution of mitochondrial DNA. Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 875-881.

Sakaguchi K (1990) Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adeno-type viruses. Microbiol. Rev. 54, 66-74.

Salas M, Mellado RP, Vinuela E, Sogo JM (1978) Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. J. Mol. Biol. 119, 269-291.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sánchez-Torres P, González R, Pérez-González JA, González-Candelas L, Ramón D (1994) Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *egl*1 gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 440-446.

Schatz G, Haslbrunner E, Tuppy H (1964) Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 127-132.

Schulte U, Lambowitz AM (1991) The LaBelle mitochondrial plasmid of *Neurospora intermedia* encodes a novel DNA polymerase that may be derived from a reverse transcriptase. Mol. Cell. Biol. 11, 1696-1706.

Sekiguchi J, Ohsaki T, Yamamoto H, Koichi K, Shida T (1990) Characterization and comparison of mitochondrial DNAs and rRNAs from *Penicillium urticae* and *P. chrysogenum*. J. Gen. Microbiol. 136, 535-543.

Sivan A, Chet I (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol. 135, 675-682.

Sivan A, Chet I (1992) Microbial control of plant diseases. Environmental microbiology (Szerk. Mitchell R) 335-354.

Smith AL (1985) Principles of microbiology. Chemical agents therapeutic for microbial diseases. Times Mirror/Mosby College Publishing pp. 243.

Soler A, de la Cruz J, Llobell A (1999) Detection of beta-1,6-glucanase isozymes from *Trichoderma* strains in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing gels. J. Microbiol. Methods 35, 245-251.

Staben C, Jensen B, Singen M, Pollock J, Schechtman M (1989) Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. Fung. Genet. Newsl. 36, 78-83.

Stahl U, Lemke PA, Tudzynski P, Kuck U, Esser K (1978) Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. Mol. Gen. Genet. 162, 341-342.

Stahl U, Kück U, Tudzynski P, Esser, K (1980) Characterization and cloning of plasmid-like DNA of the ascomycete *Podospora anserina*. Mol. Gen. Genet. 178, 639-646.

Stahl U, Tudzynski P, Kuck U, Esser K (1982) Replication and expression of a bacterial--mitochondrial hybrid plasmid in the fungus *Podospora anserina*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 3641-3645.

Stohl LL, Collins RA, Cole MD, Lambowitz AM (1982) Characterization of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild-type *Neurospora intermedia* strains. Nucleic Acids Res. 10, 1439-1458.

Tattar TA, Berman PM, Gonzalez EY, Mount MS, Dolloff AL (1996) Biocontrol of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Arboricultural Journal 20, 449-469.

Taylor JW, Smolich BD (1985) Molecular cloning and physical mapping of the *Neurospora crassa* 74-OR23-A mitochondrial genome. Curr. Genet. 9, 597-603.

Teather RM, Wood PJ (1982) Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 43, 777-780.

Tronsmo A, Dennis C (1978) Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. Trans. Br. Mycol. Soc. 71, 469-474.

Tudzynski P, Esser K (1982) Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium* II. Development of a mitochondrial DNA hybrid vector replicating in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 6, 153-158.

Tudzynski P, Duvell A, Esser K (1983) Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea*. I. Mitochondrial DNA and mitochondrial plasmids. Curr. Genet. 7, 145–150.

Tudzynski P, Esser K (1985) Mitochondrial DNA for gene cloning in eukariotes. Gene manipulation in fungi. (Szerk. Bennett JW, Lasure LL) Academic Press, London, 403-416.

Ulhoa CJ, Vainstein MH, Peberdy JF (1992) Transformation of *Trichoderma* species with dominant selectable markers. Curr. Genet. 21, 23-26.

Upshall A, Gilbert T, Saari G, O'Hara PJ, Weglenski P, Berse B, Miller K, Timberlake WE (1986) Molecular analysis of the *arg*B gene of *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 204, 349-354.

van den Boogaart P, Samallo J, Agsteribbe E (1982) Similar genes for a mitochondrial ATPase subunit in the nuclear and mitochondrial genomes of *Neurospora crassa*. Nature 298 (5870), 187-189.

Van Gorcom RFM, Punt PJ, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ (1986) A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. Gene 48, 211–217.

Varga J, Kevei F, Fekete Cs, Coenen A, Kozakiewicz Z, Croft JH (1993) Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. Mycol. Res. 97, 1207-1212.

Vázquez-Garcidueñas S, Leal-Morales CA, Herrera-Estrella A (1998) Analysis of the β-1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Envir. Microbiol. 64, 1442-1446.

Verdoes JC, Punt PJ, van der Berg P, Debets F, Stouthamer AH, van den Hondel CA (1994) Characterization of an efficient gene cloning strategy for *Aspergillus niger* based on an autonomously replicating plasmid: cloning of the *nic*B gene of *A. niger*. Gene 146, 159-165.

Vickery DB, Griffiths AJ (1993) Transcription of the kalilo linear senescence plasmid from *Neurospora intermedia*. Plasmid 29,180-192.

Vierula PJ, Cheng CK, Court DA, Humphrey RW, Thomas DY, Bertrand H (1990) The *kalilo* senescence plasmid of *Neurospora intermedia* has covalently-linked 5' terminal proteins. Curr. Genet. 17, 195-201.

Wang H, Kennell JC, Kuiper MT, Sabourin JR, Saldanha R, Lambowitz AM (1992) The Mauriceville plasmid of *Neurospora crassa*: characterization of a novel reverse transcriptase that begins cDNA synthesis at the 3' end of template RNA. Mol. Cell. Biol. 12, 5131-5144.

Wang H, Lambowitz AM (1993) The Mauriceville plasmid reverse transcriptase can initiate cDNA synthesis de novo and may be related to reverse transcriptase and DNA polymerase progenitor. Cell 75, 1071-1081.

Waring RB, Davies RW, Lee S, Grisi E, Berks MM, Scazzocchio C (1981) The mosaic organization of the apocytochrome b gene of *Aspergillus nidulans* revealed by DNA sequencing. Cell 27, 4-11.

Weiller G, Schueller CM, Schweyen RJ (1989) Putative target sites for mobile G + C rich clusters in yeast mitochondrial DNA: single elements and tandem arrays. Mol. Gen. Genet. 218, 272-283.

Widden P, Abitbol J (1980) Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce forest soil. Mycologia 72, 775-784.

Zayed G, Meyer O (1996) The single-batch bioconversion of wheat straw to ethanol employing the fungus *Trichoderma viride* and the yeast *Pachysolen tannophylus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 551-555.

Zeilinger S, Galhaup C, Payer K, Woo SL, Mach RL, Fekete C, Lorito M, Kubicek CP (1999) Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genet. Biol. 26, 131-140.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, **prof. Ferenczy Lajosnak**, az akadémia rendes tagjának, valamint **dr. Manczinger László** egyetemi docensnek a kutatómunka kapcsán felmerült elméleti és gyakorlati problémák megoldásában, valamint a kutatási eredményekből készült publikációk, pályamunkák sikeréhez nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom **dr. habil. Kevei Ferenc** tanszékvezető, egyetemi docensnek a Mikrobiológiai Tanszéken végzett munkám támogatásáért.

Megköszönöm **Lele Máriának** a laboratóriumi munkában, feladatkörét messze meghaladóan nyújtott technikai segítségét.

Köszönöm **Nagy Lajos Gergelynek** a fényképek elkészítésében való közreműködését.

Továbbá köszönetemet fejezem ki mindazon kollégáimnak, akik információik és tapasztalataik átadásával, segítőkészségükkel, emberségükkel hozzájárultak munkám sikeres elvégzéséhez.