

DEBRECENI EGYETEM
Agrártudományi Centrum
Mezőgazdaságtudományi Kar
Növényvédelmi Tanszék

**INTERDISZCIPLINÁRIS AGRÁR- ÉS
TERMÉSZETTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

Doktori Iskola vezető:
Prof. Dr. Nagy János
MTA doktora

Témavezető

Dr. habil. Kövics György
Egyetemi docens

„DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI”

***TRICHODERMA* GOMBÁK FAJ- ÉS
TÖRZSSPECIFIKUS GLIOTOXINTERMELŐ
KÉPESSÉGE**

Készítette:

Harcz Péter
doktorjelölt

Debrecen
2004.

1. A kutatás célkitűzései

A jelen dolgozat komplex módon tárgyalja a gliotoxint termelő *Trichoderma*-k izolálását, morfológiai jellemzését, korszerű molekuláris biológiai alapon történő összehasonlításukat, illetve a laboratóriumi méretekben történő gliotoxin termelésüket. A gliotoxint, mint az antibiózisban lehetséges szerepet játszó anyagot, illetve mint mikotoxint értékeljük a vizsgálataink eredményei alapján.

Munkánk során a saját izolálású és a más törzsgyűjteményekből származó nagy számú és több fajt is reprezentáló *Trichoderma* gombatörzsek laboratóriumi léptékű fermentálását tűztük ki célul, hogy a képződő gliotoxint analitikai kémiai módszerrel (HPLC) detektáljuk. A metabolitot termelő gombatörzsek morfológiai illetve molekuláris biológiai (RAPD PCR és ITSrDNS szekvenálás) alapon történő összehasonlításának és identifikálásának segítségével választ illetve megerősítést próbáltunk találni a gliotoxint termelő *Trichoderma* törzsek taxonómiai helyére.

In vitro konfrontációs antagonizmus vizsgálat folyamán próbálunk választ kapni a talajeredetű patogén *Rhizoctonia*

solani elleni antibiózisban illetve gátlásban betöltött szerepéről.

A kapott eredmények várhatóan felhasználhatók lesznek a későbbiek során a gliotoxintermelés – tágabb értelemben az antibiózis – szerepének megítélésében a biológiai növényvédelemben.

2. A kutatás előzményei

A több mint 200 éve ismert *Trichoderma* nemzetség fajai igen széles körben előforduló, talajban és elhalt növényi anyagokban élő fonalas gombák. A *Trichoderma* gombafajok az enzimtermelő képessége, illetve az, hogy képesek megtámadni és gátolni más gombákat, óriási lehetőségeket nyújtottak számos területen a kutatásban. A legtöbb izolátum a természetben is képes parazitálni más gombákat, továbbá a biológiai védekezésre való alkalmasságuk szempontjából kedvező az is, hogy a nemzetségben nincsenek növénykórokozó fajok.

Az antibiotikum és mikotoxin gliotoxin termelése már régóta ismert a *Trichoderma* nemzetségben. A gliotoxint termelő fajt többféle néven említették: *Trichoderma*

lignorum (Tode) Harz, *Trichoderma viride* Pers., *Gliocladium virens* J. Miller, Giddens & Foster, *Gliocladium fimbriatum* Gilman & Abott, *Trichoderma virens* (J. Miller, Giddens & Foster) von Arx. A gliotoxin elnevezés is egy tévedésnek volt köszönhető, mivel a termelő fajt egy zöld konídiumú *Gliocladium* fajnak hitték.

A szakirodalomban fellelhető, gliotoxintermeléssel foglalkozó tudományos munkák többnyire egy vagy két *T. virens* törzs (GI20, GI21) gliotoxintermelésével foglalkoznak.

A gliotoxin antagonizmusban betöltött szerepéről ellentmondó vélemények kerültek napvilágra, ugyanakkor az erős mikrobaellenes hatása közismert, de közegészségügyi szempontból – mint mikotoxin – aggályosnak tartható.

3. A kutatás módszerei

A munkánk során különböző *Trichoderma* törzseket és izolátumokat használtunk. Az izolátumok a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Mezőgazdaságtudományi Kar Növényvédelmi Tanszék (DE ATC MTK Növényvédelmi Tanszék) törzsgyűjteményéből

(D) illetve a Mycothèque de l'Université catholique de Louvain/Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, (Belgium, BCCM™/MUCL) törzsgyűjteményéből származtak. Az izolátumok részben saját izolálásúak, részben, pedig más gyűjteményekből származó törzsek voltak.

96 *Trichoderma* izolátumot teszteltünk a „Mycothèque de l'Université catholique de Louvain/Belgian Coordinated Collections of Microorganisms” (Belgium) törzsgyűjteményéből. A gyűjteménybe korábban elhelyeztünk 17 izolátumot, melyek a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum MTK Növényvédelmi Tanszékének gyűjteményéből származtak. A törzsek különböző földrajzi illetve szubsztrát eredettel rendelkeztek. A vizsgált 96 törzs a következő fajokat foglalta magában: *Trichoderma harzianum* (17), *T. viride* (17), *T. longibrachiatum* (12), *T. virens* (11), *T. koningii* (10), *T. polysporum* (8), *T. hamatum* (6), *T. pseudokoningii* (6), *T. atroviride* (3), *T. aureoviride* (4), *T. flavofuscum* (1). Az izolátumokat, a laboratórium szokásos eljárásának megfelelően -130°C-on tároltuk glicerolban, konídium és micélium szuszpenzió formájában.

A molekuláris biológiai módszerekhez a micéliumtömeg előállítása 2%-os maláta tartalmú táplevesben történt. A DNS kivonása liofilizált micéliumból fenol-kloroformos extrakcióval, illetve friss micéliumból, DNEasy KIT felhasználásával történt.

A kivont és tisztított DNS amplifikációja véletlenszerű primerekkel (RAPD) és speciális az ITS szakasz felszaporítására alkalmas primerekkel történt (ITSrDNS szekvenálás).

Előzetes tanulmányt végeztünk, melyben megnéztük a növekedési erélyt és a gliotoxin termelését különböző szintetikus és komplex táplevesekben. Szintetikus táptalajként egy speciális, gliotoxin optimális termeléséhez kifejlesztett táptalajt, komplex táptalajként 2%-os maláta levest használtunk. 50 ml táplevest töltöttünk 100ml-es Erlenmeyer lombikokba, melyeket egy hetes, 2% maláta tartalmú agaron nőtt *Trichoderma* telepekről származó konídiumokkal oltottuk be, a végleges koncentráció 10^3 konídium ml^{-1} volt. A lombikokat 25°C -on és 95 min^{-1} sebességű rázatás mellett inkubáltuk. A mintavételek időpontjai inkubáció 62. és 86. illetve a termelés

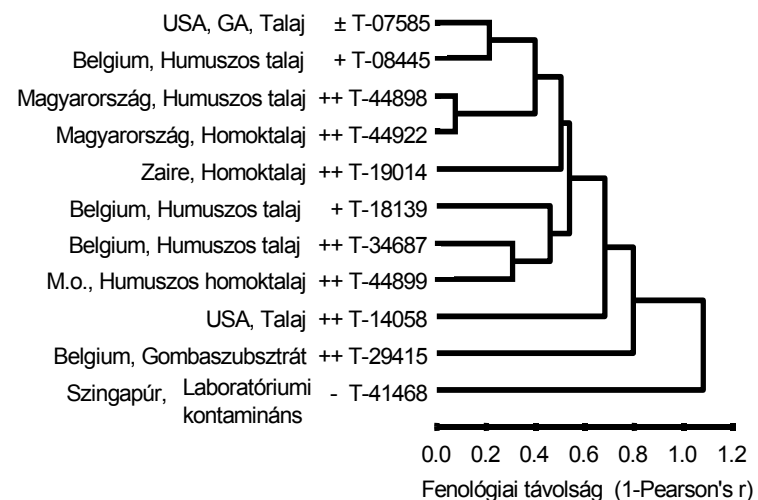
kinetikájának vizsgálatokor a 24., 40., 48., 64., 72., 88. és a 96. órájában voltak.

A gliotoxin detektálásához használt HPLC rendszerben az eluens (acetonitril : víz-25 : 75) áramlási sebessége 1 ml min^{-1} volt, amelyet Waters 515 HPLC pumpa (Milford, MA, USA) biztosított. A mintákat közvetlenül injektáltuk Waters 712 WISP injektorral (Milford, MA, USA) Chromsep SS (100X4,6 mm, $3 \mu\text{m}$ alkotókkal) Microsphere C_{18} oszlopba, amely CP 28141 előtét oszloppal (Chrompack, Middelburg, Hollandia) volt ellátva. Az injektált minta mennyisége $25 \mu\text{l}$ volt. Az oszlop temperáltan működött, 35°C -on (SparkHolland SpH99, Chrompack, Middelburg, Hollandia). A detektort (Thermo Finnigan Spectra System UV6000LP) 270 nm hullámhosszra állítottuk be. A detektor jeleinek feldolgozását és megjelenítését számítógép végezte, ChromQuest 3.0 szoftver segítségével.

4. Az értekezés főbb megállapításai

Az RAPD PCR analízisének eredményei

A magi DNS amplifikációját követő fenológiai analízis eredményei összefüggést mutattak a gliotoxintermelés meglétével, a nem-termelő izolátummal szemben (MUCL 41468). A termelt gliotoxin mennyisége azonban nem állt korrelációban a fenológiai analízis eredményeivel. Az MUCL 41468 törzs, mely nem termelt detektálható mennyiségű gliotoxint, élesen elkülöníthető a többi gliotoxint termelő törzstől az RAPD PCR eredményei alapján. Ugyanakkor az RAPD PCR megközelítéssel nem tudtuk elkülöníteni a nagy mennyiségű gliotoxint termelő törzseket (1. ábra).

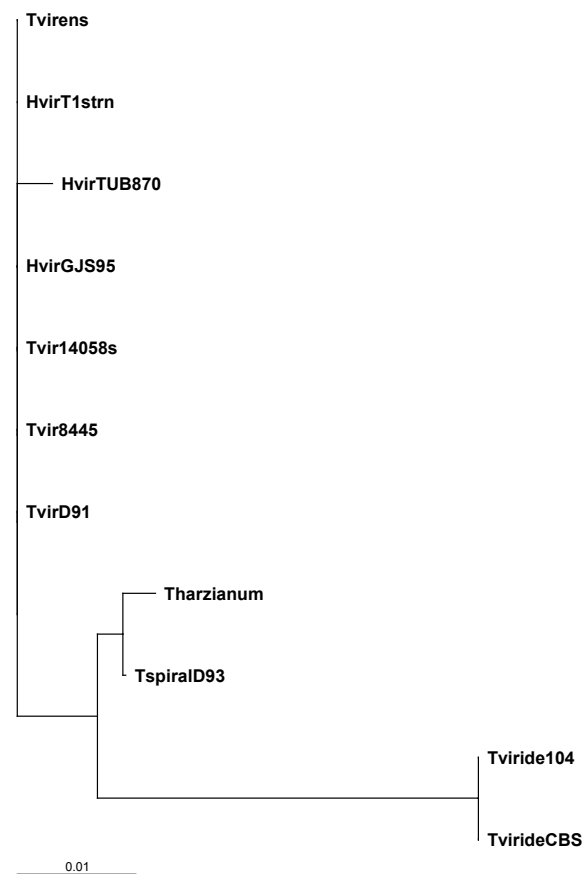


1. ábra: A *T. virans* törzsek fenológiai analízisének eredménye (dendrogram)

Gliotoxin termelés: ± nyomokban; + alacsony szinten termelő törzsek; ++ magas szinten termelő törzsek; viszonyítási alapként a magas szinten termelő törzseket vettük figyelembe az inkubáció 64. órájában.

Az ITSrDNS szekvencia-analízis eredményei

A megfeleltetés (alignment) eredményeinek feldolgozása (UPGMA) alapján a filogramot TREEVIEW szoftverrel rajzoltattunk. A 2. ábrán jól látszik, hogy a saját *T. virens* izolátumok nem különülnek el az NCBI szekvenciagyűjteményéből vett azonos fajú izolátumoktól, ITS szekvenciájuk alapján. Ugyanakkor, a más fajba tartozó izolátumok jól elkülönülnek az ITS szekvenciájuk alapján a *T. virens* fajtól. A legnagyobb filogenetikai távolság a *T. viride* és a *T. virens* fajok között mutatkozott.



2. ábra: Filogenetikai analízis az ITS1 és ITS2 szekvenciák alapján (filogram). *Tvir8445*, *TvirD91* és *Tvir 14058*: a gliotoxintermelő vizsgálatokban szereplő 3 reprezentatív törzs. *Tvirens*, *HvirT1strn*, *HvirTUB870*, *HvirGJS95*: *T. virens* ITS szekvenciák az NCBI adatbázisából. *Tharzianum*, *Tspiral*, *Tviride104*, *TvirideCBS*: más fajokból származó ITS1-2 szekvenciák

A gliotoxintermelő kísérletek eredményei

A gliotoxin detektálásához összehangolt HPLC berendezéssel lehetővé vált közvetlenül a fermentált tápközegből a gliotoxin detektálása, 5,72 perces retenciós idővel.

A táplevesek tesztelése céljából előzetes vizsgálatokban 17 *Trichoderma* törzs felhasználásával meghatároztuk a növekedési intenzitást és a gliotoxin-termelést a különböző komplex és szintetikus táplevesekben. A törzsek szignifikánsan ($P < 0,001$) intenzívebb növekedést, illetve a gliotoxin-termelő izolátumok magasabb gliotoxinszintet mutattak a komplex táptalajon (2% maláta tápleves) mint egy szintetikus táplevesen. (1. táblázat)

Összesen 96 *Trichoderma* törzset teszteltünk gliotoxintermelő képesség szempontjából. A 86 órás inkubációs időszak utáni mérések alapján csak tíz, egyaránt a *Trichoderma virens* fajba tartozó törzsről bizonyosodott be a gliotoxintermelés képessége.

1. Táblázat: A táplevesek hatása a *Trichoderma* törzsek növekedésére és a gliotoxin termelés szintjére

MUCL törzsek ^a	Tápleves					
	Maláta tápleves			Szintetikus (ún. "gliotoxin termelő" tápleves)		
	Micélium száraztömeg (mg)	Gliotoxin-termelés ^b		Micélium száraztömeg (mg)	Gliotoxin termelés ^b	
		62. h	86. h		62. h	86. h
8445	128 ± 10	18,1 ± 10,1	18,6 ± 6,8	65 ± 7	4,2 ± 1,0	6,2 ± 0,9
14058	145 ± 6	52,5 ± 5,7	49,6 ± 6,9	32 ± 6	14,6 ± 3,1	22,9 ± 2,4
18139	126 ± 10	17,1 ± 5,0	21,7 ± 5,9	35 ± 5	2,1 ± 0,4	2,4 ± 0,4
19014	104 ± 17	26,5 ± 3,9	33,3 ± 6,2	30 ± 6	1,0 ± 0,01	1,0 ± 0,1
29415	149 ± 8	32,7 ± 4,8	32,7 ± 5,4	50 ± 5	6,7 ± 1,9	10,8 ± 2,0
34687	145 ± 8	47,8 ± 4,4	26,3 ± 4,6	45 ± 10	10,0 ± 1,0	10,3 ± 1,1
41468	168 ± 9	ND	ND	51 ± 5	ND	ND
44898	148 ± 9	48,5 ± 4,4	44,2 ± 4,3	51 ± 6	4,0 ± 0,3	5,2 ± 0,3
44899	151 ± 10	16,5 ± 2,9	5,0 ± 1,1	27 ± 7	1,1 ± 0,01	1,97 ± 0,2
44922	167 ± 7	31,0 ± 1,8	35,0 ± 4,9	-	-	-
8965	141 ± 4	ND	ND	24 ± 6	ND	ND
11316	117 ± 8	ND	ND	35 ± 5	ND	ND
29736	169 ± 8	ND	ND	46 ± 6	ND	ND
44905	137 ± 4	ND	ND	59 ± 7	ND	ND
44906	185 ± 8	ND	ND	55 ± 5	ND	ND

^a MUCL: Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (member of the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms consortium, Louvain-la-Neuve, Belgium)

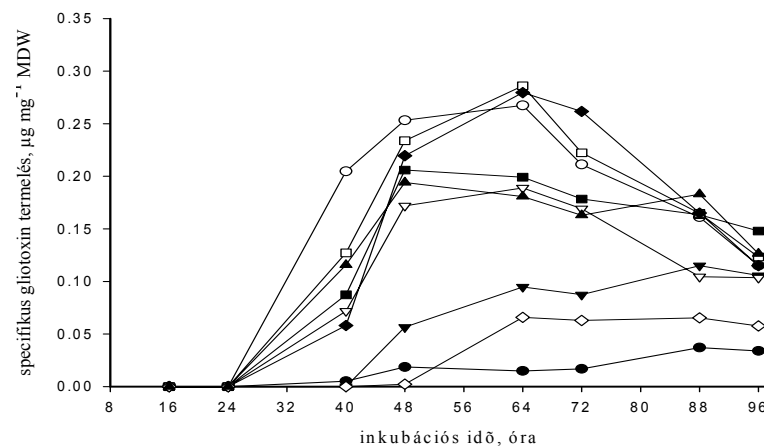
^b: Gliotoxin-termelés, $\mu\text{g ml}^{-1}$ tápleves

ND: nem detektálható (gliotoxin koncentráció táplevesben $< 0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$)

A mérési eredmények alapján a vizsgált gliotoxint termelő törzsek 2 különböző csoportot alkottak, a két csoport elkülönítése a termelt gliotoxin mennyiségén és a termelés kinetikáján alapszik. Az első csoport (MUCL: 14058, 19014, 29415, 34687, 44898, 44922) több gliotoxint termelt, mint a *T. virens* izolátumok másik része (MUCL 8445, 18139, 44899) (3. ábra), ugyanakkor a gliotoxin termelésének időzítése és kinetikájának tanulmányozása is egészen eltérő eredményeket adott. Az első csoportba tartozó gombák igen rövid idő alatt, mintegy 48-64 órán belül elérték gliotoxin-termelésük csúcsát, majd ezután a termelt gliotoxin mennyisége, a termelés intenzitása lecsökkent. Az alacsonyabb szinten termelő gombatörzsek esetében a gliotoxin termelésének kinetikájában egy lassú, az inkubációs időszak végéig tartó emelkedés volt megfigyelhető, melyben a termelt gliotoxin mennyisége az inkubáció végére sem érte el az előző csoportnál mért átlagos szintet. A növekedés ütemében jól megfigyelhető volt a trofofázis szakasza, majd az ezt követő stacioner fázis kezdete, amelyet a gomba pusztulása követ.

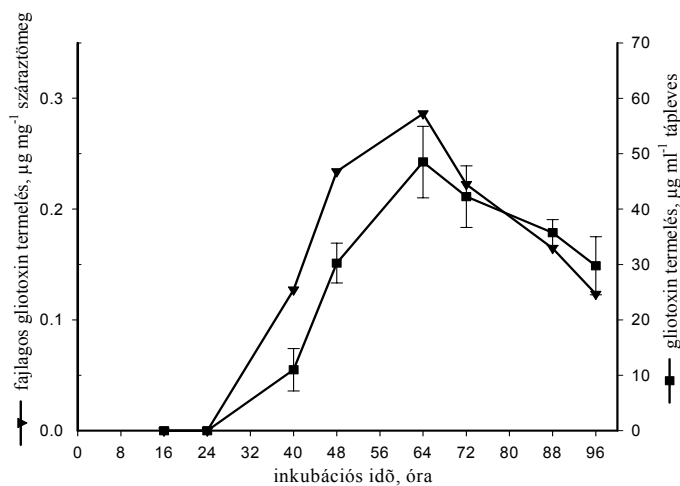
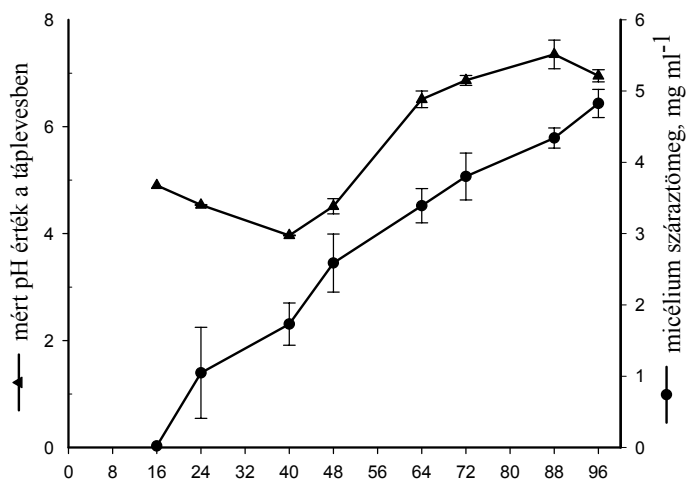
A tápközeg kémhatásának alakulása mindegyik törzs esetében hasonlóan változott. A 2%-os maláta táplevesre

jellemző pH $5 \pm 0,5$ érték először csökkent, és elérte a pH 4 értéket. Ezt követően a tápközeg pH-ja újra emelkedni kezdett, majd az inkubáció végső szakaszára minden esetben pH 7 érték fölé emelkedett

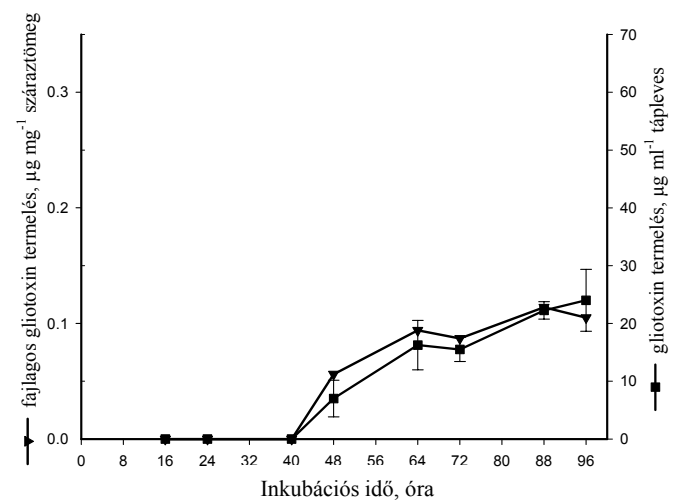
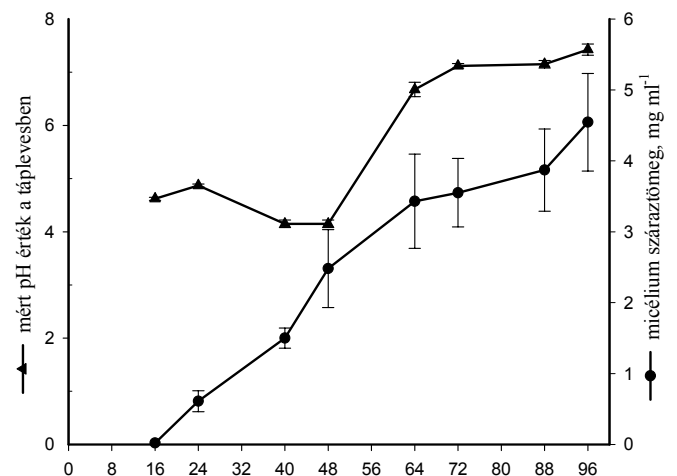


3. ábra: Kilenc gliotoxintermelő *T. virens* törzs gliotoxin termelésének kinetikája maláta táplevesben. Törzsek: MUCL 8445 (●), 14058 (○), 18139 (▼), 19014 (▽), 29415 (■), 34687 (□), 44898 (◆), 44899 (◇), 44922 (▲)

A magas szinten (4. ábra) és az alacsony szinten (5. ábra) termelő törzsek szárazanyag- és gliotoxin termelését reprezentáló grafikonokon jól látszik a termelés kinetikájában jelentkező eltérés, illetve a tápközeg pH értékének a változása.



4. ábra: Szárazanyagtermelés (●), a folyadékkultúra pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelése és kinetikája a BCCMTM/MUCL 34687 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta kivonat tápveszben.



5. ábra: Szárazanyagtermelés (●), a folyadékkultúra pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelése és kinetikája a BCCMTM/MUCL 18139 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta kivonat tápveszben.

A konfrontációs antagonizmus vizsgálat eredményei

A patogén telepének az antagonista irányába történő sugárirányú növekedésének megszűnésekor ellenőriztük a két telep széle közötti távolságot (gátlási zóna). A gátlási zóna értékét is az ismétlések középértéke adta. A gátlási zónák középértékét hasonlítottuk össze a fermentációs kísérletek során egységesen, a fermentáció 64. órájában detektált gliotoxin mennyiségével (specifikus gliotoxin termelés). A statisztikai összehasonlítás kétváltozós korreláció vizsgálatával történt (Pearson-féle teszt).

Az SPSS 10.0.5 programmal elvégzett korrelációs vizsgálat nem talált szignifikáns ($P > 0,05$) és szoros összefüggést a gátlási zónák mérete és a termelt gliotoxin mennyisége között, amely eredmény utalhat arra, hogy nem a gliotoxin játssza a legnagyobb szerepet az antagonizmusban, illetve a gátlási zóna kialakításában. A gátlás időpontja és a termelt gliotoxin mennyisége között korreláció nem mutatkozott.

A vizsgálat során a *Trichoderma* telepek növekedését is nyomon követtük, és azt tapasztaltuk, hogy a növekedésük intenzitása eltérő volt, de ez nem minden esetben volt statisztikailag igazolható.

A *R. solani* telepek növekedése egyenletes volt és köztük szignifikáns különbségek nem voltak fellelhetők a növekedés gátlása előtt. Ugyanakkor, a gátlás első jele eltérő időpontokban jelentkezett (28-36 óra). Ezek a különbségek feltételezhetően a *T. virens* eltérő növekedési intenzitásával illetve az antagonizmusban (antibiózis) szereplő más (nem mért) anyagok jelenlétével magyarázhatók, miután a gliotoxin nem mutatott összefüggést a gátlás mértékével illetve a gátlás idejével.

5. Az értekezés új, illetve újszerű eredményei

- Kilencvenhat, gliotoxin termelő képesség céljából tesztelt *Trichoderma* törzsből mindösszesen tíz (10,4%) törzs esetében tapasztaltunk gliotoxin termelést folyadék-kultúrában. A jelen munka igazolta és megerősítette azt az eredményt, hogy csak *T. virens* törzsek termelik ezt az antibiotikumot.
- A gliotoxin termelés időzítésében és a termelés kinetikájában eltéréseket tapasztaltunk a termelő törzsek között.
- Míg a nagymennyiségű gliotoxint termelő törzsek esetében a termelés optimális időszaka az inkubáció 48-

64. óra közötti intervalluma, addig a kis mennyiséget termelő törzsek ezen időszakban nem, vagy alig termeltek gliotoxint. Megállapítottuk, hogy a magas szinten termelő törzsek termelési kinetikája alapján a gliotoxin szintézise a gomba intenzív növekedési fázisának ideje alatt történik.

- A fenológiai analízis (RAPD) nem mutat szoros összefüggést a gliotoxin-termelés mértékével.
- Az ITS szekvenciák analízisével a morfológiailag és gliotoxin-termelésben is eltérő *T. virens* törzsek nem különíthetők el egymástól. A gliotoxint nem termelő, más fajba tartozó *Trichoderma* törzsek elkülöníthetők a *T. virens* fajtól. Jól elválaszthatók a korábban tévesen gliotoxin-termelőként identifikált *T. viride* faj törzsei is a *T. virens* fajtól.
- A *Rhizoctonia solani* patogénnel szembeni *in vitro* antagonizmus hatékonysága és a termelt gliotoxin mennyisége között nem találtunk statisztikailag igazolható összefüggést. A gliotoxin valószínűleg nem játszik főszerepet a *R. solani*-val szemben megnyilvánuló antagonista hatásban.

6. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

A dolgozat a növénykórokozók elleni biológiai növényvédelemben gyakran felhasznált *Trichoderma* gombákkal foglalkozik. A gyakori talajgomba, és emellett számos biológiai növényvédőszer készítményben is megtalálható *Trichoderma virens* faj antibiotikum termelésének sajátosságait vizsgáltuk ebben a munkában.

Egy jól ismert, és a *Trichoderma* nemzetségben az elsők között izolált és leírt antibiotikum, a gliotoxin termelődését vizsgáltuk új szempontok szerint. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy a biológiai növényvédelemben felhasználható *T. virens* izolátumok gliotoxintermelése eltérő lehet.

In vitro körülmények között elvégzett *Rhizoctonia solani*-val szembeni antagonizmus eredményei azt mutatták, hogy nem a termelt gliotoxin mennyisége határozza meg elsősorban az antagonizmus erősségét. A gliotoxin talajkörülmények között játszott szerepét is megkérdőjelezheti időleges termelődése, és a molekula instabilitása, amelyet további *in vivo* vizsgálatokkal lenne célszerű igazolni.

A mikotoxinként is ismert gliotoxinról, és a termelő *T. virens*-ről elmondható az, hogy a toxin kémiai tulajdonságai alapján és termelődésének sajátosságaiból következően az antagonistát tartalmazó termék valószínűleg nem tartalmazza ezt a metabolitot, és így nem jelenthet közvetlen veszélyt a felhasználóra.

A munka ugyanakkor rávilágított a *T. virens* fajba tartozó izolátumok közötti telepmorfológiai és a gliotoxintermelő képességben jelentkező különbségekre. Ezek az eltérések felvetik a faji diverzitás kérdését, illetve azt, hogy a *Trichoderma virens* faj mennyire tekinthető egységesnek? Az ITS 1-2 szakasz szekvenciája nem megfelelő a törzsek differenciálására. Más, specifikus szekvencia vizsgálata új távlatokat nyithat a *T. virens* izolátumok elkülönítésében.

7. Publikációk az értekezés témakörében

Kövics, G.J. - Harcz, P. – Naár, Z. 2001. Biological control against *Rhizoctonia* damping-off disease of tomato by *Trichoderma* strains. Prospects for the 3rd Millennium Agriculture. International Symposium. 25-27 October

2001, Cluj-Napoca, Romania. Buletinul USAMV-CN, Ser. Horticultura 55-56/2001. 63-68

Harcz P. 2001. A vezikuláris–arbuszkuláris mikorrhiza szerepe a talajeredetű betegségek elleni védekezésben, 6. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum Debrecen 2001. November 6-8. Előadások-Proceedings 296-301.

Harcz P. - Kövics Gy.- Naár Z. 2002. Biológiai védekezés a paradicsom rizoktóniás palántadőlése ellen *Trichoderma* törzsek felhasználásával. JUTEKO 2002. Tessedik Sámuel Jubileumi Mezőgazdasági Víz- és Környezetgazdálkodási Tudományos Napok, 2002. augusztus 29-30. 177-179.

Harcz P. 2002. *Trichoderma* gombák szerepe a paradicsom rizoszférájában, 7. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum Debrecen, Előadások–Proceedings, 118-124.

Harcz P. 2002. A vezikuláris-arbuszkuláris mikorrhiza szerepe a talajeredetű betegségek elleni védekezésben. Agrártudományi Közlemények-Acta Agraria Debreceniensis Különszám 28-30.

Harcz P. 2003. *Trichoderma* gombák szerepe a paradicsom rizoszférájában. Agrártudományi Közlemények-Acta Agraria Debreceniensis 10 (különszám). 67-69.

Kövics G.J. - Harcz P. 2003. Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off disease of tomato using *Trichoderma* strains. Abstracts of the 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. 9-11 October, 2003, Balatonfüred, Hungary. IM-8.

Harcz P. 2003. The role of *Trichoderma* in the rhizosphere of tomato plants. Abstracts of the 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. 9-11 October, 2003, Balatonfüred, Hungary. IMP-7.

Harcz P. - Kövics, G.J. 2003. Beneficial role of *Trichoderma* isolates in biological control against *Rhizoctonia solani*. 3rd International Plant Protection Symposium at Debrecen University. 15-16 October, 2003, Debrecen, Hungary. Proceedings appendix 4-15.

Harcz P. 2003. Effect of secondary metabolites of *Trichoderma* on germinating seeds. Natural resources and sustainable development international scientific session. Debrecen-Oradea Abstracts 47.

Harcz P. 2003. *Trichoderma* izolátumok és metabolitjaik hatása a paradicsom (*Lycopersicon esculentum*) csírázására *in vitro* körülmények között. XIII. Keszthelyi

Növényvédelmi Fórum, 2003. január 29-31. Konferencia összefoglaló, 61.

Harcz P., Tangni, E.K., Pussemier, L., Pierard, J.-Y., Munaut F., Van Hove, F., Kövics G.J. 2004. Species-specific ability for gliotoxin production by *Trichoderma* strains: timing and kinetics of the metabolite production and taxonomical position of strains. Canadian Journal of Microbiology (megjelenése folyamatban)