

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI
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

BEVEZETÉS

A *Trichoderma* nemzetség, egyes tagjai növénypatogén gombákkal szembeni antagonista tulajdonságának, illetve kiemelkedő extracelluláris enzintermelő 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 felkutatása. E témákhoz kapcsolódik kutatócsoportunk munkája is.

A hőmérséklet, mely alapvetően megszabja a mikroorganizmusok elterjedését, növekedését és enzintermelését, lényeges korlátozó tényező lehet az antagonista kapcsolatokban is. A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó törzsek nagy része mezoterm, melyek a hideg őszi, kora tavaszi időszakban kevésbé 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.

A *Trichoderma* nemzetség tagjainál az ivaros szaporodás kivitelezése nehézségekbe ütközik, ezért megváltozott tulajdonságú

törzsek előállítására a klasszikus rekombináns nyerési mechanizmusok helyett a mutagenézist, a protoplasztfúziót és a transzformációt alkalmazzák. Bár az egyes gének transzformációval történő bejuttatása lényegesen egyszerűbbé teszi a célzott törzsátalakításokat, az idegen DNS-t tartalmazó törzsek alkalmazását korlátozó jogszabályok miatt a szabadföldi felhasználásra szánt törzsek nemesítése esetében még manapság is jelentős szerep jut a mutagenézises nemesítési módszereknek.

Egyes gének, szabályozó szekvenciák vagy egyéb DNS fragmentek tulajdonságainak, hatásainak és az adott sejtben való expresszáldásának vizsgálatára, illetve bizonyos anyagcsere termékeket megnövekedett mennyiségben termelő törzsek célzott előállítására legalkalmasabb módszer a transzformáció, melynek során izolált DNS molekulákat juttatunk a sejtekbe. A transzformációs rendszerek kidolgozásához a transzformáló DNS-en kívül megfelelő befogadó sejtek kiválasztása illetve előállítása szükséges, melyek kezelése után a transzformáns sejtekből fejlődő telepek a plazmid által nyújtott szelekciós lehetőségnek köszönhetően elkülöníthetővé válnak a többi sejtől illetve teleptől.

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, 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. A gátló tényezőkkel szemben ellenállóbb mitokondriális mutánsok előállításánál is hasznos lehet a mitokondriális DNS szerveződésének alaposabb ismerete.

Fonalgombák plazmidjainak vizsgálata 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 sejttöregedés genetikai alapjainak kutatása, valamint fonalgombákban önálló replikációs képességgel rendelkező klónozó vektorok létrehozása kapcsán. *Trichoderma* törzsek mitokondriális plazmidjairól eddig csak egy érintőleges tanulmány jelent meg.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Hidegtűrő, alacsony hőmérsékleten is hatékony antagonizmusra képes törzsek szelektálása, valamint az antagonizmusban szerepet játszó extracelluláris β -glükozidáz, exokitináz és proteináz enzimeik alacsony hőmérsékleten való termelődésének és aktivitásának mérése.
2. A mikoparazitizmusban szerepet játszó extracelluláris enzimek termelésében, valamint az *in vitro* antagonizmusban 20°C-on legjobbnak mutatózó törzsek kiválasztása, és mikoparazita képességeiknek fokozása, extracelluláris β -1,3-glukanáz és kitináz enzimszintjeiknek UV mutagenézissel történő növelésével.
3. Transzformációs rendszerek kidolgozása a korábbi vizsgálataink alapján extracelluláris enzimek termelésében és *in vitro* antagonista képességekben kiemelkedőnek bizonyult *Trichoderma* törzsek további vizsgálatához illetve célzott genetikai változtatásához.
4. A mitokondriális DNS szerveződésének vizsgálata *Trichoderma* törzsekben.
5. A *T. harzianum* T95 törzs mitokondriumában jelenlevő plazmid klónozása és vizsgálata.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek felkutatásához 360, a *T. aureoviride*, *T. citrinoviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii* és *T. viride* fajcsoportokba tartozó törzset vizsgáltunk meg. Tizennégy hidegtűrő képességű, 5°C-on is növekedésre képes izolátumot találtunk, melyek a *T. aureoviride*, a *T. harzianum* és a *T. viride* fajcsoportokból kerültek 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 β -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.

2. Az Ásotthalmi Emlékerdőből származó avar- és talajmintákból 150 *Trichoderma* törzset izoláltunk, melyek extracelluláris β -1,3-

glukanáz, kitináz és proteáz enzimei termelődésének, valamint *Fusarium culmorum* 1181 törzzsel szembeni *in vitro* antagonizmusának alapján öt ígéretes jelöltet választottunk ki az UV mutagenézises nemesítési kísérletekhez. Mivel a biokontroll törzsek hatékonysága nagymértékben múlhat azon, hogy milyen mennyiségben képesek a növénypatogén gombák sejtfalában levő β -1,3-glukán és kitin bontására, ezért ezen polimerek bontásában résztvevő enzimek termelődésében mutáns törzseket állítottunk elő a *T. hamatum* AH22, AH310, *T. harzianum* AH48, AH356 és *T. viride* AH124 törzsekből. 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.

3. A *T. harzianum* AH48 törzs és az UV mutagenézises kísérletekben létrehozott *T. harzianum* AH356-BG2 valamint *T. viride* AH124-BG7 törzsek további nemesítéséhez illetve vizsgálatához transzformációs rendszereket dolgoztunk ki. Az AH124-BG7 törzs, viszonylag magas hygromycin érzékenysége miatt, alkalmas befogadó törzsnek bizonyult *Escherichia coli* hygromycin B foszfortranszferáz génjét hordozó, pCSN43 plazmiddal történő transzformációhoz. A transzformációs gyakoriság viszonylag magas volt, azonban a plazmid nem épült 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, az AH48 és AH356-BG2 törzsek számára, kis fokú hygromycin érzékenységük miatt, auxotrófia komplementáló rendszereket választottunk ki, melyekhez UV mutagenézist követő szűréses mutáns-dúsítással, illetve direkt szelekcióval állítottuk elő a megfelelő befogadó törzseket. 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 *ans1* 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 jelleget mutattak. 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, melyben egyrészt a pSal23, másrészt a pAN5-41B plazmidot alkalmaztuk. A transzformációs gyakoriság alacsony volt, és a 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 lacZ* 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*-ből 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.

4. 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, restriktációs 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 apocitokrómban, 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 *Ascomycota* fajokban megállapított génsorrendektől.

5. A *Trichoderma harzianum* T95 törzs mitokondriumaiból kinyert DNS emésztetlen mintájának elektroforetikus elválasztását követően egy egyszerű "létra-szerű" sávozat is megfigyelhető volt, a mtDNS-nek megfelelően nagy molekulású 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.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

Publikációk

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.

Antal Zs, Manczinger L, Ferenczy L (1997) Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. Biotechnol. Lett. 11(3), 205-208.

Antal Zs, Manczinger L, Szakács Gy, Tengerdy RP, Ferenczy L (1999) Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of

extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. (Mycol. Res., közlésre elfogadva)

Előadások és poszterek

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

Antal Zs. (1996) Gombaparazita *Trichoderma* törzsek transzformációja. Doktoranduszok I. Országos Konferenciája, Debrecen, Ph.D. 127.

Antal Zs, Manczinger L, Ferenczy L (1997) Expression of a reporter gene in a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain. ECB8, Budapest, Abstract book pp. 160.

Manczinger L, **Antal Zs**, Szakács Gy, Tengerdy RP, Ferenczy L (1997) Secretion of extracellular enzymes of cold-tolerant *Trichoderma* strains. ECB8, Budapest, Abstract book pp. 62.

Antal Zs, Manczinger L, Szakács Gy, Tengerdy RP, Ferenczy L (1997) Investigation of the antagonistic potential of cold-tolerant *Trichoderma* strains against plant-pathogenic fungi. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44, pp. 419.

Antal Zs, Manczinger L, Szakács Gy, Tengerdy RP, Ferenczy L (1998) Mycoparasitic potencial and secretion of extracellular

enzymes in cold-tolerant *Trichoderma* strains. 4th European Conference on Fungal Genetics, Leon, Spain, In: Fungal genetics, Abstract book (Ed.: Martín JF, Gutiérrez S) pp.163.

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

Kredics L, **Antal Zs**, Manczinger L (1999) Az *Escherichia coli lacZ* génjének expressziója *Trichoderma harzianum*-ban transzformáció és kotranszformáció útján. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, Program összefoglalók, 206 old.

Antal Zs, Manczinger L, Kredics L, Ferenczy L (1999) 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.

Díjnyertes pályamunkák

Antal Zs (1997) Biofungicid gombatörzsek genetikai transzformációja. Szegedi Akadémiai Bizottság I. díj

Antal Zs, Hamari Zs, Pfeiffer I (1998) Extrakromoszómális genetikai elemek vizsgálata mikroszkópikus gombákban. Magyar Tudományos Akadémia Ifjúsági Díj

Antal Zs (1998) Hidegtűrő *Trichoderma* törzsek vizsgálata és nemesítése protoplasztfúzióval. Szegedi Akadémiai Bizottság II. díj

2. További közlemények jegyzéke

Antal Zs, Manczinger L, Ferenczy L (1997) Investigation of integrative and autonomously replicating plasmids in a *Trichoderma harzianum* strain. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44, pp. 73.

Manczinger L, Szakács G, **Antal Zs**, Urbánszki K, Tengerdy RP, Ferenczy L (1997) Lignocellulose degrading enzymes and antagonistic properties of cold-tolerant *Trichoderma* strains. International Conference on Frontiers in Biotechnology, Trivandrum, India, Abstract book.

Antal Zs, Schoop A, Manczinger L, Ferenczy L (1998) Secretion of extracellular enzymes in a mycoparasitic *Trichoderma viride* strain. 4th European Conference on Fungal Genetics, Leon, Spain, In: Fungal genetics, Abstract book (Ed.: Martín JF, Gutiérrez S) pp. 165.

Antal Zs, Manczinger L, Kredics L, Szakács Gy, Tengerdy RP, Ferenczy L (1999) Breeding of *Trichoderma* strains by protoplast fusion. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 46, pp. 136-137.

Kredics L, Antal Zs, Manczinger L (1999) Influence of water activity and temperature on growth and enzyme activities of *Trichoderma harzianum*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 46, pp. 340.

Urbánszki K, Szakács Gy, Tengerdy RP Manczinger L, Antal Zs, Ferenczy L, Bartha L (1999) Solid substrate fermentation by *Trichoderma* spp. at 10°C. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 46, pp. 150.

Antal Zs, Manczinger L, Kredics L, Ferenczy L (1999) *Trichoderma* törzsek intra- és interspecifikus protoplasztfúziója. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, Program összefoglalók, 208 old.

Kredics L, Antal Zs, Manczinger L (1999) Influence of water potential and temperature on growth, enzyme secretion and *in vitro* enzyme activities of *Trichoderma harzianum*. 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Abstract book, pp. 51.