

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	3
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
2.1. <i>TRICHODERMÁK A BIOLÓGIAI NÖVÉNYVÉDELEMBEN</i>	11
2.2. <i>AZ ANTAGONIZMUS MECHANIZMUSAI</i>	12
2.2.1. <i>Antibiózis.....</i>	12
2.2.2. <i>Mikoparazitizmus, sejtfalbontó enzimek közreműködésével.....</i>	13
2.2.2.1. <i>A felismerési folyamat</i>	13
2.2.2.2. <i>Behatolás – sejtfalbontó enzimek csoportosítása.....</i>	15
2.2.2.3. <i>A Trichodermák kitináz enzimrendszere.....</i>	16
2.2.2.4. <i>A kitinázok szabályozása</i>	18
2.2.2.5. <i>A kitinázok szerepe</i>	19
2.2.3. <i>Szaprofiton kompetíció.....</i>	20
2.2.4. <i>Indukált növényi rezisztencia</i>	20
2.3. <i>TÖRZSNEMESÍTÉSI TÖREKVÉSEK A BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉS FOKOZÁSÁRA</i>	21
2.3.1. <i>Mutagenézis</i>	22
2.3.2. <i>Protoplasztfúzió</i>	22
2.3.3. <i>Transzgénikus mikroorganizmusok létrehozása.....</i>	22
2.3.4. <i>Transzgénikus növények létrehozása</i>	24
2.3.5. <i>Heterológ gazdában kifejeztett géntermék használata.....</i>	25
2.4. <i>A CONIOTHYRIUM MINITANS MIKOPARAZITA BIOLÓGIÁJÁRÓL</i>	25
2.4.1. <i>A C. minitans, mint biológiai védekező ágens.....</i>	25
2.4.2. <i>A szklerócium parazitizmus biológiája</i>	27

3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	31
3.1. GOMBATÖRZSEK SZÁRMAZÁSA, FENNTARTÁSA, TENYÉSZTÉSE.....	31
3.2. <i>T. HAMATUM</i> GÉNKÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE ÉS A <i>THAM-CH</i> GÉN IZOLÁLÁSA.....	32
3.3. SZEKVENCIA ANALÍZIS.....	32
3.4. A <i>T. HAMATUM</i> TAM-61 TRANSZFORMÁLÁSA.....	33
3.5. A TRANSZFORMÁNSOK KITINÁZAKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE.....	33
3.6. A TRANSZFORMÁLÓ PLAZMID BEÉPÜLÉSÉNEK IGAZOLÁSA.....	34
3.7. A <i>THAM-CH</i> GÉN EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA.....	34
3.8. KONFRONTÁCIÓS TESZT PETRI CSÉSZÉBEN.....	34
3.9. KITINÁZ ÉS β -1,3-GLÜKANÁZ GÉNSZAKASZOK IZOLÁLÁSA <i>C. MINITANS</i> BÓL PCR- REL.....	35
3.10. SEJTFAL-INDUKÁLT CDNS KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE ÉS TESZTELÉSE.....	36
3.11. A <i>CMG1</i> ÉS A <i>CMCH1</i> GÉNEK SZEKVENCIA ANALÍZISE.....	36
3.12. A <i>CMG1</i> ÉS A <i>CMCH1</i> GÉNEK KÓPIASZÁMÁNAK MEGHATÁROZÁSA.....	36
3.13. A <i>CMG1</i> GÉN KIFEJEZTETÉSE ÉLESZTŐBEN.....	37
3.14. A REKOMBINÁNS CMG1 ENZIM TISZTÍTÁSA.....	38
3.14.1. <i>Ioncsere-kromatográfia</i>	38
3.14.2. <i>N-terminális szekvencia analízis</i>	38
3.15. A CMG1 ENZIM JELLEMZÉSE.....	39
3.16. A <i>CMG1</i> GÉN EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA NORTHERN HIBRIDIZÁCIÓVAL.....	39
3.17. <i>IN VITRO</i> MICÉLIUM NÖVEKEDÉS GÁTLÁSI TESZT.....	40
4. EREDMÉNYEK.....	41
4.1. A <i>T. HAMATUM</i> HOMOLÓG TRANSZFORMÁLÁSA A <i>THAM-CH</i> GÉNNEL.....	41
4.1.1. <i>A Tham-ch gén klónozása genomik könyvtárból</i>	41
4.1.2. <i>A Tham-ch gén szekvencia analízise</i>	43
4.1.3. <i>A Tham-ch gén expressziója R. solani sejtfalon</i>	44
4.1.4. <i>A T. hamatum Tam-61 transzformálása</i>	46
4.1.5. <i>A transzformánsok analízise</i>	46
4.1.5.1. <i>A transzformáló vektor kromoszómába épülésének módja</i>	46
4.1.5.2. <i>Kitinázaktivitás</i>	48

4.1.5.3. A <i>Tham-ch</i> gén expressziójának növekedése	48
4.1.5.4. Konfrontációs teszt csészében.....	50
4.2. A <i>C. MINITANS</i> SEJTFALBONTÓ ENZIMGÉNJEI	50
4.2.1. Kítináz és glükánáz génszakaszok izolálása <i>C. minitans</i> ból	50
4.2.2. A <i>cmg1</i> és a <i>cmch1</i> gének szekvencia analízise	51
4.2.3. A <i>cmg1</i> gén kifejeztetése <i>S. cerevisiae</i> ben – tisztítás, jellemzés.....	56
4.2.4. A <i>CMG1</i> enzim hatása a <i>S. sclerotiorum</i> növekedésére.....	58
4.2.5. A <i>cmg1</i> gén megnyilvánulása.....	59
4.3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	61
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	63
5.1. A <i>T. HAMATUM</i> HOMOLÓG TRANSZFORMÁLÁSA A <i>THAM-CH</i> GÉNNEL	63
5.2. A <i>C. MINITANS</i> SEJTFALBONTÓ ENZIMGÉNJEI	67
6. ÖSSZEFOGLALÁS	71
SUMMARY	73
 MELLÉKLETEK	
M1. Irodalomjegyzék	75
M2. Az értekezés témájában megjelent saját közlemények	85
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	87

Rövidítések jegyzéke

4-MUFChT	4-metilumbelliferil- β -D-N,N',N''-triacetil kitotrióz
BGA	burgonya glükóz agar
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
cDNS	komplementer DNS
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
kDa	kilodalton
kb	kilobázis
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció
PEG	polietilén-glikol
rDNS	riboszómális DNS
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
SDS	nátrium-dodecil-szulfát

1. BEVEZETÉS

A modern mezőgazdaság jelentős mértékben vegyszerek, köztük peszticidek alkalmazására szorul. A peszticidként használt vegyszerek nagy mértékben történő kijuttatása egyrészt környezetszennyezést jelent, másrészt elősegíti a megcélzott káros szervezetek rezisztens változatainak elterjedését. A természetes élőterek fokozódó mértékű szennyezettsége a táplálékláncon keresztül jelentkezik a humán fogyasztású élelmiszerekben, ezért előtérbe kerülnek azok a növényvédelmi eljárások, amelyek kiküszöbölik a peszticidek szükségességét vagy csökkentik azok környezetbe juttatott mennyiségét. Az egyik, ennek a célnak megfelelő stratégia a biológiai növényvédelem, amelynek során valamely élő szervezet vagy annak terméke által csökkentjük a kártevők illetve kórokozók inokulum mennyiségét és akadályozzuk meg a termésvesztéséget. Fontosnak tartom még a bevezetésben megjegyezni, hogy a továbbiakban a biológiai védekezés alatt kizárólag a növénykórokozó gombák elleni biológiai védekezést fogom érteni, a kártevők elleni védekezés nem tárgya jelen értekezésnek. A környezetvédelmi szempontokon túl a kémiai növényvédelemmel szemben a biológiai védekezés mellett szól az is, hogy vannak kórokozók, amelyek ellen nincs igazán hatékony szintetikus peszticid, létezik viszont igen hatékony antagonista mikroorganizmus, amely képes a gátlásukra (Vajna, 1987), illetve bizonyos antagonista mikroorganizmusok alkalmazása esetén hosszan tartó, akár egész időnyire szóló hatást érhetünk el (Harman és Björkman, 1998).

Számos előnye ellenére ez a környezetbarát technológia eddig főként azért nem terjedt el széles körben a mezőgazdaságban, mert jelenleg az antagonista mikroorganizmusokkal történő védekezés az esetek többségében kevésbé hatékony és megbízható, mint a szintetikus peszticidek használata. Ahhoz, hogy jobban elterjedjen ez a technológia, a biológiai védekezésre alkalmas organizmusok nemesítésére, a jelenleginél sokkal gazdaságosabban alkalmazható törzsek előállítására, illetve a jelenlegi törzsek hatékonyabb alkalmazására van szükség. Ehhez pedig szükség van azoknak a mechanizmusoknak a mélyebb megértésére, amelyek alkalmassá tesznek valamely mikroorganizmust a biológiai védekezésben való felhasználásra.

A növénykórokozó gombák elleni biológiai védekezésben a leggyakrabban alkalmazott gombák a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fajok. Az Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériumának internetes honlapja szerint világszerte jelenleg 12 olyan biológiai készítmény van kereskedelmi forgalomban, amely hatóanyagként valamely *Trichoderma* fajt tartalmaz, ez a mikoparazita gombát tartalmazó készítmények fele (<http://www.barc.usda.gov>). A *Trichodermák* a Föld leghatárterjedtebb gombái közé tartoznak, megtalálhatók a tundrától a trópusokig, főként a talajokban, de előfordulnak a növények talaj feletti részein is, valamint bomló, főként növényi eredetű szerves maradványokon. Antagonista hatást fejtenek ki rendkívül széles fajspektrumban gombák, közöttük számos növénykórokozó ellen, ennek köszönhetik rendkívüli népszerűségüket a biológiai védekezésben.

A *Coniothyrium minitans* (Campbell) gomba is a biológiai védekezés egyik ígéretes mikroorganizmusa, minthogy egyes szkleróciumos gombák hatékony parazitája. Ellentétben a *Trichodermákkal*, e fajnak szűk a gazdaspektruma, viszont áldozatai között vannak igen jelentős növénykórokozó fajok a *Sclerotinia* nemzetségből, amelyek ellen rendkívül hatékonyan alkalmazható (Whipps és Gerlagh, 1992).

A *Trichodermák* biológiájáról, antagonista aktivitásának háttéréről viszonylag nagy mennyiségű információ halmozódott fel, a mikoparazita gombákkal foglalkozó kutatások modellszervezeteinek tekinthetjük ezeket a fajokat. Antagonista aktivitásukat különböző mechanizmusoknak köszönhetik, ezek egyike, és minden bizonnyal legjelentősebbike a közvetlen mikoparazitizmus, amelyet extracelluláris sejtfalbontó enzimek termelésével képesek elérni. Jóval kevesebb ismeret gyűlt eddig össze a *C. minitans* parazitizmusának biológiájáról, szinte semmit sem tudunk a gomba sejtfalbontó enzimrendszeréről, ami pedig feltehetően fontos szerepet játszik áldozatainak elpusztításában, és igen hatékony komponensekből állhat.

Doktori értekezésemben tárgyalt kutatómunkám biológiai védekezésre alkalmas mikoparazita gombák molekuláris biológiai módszerekkel történő nemesítéséről, valamint a parazita képesség háttérében rejlő biológiai folyamatok alaposabb feltárásáról szól. A kutatómunka célkitűzései az alábbiak voltak:

1. Megnövekedett kitinázaktivitású *Trichoderma hamatum* törzsek előállítása és jellemzése, ezen belül:
 - kitinázgén és szabályozó régióinak izolálása,
 - a gén kópiaszámának megnövelése a gazda törzsben genetikai transzformáció útján,
 - a transzformáns törzsek jellemzése.

2. A *Coniothyrium minitans* szklerócium parazita gomba hidrolitikus enzimrendszerének alaposabb megismerése, ezen belül:
 - kitináz és β -1,3-glükanáz enzimeket kódoló gének klónozása,
 - a gének és termékeik jellemzése.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. *Trichodermák* a biológiai növényvédelemben

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó gombák biológiai növényvédelmi „karriere” Weindling 1930-as évekbeli megfigyeléseivel indult (hivatkozások Harman és Björkman [1998] összefoglaló munkájában), amelyek bizonyították, hogy a *Trichoderma lignorum* (amelyet később *Gliocladium virens*nek neveztek el, majd ismét visszakerült a nemzetségbe *Trichoderma virens* néven [Bisset, 1991]) képes gátolni és elpusztítani növénykórokozó gombákat. Az is nyilvánvalóvá vált már ezekben a korai munkákban, hogy az antagonista hatás többféle módon nyilvánul meg: egyrészt közvetlen mikoparazitizmus útján, másrészt a gomba fizikai kontaktus nélkül is, kis távolságon belül képes megölni az áldozatát. Később igazolták, hogy a gomba alkalmas növényi betegségek biológiai úton történő megakadályozására, valamint azonosították, kristályosították a gátló anyagot, amelyet gliotoxinnak neveztek el (hivatkozások Harman és Björkman [1998] munkájában). Az elmúlt évtizedekben felgyorsultak a *Trichodermák* növényvédelmi alkalmazásával foglalkozó kutatások. A hetvenes és a nyolcvanas években elsősorban Baker és munkatársai, valamint Chet és munkatársai által publikált eredmények rámutattak arra, hogy függetlenül az antagonista hatástól, egyes *Trichoderma harzianum* törzseknek növényi növekedés serkentő hatásuk van. Ezzel párhuzamosan rengeteg tudományos munka számolt be valamely *Trichoderma* törzs biológiai védekezésben történt sikeres alkalmazásáról mind szántóföldi, mind üvegházi, valamint tárolás alatt jelentkező betegségek csökkentésében (összefoglalva Vajna [1987] által). Azonban az ígéretes kezdeti eredmények ellenére a kilencvenes évekig kellett várni amíg a kereskedelemben megjelentek és alkalmazásra kerültek a *Trichoderma* gombát tartalmazó biológiai növényvédőszer.

Az alábbiakban összefoglalom a *Trichodermák* által kifejtett antagonista mechanizmusok biológiai hátteréről eddig felhalmozódott ismereteket, valamint áttekintem azokat a módszereket amelyekkel a biológiai védekezés hatékonyságának a növelését kísérelték meg.

2.2. Az antagonizmus mechanizmusai

A *Trichoderma* gombák növénykórokozókkal szembeni antagonista hatása több eltérő mechanizmusnak tulajdonítható. Ezek: (1) az antibiózis, (2) a közvetlen mikoparazitizmus, (3) a szaprofiton kompetíció, s végül egyes szerzők ide sorolják negyedikként (4) a növényi védekező mechanizmusok indukálását is (Goldman et al., 1994b). Ezek nyilvánvalóan nem egymástól függetlenül ható jelenségek, minden bizonnyal az egyes izolátumok antagonista képességéhez eltérő mértékben járulhatnak hozzá, illetve a különböző patogénekkal szemben más-más mechanizmus, illetve mechanizmusoknak a kombinációja vezethet a gátláshoz.

2.2.1. ANTIBIÓZIS

Számos *Trichoderma* izolátumról mutatták ki, hogy illékony illetve nem illékony antibiotikumok termelésére képes (Howell, 1998). A legismertebb vegyületek a diketopiperazinok közé tartozó gliotoxin, a peptaibol antibiotikumok és a szteroid jellegű viridin. A *T. virens* által termelt gliotoxin szelektíven kötődik a citoplazma membránban található tiol csoportokhoz ezáltal a membrán szintézisben okoz zavart. Szintén membránkárosító hatásúak a peptid jellegű peptaibolok, amelyeket számos fajból izoláltak már. Ebbe a csoportba tartoznak a *T. harzianum*ból származó, 19 tagból álló peptidek, a trichorzianinok, amelyek membrán foszfolipidekkel lépnek kölcsönhatásba, ioncsatornákat nyitnak meg, és így megváltoztatják a sejt permeabilitási viszonyait.

Az antibiózisnak a biológiai védekezésben betöltött szerepe nem teljesen tisztázott. Antibiotikum termelésben sérült mutánsok vizsgálatakor kiderült, hogy a gliotoxint nem termelő törzsek kevésbé gátolták a *Pythium ultimum* okozta palántadőlést, mint a vad típusú törzs, viszont nem változott a *Rhizoctonia solani* által okozott palántadőlés elleni védekező képességük (Wilhite et al., 1994; Howell és Stipanovic, 1995). A trichorzianinokról és a gliotoxinról kimutatták, hogy sejtfalbontó enzimekkel együtt alkalmazva szinergista módon gátolnak növénykórokozó gombákat (Lorito et al., 1996b). Ha azonban az antibiotikumok alkalmazása megelőzte az enzimek hozzáadását, alacsonyabb szintű szinergizmus volt megfigyelhető, ami arra enged

következtetni, hogy a sejtfal bontása segíti elő a membránkárosító antibiotikumok hozzáférését a célponthoz.

Érdekességképpen érdemes megemlíteni, hogy a *Trichoderma viride* általt termelt, gombák csírázását gátló viridin prekuzora a viridiol nevű vegyületnek, amely fitotoxikus hatású, olyannyira, hogy javasolták herbicidként való alkalmazását is (Howell, 1998). Ez egyrészt óvatosságra int a nagy mennyiségű viridint termelő törzsek használata esetén, másrészt indokoltá teszi a törzsnemesítést a viridiol termelő képesség csökkentésére.

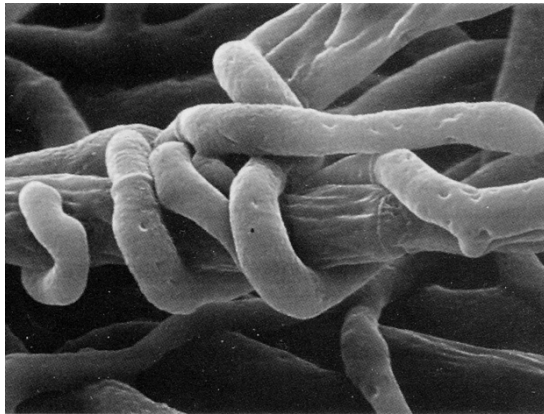
2.2.2. MIKOPARAZITIZMUS, SEJTFALBONTÓ ENZIMEK KÖZREMŰKÖDÉSÉVEL

2.2.2.1. A felismerési folyamat

A *Trichoderma* gombák képesek közvetlenül megtámadni és elpusztítani a gazdagombát. A *Trichoderma* által kifejtett mikoparazitizmus sejtszintű, biokémiai és molekuláris biológiai folyamatairól egyre több információ áll rendelkezésünkre. Az eseménysor pozitív kemotropizmussal indul, a *Trichoderma* micélium egy eddig még nem azonosított kémiai stimulus hatására atipikus módon elágazóan kezd nőni a célgomba irányába (Chet et al., 1998; Goldman et al., 1994b). Nem tisztázott, hogy ez a szignál gazdaspecifikus-e. Feltételezhető, hogy nem, és az elágazó növekedést egyszerű, kis molekulatömegű aminosavak, cukrok indukálják. A *Trichoderma* ezután megtapad áldozatán, folytatja növekedését a gazda micéliuma mentén majd hurkokat képezve rátekeredik, és a behatolást elősegítő apresszóriumszerű képleteket fejleszt (Goldman et al., 1994b) (1. ábra).

A megtapadás és a körültekeredés specifikus felismerési folyamat eredménye, amelyhez a specifitást molekuláris szinten lektin-szénhidrát kölcsönhatás biztosítja. A lektinek a sejtfelszínen elhelyezkedő, specifikus szénhidrátkötő képességű és ezzel összefüggésben agglutinációs képességű glikoproteinek, amelyek fontos szerepet játszanak a sejt és az extracelluláris tér közötti információcserében (Inbar és Chet, 1997). Inbar és Chet (1992) bizonyította először a lektinek közreműködését a mikoparazitizmusban. *Sclerotium rolfsii*-ből lektineket tisztítottak, amelyeket kovalensen kötöttek a gomba micéliumával megegyező átmérőjű műanyag szál felületére. Amikor a

*T. harzianum*ot ilyen műszálak jelenlétében növesztették, ugyanazokat a morfológiai változásokat tapasztalták, mint mikoparazitizmus során: a parazita atipikus elágazásokat fejlesztett a lektinnel bevont nylon szál irányába, megtapadt rajta, rátekeredett és appresszóriumszerű képleteket hozott létre (Inbar és Chet, 1992; Inbar és Chet, 1994). Benhamou és Chet (1993) kimutatta, hogy a *T. harzianum* és a *R. solani* közötti szoros megtapadás egy, a gazdagombából származó, galaktózban gazdag fibrilláris poliszacharid jellegű mátrixon keresztül történik. Feltételezhető, hogy a *Trichoderma* sejtfelszínén galaktózkötő receptorok, lektinek találhatóak.



1. ábra Elektron mikroszkópos felvétel a *T. harzianum* és a *Rhizoctonia solani* interakciójáról (Goldman et al. [1994b] munkájából átvéve). A parazita áldozata köré tekeredik, a gazda micéliumon jól láthatóak a turgorvesztésre utaló hosszanti befűződések.

A legújabb eredmények (Omero et al., 1999) azt sugallják, hogy a molekuláris jelet a felismerési reakció és az ezután bekövetkező morfológiai és egyéb biokémiai változások bekövetkezéséhez szükséges génexpresszióbeli változás között heterotrimer G proteinek közvetítik. Az említett proteinekről közismert, hogy központi szerepet töltenek be eukarióta sejtekben a transzmembrán receptorok által érzékelt jelátviteli folyamatokban (Bourne, 1997). A G proteinek pozitív módon szabályozzák az adenilát cikláz nevű enzimet, amely a ciklikus AMP (cAMP) szintézisét végzi és ezáltal kináz

kaszkád rendszeren keresztül transzkripciós faktorokat irányít. Két, egymástól független mechanizmus útján ható G protein aktiváló vegyület jelenlétében lektin kezelés nélkül is rátekeredett a *Trichoderma* a műszálra, sőt ugyanezt a hatást lehetett elérni külsőleg adott cAMP-vel is, illetve a cAMP bomlását katalizáló enzim gátlásával is (Omero et al., 1999). Eredményeik alapján a szerzők felállítottak egy egyszerűsített modellt arra, hogyan ismeri fel a *Trichoderma* molekuláris szinten a célgombát. A modell szerint a felismerési reakció, azaz a lektin-szénhidrát interakció egy transzmembrán receptoron keresztül heterotrimer G proteinek aktivál, amelyek az adenilát cikláz serkentése útján növelik a sejt cAMP szintjét, lehetővé téve a megfelelő transzkripciós faktorokat foszforilálás útján szabályozó kinázok működését. Az így létrejött génexpresszió változás (bizonyos gének „bekapcsolása”, mások „elhallgattatása”) lehetővé teszi a már leírt morfológiai változásokat, illetve a parazitizmus következő lépéséhez (a gazda sejtfalának bontásához) szükséges lítikus enzimek szintézisét (Omero et al., 1999).

2.2.2.2. Behatolás – sejtfalbontó enzimek csoportosítása

A felismerést, a megtapadást, majd a körültekeredést követi a mikoparazitizmus egy fontos lépése, a gazdasejtbe történő behatolás. Ennek érdekében a *Trichoderma* át kell jutnia a gazda sejtfalra, ezt pedig sejtfalbontó hidrolitikus enzimek termelésével és kiválasztásával éri el (Goldman et al., 1994b). Elad és munkatársai (1982) nagy mértékű kitináz, glükánáz és proteináz aktivitást mértek a tápoldatban, amikor *T. harzianum*ot tenyésztettek folyékony kultúrában, amelyben a célgomba sejtfal kivonata volt az egyetlen szénforrás. Talajban is kimutatták a megnövekedett enzimaktivitásokat, amikor a *Trichoderma* *R. solanum* illetve *Sclerotium rolfsii* parazitált.

A penetrációt kísérő sejtfal lízisről és citokémiai változásokról elektronmikroszkópos tanulmányok szolgáltatottak meggyőző bizonyítékokat. Ezek a kísérletek igazolták, hogy a behatolási hely közvetlen közelében megváltozik a gazdasejtfal struktúrája (Elad et al., 1983). Kitin mono- és oligomerek szabadulnak fel, és nemcsak a penetráció közvetlen közelében. Ez a jelenség már a fizikai kontaktus előtt is megfigyelhető volt és együtt járt a gazda sejtjeinek turgorvesztésével (Cherif és Benhamou, 1990), ami arra utal, hogy a sejtfalbontás a mikoparazitizmus egyik korai eseménye, és elősegíti a behatolást. A glükánázok behatolásban játszott hasonló

szerepéről a *Trichoderma-Pythium* kapcsolat tanulmányozása során találtak bizonyítékokat (Benhamou és Chet, 1997).

A növénykórokozó gombák többségében a sejtfal fő alkotóelemei a kitin, a zömmel β -1,3-, illetve β -1,6-glikozidos kötéseket tartalmazó glükánok, valamint fehérjék. Ez igaz a *Basidiomycetes*, az *Ascomycetes* és a *Deuteromycetes* osztályokba tartozó fonalas gombákra. A gombasejtfalban megtalálható kitin N-acetil-D-glükózamin egységekből álló nem elágazó polimer. Lebontását a kitináz enzimek végzik, amelyeket hasítási tulajdonságaik alapján β -N-acetil-hexózaminidázokra (EC 3.2.1.52), endokitinázokra (EC 3.2.1.14) és kitobiozidázokra osztanak (Lorito, 1998). A hexózaminidázok (korábbi elnevezésük glükózaminidázok [EC 3.2.1.30]) monomereket hasítanak le a kitin illetve kitin oligomerek nem-redukáló láncvégeiről, míg az endokitinázok véletlenszerűen hasítják a kitin polimert és oligomereket szabadítanak fel. Az enzimnevezéktan hivatalos kiadványa, az Enzyme Nomenclature nem ismer kitobiozidáz enzim típust, a kategória bevezetését Harman és munkatársai (1993) javasolták a celluláz rendszer analógiájára, amikor izoláltak és jellemeztek egy kitináz enzimet, amely kizárólag kitobióz egységeket hasított le a kitinszál nem-redukáló végéről.

A gombasejtfalat alkotó másik jelentős szénhidrát polimer az 1,3-glikozidos kötéseket tartalmazó β -glükán. Ennek lebontását a β -1,3-glükánáz enzimek végzik, amelyeket hasítási tulajdonságaik alapján két csoportba osztanak (Pitson et al., 1993). Az endo- β -1,3-glükánázok (EC 3.2.1.39) véletlenszerűen hasítják a láncot, oligomereket szabadítanak fel, míg az exo- β -1,3-glükánázok (EC 3.2.1.58) monomereket hasítanak le a láncvégről, hidrolízis termékük kizárólag glükóz.

2.2.2.3. A *Trichoderma* kitináz enzimrendszere

Egy adott *Trichoderma* törzs kitináz rendszere több, különböző méretű és specificitású enzimből áll. Haran és munkatársai (1995) a *T. harzianum* TM törzsében négy különböző méretű endokitinázt, és két eltérő méretű N-acetil-hexózaminidázt mutattak ki szénforrásként kitint tartalmazó táptalajon tenyésztett gomba sejtmentes összefehérje kivonatából. Számos kitináz enzimet tisztítottak és jellemeztek már különböző *Trichoderma* törzsekből. Biokémiai jellemzőik mellett megállapították, hogy *in vitro*

erős gombagátló hatással rendelkeznek a kitines sejtfalú tesztgombák széles skálája ellen (Lorito et al., 1993a; Lorito et al., 1994a; de la Cruz et al., 1992). A gátló hatást szinergista módon fejtik ki, ugyanis a gátláshoz szükséges koncentráció értékek jóval kisebbnek bizonyultak különböző specificitású kitinázok együttes alkalmazása esetén (Lorito et al., 1993a), illetve az önmagukban gátló hatást nem mutató enzimek együttesen alkalmazva jelentős mértékű gátlást okoztak (Lorito et al., 1994c). Amikor az alkalmazott enzimkombináció endokitinázt (CHIT42), kitobiozidázt (CHIT40), N-acetilhexózaminidázt (CHIT72) és egy β -1,3-glükánázt tartalmazott, a gátláshoz szükséges koncentráció érték ($ED_{50}=1,6 \mu\text{g/ml}$) összevethető volt egyes – kontrollként használt – szintetikus fungicidek hasonló értékeivel (Lorito, 1998). Ráadásul a kitináz enzimek nemcsak egymással, hanem más sejtfalbontó enzimekkel, sőt membránkárosító antibiotikumokkal és fungicidekkel együtt alkalmazva is szinergizmust mutattak (Lorito et al., 1994b; Lorito et al., 1996b). Érdekes még megjegyezni, hogy a *T. harzianum*-ból származó kitinázok hatékonyabban és jóval szélesebb spektrumban gátolták a növénykórokozó gombákat, mint akár növényi vagy baktérium eredetű hasonló enzimek (Lorito et al., 1993a). Az *in vitro* gombagátlási tesztekben a 42 kDa méretű endokitináz bizonyult a leghatékonyabbnak. A sejtfalbontó enzimekkel történt *in vitro* kezelés fénymikroszkóppal megfigyelhető morfológiai változásokat okozott a tesztgombákon. A kezelt micéliumon kitüremkedések voltak láthatók, erős vakuolizáció, abnormális elágazások és nekrozis volt megfigyelhető (Lorito et al., 1993a).

Érdekességgként érdemes megemlíteni, hogy a *Trichoderma* még nagy koncentrációban is igen ellenállóak saját kitinázaikkal szemben (Lorito et al., 1993a). Erre Lora és munkatársai (1994) adtak lehetséges magyarázatot, amikor izoláltak egy feltételezett sejtfalféhrjét (QID3), amelyről azt gondolják hogy specifikus kitináz inhibitorként hat. Ezt alátámasztja, hogy a fehérjét kódoló gént élesztőben kifejeztetve a transzformánsok fenotípusa éppen olyan volt, mint azoké a törzseké, amelyeket a kitináz inhibitor allózamidinnel kezeltek. A szerzők hipotézise szerint a QID3 fehérje jelenlétében olyan nagy kitináz koncentrációra van szükség a gátláshoz, ami *in vivo* nem fordul elő.

2.2.2.4. A kitinázok szabályozása

A *Trichoderma* kitináz enzimrendszere bonyolult, több tényezőtől függő szabályozás alatt áll, amelyben az egyes komponensek indukciója is eltérő. Általában serkenti termelésüket a táptalajba szénforrásként adott kitin (Haran et al., 1995). Inbar és Chet (1995), valamint Haran és munkatársai (1996b) bizonyították, hogy a kitinázok szabályozása összefüggésben van a gazda felismerésével is. A már említett műszálas kísérleti rendszert és a kitinázok gélből történő detektálását alkalmazva kimutatták, hogy a lektinnel kezelt szátra tekeredő *Trichoderma*-ban erősebben indukálódik a 102 kDa kitináz, mint a kontrollban, ahol a kezeletlen műszál mellett nőtt a gomba. Ebben a rendszerben egyáltalán nem volt jelen kitin, mégis különbséget tapasztaltak a kitinázrendszer egyik komponensének megnyilvánulásában. Más kísérleti eredmények (Haran et al., 1996b) megerősítették, hogy különböző gazdagombák ellen meghatározott kitináz „készlet” indukálódik, meghatározott sorrendben, és ezt a jelenséget cikloheximiddel, vagy a célgomba micéliumának előzetes autoklávozásával gátolni lehetett. Ez arra utal, hogy a specifikus kitináz indukcióhoz szükség van az élő gazda által szolgáltatott jelekre, és a parazita részéről *de novo* szintetizált fehérjékre. Érdekes, hogy akkor is tapasztaltak specifikus kitináz indukciót, amikor a célgomba egy, az *Oomycetes*-be tartozó, sejtfalában kitint nem tartalmazó gomba, a *Phytophthora citrophthora* volt (Inbar és Chet, 1997). Ez is megerősíti azt, hogy az egyes kitinázok termelésének szabályozása nem kizárólag a célgomba sejtfalának kitintartalmától függ.

Az utóbbi években rohamosan növekedett a kitinázokat kódoló génekről, genetikai szabályozásukról rendelkezésünkre álló információ mennyisége. Két endokitinázt, a 33 kDa és a 42 kDa méretű enzimet (CHIT33 és CHIT42), valamint a 72 kDa N-acetil-hexózaminidáz enzimet (CHIT72) kódoló géneket izolálták eddig mikoparazita *Trichoderma*-kból (Carsolio et al., 1994; Limón et al., 1995; Peterbauer et al., 1996). Könnyen hasznosítható szénforrások, mint például glükóz, szacharóz jelenléte esetén a gének transzkripciója gátolt, azaz katabolit represszió szabályozza őket. A legrészletesebben a 42 kDa endokitináz génjének szabályozása ismert. Bizonyították, hogy ez a gén erősen indukálódik *R. solanival* kialakult mikoparazita kapcsolat során (Carsolio et al., 1994). A promóter régió *in vitro* analízise során fény derült arra, hogy *B. cinerea*-val való parazita kölcsönhatás esetén egy specifikus DNS kötő fehérjekomplex

leszorítja a CRE1 katabolit represszort a promótorról és lehetővé teszi a gén átírását (Lorito et al., 1996a). Más szerzők eltérő megközelítést alkalmaztak (Mach et al., 1999; Zeilinger et al., 1999; Kullnig et al., 2000), amikor az endokitináz gén (*chit42=ech42*) és a hexóزامinidáz gén (*nag1=chit72*) promóterét különböző riportergénekkel fúzionáltatták és vizsgálták a két gén megnyilvánulását különböző körülmények esetén. A leglényegesebb konklúziók a következők voltak: (1) a 42 kDa endokitinázgén transzkripciója már a fizikai kontaktus előtt beindul, de ehhez makromolekulák (feltehetően enzimek) diffúziója szükséges; (2) a gént nem indukálják kitin oligomerek, viszont bizonyos stresszfaktorok igen; (3) ezzel ellentétben a hexóزامinidáz géne csak kontaktus után indukálódott, kitin oligomerek sőt a monomer is indukálta.

2.2.2.5. A kitinázok szerepe

Nem tisztázott, hogy a *Trichodermák* különböző biológiai folyamataiban pontosan mi a szerepük a kitinázoknak. Látva a kitinbontó rendszer komplexitását, nyilvánvaló, hogy az egyes komponenseknek különböző szerepük lehet a morfogenezisben, a parazitizmusban és a szaprofiton életmód során. Talán nem is célszerű élesen különválasztani ezeket a jelenségeket, hiszen például a gazdafelismerés morfológiai változásokat indukál, ami úgy tűnik, hogy előfeltétele a parazitizmus létrejöttének (Omero et al., 1999). Minthogy a *Trichodermák* sejtfa is jelentős arányban tartalmaz kitint, a morfológiai változásokhoz szükség van sejtfalhoz kötött kitinázok működésére is. Ezen a területen kevés a kísérletes bizonyíték, csak sejtécek vannak. A CHIT102 hexóزامinidázt csak intracellulárisan lehetett kimutatni (nem-induktív körülmények között is), ebből arra következtettek, hogy szerepe lehet a morfogenezisben (Haran et al., 1995). A CHIT33 szekvenciájában viszont nincsenek jelen azok a motívumok amelyek a sejtfalban lokalizált enzimekre jellemzőek, tehát feltételezhetően ez nem vesz részt a morfogenezisben (Limón et al., 1995).

A kitinázok erős gombagátló hatása, a kezelt gazdagombákon okozott morfológiai változások (Lorito et al., 1993a), valamint a penetrációt kísérő sejtfa lízis (Benhamou és Chet, 1993; Benhamou és Chet, 1997) arra utalnak, hogy ezek az enzimek fontos szerepet töltenek be a *Trichodermák* parazita életmódjában. Lényeges, tisztázásra váró kérdés azonban, hogy milyen mértékű a kitinázok szerepe a folyamatban, azaz

mennyire meghatározó egy törzs parazita képességében (és ezzel összefüggésben biológiai védekezésre való alkalmasságában) annak kitinázkészlete és indukciójának mértéke. Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása befolyásolhatja a törzsnemesítés irányát.

2.2.3.SZAPROFITON KOMPETÍCIÓ

A szaprofiton kompetíció, mint antagonista mechanizmus valójában közvetett hatás, amelynek során a limitáló tápelemekért (elsősorban a szénért, nitrogénért és vasért) folytatott harcban azok a mikroorganizmusok kerekednek felül, amelyek az adott elem(ek)ben gazdag szubsztrát hasznosítására hatékonyabb rendszert fejlesztettek ki. A mikroorganizmusoknak azt a képességét, hogy milyen hatékonyan kolonizálják a növény fejlődő gyökérrendszerét, rizoszféra kompetenciának nevezzük (Ahmad és Baker, 1987). A *Trichoderma* gombák gyors növekedési rátájuk, nagyarányú konídium képzésük, valamint széleskörű és hatékony szubsztrát hasznosító képességük révén kiszoríthatják a kórokozókat a rizoszférából és megakadályozhatják elszaporodásukat.

A kompetíciót nagyon nehéz elválasztani a korábban tárgyalt két mechanizmustól, szinergista kölcsönhatásban van mind az antibiózissal mind a parazitizmussal. Növényi betegségek elleni biológiai védekezésben betöltött szerepéről kevés kísérletes példa van mikoparazita gombák esetén. Dinnye és gyapot rizoszférájában végzett vizsgálatok során igazolták, hogy a *T. harzianum* T-35 törzse *Fusarium oxysporum* elleni antagonista hatásában jelentős szerepe van a szénért és nitrogénért folytatott kompetíciónak (Sivan és Chet, 1989), ugyanis a gátló hatás sokkal kisebb volt, amikor könnyen hasznosítható szén illetve nitrogén forrást, glükózt és aszparagint adtak a talajhoz. Uborka és szamóca *Sclerotinia* illetve *Botrytis* okozta betegségeinek a csökkentésében jelentős szerepe van annak, hogy a *Trichoderma* izolátumok gyorsan kolonizálják a szenescens növényi szöveteket (Harman és Björkman, 1998).

2.2.4.INDUKÁLT NÖVÉNYI REZISZTENCIA

Az indukált növényi rezisztencia azt jelenti, hogy a növények a kórokozó mikroorganizmusok jelenlétét érzékelve beindítják védekező rendszerüket. Az indukált

növényi rezisztencia biológiai védekezésben betöltött szerepe kevésbé tisztázott. Egyes szerzők szerint a *Trichoderma*, annak ellenére hogy nem növénykórokozó, aktiválhatja a növények védekező rendszerét és így rezisztenssé válhat a növény egy későbbi, patogén mikroba által okozott támadással szemben (Goldman et al., 1994b). Lotan és Fluhr (1990) igazolta, hogy a *T. viride* 22 kDa-os xilanáz enzime PR (**P**athogenesis **R**elated) fehérjék szintézisét, valamint egyéb védekező mechanizmusokat indukált dohány növényekben.

Más szerzők hidropóniás uborka állományban végzett vizsgálat során azt találták, hogy a *T. harzianum*mal kezelt növények fejlettebbek voltak, mint a kezeletlen kontroll növények (Yedidia et al., 1999). A gomba micéliuma behatolt az epidermiszbe és a kéreg külső részébe, s ezekben a rétegekben a gyökérsejtek fala megvastagodott, újonnan képződött fizikai gátak (kallóz, cellulóz) rakódtak le nemcsak a penetráció helyén, hanem távolabb is. Ezen felül, emelkedett a kitináz és a peroxidáz aktivitás a gyökérben és a levelekben, tehát szisztémikus módon rezisztencia mechanizmusokat indukált a gomba.

Egy érdekes lehetséges mechanizmusra hívták fel a figyelmet Zimand és munkatársai (1996), amikor kimutatták, hogy a *T. harzianum* oly módon mérsékelte a *B. cinerea* által okozott betegséget a bab levelein, hogy gátolta a patogén pektinbontó enzimeit. A szerzők szerint ennek eredményeképpen oligogalakturonidok halmozódhattak fel, amelyek védekezést indukáló elicitoroként hatottak.

2.3. Törzsnemesítési törekvések a biológiai védekezés fokozására

A bevezetésben már említettem, hogy a gyakorlati mezőgazdaságban ma a kémiai növényvédelem van jelentős túlsúlyban, alig használnak biológiai védekezésre alkalmas mikroorganizmusokat. A szélesebb körű alkalmazás fő korlátja az, hogy nem elég hatékonyak a mikrobák, és teljesítményük sokkal jobban ingadozik egyes környezeti tényezőktől függően, mint a szintetikus peszticideké. Az alábbiakban felvázolom azokat az eddigi törekvéseket, amelyek célja a biológiai növényvédelem hatékonyságának növelése volt. Erre a célra különböző megközelítési módokat alkalmaztak: a természetes

szelekciót, a mutagenézist, a protoplasztfúziót és a transzgénikus organizmusok létrehozását.

2.3.1.MUTAGENEZIS

Ahmad és Baker (1987) kémiai mutagenézis útján a *T. harzianum* egyik törzséből olyan benomil rezisztens mutánsokat állítottak elő, amelyek nemcsak fungicid rezisztenciában tértek el a vad típusú törzstől, hanem jelentősen megnőtt a rizoszféra kompetenciájuk. Több próbálkozás történt már antagonistá *Trichoderma* antibiotikum termelésének mutagenézissel való befolyásolására, amelyek azonban nem jártak átütő sikerrel. Graeme-Cook és Faull (1991) UV kezelést követően izoláltak *T. harzianum* mutánsokat, amelyeknek megnőtt az antibiotikum termelésük. Ezek között találtak olyat, amely hatékonyabban gátolta a *Fusarium oxysporum* csírázását, mint a szülői törzs, viszont nem javult e mutánsok kolonizáló képessége, sőt általában a nagyobb antibiotikum termelés csökkent kolonizációs képességgel járt együtt. Más szerzők olyan törzset állítottak elő, amelyek elveszítették a fitotoxikus viridiol termelésének képességét, viszont megőrizték a *R. solani* okozta palántadőlés elleni kedvező hatásukat (hivatkozás [Howell, 1998]-ban).

2.3.2.PROTOPLASZTFÚZIÓ

Két *T. harzianum* törzsből protoplasztfúzióval előállított utódok között izoláltak egy olyan törzset, amelynek a rizoszféra kolonizációs képessége jelentős mértékben megnőtt a szülői törzsekéhez képest (Sivan és Harman, 1991). Később előállítottak és kereskedelmi forgalomba hoztak egy biológiai készítményt, amely ezt a törzset tartalmazza hatóanyagként (Harman és Björkman, 1998).

2.3.3.TRANSZGÉNIKUS MIKROORGANIZMUSOK LÉTREHOZÁSA

Tekintettel a sejtfalbontó enzimek erős gombagátló hatására, számos próbálkozás történt az ezeket kódoló gének felhasználására a molekuláris biológiai módszerekkel történő törzsnemesítésben. Az első munkák még baktérium eredetű génekkel történő beavatkozásról szóltak, mivel ezeket klónozták előbb. Az elmúlt néhány évben szaporodott azoknak a munkáknak a száma, amelyekben fonalas gomba eredetű

hidrolázok génjeit juttatják be különböző konstrukciókban a kiválasztott recipiensbe. A transzformáló konstrukció készítésekor alapvetően két megközelítési módot alkalmaztak: a transzgének (1) konstitutív promóterekkel, illetve (2) indukálható promóterekkel való szabályozását. Az előbbi előnye lehet, hogy a patogénnel való találkozás esetén hamarabb jelenik meg, illetve már eleve jelen van egy erős enzimaktivitás, az utóbbi esetben viszont csak szükség esetén, indukció következtében használja a sejt enzimtermelésre az energiáit (Goldman et al., 1994b). Differenciál hibridizációs technikát alkalmazva jellemeztek olyan *Trichoderma* géneket, amelyek erős konstitutív expressziót mutatnak (Goldman et al., 1994a), és olyanokat, amelyek erősen indukálódtak a célgomba sejtfalán mint egyetlen szénforráson (Vasseur et al., 1995), azzal a céllal, hogy a törzsnemesítésben használható promótereket izoláljanak. Ezeknek a promótereknek a tényleges kipróbálására azonban nem került sor.

Haran és munkatársai (1993) a *Serratia marcescens* baktérium kitinázgénjét (*chiA*) építették a *T. harzianum* T35 törzs genomjába a 35S konstitutív promóter szabályozása alatt azt remélve, hogy a patogénnel való találkozás esetén hamarabb jelentkezik nagyfokú kitinázaktivitás, s így hatékonyabbá válik a *Trichoderma* támadása. Azt tapasztalták azonban, hogy glükózt tartalmazó tápoldatban valóban megnőtt ugyan a transzformánsok kitinázaktivitása, viszont kitin-indukció esetén a vad típusénál is kisebb volt a transzformánsok aktivitása. E csökkenés egyik lehetséges magyarázata a transzformáló konstrukció véletlenszerű beépülése a *Trichoderma* genom olyan régiójába, amely lényeges az induktív kitinázaktivitás kialakításában.

Szintén a *Trichodermák* enzimaktivitásának konstitutív növelését célozták azok a kísérletek, amelyekben a *T. longibrachiatum egl1* génjét, illetve a *T. harzianum chit33* génjét építették be a recipiens törzsek genomjába (Migheli et al., 1998; Limón et al., 1999). Az előbbi egy endo- β -1,4-glükánázt kódol, az utóbbi a 33 kDa endokitinázt kódolja. A glükánáz-transzformánsok uborkán végzett üvegházi kísérletekben hatékonyabbak voltak a *Pythium* okozta palántadőlés ellen, mint a vad típusú törzs, a kitináz-transzformánsok pedig megnövekedett mértékű gátló hatást fejtettek ki *R. solani* ellen *in vitro* körülmények között.

Margolles-Clark és munkatársai (1996b) indukálható promótert alkalmaztak a kísérleteik során. Készítettek egy plazmidkonstrukciót, amelyben a *T. harzianum* 42 kDa

endokitinázt kódoló génjét a *T. reesei* cellobiohidroláz (*cbh1*) gén igen erős promotere szabályozta. Az ezzel a génkonstrukcióval transzformált *T. harzianum* törzsek között olyanokat is izoláltak, amelyek celluláz indukáló körülmények között a vad típusú törzs endokitináz termelésének a tízszeresét mutatták.

A *T. harzianum prb1* génje egy bázikus proteinázt kódol, amelyet szintén összefüggésbe hoztak a gomba mikoparazita aktivitásával (Geremia et al., 1993). A *prb1* gén kópiaszámának növelésével, saját szabályozó elemeivel együtt, létrehoztak transzformáns törzseket, amelyek proteináz termelése jelentősen megnőtt (Flores et al., 1997). A törzsek közül néhány során sokkal aktívabbnak bizonyult üvegházi tesztek során a *R. solani* okozta palántadőlés csökkentésében, mint a vad típusú recipiens. Érdekes módon nem a legjobb proteináz termelők nyújtották a legnagyobb védekezést, ami azzal magyarázható hogy bizonyos aktivitás felett a *prb1* terméke a mikoparazitizmusban fontos egyéb fehérjéket is elbont (Flores et al., 1997).

2.3.4. TRANSZGÉNIKUS NÖVÉNYEK LÉTREHOZÁSA

A biológiai védekezésre alkalmas törzsek felhasználásának új irányzata az, amikor nem magukat a mikroorganizmusokat manipulálják és juttatják ki, hanem izolálják a biológiai aktivitásukért felelős géneket és azokat építik be a növényi genomba. Ennek számos előnye lehet. A legfontosabb előny az, hogy a folyamatosan változó környezeti tényezők kevésbé befolyásolják a védekezés hatékonyságát, mint a mikroorganizmusok közvetlen kijuttatása esetén. Ezen felül nem tisztázott, hogy a genetikailag módosított mikroorganizmusok szabadföldi használatának milyen ökológiai kockázata van és emiatt nem valószínű, hogy a közeljövőben engedélyeznék transzgenikus mikrobák használatát.

Nemcsak a kórokozók természetes ellenségei képesek a kitináztermelésre, hanem maguk a növények is a patogén támadása esetén komplex védekező válaszuk részeként úgynevezett PR proteineket, köztük kitinázokat, glükánázokat termelnek (Stintzi et al., 1993). A növényi eredetű enzimek azonban jóval kevésbé hatékonyak gombák ellen és jóval szűkebb a hatásspektrumuk, mint például a *T. harzianum* hidrolázainak (Lorito et al., 1993a). A közelmúltban történtek kísérletek növényi, illetve baktérium eredetű kitinázgéneket hordozó transzgenikus növények létrehozására a kórokozó gombák elleni rezisztencia növelése érdekében (Schickler és Chet, 1997). Ezek nem hoztak átütő sikert

a rezisztencia nemesítésben, bizonyos kórokozókkal szemben mérsékelt szinten emelkedett a rezisztencia, másokkal szemben viszont nem tapasztaltak javulást. Amikor viszont a *T. harzianum* 42 kDa méretű endokitinázát kódoló gént vitték be növényekbe (dohányba és burgonyába), lényeges ellenállóképesség javulást értek el mindkét növény esetében az összes tesztelt kórokozó gomba ellen (Lorito et al., 1998).

2.3.5. HETEROLÓG GAZDÁBAN KIFEJEZTETT GÉNTERMÉK HASZNÁLATA

Mivel a tisztított sejtfalbontó enzimeknek gombagátló hatásuk van, felmerülhet maguknak a géntermékeknek a használata. Ennek a megközelítési módnak az az előnye, hogy teljesen kiküszöböli az ökológiai kockázatot, és valószínűleg a legkövetkezetesebb eredményt ígéri. Ebben az esetben azonban olyan nagy mennyiségű tisztított géntermékre van szükség, amelyet nyilvánvalóan nem nyerhetünk gazdaságosan a termelő organizmusból, ezért történtek próbálkozások heterológ expressziós gazdáiban való kifejeztetésükre és tisztításukra. Jelenleg azonban még nem állnak rendelkezésre a megfelelően hatékony expressziós rendszerek.

Margolles-Clark és munkatársai (1996a) a *T. harzianum* 42 kDa endokitináz génjét fejeztették ki *T. reesei*-ben az előző fejezetben már ismertetett konstrukcióban (a *cbh1* gén promóterével szabályozva, lásd 2.3.3. fejezet). A legjobban termelő transzformáns extracelluláris enzimtermelése rázatott kultúrában, indukáló körülmények között elérte a 130 mg/liter szintet. Ez endokitinázaktivitásra lefordítva mintegy hússzorosa annak, mint ami a vad típusú *T. harzianum*-ban mérhető.

2.4. A *Coniothyrium minitans* mikoparazita biológiájáról

2.4.1. A *C. MINITANS*, MINT BIOLÓGIAI VÉDEKEZŐ ÁGENS

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fajokon kívül más gombákról is kiderült, hogy alkalmasak a biológiai növényvédelemben való használatra, mert antagonisták hatásuk van növénykórokozó gombákkal szemben (Vajna, 1987). Az egyik ilyen ígéretes mikroorganizmus a *Coniothyrium minitans*. Világszerte elterjedt talajlakó gombáról van szó, amely képes megtámadni és közvetlen mikoparazitizmus útján elpusztítani egyes

gombák rendkívül ellenálló kitartóképleteit, a szkleróciumokat (Whipps és Gerlagh, 1992). Ellentétben a *Trichodermákkal*, ennek a mikoparazitának szűk a gazdaköre, eddig mindössze három szklerócium képző fajról izolálták, (Whipps és Gerlagh, 1992), közülük is leggyakrabban a *Sclerotinia sclerotiorum* szkleróciumairól. Emellett gazdájának tekinthető a *Sclerotinia trifoliorum* és a *Sclerotium cepivorum*. Laboratóriumban ezen felül képes volt megfertőzni néhány egyéb, az Ascomycetes illetve a Deuteromycetes osztályba tartozó szklerócium képző fajt, közöttük a *Sclerotinia minort*. Ezekről a gombákról még nem izolálták a természetben a *C. minitans*-t.

A *C. minitans* fő gazdájának tekinthető kórokozó, a *S. sclerotiorum* növénykórtani jelentőségét jól illusztrálják az alábbi adatok (Purdy, 1979). Több, mint hatvan különböző névvel illetett növénybetegség utal e gomba által okozott fertőzésre, az egyik legkevésbé specifikus, polifág növénykórokozó: 64 növény család 225 nemzetségében 361 faj a gazdája. A gomba képes talajeredetű fertőzés kiváltására is, de a széllel terjedő askospórái révén a növények talaj feletti részeit is képes közvetlenül megtámadni. Mindkét esetben a fertőző inokulum forrása a rendkívül ellenálló kitartó képlet, a szklerócium, ami ellen rendkívül nehéz, illetve költséges kémiai módszerekkel védekezni. A szkleróciumok a talajban kedvező körülmények esetén csírázhatnak micéliumot képezve, amely a talajeredetű fertőzés forrása, vagy apotéciumot képezve, amelyekben kialakulnak a levegő eredetű fertőzésre alkalmas askospórák. A *S. sclerotiorum* által okozott termésvesztés lokálisan a 100%-ot is elérheti, éves szinten dollármilliókban mérhető a gomba által okozott mennyiségi és minőségi kár (Purdy, 1979).

A *C. minitans* mikoparazita gombát számos esetben alkalmazták már igen jó eredménnyel különböző szántóföldi és kertészeti kultúrákban *Sclerotinia* fajok okozta betegségek visszaszorítására (Huang 1980; Trutmann et al., 1982; Budge és Whipps, 1991; McQuilken et al., 1995). A kereskedelemben Contans, illetve KONI néven két készítmény kapható, amelyek hatóanyagként ezt a gombát tartalmazzák. Különösen figyelemre méltóak Huang (1980) három éves kísérlet során kapott eredményei, amelyek szerint a *C. minitans* sokkal hatékonyabban gátolta a *S. sclerotiorum* által okozott betegséget napraforgóban, mint két másik mikoparazita gomba, köztük egy *Trichoderma* izolátum. A szerző azt is megállapította, hogy a parazita alkalmazása esetén a növények

primér fertőzése jelentősen csökkent, mivel a fertőző inokulumokat pusztította el a *C. minitans*, a növények másodlagos fertőződésére, azaz a növénykórokozó növényről növényre terjedésére viszont nem volt hatással a hiperparazita. Ezzel összhangban más szerzők is megállapították, amikor tíz különböző szklerócium parazita gomba hatékonyságát hasonlították össze, hogy a *C. minitans* számos *Trichoderma* fajt megelőzve nagyobb mértékben fertőzte a *S. sclerotium* szkleróciumait és hatékonyabban csökkentette életképességüket (Whipps és Budge, 1990).

Egy hét éven át végzett szántóföldi kísérletsorozatban (Gerlagh et al., 1999) ugyancsak az derült ki, hogy a *C. minitans* jóval hatékonyabban csökkentette a talajban a szkleróciumok számát és ezzel összefüggésben mérsékelte a termésvesztést, mint az egyébként eredetileg szintén fertőzött szkleróciumokról izolált *Trichoderma* törzsek. Még két évvel az utolsó alkalmazást követően is jóval kevesebb szklerócium volt a *C. minitans* kezelt parcellákban (azokon a területeken is, ahol a vetésforgóban *Sclerotinia* fertőzésre rendkívül fogékony növényeket alkalmaztak), mint a kontroll területeken. Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a *C. minitans* specializálódott mikoparazita, amely áldozatát, és az általa okozott növénybetegséget jóval hatékonyabban képes gátolni, mint például a szklerócium parazitizmusra szintén képes, ám kevésbé specializálódott mikoparaziták, köztük a *Trichoderma* fajok.

2.4.2. A SZKLERÓCIUM PARAZITIZMUS BIOLÓGIÁJA

A *C. minitans* elsősorban szklerócium parazitának tekinthető, micélium kölcsönhatások révén is képes azonban gátolni áldozatát (Whipps és Gerlagh, 1992). A hifa kölcsönhatás háttéréről fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok szolgáltatnak részleteket (Trutmann et al., 1982; Tu, 1984; Huang és Kokko, 1988). Mind a *Coniothyrium* fő hifája, mind az oldalelágazások kezdeményezhetik a fertőzést. Arról vita van az irodalomban, hogy a célgombába való behatolás során fejleszt-e appresszóriumot a parazita (Whipps és Gerlagh, 1992). Mindenesetre a behatolás után intracellulárisan növekszik az áldozat sejtjeiben, melyek granulálódnak, vakuolizálódnak és végül nekrotizálódnak. A fertőzés későbbi szakaszában egy nyálkás réteg képződik a megtámadott micélium felületén, amelyen a parazita jól szaporodik.

A szklerócium parazitizmus biológiájáról szintén meglehetősen korlátozott mennyiségű információ áll a rendelkezésünkre. Fény- és elektronmikroszkópos tanulmányok ebben az esetben is bepillantást engedtek a folyamat néhány részletébe (Tu, 1984; Huang és Kokko, 1987; Whipps és Budge, 1990), ugyanakkor csakúgy mint a micélium parazitizmus esetén, semmi adat sincs a jelenség molekuláris szintű háttéréről. A szklerócium parazitizmus kiindulhat a csírázó konídiumból, illetve micélium is lehet fertőző inokulum (Whipps és Gerlagh, 1992). A parazitizmus során a *C. minitans* áthatol a szklerócium külső pigmentált rétegén, az úgynevezett karima sejteken. Ezt követően a parazita folytatja a növekedést a belső, nem pigmentált, kéreg- és velőrétegekben mind inter-, mind intracellulárisan. A behatolás részben fizikai nyomás, részben pedig a karima sejtek falának enzimatis lebonthatásának az eredménye. Philips és Price (1983) szerint kizárólag az előbbinek tulajdonítható a sejtfa átörése, míg Huang és Kokko (1987) elektronmikroszkóp segítségével igazolta, hogy sejtfa bontás is szerepet játszik a parazita behatolásában.

Annak ellenére, hogy a *C. minitans* extracelluláris sejtfa bontó enzimeinek minden bizonnyal fontos szerepük van a parazitizmusban, alig van adat a gomba sejtfa bontó hidroláz rendszeréről, amely pedig valószínűleg igen hatékony komponensekből állhat, mivel képessé teszi a parazitát arra, hogy át tudjon hatolni a rendkívül „kemény”, merev, ellenálló szklerócium rétegeken. A *S. sclerotiorum* szkleróciumainak külső rétegét alkotó sejtek falának fő összetevői melanin, β -glükán és kitin (Jones, 1970). A belső rétegekben, valamint a micéliumban hiányzik a melanin, itt a zömmel 1,3-glikozidos kötések, helyenként 1,6-irányú elágazásokat tartalmazó β -glükán a legnagyobb arányú alkotóelem, illetve kitin szálakat is azonosítottak minden sejtfa típus falában. Jones és munkatársai (1974) igazolták, hogy a *C. minitans* termel egy endo- és egy exoglükánázt, amelyek szinergista módon képesek a szkleróciumból tisztított sejtfa bontására. Semmilyen adat nincs viszont a glükánázok fiziko-kémiai tulajdonságairól, indukálhatóságukról, genetikai háttérükről. Egyáltalán nincs információ a hiperparazita kitinázrendszeréről, amely feltehetően szintén fontos szerepet játszik a sejtfa bontásban, és így a parazita hatékonyságának kialakításában.

A szklerócium parazitizmus késői szakaszában a belső rétegek sejtjeiben plazmolízis és vakuolizáció figyelhető meg (Whipps és Gerlagh, 1992). A külső

pigmentált réteg sejtjei viszonylag épek maradnak, a sejtfallízis is jóval kisebb mértékű (Huang és Kokko, 1987), amit a szerzők a melanin enzimgátló hatásával magyaráznak. A parazitizmus végén a *C. minitans* piknídiumot képez a fertőzött szkleróciumban és a felületén. Maga a szkleróciium végső soron elpusztul, csírázástelenné válik.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Gombatorzsek származása, fenntartása, tenyésztése

A *T. hamatum* Tam-61, a *C. minitans* Cm-2, a *S. sclerotiorum* Sc-1, és a *R. solani* Rs-2 gombatorzsek a MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének törzsgyűjteményéből származtak. A *C. minitans* izolátum kivételével minden gombát burgonya glükóz agar (BGA) táptalajon tartottunk fenn 4 °C-on, paraffin olaj alatt.

A *T. hamatum* Tam-61 törzsének rázatott tenyésztését Vogel féle mikroelem oldattal kiegészített Czapek féle minimál tápoldatban (3,0 g/l NaNO₃; 1,0 g/l KH₂PO₄; 0,5 g/l KCl; 0,5 g/l MgSO₄×7H₂O) (MM) végeztük. Inokulumként BGA csészékről steril desztillált vízzel lemosott konídium szuszpenziót használtunk 10⁶/ml végkoncentrációban. Az MM tápoldat szénforrásként glükózt (20 g/l), vagy *R. solani*ból Geremia és munkatársai (1993) módszerével kivont sejtfalat (1 g/l), vagy kolloid kitint (10 g/l) tartalmazott. A ráztatás 25-28 °C-on, 180 rpm fordulatszámmal történt.

A *C. minitans* Cm-2 törzs fenntartását annak érdekében, hogy kizárjuk a biológiai aktivitásának elvesztését a sorozatos laboratóriumi átoltasok következtében, az alábbi módon oldottuk meg. A Cm-2 konídium szuszpenziójával fertőztük a *S. sclerotiorum* BGA csészén képzett szkleróciumait. Tizennégy-tizennyolc nappal a fertőzés után, amikor a parazita konídiumait tartalmazó fekete cseppek megjelentek a szklerócium felszínén, a fertőzött szkleróciumokat BG-t tartalmazó ferde agar csövekre helyeztük egyenként, és 4 °C-on tároltuk. Konídium termelésre a fertőzött szkleróciumból készített szuszpenzióval oltottunk zabliszt agar csészéket. A zabliszt agar csészékről 12-14 nap után lemosott konídiummal szintetikus tápoldatot (SM) inokuláltunk 10⁶/ml koncentrációban, amely az alábbiakat tartalmazta (g/l): NaNO₃, 3,0; KH₂PO₄, 1,0; KCl, 0,5; MgSO₄×7H₂O, 0,5; pepton, 1,0; FeSO₄×7H₂O, 0,01; ZnSO₄×7H₂O, 0,003; CoCl₂×6H₂O, 0,003. Az SM tápoldatot szénforrásként glükózzal (20 g/l), vagy liofilizált, porrá őrölt szkleróciummal (5 g/l), vagy *S. sclerotiorum* szkleróciumaiból készített sejtfalkivonattal egészítettük ki (2 g/l). A ráztatást 22-25 °C-on 180 rpm fordulaton végeztük. A sejtfalkivonást Jones (1970) módszere alapján végeztük kisebb módosítással. *S. sclerotiorum* liofilizált, porrá őrölt szkleróciumait desztillált vízben

szuszpendáltuk (0,2 g/ml), majd centrifugáltuk 10 percig 16.000 g értéken. Ezt a folyamatot addig ismételtük amíg a felülúszóban a Bradford módszerrel (Bradford, 1976) már nem tudtunk fehérjét kimutatni. Ezután a szuszpenziót kétszer 5 perces ultrahangos feltárásnak vetettük alá VirSonic 300 (Virtis) berendezést használva. Ezt követően kétszer megismételtük a fent leírt desztillált vizes extrakciót és centrifugálást, majd a végső centrifugálás után a pellet felső harmadát, amelyet egy fekete, homogén, gélszerű anyag alkotott, liofilizáltuk és porrá őrölve tároltuk.

3.2. *T. hamatum* génkönyvtár készítése és a *Tham-ch* gén izolálása

A genomi DNS-t Fekete és munkatársai (1995) alapján vontuk ki a *T. hamatum* Tam-61 törzsből, amelyet folyékony BG tápoldatban két napig növesztettünk. A *Sau3AI*-el részlegesen emésztett DNS-t ultracentrifugálással frakcionáltuk Sambrook és munkatársai (1989) szerint, majd a 12-23 kb nagyságú fragmentumokat λ DASH II bakteriofág vektorba (Stratagene) ligáltuk a gyártó utasításait követve. A könyvtár amplifikálását, valamint próbázását plakk hibridizációval szintén a gyártó instrukciói szerint hajtottuk végre. A próba DNS radioaktív jelölését random priming módszerrel (Sambrook et al., 1989) végeztük. A fág DNS tisztítást, térképezést, valamint a kitinázgént (*Tham-ch*) tartalmazó fragmentum Bluescript KS (Stratagene) plazmid vektorba klónozását szintén hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel végeztük (Sambrook et al., 1989).

3.3. Szekvenca analízis

A plazmidba klónozott kitinázgén nukleotidsorrendjét didezoxi-láncterminációs módszerrel, a Sequenase, Version 2.0 szekvenáló kit (USB) segítségével határoztuk meg. A szekvenáláshoz plazmid-specifikus, kereskedelemben kapható primereket, valamint általunk szintetizáltatott kitinázgén-specifikus primereket is használtunk. A szekvenca összehasonlításokat és egyéb elemzéseket a GCG programcsomaggal, valamint a BLAST módszerrel végeztük (Devereux et al., 1984; Altschul et al., 1990). A *T. hamatum*ból klónozott kitinázgén (*Tham-ch*) szekvenciáját elhelyeztük szekvenca

adatbázisokban (EMBL, GenBank, DDJB), ahol az U88560 azonosító számmal érhető el.

3.4. A *T. hamatum* Tam-61 transzformálása

A kitinázgént tartalmazó plazmid 3,5 kb nagyságú *KpnI-XhoI* fragmentumát ligáltuk a pCSN43 vektorba (Staben et al., 1989), amely higromicin rezisztenciát hordoz és elterjedten használják fonalas gombák transzformálására. Az így létrehozott transzformáló plazmidot pECTR1-nek neveztük el. A *T. hamatum* Tam-61 törzsét YPD tápoldatban (5 g/l élesztőkivonattal, 5 g/l peptonnal és 5 g/l glükózzal kiegészített Czapek tápoldat) 22 óráig rázatva inkubáltuk (26 °C, 180 rpm, 5×10^5 konídium/ml kiindulási inokulum) A képződött fiatal micéliumból Ulhoa és munkatársai (1992) szerint protoplasztokat izoláltunk, amelyeket polietilén-glikol (PEG) és Ca^{2+} ionok jelenlétében a Herrera-Estrella és munkatársai (1990) által leírt módszerrel transzformáltuk a pECTR1 plazmiddal. A transzformánsok szelekcióját 200 µg/ml higromicint tartalmazó YPD táptalajon végeztük. A higromicin rezisztens telepeket monospóráztuk 0,1% Triton-X 100-at tartalmazó BGA táptalajon. A genetikailag ily módon homogenizált törzsek stabilitását ötszöri nem-szelektív BGA csészén történt átoltás után higromicint tartalmazó csészékre való visszahelyezéssel ellenőriztük.

3.5. A transzformánsok kitinázaktivitásának mérése

A transzformáns törzsek és a vad típusú recipiens konídium szuszpenziójával 25 ml MM tápoldatot oltottunk be (10^6 /ml), amelyben a szénforrás 20 g/l glükóz volt. Két nap rázatott inkubálás (28 °C, 180 rpm) után a micéliumot steril körülmények között leszűrtük, desztillált vízzel mostuk, majd átoltottuk szénforrásként kizárólag kolloid kitint (10 g/l) tartalmazó MM tápoldatba. További két nap rázatott tenyésztés után meghatároztuk a tenyészetszűrletek kitinázaktivitását 4-metilumbelliferil- β -D-N,N',N''-triacetil kitotrióz (4-MUFChT) (Sigma) fluorogén szubsztrát segítségével. A reakció elegy (200 µl) tartalmazott:

- 125 µl sterilre szűrt felülúszót
- 75 µl 0,4 mM 4-MUFChT-t 133 mM foszfát pufferben (pH=5,2) oldva.

Tíz perc inkubálás (37 °C) után a reakciót 1,8 ml 0,2 M Na₂CO₃ hozzáadásával állítottuk le, majd Kontron SFM 25 fluoriméterben mértük a minták fluoreszcenciáját (gerjesztési hullámhossz: 350 nm, emittálási hullámhossz: 440 nm). A tenyésztésűrletek fehérje koncentrációját a Bradford módszerrel (Bradford, 1976) mértük. A kitinázaktivitasokat egységnyi fehérjére vonatkoztatott specifikus aktivitásban (pmol felszabadított 4-MUFChT/perc/μg fehérje) fejeztük ki.

3.6. A transzformáló plazmid beépülésének igazolása

Tíz véletlenszerűen kiválasztott, monospórázott transzformánsból és a vad típusú recipiens törzsből genomi DNS-t tisztítottunk (Fekete et al., 1995). A DNS mintákat különböző restrikciós endonukleázokkal emésztettük, 0,7 %-os agaróz gélben elektroforézissel elválasztottuk, nylon membránra (Amersham) rögzítettük, majd Southern hibridizációt hajtottunk végre Sambrook és munkatársai (1989) alapján, melyhez a próba DNS-t random priming módszerrel jelöltük. A nem-specifikus jelek eltávolítása érdekében szigorú mosási körülményeket alkalmaztunk: 3×15 percig mostuk a membránt 0,1% SDS-t és 0,1×SSC-t tartalmazó pufferben 65 °C-on. (1×SSC: 150 mM nátrium-klorid, 15 mM tri-nátriumcitrát)

3.7. A *Tham-ch* gén expressziójának vizsgálata

A gombatörzseket glükózon történt előtenyésztés után (lásd 3.5. fejezet) átoltottuk MM tápoldatba, amely egyedüli szénforrásként 0,1% *R. solaniból* kivont sejtfalat tartalmazott. További két nap tenyésztés után a leszűrt micéliumból Stiekema és munkatársai (1988) által leírt módszerrel össz RNS-t tisztítottunk, az RNS mintákat formaldehidet tartalmazó denaturáló gélben (1% agaróz) elválasztottuk (Sambrook et al., 1989) és Northern hibridizációt hajtottunk végre radioaktívan jelölt *Tham-ch* génnel.

3.8. Konfrontációs teszt Petri csészében

A vad típusú szülő törzset, valamint a T2, a T8, vagy a T9 transzformáns törzseket 0,2% glükózt tartalmazó MM csészék szélére oltottuk. Az inokulum 3-4 napos BGA csészéken növő telepek széléről 5 mm-es dugófúróval vett micélium volt. A *Trichoderma*val

szemben, az inokulumból 6 cm távolságban a *S. sclerotiorum* Sc-1, vagy a *R. solani* Rs-2 szintén BGA-ról származó telepét helyeztük. A csészéket 26 °C-on inkubáltuk. A két gomba összenövése után a parazita micéliuma tovább növekedett, míg áldozata növekedése megállt. A *Trichoderma* micélium frontja a *Sclerotinia*, illetve a *Rhizoctonia* micéliumban jól látható volt. Az átnövés sebességét vonalzóval mértük és naponta feljegyeztük. A kísérletet kétszer végeztük el, mindkét alkalommal három ismétlést alkalmazva minden párosításra.

3.9. Kitináz és β -1,3-glükánáz génszakaszok izolálása *C. minitans*ből PCR-rel

Az Oligo 4.0 program segítségével két degenerált oligonukleotid primer párt terveztünk és szintetizáltattunk fonalas gombákból származó kitináz, illetve β -1,3-glükánáz enzimek szekvenciáinak összehasonlítása során azonosított konzervatív régiók alapján. A kitináz specifikus primer pár (CP1 és CP2) illetve a glükánáz specifikus primer pár (GP1 és GP2) szekvenciái:

CP1: 5'-AA(G/A)GT(C/T/G)(A/C/T)TNCTNTCN(C/A/T)TNGG(C/T/A)GG-3'

CP2: 5'-TC(A/G/C)(C/A)(T/A)(G/A)TC(G/A)AN(G/A)TC(G/A)AN(G/C/A)CC(A/G)TC-3'

GP1: 5'-AA(A/G)GGNGA(C/T)GGNGTNACNGA(C/T)GA-3'

GP2: 5'-TG(A/G)(A/T)A(A/G)TANGGNGT(C/T)TCNGT(C/T)TG -3'

A *C. minitans* Cm-2 törzsét 12 napig tenyésztettük SM tápoldatban (24 °C, 180 rpm), amely *S. sclerotiorum* szkleróciumaiból kivont sejtfallal (0,2%) volt kiegészítve. A micéliumból össz RNS-t izoláltunk (Stiekema et al., 1988), és 10 μ g-ot használtunk első szál cDNS szintézishez (Sambrook et al., 1989). Az első szál cDNS-t templátként alkalmaztuk PCR reakciókban a GP1 és GP2 primerekkel együtt az alábbi paraméterekkel: 1 μ l első szál cDNS, 0,5 μ M koncentrációban a degenerált primerek, 1,5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTP, 1 U Taq polimeráz (Promega), 50 μ l végtérfogatban. Az amplifikálást Perkin Elmer DNA Thermal Cycler gépben végeztük az alábbi program beállítással: 95 °C, 5 perc - 1 ciklus; 94 °C, 1 perc, 72 °C, 1 perc, 55 °C, 1 perc - 35 ciklus; 72 °C, 10 perc - 1 ciklus. A CP1 és CP2 primerekkel végzett PCR reakciók körülményei annyiban tértek el a fent leírtaktól, hogy a 35 ciklus során a 72 °C-on

végzett láchhosszabbítás ideje 30 másodperc volt. A PCR termékeket elektroforézist követően agaróz gélből izoláltuk a Fermentastól vásárolt “DNA extraction kit”-et használva, majd Bluescript KS plazmidba ligáltuk.

3.10. Sejtfal-indukált cDNS könyvtár készítése és tesztelése

A *C. minitans* Cm-2 törzsét kizárólagos szénforrásként szklerócium-sejtfalat tartalmazó MM tápoldatban rázattuk az előző fejezetben leírtak szerint. A micéliumból össz RNS-t vontunk ki, amelyből mRNS-t tisztítottunk az “Oligotex mRNA purification System” (Qiagen) segítségével. A cDNS könyvtárat a “Lambda ZAP Express™ cDNA Synthesis Kit” felhasználásával (Stratagene) készítettük 5 µg mRNS-ből kiindulva a gyártó utasításait betartva. A könyvtárat plakkhibridizációval (Sambrook et al., 1989) teszteltük, radioaktív próbaként a kitináz-, vagy a glükánáz-specifikus primerekkel előállított PCR terméket használtuk. A pozitív fág klónokból a Stratagene ajánlásait követve (<http://www.stratagene.com>) plazmidot szabadítottunk, amellyel *Escherichia coli* DH5α sejteket transzformáltunk. A feltételezett kitinázgént *cmch1*-nek, az ezt tartalmazó plazmidot pCMCH-nak, míg a feltételezett β-1,3-glükánáz gént és a plazmidot *cmg1*-nek illetve pCMGL-nek neveztük el.

3.11. A *cmg1* és a *cmch1* gének szekvencia analízise

A glükánáz és kitináz gének nukleotidsorrendjének meghatározása és a szekvencia elemzése a 3.3. fejezetben részletezett módon történt. A gének génbanki azonosító számai: *cmch1* - AF285086, *cmg1* - AF247649.

3.12. A *cmg1* és a *cmch1* gének kópiaszámának meghatározása

DNS-t tisztítottunk folyékony BG tápoldatban három napig tenyésztett *C. minitans* Cm-2 izolátumból, és a 3.6. fejezetben leírtak szerint Southern hibridizációt hajtottunk végre, annyi módosítással, hogy a filter mosását nem szigorú körülmények között végeztük (2×SSC-t és 0,1% SDS-t tartalmazó pufferben szobahőmérsékleten 3×15 percig).

3.13. A *cmg1* gén kifejeztetése élesztőben

A pCMGL plazmid 2,8 kb nagyságú *MluI-XhoI* fragmentumát, amely tartalmazta a teljes feltételezett kódoló régiót, a pYES2 expressziós vektorba (Invitrogen) ligáltuk. Ily módon a *cmg1* gént fuzionáltattuk a GAL1 galaktóz indukálható promóterrel (West et al., 1984). Az így előállított plazmidot pYGL-nek neveztük el. A pYGL és a pYES2 vektorokkal külön-külön transzformáltuk a *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen) törzsét a Gietz és munkatársai (1992) által közölt módszerrel. A transzformánsokat uracil prototrófia alapján szelektáltuk. A transzformáns élesztő törzseket 2% glükózt tartalmazó SCU médiumban (<http://www.invitrogen.com>) ~16 órán át tenyésztettük (30 °C, 200 rpm), majd centrifugálás (1500 g, 4 °C, 5 perc) után átoltottuk 2% galaktózt tartalmazó tápoldatba (OD₆₀₀=0,4). Kilenc órányi további rázatott inkubálást követően a tenyészeteket centrifugáltuk (1500 g, 5 perc, 4 °C), majd a felülúszóból extracelluláris fehérjét, az ülepített sejtekből pedig intracelluláris fehérjét állítottunk elő. Az extracelluláris fehérjemintát a felülúszó dializálásával, majd liofilizálásával és végül 20 mM Tris-HCl-ben (pH=6,8) történő visszaoldásával készítettük. Az intracelluláris fehérje kivonása érdekében a centrifugált sejteket üveggyöngyök jelenlétében vortexeltük feltáró pufferben (50 mM nátrium foszfát, pH=7,4, 1 mM EDTA, 5% glicerin, 1 mM fenil-metil szulfonil fluorid).

Mind az intra- mind az extracelluláris protein mintákat SDS-PAGE segítségével elválasztottuk. Az elektroforézis 4%-os gyűjtőgélben és 8%-os elválasztógélben hagyományos eljárások szerint történt (Sambrook et al., 1989), azzal a kivétellel, hogy a mintakezelő pufferből kihagytuk a redukálószer (ditiotreitolt), valamint forralás helyett szobahőmérsékleten kezeltük a mintákat. Az elválasztott fehérjék renaturálása érdekében a gélt kétszer tíz percig ráztuk 25% (v/v) propanolt tartalmazó foszfát pufferben (50 mM, pH=5,0), majd további kétszer tíz percig propanol mentes foszfát pufferben. Ezt követően a gélből a Pan és munkatársai (1989) által leírt módszerrel mutattunk ki β -1,3-glükánáz aktivitást.

3.14. A rekombináns CMG1 enzim tisztítása

3.14.1. IONCSERE-KROMATOGRÁFIA

A pYGL plazmival transzformált, galaktózzal indukált *S. cerevisiae* INVSc1 törzs extracelluláris fehérje kivonatát Mono Q HR 5/5 anion cserélő oszlopon (Pharmacia) elválasztottuk. Az oszlopot és a fehérjemintát 50 mM Tris-HCl (pH=7,6) pufferben készítettük el, az elúciót lineáris NaCl gradienst (0-1,0 M) alkalmazva végeztük. A frakciók β -1,3-glükánáz aktivitását 100 μ l végtérfogatú reakciókban teszteltük, amelyek az alábbiakat tartalmazták:

- 90 μ l 66 mM citrát-foszfát pufferben (pH=5,0) oldott laminarint (5 mg/ml),
- 10 μ l az adott frakcióból.

A reakciókat 37 °C-on inkubáltuk 1 óráig, majd 100 μ l Miller féle dinitroszalicilsavas reagens (Miller, 1959) hozzáadásával és ezt követően 5 percre forrásban levő vízfürdőbe való helyezéssel állítottuk le. Az elegyeket 1 ml desztillált vízzel egészítettük ki, majd a redukáló cukor tartalmát abszorbancia méréssel határoztuk meg 540 nm-en. A legnagyobb aktivitást mutató frakciót Vivaspin 4 (Vivascience) berendezéssel töményítettük. A minta fehérjetartalmának homogenitását hagyományos SDS-PAGE-t (Sambrook et al., 1989) követő ezüsfestéssel ellenőriztük.

3.14.2. N-TERMINÁLIS SZEKVENCIA ANALÍZIS

A mintában látható protein N-terminálisának szekvenálását az MBK Analízis-Szintézis Laboratóriumában végezték az alábbiak szerint. SDS-PAGE után a gél fehérje tartalmát polivinilidén-difluorid membránra elektroblottoltuk Matsudaira (1987) szerint Mini Trans-Blot Cell (BioRad) készülék segítségével, majd festettük a membránt 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250 festékkel (50% metanolban). 50%-os metanolban festéktelenítettük a membrán, majd az egyetlen látható fehérje sávot kivágtuk és az Edman féle módszerrel szekvenálási analízisnek vetettük alá ABI 471A berendezés (Applied Biosystems) segítségével.

3.15. A CMG1 enzim jellemzése

A tisztított, rekombináns enzim szubsztrát specificitását különböző glikozidos kötéseket tartalmazó polimerekből történő redukáló cukor felszabadítással jellemeztük. A tesztbe bevont polimerek a következők voltak (zárójelben a fő kötéstípus): laminarin (β -1,3-), karboximetil-cellulóz (β -1,4-), arabinoxilán (β -1,4-), lichenin (β -1,[3]4-), pustulan (β -1,6-), Avicel cellulóz (β -1,4-) és *Sclerotinia* sejtfalpreparátum (β -1,3- és β -1,6-).

A rekombináns enzim exo jellegű aktivitásának bizonyítására egyazon reakcióból párhuzamosan mértük a laminarinból felszabadított glükóz ekvivalens redukálócukor tartalmát (Miller, 1959), illetve a Sigma glükóz oxidáz kit (510-A) segítségével a felszabadított glükózt.

3.16. A *cmg1* gén expressziójának vizsgálata Northern hibridizációval

A *C. minitans* Cm-2 konídium szuszpenziójával glükózzal, vagy darált szkleróciummal kiegészített SM tápoldatokat oltottunk be 10^6 db/ml végkoncentrációban. A tenyészeteket kettő, illetve hat napig rázattuk (180 rpm, 23 ± 2 °C), ekkor leszűrtük a micéliumot, RNS-t vontunk ki belőle (Stiekema et al., 1988) és Northern hibridizációt hajtottunk végre (Sambrook et al., 1989) a radioaktívan jelölt *cmg1* génnel.

A *cmg1* gén szklerócium parazitizmus alatti expressziójának tanulmányozása érdekében 200 ± 20 db *S. sclerotiorum* szkleróciumot helyeztünk celofánnal fedett, 0,1% glükózt tartalmazó SM csészékre. A szkleróciumokat 200 μ l *C. minitans* konídium szuszpenzióval (10^6 db/ml) fertőztük, majd a csészéket 22 °C-on, sötétben inkubáltuk. Kontrollként kizárólag a parazitával oltottunk be csészéket. Három, öt és tíz nap inkubálás után steril spatulával összegyűjtöttük a csészéről a micéliumot és az RNS kivonásáig fagyasztva tároltuk. Ezt követően Northern hibridizációt hajtottunk végre. A különböző mintákban tapasztalt expressziós szintek kvantitatív összehasonlítását az analySIS szoftver (Soft Imaging System GmbH) felhasználásával végeztük.

3.17. *In vitro* micélium növekedés gátlási teszt

Huszonnégy lyukú mikrotiter lemez (Corning) mélyedéseiben (16 mm Ø), 400 µl 1%-os vizes agar táptalajra helyeztünk három napos BGA csészéről származó, 1 mm átmérőjű *S. sclerotiorum* Sc-1 inokulumot. A lemezt 25 °C-on, 100 % relatív páratartalom alatt 12 órán át inkubáltuk. Ezután az élesztő tenyésztésűrlletéből tisztított CMG1 enzimből (lásd 3.14. fejezet) készített különböző koncentrációjú oldatokkal (50 mM, pH=4,8 citrát pufferben), illetve kontrollként citrát pufferrel, vagy 5 perc forralással inaktivált enzimmel felülöntöttük (50 µl) az inokulumokat. A telepnövekedést sztereo mikroszkópba helyezett okulár mikrométerrel követtük nyomon, és mértük 0, 1 illetve 7 órával a felülöntés után. A kísérletet két független alkalommal, beállításonként legalább négy ismétléssel végeztük. Az átlagolt eredményeket az enzimmentes citrát pufferrel kezelt micélium növekedésének százalékában fejeztük ki.

4. EREDMÉNYEK

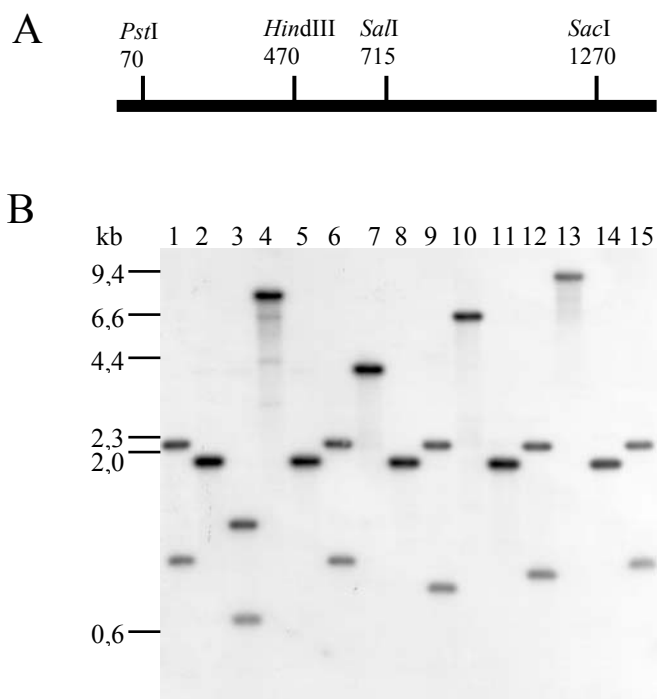
4.1. A *T. hamatum* homológ transzformálása a *Tham-ch* génnel

4.1.1. A *THAM-CH* GÉN KLÓNOZÁSA GENOMI KÖNYVTÁRBÓL

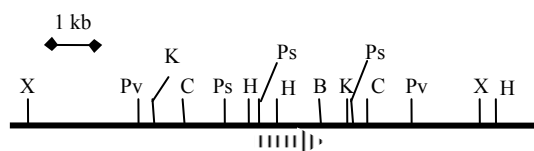
Célul tűztük ki egy mikoparazita *Trichoderma* törzs 42 kDa endokitináz enzimet kódoló génjének és *cis* szabályozó elemeinek klónozását annak érdekében, hogy indukálható promotérral vezérelt, megnövelt kópiaszámú transzformánsokat állítsunk elő. A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Mikológiai Csoportjában rendelkezésünkre álló *Trichoderma* törzsgyűjteményből a *T. hamatum* Tam-61 törzset választottuk ki a munkánkhoz, amely igen jó mikoparazita képességet mutatott *in vitro* tesztekben (Turóczy et al., 1996).

Elkészítettük a *T. hamatum* Tam-61 genomi klóntárát λ bakteriofág vektorban. A könyvtárat azzal a PCR termékkel próbáltuk, amelyet Fekete és munkatársai (1996) amplifikáltak a Tam-61 genomjából a *T. harzianum* kitinázgén (*ech42*) (Carsolio et al., 1994) szekvenciája alapján tervezett primerekkel. A PCR termék nagyfokú homológiát mutatott a 42 kDa kitinázgén kódoló régiójához. A plakk hibridizációban pozitívnak mutató fág plakkok közül kiválasztottunk hármat, amelyekből DNS-t izoláltunk. A fág DNS mintákat többféle restriktív enzimmel, illetve enzimbombinációval emésztettük, és az emésztésekhez a radioaktívan jelölt PCR terméket hibridizáltuk, hogy megállapíthassuk a kitinázgén környezetének fizikai térképét (2. ábra). Megkönnyítette a helyzetünket, hogy ismertük a PCR termék teljes szekvenciáját, és így a restriktív enzimek felismerőhelyeinek pozícióját is. A 2. ábrán az egyik hibridizáció eredménye és a PCR termék fizikai térképe látható. E hibridizálások eredményeképpen megszerkesztettük a *T. hamatum*-ból izolált, *Tham-ch*-nak elnevezett kitinázgén környezetének hasítási térképét (3. ábra). A térkép alapján kiválasztottunk egy ~4 kilobázis nagyságú *Clal* fragmentumot, amely mintegy 1,5 kilobázis méretű promotér szakaszt és mintegy 1 kilobázis nagyságú 3' nem-kódoló régiót is tartalmazott a struktúrgénen kívül. Ez a szakasz alkalmasnak tűnt további célunk elérésére, a saját

szabályozó elemeivel irányított gén kópiaszámának növelésére, ezért ezt a fragmentumot Bluescript plazmidba ligáltuk. Az így létrejött plazmidot pEKC1-nek neveztük el.



2. ábra A *Tham-ch* gén környezetének térképezése Southern hibridizációval. (A) A *T. hamatum* Tam-61 törzsből amplifikált kitináz-homológ PCR termék (Fekete et al., 1996) hasítási térképe. (B) A PCR termék hibridizálása a *T. hamatum* Tam-61 emésztett DNS mintáihoz. Az alkalmazott enzimek: 1, *Sall*; 2, *PstI*; 3, *Sall-PstI*; 4, *BamHI*; 5, *BamHI-PstI*; 6, *BamHI-Sall*; 7, *EcoRI*; 8, *EcoRI-PstI*; 9, *EcoRI-Sall*; 10, *XbaI*; 11, *XbaI-PstI*; 12, *XbaI-Sall*; 13, *XhoI*; 14, *XhoI-PstI*; 15, *XhoI-Sall*.



3. ábra A *Tham-ch* gén kromoszómális környezetének fizikai térképe. A nyíl a kódoló régióval megegyező szakaszt mutatja és jelzi az átírási irányát. B, *BglII*; C, *Clal*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; Ps, *PstI*; Pv, *PvuII*; X, *XhoI*.

4.1.2.A *THAM-CH* GÉN SZEKVENCIA ANALÍZISE

Meghatároztuk a pEK1 plazmidba ligált DNS szakasz teljes nukleotid sorrendjét. A *ClaI* fragmentum 4024 bázispárból áll, amelyen homológiák alapján azonosítottunk egy 1467 bázispárt tartalmazó feltételezett nyílt leolvasási keretet, amely egy 424 aminosavból álló fehérjét kódol.

```
-790 ccagcgggagatcattagagctcgaaataccacgtttaggagcagtcgaaacttggagattc
-730 tggctgctgttgccaatggcagtgaaaccctatgctaagatgcccatcatagcggctgcca
-670 ggcgcatcaccagatgcataagcagggcatggcaagtggcatctgcagccggcagcagat
-610 caggcgcattggcagccttctgcaaacgctgacttgttggaaatgggctggcgttcgctt
-550 cgcgctgggatcttggccccctgagacattcccttcccccgggcagtcgggtgcctcta
-490 ggcatatcgggagaaatgccgccatcagcaacgttgctagacttggcgaggtacggcatag
-430 tttagtgatattgcgcggggcttcccctgggatatgcttatcttctgaatctggggaatc
-370 gaggaattctacgagtcgacagccgcccagccttgggcacgggacatgggtcgcacactc
-310 ctgcctccctgggagacgatggcactattctagagcagacaagtgagcataaacgttgcgat
-250 tgaccataattggcaaacgcatgggttacatactcgtgctaagaacctgaaagggaaagcttc
-190 acaagtcaacttcagaattcgtaggacaaattaggaagctccacattgacttataaatatcc
-130 tgcattgccatccagcacttcagatgaaaattccattcagcagcagcaacttggagagct
-70 ctttccagcagcaacttcttcccttccaaagtatctcttgataacgttcgctgaatctcaa
-10 attttgcaccATGTTGGGCTTCCTCGGAAAATCCGTGGCCTTGCTTGCTGCGCTGCAGGC
```

4. ábra A *Tham-ch* gén promóter régiója. Kis betűk jelzik az 5' nem-kódoló régiót, nagy betűkkel jelöltük a kódoló szakaszt. A számok a bal oldalon a translációs iniciációs kodontól (ATG) való távolságot mutatják. A CAAT és a TATA boxokat (Gurr et al., 1988) aláhúzással, a CRE1 katabolit represszor konszenzus kötőhelyeit (Lorito et al., 1996a) dupla aláhúzással, a stressz válaszban szerepet játszó transzkripciós faktor kötőhelyét (Kobayashi és McEntee, 1993) bekeretezéssel jelöltük.

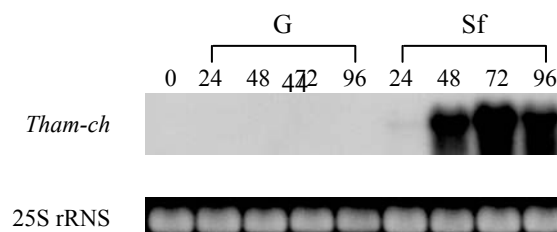
A *Tham-ch* gén által kódolt fehérje szekvenciáját összehasonlítottuk korábban már leírt kيتينázokkal és megállapítottuk, hogy rendkívül nagyfokú (92%) homológiát mutat a *T. harzianum*-ból izolált 42 kDa endokitinázzal (Carsolio et al., 1994). Szintén jelentős, bár kisebb mértékű hasonlóságot (70%) tapasztaltunk az *Aphanocladium album* mikoparazitából tisztított endokitináz enzimmel (Blaiseau és Lafay, 1992). Rövidebb szakaszok, például a 114. és a 136. aminosav közötti régió, valamint a 151. és a 176. aminosav közötti szakasz a legkülönbözőbb organizmusokból származó kيتينázok megfelelő szakaszaival mutattak nagyfokú hasonlóságot. Az előbbiről feltételezik, hogy a szubsztrátkötő hely az enzimen, az utóbbi pedig valószínűleg az aktív centrum

(Kuranda és Robbins, 1991). A gén nem-kódoló régiói kisebb hasonlóságot mutattak a *T. harzianum ech42* génjével, mint a struktúrgén. A promóter régióinak a translációs iniciációs kodonhoz közel eső 350 bp hosszú szakaszában azonban ez az érték még megközelítette a 90%-ot. A stop kodont követő terminátor régióban mintegy 70%-os hasonlóságot tapasztaltunk.

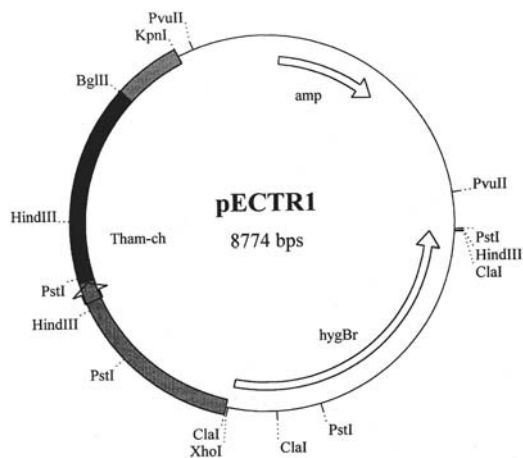
A promóterben azonosítottunk feltételezett TATA és CAAT boxokat (4. ábra), amelyek általános eukarióta transzkripció aktivátorok kötőhelyei és megtalálhatók az eddig leírt gombagének többségében (Gurr et al., 1988). A CRE1 katabolit represszor konszenzus kötőhelyei, amelyekről bebizonyították, hogy valóban szerepet játszanak a *T. harzianum* 42 kDa endokitináz génjének szabályzásában (Lorito et al., 1996a), szintén jelen voltak a promóterben (4. ábra). Az élesztő stressz által indukálható génjeinek promótereiben megtalálható CCCCT motívum (Kobayashi és McEntee, 1993) szintén jelen volt az 5' szabályozó régióban a translációs start ponttól 400 bp távolságra (4. ábra).

4.1.3. A *THAM-CH* GÉN EXPRESSZIÓJA *R. SOLANI* SEJTFALON

Northern hibridizációt hajtottunk végre annak ellenőrzésére, hogy a *T. hamatum* kitinázgén (*Tham-ch*) modellezett mikoparazitizmus során, azaz a célgomba sejtfalán növesztve erősen indukálódik-e, így alkalmas-e a tervezett transzformációs kísérletekbe való bevonásra. Két napig tenyésztettük a Tam-61 törzset 2% kezdeti glükóz koncentráció mellett MM tápoldatban, majd átoltottuk szénforrásként kizárólag *R. solani* sejtfalat tartalmazó MM tápoldatba, illetve szintén 2% glükózt tartalmazó MM-be. További négy napig rázattuk a tenyészeteket, minden nap mintát vettünk és a micéliumból tisztított RNS-hez hibridizáltuk a *Tham-ch* gént (5. ábra). Glükóz jelenlétében nem tapasztaltunk expressziót, míg sejtfalon a második naptól erős expressziót kaptunk, amely mindvégig megmaradt.



5. ábra A *Tham-ch* gén expressziója *T. hamatum* Tam-61 törzsben. A 2% glükózon előtenyésztett gombát átoltottuk kizárólagos szénforrásként 2% glükózt (G), vagy 0,1% *R. solani* sejtfalat (Sf) tartalmazó minimál tápoldatba, majd a tenyészetekből négy napig naponta mintát vettünk, RNS-t tisztítottunk és hibridizáltuk a *Tham-ch* gén *PstI*-*Bgl*II fragmentumát (felső kép). A csatornák feletti számok az átoltás után eltelt időt jelzik órában. Az alsó képen az ethidium-bromiddal festett 25S rRNS látható mennyiségi kontrollként.



6. ábra A pECTR1 transzformáló vektor sematikus rajza. Vastag vonallal jelöltük a *Tham-ch* gént, szürkével a nem-kódoló régiót, feketével a struktúrgént, a nyíl a transzkripció irányát jelzi. Üres nyilak jelzik az ampicillin rezisztencia gént (amp) és a higromicin B rezisztencia gént (hygBR).

4.1.4.A *T. HAMATUM* TAM-61 TRANSZFORMÁLÁSA

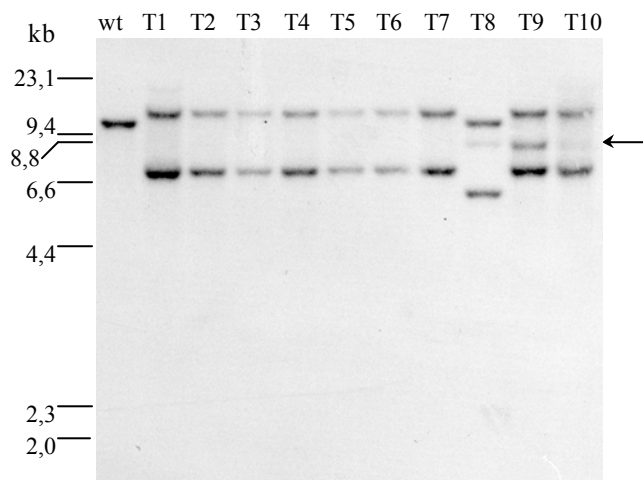
A pEKC1 plazmid 3,5 kb nagyságú *KpnI-XhoI* fragmentumát ligáltuk a pCSN43 plazmidba. Ezzel létrehoztuk a pECTR1 nevű transzformáló vektort (6. ábra), amely tartalmazta a *T. hamatum* endokitináz génjét mintegy 1,5 kb méretű promóter szakasszal és 0,5 kb terminátor régióval együtt. A vektor a higromicin rezisztenciagént hordozta eukarióta szelekciós markerként. A pECTR1 plazmiddal transzformáltuk a *T. hamatum* Tam-61 törzséből készített protoplasztokat. A transzformánsokat 200 µg/ml higromicint tartalmazó lemezekon szelektáltuk. A transzformációs gyakoriság elérte a 300 cfu/µg transzformáló DNS értéket. Tíz primér transzformánst monospóráztunk, és ellenőriztük a higromicin rezisztens fenotípusuk stabilitását. Mind a tíz monospórázott transzformáns törzs stabilnak bizonyult nem-szelektív körülmények között is, továbbá nem tapasztaltunk különbséget sem telepmorfológiában, sem növekedési sebességben, sem konídium termelésben a vad típusú recipiens törzshöz képest.

4.1.5.A TRANSZFORMÁNSOK ANALÍZISE

4.1.5.1. A transzformáló vektor kromoszómába épülésének módja

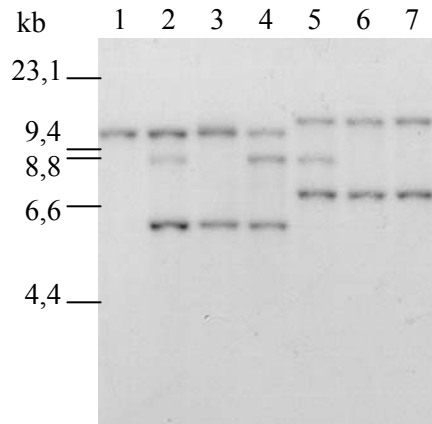
A stabilitási teszt arra utalt, hogy a transzformáló vektor konstrukció stabilan integrálódott a recipiens genomba. Az integrálódás tényét és típusát Southern hibridizációs kísérletekkel lehet igazolni, amennyiben ismert a gén környezetének és a vektornak a restriktions térképe. A tíz monospórázott transzformáns, illetve a Tam-61 recipiens DNS-ét *XhoI* enzimmel vágtuk, amelynek egyetlen felismerőhelye van a pECTR1 vektoron. Az emésztésekhez hibridizáltuk a *Tham-ch* gént. Nyolc transzformáns (T1-T8) esetén eltűnt a vad típusú, ~11 kb nagyságú jel és helyette megjelent egy ~12,5 kb és egy 7,5 kb méretű csík, ami azt jelezte, hogy ezekben a törzsekben homológ egykópiás integrálódás történt (7. ábra). Két olyan törzset találtunk, a T9 és T10 jelűt, amelyekben az előbb említett hibridizációs szignálok felül a transzformáló plazmid méretével megegyező (8,8 kb) jelet kaptunk, ami tandem kópiák beépülésére utal. Meglepő módon azonban éppen a tandem kópiákról származó jelek voltak gyengébb intenzitásúak. Egyetlen transzformáns törzs, a T8 esetén tapasztaltuk, hogy az endogén kópia érintetlen maradt. Ebben a törzsben véletlenszerűen integrálódott

a pECTR1 plazmid a genomba, és itt is detektáltuk a tandem beépülést jelző, 8,8 kb méretű jelet, igaz halványabban. A Southern hibridizációt elvégeztük a *PvuII* enzimmel emésztett DNS mintákon is. Ennek az enzimnek két felismerőhelye van a transzformáló vektoron. Ez a hibridizálás teljes mértékben megerősítette az előző kísérletben megállapított integrálódási típusokat.



7. ábra A transzformáló plazmid beépülésének igazolása Southern hibridizációval. A vad típusú recipiens (wt) *T. hamatum* Tam-61, illetve tíz monospórázott transzformáns (T1-T10) *XhoI* enzimmel emésztett DNS mintáihoz hibridizáltuk a *Tham-ch* gén 1,4 kb nagyságú *PstI-BglIII* fragmentumát. A bal oldalon látható számok a molekula tömeg markerek pozícióit jelzik, a nyíl a jobb oldalon a linearizált pECTR1 plazmid méretének (8,8 kb) megfelelő pozíciót mutatja.

A tandem beépülésre utaló jelek kisebb intenzitása azt jelezte, hogy ezek a kópiák nem stabilak. Ennek ellenőrzésére a T8 és T9 jelű transzformánsokból hat-hat utódot állítottunk elő monospórázással, amelyek *XhoI* enzimmel emésztett DNS mintáin ismét elvégeztük a Southern hibridizációt. A tizenkét megvizsgált utód közül mindössze egy törzs esetén tudtuk kimutatni a tandem beépülésre utaló jelet (8. ábra, 4-es sáv), tizenegy utódban teljesen eltűnt a lineáris plazmid méretével megegyező csík, ami megerősítette a feltevésünket, miszerint a pECTR1 plazmid integrálódása csak egyetlen kópiában stabil.



8. ábra A T8 és T9 transzformánsok és monospórázással előállított utódaik Southern analízise. A törzsek *XhoI* enzimmal emésztett összDNS mintáihoz hibridizáltuk a *Tham-ch* gént. 1, Tam-61 recipiens törzs; 2, T8 transzformáns; 3 és 4, T8 törzsből monospórázással előállított utódtörzsek; 5, T9 transzformáns törzs; 6-7, T9 törzsből monospórázással előállított utódtörzsek.

4.1.5.2. Kitinázaktivitás

Megmértük a kétszeres *Tham-ch* kópiaszámú transzformáns törzsek extracelluláris kitinázaktivitását és összehasonlítottuk a recipiens törzs aktivitásával. Az eredmények az **1. táblázat**ban láthatók. A kolloid kitinnel indukált tenyészetek szűrletében mért kitinázaktivitást egységnyi fehérjére vonatkoztatott, specifikus aktivitásban fejeztük ki. A T8 törzs kivételével az összes transzformáns szűrletében megemelkedett kitinázaktivitást tapasztaltunk. Az emelkedés mértéke változó volt, a T9 jelű törzs esetén volt a legmagasabb, mintegy ötszöröse a vad típusénak. A T8 jelű törzs esetén kisebb értéket kaptunk, mint a recipiens tenyészetszűrletében.

4.1.5.3. A *Tham-ch* gén expressziójának növekedése

Megvizsgáltuk a *Tham-ch* gén expressziójának mértékét a transzformáns törzsekben a vad típusú recipienséhez viszonyítva. Glükózon történt előtenyésztés után átoltottuk a törzseket *R. solani* sejtfaikivonatot tartalmazó tápoldatba, tovább rázattuk a

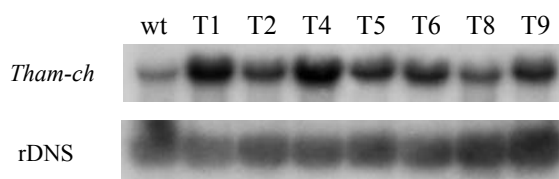
1. táblázat A vad típusú recipiens (*T. hamatum* Tam-61) és a transzformáns törzsek (T1-T10) extracelluláris kitinázaktivitása. Az eredmények két független kísérlet átlagát mutatják.

törzs	specifikus kitinázaktivitás ¹	relatív kitinázaktivitás ²
Tam-61	445	1.00
T1	1005	2.26
T2	1295	2.91
T3	1105	2.48
T4	737	1.66
T5	744	1.67
T6	586	1.32
T7	1268	2.85
T8	218	0.49
T9	2200	4.94
T10	1270	2.85

¹ pmol felszabadított 4 MUF-ChT · perc⁻¹ · µg fehérje⁻¹

² az adott törzs és a Tam-61 aktivitásának a hányadosa

tenyészeteket két napig, majd RNS-t vontunk ki a leszűrt micéliumból és Northern hibridizációt hajtottunk végre a *Tham-ch* gént használva próbaként. Minden tesztelt transzformáns esetén nagyobb mértékű expressziót tapasztaltunk, mint a Tam-61 recipiensben hasonló tenyésztési körülmények között (9. ábra). Nem észleltünk korrelációt a transzkriptumok szintje és az enzimaktivitás értékek között.



9. ábra A *Tham-ch* gén expressziója a transzformánsokban. A vad típusú recipienst (wt) és a transzformánsokat (T1, T2, T4, T5, T6, T8 és T9) glükózon előtenyésztettük, majd átoltottuk *R. solani* sejtfalat tartalmazó MM tápoldatba. További két nap tenyésztés után összRNS-t vontunk ki a törzsekből és hibridizáltuk a mintákhoz a *Tham-ch* gén *PstI-BglII* fragmentumát (felső kép), illetve mennyiségi kontrollként az *Aspergillus nidulans*ból származó rDNS próbát (alsó kép).

4.1.5.4. Konfrontációs teszt csészében

In vitro csészetesztekben ellenőriztük, hogy a három kiválasztott transzformáns (T1, T8, T9) képes-e gyorsabban átnőni áldozatát, mint a Tam-61. A kísérletekbe két, hasonló növekedési sebességű növénykórokozó gombát, a *R. solani*t és a *S. sclerotiorum*ot vontunk be, amelyeket leoltottunk a mikoparazita inokulummal szemben 0,2% glükózt tartalmazó szintetikus minimál táptalajon (MM) és a két gomba találkozása után naponta mértük a *Trichoderma* micélium front távolságát a találkozási ponttól, azaz az átnövési sebességet. Minden párosítás esetén átnőtte a *Trichoderma* törzs a tesztgombát és erősen sporulált rajta, az átnövés sebességében azonban nem tapasztaltunk különbséget a transzformánsok és a vad típusú recipiens törzs között.

4.2. A *C. minitans* sejtfalbontó enzimgénjei

4.2.1. KITINÁZ ÉS GLÜKANÁZ GÉNSZAKASZOK IZOLÁLÁSA *C. MINITANS*BÓL

Annak érdekében, hogy jobban megismerjük a *C. minitans* szklerócium-parazita gomba hidrolitikus enzimrendszerét, amely feltehetően fontos szerepet játszik a parazitizmus során, célul tűztük kitináz illetve β -1,3-glükanáz gének izolálását és jellemzését. Célunk elérése érdekében összehasonlítottuk a fonalas gombákból eddig izolált glükanáz, illetve kitináz enzimek szekvenciáit és kijelöltünk két-két konzervatív régiót, amelyek alapján két degenerált oligonukleotid párt terveztünk a glükanázokra (GP1 és GP2), valamint a kitinázokra (CP1 és CP2). A *C. minitans* Cm-2 jelű törzsét 12 napig tenyésztettük szintetikus SM tápoldatban, amelyben az egyetlen szénforrás a *S. sclerotiorum* szkleróciumaiból kivont sejtfal volt. A *Coniothyrium* micéliumból RNS-t tisztítottunk, amelyet templátként használtunk első szál cDNS szintézishez. Az első szál cDNS-ről egy ~700 bp nagyságú fragmentumot amplifikáltunk PCR-rel a GP1 és a GP2 primerek segítségével. A CP1 és a CP2 primerek segítségével pedig egy ~150 bp méretű amplifikátumot állítottunk elő. A PCR termékek mérete megegyezett azzal, amit a fehérje összehasonlítások során azonosított konzervatív régiók távolsága alapján várni lehetett.

A PCR termékeket plazmidba ligáltuk és szekvencia analízisnek vetettük alá. A szekvenciákat összehasonlítottuk az adatbázisokban fellelhető összes fehérjével és jelentős homológiát kaptunk fonalas gomba eredetű β -1,3-glükanáz enzimek, illetve kitináz enzimek megfelelő szakaszaihoz. Ezután cDNS bankot készítettünk λ ZAP II bakteriofág vektorban szklerócium-sejtfalon növesztett *C. minitans* Cm-2 törzsből és a bankot próbáztuk külön-külön a két PCR termékkel, melynek eredményeképpen pozitív plakkokat izoláltunk. A pozitív fágokból helper fág segítségével *in vivo* cirkuláris plazmidot szabadítottunk. A feltételezett glükanáz gént tartalmazó plazmidot pCMGL-nek, míg a kitináz gént hordozó plazmidot pCMCH-nak neveztük el.

4.2.2.A *CMGI* ÉS A *CMCHI* GÉNEK SZEKVENCIA ANALÍZISE

Meghatároztuk a pCMGL-ben található cDNS klón teljes nukleotidsorrendjét, amely a 3' végen található 13 tagból álló poli(A) farokkal együtt 2966 bázispárt tartalmazott. Az első transzlációs iniciációs kodon (ATG, 58-60; 10. ábra) után rövid távolságon belül egy stop kodon található (76-78) azonos leolvasási keretben, ezért feltételezhető, hogy a tényleges transzláció a második ATG-nél (233-235. pozíció) indul. Vélhetően a glükanáz enzim szintézisekor az úgynevezett transzlációs reiniciáció játszódik le. Ezt a jelenséget jónéhány más eukarióta gén transzlációjánál megfigyelték már (Kozak, 1999). A második ATG szekvencia környezete (TCATCATGG) beleillik a fonalas gomba gének transzlációs kezdőpontjait övező konszenzus szekvenciába (Gurr et al., 1988).

```

1  ttctctcatccgcattgtgtcggttattcattcattcgttgccaccttca
51  ctccgctatgcacgggtgtttttatatagagcttctcttccctcttccaccgt
101  tgctccaacaacttgcattctttacaaaccaacccaccacacgcgtctct
151  gtgagactaactttgatttccaaagtcccgacaatccttcaaaccaactt
201  ttacattttcaaaactcaaactagctgtcatcATGGTAGCGTTCGGCGCC
251  ACGGCGCTTTTCCTCACGCTGCGCGTGCTTCTTTTCGGCAACCCCGTCGTC

```

10. ábra A *cmgI* cDNS klón 5' végének szekvenciája. Kis betűvel van jelölve a nem-kódoló régió, nagy betűvel a kódoló szakasz. Az első ATG kodont aláhúzással, a STOP kodont dupla aláhúzással, a feltételezett transzlációs iniciációs kodont kivastagítással jelöltük.

A cDNS által kódolt nyitott leolvasási keret (ORF) egy 792 aminosavból álló feltételezett fehérjét kódol. A pCMGL klón tartalmaz ezen felül egy viszonylag nagy, 232 bp hosszú 5' nem-kódoló régiót valamint egy 338 bp hosszú 3' nem-kódoló szakaszt. A SignalP számítógépes program egy szekréciós szignál peptid hasítóhelyet valószínűsít a 24. aminosav után (11. ábra) (Nielsen et al., 1997). Ezen felül hat potenciális N-glikozilációs konszenzus szekvenciát találtunk (NXS/T) a fehérjében, ami szintén jellemző a szekretált gomba enzimekre (Archer és Peberdy, 1997). A szekretált fehérje becsült molekulatömege 82,3 kDa, izoelektromos pontja pedig 4,73.

Az aminosavsorrendet összehasonlítottuk a szekvencia adatbázisokban található összes fehérjével és rendkívül magas homológia értékeket kaptunk különböző fonalas gombákból izolált exo- β -1,3-glükánáz enzimek szekvenciáihoz. A 11. ábrán mutatom be az összehasonlítások eredményét. A fehérje teljes hossza mentén a legnagyobb azonossági érték az *Ampelomyces quisqualis*ből klónozott *exgA* gén termékéhez adódott (69%) és szintén jelentős homológiát találtunk a *T. harzianum*ból izolált LAM1.3 enzimhez (42% azonosság), valamint a *Cochliobolus carbonum* növénykórokozó gombából izolált EXG1-hez (41% azonosság) (Rotem et al., 1999; Nikolskaya et al., 1999; Cohen-Kupiec et al., 1999). A fent említett exoglükánázokon kívül az egyetlen fehérje, amellyel a teljes hosszúsága mentén viszonylag nagyfokú hasonlóságot találtunk, a *T. harzianum*ból izolált endo- β -1,3-glükánáz, a BGN13.1 volt (de la Cruz et al., 1995). Ebben az esetben 27% azonosságot tapasztaltunk a két enzim aminosavsorrendje között.

Elvégeztük a feltételezett kitinázgént tartalmazó pCMCH plazmid szekvencia analízisét is. Az összesen 1758 bázispárból álló cDNS-en az első ATG kodon a 44-46. pozícióban található (12. ábra). Ennek szekvencia környezete megfelel a fonalas gomba gének translációs kezdőpontjai körül azonosított konszenzus szekvenciának (Gurr et al., 1988). Az első ATG-vel kezdődő leolvasási keret egy 443 aminosavból álló feltételezett fehérjét kódol, amelynek az első húsz oldallánca egy tipikus szekréciós szignál peptidre emlékeztet (Nielsen et al., 1997). A szekretált fehérje becsült molekula tömege 45,7 kDa. A fehérje szekvenciában két N-glikozilációs szignált azonosítottunk. Összehasonlítva az adatbázisokban elhelyezett összes fehérjével, a CMCH1 szekvenciája nagyfokú homológiát mutatott különböző kitináz enzimekhez. A szekvencia teljes hossza mentén a legmagasabb értékeket fonalas gombákból származó enzimekhez

```

          ↓
          *****
CMG1  1  -----MVAFGATALFLTRVLLSATPSSAPVAQANAPAPGAASGYLPELASKGCKAAFNANEDTYLWVRNVKDFGASDGSST
EXGA  1  -----MLAFSAGAFLLTRVFLTATPSAAPVAQAVEVPOACASGYWFGNI..KROCIAPFNENFAAKRVFRNVKLLGAKGCGVIT
LAM1  1  -----MGFIRSEVLSALTFAAACRGLATPGS.EAEPSEVKRASGVWYENIA..HOCIAPF.APSN.YIVFRNVKDYGAKGCGVIT
EXG1  1  MRFSSLLACLGA.VGIQAAIIPFORRVNDITDSGSLDAQAAAAIVDGYLNDLS..GKRAPFNSNEN.YKVFNRVNDYGAKGCGVIT
BGN13 1  -----MLKLLTALVALLGAAASATPTSPFASDEGITKRATSFYYPNMDHVNAPRFAP.DLLGDFNY

CMG1  81  DDTAAINRAIASLTKGSSDSEVRCGEG.CDSTITIPAVVYFPPTYMISKPLIQYYTQFVIGAKQLPTLKAAPAFECMGLIDADFYI
EXGA  79  DDTAAINRAIADGN.....RCGQG.CDSTITIPAVVYFPPTYMISKPLIQYYTQFVIGADATNPTLKAADTFECMGLIDADFYI
LAM1  75  DDTAAINRAIILSG.....RCGR.LCISSTLIPAVVYFPPTYMISKPLIQYYTQFVIGADPTNPTLKAADTFECMGLIDADFYI
EXG1  85  DDTAAINRAIISDCS.....RCQPVWCDSSTIPAVVYFPPTYMISKPLIQYYTQFVIGADPTNPTLKAADTFECMGLIDADFYI
BGN13 62  PIYQTVNAGDGNALQNAITTDGKGSRRHPQWFASQPRVVYIPPTYMISKPLIRFNTDITLMDPTNPTLKAADTFECMGLIDADFYI

CMG1  168  EGGN.CANWETNQNNEYSIRNFVLDISAKAAA...GVHWVSOATSLONVFNMAASTPEQOAKGIFVDNGSGGFMIDIVFNG
EXGA  158  PGGD.CANWYTNQNNVYRTRNFVIDIKDTKAAA...GIHWVSOATSLONRFEMATGEA..CANCKGIFVDNGSGGFMIDIVFNG
LAM1  154  GDNPNDFPNWISTNVEYRTRNFVIDIKDTKAAA...GIHWVSOATSLONRFEMATGEA..CANCKGIFVDNGSGGFMIDIVFNG
EXG1  164  .SNQGEFPGWISTNVEYRTRNFVIDIKDTKAAA...GIHWVSOATSLONRFEMATGEA..NSVHAGIFVDNGSGGFMIDIVFNG
BGN13 150  STNKGGE.....LSPAVANQNVVDDTAAI.PGNSFTALMWVQAQAHLQNVRTMSSSS..GNGHTCHRMGRSSTLGLADIVRVER

CMG1  251  GATGAFLLGSOQFTIRNMTFNKCGTGYMNNWNLWTKSNTFNGCKVGLDMAN..APDNQIVGSLVLDISKYISIPVGVNTISETSI
EXGA  239  GATGAFLLGSOQFTIRNMTFNKCGTGYMNNWNLWTKSNTFNGCKVGLDMAN..SPDNQIVGSLVLDISKYISIPVGVNTISETSI
LAM1  239  GATGAFLLGSOQFTIRNMTFNKCGTGYMNNWNLWTKSNTFNGCKVGLDMAN..SPDNQIVGSLVLDISKYISIPVGVNTISETSI
EXG1  247  GYEMNNLGNQOFTIRNMTFNKCGTGYMNNWNLWTKSNTFNGCKVGLDMAN..APDNQIVGSLVLDISKYISIPVGVNTISETSI
BGN13 229  GQNCIWHDDHQOASFFNITFQNTICMLISSGNTSIFSTFDTCCTAFPTLAGSPW.....IALIDAKSINSGV...TFTTNQF

CMG1  336  FIGGGLLIDNVDVDFSGTETAVDFQCKKTLAGGS.VVKTWAOGNALASGGTQ.GRVQCDVQNGPQKPSLLGNDGGLPERSKELVADV
EXGA  324  PHTGGLLIDNVDVDFSGSNTAVONVAGETLACKS.KVATWAOGNAMAGQOAGRVQGDVNNPPTKPSLLG.ENGWERSKPOYENI
LAM1  318  PATSNLIVENLNLNVVPAVQSSSGSTLLAGGTTTAAACQGHQYTFN..GPTTFQCSI.TFNRPSSLLSG.SNYVTRSKPOYETL
EXG1  334  FTGSGQIVTENKLTNVVPAV.VSNCATVLAGGSLTQVQGNKYAPNASGPKFOCAL.SGATRPITGLLON.CKFKYSKSKPOYETL
BGN13 306  E.....SFMENLTKDN.GTFVWVVRGSI.LVCASSHVNTYSQNVGRNPT.....YGDVTSNTRBSALAPG.CRYPYVAPHTVGDIL

CMG1  422  AAGQFVSHKTAG.....KQSDGKTDITKAVQAAIDGLTD.GOVLWHDGAMHLSDITVIFAEQNVKIVGETVPLMLATCANFEDMBEN
EXGA  410  DVSKRFVSDKAG.....AVSDGVITDDTAMIKKAIIDGLQD.GOVLWHDGAMHLSDITVIFAEQNVKIVGETVPLMLATCANFEDMBEN
LAM1  402  PVSSFRSIVRSAG.....ATQNAVITDDTAMIKKAIIDGLQD.GOVLWHDGAMHLSDITVIFAEQNVKIVGETVPLMLATCANFEDMBEN
EXG1  419  STSSFTSARGAG.....ATQSDGVITDDTAMIKKAIIDGLQD.GOVLWHDGAMHLSDITVIFAEQNVKIVGETVPLMLATCANFEDMBEN
BGN13 382  PISSEFLVNDPAQNGNRQVKQDNTINEADTLNAILELAASQNKVAYPFQKVRVDSITLPIP..KGRITVGEAWATITGNCNFKNENS

CMG1  503  ERFLEFVGRQTDKCAFEMSDSHLITKGPTEGAILMEWNNNAEN.CAAGLWDVHFRIGGGQCTELOSDTQSKQNTAHDANPKCTIGSF
EXGA  491  POFGRFVGRKQTDKCAFEMSDSHLITKGPTEGAILMEWNNNAEN.CAAGLWDVHFRIGGGQCTELOSDTQSKQNTAHDANPKCTIGSF
LAM1  482  ERFVVOGT.PEOTQOVESDMLVSTQGTQAGAILMEWNLATSG.TPSGLWDVHFRIGGGQCTELOSDTQSKQNTAHDANPKCTIGSF
EXG1  499  VPVLIHQGR.PEESGSEWSDMLVSTQGTQAGAILMEWNLATA..LGSGLWDVHFRIGGGQCTELOSDTQSKQNTAHDANPKCTIGSF
BGN13 468  POFVVSVGR.AGDVCIQALQDRLVITNDVLPGAILVQFNAGNPFQDVALWNSLVTVGCTCAQALANACNNNSN.....DCKGAF

CMG1  590  MOLHITRKSSEG.YFENVWLWTADHLDLKHQNDITNRCRMLVESQ.GPVWLVGTASEHSVLSQYHFOCAKINVLGAIOTETPYYO.
EXGA  578  MOLHITRKSSEG.YFENVWLWTADHLDLKHQNDITNRCRMLVESQ.GPVWLVGTASEHSVLSQYHFOCAKINVLGAIOTETPYYO.
LAM1  567  MSMLHITRKSSEG.YFENVWLWTADHLDLKHQNDITNRCRMLVESQ.GPVWLVGTASEHSVLSQYHFOCAKINVLGAIOTETPYYO.
EXG1  581  TQVHWLTKGANCAYFENWWTADHLDLKHQNDITNRCRMLVESQ.GPVWLVGTASEHSVLSQYHFOCAKINVLGAIOTETPYYO.
BGN13 548  IGLHVAKSSG.PYIQNVWELGLRDHIAENFSGTSHRRERWVWFGPIRRNATCLYPIGSGHMLYQLNLHNAANVVSLLQAEINPHQG

CMG1  675  .PNPNALQPKKN.DKVFDPDMNITKSD.....KTAWAVRITHSQDNWVYAGATYSPFDYSDCVAT.....NDQCEHMEIDAK
EXGA  663  .PNPKANVPEKKN.DKVFDPDMNITNTT.....SAWAVRITHSQDNWVYAGATYSPFDYSDCVAVG.....QNQCEHMEIDEN.N
LAM1  654  .PNPDAPFENVN.TALNDNFATSCSGSSGRCAEAWGLRIVSSQNLITVYAGATYSPFDYSDCVAVG.....QNQCEHMEIDEN.N
EXG1  666  .PTEPAPFVYSS.SKYSDPVYSSQT.....SAWGLRLDANKVLYGCGYSPFDYSDCVAVG.....QNQCEHMEIDEN.N
BGN13 635  ANTOQIPFAEYVANVGTQDPPDS.WCNGDKRCRMGPANFNGGNSHYTASAAWAFSGPGQCCA.....QFECQOTLHWIAST

CMG1  748  SENNVVFLSSKASVNMITQDEKGLALDSNRSNRCANLCHBAQA*-----
EXGA  733  SENNVVFLSSKASVNMISGCVGLKDEBDRSNRCANLCHBAQA*-----
LAM1  738  LNNVNVNCTGVVNVQITQCNVLTSSSNVNAADVIALERLISGSGGVTPPPSSTTKAQSTFTIITSSPPKQVGNWFLGCVSD
EXG1  744  .ISVQAFCSSEVGVEMVVAAGQDKANWKNLNVVPTLITGLSYGF*-----
BGN13 715  PSNLQAFGLCSKDSVNTLRLGDGTFINTQNGTGGWTPGCGDVARVYTT*-----

```

11. ábra A CMG1 enzim szekvenciájának összehasonlítása más fonalas gombából származó β -1,3-glükánázokkal. CMG1, *C. minitans* CMG1; EXGA, *A. quisqualis* EXGA; LAM1, *T. harzianum* LAM1.3; EXG1, *C. carbonum* EXG1; BGN13, *T. harzianum* BGN13.1. Az azonos aminosavak fekete háttérben, a hasonló aminosavak szürke háttérben láthatók. Nyíl jelzi a számítógép által jósolt szignál peptid hasítóhelyet a CMG1 szekvenciában. Csillagok jelzik a heterológ gazda (*S. cerevisiae*) által szekretált CMG1 fehérje N-terminális oldalláncait. A szaggatott vonalak alatt látható régiók a feltételezett szubsztrát kötő helyek (Nikolskaya et al., 1998).

```

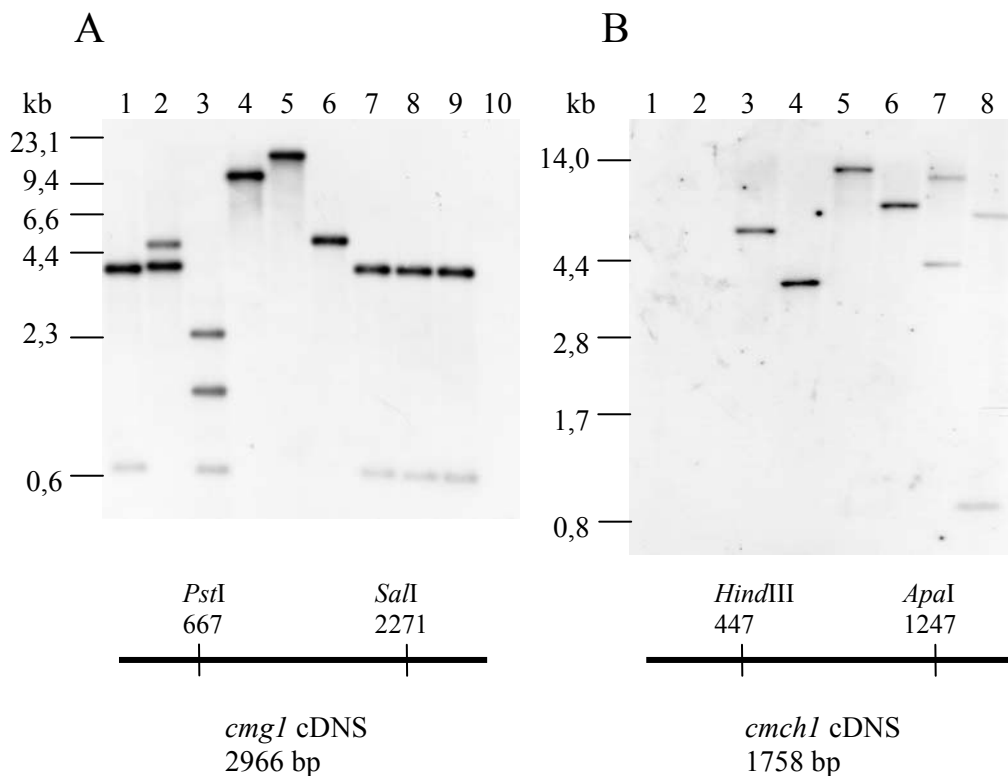
1 gcccaccagaccgacctcaaggagcattctcaatcactcaatcATGATGCTCTTTGCTCT
M M L F A L 6
61 TGTATCAATTCTCCCACTGTTGGGTCTTTCCGAGGGCTCGCTTTGCCTCAGTCGCTAA
V S I L P L L G L S E A L A L P Q S P K 26
121 GAACGGAAACAGACCTGTATGTTTCGTTCCAGGAACCGGAGGAGTCTGGCCAGCTTGTGAA
N G T D L Y V S F Q E P E E S G Q L V N 46
181 TCGAGCAGCGTCCGGTTACAGAAATGTTGCATACTTTGTCAACTGGGCAATATACGGGCG
R A A S G Y R N V A Y F V N W A I Y G R 66
241 AAATTACAACCCACAGAACCTCCCTGCAGACCAGCTCACTCAGTACTCTACTCTTTTGC
N Y N P Q N L P A D Q L T H V L Y S F A 86
301 caacgttcgaccgagacagggcaggtgtacctcagcgacacgtggtcggacaccgacaa
N V R P E T G E V Y L S D T W S D T D K 106
361 GCACTACGGCACCAGATTCTTGGAACGATGTGGGGACCAACGTGTACGGCTGTGTGAAACA
H Y G T D S W N D V G T N V Y G C V K Q 126
421 ATTGTTCTCTTGAAAAAGCCAAACCGCAAGCTTAAGGTTCTGCTGTCTATCGGTGGATG
L F L L K K A N R K L K V L L S I G G W 146
481 GACCTACTCATCCAACCTTCGTGCAACCCGCGCAGCACTGCTGCAGGTAGAAGCAAGTTCGC
T Y S S N F V Q P A S T A A G R S K F A 166
541 AAGCAGTGCCTGCGAGCTTGTCAAGGACCTCGGCTTCGACGGTCTTGACATTGACTGGGA
S S A V Q L V K D L G F D G L D I D W E 186
601 GTACCCCTCTGATGCTACGCAAGCTGCCAACATGGTCGCTCTCTCGCCGAAGTCCGCTC
Y P S D A T Q A A N M V A L L A E V R S 206
661 gcaactcaacgcctacgctgcccagtagcgaacggcgccctatgcttctcactgtcgc
Q L N A Y A A Q Y A N G A P M L L T V A 226
721 TTCACCCGCTGGCCAGCAACTACCAGAATATGGACCTTGCTGGCATGGACAAGTACCT
S P A G P A N Y Q N M D L A G M D K Y L 246
781 AGACTTCTGGAACCTGATGGCTTACGACTATGCCGGCTCTGGGATACTACTTCCGGTCA
D F W N L M A Y D Y A G S W D T T S G H 266
841 CCAGGCCAGCTTCTACCCTTCGACAAGCAACCCTACCAGTACACCCTTTAACCCAAGCA
Q A S F Y P S T S N P T S T P F N T K Q 286
901 AGCTATTGACTACTACACCTCTAATGGTGTGCGGCATCCAAGATCACGCTCGGTATGCC
A I D Y Y T S N G V A A S K I T L G M P 306
961 GTTGTATGGTCGTCTTCCAGAACACCCGCGGCCCTGAAAGCCCTACTCTGGTATCGG
L Y G R A F Q N T G G P G K P Y S G I G 326
1021 TCCTGGCACCTGGGAGGCTGGCGTGTACGACTACAAGACACTCCCGCAAGCCGGTGGCTC
P G T W E A G V Y D Y K T L P Q A G A S 346
1081 AGTCGTCATGATGCCAGCTGGCGGCGAGCTATAGCTACGACTCTGCTTCGCGGACGAT
V V N D A S L A A S Y S Y D S A S R T M 366
1141 GATCTCTACGATACCCCGCGATCATCCAGCAGAAGACCGGCTCATAAAGTCCCTTGG
I S Y D T P A I I Q Q K T G L I K S L G 386
1201 TCTCGGCGGTGATGTGGTGGAAAGCAGCTCGGACAAGACGGGCCCGGATTCTCTGAT
L G G G M W W E S S S D K T G P D S L I 406
1261 CTCGACTTACGTCAACTCCGTCGGCGGTGTCGGCGCCCTCGACCAGAGTGCCACAGTCTCT
S T Y V N S V G G V G A L D Q S A N V L 426
1321 GACGTAATCGGGTCCAAGTACGATAACCTCCGGTCTGGCTTCCCCAACAACTAGgtcgg
T Y S G S K Y D N L R S G F P N N * 443
1381 cctccaagctcgaatgtgacttatagctttttcgcattcttgacactcgtctgccaat
1441 acgttgtgacttcagagtcctcctatcttcacggccactgttcggtgcttcattggcccggt
1501 catgccaacttttttcgcttcgcttcttctgatacttgaagaggtccggggcagcg
1561 gcaccttggggaggttgggttgcgtattcgttcttctgtatctacattcgtcggcagt
1621 acatcccttgttttagggagcatgcatgagatagaggaagggatgggagatggaaactgg
1681 tgagtgatccactgaagcactcgttatcacatggttcctaatacatcttgggtgactggt
1741 aaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

12. **ábra** A *cmchl* cDNS klón és feltételezett fehérje termékének szekvenciája. Felül a nukleotidsorrend látható, alatta az aminosavsorrend. A számok a bal oldalon a nukleotidok pozícióját jelzik a cDNS klónon, a jobb oldalon pedig az aminosavak pozícióját a fehérjetermékben. A nem-kódoló DNS szakaszok kis betűkkel vannak jelölve. A SignalP program által jósolt szekréciós szignált bekereteztük, a potenciális N-glikozilációs szignálokat pedig aláhúzással jelöltük. Szaggatott vonal mutatja a degenerált primerek tervezésekor figyelembe vett konzervatív régiókat.

kaptuk, nevezetesen az *Aspergillus nidulans* CHIB enziméhez 60%, az *A. album* CHI1 enziméhez 57%, a *Coccidioides immitis* kitináz antigénjéhez 56%, és a különböző *Trichoderma* fajokból izolált 42 kDa endokitinázokhoz 54%.

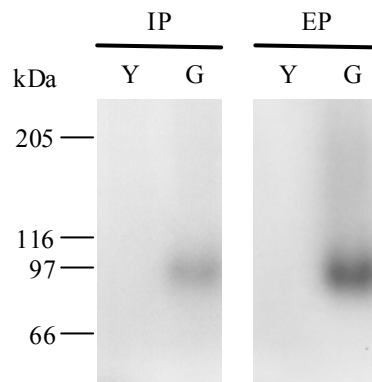
Southern hidridizációval kimutattuk, hogy mind a *cmg1*, mind pedig a *cmch1* egy kópiában van jelen a *C. minitans* genomjában (13. ábra). Ebben a kísérletben azt is igazoltuk, hogy a *S. sclerotiorum* nem tartalmaz olyan homológ szekvenciát, amely kereszthibridizációt mutatna a két *Coniothyrium* eredetű génnel.



13. ábra A *cmg1* (A) és a *cmch1* (B) gének kópiszámának meghatározása Southern hibridizációval. Az emésztett *Coniothyrium* DNS mintákhoz a teljes hosszúságú cDNS klónokat hibridizáltuk nem szigorú mosási paramétereket alkalmazva. Az A/10-es, valamint a B/1-2-es csatornába *S.sclerotiorum* DNS-t vittünk. Az alkalmazott enzimek: (A) 1, *Pst*I; 2, *Pvu*II; 3, *Pst*I-*Pvu*II; 4, *Eco*RI; 5, *Bam*HI; 6, *Xho*I; 7, *Pst*I-*Eco*RI; 8, *Pst*I-*Bam*HI; 9, *Pst*I-*Xho*I; 10, *Eco*RI. (B) 1, *Eco*RI; 2, *Hind*III; 3, *Bam*HI; 4, *Xho*I; 5, *Eco*RI; 6, *Hind*III; 7, *Apa*I; 8, *Hind*III-*Apa*I.

4.2.3. A *CMG1* GÉN KIFEJEZTETÉSE *S. CEREVISIAE*BEN – TISZTÍTÁS, JELLEMZÉS

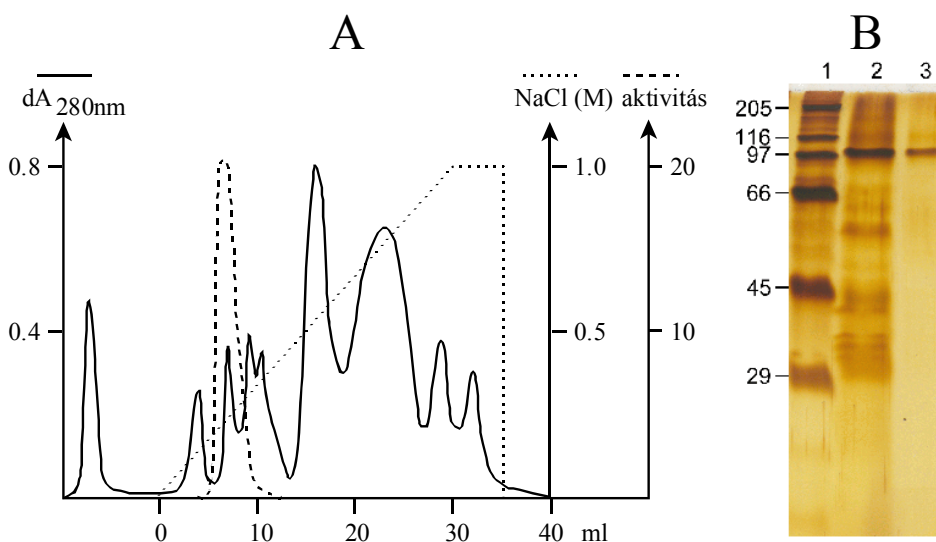
Annak igazolására, hogy a struktúra alapján klónozott *cmg1* gén valóban enzimaktivitást mutató fehérjét kódol, heterológ gazdában fejeztettük ki a gént. A teljes kódoló régiót tartalmazó 2,8 kb nagyságú *MluI-XhoI* fragmentumot ligáltuk a pYES2 expressziós vektorba, amely a beépített DNS szakasz galaktózzal történő indukálhatóságát biztosítja megfelelő *S. cerevisiae* törzsben. A *cmg1*-et hordozó vektort pYGL-nek neveztük el. A pYGL plazmiddal, valamint kontrollként a pYES2 plazmiddal *S. cerevisiae* INVSc1 törzséből készített kompetens sejteket transzformáltunk. A pYGL-t, illetve a pYES2-t hordozó transzformánsokból galaktózzal indukált intra- és extracelluláris fehérjét tisztítottunk, majd elválasztottuk SDS-PAGE segítségével. A fehérjék renaturálását követően a gélből mutattunk ki β -1,3-glükanáz aktivitást. A 14. ábrán jól látható, hogy egy ~100 kDa méretű enzimet tudunk kimutatni a *cmg1*-et expresszáló törzsből, míg nem tapasztaltunk aktivitást az “üres” plazmiddal transzformált törzs fehérje mintáiban.



14. ábra β -1,3-glükanáz aktivitás kimutatása gélből SDS-PAGE után. A *S. cerevisiae* INVSc1 törzset transzformáltuk a pYES2 (Y), illetve a pYGL (G) plazmiddal, majd galaktózzal indukáltuk a törzseket. Az intracelluláris fehérje kivonatukból (IP) 100 μ g-ot, a tizenötszörösére töményített tenyészet-szűrletekből (extracelluláris protein, EP) pedig 15 μ l-t elválasztottunk SDS-PAGE-vel és a gélből renaturálást követően hívtuk elő a β -1,3-glükanáz aktivitást mutató csíkokat. A molekula tömeg markerek pozíciója a bal oldalon látható.

A pYGL(INVSc1) törzs tenyészet-szűrletét mintegy ezerszeres töményítés után anion cserélő kromatográfiával frakcionáltuk. Meghatároztuk a frakciók glükanáz

aktivitását, és sótalanítást, valamint töményítést követően a legmagasabb aktivitást mutató frakció fehérje tartalmának homogenitását SDS-PAGE-t követő ezüsfestéssel ellenőriztük (15. ábra). Egyetlen erősen festődő sávot észleltünk ~100 kDa méretnél. Meghatároztuk a fehérje N-terminálisán elhelyezkedő első kilenc aminosav sorrendjét. A kapott szekvencia (APAPGAASG) teljes mértékben megegyezett a *cmg1* által kódolt feltételezett fehérjében a 32-40. aminosavat felölelő szakasznak (11. ábra).

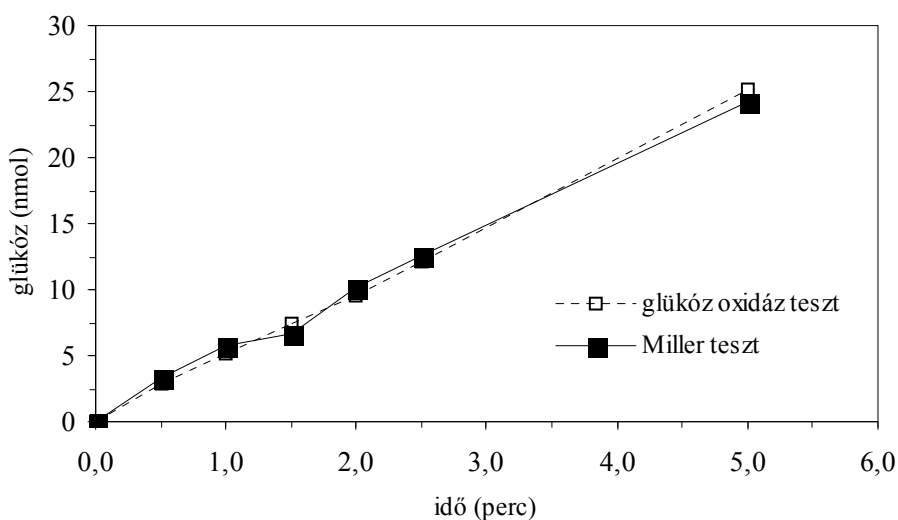


15. ábra A CMG1 enzim tisztítása a pYGL plazmival transzformált *S. cerevisiae* INVSc1 törzs tenyésztésűrlétéből. (A) Ioncsere-kromatográfia MonoQ oszlopon; aktivitás: nmol glükóz/perc. (B) A legnagyobb aktivitást mutató frakció fehérje homogenitásának ellenőrzése SDS-PAGE-t követő ezüsfestéssel. 1, Molekulatömeg marker; 2, nem-frakcionált tenyésztésűrlét; 3, 8-as frakció.

Meghatároztuk a rekombináns CMG1 enzim szubsztrátspecificitását. A kísérletbe különböző monomerekből felépülő, eltérő glikozidos kötéseket tartalmazó polimereket vontunk be. Redukáló cukor felszabadulást kizárólag a tiszta β -1,3-glükánból álló laminarinból, valamint a *C. minutans* egyik fő gazdájából, a *S. sclerotiorum* szkleróciumaiból tisztított sejtfalból tudtunk kimutatni. A szklerócium sejtek falának fő

alkotóelemei a melanin, a kitin és a jórészt 1,3-glikozidos kötéseket tartalmazó β -glükán. A laminarinon mért aktivitás mintegy hússzorosa volt a sejt falon mért aktivitásnak.

Annak érdekében, hogy kísérletesen igazoljuk azt, amit a szekvencia összehasonlítások sugalltak, hogy a *cmg1* által kódolt glükánáz exo típusú, az alábbi tesztet végeztük el. Mértük a CMG1 által a reakció során laminarinból felszabadított glükóz-ekvivalens redukáló cukrok megjelenésének a sebességét és mértékét, valamint ugyanabból a reakcióból mérve meghatároztuk a glükóz felszabadulás sebességét és mértékét. Mivel a glükózekvivalens redukáló cukrok és a glükóz felszabadulásának sebessége és mértéke megegyezett (16. ábra), arra következtettünk, hogy a hidrolízis terméke kizárólag glükóz, következésképpen a CMG1 enzim exo- β -1,3-glükánáz.



16. ábra A CMG1 enzim laminarinból felszabadított hidrolízis termékeinek vizsgálata.

4.2.4.A CMG1 ENZIM HATÁSA A *S. SCLEROTIORUM* NÖVEKEDÉSÉRE

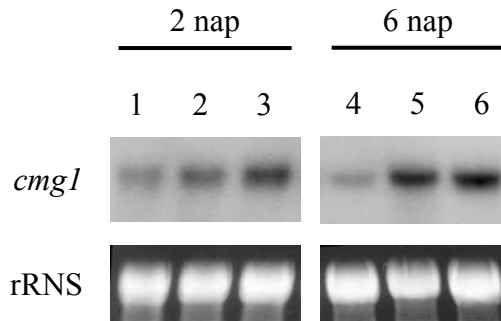
Megvizsgáltuk, hogy az élesztő által termelt, tisztított CMG1 enzim gátolja-e a *S. sclerotiorum* növekedését. Huszonnégy lyukú mikrotiter lemez mélyedéseibe öntött vizes agaron 12 órán át előneveltük a növénykórokozót, ezt követően felülöntöttük 50 μ l

citrát pufferben (50 mM, pH=4,8) oldott enzimmel, illetve – kontrollként – enzim mentes pufferrel, vagy 5 perces forralással inaktivált enzimmel. Az enzimet 300 és 600 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A telepnövekedést a felülöntést követően azonnal, majd egy, illetve hét óra elteltével sztereo mikroszkópban elhelyezett okulár mikrométerrel mértük. Azt tapasztaltuk, hogy a CMG1 enzim 300 µg/ml koncentrációban alkalmazva 35%-os, míg 600 µg/ml koncentrációban 85%-os micélium növekedés gátlást okozott a pufferrel felülöntött kontrollhoz képest. A hőinaktivált enzim ezzel szemben nem gátolta a *S. sclerotiorum* micélium növekedését.

4.2.5.A *CMG1* GÉN MEGNYILVÁNULÁSA

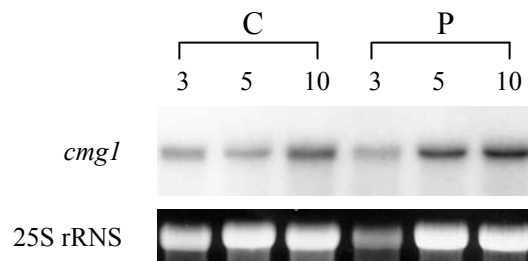
Megvizsgáltuk milyen hatással vannak különböző szénforrások a *cmg1* gén megnyilvánulására. Glükózzal, illetve darált szkleróciummal kiegészített SM tápoldatban rázatva tenyésztettük a Cm-2 törzset kettő, illetve hat napig. A szűrt micéliumból RNS-t vontunk ki, elektroforézissel elválasztottuk és a mintákhoz a *cmg1* gént hibridizáltuk. 2% glükóz alkalmazása esetén a katabolit represszió által szabályozott gének, mint például a fonalas gombák sejtfallbontó enzimgénjeinek túlnyomó többsége, nem nyilvánulnak meg. A 0,1% kezdeti glükóz koncentráció az “éhezést”, a darált szkleróciuum pedig a parazitizmus során a behatoló gomba számára elérhető egyedüli szénforrást modellezte. Amint a 17. ábrán látható, azt tapasztaltuk, hogy a *cmg1* gén transzkriptumai minden mintában jelen voltak, azaz 2% glükózon is megnyilvánult a gén. Az expresszió szintje nagyobb volt a tenyésztés elején (2 nap után, 17. ábra – 1-es sáv), mint a késői szakaszban (6 nap után, 17. ábra – 4-es sáv). Éhezés vagy darált szkleróciuum hatására a 2% glükózon észleltekhöz képest erősebb transzkripciót tapasztaltunk, különösen hat nap elteltével.

Szintén megvizsgáltuk a *cmg1* gén expresszióját parazitizmus alatt. Ehhez 0,1% glükózt tartalmazó, celofánnal fedett SM agar csészén *C. minitans* konídium szuszpenzióval fertőztünk *S. sclerotiorum* szkleróciuumokat. Kontrollként szkleróciuumot nem tartalmazó tápoldalon növesztettük a *C. minitans*-t. Mivel alacsony specificitású Southern hibridizációval bizonyítottuk, hogy a *S. sclerotiorum* nem tartalmaz a *cmg1*-el homológ szekvenciát (13. ábra), így a egyes tenyészetekben a szignál kizárólag a *C. minitans cmg1* génjéről származik. A radioaktívan jelölt *cmg1*-et hibridizáltuk három, öt



17. ábra A *cmg1* gén expressziójának vizsgálata Northern hibridizációval. A *C. mitans* Cm-2 törzset kettő, illetve hat napig tenyésztettük SM tápoldatban, amelyet szénforrásként 2% glükózzal (1 és 4 jelű csatornák), 0,1% glükózzal (2 és 5), vagy 0,25% darált szkleróciummal (3 és 6) egészítettünk ki. RNS-t vontunk ki a leszűrt micéliumból, majd hibridizáltuk a *cmg1* gént az elektroforézissel elválasztott mintákhoz. Az autoradiogramm látható felül, alul pedig mennyiségi kontrollként az etidium-bromiddal festett riboszómális RNS képe.

és tíz nap inkubálás után izolált RNS mintákhoz. A parazitizmus során a relatív expressziós szint végig magasabb volt (18. ábra), mint a kontroll mintákban. A hibridizációs szignálok mennyiségi összehasonlítását az anlySIS szoftverrel elvégezve arra a megállapításra jutottunk, hogy az emelkedés mértéke mintegy kétszeres a három és öt napos mintákban, és mintegy másfélszeres a tíz napos mintában.



18. ábra A *cmg1* gén expressziójának vizsgálata Northern hibridizációval. A *C. mitans* Cm-2 törzset kettő, illetve hat napig tenyésztettük SM tápoldatban, amelyet szénforrásként 2% glükózzal (1 és 4 jelű csatornák), 0,1% glükózzal (2 és 5), vagy 0,25% darált szkleróciummal (3 és 6) egészítettünk ki. RNS-t vontunk ki a leszűrt micéliumból, majd hibridizáltuk a *cmg1* gént az elektroforézissel elválasztott mintákhoz. Az autoradiogramm látható felül, alul pedig mennyiségi kontrollként az etidium-bromiddal festett riboszómális RNS képe.

4.3. Új tudományos eredmények

Doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatómunka elvégzésének eredményeképpen az alábbi új tudományos eredmények születtek:

1. Izoláltuk a *Trichoderma hamatum* 42 kDa endokitináz enzimét kódoló gént (*Tham-ch*) és *cis* szabályozó elemeit. Meghatároztuk a *Tham-ch* gén nukleotidsorrendjét.
2. Transzformáció útján kétszeresére növeltük a *Tham-ch* gén kópiaszámát a gazdatörzsben (*T. hamatum* Tam-61).
3. Megállapítottuk, hogy a kitinázgént több kópiában hordozó transzformáns törzsek extracelluláris kitinázaktivitása nagyobb, mint a vad típusú recipiens törzsé. A T9 jelű törzs aktivitása közel ötszöröse volt a vad típusú törzs aktivitásának.
4. A specializálódott szklerócium parazita *Coniothyrium minitans* sejtfa-indukált cDNS bankjából izoláltunk egy β -1,3-glükánázt (*cmg1*) és egy kitinázt (*cmch1*) kódoló gént. Meghatároztuk mind a két gén nukleotidsorrendjét.
5. Heterológ gazdában kifejeztettük a *cmg1* gént, a rekombináns enzimet tisztítottuk, jellemeztük: szubsztrát specificitását és hidrolízis termékeit megvizsgálva igazoltuk, hogy a CMG1 exo- β -1,3-glükánáz.
6. Megállapítottuk, hogy a CMG1 enzim képes bontani a *Sclerotinia sclerotiorum* szkleróciumaiból tisztított sejtfa preparátumot, továbbá 300, illetve 600 μ g/ml koncentrációban alkalmazva 35, illetve 85%-ban gátolja e növénykórokozó gomba micélium növekedését.
7. Igazoltuk, hogy a *cmg1* gén expressziója felerősödik szklerócium parazitizmus során, valamint azt, hogy 2% glükóz hatására sincs teljes represszió alatt.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. A *T. hamatum* homológ transzformálása a *Tham-ch* génnel

A biológiai védekezés mint környezetbarát növényvédelmi technológia szélesebb körű elterjedésének egyik alapfeltétele a jelenleg használt mikroba törzseknél jóval hatékonyabbak előállítása. A törzsnemesítés egyik útja lehet transzgénikus mikroorganizmusok molekuláris biológiai módszerekkel való előállítása (Haran et al., 1996a). Bár aligha valószínű, hogy a közeli jövőben engedélyeznék genetikailag módosított mikroorganizmusok szabadföldi kibocsátását, a biológiai védekezésre alkalmas törzsek genetikai manipulálásának mégis van létjogosultsága, ugyanis a transzgénikus törzsek vizsgálata rendkívül hasznos információt szolgáltat egy adott génnek a biológiai védekezésben betöltött szerepéről, és így támpontot adhat a természetből izolált törzsek szelekciós kritériumainak meghatározásához (Handelsmann és Stabb, 1996).

Egy igen jó mikoparazita képességű *T. hamatum* izolátumból (Tam-61) (Turóczy et al., 1996) klónoztuk a *T. harzianum* 42 kDa endokitináz génjének (*ech42*) homológját, amelyet *Tham-ch*-nak neveztünk el. Az volt a célunk, hogy saját, indukálható promóterével vezérelt, megemelkedett kópiaszámú transzformánsokat állítsunk elő. A konstitutív promóterek használatával szemben a törzsnemesítésben az indukálható promóterek előnye az, hogy a transzgénikus organizmus gazdaságosabban használja fel energia forrásait, nem „pazarolja” energiáit a transzgén és terméke kifejeztetésére, csak amikor szüksége van rá. A *T. harzianum* 42 kDa endokitináz génjéről ismert volt, hogy glükóz által represszált és erősen indukálódik mikoparazita kölcsönhatás alatt, valamint különböző stressz hatások esetén is (Carsolio et al., 1994; Lorito et al., 1996a; Mach et al., 1999). A *Tham-ch* gén promóterének szekvencia analízise azt sugallta, hogy az általunk klónozott génszakasz hasonló szabályozás alatt állhat a Tam-61 törzsben is, és tartalmaz minden olyan elemet, amely szükséges az indukált expresszióhoz (4. ábra). A gén expressziójának vizsgálata *in vitro* rázatott kultúrában, amelyben kizárólagos szénforrásként glükózt vagy *R. solani* sejtflatat alkalmaztunk (5. ábra), megerősítette a

fenti hipotézist és azt jelezte, hogy kezünkben van a teljes gén, ami alkalmas a transzformációs kísérletekbe való bevonásra.

A *T. hamatum* Tam-61 törzsét transzformáltuk a saját promóterével és terminátor régiójával irányított *Tham-ch* gént tartalmazó plazmiddal, a pECTR1-el. Mielőtt a transzformáns törzseket jellemeztük, monospórázással biztosítottuk a primér transzformánsok genetikai homogenitását. Erre azért volt szükség, mert a primér transzformánsok többnyire heterokariotikusak, amit egyrészt az okoz, hogy a *Trichoderma* protoplasztok általában többmagvúak (Sivan et al., 1992), másrészt a sejtmagoknak csak kis hányada "fogadja be" az idegen DNS-t. Ráadásul a PEG kezelés hatására protoplaszt fúzió is lejátszódhat. Az általunk előállított primér transzformánsok szektoros növekedése (19. ábra), valamint higromicin rezisztens fenotípusuk nem-szelektív körülmények között tapasztalt elvesztése egyértelműen azt jelezte, hogy genetikailag inhomogén, heterokariotikus törzsekkel van dolgunk. A primér transzformánsok genetikai tisztítása céljából monospórázást hajtottunk végre higromicint



19. ábra A pECTR1 plazmiddal transzformált primér transzformánsok szektoros növekedése. A képen hét napos, higromicinnel kiegészített (200 µg/ml) burgonya glükóz agar csészéken nőtt primér transzformánsok láthatók, kivéve balra lent, ahol a recipiens (*T. hamatum* Tam-61) látható antibiotikum mentes csészén növesztve.

tartalmazó táptalajon. Mivel a *Trichoderma* konídiumok egymagvúak, a várakozásnak megfelelően az összes monospórázott higromicin rezisztens utód törzs egységes volt, nem különbözött telepmorfológiában, növekedési sebességben, konídium termelésben a vad típusú recipiens törzstől, továbbá stabilnak bizonyult nem-szelektív körülmények között is.

Fonalas gombák stabil transzformálása esetén a vektor integrálódik a recipiens kromoszómájába (Timberlake, 1991). Ez alapvetően kétféle módon történhet: homológia alapján, vagy véletlenszerűen. Mindkét esetben lejátszódhat egykópiás, illetve ún. tandem beépülés, amikor egymást követő kópiák (amelyek száma változó lehet, orientációja mindig megegyezik) integrálódnak. Biológiai védekezésben használt *Trichoderma* törzsek transzformálása során korábban nem tapasztaltak homológia alapján történő integrálódást, a véletlenszerű beépülés pedig az esetek többségében tandem módon történt (Herrera-Estrella et al., 1990; Lorito et al., 1993b; Sivan et al., 1992). A mi eredményeink ezzel szemben éppen arra utalnak, hogy a transzformáló vektor (pECTR1) az általunk használt rendszerben a homológia alapján történő integrálódást részesítette előnyben: tíz esetből kilenc alkalommal az endogén kitináz lokuszba épült be, ráadásul zömmel egy kópiában (kilenc esetből hétszer) (7. ábra). A tandem kópiák instabilnak bizonyultak mind a homológ integránsok, mind az egyetlen nem-homológ integráns esetén, tehát az általunk használt transzformációs rendszerrel a gén kópiaszámának csak a kétszeresét lehetett elérni. A homológ beépülés előnye az lehet, hogy a megfelelő kromoszómális környezetbe kerül a transzgén, ahol nem érik a pozíciójából eredő negatív hatások. A tandem beépülés előnye, hogy több kópiától nagyobb expressziós szint várható. A homológ egykópiás integrálódásnak van egy speciális alkalmazási területe: megfelelő génkonstrukció elkészítése esetén lehetőséget nyújt null-mutánsok előállítására, ami lehetővé teszi egy adott gén funkciójának a vizsgálatát (Timberlake, 1991). Az integrálódás típusát azonban fonalas gombák esetén nem lehet irányítani, csak a megtörtént események kimutatásáról lehet szó.

A transzformánsok többségében megemelkedett kitináz génextpressziót és megnövekedett extracelluláris kitinázaktivitást mutattunk ki a vad típusú recipienshez viszonyítva. A T8 jelű törzs volt az egyetlen, amelynek kisebb volt a kitinázaktivitása, mint a Tam-61-nek, és az volt az egyetlen transzformáns, amelyben a vektor

integrálódása nem homológia alapján történt. Elképzelhető, hogy ebben a törzsben az integrálódás olyan régióban történt, amelynek a működése pozitív hatást gyakorol a gomba extracelluláris kitinázaktivitására, és a beépülés zavart okozott.

Nem bizonyultak hatékonyabb parazitának a transzformánsok a recipienshez képest *in vitro* csészetesztben két fontos talajlakó növénykórokozó, a *S. sclerotiorum* és a *R. solani* ellen. Ez jelentheti azt, hogy a két említett gazda hatékonyabb legyűrésében nem a kitinázaktivitás jelenti a „szűk keresztmetszetet”. Előfordulhat az is, figyelembe véve a *Trichodermák* kitináz rendszerét alkotó izoenzimek gazdafüggő megnyilvánulását (Haran et al., 1996b), hogy hiába van jelen nagyobb mennyiségű 42 kDa endokitináz, ha a nagyobb parazita aktivitáshoz egy másik sejtfalbontó enzim (nem is feltétlenül egy kitináz) szintjének a növekedésére lenne szükség. A mi munkánk megjelenése idején nem volt kísérletesen alátámasztott információ arról, hogy egyetlen enzimgén milyen mértékben járul hozzá egy olyan összetett képesség kialakításához, mint a mikoparazita aktivitás. Bár már 1994-ben publikálták a *T. harzianum* 42 kDa kitinázát kódoló gén klónozását (Carsolio et al., 1994), és azt követően több szerző többször felvetette a null-mutáns előállítás jelentőségét (Goldman et al., 1994b; Haran et al., 1996a), csak 1999-ben jelent meg tudományos közlemény – igaz mindjárt három független munka (Baek et al., 1999; Carsolio et al., 1999; Woo et al., 1999) – arról, hogy inaktiválták az *ech42* gént egy mikoparazita *Trichodermában* és tesztelték a mutánsok biológiai védekezésre való alkalmasságát. Az eredmények látszólag ellentmondanak egymásnak. Carsolio és munkatársai (1999) nem tapasztaltak különbséget a null-mutánsok és a vad típus között, amikor *R. solani* okozta palántadőlés ellen használták a gombákat. Ezzel szemben Baek és munkatársai (1999) azt találták, hogy a mutánsok hatékonysága romlott. Woo és munkatársai (1999) a három tesztelt növénykórokozó esetében három különböző eredményt kaptak: *P. ultimum* ellen nem változott, *B. cinerea* ellen csökkent, míg érdekes módon *R. solani* ellen nőtt a mutánsok vad típuséhoz viszonyított hatékonysága. Úgy tűnik tehát, hogy egy adott lítikus enzimgén fontossága, a mikoparazitizmusban és ezzel összefüggésben a biológiai védekezésben játszott szerepe törzsfüggő és gazdafüggő is. Nem várhatunk tehát általános hatékonyság javulást egyetlen enzim túltermeltetésével, de azért szelektív módon növelhetjük ezen az úton a biológiai növényvédelem hatékonyságát.

5.2. A *C. minitans* sejtfalbontó enzimgénjei

Sejtfalbontó enzimek, elsősorban β -1,3-glükánázok és kitinázok termelését számos esetben hozták összefüggésbe mikoparazita gombák biológiai aktivitásával (Haran et al., 1996a; Archambault et al., 1998; de la Cruz et al., 1995; Lorito, 1998). Feltehetően a gazdagomba sejtfalán keresztül történő behatolást segítik ezek az enzimek. Ezen felül szerepük lehet az elpusztított áldozat kolonizálásában és táplálékként való elfogyasztásában. A legismertebb és a biológiai védekezésben legyakrabban alkalmazott mikoparaziták, a *Trichodermák* lítikus enzimszisztémájáról viszonylag nagy mennyiségű információ gyűlt már össze, számos enzimet tisztítottak és jellemeztek ezekből a fajokból és jónéhánynak a génjét is klónozták már (Lorito, 1998; Benítez et al., 1998). Ezzel szemben a *C. minitans* szklerócium parazita gomba hidroláz rendszeréről alig van adat az irodalomban, jóllehet igen hatékony komponensekből állhat, hiszen a parazita képes áthatolni a rendkívül kemény, ellenálló szklerócium sejtrétegein. Jones és munkatársai (1974) igazolták, hogy a *C. minitans* termel egy endo- és egy exoglükánázt, amelyek szinergista módon képesek a szkleróciumból tisztított sejtfal bontására. Semmilyen adat nincs viszont a glükánázok fiziko-kémiai tulajdonságairól, szabályozásukról, genetikai hátterükről. Egyáltalán nincs információ a hiperparazita kitinázrendszeréről, amely pedig feltehetően szintén fontos szerepet játszik a sejtfalbontásban, és így a hatékony parazita életmód biztosításában.

Gomba eredetű kitinázokban és β -1,3-glükánázokban azonosított homológ régiók alapján izoláltunk a *C. minitans*-ból egy kitináz (*cmch1*) és egy glükánáz gént (*cmg1*). Eredményeink arra utalnak, hogy az általunk tervezett és használt degenerált primerek alkalmasak más fonalas gombák hasonló génjeinek klónozására.

A *cmg1* gén termékének aminosav szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutatott különböző fonalas gombákból származó β -1,3-glükánázokhoz a fehérje teljes hossza mentén (11. ábra). A homológia mértéke jóval nagyobb volt exo-glükánázokhoz (42-69%), mint az egyetlen, fonalas gombából izolált endoglükánázhoz (27%), ami arra utalt, hogy a CMG1 exo-glükánáz. Az enzim **exo**-típusú hasítási mechanizmusát sikerült kísérletesen is igazolni, amikor mértük a glükóz és a glükóz ekvivalens redukáló cukrok felszabadulását (16. ábra). Szubsztrát specifitását megvizsgálva arra a megállapításra

jutottunk, hogy nagy specificitással 1,3- β -glikozidos kötéseket hasít, 1,4-, 1,3(4)-, vagy 1,6-glikozidos kötéseket tartalmazó polimereket nem fogadott el szubsztrátként. Figyelemre méltó az is, hogy az enzim képes volt a szklerócium sejtfal hidrolízisére is.

A glikozil-hidrolázok aktív centrumában két aminosav, a katalitikus sav és a katalitikus nukleofil játszik kulcsfontosságú szerepet a hidrolízisben (Warren, 1996). Az esetek túlnyomó többségében ebben a két pozícióban glutaminsav található, illetve néhány enzimben azonosítottak aszparagisav oldalláncot a katalitikus sav szerepében. Bár a CMG1 szekvenciája tartalmaz számos glutaminsav oldalláncot, egyik környezetében sem találtunk olyan motívumokat, amelyek jellemzőek a különböző élesztőkből, illetve árpából származó β -1,3-glükánázok aktív centrumára (Chen et al., 1995; Mackenzie et al., 1997). Azonosítottunk azonban két régiót, nevezetesen a 68. és a 90., valamint a 428. és a 450. aminosav közötti szakaszokat, amelyek a glükánáz enzimeken kívül különböző fehérjékkel, mint például egy bakteriofág nyaki proteinnel, poligalakturonázokkal, neuraminidázokkal mutattak hasonlóságot (hivatkozások: [Nikolskaya et al., 1998]-ban). Ezeknek az eltérő funkciójú fehérjéknek az a közös tulajdonságuk, hogy glükánokkal lépnek kölcsönhatásba, ami arra utal, hogy a fent megjelölt régiók valószínűleg a szubsztrátkötésben tölthetnek be szerepet.

A SignalP programmal végzett szekvencia analízis (Nielsen et al., 1997) azt jelezte, hogy a CMG1 fehérje egy 24 aminosav hosszúságú szekréciós szignált hordoz az N-terminálison. A heterológ gazda *S. cerevisiae* valóban szekretálta a *cmg1* gén termékét, a rekombináns enzim N-terminálisa azonban a 32. pozícióban lévő alanintól kezdődött, azaz hét aminosavval a számítógépes előrejelzéssel megállapított hasítóhely után (11. ábra). Erre az az egyik lehetséges magyarázat, hogy a szignál peptid lehasítását követően további proteolitikus érésen megy keresztül az enzim, ami gyakori esemény a szekretált eukarióta enzimek körében (Archer és Peberdy, 1997). A megjósolt szignál peptid hasítóhelyet közvetlenül követő régióban egy jellegzetes dipeptidekből (X-Ala vagy X-Pro) álló motívum található a CMG1 szekvenciában (11. ábra). Ez a motívum a szubsztrátja az aminodipeptidáz A nevű enzimnek, amiről ismert, hogy részt vesz különböző élesztők bizonyos extracelluláris fehérjéinek – többek között a *S. cerevisiae* egyik szekretált feromonjának, illetve a *Yarrowia lipolytica* extracelluláris proteázának –

érésében (Julius et al., 1983; Matoba et al., 1997). Elképzelhető, hogy a CMG1-et termelő élesztőben is ez a folyamat játszódik le.

Nemcsak a rekombináns fehérje N-terminálisa, hanem a mérete is eltért a számítógép által megjósolttól. A becsült ~82 kDa helyett ~100 kDa volt a mérete az élesztő által szekretált CMG1 enzimnek (15. ábra). Ez nagy valószínűséggel a heterológ gazda túlzott glikozilálásának a következménye, amit több esetben megfigyeltek már *S. cerevisiae*ben végzett heterológ fehérje expresszió alkalmával (Penttila et al., 1988).

Mikoparazita gombák sejtfalbontó enzimeit kódoló gének szabályozásáról egyre több ismeret lát napvilágot. A gének többsége glükóz által represszált, ugyanakkor autoklávozott micéliummal, gomba sejtfal kivonattal, illetve a sejtfalat alkotó polimerekkel (laminarinnal, kitinnel) indukálható (Lora et al., 1995; Haran et al., 1996a; Cohen-Kupiec et al., 1999; Rotem et al., 1999). A *T. harzianum*ból izolált proteínáz és endokitináz génekről bizonyították, hogy transzkripciójukat a parazita és a gazda közötti kölcsönhatás beindítja (Cortes et al., 1998; Zeilinger et al., 1999). Egyes gének expressziója különböző stresszhatásokra, szénforráshiány okozta éhezésre is megemelkedik (Lora et al., 1995; Margolles-Clark et al., 1996b; Mach et al., 1999). Az általunk izolált *cmg1* gén expressziójának vizsgálatokor némi meglepetésre azt tapasztaltuk, hogy a glükóz csak kis mértékben represszálja. Ez különösen igaz a tenyésztés korai stádiumára (2 nap után, 17. ábra), amikor még erőteljesen növekvő fázisban van a gomba. Később az expresszió szintje visszaesik (6 nap után). A csökkenés nem magyarázható szénforráshiánnyal, ugyanis a 6. napon a tápoldat glükóztartalma még mindig ~1% volt. Éhezési körülmények között (0,1% glükóz), valamint egyedüli szénforrásként *S. sclerotiorum* szklerócium örleményt tartalmazó tápoldatban a *cmg1* transzkriptumok szintje nagyobb volt, mint 2% glükózon (17. ábra). Az éheztetett és a szkleróciumon tenyésztett kultúrákat mikroszkóppal ellenőriztük, hogy megállapíthassuk, nem az autolízis játszik-e szerepet a megemelkedett expresszióban. Minden mintában épnek találtuk a *Coniothyrium* micéliumot, egyedül a hat napos éheztetett tenyészetben volt megfigyelhető erősebb sporuláció. Az *in vitro* rázatott tenyészetben elvégzett vizsgálatok mellett csészeteszekben kimutattuk, hogy a *cmg1* gén expressziója felerősödik *S. sclerotiorum* szkleróciumával létrejött parazita kölcsönhatás során. Eredményeink arra utalnak, hogy a *cmg1* sokrétű szabályozás alatt

áll, aminek alaposabb megismerése további kísérleteket igényel, valamint azt is sugallják, hogy ennek a génnek szerepe van a szklerócium parazitizmusban.

Számos közleményben adtak hírt gombaeredetű sejtfalbontó enzimének felhasználásáról a biológiai védekezés hatékonyságának javítására. Többféle stratégiát alkalmaztak a cél elérése érdekében. (1) Megnövekedett mikoparazita képességű transzgénikus törzseket hoztak létre (Flores et al., 1997; Mighéli et al., 1998; Limón et al., 1999). (2) Az *ech42* gén transzgénikus növényekben való kifejeztetésével fokozták a növények kórokozók gombák elleni rezisztenciáját (Lorito et al., 1998; Bolar et al., 2000), és ez a javulás nagyobb mértékű volt, és szélesebb spektrumban jelentkezett, mint amit korábban növényi eredetű gének hasonló célú felhasználása esetén tapasztaltak. Ez összhangban van azzal, hogy gomba eredetű kitinázok és glükánázok *in vitro* vizsgálatokban nagyobb mértékben gátolták a növénypatogén tesztgombákat, mint akár a növényi, akár a baktérium eredetű enzimek (Lorito et al., 1993a). A harmadik lehetőség a hatékony expressziót biztosító heterológ gazdában kifejeztetett, tisztított géntermék hatóanyagként történő használata (Margolles-Clark et al., 1996a).

Úgy gondoljuk, hogy a *C. minitans*ból általunk izolált és jellemzett glükánáz gént, a *cmg1*-et érdemes a fent felsorolt stratégiák valamelyikével a biológiai növényvédelem hatékonyságának fokozását célzó kísérletekbe bevonni. Ezt alátámasztja a rekombináns enzim *S. sclerotiorum* ellen kifejtett gátló hatása. Érdemes lenne azonban a *C. minitans*ból további enzimeket (és génjeiket) izolálni, amelyek együttes alkalmazásával csökkenteni lehetne a gátláshoz szükséges koncentrációt, hiszen e lítikus enzimek szinergisztikusan hatnak.

Míthogy a közelmúltban kidolgozták a *C. minitans* transzformációs rendszerét (Jones et al., 1999), adva van a lehetőség a *cmg1* gén funkciójának géninaktivációs kísérletekkel történő vizsgálatára.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A biológiai növényvédelem segítségével csökkenteni lehet a környezet szintetikus peszticidekkel való terhelését. A növénykórokozó gombák elleni biológiai védekezés legelterjedtebb módja mikoparazita gombák alkalmazása. A mikroorganizmusokkal történő védekezés azonban az esetek többségében kevésbé hatékony és megbízható, mint a szintetikus peszticidek használatán alapuló védekezés. A biológiai védekezés szélesebb körű alkalmazását elősegítheti az antagonista mikrobák biológiájának, genetikájának alaposabb megismerése, és ezeknek az ismereteknek a törzsnemesítésben, illetve az alkalmazási mód optimalizálásában való felhasználása.

Sejtfalbontó enzimek, elsősorban β -1,3-glükánázok és kitinázok termelését számos esetben hozták összefüggésbe mikoparazita gombák biológiai aktivitásával. Valószínű, hogy a gazdagomba sejtfalán keresztül történő behatolást segítik ezek az enzimek. Ezen felül szerepük lehet az elpusztított áldozat kolonizálásában és táplálékként való elfogyasztásában.

A doktori értekezésem alapjául szolgáló munka céljai az alábbiak voltak: (1) A biológiai védekezésre alkalmas mikoparazita *Trichoderma hamatum* kitinázaktivitásának fokozása a 42 kDa endokitináz kódoló gén kópiaszámának növelésével. (2) Kitináz, illetve β -1,3-glükánáz gének klónozása a *Coniothyrium minitans* gombából; a gének jellemzése azzal a céllal, hogy jobban megismerjük e szkleróciumos növénykórokozókra specializálódott mikoparazita sejtfalbontó enzimrendszerét.

A *T. hamatum* Tam-61 törzs genomi könyvtárából szekvencia homológiák alapján klónoztuk a 42 kDa endokitináz enzimet kódoló gént, amelyet *Tham-ch*-nak neveztünk el. A *Tham-ch* gént és *cis* szabályozó elemeit eukarióta szelektációs markert (higromicin rezisztenciát) hordozó vektorba építettük, amellyel a *T. hamatum* Tam-61 törzséből izolált protoplastokat transzformáltunk. Tíz, genetikailag homogén, stabil transzformáns törzset szelektáltunk és jellemeztünk. A kitinázgént tartalmazó transzformáló vektor (pECTR1) kromoszómába integrálódása csak egy kópiában volt stabil, tehát az általunk használt transzformációs rendszer a *Tham-ch* gén kópiaszámának megkésztetésére volt alkalmas. A vektor a homológia alapján történő integrálódást részesítette előnyben, ezt tapasztaltuk kilenc transzformáns esetén, míg egy törzsben a pECTR1 plazmid véletlenszerű beépülését mutattuk ki. Egy kivétellel az összes transzformáns törzs extracelluláris kitinázaktivitása nagyobb volt, mint a vad típusú recipiens törzsé. A legnagyobb aktivitás növekedést a T9 jelű törzs esetében mértük, ez közel ötszöröse volt a vad típusú törzs aktivitásának.

A *C. minitans* hiperparazita gomba sejtfalbontó enzimrendszeréről, amely feltehetően fontos szerepet tölt be a szklerócium-parazitizmusban, alig van adat az

irodalomban. Kitináz és β -1,3-glükánáz enzimek konzervatív régiói alapján degenerált primereket terveztünk, amelyek segítségével izoláltunk egy kitinázt (*cmch1*) és egy β -1,3-glükánázt (*cmg1*) kódoló gént a *C. minitans*ból készített cDNS könyvtárból. Meghatároztuk mind a két cDNS klón teljes szekvenciáját. A *cmch1* gén egy 443 aminosavból álló feltételezett fehérjét kódol, amely nagyfokú hasonlóságot mutat különböző organizmusokból származó kitináz enzimekhez.

Alaposabban jellemeztük a glükánáz kódoló *cmg1* gént és termékét, amely a szekvencia analízis szerint egy 792 aminosavból álló fehérje. A CMG1 protein teljes hossza mentén nagyfokú hasonlóságot mutat fonalas gombákból izolált β -1,3-glükánáz enzimek szekvenciájához. Számítógépes elemzés szerint az N-terminálisán egy 24 aminosav nagyságú szekréción szignál peptidet hordoz. A szekretált fehérje számított molekulatömege 83,3 kDa, izoelektromos pontja 4,73. A *cmg1* gént expresszáló *Saccharomyces cerevisiae* törzs egy ~100 kDa méretű β -1,3-glükánáz enzimet választott ki a tápoldatba. A tisztított rekombináns enzim specifikusan hasított 1,3- β -glikozidos kötéseket, és kizárólag glükóz monomereket szabadított fel a szubsztrátumból, azaz a CMG1 β -1,3-glükánáz enzim. A CMG1 képes volt bontani a *Sclerotinia sclerotiorum* szkleróciumaiból tisztított sejtfa preparátumot, ráadásul 300, illetve 600 μ g/ml koncentrációban alkalmazva 35, illetve 85%-ban gátolta az említett növénykórokozó gomba micélium növekedését.

A *cmg1* egy kópiában van jelen a *C. minitans* genomban. Ellentétben a fonalas gombákból izolált hidroláz gének többségével, expressziója nem teljesen gátolt 2% glükóz jelenlétében. A transzkripció szintje erősödik szénforráshiány okozta éhezés hatására, valamint akkor, ha a tápoldatban öröklött szklerócium az egyedüli szénforrás. A *S. sclerotiorum*mal létrejött parazita kölcsönhatás során szintén emelkedik a *cmg1* gén expressziós szintje, ami arra utal, hogy a *cmg1* génnek szerepe van a szklerócium parazitizmusban.

Gomba eredetű sejtfa bontó enzimek génjeit eredményesen fel lehet használni a biológiai védekezés hatékonyságának javítására. Ezek a gének (1) alkalmasak lehetnek antagonisták mikroorganizmus törzsek nemesítésére, (2) növényekbe való beültetésük esetén gombák elleni rezisztencia fokozására és (3) hatékony expressziót biztosító heterológ gazdában kifejeztetve a tisztított géntermék használható hatóanyagként. Figyelembe véve a CMG1 enzim gomba gátló aktivitását, indokoltnak tartjuk, hogy bevonjuk a *cmg1* gént a biológiai növényvédelem hatékonyságának fokozását célzó kísérletekbe.

SUMMARY

Biological plant disease control is an environmentally sound technology that reduces the amounts of synthetic pesticides delivered into agro-ecosystems. The most frequently applied approach to biocontrol against fungal pathogens has been the use of mycoparasitic species. However, the application of microorganisms as biocontrol agents has been, in general, less effective and reliable than the use of chemical fungicides. The improvement of the efficiency of biological plant disease management requires a better understanding of the molecular biology of biocontrol microbes. This could facilitate the development of (i) superior biocontrol strains possessing greater ability to suppress fungal pathogens, and (ii) improved application methodologies.

Chitinases and β -1,3-glucanases have been suggested to contribute to the mycoparasitic activity of several fungal species by facilitating penetration through the host cell wall structures. The objectives of the work described in this thesis were (i) to develop strains of the biocontrol fungus, *Trichoderma hamatum* with improved chitinase activity, and (ii) to characterize the genetic background of the hydrolytic enzyme systems of the sclerotial parasite, *Coniothyrium minitans*.

A 42 kDa endochitinase encoding gene, *Tham-ch* was cloned by screening the genomic library of *T. hamatum* strain Tam-61 with a PCR-amplified chitinase sequence from the same fungus. *Tham-ch* and its own regulatory sequences were reintroduced into the host strain by PEG-mediated homologous transformation. The integration of the transforming construct was stable only in one copy. Homologous integration occurred in nine transformants, whereas non-homologous integration was detected in one transformant. All but one transformant expressed higher levels of chitinase activity in comparison to the wild type recipient strain; the maximum level of increase rose 5-fold. Duplicating the copy number of the highly conserved ~42 kDa endochitinase encoding gene appears to be one of the means by which the biocontrol capability of *Trichoderma* species could be improved.

During sclerotial infection of *Sclerotinia sclerotiorum* the mycoparasite *Coniothyrium minitans* penetrates through the host cell walls that contain β -1,3-glucan and chitin as the major components. A PCR based strategy was applied to clone a β -1,3-

glucanase encoding gene, *cmg1* and a chitinase encoding gene, *cmch1* from a cDNA library of the fungus. The *cmch1* gene encodes a putative protein of 443 residues showing high homology to chitinases from various organisms.

The glucanase encoding gene and its product were characterized more extensively. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the *cmg1* gene showed high similarity to other fungal exo- β -1,3-glucanases. The calculated molecular mass of the deduced protein (without the predicted 24 amino acids long N-terminal secretion signal peptide) was 83,346 Da and had an estimated pI point of 4.73. *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc1 expressing the *cmg1* gene secreted a ~100 kDa β -1,3-glucanase enzyme (as determined by SDS-PAGE) into the culture medium. N-terminal sequence analysis of the purified recombinant enzyme revealed that the secreted enzyme starts at Ala-32, seven amino acids downstream the predicted signal peptidase cleavage site. The purified recombinant glucanase inhibited *in vitro* the mycelial growth of *S. sclerotiorum* by 35 and 85% at concentrations of 300 and 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The *cmg1* gene is present in the genome of *C. mitans* in a single copy. Northern analyses indicated an elevation of the transcript levels of *cmg1* by both carbon starvation and by the presence of ground sclerotia of *S. sclerotiorum*; only a slight repression was observed in the presence of 2% glucose. The expression of *cmg1* increased during the parasitic interaction with *S. sclerotiorum* suggesting an important role for the gene in mycoparasitism.

Genes encoding cell wall degrading enzymes of mycoparasitic fungi have been suggested to be utilized by various strategies to improve the efficiency of biological plant disease control. Chitinase and/or glucanase genes could be overexpressed in (i) microbial biocontrol agents to enhance their parasitic ability; (ii) in plants to increase their resistance to fungal pathogens; and (iii) in heterologous expression hosts to yield enzyme production at a commercially reasonable scale. The *cmg1* gene of *C. mitans* appears to be a good candidate to be used any of these strategies.

MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- Ahmad, J. S. and Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77:182-189.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. P. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Archambault, C., Coloccia, G., Kermashe, S. and Jabai-Hare, S. (1998). Characterization of an endo-1,3- β -D-glucanase produced during the interaction between *Stachybotrys elegans* and its host *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* 44:989-997.
- Archer, D. B. and Peberdy, J. F. (1997). The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17:273-306.
- Baek, J. M., Howell, C. R. and Kenerley, C. M. (1999). The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* 35:41-50.
- Benhamou, N. and Chet, I. (1993). Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83:1062-1071.
- Benhamou, N. and Chet, I. (1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2095-2099.
- Benítez, T., Limón, C., Delgado-Jarana, J. and Rey, M. (1998). Glucanolytic and other enzymes and their genes. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2., Taylor and Francis Ltd., London, UK, pp 101-127.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II: Intrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69:2357-2372.
- Blaiseau, P. L. and Lafay, J. F. (1992). Primary structure of a chitinase-encoding gene (*chi1*) from the filamentous fungus *Aphanocladium album*: similarity to bacterial chitinases. *Gene* 120:243-248.
- Bolar, J. P., Norelli, J. L., Wong, K.-W., Hayes, C. K., Harman, G. E. and Aldwinckle, H. S. (2000). Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90:72-77.

- Bourne, H. R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:134-142.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Budge, S. P., and Whipps, J. M. (1991). Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant Pathol.* 40:59-66.
- Carsolio, C., Gutiérrez, A., Jiménez, B., Van Montagu, M. and Herrera-Estrella, A. (1994). Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:10903-10907.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I. and Herrera-Estrella, A. (1999) Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:929-935.
- Chen, L., Garrett, T. P., Fincher, G. B. and Hoj, P. B. (1995). A tetrad of ionizable amino acids is important for catalysis in barley beta-glucanases. *J. Biol. Chem.* 270:8093-8101.
- Cherif, E. and Benhamou, N. (1990). Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80:1409-1414.
- Chet, I., Benhamou, N. and Haran, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2., Taylor and Francis Ltd., London, UK, pp 153-172.
- Cohen-Kupiec, R., Broglie, K. E., Friesem, D., Broglie, R. M. and Chet, I. (1999). Molecular characterization of a novel β -1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Gene* 226:147-154.
- Cortes, C., Gutierrez, A., Olmedo, V., Inbar, J., Chet, I. and Herrera-Estrella, A. (1998). The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Mol. Gen. Genet.* 260:218-225.
- de la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benitez, T., Pintor-Toro, J. A. and Llobell, A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* 206:859-867.
- de la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benítez, T., Llobell, A. and Romero, R. C. (1995). A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 177:6937-6945.

- Devereux, J., Haerberli, P. and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for VAX. *Nucleic. Acids. Res.* 12:387-395.
- Elad, Y. Chet, I. and Henis, Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28:719-725.
- Elad, Y. Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – SEM studies and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73:85-88.
- Fekete, Cs., Giczey, G., Papp, I., Szabó, L. and Hornok, L. (1995). High-frequency occurrence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:295-299.
- Fekete, C., Weszely, T. and Hornok, L. (1996). Assignment of a PCR-amplified chitinase sequence cloned from *Trichoderma hamatum* to resolved chromosomes of potential biocontrol species of *Trichoderma*. *FEMS Microbiol. Lett.* 145:385-391.
- Flores, A., I. Chet, and Herrera-Estrella, A. (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr. Genet.* 31:30-7.
- Geremia, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S. B., Van Montagu, M. and Herrera-Estrella, A. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8:603-613.
- Gerlagh, M., Goossen-van de Geijn, H. M., Fokkema, N. J. and Vereijken, P. F. G. (1999). Long-term biosanitation by application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*-infected crops. *Phytopathology* 89:141-147.
- Gietz, R. D., Jean, A. S., Woods, R. A. and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high-efficiency transformation of intact yeast cell. *Nucleic. Acids. Res.* 20:1425.
- Goldman, G. H., Vasseur, V., Contreras, R. and Van Montagu, M. (1994a). Sequence analysis and expression studies of a gene encoding a novel serine + alanine-rich protein in *Trichoderma harzianum*. *Gene* 144:113-117.
- Goldman, G., Hayes, C. and Harman, G. E. (1994b). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends Biotechnol.* 12:478-482.
- Graeme-Cook, K. A. and Faull, J. L. (1991). Effect of ultraviolet-induced mutants of *Trichoderma harzianum* with altered antibiotic production on selected pathogens in vitro. *Can. J. Microbiol.* 37:659-664.

- Gurr, S. J., Unkles, S. E. and Kinghorn, J. R. (1988). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi, p. 93-139. In: J. R. Kinghorn (ed.), *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*, IRL Press, Oxford.
- Handelsman, J. and Stabb, E. V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*. 8:1651-1668.
- Haran, S., Schickler, H., Pe'er, S., Logemann, S., Oppenheim, A. and Chet, I. (1993). Increased constitutive chitinase activity in transformed *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control* 3:101-108.
- Haran, S., H. Schickler, Oppenheim, A. and I. Chet. (1995). New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 99:441-446.
- Haran, S., Schickler, H. and Chet, I. (1996a). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 42:2321-2331.
- Haran, S., H. Schickler, Oppenheim, A. and I. Chet. (1996b). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86:980-985.
- Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Pietro, A., Peterbauer, C. and Tronsmo, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83:313-318.
- Harman, G. E. and Björkman, T. (1998). Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2., Taylor and Francis Ltd., London, UK, pp 229-266.
- Herrera-Estrella, A., Goldman, G. H. and Van Montagu, M. (1990). High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Mol. Microbiol.* 4:839-843.
- Howell, C. R. (1998). The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2., Taylor and Francis Ltd., London, UK, pp 173-184.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. (1995). Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85:469-472.
- Huang, H. C. (1980). Control of sclerotinia wilt of sunflower by hyperparasites. *Can. J. Plant. Pathol.* 2:26-32.

- Huang, H. C., and Kokko, E. G. (1987). Ultrastructure of hyperparasitism of *Coniothyrium minitans* on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* 65:2483-2489.
- Huang, H. C., and Kokko, E. G. (1988). Penetration of hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans* without the formation of appressoria. *J. Phytopathol.* 123:133-139.
- Inbar, J. and Chet, I. (1992). Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J. Bacteriol.* 174:1055-1059.
- Inbar, J. and Chet, I. (1994). A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. *Microbiology* 140:651-657.
- Inbar, J. and Chet, I. (1995). The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 141:2823-2829.
- Inbar, J. and Chet, I. (1997). Lectins and biocontrol. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17:1-20.
- Jones, D. (1970). Ultrastructure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 53:351-360.
- Jones, D., Gordon, A. H. and Bacon, J. S. D. (1974). Co-operative action by endo- and exo- β -(1,3)glucanases from parasitic fungi in the degradation of cell-wall glucans of *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de bary. *Biochem. J.* 140:47-55.
- Jones, E., Carpenter, M., Fong, D., Goldstein, A., Thrush, A., Crowhurst, R. and Stewart, A. (1999). Co-transformation of the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans* with hygromycin B resistance and β -glucuronidase markers. *Mycol. Res.* 103:929-937.
- Julius D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G. and Thorner, J. (1983). Yeast alpha factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* 32:839-852.
- Kobayashi, N. and McEntee, K. I. (1993). Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13:248-256.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234:187-208.
- Kullnig, C., Mach, R. L., Lorito, M. and Kubicek, C. P. (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a

- prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2232-2234.
- Kuranda, M. J. and Robbins, P. W. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266:19758-19767.
- Limón M. C., Lora, J. M., Garcia, I., de la Cruz, J., Llobell, A., Benitez, T. and Pintor-Toro, J. A. (1995). Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* 28:478-483.
- Limón, M. C., Pintor-Toro, J. A. and Benítez, T. (1999). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89:254-261.
- Lora, J. M., de la Cruz, J., Benitez, T., Llobell, A. and Pintor-Toro, J. A. (1994). A putative catabolite-repressed cell wall protein from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol. Gen. Genet.* 242:461-466.
- Lora, J. M., De la Cruz, J., Llobell, A., Benitez, T. and Pintor-Toro, J. A. (1995). Molecular characterization and heterologous expression of an endo-beta-1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol. Gen. Genet.* 247:639-645.
- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L. and Di Pietro, A. (1993a). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83:302-307.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A. and Harman, G. E. (1993b). Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr. Genet.* 24:349-356.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L. and Harman, G. E. (1994a). Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84:398-405.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C. K. and Harman, G. E. (1994b). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140:623-9.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Zoina, A., Scala, F., Del Sorbo, G., Woo, S. L. and Harman, G. E. (1994c). Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides. *Mol. Biotechnol.* 2:209-217.

- Lorito M., Mach R. L., Sposato P., Strauss J., Peterbauer C. K. and Kubicek C. P. (1996a). Mycoparasitic interaction relieves binding of the *Cre1* carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14868-14872.
- Lorito M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P. and Scala, F. (1996b). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant Microb. Int.* 9:206-213.
- Lorito, M. (1998). Chitinolytic enzymes and their genes. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2., Taylor and Francis Ltd., London, UK, pp 73-99.
- Lorito, M., Woo, S. L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S. and Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:7860-7865.
- Lotan, T. and Fluhr, R. (1990). Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant Physiol.* 93:811-817.
- Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S. L., Zeilinger, S., Kullnig, C. M., Lorito, M. and Kubicek, C. P. (1999). Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1858-1863.
- Mackenzie, L. F., Brooke, G. S., Cutfield, J. F., Sullivan, P. A. and Withers, S. G. (1997). Identification of Glu-330 as the catalytic nucleophile of *Candida albicans* exo-beta-(1,3)-glucanase. *J. Biol. Chem.* 272:3161-3167.
- Margolles-Clark, E., Hayes, C. K., Harman, G. E. and Penttilä, M. E. (1996a). Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in of *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2145-2151.
- Margolles-Clark, E., Harman, G. E. and Penttilä, M. E. (1996b). Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2152-2155.
- Matoba, S., Morano, K. A., Klionsky, D. J., Kim, K. and Ogrydziak, D. M. (1997). Dipeptidyl aminopeptidase processing and biosynthesis of alkaline extracellular protease from *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 143:3263-3272.
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262:10035-10038.

- McQuilken, M. P., Mitchell, S. J., Budge, S. P., Whipps, J. M., Fenlon, J. S. and Archer, S. A. (1995). Effect of *Coniothyrium minitans* on sclerotial survival and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* in field-grown oilseed rape. *Plant. Pathol.* 44:883-896.
- Migheli, Q., González-Candelas, L., Dealessi, L., Camponogara, A. and Ramón-Vidal, D. (1998). Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the β -1,4-glucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Phytopathology* 88:673-677.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Biochem.* 31:426-428.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10:1-6.
- Nikolskaya, A. N., Pitkin, J. W., Schaeffer, H. J., Ahn, J. H. and Walton, J. D. (1998). EXG1p, a novel exo- β 1,3-glucanase from the fungus *Cochliobolus carbonum*, contains a repeated motif present in other proteins that interact with polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1425:632-636.
- Omero, C., Inbar, J., Rocha-Ramirez, V., Herrera-Estrella, A., Chet, I. and Horwitz, B. A. (1999). G protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 103:1637-1642.
- Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kuc, J. (1989). Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Anal. Biochem.* 182:136-140.
- Penttilä, M. E., André, L., Lehtovara, P., Bailey, M., Teeri, T. and Knowles, J. K. C. (1988). Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 63:103-112.
- Peterbauer, C. K., Lorito, M., Hayes, C. K., Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (1996). Molecular cloning and expression of the *nag1* gene (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Curr. Genet.* 30:325-331.
- Pitson, S. M., Seviour, R. J. and McDougall, R. J. (1993). Noncellulolytic fungal β -glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 15:178-192.
- Philips, A. J. L. and Price, K. (1983). Structural aspects of the parasitism of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Coniothyrium minitans* Campb. *Phytopath. Z.* 107:193-203.

- Purdy, L. H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69:875-880.
- Rotem, Y., Yarden, O. and Sztejnberg, A. (1999). The mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* expresses *exgA* encoding an exo- β -1,3-glucanase in culture and during mycoparasitism. *Phytopathology* 89:631-638.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Schickler, H. and Chet, I. (1997). Heterologous gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J. Industrial Microbiol. & Biotechnol.* 19:196-201.
- Sivan, A. and Chet, I. (1989). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79:198-203.
- Sivan, A. and Harman, G. E. (1991). Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 137:23-29.
- Sivan, A., Stasz, T. E., Hemmat, M., Hayes, C. K. and Harman G. E. (1992). Transformation of *Trichoderma* spp. with plasmids conferring hygromycin B resistance. *Mycologia* 84:687-694.
- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J. and Selker, E. (1989). Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal. Gen. Newsl.* 36:78-83.
- Stiekema, W., Heidekamp, F., Dirkse, W., van Beckum, J., de Haan, P., ten Bosch, C. and Louwse, J. (1988). Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 11:255-269.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. and Fritig, B. (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75:687-706.
- Timberlake, W. E. (1991). Cloning and analysis of fungal genes. In: Bennett, J. W. and Lasure, L. L. (eds), More gene manipulations in fungi. Academic Press Inc., San Diego, Calif., pp 51-86.
- Trutmann, P., Kean, P. J. and Merriman, P. R. (1982). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on aerial parts of plants by *Coniothyrium minitans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78:521-529.
- Tu, J. C. (1984). Mycoparasitism by *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum* and its effect on sclerotial germination. *Phytopath. Z.* 109:261-268.

- Turóczi, G., Fekete, C., Kerényi, Z., Nagy, R., Pomázi, A. and Hornok, L. (1996). Biological and molecular characterisation of potential biocontrol strains of *Trichoderma*. *J. Basic. Microbiol.* 36:63-72.
- Ulhoa, C. J., Vainstein, M. H. and Peberdy, J. F. (1992). Transformation of *Trichoderma* species with dominant selectable markers. *Curr. Genet.* 21:23-26.
- Vajna, L. (1987). A biológiai védekezés. In: Növénypatogén gombák. Szerk.: Vajna L. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, p.180-291.
- Vasseur, V., Van Montagu, M. and Goldman, G. H. (1995). *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls. *Microbiology*141:767-774.
- Warren, R. A. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:183-212.
- West, R. W., Yocum, R. R. and Ptashne, M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UAS_G. *Mol. Cell. Biol.* 4:2467-2478.
- Whipps, J. M. and M. Gerlagh. (1992). Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycol. Res.* 96:897-907.
- Whipps, J. M., and Budge, S. P. (1990). Screening for sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycol. Res.* 94, 607-612.
- Wilhite, S. E., Lumsden, R. D. and Straney, D. C. (1994). Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of Pythium damping off. *Phytopathology* 84:816-821.
- Woo, S. L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G. E., Kubicek, C. P., Del Sorbo, G. and Lorito, M. (1999). Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum*. *Mol. Plant Microb. Int.* 12:419-429.
- Yedidia I., Benhamou N. and Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M. and Kubicek, C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal. Genet. Biol.* 26:131-140.
- Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I. (1996). Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86:1255-1260.

M2. Az értekezés témájában megjelent saját közlemények

Tudományos dolgozatok

Giczey G., Kerényi Z., Fülöp L., Hornok L. (2001). Expression of *cmg1*, an exo- β -1,3-glucanase gene from *Coniothyrium minitans* increases during sclerotial parasitism. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:865-871.

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

Hornok L., **Giczey G.**, Kerényi Z. (1998). Strain improvement in biocontrol fungi. *Phytoprotection* **79**(SL):136-138.

Ismeretterjesztő cikk

Hornok L., **Giczey G.** (1998). Növényvédő házasított mikroorganizmusok. *Élet és Tudomány* **53**:995-997.

A doktori képzés ideje alatt más témában megjelent tudományos dolgozatok

Fekete C., Logrieco A., **Giczey G.**, Hornok L. (1997). Screening of fungi for the presence of the trichodiene synthase encoding sequence by hybridization to the *Tri5* gene cloned from *Fusarium poae*. *Mycopathologia* **138**:91-97.

Fekete C., **Giczey G.**, Papp I., Szabó L., Hornok L. (1995). High-frequency occurrence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiology Letters* **131**:295-299.

Konferencia-előadások, poszterek

Giczey G., Kerényi Z., Hornok L. (2000). Isolation and characterization of a β -1,3-glucanase gene from the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *5th European Conference on Fungal Genetics, Arcachon, France*.

Giczey G., Kerényi Z., Fülöp L., Hornok L. (2000). The expression pattern of *cmg1*, an exo- β -1,3-glucanase gene of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely*.

Giczey G., Kerényi Z., Hornok L. (2000). A *Coniothyrium minitans* β -1,3-glükánáz génjének jellemzése *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest*.

Giczey G., Kukolya J., Hornok L. (1999). Kitináz és glükánáz izoenzimek kimutatása *Coniothyrium minitans* tenyésztésűrletéből. *I. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest*.

Giczey G., Kukolya J., Hornok L. (1999). A hiperparazita *Coniothyrium minitans* sejtfalbontó enzimeit. *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest*.

- Giczey G.**, Kukolya J., Hornok L. (1998). A biológiai növényvédelemben alkalmazott *Coniothyrium mimitans* extracelluláris hidrolitikus enzimeinek jellemzése. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Miskolc.*
- Giczey G.**, Kerényi Z., Dallmann G., Hornok L. (1997). Improvement of chitinase activity of the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* by homologous transformation with an endogenous endochitinase gene. *TRICEL '97 conference, Gent, Belgium.*
- Giczey G.**, Kerényi Z., Dallmann G., Hornok L. (1997). Antagonista *Trichoderma*-törzsek nemesítése a kitináz-aktivitás növelésével. *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest.*
- Giczey G.**, Kerényi Z., Dallmann G., Hornok L. (1997). Homologous transformation of *Trichoderma hamatum* with an endochitinase gene. *8th European Congress on Biotechnology, Budapest.*
- Giczey G.**, Kerényi Z., Hornok L. (1997). A *Trichoderma hamatum* *Tham-ch* génnel történő transzformálása változatos integrálódási eseményekkel és a kitináz-aktivitás növekedésével jár. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Szekszárd*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Balázs Ervinnek, hogy a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont főigazgatójaként biztosította számomra a dolgozat elkészítéséhez szükséges kutatómunka végzésének feltételeit.

Köszönettel tartozom program- és témavezetőmnek, Dr. Hornok Lászlónak a doktori munkámhoz nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és támogatásáért.

Köszönet illeti Dr. Vajna Lászlót, aki rendelkezésünkre bocsátotta a gombatorzseket, és hasznos információkkal látott el a tenyésztésükre vonatkozóan.

Köszönöm Dr. Kerényi Zoltánnak a transzformációs munkákban, Dr. Fülöp Lászlónak a fehérjetisztításban, Dr. Dallmann Gézának és Dr. Fekete Csabának molekuláris biológiai módszerek elsajátításában nyújtott segítségét, valamint Dr. Buzás Zsuzsannának és Dr. Patthy Andrásnak a fehérjeszekvenálásban végzett munkáját.

Köszönöm Bagdány Tímeának a lelkiismeretes asszisztensi munkáját, és Takács Gábornak az ábrák elkészítésében nyújtott segítségét.