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

TRICHODERMA GOMBÁK FAJ- ÉS TÖRZSSPECIFIKUS GLIOTOXINTERMELŐ KÉPESSÉGE

Készítette:
Harcz Péter
doktorjelölt

Debrecen
2004.

Tartalomjegyzék

Old.

1. BEVEZETÉS ... 3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ... 6
2.1. A *Trichoderma* genus ... 6
2.2. *Trichoderma*-kutatás Magyarországon ... 8
2.3. A *Trichoderma* virens faj ... 10
2.4. A *Trichoderma*-k másodlagos anyagcsere termékei ... 12
2.5. A gliotoxin termelődése és szerepe a biológiai védekezésben ... 17
2.6. Molekuláris biológiai eredmények alkalmazása a *Trichoderma*-taxonómiai kutatásban ... 22
3. **ANYAG ÉS MÓDSZER** ... 24
3.1. *Trichoderma* törzsek és izolátumok, a tenyésztés módszerei ... 24
3.1.1. A *Trichoderma* törzsek izolálása és kiválasztása ... 24
3.1.2. Tenyésztésre és gliotoxin-fermentációhoz használt táptalajok ... 27
3.1.3. A micélium száraztömeg és a pH mérése ... 28
3.2. A RAPD PCR analízis módszere ... 28
3.2.1. Micéliumtömeg előállítása DNS kivonásához és a DNS kivonása ... 28
3.2.2. RAPD PCR reakció véletlenszerű primerekkel ... 30
3.2.3. Fenológiai analízis ... 31
3.3. *Trichoderma* törzsek azonosítása ITS rDNS szekvencia alapján ... 32
3.3.1. Micéliumtömeg felszaporítása a DNS kivonásához és a DNS kivonása ... 32
3.3.2. A DNS felszaporítása és a PCR termék kimutatása ... 34
3.3.3. A minták előkészítése a ciklikus szekvenáló reakcióhoz és a bázissorrend meghatározása ... 35
3.3.4. Az ITSrDNS szekvenciák megfeleltetése (alignment) és dendrogram készítése ... 36
3.4. Gliotoxin-termelés: a folyadékkromatográfiás (HPLC) mérés módszere ... 37
3.4.1. Fermentáció a vizsgálatba bevont *Trichoderma* törzsekkel ... 37
3.4.2. A HPLC méréshez felhasznált anyagok ... 37
3.4.3. A HPLC berendezés ... 38
3.5. *T. virens* törzsek *Rhizoctonia solani*-val szembeni in vitro antagonizmusának vizsgálati módszere ... 39
3.5.1. A *Trichoderma* és a patogén *R. solani* törzsek ... 39
3.5.2. A patogén és az antagonista leoltásának körülményei ... 40
3.6. Az alkalmazott statisztikai vizsgálatok módszerei ... 41
3.6.1. Az RAPD PCR analízis során alkalmazott statisztikai módszerek ... 41
3.6.2. Gliotoxin-fermentáció értékelése során alkalmazott statisztikai módszerek ... 41
3.6.3. Az in vitro konfrontációs antagonizmus teszt eredményeinek elemzésekor alkalmazott statisztikai módszerek ... 42
4. EREDMÉNYEK ... 43
4.1. *Trichoderma* törzsek és izolátumok morfológiai sajátosságai ... 43
4.1.1 Az izolált és kiválasztott *Trichoderma virens* törzsek morfológiai jellemzése ... 43
4.1.2. A micéliumtömeg és a tápközeg pH mérésének eredményei ... 46
4.2. *Trichoderma virens* törzsek RAPD PCR és fenológiai analízis eredményei ... 47
4.3. *Trichoderma* törzsek ITS rDNS szekvencia analízisének eredményei ... 52
4.4. Gliotoxin-termelés: a folyadékkromatográfiás (HPLC) mérés eredményei ... 53
4.4.1. Az előzetes táptalaj-kiválasztási vizsgálatok eredményei ... 56
4.4.2. *Trichoderma* izolátumok gliotoxintermelése ... 58
4.4.2. *T. virens* törzsek gliotoxin-termelése ... 59
4.5. *T. virens* törzsek in vitro antagonizmusa *Rhizoctonia solani*-val szemben ... 70
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK ... 74
6. ÖSSZEFOGLALÁS ... 80
7. IRODALOMJEGYZÉK ... 82
ÁBRÁK, TÁBLÁZATOK ÉS KÉPEK JEGYZÉKE ... 97
MELLÉKLETEK ... 99
M1. ... 100
M2 ... 101
M3. ... 106
M4. ... 108
M5. ... 109

1. BEVEZETÉS

Több mint hetven éve jelent meg az első rövid publikáció a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó gombáknak növényi kórokozókkal szembeni antagonista tulajdonságáról. Azóta eltelt időszakban a *Trichoderma* fajok a legkülönbözőbb növényi kórokozókkal szemben mutatott antagonizmusát írták le, és számos *Trichoderma* gombatörzset tartalmazó biopreparátumot fejlesztettek ki, amelyeket világszerte forgalmaznak (1. táblázat).

A trichodermák növénybetegségeket okozó patogén szervezetekkel szembeni anatgonizmusának mechanizmusait 3 fő csoportba sorolhatjuk, úgy mint: szaprobionta kompetíció, parazitizmus és antibiózis. Az antagonizmusban szerepet játszó folyamatok közül a legrégebben ismert és legalaposabban tanulmányozott az antibiotikus hatású anyagok (antibiotikumok) termelése.

A parazitizmushoz és a szaprobionta kompetícióhoz hasonlóan az antibiózisnak az antagonizmusban betöltött szerepe sem ismert pontosan, ugyanakkor az antibiotikumok fontosságát támasztja alá, hogy olyan mikroorganizmusokat (pl. baktériumokat) is sikeresen lehet talajlakó kórokozókkal szemben alkalmazni, amelyeknél a parazitizmus kizárt, és viszonylag lassú szaporodásuk miatt a szaprobionta kompetíció sem valószínűsíthető.

Az antibiotikum-termelő szervezetek, például a gliotoxint termelő *Trichoderma* izolátumok tesztelése laboratóriumi fermentációs rendszerekben fontos lehet. Az így kapott eredmények felhasználhatók lehetnek az antibiotikumot termelő izolátumok későbbi szelekciójára, illetve az antibiotikumok keletkezési dinamikájának tanulmányozására is. Pontos választ kell kapjunk a gliotoxin antibiotikumot termelő *Trichoderma* faj(ok) taxonómiai helyére is, mivel a gliotoxint termelő fajt többféle néven említik, amely számos helyen a téves faji meghatározás következménye.

Néhány másodlagos anyagcseretermék képződése – mindamellett, hogy hasznosak lehetnek az antibiózis jelensége során – nem kívánatos hatásokat is kiválthatnak. Ezek a másodlagos anyagcseretermékek a mikotoxinok, amelyek képződése és jelenléte egy biológiai növényvédelmi célra szánt mikroorganizmus tenyészetében, vagy a forgalomba hozandó készítményben akár az engedélyezésből kizáró ok is lehet. *Trichoderma* fajok is termelhetnek ilyen mikotoxinokat, melyek kémiailag igen sokfélék. A gliotoxin, mint mikotoxin termelése ismert az *Aspergillus* és

Penicillium nemzetségekben is, mely fajok élelmiszereket toxinokkal fertőzve okozhatnak komoly egészségkárosodást. Felmerül tehát a kérdés, hogy a gliotoxint termelő, biológiai védekezésre használt szervezet biztonságosnak tekinthető-e?

- Célkitűzéseink között szerepelt a gliotoxint termelő *Trichoderma* fajok izolálása, morfológiai jellemzése, molekuláris biológiai alapon történő összehasonlítása.
- Munkánk során a saját izolálású és a más törzsgyűjteményekből származó nagyszámú és több fajt is reprezentáló *Trichoderma* gombatörzsek laboratóriumi léptékű fermentálását tűztük ki célul, hogy a képződő gliotoxint analitikai kémiai módszerrel mutassuk ki.
- A metabolitot termelő gombatörzsek morfológiai, illetve molekuláris biológiai jellemzők alapján történő meghatározásával választ, illetve megerősítést kívántunk találni a gliotoxint termelő *Trichoderma* törzsek taxonómiai helyzetére.
- A *Rhizoctonia solani* gombával szemben beállított *in vitro* konfrontációs antagonizmus vizsgálattal választ kívántunk kapni a *Trichoderma* izolátumok által termelt gliotoxin gátlásban betöltött szerepére.
- A gliotoxin, mint az antibiózisban lehetséges szerepet játszó anyag, másrészt, mint mikotoxin értékelése is szerepelt a vizsgálatainkban.

A kapott eredmények várhatóan felhasználhatók lesznek a későbbiek során a gliotoxin – tágabb értelemben az antibiózis – szerepének megítélésében, a biológiai növényvédelem ismeretanyagának kiszélesítésében, illetve a hatékony és egyben biztonságos biopreparátumok kifejlesztésében.

1. táblázat: Néhány példa növény kórokozók ellen alkalmazható, trichodermákat tartalmazó készítményekre a világban

Termék neve	Gyártó	Ország	Antagonista	Célszervezet(ek)
Binab	Binab	Svédország	különböző *Trichoderma* törzsek	gyökérrothadás, korhasztó gombák
Bio-Fungus, Supresivit	Bio Plant és De Ceuster Mestsoffen	Dánia, Belgium	*Trichoderma* spp.	talajeredetű betegségek
RootPro, RootProtato	Efal Agri	Izrael	*Trichoderma harzianum*	*Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium* spp.
RootShield, PlantShield, T-22 Planter box	Bioworks, Inc.	USA	*Trichoderma harzianum* T-22	*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp.
Trichodex	Makhthesim Chemical Works	Izrael	*Trichoderma harzianum* T-39	*Botrytis cinerea, Colletotrichum* spp., *Fulvia fulva, Monilia laxa Plasmopara viticola*
Trichopel	Agrimm Technologies, Ltd.	Új-Zéland	*Trichoderma harzianum és T. viride*	*Armillaria, Botryosphaeria, Chondrostereum, Fusarium, Nectria, Pythium, Rhizoctonia* spp.
Trieco	Ecosense Labs Pvt. Ltd.	India	*Trichoderma viride*	gyökérrothadás, csírapusztulás, palántadőlés
Ecofit WP	Hoechst Schering AgrEvo Ltd.	India	*Trichoderma viride*	*Rhizoctonia solani, Pythium* spp., *Fusarium* spp.
Tri 002	Plant Support B.V.	Hollandia	*Trichoderma harzianum*	növekedést serkent, növeli a növény ellenállóképességét
Soilgard 12G	Thermo Trilogy, Certis Inc.	USA	*Trichoderma (Gliocladium) virens*	palántadőlés, gyökérbetegségek
Primastop	Kemira Agro Oy	Finnország	*Gliocladium catenulatum*	talajeredetű kórokozók, mag-, gyökér- és szárbetegségek ellen

Forrás: http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/productlist.htm, http://www.ippc.orst.edu/biocontrol/biopesticides/, http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides; Koch (1999)

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Trichoderma* genus

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó gombafajok több mint 200 éve ismertek. Persoon (1794) nevéhez fűződik a *Trichoderma* taxonómiai csoport bevezetése, négy közel hasonló gomba megemlítésével, amelyeket „Liszt-szerű por, körbevéve fonalas bevonattal" szavakkal jellemzett. A négy faj, amely eredetileg leírásra került ebben a génuszban, nevezetesen a *T. aureum*, *T. nigrescens*, *T. roseum* és *T. viride*, teljesen eltérő színű telepet képeztek; ma már köztudott, hogy egymástól függetlenek (Bissett, 1991a). A Tulasne fivérek nevéhez fűződik a *Trichoderma* anamorfok és a *Hypocrea* teleomorfok kapcsolatának első említése (1865), de ez egészen a közelmúltig feltáratlan terület maradt (cit.: Gams és Bisset, 1998). Bisby (1939) még úgy gondolta, hogy a nagyfokú morfológiai változatosság egyetlen faj, a *Trichoderma viride* változatainak tudható be. Harz jellemezte elsőként mikroszkópikusan is a *Trichoderma* nemzetséget (cit.: Gams és Bisset, 1998), majd Rifai (1969) javasolta a *Trichoderma* fajok rendszerezését mikroszkópikus morfológiai alapon, amely napjainkban is általánosságban elfogadott. Rifai javaslata szerint „faj-aggregátumokat" hoztak létre a nemzetségen belül. Domsch *et al.* (1980) szintén jellemezték, és pótlólagosan néhány fajjal kiegészítették Rifai rendszerét. A teleomorf kapcsolatok vizsgálata Dingley (1957) illetve Rifai és Webster munkásságához kapcsolódik (Rifai és Webster, 1966; Webster és Rifai, 1968). Az ismert teleomorf alakok a *Hypocrea* genus mellett más, az ahhoz közeli nemzetségekbe is tartoznak, mint a *Podostroma* P. Karst (Doi, 1967) és a *Sarawakus* Boedijn (Rifai *et al.*, 1985). Aszkospóra izolátumokból kiinduló *Trichoderma* anamorfokon elvégzett morfológiai tanulmányok Bisset (1984, 1991a, 1991b, 1991c, 1992) nevéhez fűződnek, aki 21 fajt különböztetett meg a *Pachybasium* szekcióban, és hetet a *Longibrachiatum* szekcióban. A morfológiai tanulmányok azt mutatták, hogy a fajok meghatározása kizárólag morfológiai alapon nagyon nehéz ebben a nemzetségben (Samuels, 1996; Gams és Bisset, 1998). A morfológiai bélyegeken alapuló fajhatározási módszerek azonban továbbra is elsődlegesek maradnak a faji és a faj-aggregátum szintű meghatározásban, ugyanakkor a pontos identifikáláshoz szükség lehet molekuláris biológiai módszerekre is (Samuels, 1996). A molekuláris biológiai módszereket taxonómiai céllal a közelmúltban vezették be a *Trichoderma* nemzetségben, konkrétan a *Trichoderma* és a *Longibrachiatum* szekciók

és a kapcsolódó teleomorfok revíziója céljából (Kuhls *et al*., 1996; Kullnig-Gradinger *et al*., 2002; Samuels *et al*., 1998, 2000, 2002; Lieckfeldt *et al.*, 1998, 1999, 2001).

A konídiumtartók elágazódásai változatos képet mutatnak, és látszólag hasonlítanak olyan nem-rokon nemzetségekre, mint a *Verticillium* és a *Gliocladium*. A legtöbb esetben a *Hypocrea* nemzetség *Trichoderma* anamorfjait a kevésbé szabályos konídiumtartó elágazások alapján különíthetjük el a sokkal szabályosabb, örvös elágazódású *Verticillium* nemzetségtől, illetve a *Penicillium*-szerű konídiumtartókkal rendelkező *Gliocladium* nemzetségtől.

A *Trichoderma* genus fajai gyors növekedésű telepekkel jellemezhetők, felületük kezdetben sima, majd a képződő légmicéliumtól és a képződő konídiumtartóktól pelyhes, vagy csomós tömörülések jelentkeznek. A sporuláció jellegzetesen zöldes színű (esetenként zöld, fehér vagy halványbarna), sohasem teljesen összefüggő, hanem kisebb-nagyobb csomókba tömörült. A hifák színtelenek, szeptáltak, sima falúak, ritkán szemcsésnek tűnnek, erősen elágazók. A legtöbb faj klamidospórát is képez, terminálisan és interkalárisan. A klamidospórák gömbölyűek, ellipszoid vagy hengeres alakúak, sima falúak. A konídiumtartók a szilárd táptalaj felszínén elszórtan, vagy koncentrikus gyűrűkbe, illetve csomókba tömörülve képződnek. A konídiumtartók elágazók, rajtuk másodlagos elágazódások is megfigyelhetők. A konídiumtartók elágazásai fialidokban végződnek, egyes fajoknál a főág csúcsa steril hifa-nyúlványban végződik. A fialidok alakja jellegzetes, faj- illetve faj-aggregátum szintű határozóbélyeg lehet. A sejtek palack, körte alakúak, megnyúltak, csúcsuk felé esetenként görbültek. Bizonyos fajoknál egy konídiumtartón eltérő formájú fialidokat találhatunk. A konídiumok egymást követően fűződnek le a fialidokon. Bizonyos fajoknál a lefűződést követően a konídiumok együtt maradnak, és félgömb alakú konídium-halmazt alkotnak, ritkán rövid láncot is képezhetnek, hialinok illetve sárgászöld-sötétzöld színűek, alakjuk gömb, ellipszoid, ellipszoid-hengeres, gyakran az alapi részen lemetszettek, felületük sima, vagy szabálytalan, akár szárnyszerű sejtfal kitüremkedésekkel ellátott (*Trichoderma saturnisporium* és *T. ghanese*) (Vajna, 1987; Bisset 1984, 1991a, 1991b, 1991c, 1992; Gams és Bisset, 1998).

A *Trichoderma* fajok közönséges fonalas talajgombák, melyek előfordulnak minden égövön az Antarktisztól a trópusokig (Domsch *et al.*, 1980). Szaprotróf szervezetként igen sokféle anyagot képesek szén-, illetve nitrogénforrásként felhasználni. Nagyszámú enzimet képesek termelni, például cellulázt és hemicellulázt

illetve kitinázt. Oudemans és Koning izoláltak elsőként *Trichoderma* gombákat talajból (cit.: Gams és Bisset, 1998). A *Trichoderma*-k világszerte elterjedtek és gyakori, nagy jelentőséggel bíró képviselői a talajok mikrobiotópjának (Turóczi, 1999). A *Trichoderma* gombafajok ugyan nem adtak számunkra olyan átütő jelentőségű anyagokat, mint a penicillin, de az enzimtermelő képességük, illetve az, hogy képesek megtámadni és gátolni más gombákat óriási lehetőségeket nyújtanak a kutatásban számos területen (Samuels, 1996). A *Trichoderma reesei* E. G. Simmons faj azon tulajdonsága, hogy képes celluláz enzimek termelésével a cellulóztartalmú anyagokat lebontani (Reese és Mandels, 1989; Kubicek *et al.*, 1990) lehetővé teszi a gomba ipari felhasználását is (Buchert *et al.*, 1994; Nigam, 1994). A legtöbb izolátum a természetben is képes élősködnii más gombákon, így például benövik az *Armillaria* fajok rizomorfáit, gyakoriak a különböző szkleróciumokon, vagy a növénykórokozó gombáknak a gazdanövényen előforduló képletein. A biológiai védekezésre való alkalmasságuk szempontjából kedvező az is, hogy a nemzetségben nincsenek kórokozó fajok. Kivételt jelent ez alól a *Lentinus edodes* (shiitake) és az *Agaricus bisporus* (kétspórás csiperke) gombatermesztés, ahol a zöldpenész betegséget okozhatják agresszív *Trichoderma* fajok (Komatsu, 1976; Muthumeenakshi *et al.*, 1994), de ez megfelelő technológia mellett elkerülhető. Néhány irodalmi adat utal csupán arra, hogy beteg növényekről is izoláltak *Trichoderma*-t de visszafertőzéssel nem tudták igazolni patogenitásukat (Kattner, 1990).

Számos tudományos cikk, könyv és áttekintés foglakozik a *Trichoderma* gombafajok gyakorlati felhasználhatóságával a biológiai növényvédelemben (Baker és Cook, 1982; Vajna, 1984; Papavizas, 1985; Chet, 1987; Jeffries és Young, 1994; Lorito *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1995; Hjeljord és Tronsmo, 1998; Harman és Björkman, 1998; Harman, 2000; Hjeljord *et al.*, 2001; Howell, 2003). Igen széles körben, az erdészeti kultúráktól (Highley *et al.*, 1997) a szántóföldi növényeken át a dísznövény és kertészeti kultúrákig (Elad *et al.*, 1981; Kraft és Papavizas, 1983; Harman, 2000). Ezek a munkák átfogó képet adnak a *Trichoderma* fajok biológiai védekezésben való alkalmazhatóságának jelenlegi helyzetéről.

2.2. *Trichoderma*-kutatás Magyarországon

Az első *Trichoderma* nemzetségre történő utalás 1952-ben volt, Ubrizsy (1952) által, aki – a szakirodalmon alapuló ismeretei alapján – *Trichoderma lignorum* (Tode)

Harz és a *T. koeningi* [sic] (=*Trichoderma koningii*) fajokat gyümölcsfáknál jelentkező gyökérpatogénként írta le. Ubrizsy és Reichart (1958) hat évvel később tett elsőként utalást *T. lignorum* anatagonista szerepéről növénykórokozókkal szemben. Elsőként Vörös (1957) írt le *Trichoderma* fajokat Magyarországon, nevezetesen a *T. lignorum* és *T. koningii* fajokat. Az első határozókulcs, rövid leírással, magyar nyelven Ubrizsy és Vörös (1968) nevéhez fűződik, akik a *Trichoderma* fajokat, mint a faanyagok felületén lágykorhadást előidéző gombát említik. Öt fajt jellemeztek: *T. album* Preuss, *T. koningii* Oud., *T. lignorum* (Tode) Harz, *T. glaucum* Abott, *T. viride* Pers. (Ubrizsy és Vörös, 1965). További *Trichoderma* fajok (*T. piluliferum* Bisset, *T. polysporum* Bisset, *T. longipilis* Bisset, *T. spirale* Bisset, *T. fasciculatum* Bisset, *T. minutisporum* Bisset) előfordulásáról Vajna (1983) illetve Turóczi *et al.* (1994) adtak számot.

Magyarországon a külföldihez hasonló népszerűségre tett szert a *Trichoderma*-kutatás. A növénybetegségek elleni biológiai védekezés területén intenzív kutatómunka az 1970-es években kezdődött hazánkban. 1983-tól 1987-ig Vajna és munkatársai az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében (MTA NKI) szabadföldi és fóliasátras kísérletekben vizsgáltak különböző *Trichoderma* izolátumokat és leírták felhasználhatóságukat a biológiai növényvédelemben. A kísérletek eredményeként egy *T. viride* törzsből gyakorlati alkalmazásra kész terméket fejlesztettek ki (talajeredetű kórokozók ellen zöldség és dísznövény kultúrákban, Vajna *et al.*, nem publikált adat), de megfelelő gyártó partner hiányában azóta sem került piacra (Turóczi, 1999). A kajszi gutaütéses betegségkomplexuma elleni lehetséges védekezési lehetőségeket Rozsnyai *et al.* (1992) és a görögdinnye fuzáriózisa elleni vékezést Duláné *et al.* (1987) vizsgálták *Trichoderma* gombával.

Az MTA NKI törzsgyűjteményében jelenleg is 250-nél több *Trichoderma*-t tárolnak, melyek felhasználásával a Gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központban *T. hamatum*-ból származó endokitináz gént vizsgáltak (Turóczi *et al.*, 1996; Fekete *et al.*, 1996; Fekete *et al.*, 2001). Az egri Eszterházy Károly Tanárképző Főiskolán elsősorban talajból izolált *Trichoderma*-k ökofiziológiai jellemzésével (előfordulás és kolonizációs képesség különböző talajtípusokban, környezeti tényezőkkel szembeni igények) foglalkoznak. Naár (1997) a hazai *Trichoderma* kutatások történelmi előzményeiről is áttekintést adott. Naár és Kecskés (1995, 1998a, 1998b) a hajtatott fejessalátán károkat okozó *Sclerotinia minor* ellen dolgoztak ki hatékony biológiai védelmet vinklozolin-rezisztens *Trichoderma* törzsek

szelektálásával, illetve a szaprobionta kompetíciót befolyásoló faktorok szerepét vizsgálták. A Budapesti Műszaki Egyetemen *Trichoderma* törzsgyűjteményt állítottak össze és a Bécsi Műszaki Egyetemmel közösen a *Trichoderma*-k molekuláris biológiai alapú rendszerezésén dolgoznak (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; Kubicek *et al.*, 2003). A Szegedi Egyetem Mikrobiológiai Tanszékén molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával végeznek kísérleteket hidegtűrő *T. harzianum* törzsek előállítására, illetve a szélsőséges környezeti tényezőknek ellenálló izolátumokat vizsgálták (Kredics *et al.*, 2000). A *Trichoderma* izolátumok biológiai védekezési potenciáljának fokozására a gombák extracelluláris enzimtermelését tanulmányozzák Manczinger *et al.*, (2002), Szekeres *et al.* (2004) és Kovács *et al*. (2004).

2.3. A *Trichoderma virens* faj

A jelen dolgozat alapjául szolgáló laboratóriumi vizsgálatok legnagyobbrészt a *Trichoderma virens* faj gliotoxintermelésének elemzését szolgálták.

Trichoderma virens (J. Miller, Giddens & Foster) von Arx, Beih., Nova Hedvigia 87: 288. 1987. (basonym: *Gliocladium virens* J. Miller, Giddens & Foster, Mycologia 49: 792. 1957.)

Teleomorf: *Hypocrea virens* (Chaverri, Samuels & E.L. Stewart), Mycologia 93: 1113-1124. 2001.

(A faj leírása: Webster és Lomas (1964) alapján, módosítva GamsésBissett (1998) és Chaverri *et al*., (2001) nyomán.

A telepek maláta táptalajon, 25 ºC-on gyorsan növekedők. A konídiumképzés jellemzően egyenletesen jelentkezik, és befedi a táptalaj teljes felszínét, esetleg ritkán lapos pusztulákat (konídiumtartó csomókat) képezve a Petri-csésze szélén, illetve koncentrikus körökben tömörülve. A sporuláció színe sötétzöld, kékes-zöldbe forduló. A telep hátoldala általában színtelen, vagy lassan sárguló, illetve borostyánsárga színű. Az egyenletesen, szétszórtan keletkező konídiumtartók oldalsó ágakkal rendelkező, légmicéliumnak tűnő képletként emelkednek ki a szubsztrátból. A konídiumtartók alapi része rendszerint steril, és oldalágak nélküli, a hosszának kb. felétől a csúcsáig jelentkeznek szabálytalanul az oldalágak, melyek 3-6 egymáshoz közel ülő fialidból álló csoportban végződnek. A hosszúfonalas (macronematous, /ang./) típusú konídiumtartókon szabálytalanul képződnek oldalágak. A konídiumtartó csúcsi fele

fertilis, és gyakran a csúcsa is tartalmaz egy fialid-csomót. Az elsődleges oldalágak rendszerint egyesével keletkeznek, a szembenálló párok közvetlen a szeptumok alatt erednek. A teljes rendszer szabálytalan, de nem tömött.

A konídiumtartó-csomókban képződő fialidok rendszerint hosszúkásak vagy ampullaszerűek, legtöbbször 4,5-10-(13)×2,8-5,5 µm méretűek, gyakran örvösen, 3-6 egymás mellett ülő fialid figyelhető meg, esetenként egyedülálló, vagy páros fialidok is megfigyelhetők. Az elszórtan elhelyezkedő fialidok általában hosszúkásabbak, 20×2,5-3 µm méretűek.

A konídiumok ellipszoid, illetve ovális formájúak, 3,5-6,0×2,8-4,1 µm méretűek, sima falúak, pásztázó elektronmikroszkópban (SEM), nagy nagyításnál enyhén bordázottak (Meyer és Plaskowitz, 1989), színük sötétzöld. A szomszédos fialidokból képződött konídiumok gyakran gömbszerű csomókba tömörülnek.

A *T. virens* faj rendszertani helye és elnevezése sokat változott. A faj elsőként a *Gliocladium* Corda genusban kapott helyet, *Gliocladium virens* J. Miller, Giddens & Foster-ként a *Gliocladium*-szerű konídiumtartó-elágazódások alapján. A *T. virens* nem az egyetlen *Gliocladium*-szerű konídiumtartó elágazódásokkal jellemezhető faj, amely a *Hypocrea* nemzetség anamorfjai között fellelhető. A *Hypocrea gelatinosa* (Webster és Lomas, 1964; Bisset 1991b), *Hypocrea flavovirens* Berk. & Broome (Doi, 1972) vagy más egyéb *Hypocrea* fajok anamorfjai is ilyen konídiumtartókkal jellemezhetők.

Bisby (1939) javaslata szerint a *Hypocrea gelatinosa* (Tode: Fr.) Fr. anamorfja nagyon hasonló volt a G. *virens* fajhoz, ezért a morfológiai hasonlóság alapján a *G. virens* faj elhelyezése a *Trichoderma* nemzetségben ésszerű. Ugyanakkor az a következtetés, miszerint a *Hypocrea gelatinosa* azonos lenne a *Hypocrea rufa* (Pers.) Fr. fajjal – mely azonban a *Trichoderma viride* Pers. faj teleomorfja– hibás volt (Chaverri *et al.*, 2000). A szakirodalomban gyakran szerepel a két – nevében hasonló *T. virens* és *T. viride* faj – téves névalkalmazása. Később, Webster és Lomas (1964) és Rifai (1969) úgy találták, hogy a *T. virens* morfológiailag közelebb áll a *Gliocladium* nemzetség tagjaihoz, mint a *T. viride* fajhoz, – amely a *Trichoderma* nemzetség típusfaja – ezért a *Gliocladium* nemzetségbe sorolását fogadták el. Több, a közelmúltban megjelent, a *T. virens* faj gliotoxin-termelését tárgyaló publikációban megtalálható *Gliocladium virens* basonym használata ide vezethető vissza. Seifert (1985) a *Sphaerostilbella* nemzetségről és rokon nemzetségekről írt monográfiájában

megállapította, hogy a *Hypocrea Gliocladium*-típusú anamorfjai nem illenek bele az igazi, *Gliocladium penicilloides* típusfajjal jellemzett *Gliocladium* nemzetségbe, hanem inkább a *Trichoderma* nemzetségbe tartoznak. Molekoluláris biológiai módszerekkel, 28S és ITSrDNS szekvenciák vizsgálataival Rehner és Samuels (1994, 1995) arra a következtetésre jutottak, hogy a *Hypocrea* anamorfjai *Trichoderma*-k, és a *T. virens* faj genetikailag a *Hypocrea* fajok közé tartozó és filogenetikailag igen távol áll a *G. penicilloides* fajtól. A *Trichoderma virens* faj legitim besorolása (von Arx 1987) ma már általánosan elfogadott (Bissett, 1991a, b; Samuels, 1996; Gams és Bisset, 1998) amelyet a Rehner és Samuels (1994, 1995) által elvégzett DNS szekvenciaanalízisek eredményei is megerősítenek.

A *T. virens* teleomorfjának, a *Hypocrea virens* (Chaverri, Samuels & E.L. Stewart) új fajkénti leírását Chaverri *et al.* (2001) adták. Molekuláris biológiai eljárásokon alapuló módszereikkel megerősítették a *T. virens* faj *Trichoderma* nemzetségbe tartozását is.

2.4. A *Trichoderma*-k másodlagos anyagcsere termékei

A másodlagos anyagcsere kifejezésnek Bu'Lock (1975) növényélettannal foglalkozó kutató a névadója, aki a szekunder metabolitokat az öregedő tenyészetek által termelt anyagoknak tekintette. Igen nagyszámú ismérv választja el a primer és a szekunder anyagcsere-formát, de az alapvető különbség az, hogy az elsődleges anyagcsere nélkülözhetetlen a sejtek életbenmaradásához és növekedéséhez, amíg a másodlagos anyagcsere nem. Az elsődleges anyagcsere tartalmazza az anabolikus és katabolikus folyamatokat is, amelyek életben tartják a szervezetet. A másodlagos anyagcsere csak anabolikus, és nélkülözhető a mikroba szempontjából. Az élő szervezet elveszítheti a másodlagos anyagcserére való képességét anélkül, hogy elpusztulna (Bu'Lock, 1975; Bennet és Bentley, 1989; Betina, 1994). Wilhite *et al.* (1994) által UV sugárzással előállított *Trichoderma virens* mutánsok elveszítették a gliotoxin-termelő képességüket, amelyen az antibiotikus aktivitásuk is alapult, de ez nem jelentette a pusztulásukat, csak a patogénnel szembeni gátló hatásuk csökkent az eredeti törzshöz viszonyítva.

A természetre jellemző gazdaságosságra törekvés, a létért való küzdelem körülményei között mégis fel kell tételeznünk, hogy maga a történés, adott körülmények

között ezen anyagok termelése esszenciális az őket termelő szervezetek számára (Szentirmai, 1993).

A másodlagos anyagcseretermékek igen változatos kémiai csoportokat alkotnak, de mind az elsődleges anyagcsere valamely lépcsőjéből származtathatók, mind egy-egy primer metabolit karikatúrájának tekinthető (Szentirmai, 1993). Következésképpen, a másodlagos anyagcsere-termékek csoportosítása a prekurzoraik alapján célszerű, ahonnan származtathatók (Bennett, 1983). A szekunder metabolitokat Weinberg (1974) „biokémiai furcsaságoknak" nevezte (biochemically bizarre), illetve korábban a „rendkívül sokszínű szerves vegyületek" („an extraordinary bestiary of organic compounds") kifejezést használta a szerző (Weinberg, 1970).

Bizonyos rendszertani csoportok, – beleértve gombákat, sugárbaktériumokat – anyagcserefolyamataik során termelnek olyan anyagokat, amelyek nem tűnnek nélkülözhetetlennek a termelő mikroorganizmus növekedése szempontjából. Ezek a másodlagos anyagcsere-termékek képződéséhez vezetnek, melyeket időnként *idiolit*oknak is neveznek (Campbell, 1983). Ezen vegyületek képződése általában a növekedési fázis (*trofofázis*) végén indul meg, és a stacioner fázis (idiofázis) első szakaszára terjed, amikor a sejtosztódás sebességének a csökkenése, sok esetben a spóraképzés megindulása, illetve az erre való előkészület az intermedier anyagcsere addig jól működő rendszerében némi zavart okozhat. Másodlagos anyagcsere-termékek szintézise gyakran jelentkezik egy elkülönülő termelési fázis alatt (idiofázis) amely elválasztható a növekedési szakasztól (trofofázis) (Drew és Wallis, 1983). Ezt a trofofázis-idiofázis kapcsolat jelenlétét megfigyelték több másodlagos anyagcseretermék fermentációja során (Demain, 1972).

Az antibiotikumok általában mikrobák által termelt alacsony molekula-tömegű szerves vegyületek. Az antibiotikumok kis koncentrációban gátló hatással bírnak más mikroorganizmusok növekedésére, vagy másféle metabolikus aktivitásukra. A legtöbb ilyen anyagot talajlakó mikróbák termelik (Fravel, 1988).

Az antagonizmusban szerepet játszó folyamatok közül a legrégebben ismert és legalaposabban tanulmányozott az antibiotikus hatású anyagok (antibiotikumok) termelése (Fravel, 1988). Az antibiotikus hatást Roberts 1874-ben ismerte fel (cit.: Turóczi, 1999). A *Penicillium notatum* West (=*P. chrysogenum* Thom) másodlagos anyagcseretermékének, a penicillinnek 1929-es felfedezése (Fleming, 1929) mérföldkő

volt az antibiotikumok kutatásában. Intenzív kutatások kezdődtek további antibiotikumok után, a mikróbák antagonizmusára és antibiózisára figyelve (Sivasithamparam és Ghisalberti, 1998). Richard Weindling (1932) amerikai kutató egyik korai munkájában megfigyelte, hogy egy általa *Trichoderma lignorum* fajként azonosított gomba antagonizmust mutatott más gombafajokkal szemben. Az antibiotikus anyag a tápközegben volt megtalálható (Weindling, 1934), és kinyerésre került kristályosított formában is (Weindling és Emerson, 1936). A *Trichoderma lignorum*-nak nevezett faj –amelyről feltételezhetjük, hogy azonos volt a *T. virens*-szel – antibiotikus hatása különös figyelmet érdemel. Ennek az az oka, hogy Weindling (1934) első cikke óta számos kutató foglalkozott e faj antifungális anyagainak vizsgálatával (Howell *et al.*, 1993).

Sivasithamparam és Ghisalberti (1998) utalnak arra, hogy amíg az elsődleges anyagcsere termékek csoportja mindössze néhány száz vegyületet foglal magába, aközben a másodlagos anyagcsere termékek száma százezer feletti, és évente ezer újabb vegyületet találnak meg. Jelenleg több mint 140, *Trichoderma*-k által termelt, szekunder metabolitot ismernek, és ez a szám is növekszik. Dennis és Webster (1971a, 1971b, 1971c) említést tesznek a *Trichoderma*-k igen széles spektrumú antibiotikum-termeléséről. Ezeknek a másodlagos anyagcsere termékeknek létezik elfogadott és ismert osztályozása (Turner és Aldridge, 1983; Luckner, 1990).

A *Trichoderma*-k antimikrobiális termékei rendkívül változatos csoportot alkotnak a kémiai szerkezet és a funkció szempontjából, és ez a csoport illékony és nem illó vegyületeket is tartalmaz (Taylor, 1986). A 2. táblázat az antibiotikus anyagokat kémiai tulajdonságaik szerinti csoportosításban összegzi.

2. táblázat: *Trichoderma* fajok által termelt legfontosabb, az antibiózisban is szerepet játszó vegyületek a kémiai tulajdonságaik alapján csoportosítva

Metabolit neve/csoportja	**A termelő gombafaj (törzs)/közlés ideje**	**Antibiotikus hatás jellege**	**Egyéb hatás**
1. Nem acetátból származtatható vegyületek			
mannitol	*Trichoderma harzianum* (Hussain *et al.*, 1975)		antimutagén
ferulinsav	*T. virens* (Dickinson *et al.*, 1995)	Antifungális, baktericid, antivirális	sejtméreg
2. Citrát-ciklus intermedierek			
viridiofungin A, B és C	*T. viride* (Harris *et al.*, 1993)	antifungális	fitotoxin
3. Zsírsavak: (acetil CoA lineáris kapcsolódásából)			
4. Poliketidek			
benzokinonok			
antrakinon	*T. polysporum* (Donnely és Sheridan, 1983)	Antibakteriális, fungicid	
5. Oxigént tartalmazó heterociklikus vegyületek			
trichoharzin	*T. harzianum* (Kobayashi *et al*., 1993)	Antifungális	Növényi növekedést serkentő
harzianolide	*T. harzianum* (Almassi *et al*., 1991)	Antifungális	Növényi növekedést serkentő
6. Pironok			
6-pentyl-α-piron	*T. harzianum* (Claydon *et al*., 1987) *T. koningii* (Simon *et al*., 1988), *T. viride* (Collins és Halim, 1972), *Trichoderma* spp. (Kikuchi *et al*., 1974)	Antifungális, antimikrobiális	Növényi növekedést serkentő, *Rhizoctonia solani**, kókusz illatú aroma**
Koninginin A, B, C, D, E	*T. harzianum, T. koningii*	Antifungális	Növényi növekedést szabályozó hatású
7. Terpénvázas anyagok			
trichodermol	*T. polysporum, T. sporulosum* (Adams és Hanson, 1972), *T. virens* (Yamamoto *et al*., 1969)	Antifungális	mycotoxin
mycotoxin HT-2	-		mycotoxin
mycotoxin T-2	*T. harzianum, T. lignorum* (Bamburg és Strong, 1969)	Antifungális	mycotoxin
trichodermin	*T. polysporum* (Adams és Hanson, 1972) *T. viride* (Godtfersten és Vangedal, 1965)	Antifungális	antihormonális, mycotoxin
harzianum A	*T. harzianum* ATCC 90237 (Corley *et al*., 1994)		

2. táblázat (folyt.)

Metabolit neve/csoportja	**A termelő gombafaj (törzs)/közlés ideje**	**Antibiotikus hatás jellege**	**Egyéb hatás**
7. Terpénvázas anyagok (folyt.)			
harziandione	*T. harzianum* (Ghisalberti *et al*., 1992)		
heptelidsav (avocetin)	*T. virens, T. viride* (Itoh *et al.*, 1980)	antibiotikum antimikrobiális	Antibakteriális,
viridin	*T. virens* (Moffatt *et al*., 1969; Lumsden *et al*., 1992b), *G. fimbriatum* (Brian *et al.,*1946), *T. viride* (Golder és Watson, 1980)	antibotikum	Gombaspóra-csírázás gátló *Rhizoctonia solani* *
viridiol	*T. virens, T. viride* (Moffatt *et al*., 1969)		
8. Aminosavakból származtatható metabolitok			
isonitrin A	*T. hamatum* IMI 3208, *T. harzianum* IMI 3198 (Baldwin *et al.*, 1991)	Antibiotikum	
isonitrin B	*T. koningii* (Tamura *et al.*, 1975), *Trichoderma* sp. (Nobuhara *et al.*, 1976)	Antibiotikum	
isonitrin D	*T. polysporum, T. koningii, T. harzianum* (Fujiwara *et al.*, 1982)	Antibiotikum	
isonirin C	*T. hamatum, T. viride* (Fujiwara *et al.*, 1982)	Antibiotikum	
isonitric acid E, F	*T. hamatum, T. viride* (Baldwin *et al.*, 1991)	Antibiotikum	
gliotoxin	*T. virens* (Lumsden *et al.,*1992a) *T. lignorum* (Weindling, 1934), *T. hamatum (?)* (Hussain *et al*., 1975), *G. fimbriatum* (Johnson *et al*., 1943)	Antibiotikum, antivirális	Acetolaktát szintetáz inhibitor, immuno-modulátor, fitotoxikus
gliovirin	*T. virens (Howell* és *Stipanovic, 1983)*	Antibiotikum	*Pythium ultimum* ***
9. **Polipeptidek (peptaibol antibiotikumok)**			
trichopolyn I	*T. polysporum* (Fujita *et al.,* 1981)	antibiotikum	
trichopolyn II	*T. polysporum* (Fujita *et al.,* 1981)	antibiotikum	
10. **Egyéb metabolit**			
valinotricin	*T. polysporum* (Fujita *et al*., 1984)		

Forrás: (Turner és Aldridge, 1983; Luckner, 1990; Sivasithamparam és Ghisalberti, 1998)

* A *Rhizoctonia solani*-val szembeni aktivitását figyelték meg (Lumsden *et al.*, 1992b).

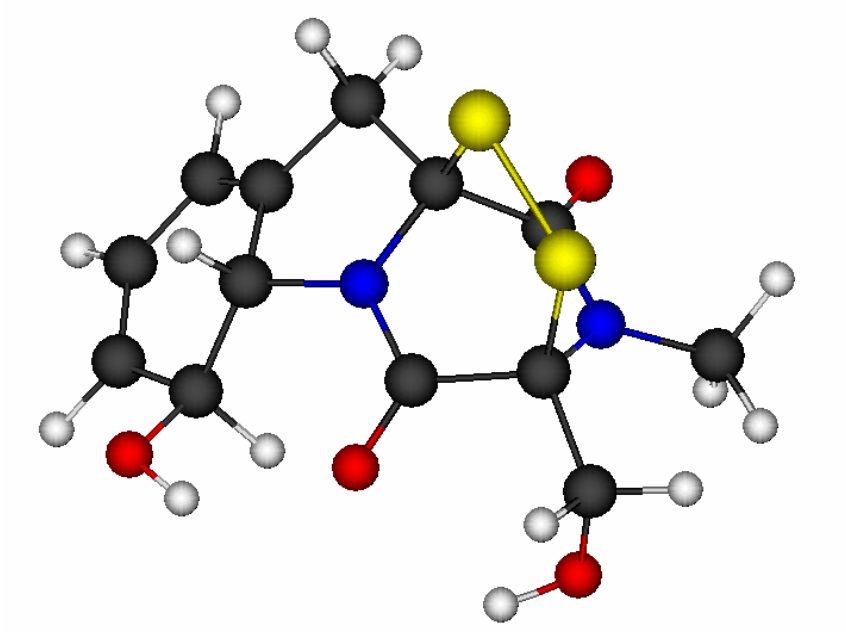
** A metabolitot termelő gombák laboratóriumi kultúrája gyakran jellegzetes kókusz illatú a 6-pentyl pyron jelenlétének köszönhetően

*** A *Pythium ultimum* patogénnel szembeni erősebb hatékonyságát figyelték meg (Howell és Stipanovic, 1983.

2.5. A gliotoxin termelődése és szerepe a biológiai védekezésben

A 2. táblázat rávilágított a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fajok által termelt másodlagos anyagcsere-termékek sokszínűségére. A jelen dolgozatban a másodlagos anyagcseretermékek közül a gliotoxin termelésével foglalkoztunk, ezért a következőkben az említett metabolitra vonatkozó ismereteket foglaljuk össze.

A gliotoxin (1. ábra) az egyik legismertebb tagja az epipolytio-diketo-piperazin (ETP) gombametabolit csoportnak. A ETP csoportba tartozó anyagcseretermékek a piperazindion hattagú gyűrűn található diszulfid híddal jellemezhetők, amelyek jelentőséggel bírnak a vegyületek biológiai szerepében (Waring és Beaver, 1996) azáltal, hogy a molekulának a diszulfid-híd ad antibiotikus aktivitást (Taylor, 1971). A gliotoxint 1943-ban ismerték fel, írták le és jellemezték (Johnson *et al.*, 1943).



1. ábra: A gliotoxin molekula szerkezeti képlete

A molekula stabilitása függ a közegben mért pH-tól. Savanyú környezet növeli a kémiai stabilitását, de gyors lebomlás következik be pH 7,0 felett (Weindling és Emerson, 1936; Brian és Hemming, 1945). A molekula néhány kémiai jellemzőjét a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat: A gliotoxin néhány kémiai jellemzője

GLIOTOXIN	$C_{13}H_{14}N_2S_2O_4$
2,3,5a,6-tetrahidro-6-hidroxi-3-(hidroximetil)-2metil-10H-3a, 10a-epithiopirazino[1,2a]indol-1,4-dion	
Molekulatömege:	g/mol
	324,6
Oldhatósága:	mg ml^{-1}
vízben	0,07
etilalkoholban	4,7
DMF (N,N dimetilformamid) -ben	17
kloroformban	20
piridinben	77

Forrás: The Merck Index, Tenth Edition. 1983. p. 635.

Számos gomba képes a gliotoxin termelésére. *Penicillium* és *Aspergillus* fajok is termelhetik ezt a metabolitot (Sakai és Watanuki, 1987; Richard *et al.*, 1994). Savard *et al.* (1994) *Penicillium bilaii* PB-50 jelzésű törzsével termeltek gliotoxint. Szintén termelnek gliotoxint az *Aspergillus fumigatus* Fresenius és a *Penicillium terlikowskii* Zaleskii izolátumai is (Brewer *et al.*, 1966; Taylor, 1971; Nieminen *et al.*, 2002; Wenehed *et al.*, 2003). A *Gliocladium* (Johnson *et al.*, 1943), a *Thermoascus* (Waring *et al.*, 1987), *Dichotomomyces* (Seigle-Murandi *et al.*, 1990) és a *Candida* (Shah és Larsen, 1991) nemzetségek bizonyos fajai szintén rendelkeznek ezen antibiotikum termelésének a képességével.

A Trichoderma nemzetség 1964-ben Webster és Lomas, akik különböző *Trichoderma* izolátumokat vizsgáltak és ismerték a Weindling (1932) antibiotikumot termelő gombája körüli identifikációs anomáliát (*Trichoderma viride* vagy *Gliocladium fimbriatum*?) megismételték az antibiotikum-termelési kísérletet Weindling és Brian izolátumaival, továbbá számos *T. viride* izolátummal. Az eredmény meglepő volt. A *Trichoderma viride* és más *Trichoderma* izolátumok nem termeltek sem gliotoxint, sem viridint. Kiderült, hogy az eredeti törzsek, – az akkori genus koncepció szerint – a *Gliocladium virens* fajjal azonosak (Vajna, 1984). Ubrizsy és Vörös (1965) említették azt, hogy a gliotoxin elnevezés annak a tévedésnek a következménye, hogy a termelő *Trichoderma*-törzset a munka elején egy zöld-konídiumú *Gliocladium*-fajnak hitték.

A *Trichoderma virens* törzsek által termelt gliotoxin igen széles antibiotikus aktivitással rendelkezik, beleértve a baktériumosztódás, valamint a gombaspóra kicsírázásának gátlását, továbbá a vírusreplikáció gátlását szövettenyészetben (Rightsel

et al., 1964). A gliotoxin antifagocita és immunrendszert módosító hatása szintén ismert (Müllbacher *et al.*, 1985). A gliotoxint a sejtek gyorsan felveszik, ami ezután az élő szövetekben, sejtekben a fehérjékhez kötődve kumulálódik, majd a mitokondriumok működési zavarát eredményezheti, a fehérje- és nukleinsav- szintézist, valamint sok más sejtfunkciót gátolhat (Middleton, 1974; Jones és Hancock, 1988; Waring *et al.*, 1994, 1995). Haraguchi *et al.* (1996) dohánynövényekben tapasztalta az elágazó láncú aminosavak szintéziséért felelős acetolaktát-szintetáz enzim gátlását gliotoxin által. Valin, leucin és izoleucin hozzáadásával a növényeken jelentkező növekedés-gátlás mérsékelhető volt. A gliotoxin káros hatásának mértéke függ a toxinnal szembeni kitettség mértékétől (expozíció) (Wilhite és Straney, 1996). Brian és Hemming (1945) tanulmányozták azt az anyagot, amelyet ők még a *T. viride* faj termékének hittek, és először végeztek kísérletet ezzel az antibiotikummal mint magcsávázó szerrel. Zab, árpa és búza magvakat kezeltek maggal terjedő gombabetegségek ellen (*Ustilago hordei, Helminthosporium avenae* /=*Dreschlera avenae*/, *Tilletia caries*). A gliotoxin hatásos volt ugyan, de gyengébb eredményt adott, mint a szerves higanytartalmú (akkoriban használatos) csávázószerek. Az eredmények alapján, valamint a gliotoxin vizes oldatának instabilitása miatt a szerzők akkor úgy ítélték meg, hogy állatgyógyászatban nem, növényvédő szerként inkább figyelembe vehető a gliotoxin, s jövője függ a szintézis módszer kidolgozásától is (Vajna, 1984).

Számos tudományos munka foglalkozik a *T. virens* gomba gliotoxin termeléséhez optimális tápanyagellátás szerepével, termelésének ütemével és kinetikájával. Park *et al*. (1991) különböző szén- és nitrogénforrások gliotoxin-termelésre kifejtett hatását vizsgálták, és úgy találták, hogy kísérleteikben az optimális szénforrásnak a glükóz, nitrogénforrásként pedig a fenilalanin mutatkozott. Korábban Kirby *et al.* (1978) a fenilalanint fontos prekurzorként említették a gliotoxin bioszintézisében, melynek első lépésében egy fenilalanin molekula egyesül egy szerinnel. Park *et al*. (1991) speciálisan gliotoxin termelésére készített szintetikus táplevesben a legtöbb gliotoxint az inkubáció nyolcadik napján mérték. Ugyanakkor Lumsden *et al*. (1992a) a gliotoxin képződését figyelték meg mohatőzeges, talajmentes közegben, amivel a képződés ütemét, illetve a gliotoxin mozgását, diffúzióját *in situ* modellezték. A gomba beoltását követő két napban intenzív gliotoxin-képződést tapasztaltak, majd a gliotoxin koncentráció lecsökkent. Az előző megfigyeléssel egyezően, Ridout és Lumsden (1993) véleménye szerint folyékony tápközegben csak a

gomba fejlődésének első két napjában figyelhető meg gliotoxin-felhalmozódás. A gliotoxin későbbi eltűnése több okkal is magyarázható: 1., a gliotoxin bioszintézis megszűnése; 2., a gliotoxin lebomlása (esetleg átalakítása más molekulává); 3., a sejtek elhalása, ezzel együtt a bioszintézis képessége is csökken. Wilhite és Straney (1996) laboratóriumi fermentációs rendszerekben vizsgálták a *T. virens* izolátum gliotoxin-termelésének kinetikáját és időzítését. Kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a *Trichoderma virens* toxintermelése átmeneti, 16 órán keresztül, a gomba intenzív növekedési szakaszában történik (trofofázis), szemben a klasszikus másodlagos anyagcsere-termékekkel, amelyek termelése a tápanyagok kimerülése után, illetve a trofofázis befejeződésekor következik be. Wilhite és Straney (1996) utal arra, hogy a gliotoxin bioszintézis ütemezése nemcsak az átmeneti jellege miatt érdekes, hanem azért, mert a szintézis kezdete és a vége egyaránt befejeződik jóval a gyors növekedés fázisának (trofofázis) vége előtt.

A gliotoxinnak az antibiózisban és az antagonizmusban betöltött szerepéről is számos vélemény látott napvilágot, amelyet eltérő módon itélnek meg különböző szerzők. Wright (1956a, 1956b, 1956c) közlése szerint a gliotoxin-termelő *T. viride* (*T. virens*?) izolátum hatákonyabban gátolta a *Pythium* spp. okozta palántadőlést, mint a viridin-termelő izolátum, miközben a kontroll, – amely egyik metabolitot sem termelte – adta a leggyengébb eredményt. Howell (1987) vizsgálatainak eredményei alapján szántóföldi körülmények között a *Trichoderma* (syn: *Gliocladium*) *virens* nem tudta parazitálni a *Rhizoctonia solani* patogén gombát, de ugyanakkor gátolta a *Rhizoctonia solani* által okozott palántadőlést gyapotnövényeken. Az eredmények azt igazolták, hogy az antibiózis játszhatta a fő szerepet a *R. solani* elleni védekezésben, amely alátámasztást nyert később mikroszkópi vizsgálatokkal is, melyek antibiózisra utaló jeleket mutattak. Wilhite *et al.* (1994) szerint a termelt gliotoxin igen nagy jelentőséggel bír a *T. virens* izolátum antagonista szerepében *Pythium ultimum*-mal szemben, és megfigyelték azt, hogy gliotoxint nem-termelő mutáns törzsek körülbelül fele hatékonysággal gátolták a *P. ultimum* patogént, és a biológiai növényvédelemben is kisebb hatékonysággal működtek. Lumsden *et al.* (1992a) megállapították azt is, hogy főképp a gliotoxinnak tulajdonítható a patogénekkel szembeni antagonista hatás.

Az előző megállapításokkal szembeállítható Jones *et al.* (1984) vizsgálata, melyben földimogyoró *Rhizoctonia solani* által előidézett palántadőlése és gyökérrothadása ellen alkalmaztak gliotoxin-termelő, illetve gliotoxint nem-termelő *T. virens* izolátumokat.

Eredményeik azt mutatták, hogy a gliotoxin-termelő *T. virens* izolátum az antibiotikumot nem termelő izolátumnál kevésbé hatékonyan gátolta a betegség kialakulását.

Howell (1999) a másodlagos anyagcseretermékeik – köztük a gliotoxintermelés – szempontjából vizsgált *T. virens* izolátumokat. Megállapítása szerint a *T. virens* izolátumok antibiotikumspektruma jelentősen eltérhet, aminek alapján két csoportba sorolhatók. A P-csoportba tartozók gliovirint, viridint, heptelidsavat és viridiolt termelnek, míg a Q-csoport tagjai gliotoxint, viridint és viridiolt képeznek, de nem fordul elő gliovirin és heptelidsav a metabolitjaik között. A P-csoportba tartozók viszont nem termelnek gliotoxint). Mivel a két legfontosabb antibiotikum – a gliotoxin és a gliovirin – hatásspektruma eltér (a gliotoxin a *Rhizoctonia solani* ellen sokkal hatásosabb, mint a *Pythium ultimum* ellen és fordítva) így a két csoport tagjai is eltérő mértékben képesek védeni a növényt e két kórokozó ellen.

2.6. Molekuláris biológiai eredmények alkalmazása a *Trichoderma*-taxonómiai kutatásban

Napjainkban a nukleinsavakat vizsgáló molekuláris biológiai módszerek elterjedtek és általánosan használatosak a fajok meghatározásában és filogenetikai osztályozásban. Zimand *et al.* (1994) „Randomly Amplified Polimorphic DNA" (RAPD) módszerrel, 10 tagú oligomer primerek használatával különböztetett meg *Trichoderma* törzseket. A módszerrel hasonló PCR termék-mintázatot kaptak, amely alapján egymáshoz hasonló genetikai állományú törzseket találtak. A T-39-es jelzésű, *Botrytis cinerea* ellen hatékony biológiai növényvédő szer készítmény törzse, elkülöníthető volt ezzel a módszerrel a többi izolátumtól. A RAPD fingerprinting (ujjlenyomat) módszert használták Arisan-Atac *et al.* (1995) szelídgesztenye rák (*Cryphonectria parasitica*) ellen hatékony *Trichoderma* izolátumok alcsoportjainak elkülönítésére; úgy találták, hogy a biológiai hatékonyság megoszlott a vizsgált izolátumok eltérő csoportjai és alcsoportjai között. Restriction Fragment Lenght Polymorphisms (RFLP) és RAPD kombinációs technikáját használták Muthumeenakshi *et al.* (1994) termesztett gomba szubsztrát-komposztból származó *Trichoderma harzianum* izolátumok csoportosítására és elkülönítésére. A három elkülöníthető csoportból egy volt különösen aggresszív. Chen *et al.* (1999) szintén a RAPD-módszert használták a termesztett kétspórás csiperkén (*Agaricus bisporicus*) a zöld-penész betegséget okozó *Trichoderma* izolátumok genetikai variabilitásának vizsgálatára. A *Trichoderma harzianum* faj 4-es biotípusát találták meg az esetek 90 %-ában, amely nagy hasonlóságot mutatott a 2-es biotípussal, amely az Európára jellemző patogén genotípus.

A DNS szakaszok szekvenálásán alapuló molekuláris biológiai módszerek alkalmazhatók lehetnek faji, vagy fajon belüli (izolátum szintű) elkülönítésre, mivel ismert DNS szakaszok szekvenálási eredményei evolúciós eredetre is utalnak. Az rRNS alegységeket kódoló szakaszok közötti „internal transcribed spacer"-ek (ITS) sokkal változékonyabbak, mint az alegységek. Az rDNS alegységek között található két ITS régió molekuláris jellemzésére jól használható, mert viszonylag kis méretű (500-600 bp) és könnyen amplifikálható PCR-rel, egy nemzetségen belül a fajok, vagy fajon belül a populációk vizsgálatára használhatják (White *et al.*, 1990).

Kindermann *et al.* (1998) kísérelték meg elsőként a *Trichoderma* nemzetség teljes, ITS rDNS szekvenciák alapján történő filogenetikai analízisét. Napjainkban

kutatócsoportok dolgoznak a *Trichoderma* nemzetség molekuláris biológiai alapon történő rendszerezésén, konkrétan a *Trichoderma* és a *Longibrachiatum* szekciók és a kapcsolódó teleomorfok revízióján (Samuels, 1996; Kullnig-Gradinger *et al*., 2002; Samuels *et al*., 1998, 2000, 2002; Lieckfeldt *et al.*, 1998, 1999, 2001). Rehner és Samuels (1994, 1995) a *Hypocrea* telemorfok és *Trichoderma* anamorfjaik kapcsolatát vizsgálták és megerősítették a *Trichoderma virens* faj *Trichoderma* nemzetségbe tartozását is.

3. **ANYAG ÉS MÓDSZER**

3.1. *Trichoderma* törzsek és izolátumok, a tenyésztés 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 (MUCL/BCCM^{TM}) törzsgyűjteményéből származtak. Az izolátumok részben sajátok részben pedig más gyűjteményekből származó törzsek voltak.

3.1.1. A *Trichoderma* törzsek izolálása és kiválasztása

Amikor a *Trichoderma* telepek látható, elkülönülő telepeket képeznek a szubsztrát felszínén, akkor innen végezhető el az izolálás (Gams és Bissett, 1998). A DE ATC MTK növényvédelmi Tanszék gyűjteményéből (D) származó *Trichoderma*-k törzsei egy részének izolálása 2 %-os, antibiotikummal kiegészített maláta agaron történt.

A többi saját törzs izolálását *Trichoderma*-szelektív táptalajon (Askew és Laing, 1993, 1. sz. melléklet), talajszemcsékről végeztük (a DE ATC MTK Növényvédelmi Tanszék izolátumai, amelyek talajeredetűek).

16-16 talajszemcsét, illetve korhadó fakéreg-darabot helyeztünk a szelektív táptalaj felszínére. A talajszemcsék felszínén illetve a táptalaj felszínén megjelenő *Trichoderma* telepekből konídiumcsomókat emeltünk le és használtunk a szélesztésekhez, melyekről a hipotetikusan monokonídiumos izolátumokat nyertünk.

A gliotoxintermelési vizsgálatokban 96 *Trichoderma* izolátum került tesztelésre a „Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain/Belgian Coordinated Collections of Microorganisms" (Belgium) törzsgyűjteményéből. A gyűjteménybe korábban felvételre került 17 duplikált izolátum, 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. (3. táblázat)

4. táblázat: Az MUCL/BCCM vizsgálatba vont izolátumainak listája az izolátumok eredetével

Izolátumok	Eredeti gyűjtemény jel	Földrajzi eredet	Szubsztrát
Trichoderma virens			
MUCL/BCCM 7585	ATCC 13213; (=CBS 249.59)	USA, Georgia	talaj
MUCL/BCCM 8445		Belgium, Korbeek-Lo	humuszos talaj
MUCL/BCCM 14058		Zaire, Yangambi	talaj, erdőtalaj
MUCL/BCCM 18139		Belgium, Heverlee	humuszos talaj, üvegház
MUCL/BCCM 19014	ATCC 9645	USA, Maryland	talaj
MUCL/BCCM 29415*		Belgium, Rijkel	szalma, termesztett gomba-szubsztrát
MUCL/BCCM 34687		Belgium, Meise	fa, trópusi üvegház
MUCL/BCCM 41468		Szingapúr	gombakultúra fertőző
MUCL/BCCM 44898	D/091	Magyarország, Debrecen	humuszos talaj
MUCL/BCCM 44899	D/121	Magyarország, Izsák	humuszos homoktalaj
MUCL/BCCM 44922	D/128	Magyarország, Esztergom	homoktalaj, aggregátumok
T. hamatum			
MUCL/BCCM 8151		Hollandia, Baarn	lebomló levél
MUCL/BCCM 8965		Belgium, Heverlee	rothadó fa
MUCL/BCCM 11316		Belgium, Heverlee	talaj
MUCL/BCCM 29736		Belgium, Heverlee	talaj, kert
MUCL/BCCM 44905	Tha-2**(=D/101)	Magyarország, Tha-2	
MUCL/BCCM 44906	D/113	Magyarország, Eger	homoktalaj
T. aureoviride			
MUCL/BCCM 18923		Belgium, Oud-Heverlee	fatönk, *Fagus sylvatica*
MUCL/BCCM 22194		Belgium, Heverlee	humuszos talaj
MUCL/BCCM 29417		Belgium, Rijkel	szalma, termesztett gomba-szubsztrát
MUCL/BCCM 30189		USA, New York	
T. flavofuscum			
MUCL/BCCM 7995	ATCC 13308	USA, Georgia	talaj
T. harzianum			
MUCL/BCCM 15569		USA, PA	talaj
MUCL/BCCM 15573		USA, PA	talaj, szennyvíziszap előtt.
MUCL/BCCM 15583		USA, PA	talaj, szennyvíziszap után.
MUCL/BCCM 16223		USA, Ohio	víz
MUCL/BCCM 16450		Belgium, Brüsszel	decayed reed panel
MUCL/BCCM 19271		Belgium, Heverlee	acrylic *és* Trimetal paint
MUCL/BCCM 19412		Belgium	
MUCL/BCCM 19468		Belgium, Brussels	elhalt ág, *Fagus sylvatica*
MUCL/BCCM 28446	IAM 12506	-	-
MUCL/BCCM 29416		Belgium, Rijkel	szalma, termesztett gomba-szubsztrát
MUCL/BCCM 29707		Belgium, Heverlee	talaj
MUCL/BCCM 29733		USA, Ohio	szennyvíziszap
MUCL/BCCM 38044		India, Mysore	-
MUCL/BCCM 44178		-	washing up water, paper manufact.
MUCL/BCCM 44891	D/087	Magyarország, Debrecen	talaj, palántanevelő
MUCL/BCCM 44892	D/110	Magyarország, Eger	csernozjom talaj
MUCL/BCCM 44924	D/130	Magyarország	elhalt kéreg, diófa
T. koningii			
MUCL/BCCM 1043	CBS 353.33	Ausztria	talaj, legelő
MUCL/BCCM 8814		Hollandia, Bilthoven	elbomló levél, *Quercus robur*
MUCL/BCCM 11425		UK, England, Nottingham	

3. táblázat (folyt.)

Izolátumok	Eredeti gyűjtemény jel	Földrajzi eredet	Szubsztrát
***T. koningii* (folyt.)**			
MUCL/BCCM 19359		Belgium, Heverlee	talaj, üvegház
MUCL/BCCM 29271		Dél-Afrika, Transvaal	talaj, *Acacia karroo* alatt
MUCL/BCCM 42797		Marokkó, Doukala	cukorrépaföld
MUCL/BCCM 42798		Marokkó, Doukala	cukorrépaföld
MUCL/BCCM 42800		Marokkó, Doukala	cukorrépaföld
MUCL/BCCM 44896	D/090	Magyarország, Debrecen	talaj, paradicsom palántanevelő
MUCL/BCCM 44897	D/120	Magyarország, Izsák	humuszos homoktalaj
T. pseudokoningii			
MUCL/BCCM 11426		UK, England, Nottingham	
MUCL/BCCM 16267		Hollandia, Baarn	talaj
MUCL/BCCM 19358		-	humuszos talaj, üvegház
MUCL/BCCM 29730		UK, England, Nottingham	
MUCL/BCCM 29739		Belgium, Heverlee	humuszos talaj, üvegház
MUCL/BCCM 44914	D/116	Magyarország, Eger	homoktalaj
T. atroviride			
MUCL/BCCM 44893	D/088	Magyarország, Debrecen	talaj, paradicsom palántanevelő
MUCL/BCCM 44894	D/109	Magyarország, Eger	barna erdőtalaj
MUCL/BCCM 44895	D/122, ATCC 74058	-	-
T. viride			
MUCL/BCCM 1044		-	-
MUCL/BCCM 7769		Hollandia, Aalsmeer	talaj, üvegház
MUCL/BCCM 7840		Belgium, Heverlee	*Amantia phalloides*
MUCL/BCCM 11312		Belgium, Heverlee	*Phragmites communis,* talajbóll
MUCL/BCCM 19307		Belgium, Machelen	festék
MUCL/BCCM 19448		UK, England	festék
MUCL/BCCM 29708		Hollandia, Wageningen	-
MUCL/BCCM 29723		MUCL/BCCM	laborkultúra fertőző
MUCL/BCCM 29725		Belgium, Bruxelles	rothadó széna
MUCL/BCCM 29726		Belgium, Heverlee	Xylamon festékkel kezelt fa
MUCL/BCCM 29745		Belgium, Louvain-la-Neuve	fa, *Quercus* sp.
MUCL/BCCM 29748		-	borospince
MUCL/BCCM 30195		Németo., Saar, Hamburg	savanyú ipari szennyvíz
MUCL/BCCM 31470	ATCC 32098	-	-
MUCL/BCCM 31471	ATCC 26802	Kanada	fa, *Alnus* sp
MUCL/BCCM 44903	Tv-5** (=D/100)	Magyarország	-
MUCL/BCCM 44904	D/112	Magyarország, Eger	csernozjom talaj
T. longibrachiatum			
MUCL/BCCM 295		Belgium, trópusi üvegház	gyökér, *Theobroma cacao*
MUCL/BCCM 20461	ATCC 24449	-	-
MUCL/BCCM 20520		Belgium, Gembloux	komposzt
MUCL/BCCM 29711		-	-
MUCL/BCCM 29740		Belgium, Heverlee	humuszos talaj, üvegház
MUCL/BCCM 29752		USA, New York, Ithaca	-
MUCL/BCCM 29753	ATCC 26921	-	-
MUCL/BCCM 31834		-	laborkultúra fertőző
MUCL/BCCM 33106		Malawi, Zomba	erdő, avarszint, elhalt ágak, avar
MUCL/BCCM 40621	ATCC 52326	India	cukornád
MUCL/BCCM 42799		Marokkó, Doukala	cukorrépatábla
MUCL/BCCM 44177			papírgyár, felmosóvíz.
T. polysporum			
MUCL/BCCM 1046		-	-
MUCL/BCCM 1179		Belgium, Tervueren	avar, *Fagus sylvatica*
MUCL/BCCM 1181		Belgium, Tervueren	ág, tűlevél, avar, *Fagus sylvatica*
MUCL/BCCM 4220		Kanada, Quebec	erdő, faág
MUCL/BCCM 8860		Hollandia, Bilthoven	levél, *Quercus robur*
MUCL/BCCM 18507		Belgium, Haasrode	avar, erdő
MUCL/BCCM 20192		Belgium, Heverlee	erdő
MUCL/BCCM 44909	D/106	Magyaro., Csanádapáca	csernozjom talaj

3. táblázat (jelmagyarázat)
D: Debreceni Egyetem, Agrártudományi Centrum, Mezőgazdaságtudományi Kar, Növényvédelmi Tanszék gyűjteménye, Debrecen
MUCL/BCCM : Mycothèque de l'Université catholique de Louvain/Belgian Coordinated Collections of Microorganisms
ATCC : American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA;
CBS: CentraalBureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands;
- : hiányzó adat v. információ;
*: eredetileg *Trichoderma hamatum*-ként identifikálták
**: MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, Budapest, dr. Vajna László szívességéből

3.1.2. Tenyésztésre és gliotoxin-fermentációhoz használt táptalajok

A gombatörzsek tenyésztése, konídiumnyerés és a konfrontációs antagonizmus teszt során 2 %-os maláta-kivonat agar táptalajt használtunk (összetétel az 1. mellékletben). A sterilizált táptalajból Petri-csészékbe 15 ml-t töltöttünk minden esetben.

Tanulmányt végeztünk, melyben megnéztük a növekedési erélyt és a gliotoxin termelését szintetikus és maláta táplevesekben. Martin és Demain (1980) szerint a komplex táptalajokban jobban elkülönül a trofofázis és az idiofázis szakasza. Gliotoxin optimális termeléséhez kifejlesztett szintetikus tápforrást (Park *et al.*, 1991) valamint 2%-os maláta levest (Duchfea, Haarlem, Hollandia) használtunk (1. melléklet).

A tápfolyadékokat a receptek és az elkészítési útmutatók szerint autoklávozással (Fedegari Autoclavi, Spa-Albuzzano-Pv, Olaszország) sterilizáltuk, majd a felhasználásig +4 ˚C-on tároltuk.

A szintetikus és a maláta-kivonat táplevesekből 50 ml-t töltöttünk ki 100 ml-es Erlenmeyer lombikokba, melyeket a tesztelt 17 *Trichoderma* izolátum (BCCM^{TM}/MUCL 8445, 14058, 18139, 19014, 29415, 34687, 41468, 44898, 44899, 44922, 8965, 11316, 29736, 44905, 44906) 10^3 konídium ml^{-1} végső koncentrációjú konídiumszuszpenzióival oltottuk be. A konídiumok és klamidospórák számát haemocitométerrel (Marienfeld, Germany) határoztuk meg, Optiphot fénymikroszkóp (Nikon, Japan) alatt, 400×-os nagyítás mellett. A beoltott táptalajokat 25 ˚C-on, 95 fordulat min^{-1} rázatás és teljes sötétség mellett inkubáltuk. A tenyészetekből steril pipettával vettünk mintákat a beoltást követő 62. és 86. órában, illetve a micélium száraztömeget is ekkor mértük meg. A minták tárolása 1,5 ml-es Eppendorf csőben, -18 ˚C-on történt a kromatográfiás vizsgálatig.

A fermentációhoz és gliotoxin termelés vizsgálatához a 2 %-os maláta táplevest használtunk. Wilhite és Straney (1996) kísérleteiben szintén használt folyékony maláta táplevest (mint komplex közeget) gliotoxin termeltetésére.

A maláta tápleves beoltásához használt konídiumszuszpenzió koncentrációja megegyezett az előzőkben ismertetettel. A beoltott táptalajok inkubációjának és a mintavétel körülményei megegyeztek a szintetikus és a maláta tápleves összehasonlításakor leírtakkal.

3.1.3. A micélium száraztömeg és a pH mérése

A mintavételeket követően szűréssel, kvantitatív szűrőpapíron (grade 43, Whatman, UK), porcelán szűrőtölcsérben (Büchner) a biomasszát leválasztottuk, majd a biomasszát a szűrőpapírral együtt a szárítószekrényben 90˚C-on, 36 óráig szárítottuk.

A szűrt tenyészetből visszamaradó folyékony fermentált táptalaj kémhatását közvetlenül a mintavételek után mértük.

3.2. A RAPD PCR analízis módszere

A RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) PCR módszer során a DNS-t véletlenszerűen kiválasztott 10 nukleotidból álló oligomer primerrel amplifikáljuk. A képződött termék gélelektroforézise után, az azonos bázispárméretű PCR termékek meglétén illetve hiányán alapulva végzünk fenotípusos összehasonlítást a vizsgált izolátumok között.

3.2.1. Micéliumtömeg előállítása DNS kivonásához és a DNS kivonása

A micéliumtömeg előállítása a 11 *T. virens* és 3 más *Trichoderma* faj (*T. koningii, T. atroviride, T. hamatum*) izolátumaiból 2 %-os maláta folyékony táptalajon történt, 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban. A 2 %-os maláta agaron egy hétig inkubátorban (REVCO RI, Revco Scientific, Asheville, NC, USA) növesztett tenyészetekről egy oltókacsnyi konídiummal oltottuk be a táplevest. A tenyészeteket 5 napig, 25 ˚C-on, teljes sötétségben, 95 min^{-1} fordulatszámmal rázattuk. A keletkezett biomasszát 50 ml-es műanyag centrifugacsövekbe töltöttük, majd centrifugáltuk (ALC Refrigerated centrifuge PK 130) 15 percen át, 3000 min^{-1} fordulatszámmal. A centrifugálás után a felülúszó folyadékot eltávolítottuk, és a micéliumot tartalmazó

műanyag flakonokat mélyfagyasztóba helyeztük -80 ˚C hőmérsékletre, 1,5 órán át. Ezt követően a minták liofilizálása következett, egy teljes éjszakán át (Virtis Benchtop 3L). A liofilizált micéliumtömeget -18˚C-on tároltuk a DNS kivonásáig.

A DNS kivonás módszere liofilizált micéliumtömegből a BCCM^{TM}/MUCL Biomolekuláris Laboratóriumának protokollját követte.

Ezzel az eljárással összesen 14 törzsből – 11 *Trichoderma virens* izolátumból és 3 más *Trichoderma* faj (*T. koningii, T. atroviride, T. hamatum*) izolátumaiból – vontuk ki az összes genomi DNS-t.

30 mg liofilizált micélium mintákat mértünk be 1,5 ml-es steril Eppendorf csövekbe, majd a gombasejteket 700 µl kivonó puffer adagolása után steril Pasteur pipettával szétroncsoltuk, ezzel is elősegítve a lízist. Ezt követően a minta thermo-blokkba került 1 órára, és negyedóránként homogenizáltuk (az Eppendorf csövek forgatásával). A sejtek feltárása után a mintákat 15 percig 13000 min^{-1} fordulaton centrifugáltuk (Refrigerated Eppendorf Centrifuge 5415R). A felülúszót pipettával összegyűjtöttük (1000 µl) és másik új, steril 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe.

700 µl kloroform:izoamilalkohol (24:1) oldatot adtunk az előző pontban nyert lizátumokhoz, és óvatos rázással összekevertük. Ezt követően a mintákat ismét 15 percig centrifugáltuk 13000 min^{-1} fordulaton, majd a felülúszókat összegyűjtöttük és új csövekbe pipettáztuk. Az új Eppendorf csövekbe fagyott etilalkoholt tettünk, megközelítőleg a minták mennyiségének a dupláját, majd a mintákat egy éjszakán át -20˚C-on tároltuk. Következő lépésben az Eppendorf csöveket 4˚C-on 20 percig centrifugáltuk 13000 min^{-1} fordulaton. A felülúszó eltávolítása után a mintákat vákumcentrifugában (Speed-Vac SC 110 Savant) 20 perc alatt beszárítottuk. A csapadékot 100 µl steril „BIOMOL" (molekuláris biológiai célú víz, Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA) vízben gyűjtöttük össze.

Az így kapott oldat már mentes a sejttörmelékektől, lipidektől, és nem (vagy csak nyomokban) tartalmaz fehérje-komponenseket. A PCR reakciót azonban mikromennyiségű szennyezés is zavarhatja, ezért további nukleinsav-tisztítás szükséges.

A mintákat tartalmazó Eppendorf csövekbe a minták mellé háromszoros mennyiségű NaI-oldatot adtunk azért, hogy a DNS molekulák töltést kapjanak, majd a töltéssel rendelkező molekulák megkötéséhez „üvegtejet" (kolloid méretű szilikátot tartalmazó folyadékot) adtunk, a mintát néhány percig enyhe rázás közben inkubáltuk.

Következő lépésként a mintát 5 percig 13000 fordulat min^{-1} -en centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a mintához 500 µl mosó puffert (NewWash) adtunk, majd a mintát óvatosan felkevertük egy 1000 µl-es pipettával. Ezt a lépést háromszor ismételtük meg, végül a tiszta DNS-t 30 µl steril vízben (molekuláris biológiai célú víz, Sigma Chemical Co., St Luis, MO, USA) gyűjtöttük össze.

3.2.2. RAPD PCR reakció véletlenszerű primerekkel

A 14 *Trichoderma törzs* amplifikációit egyenként 25 µl-es végtérfogatú reakcióelegyekben végeztük. A mikro-PCR-plate csövei az alábbi reakcióelegyet tartalmazták:

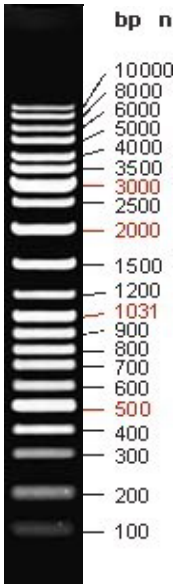
- 2 µl DNS-t (10 ng μl^{-1})
- 0,5 µl Taq polimeráz enzim (Fermentas Life Sciences, Fermentas GMBH, Germany)
- 2,5 µl puffert
- 1,5 µl $MgCl_2$
- 0,5 µl DNTP (Fermentas Life Sciences, Fermentas GMBH, Germany)
- 2,5 µl 10 bázisú oligonukleotit primer (Kit A: A-01, A-04, A-10, A-17 Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA). A véletlenszerűen kiválasztott 10 bázisból álló oligomer primerek egyenként: A-01: 5'-CAGGCCCTTC-3'; A-04: 5'-AATCGGGCTG-3'; A-10: 5'-GTGATCGCAG-3'; A-17: 5'-GACCGCTTCT-3', 15 µg ml^{-1} koncentrációban
- 15,5 µl steril víz (molekuláris biológiai célú víz, Sigma Chemical Co., St Luis, MO, USA)

A keveréket mikro-PCR-plate-re pipettáztuk, majd a PCR reakció a következő hőprofil alapján játszódott le:

- 7 perces denaturációs szakasz 94 ˚C-on
- 1,5 perc 94 ˚C, 2 perc 35 ˚C, majd 3 perc 72 ˚C (45 ciklus)

Végezetül a berendezés (PTC-200 Thermal Cycler) 7 ˚C-on tárolta a mintákat. A PCR reakció két ismétlésben játszódott le.

A DNS kimutatása horizontális gélelektroforézissel történt. Az elektromos mezőben vándorló nukleinsav darabok méret alapján válnak el. A kapott sávok etídium-bromid segítségével jelezhetők, melyek DNS-sel alkotott komplexe UV hatására fényt bocsát ki. Az elektroforézishez 1,4 %-os agaróz-gélt készítettünk. Az elegyet az agaróz teljes oldódásáig forraltuk, majd kb. 50 °C-ra hűtöttük. Kiöntés előtt 5 µl etídium-bromid oldatot adtunk hozzá. Ezt követően 5 µl betöltési puffert adtunk 20 µl PCR termékhez, majd ezután a gél zsebeibe pipettáztuk. A GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, #SM0331 (Fermentas Life Sciences, Fermentas GMBH Germany) DNS-markert futtatuk a bázispárok méretének összehasonlító meghatározásához (2. ábra).



2. ábra: DNS marker a bázispárméretekkel

Az elektroforézist 90 V feszültséggel 2,5 óráig végeztük, TBE pufferben. Az etídium-bromiddal jelzett DNS jelenlétét áteső UV fényben mutattuk ki.

3.2.3. Fenológiai analízis

A fenológiai analízis folyamán Munaut *et al.* (1998) által leírt módszert követtük, ahol az eljárás azon a feltételezésen alapult, hogy a véletlenszerűen kiválasztott primerek reprodukálhatóan képesek amplifikálni polimorfikus sávokat. A sávok – jelenlétük, illetve hiányuk esetén – 1 és 0 értékeket kaptak. Az összes vizsgált törzsre és primerre vonatkozó eredményeket egy mátrixban ábrázoltuk.

Az izolátumok páronkénti összehasonlítását lehetővé tette a közös sávok megosztása. A hasonlósági együtthatót (F) Sorensen-Dice módszer szerinti számítás nyomán a következő képlettel határoztuk meg:

$$F=2\times n_{ab}\times(n_a+n_b)$$

Ahol: n_{ab}= a megegyező polimorfikus sávok jelenléte az „a” és „b” mintában, és az n_a illetve n_b= az összes polimorfikus sáv száma az „a” vagy „b” mintában.

A genetikai távolságmátrix értékeit (1-F) a PHYLIP programmal (Phylogeny Interference Package, version 3.2, Felsenstein, 1989) határoztuk meg, a „súlyozatlan pár-csoportok módszerét” (UPGMA, Unweighted Pair-Group Method based on the Arithmetic Averages) felhasználva, számtani átlagot számolva. A fát a program „drawgram” része ábrázolta, fenogram formájában.

3.3. *Trichoderma* törzsek azonosítása ITS rDNS szekvencia alapján

A kísérletekben vizsgált *T. virens* törzsek faji szintű meghatározása, illetve faji hovatartozásuk igazolása a jelenleg legkorszerűbbnek és megbízhatóbbnak tartott molekuláris biológiai módszer, a riboszómális DNS géncluster ITS1 és ITS2 (internal transcribed spacers) szakaszának meghatározásával történt. Ehhez szükséges a gombasejtek feltárása, a teljes genomiális DNS kinyerése és tisztítása. A kívánt szakasz polimeráz láncreakció (PCR) segítségével szaporítható fel a szekvenáláshoz. A bázissorend analízise Sanger-féle stopnukleotid módszeren alapul. Ennek során a polimeráz reakciót különböző lánchosszúságnál fluorescensen jelzett didezoxi nukleotidok megállítják. A kapott DNS darabokat kapilláris elektroforézissel választjuk el, majd a fluorescens jelet detektáljuk, ez adja meg a nukleotid sorrendet.

3.3.1. Micéliumtömeg felszaporítása a DNS kivonásához és a DNS kivonása

A gombák felszaporítása DNS-kivonás céljából, az 3.2.1. pontban leírtaktól eltérő módon történt. Konídiumnyerés céljából a törzseket 2%-os maláta tartalmú ferde agarra oltottuk, majd két hétig szobahőmérsékleten inkubáltuk, hogy ekkorra az agar teljes felületén sporulációt nyerjünk.

100 ml-es Erlenmeyer lombikokban, egyenként 10 ml 3 %-os maláta táplevest sterilizáltunk autoklávozással. Egyenként 2-2 ml steril táplevest pipettáztunk a dúsan sporuláló *T. virens* törzset tartalmazó ferdeagaros kémcsövekbe, majd a pipetta segítségével, keverő mozdulatokkal, illetve dörzsöléssel a konídiumokat szuszpendáltuk. A 2 ml konídiumszuszpenzió visszapipettázásával inokuláltuk a táplevest.

A törzsenként kettő, beoltott táplevest tartalmazó Erlenmeyer lombikot 240 min^{-1} fordulatszámon történő rázatással, szobahőmérsékleten, 36 órán keresztül inkubáltuk.

A gombasejtek feltárása enzimatikus reakcióval, Qiagen „Dneasy Plant Mini Kit”-tel az előállító útmutatója alapján történt. Először a 36 órás gombatenyészetekből származó micéliumot a tenyészetek leszűrésével steril szűrőpapíron öszegyűjtöttük. A táptalaj maradékát desztillált vízzel mostuk ki. Az összegyűjtött micéliumból kis mennyiséget steril kerámiagolyókat tartalmazó „Green Beads” (Rosche) steril, 2 ml-es feltárócsőbe tettük, és „MagNA Lyser” (Roche) sejtfeltáróval 90 másodpercig 5000 min^{-1} fordulaltot alkalmazva tártuk fel, AP1 lízispuffer jelenlétében.

Az előző lépés során nyert lizátumhoz 130 µl AP2 puffert adtunk, majd összekeverés után 5 percig jégen tartottuk. Az AP2 puffer detergens felelős a fehérjék és poliszacharidok kicsapásáért. Az oldószeres és a vizes fázis szétválasztása 4°C-on, 20000 g-n, 5 percig tartó centrifugálással történt. A felülúszót (a DNS-t tartalmazó vizes fázist) óvatosan lila QIAshredder oszlopokra pipettáztuk, melyeket 2 ml-es centrifuga csövekbe helyeztünk, majd 2 percig 20000 g-n cenrifugáltuk. Ezzel a lépéssel a finom csapadékokat is eltávolítottuk az oldatból.

A centrifugálás után az átszűrt oldatot új, steril Eppendorf csőbe pipettáztuk át, ügyelve arra, hogy a csövekben közel azonos mennyiségű (kb 450 µl) oldat legyen. 1,5×-es mennyiségű AP3/E puffer hozzáadása és elkeverése után az oldatból 650 µl-t DNeasy Mini Spin oszlopra pipettáztunk, amelyet előzőleg egy steril 2 ml-es Eppendorf csőbe helyeztünk. Az oszlop szilikagél membránt tartalmaz, mely megköti a DNS-t. 1 percig tartó, 6000 g-s centrifugálás után a DNS a membránhoz kötődött, az átfolyót pedig eltávolítottuk, majd megismételtük a lépést a megmaradt mintával, ami az előző pipettázáskor nem fért az oszlopra.

A DNS-tisztítási folyamat lényege, hogy az előző pontban ismertetett DNeasy Mini Spin oszlopban található szilikát alapú mátrix megköti a DNS-t, így mellőle az esetleges szennyező anyagok eltávolíthatók.

A megkötött DNS-t tartalmazó oszlopra 500µl AW puffert pipettáztunk, majd 1 percig tartó 6000 g-s centrifugálás után az átfolyót eltávolítottuk. Ezt követően újabb 500µl AW puffert pipettáztunk a membránra, majd 2 percig 20000 g-n centrifugáltuk. Az etanolt is tartalmazó AW mosó (washing) puffer a DNS leoldása nélkül a szennyeződéseket távolította el a membránhoz kötődött nukleinsav mellől. A következő lépésben az oszlopot egy új, steril 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, majd 100 µl AE puffert pipettáztunk közvetlenül a membránra és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 6000 g-n 1 percig cenrifugáltuk, így a DNS az oldatba került.

3.3.2. A DNS felszaporítása és a PCR termék kimutatása

PCR segítségével lehetőség nyílik egy néhány 100, vagy akár 4-5000 bázispárból álló DNS-szakasz specifikus felszaporítására. A reakciót 0,2 µl-es PCR csövekben végeztük, Primus-MWG (MWG BIOTECH, Németország) termocyclerben. Az egyes csövek az alábbi reakcióelegyet tartalmazták (végtérfogat 50 µl):

- 23,55 µl steril víz
- 5 µl Pfu DNS polimeráz puffer 10× (20 mM $MgSO_4$-al)
- 1 µl dNTP (10 mM) (Fermentas Life Sciences, Fermentas GMBH, Németország)
- 5 µl LR1 primer (5 pmol μl^{-1}), (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3')
- 5 µl SR6R primer (5 pmol μl^{-1}), (5'-AAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3')
- 0,45 µl Pfu polimeráz (3U μl^{-1}) (Promega, Bio-Science Hungary, Magyarország)
- 10 µl DNS templát

Az LR1 és SR6R (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002) primereket a Bio-Science Kft-n keresztül (Budapest) az Integrated DNA Tecnologies (USA, Coralvill) cégtől szereztük be.

A DNS kimutatása rutinszerűen horizontális agaróz-gélelektroforézissel történik. Az elektromos mezőben elmozduló nukleinsavdarabok méretük alapján választódnak el.

A kapott sávok etídium-bromid segítségével jelezhetők, melyek DNS-sel alkotott komplexe UV hatására fluoreszkál. Az elektroforézishez 1,4 %-os agaróz-gélt készítettünk. Az elegyet az agaróz teljes oldódásáig forraltuk, majd kb. 50 °C-ra hűtöttük. Kiöntés előtt 5 µl etídium bromid törzsoldatot adtunk hozzá. A gél teljes dermedése után 5 µl DNS mintához 1 µl töltőpuffert (Loading Dye 6x, Fermentas) adtunk, majd a gél zsebeibe pipettáztuk. A DNS méretének megállapításához a minta mellett 5 µl molekulasúly markert (100 bp DNA Ladder Ready to Use, Fermentas) futtattunk.

3.3.3. A minták előkészítése a ciklikus szekvenáló reakcióhoz és a bázissorrend meghatározása

A szekvenáló reakcióhoz tökéletesen tiszta amplifikált DNS-re van szükség, amely nem tartalmazhat dNTP, primer, vagy egyéb DNS maradványokat. Így az előző PCR reakció során kapott terméket utólagosan tisztítani kellett. A tisztítást Microcon YM-100 szűrővel végeztük.

A Microcon mintatartót 1,5 ml-es Eppendorf csőbe tettük (a „kék” résszel felfelé), majd 0,5 ml térfogatú mintát pipettáztunk rá, anélkül, hogy a pipettával a membránhoz értünk volna. Ezt követően 8 percen át 500 g-n centrifugáltjuk, majd a mintatartót kivettük az Eppendorf csőből. Ezután a mintatartót fordítva („kék” rész lefelé) új, steril Eppendorfba helyeztük. 3 perc 1000 g-s centrifugálás után az 5-15 µl koncentrált minta az Eppendorf csőbe került, melyet a mintatartó eltávolítása után lezártunk, és a felhasználásig -18ºC-on tároltuk.

A reprezentatív törzsek rDNS ITS nukleotidsorendjének vizsgálatát a „jelölt terminátorú ciklikus szekvenálás” módszerrel megbízás alapján az MGW-Biotech GmbH cégnél, Németországban végezték. A fragmentumok elválasztása és a szekvencia leolvasása AB1 3100 készülékkel történt.

A ciklikus szekvenáló reakció:

A vizsgálathoz a AB1 szekvenáló kit-jét használtuk. A kit reakcióelegye tartalmazza a normál dNTP-ket és a jelölt dNTP-ket, valamint a Taq DNS polimeráz enzimet. A végső reakcióelegy összetevői (20 µl végtérfogat):

- 8 µl szekvenáló elegy, v1.1 RR 100-a

- 4 µl LR1 primer (0,8 pmol μl^{-1})
- 4 µl steril víz

- 4 µl előzőleg tisztított PCR reakció termékek

A 4-4 µl PCR termék utólag, a többi komponens elegyének a PCR csövekbe mérése után kerültek szétosztásra. A szekvenáló reakcióhoz a következő hőprofilt alkalmaztuk:

- 96 °C, 10 mp denaturáció,
- 50 °C, 5mp annelláció,
- 60 °C, elongáció,

Mindez 28 ciklus folyamán ismétlődött.

3.3.4. Az ITSrDNS szekvenciák megfeleltetése (alignment) és dendrogram készítése

Az ITSrDNS szekvenciák kiértékelése, csoportosítása és a dendrogram elkészítése az internetről szabadon letölthető szoftverekkel történt. Az analízisben 3, reprezentaív, eltérő gliotoxintermelésű és származású törzset vizsgáltunk és hasonlítottunk össze más izolátumokkal.

A FASTA formátumú, **.txt* kiterjesztésű szekvenciákat a ClustalX szoftverrel (Thompson *et al.*, 1997) csoportosítottuk az azonos bázisok egy vonalba kerülésének céljából (megfeleltetés-alignment). A feldolgozott adatokat **.msf* kiterjesztésűre történő átkonvertálását a ClustalX program végezte. A MEGA2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software) (Kumar *et al.*, 2001) program az **.msf* kiterjesztésű szekvencia inputokat alakította **.meg* kiterjesztésűvé, amelyek a GeneDoc szoftverrel (Nicholas *et al.*, 1997) megnyithatóvá váltak. A szoftver menüsorának felhasználásával lehetővé vált a ClustalX által végrehajtott szekvencia-megfeleltetés korrigálása, illetve a a denrogram-file elkészítése. A dendrogram megrajzolására a TREEVIEW 1.6.6 programot használtuk (Page, 1996).

A megfeleltetés (alignment) során a saját gliotoxintermelő kísérletekben szereplő *T. virens* izolátumok ITS szekvenciáin kívül szerepeltek a *Hypocrea virens* TUBF-870 (NCBI AF486011, Kubicek *et al.*, 2003) a *H. virens* GJS 95-194 (NCBI AF328552, Chaverri et al., 2001), *H. virens* T1 (NCBI AF501334, Park *et al.*, nem bublikált adat), *T. virens* (NCBI 048734, Shin és Lee, nem publikált adat), *T. viride*

CBS 240.63 (NCBI X9386, Kuhls et al., 1996), *T. viride* TUBF1041 (NCBI AF486010, Kubicek *et al.*, 2003) *T. harzianum* D/090 (nem publikált szekvencia) *T. spirale* D/093 (nem publikált szekvencia) törzsek szekvenciái is.

3.4. Gliotoxin-termelés: a folyadékkromatográfiás (HPLC) mérés módszere

A HPLC (High Performanced Liquid Chromatography) rendszereket eltérő tulajdonságú, igen alacsony koncentrációjú anyagok kimutatására (detection) és mennyiségi meghatározására (determination) fejlesztették ki. Mikrobák által termelt anyagcseretermékek, mikotoxinok kimutatására széles körben használatos, mivel a kimutatási határ és a meghatározási határ is igen alacsony.

3.4.1. Fermentáció a vizsgálatba bevont *Trichoderma* törzsekkel

A felhasznált anyagok és a módszerek megegyeznek az 3.1.2. pontban ismertetett eljárásokkal. A különbség a mintavétel időpontjában volt. A komplex és a szintetikus táptalajok összehasonlítása során a mintavételek a fermentáció 62. és 86. órájában történtek, míg a gliotoxintermelő *T. virens* törzsek vizsgálata esetében az első mintavétel 16 órával a leoltás után következett, majd ezt követően az inkubáció 24., 40., 48., 64., 72., 88. és a 96. órájában történt.

A -18 ˚C-on, Eppendorf csövekben tárolt mintákat szobahőmérsékleten felolvasztottuk, majd a micéliumdarabokat tartalmazó mintát rázással homogenizáltuk. A micéliumfragmentumok újbóli leválasztása céljából a mintákat centrifugáltuk 12000 fordulat min^{-1}-el 12 perc időtartamig (Sigma 2M). A felülúszó folyadékfázisból a mintát üvegcsébe pipettáztuk, majd a beállított mennyiséget az injektor juttatta a HPLC rendszerbe.

3.4.2. A HPLC méréshez felhasznált anyagok

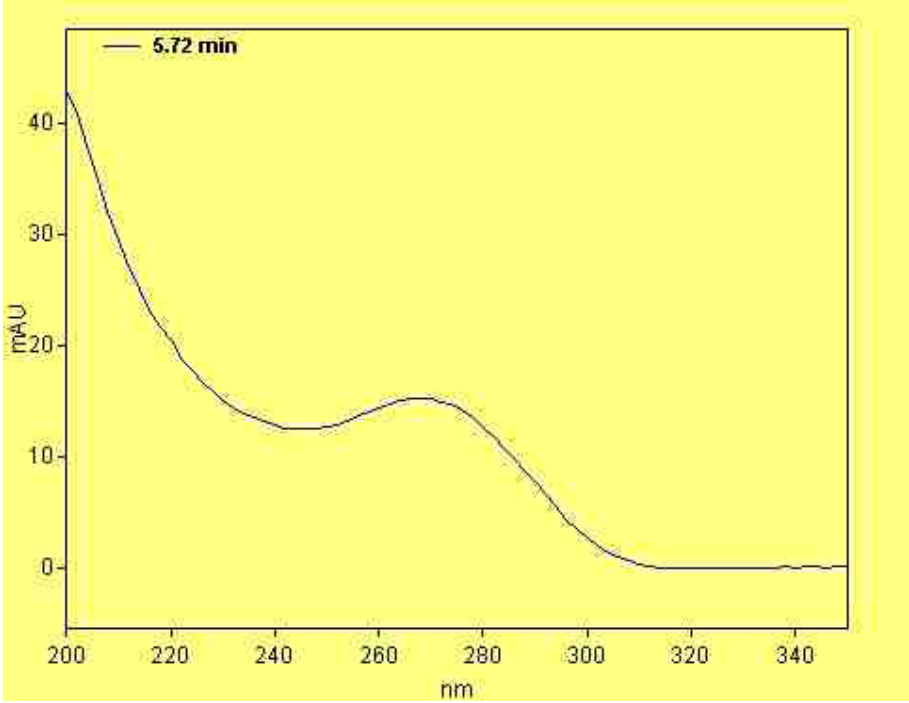
A *Trichoderma* izolátumok által fermentált folyékony táptalajokból származó mintákat az előző pontban ismertetett előkészítés után közvetlenül a rendszerbe injektáltuk. A standard gliotoxint (G-9893) (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA, *Gliocladium fimbriatum*) HPLC tisztaságú etilalkoholban (Acros Organics, New Jersey, USA) oldottunk fel törzsoldatként 100 µg ml^{-1}, és injektálva 1, 2,5, 5, 10, 25 és 50 µg ml^{-1} koncentrációkban, majd a standard oldatok segítségével történt a mérőgörbe

illesztése. Az analízishez mozgó fázisként víz (MilliQ, kétszer desztillált és szűrt, Millipore rendszer, Molsheim, France) és HPLC tisztaságú acetonitril (Baker, Deventer, Hollandia) 75:25 arányú keverékét alkalmaztuk. Az eluens előkészítése során a nagyfokú tisztaság elérése céljából a keveréket 0,22 μm-es membránszűrön átszűrtük.

3.4.3. A HPLC berendezés

Az eluens 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 μm alkotókkal) Microsphere C_{18} oszlopba, amely CP 28141 előtét oszloppal (Chrompack, Middelburg, Hollandia) volt ellátva. Az injektált minta mennyisége 25 μl volt. Az oszlop temperáltan, 35˚C-on működött (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.

Az ismertetett rendszerben a gliotoxin retenciós ideje 5,7±0,2 perc volt (3. ábra). A legkisebb kimutatható mennyiség 0,1 μg ml^{-1} és 0,3 μg ml^{-1} a jel/válasz arányán alapulva, ha az 3:1 illetve 10:1. Az 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 μg gliotoxin ml^{-1} oldószer beinjektálása után a HPLC válaszok (csúcs területe) pozitív regressziót mutatott a gliotoxin koncentrációval és minden esetben a korrelációs koefficiens (R) >0.9991 értékű volt.



3. ábra: A HPLC rendszer beállítása után tapasztalt retenciós idő (5,72 min), és a 270 nm hullámhossznál tapasztalt abszorpciós optimum

3.5. *T. virens* törzsek *Rhizoctonia solani*-val szembeni *in vitro* antagonizmusának vizsgálati módszere

A *Trichoderma* fajok növénypatogénekkel szembeni antagonizmusában, illetve a patogének visszaszorításában többféle mechanizmus játszhat szerepet, úgy mint a tápanyagokért és a helyért folytatott versengés, közvetlen parazitizmus, illetve gátló és elpusztító hatású metabolitok termelése (antibiózis).

Ebben a vizsgálatban *T. virens* törzsek által termelt antibiotikum (gliotoxin) hatásának mértékét tanulmányoztuk a növénypatogén *R. solani* gomba ellen, konfrontációs leoltást követően.

3.5.1. A *Trichoderma* és a patogén *R. solani* törzsek

A vizsgálatban 8 gliotoxint termelő (BCCM^{TM}/MUCL 8445, 14058, 18139, 19014, 29415, 34678, 44898, 44899) és egy gliotoxint nem termelő *T. virens* törzs (BCCM^{TM}/MUCL 41468) szerepelt.

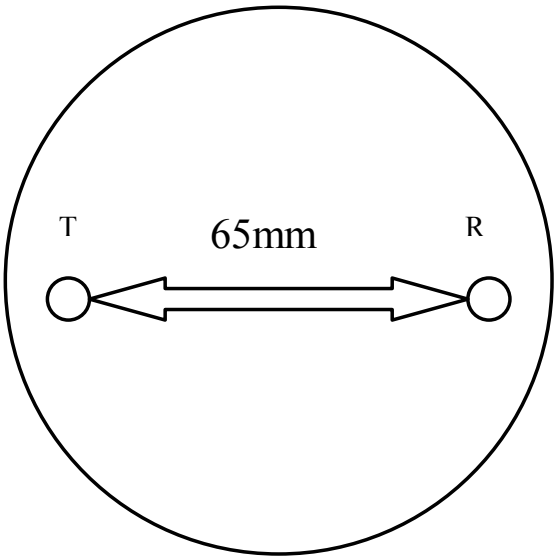
A patogén, *R. solani* (BCCM^{TM}/MUCL 39808) törzs talajból, paprika gyökeréről lett izolálva. A patogén a laboratóriumi eljárásoknak megfelelően micéliumszuszpenzió formájában, glicerolban volt tárolva -130˚C-on.

A patogén és az antagonista felszaporítása egyaránt 2%-os maláta táptalajt tartalmazó Petri-csészékben történt, majd a táptalaj teljes felületét benövő telepekből 5 mm átmérőjű, táptalajt és gombamicéliumot tartalmazó korongokat metszettünk ki, melyeket a későbbiekben a leoltásnál helyeztünk át.

3.5.2. A patogén és az antagonista leoltásának körülményei

A konfrontációs vizsgálat során 2 %-os maláta agar táptalajt használtunk, 90 mm átmérőjű Petri-csészékben. A táptalajból mindegyik Petri-csészébe steril adagolóval azonos mennyiségű olvasztott táptalajt (15 ml) töltöttünk, ügyelve a táptalaj egyenletes vastagságára.

A patogén és a *Trichoderma* telepekből kivágott agarkorongok a steril táptalaj felszínére, a Petri-csészék szélére, egymástól 65 ± 1 mm távolságra lettek elhelyezve, eltérő időpontban. Tapasztalataink alapján az általunk használt táptalajon lassan növő *R. solani* MUCL 39808 törzs 64 órával a gyorsabb növekedésű *Trichoderma* agarkorong elhelyezése előtt kellett a tápagarra tenni azzal a céllal, hogy a konfrontáció idején jelentős méretű teleppel rendelkezzen (4. ábra). A vizsgálatot 3 sorozatban végeztük.



4. ábra: A konfrontációs kísérlet vázlata (T= Trichoderma törzs, R= Rhizoctonia solani)

A *T. virens* törzsek leoltása után 4 óránként mértük a patogén és az antagonista telepátmérőjét, mindaddig, amíg a gyorsabban növő *Trichoderma* telepe a *R. solani* telepe fölé nem nőtt, illetve a patogén növekedése teljesen megállt. A patogén telepátmérő-növekedésének értékelésével következtetünk az antagonista gombák gátló hatásának mértékére, illetve ez alapján a növekedési ütem összehasonlíthatóvá válik, a gliotoxintermeléssel összefüggő statisztikai kapcsolat vizsgálható.

Wilhite és Straney (1996) tettek utalást arra, hogy a gombatelep szélén a fiatal, növekvő hifák zónájában képződő gliotoxin mint egy „pajzs" halad a kolónia előtt. A patogén gomba növekedésének blokkolása időpontjában a két gombatelep széle közötti távolság (gátlási zóna) alapján pedig az esetleges antibiózis jelenségére, illetve a termelt gliotoxin hatására következtetünk. A gátlási zóna mérete és a termelt gliotoxin mennyisége között korrelációs teszttel kerestük az összefüggést. A termelt gliotoxin mennyiségéhez a fermentáció 64. órájában mért gliotoxin mennyiségét vettük viszonyítási alapként. A gátlási zóna méretét számítással kaptuk meg. A *R. solani* telep növekedésének leállásakor mért telepsugarát és az ugyanekkor mért antagonista telepsugarát összeadtuk, majd kivontuk a két telep leoltásának távolságából (65 mm).

3.6. Az alkalmazott statisztikai vizsgálatok módszerei

3.6.1. Az RAPD PCR analízis során alkalmazott statisztikai módszerek

Az RAPD PCR fenológiai analízisének eredményei és a gliotoxin termelés közötti összefüggést kéttényezős korrelációvizsgálattal (Pearson féle korrelációs teszt) értékeltük, $P < 0,05$ valószínűségi szinten.

3.6.2. Gliotoxin-fermentáció értékelése során alkalmazott statisztikai módszerek

A kalibrációs görbék a legkisebb négyzet elvén lettek kiszámítva. Annak érdekében, hogy elkerüljük az adatbázis egyenetlen eloszlásából eredő problémákat, az adatok szignifikáns különbségét „non-parametric" statisztikai eljárások alkalmazásával számítottuk. A kísérlet ismétléseinek és a kezelések (gomba törzsek) hatását a micélium száraztömegre és a termelt gliotoxin mennyiségére a Kruskal-Wallis teszttel értékeltük ki, ugyanakkor a Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk a táptalajoknak (2 % maláta és a

szintetikus táptalaj) a micélium száraztömegre és a gliotoxin mennyiségére gyakorolt hatásának számszerűsítésére. A micélium száraztömeg és a gliotoxin termelés vizsgálata esetén egyaránt a gombatörzsek és a táptalajok adták a varianciaanalízis alapját. Mivel ezeken a változókon nem volt tapasztalható az ismétlések hatása, mindegyik törzs esetében átlagot számoltunk. Az összes gliotoxint termelő törzsnél a maláta tápleves esetében a Wilcoxon Signed Ranks tesztet használtuk, hogy összehasonlítsuk a gliotoxin-termelési szintet 62. és 86. óra inkubációt követően. A statisztikai szignifikancia megállapítása $P < 0,05$ hibavalószínűségi szinten történt. A statisztikai analízisek számításait az SPSS-Release 10.0.5 (SPSS, 1999) programmal végeztük.

3.6.3. Az in vitro konfrontációs antagonizmus teszt eredményeinek elemzésekor alkalmazott statisztikai módszerek

Az *in vitro* konfrontációs antagonizmus teszt esetében a *Rhizoctonia solani* telep sugárirányú növekedésének értékszámait egytényezős varianciaanalízisnek vetettük alá, melynek során azonos mintavételi időpontban a különböző kezelések hatását, másrészt az azonos kezelések eltérő időpontban jelentkező szignifikanciaszintjét hasonlítottuk össze. A számításokat a GENSTAT 4.3 Statistical Package programmal végeztük, amely képes a kezelések átlagait összehasonlítani, illetve csoportokat képezni.

A konfrontációs antagonizmus reakció során, a patogén növekedésének leállásakor a *Trichoderma* és a *R. solani* telepe között mért távolságot (gátlási zóna) vetettük össze az antagonisták által termelt gliotoxin mennyiségével, az összefüggéseket Pearson féle korrelációs teszttel kerestük, a számításokat SPSS-Release 10.0.5 (SPSS, 1999) programmal végeztük, $P < 0,05$ hibavalószínűségi szinten.

4. EREDMÉNYEK

4.1. *Trichoderma* törzsek és izolátumok morfológiai sajátosságai

A kísérleteinkben szereplő törzsek egy része saját izolálású. Ezen törzsek izolálása *Trichoderma*-szelektív táptalajon történt (Askew és Laing, 1993). A többi törzshöz más gyűjteményekből jutottunk.

A gliotoxintermelő és az *in vitro* antagonizmus tesztekben szereplő *T. virens* törzsek telepmorfológiája, színe, növekedési intenzitása rendkívül változatos volt, ugyanakkor a sejtmorfológiai illetve a mikroszkópikus morfológiai tulajdonságok alapján meglepően egységesnek bizonyultak.

4.1.1 Az izolált és kiválasztott *Trichoderma virens* törzsek morfológiai jellemzése

A gombatörzseket 2 %-os maláta tartalmú agaron felszaporítva vizsgáltuk, illetve követtük figyelemmel a növekedésüket. A gombatelepekről 4 napos, szobahőmérsékleten és laboratóriumi fényviszonyok között történő inkubációt követően készült fotók a *2. melléklet*ben találhatók.

Trichoderma virens ATCC 13213; CBS 249.59; MUCL 7585

Az Amerikai Egyesült Államok Georgia államában, talajból izolálták. A gomba a gyűjteményben szereplő adatok alapján a *Trichoderma* (syn.: *Gliocladium*) *virens* faj ex-típustörzseként (ATCC 13213) nyilvántartott. Az anyagcseretermékei között ismert az L-tirozinból képződött L-dopamin és származékai.

Tapaszatalataink szerint a gomba 2 %-os maláta kivonat tartalmú agaron többszöri átoltás után is gyenge növekedést mutatott. Az ötvenedik órában még nem jelentkezett a gombatelepen sporuláció.

Trichoderma virens MUCL 8445

A gombát belgiumban izolálták humuszos talajból, virágcserépből. Tapasztalataink szerint a gomba közepesen intenzív növekedést mutatott, 50 órás

inkubációt követően a telep közepén ekkor gyenge sporuláció jelentkezett. A telep felszíne sima.

100 órás inkubációt követően a gombatelep felszínén koncentrikus körökben jelentkező halványzöld sporuláció volt megfigyelhető. A telep felszíne kissé vattaszerű, bolyhos.

(2. melléklet, 1. kép)

Trichoderma virens MUCL 14058

A törzs Zaire-ből, erdőtalajból származik. Az 50 órás telepen már jelentős világos kékes-zöld színű sporuláció jelentkezett a telep közepén, a gomba intenzív növekedést mutatott. A 100 órás telep sima felszínű volt, melyen sötétzöld spouláció jelentkezett, amely kezdetben koncetrikus jellegű, később a Petri-csésze teljes felszínére kiterjedt. A telep felszíne csak kis mértékben vattaszerű.

(2. melléklet, 2. kép)

Trichoderma virens MUCL 18139

A törzs humuszos üvegházi talajból, Belgiumból származik. A gomba növekedése és sporulálása már 50 órás inkubációt követően koncentrikus jelleget mutat. A sporuláció 100 órás inkubációt követően koncentrikus körökben mutatkozott sötétebb zöldnek, másutt egyenletes világoszöld volt. A telep felszíne enyhén bolyhos, vattaszerű.

(2 számú melléklet, 3. kép)

Trichoderma virens ATCC 9645; CBS 243.65; CBS 430.54; MUCL 19014

A gomba az USA-ból származik, izolálása talajból történt. A törzs ipari célú felhasználása ismert, tesztgombaként alkalmazták ragasztók, elektromos szigetelések, cellulóz alapú szövetek mikrobiológiai ellenállóképesség-vizsgálata céljából. Tenyészeteinkben a gomba csak közepesen intenzív növekedést mutatott. Az 50. órában tenyészetben gyenge micéliumnövekedés volt tapasztalható, nagyobb tömegű sporuláció még nem jelentkezett. A 100 órás telepről is elmondható, hogy gyenge-

közepes növekedést mutatott, a sporuláció a telep felszínén, egyenletesen, halványzöld-, majd sötétebb zöldbe fordulva jelentkezett.

(2. melléklet, 4. kép)

Trichoderma virens MUCL 29415

A *Pleurotus pulmonarius* gombatenyészetéből, búzaszalma szubsztrátról, Belgiumból származik a törzs. A gombatelep felszíne az inkubáció 50-ik órájában vattaszerű volt, a telep közepén jelentkező halványzöld sporulációval. A 100 órás tenyészetnek közepesen vattaszerű volt a felszíne, erőteljes fehér-halványzöld, a telep közepén sötétzöldbe vált át.

(2. melléklet, 5. kép)

Trichoderma virens MUCL 34687

A gombát egy trópusi melegházban, farönkről izolálták, Belgiumban. Az 50 órás telepen már zöld sporuláció jelentkezett, amely körül a még nem sporuláló területeken a micélium vattaszerű volt. A 100 órás telep vattaszerű, bolyhos, de az erőteljes konídiumképzésnek köszönhetően zöld, sötétzöld, koncentrikus jellegű.

(2. melléklet, 6. kép)

Trichoderma virens MUCL 41468

A gombát Szingapúrban izolálták, ahol laboratóriumban, más gomba agartenyészetét fertőzte. Vizsgálatainkban az 50 órás kolónia egyenletes sima felületű volt, halványzöld sporulációval. Az inkubáció 100. órája körül a telep felszíne sima volt, a teljes felületre kiterjedő, egyenletes sporuláció lassan fordult át sötétzöldbe. A telep növekedése igen intenzív, 50 óra után befedte a a táptalaj teljes felszínét (9 cm átmérőjű Petri-csésze).

(*2. melléklet*, 7. kép)

Trichoderma virens D/090; MUCL 44898

A törzset a Debreceni Egyetem ATC bemutatókertjében, palántanevelő melegágy talajából izoláltuk *Trichoderma*-szelektív (Askew és Laing, 1993) táptalajon. A gomba *Rhizoctonia solani* ellen *in vitro*, illetve a patogén által előidézett palántadőléses megbetegedés ellen hatékony volt *in situ* kísérleteinkben (Harcz *et al.*, 2001). A gomba telepe vattaszerűnek mutatkozott 50 óra inkubáció után, ekkor mérsékelt, halványzöld sporulációt tapasztaltunk. A 100. órában kiterjedt, sötétzöld sporuláció jelentkezett a gomba telepének közepén, körülötte a micélium továbbra is bolyhos, vattaszerű maradt.

(2. melléklet, 8. kép)

Trichoderma virens I-7; EGR-55; D/121; MUCL 44899

A gombatörzset Naár Zoltán izolálta humuszos homoktalajból, Izsák térségében. Ez a gombatörzs erőteljes növekedést mutatott, az ötvenedik órában fehér, erősen vattaszerű volt a kolónia. A későbbiekben is intenzíven növekedett a gomba, de a telep továbbra is fehér színű és erősen vattaszerű maradt. A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy ez a törzs csak a 10. nap után produkált erőteljesebb, zöld színű sporulációt.

(2. melléklet, 9. kép)

Trichoderma virens D/132; MUCL 44922

A gomba izolálása *Trichoderma*-szelektív (Askew és Laing, 1993) táptalajon történt, elhalt fakéregről. A gomba intenzív növekedést mutatott, a növekedés 50. órájában a telep közepén sporuláció jelentkezett, később a 100. órás telepen a sporuláció sötétzöld, koncentrikus jellegű körökben jelentkezett.

(2. melléklet, 10. kép)

4.1.2. A micéliumtömeg és a tápközeg pH mérésének eredményei

Az inkubáció után leszűrt, majd szárítószekrényben légszárazra szárított micéliumtömeget megmértük, és az eredmények alapján azt tapasztaltuk, hogy a

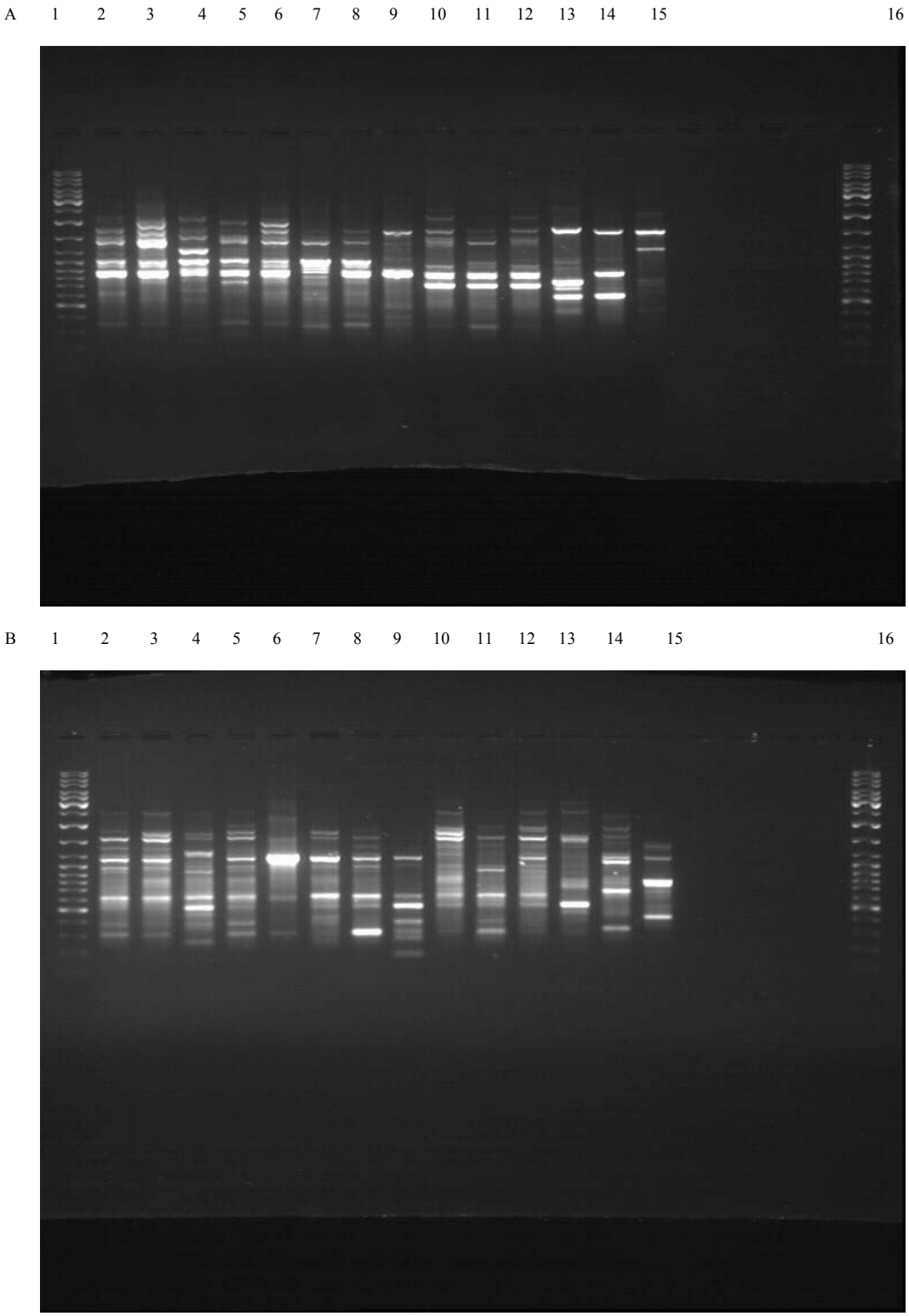
növekedés ütemében jól megfigyelhető volt a trofofázis szakasza, majd az ezt követő stacioner fázis kezdete, amelyet a gomba pusztulása követett.

A tápközeg kémhatásának alakulása mindegyik törzs esetében hasonlóan változott. A maláta táplevesre jellemző pH 5±0,5 érték először csökkent, és elérte a pH 4 értéket. Ennek a magyarázata lehet az a jelenség, hogy bizonyos gombacsoportoknál a tápanyagokat jelentő makromolekulák lebontása során szerves savak (pl. oxálsav) termelődnek, – melyeknek közvetlen, molekuláris szerepük is van a lebontásban – ugyanakkor a közeg pH-ját a savas tartományba tolják el (Manczinger *et al.*, 2003). Ezt követően a tápközeg pH-ja újra emelkedni kezdett, majd az inkubáció végső szakaszára minden esetben pH 7 érték fölé emelkedett (14-22. ábrák).

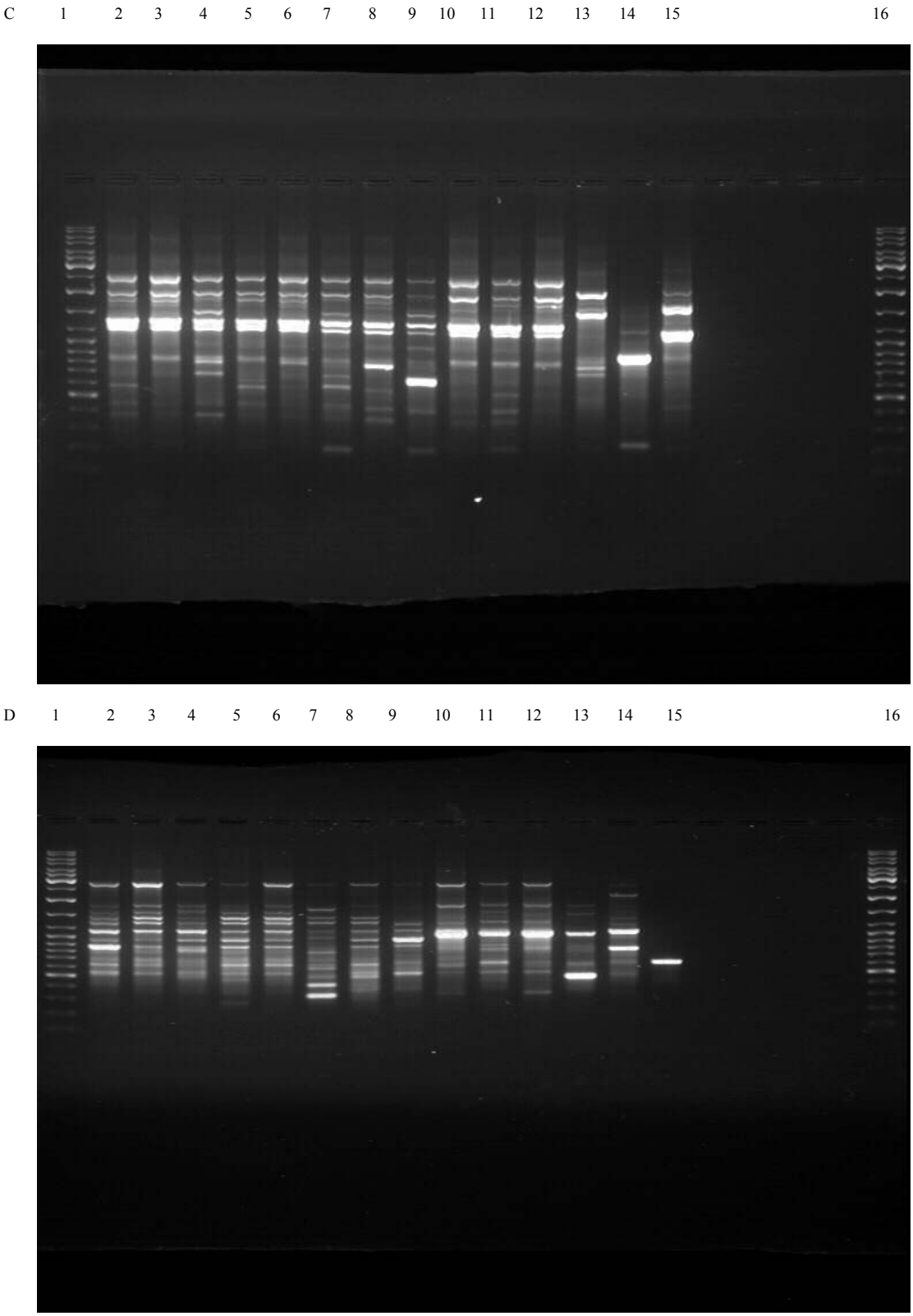
4.2. *Trichoderma virens* törzsek RAPD PCR és fenológiai analízis eredményei

A tesztelt törzsek esetében négy, véletlenszerűen kiválasztott primerrel a mintákat 2 ismétlésben amplifikáltuk. Az amplifikáció során nyert gélmintázatot (5. A-B és 6. C-D ábrák) fenológiai analízissel értékeltük és tettük az eredményeket összehasonlíthatóvá. A gélelektroforézist követően a DNS-mintázatban több nagy sáv jelentkezett, melyek mérete a 300-3000 bázispár (bp) mérettartományba esett.

A véletlenszerű primerekkel végrehajtott amplifikáció során a létrejött összes reprodukálható polimorfikus sáv lehetővé tette a hasonlóság elemzését a *T. virens* törzsek között.



5. ábra A-B: Az A-01(A) és az A-04 (B) primerek amplifikációja során kapott mintázat az RAPD analízis során. Magyarázat: 1 és 16: DNS létra; 2-12.: *T. virens* izolátumok (MUCL7585, 8445, 14058, 18139, 19014, 29415, 34687, 44898, 44899, 44922; 13-15: *T. harzianum*, T. *atroviride*, *T. hamatum*



6. ábra C-D: Az A-10(C) és az A-17(D) primerek amplifikációja során kapott mintázat az RAPD analízis során. Magyarázat: 1 és 16: DNS létra; 2-12.: *T. virens* izolátumok (MUCL7585, 8445, 14058, 18139, 19014, 29415, 34687, 44898, 44899, 44922; 13-15: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. hamatum*

Az amplifikáció során keletkezett reprodukálható polimorfikus sávok jelenléte, illetve a jelenlét „1” és az azonos sáv hiányának „0” jelölése egy mátrixban (4. táblázat) lehetővé tette azt, hogy a *T. virens* törzsek közötti hasonlóságot értékeljük. A hasonlósági koefficiens (F) eredményei alapján a genetikai távolságmátrix (7. ábra) értékeit (1-F) a PHYLIP program segítségével számítottuk.

5. táblázat: A gélmintázat alapján összesített polimorfikus sávok jelenléte, illetve hiánya a tesztelt törzsek esetében

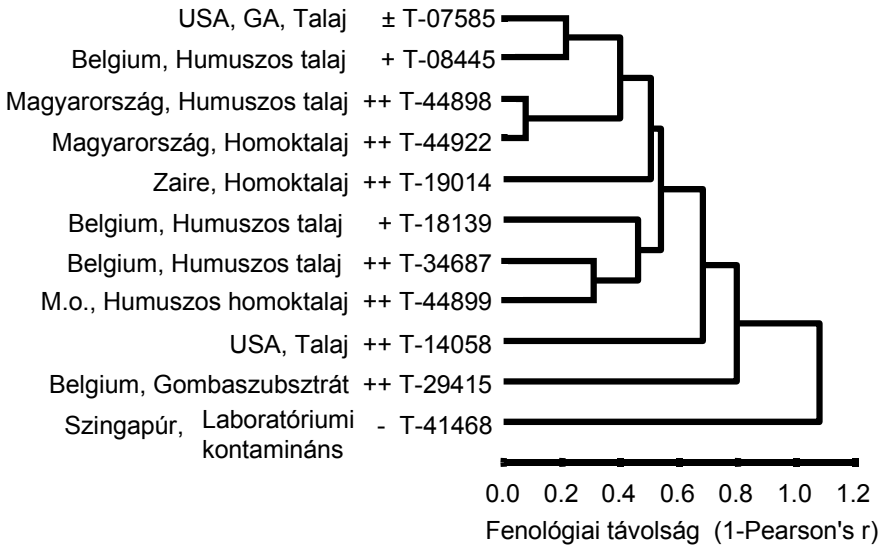
	T. virens törzsek (MUCL)										
	7585	8445	14058	18139	19014	29415	34687	41468	44898	44899	44922
Polimorfikus sávok jelenléte vagy hiánya azonos bázispárméret esetén (soronként)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

```
7585..... 0.00
8445..... 0.11 0.00
14058.... 0.23 0.31 0.00
18139.... 0.19 0.20 0.38 0.00
19014.... 0.22 0.23 0.36 0.31 0.00
29415.... 0.42 0.41 0.46 0.33 0.48 0.00
34687.... 0.22 0.23 0.36 0.23 0.18 0.39 0.00
41468.... 0.68 0.73 0.81 0.55 0.78 0.68 0.67 0.00
44898.... 0.15 0.17 0.21 0.24 0.28 0.38 0.28 0.71 0.00
44899.... 0.28 0.29 0.41 0.21 0.33 0.28 0.17 0.50 0.26 0.00
44922.... 0.20 0.21 0.26 0.29 0.33 0.44 0.33 0.70 0.04 0.31 0.00
```

7. ábra: RAPD analízis genetikai távolságmátrix a hasonlósági koefficiens értékekkel

A genetikai távolságmátrix értékei alapján a fa a program Drawgram részével lett ábrázolva (8. ábra). A dendrogram a véletlenszerű primerekkel történt amplifikáció során képződött sávok jelenlétének, illetve hiányának elemzése alapján adott számunkra lehetőséget a törzsek fenotípusos összehasonlítására, ugyanakkor az RAPD analízissel kapott dendrogram nem utal a törzsek filogenetikai és evolúciós kapcsolatára.

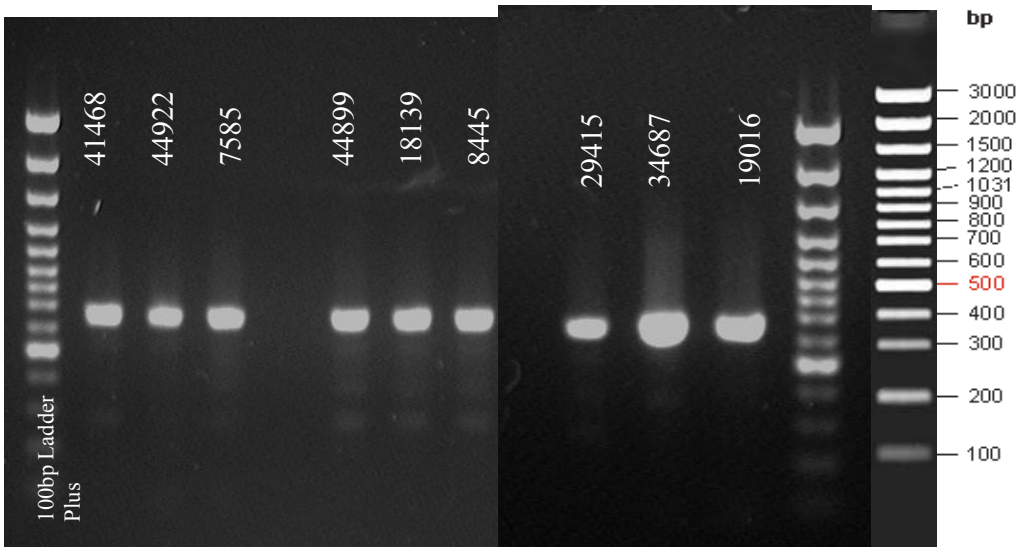
A Pearson-féle korrelációs teszttel nem találtunk összefüggést a gliotoxin-termelés és az RAPD eredmények cluster-analízise, illetve a gombák szubsztrát-eredete között.



8. ábra: A *T. virens* törzsek fenológiai analízisének eredménye (dendrogram)

4.3. *Trichoderma* törzsek ITS rDNS szekvencia analízisének eredményei

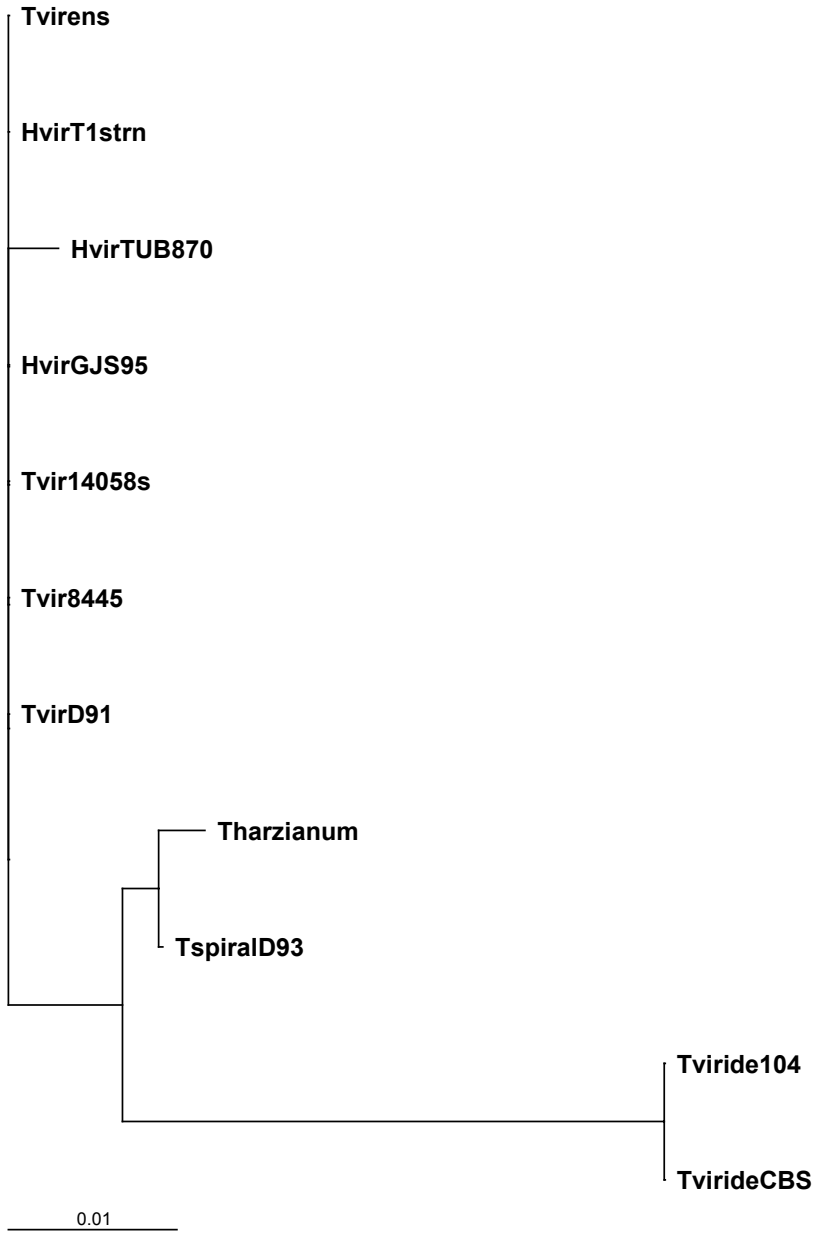
A szekvenálási céllal felszaporított, majd tisztított DNS-t agarózgélben futtatuk, abból a célból, hogy annak mennyiségéről és tisztaságáról (nem tartalmaz szennyező anyagokat illetve primer maradványokat) meggyőződjünk (9. ábra).



8. ábra: A szekvenáláshoz kivont, felszaporított és tisztított DNS gélfotója

A törzsek telep-, és mikroszkópikus tulajdonságaik alapján is *Trichoderma virens* faj képviselőinek bizonyultak, de az identifikáció pontosítása céljából a riboszómális DNS géncluster ITS1 és ITS2 szakaszának felszaporítását, majd a szekvencia ismeretének birtokában a molekuláris biológiai alapokon történő pontos faji meghatározást is elvégeztük.

A megfeleltetés (alignment, 4. sz. melléklet) eredményeinek feldolgozása (UPGMA) alapján a TREEVIEW szoftverrel filogramot rajzoltattunk, amelyen 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 (10. ábra).

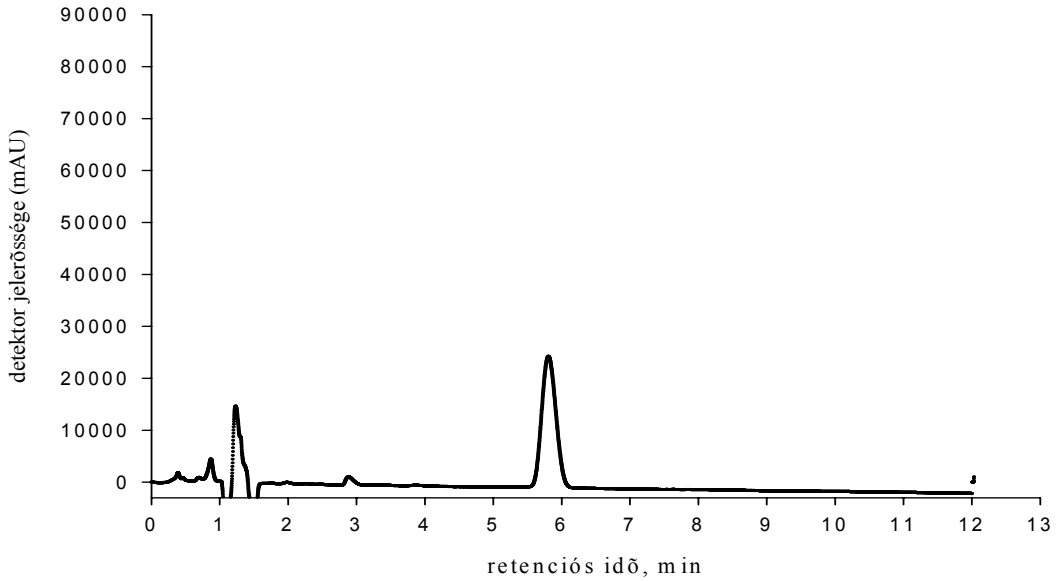


9. ábra: Filogenetikai analízis az ITS1 és ITS2 szekvenciák alapján (filogram). Tvir8445, TvirD91 and Tvir 14058: a gliotoxintermelő vizsgálatokban szereplő 3 reprezentatív törzs. Tvirens, HvirT1strn, HvirTUB870, HvirGJS95: *T. virens* ITS szekvenciák az NCBI adatbázisából. Tharzianum, Tspiral, Tviride104,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

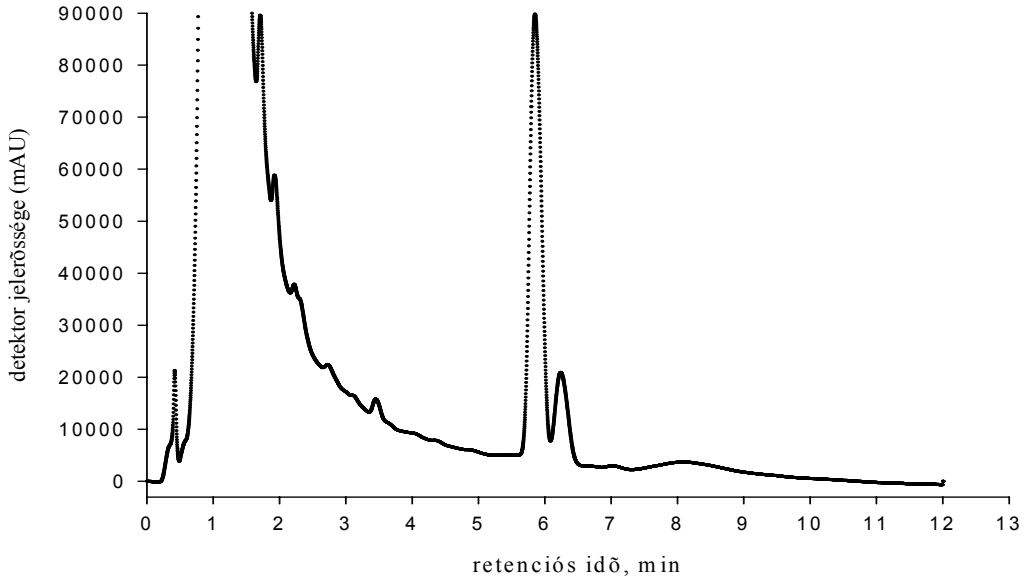
4.4. Gliotoxin-termelés: a folyadékkromatográfiás (HPLC) mérés eredményei

Az Anyag és Módszer fejezet 3.4.2.-3.4.4. pontjaiban ismertetett módon felépített analitikai rendszer összehangolása, a megfelelő oszlop, eluens, áramlási sebesség és hőmérséklet megválasztása után a gliotoxin kimutatása lehetővé vált

közvetlenül a centrifugálással tisztított tápközegből. A molekula retenciós ideje a rendszer használata során 5,72 min. volt, amely az 11. ábrán jól megfigyelhető a standardként 10 μg ml^{-1} koncentrációban injektált gliotoxin görbéjén. A tápközegben jelenlévő, más szennyező anyagokat, amelyek zavaró tényezőként léphettek fel a kimutatás során (kettős csúcs, csúcs vállal, aszimmetrikus csúcs) ezzel a rendszerrel sikerült olyan mértékben elkülöníteni, hogy a gliotoxin csúcs alatti terület nagy pontossággal integrálhatóvá és értékelhetővé vált (12. ábra). Az ábrán látható másodlagos csúcs feltételezhetően ugyancsak a gomba anyagcsereterméke, de az identifikálása nem történt meg.



10. ábra: A HPLC-s kimutatás eredményei, a detektor jelerőssége a retenciós idő függvényében a 10 µg ml^{-1} koncentrációjú standard gliotoxin injektálása esetén.



11. ábra: A HPLC-s kimutatás eredményei, a detektor jelerőssége a retenciós idő függvényében az MUCL 29415 törzs tápközegéből a 72. órában vett minta injektálása esetén.

4.4.1. Az előzetes táptalaj-kiválasztási vizsgálatok eredményei

A táplevesek tesztelése céljából előzetes vizsgálatokban 17 *Trichoderma* törzs felhasználásával meghatároztuk a növekedési intenzitást és a gliotoxin-termelést 2 % maláta kivonat-tartalmú és szintetikus táplevesekben. A törzsek szignifikánsan ($P < 0{,}001$) intenzívebb növekedést, illetve a gliotoxin-termelő izolátumok magasabb gliotoxin-szintet mutattak a komplex táptalajon mint a szintetikus (ún. „gliotoxin-termelő") táplevesben (összetételek az 1. mellékletben).A későbbi fermentációs vizsgálatokban is a 2 %-os maláta táplevest használtuk, ezen törzsek is közepesen erős, illetve intenzív növekedést mutattak az inkubációs időszak alatt ezen tápfolyadékokban (5. táblázat).

Megfigyeltük, hogy a maláta táplevesben a *T. virens* törzsek fonalas növekedést mutattak, illetve kisszámban laza szerkezetű hifa-gyöngyöket képeztek. A fermentációs időszak végére a fonalas biomassza a tápfolyadék egészét kitöltötte. A szintetikus táplevesben a nagyszámú és tömörebb micéliális pellet (hifagyöngy) keletkezett. A kétféle tápközeget egyenlő számú propagulummal oltottuk be.

A gliotoxin-termelést a 62. és 86. órás inkubációs időpontokban összehasonlítva a rangkorrelációs vizsgálat (Wilcoxon Signed Ranks teszt) nem mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a termelt gliotoxin mennyiségében ($0{,}068 \leq P \leq 1{,}000$) (6. táblázat). Azonban számos törzs esetében megfigyelhető volt az, hogy a maláta táplevesben a gliotoxin mennyisége lecsökkent a két mintavétel közötti 24 óra alatt, jelezve egyfajta időbeni eliminációs változást.

6. táblázat: A táplevesek hatása a *Trichoderma* törzsek növekedésére és a gliotoxin-termelés szintjére 25°C-on, 62 és 86 órás inkubációs időszakban

MUCL/BCCM™ törzsek [a]	Tápleves					
	Maláta tápleves			Szintetikus (ún. "gliotoxin termelő" tápleves		
	Micélium száraztömeg	Gliotoxin-termelés [b]		Micélium száraztömeg	Gliotoxin termelés [b]	
	(mg)	62. h	86. h	(mg)	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, $\mu g\ ml^{-1}$ tápleves

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

7. táblázat: A rangkorrelációs vizsgálat (Wilcoxon Signed Rank) eredménytáblázata. (d)

Jelmagyarázat: a: pozitív rangkorreláció
b:negatív rangkorreláció
c: a negatív és a pozitív eltérések összege megegyezik

Test Statistics[d]

	T8445G86 - T8445G62	T14058G8 - T14058G6	T18139G8 - T18139G6	T19014G8 - T19014G6	T29415G8 - T29415G6	T34687G8 - T34687G6	T44898G8 - T44898G6	T44899G8 - T44899G6	T44922G8 - T44922G6
Z	-1,826[a]	-,365[a]	-,730[b]	-1,826[a]	,000[c]	-1,826[b]	-1,461[b]	-1,826[b]	-1,461[a]
Asymp. Sig. (2-ta	,068	,715	,465	,068	1,000	,068	,144	,068	,144

a. Based on negative ranks.

b. Based on positive ranks.

c. The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

d. Wilcoxon Signed Ranks Test

4.4.2. *Trichoderma* izolátumok gliotoxintermelése

Komplex tápközegben végzett fermentáció során 96, különböző fajokat reprezentáló *Trichoderma* és tíz gliotoxin-termelő *T. virens* törzseket vizsgáltunk meg gliotoxintermelés szempontjából.

A termelt és a mérhető gliotoxin megléte alapján kétféle megközelítésben vizsgálhatjuk a termelt metabolit mennyiségét, úgy, mint felhalmozódó (összes, FGT) és úgy mint specifikus (sejtpopulációra vagy száraztömegre viszonyított, SGT). Az összes gliotoxin (FGT) nem minden esetben adhat összehasonlítható eredményt, mivel a toxintermelő gombasejtek mennyiségében izolátumonként eltérések lehetnek (száraztömegbeli eltérések), de emellett a metabolit termelésének intenzitásában is lehetnek különbségek. A fermentációs kísérlet beállításakor, fenntartása mellett, illetve befejezésekor a mikroba sejtpopulációjának megfigyelése és az ahhoz történő viszonyítás elfogadható, ha feltételezzük, hogy a kiinduló inokulum nem tartalmazza a megfigyelendő metabolitot (Drew és Wallis, 1983). Az inokulum (konídium-szuszpenzió) nem tartalmazott egy esetben sem kimutatható mennyiségű gliotoxint.
Összesen 96 *Trichoderma* törzset teszteltünk gliotoxin-termelő képesség szempontjából. A 86. órás inkubációs időszak utáni mérések alapján csak tíz, egyaránt a *Trichoderma virens* fajba tartozó törzsről bizonyosodott be a gliotoxin-termelés képessége (13. ábra).

Az MUCL törzsgyűjteményben szereplő 29415-ös számú törzs eredetileg *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain. fajként szerepelt, melynek meghatározása a morfológiai bélyegek alapján történt a gomba izolálását követően, molekuláris biológiai módszereken alapuló faji identifikálás nem volt (De Cock, személyes közlés). A mérési eredmények szerint a gomba jelentős mennyiségű gliotoxint termelt minden ismétlésben, s ez felvetette a téves faji meghatározás lehetőségét. A gomba újbóli, mikroszkópikus és telepmorfológián alapuló meghatározása után bebizonyosodott a törzsről hogy a *Trichoderma virens* fajt képviseli, és ezt követően a gyűjteményben is átnevezésre került.

A termelt gliotoxin mennyisége elérte a 52,5±5,7 $\mu g\ ml^{-1}$ koncentrációt, a 25°C-on történő inkubációt követően, a fermentált táplevesből kimutatva. Ugyanakkor a *T. virens* törzsek közül az ATCC 13213 (=MUCL 7585) esetében a gliotoxin csak nyomokban volt kimutatható, míg a MUCL 41468 törzs nem termelt kimutatható

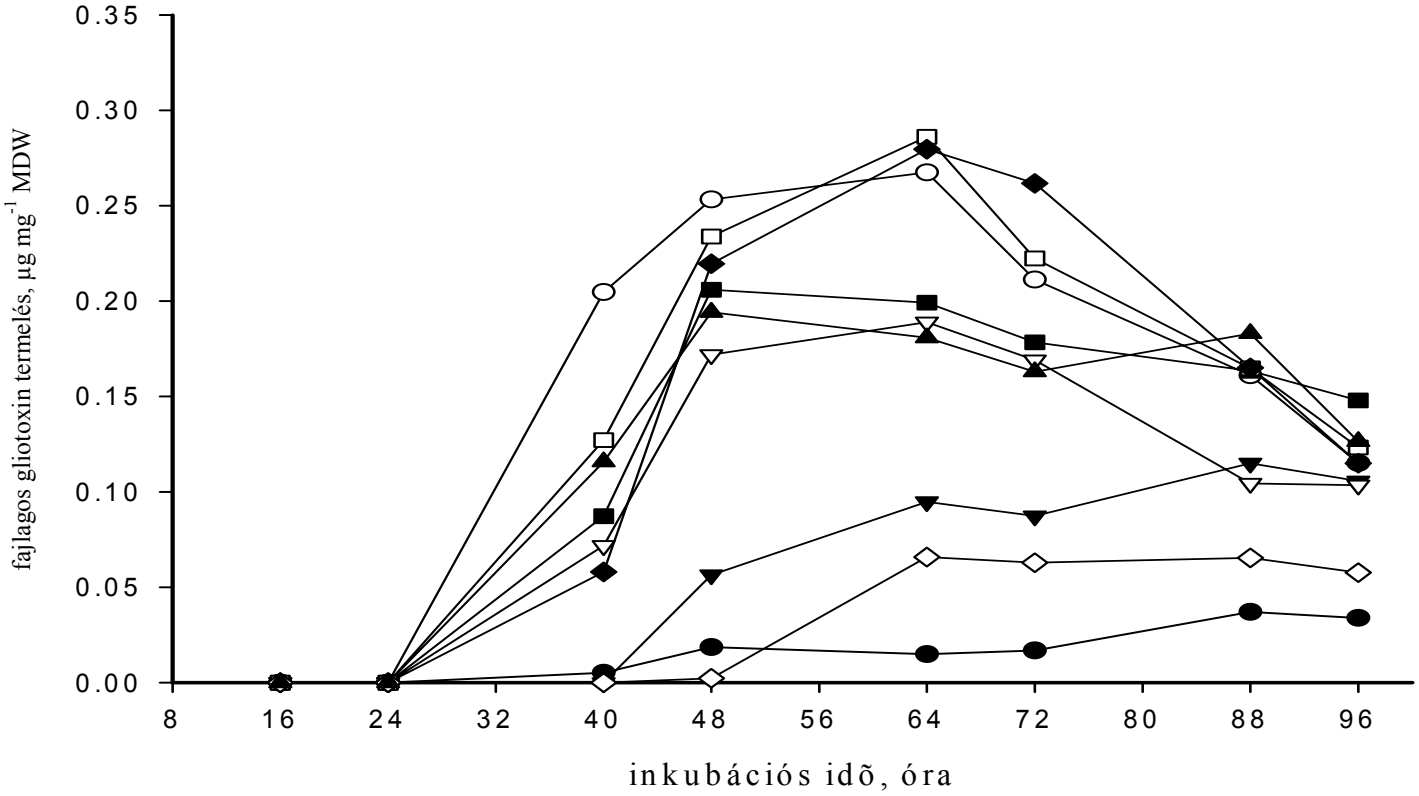
mennyiségű gliotoxint (mivel a termelés kinetikája ezeknél a törzseknél nem volt felállítható, ezeket a törzseket nem ábrázoltuk).

4.4.2. *T. virens* törzsek gliotoxin-termelése

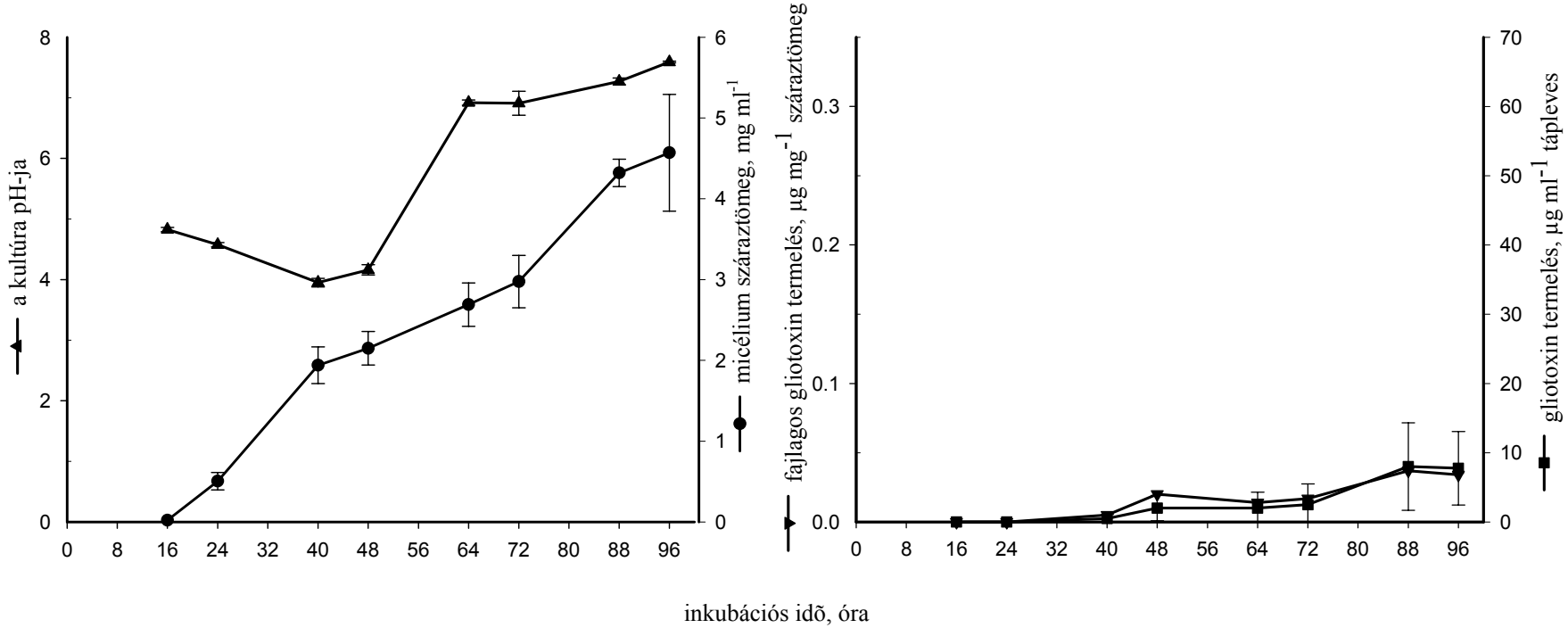
A legnagyobb felhalmozódott gliotoxin mennyiség 48,5 μg ml^{-1} koncentrációban jelentkezett az ismétlések átlagában (MUCL 34687). Másik izolátum (MUCL 8445) esetében a legmagasabb mért gliotoxin koncentráció mindössze 8 μg ml^{-1} az ismétlések átlagában. A legmagasabb gliotoxin-szint a fermentáció során eltérő időpontban jelentkezett a különböző vizsgált izolátumok esetében, és a kumulatív gliotoxin-koncentrációval együtt az izolátumok eltérő csoportokba sorolhatók (14-22. ábrák).

A specifikus gliotoxin-termelés során a mért összes gliotoxin mennyiségét viszonyítottuk a mintavételkor mért száraztömeghez. Az így kapott számok alapján a vizsgált *T. virens* törzsek egymással már összehasonlíthatóvá tehetők, a laboratóriumi fermentáció során termelt gliotoxin szempontjából.

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) (13. 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.

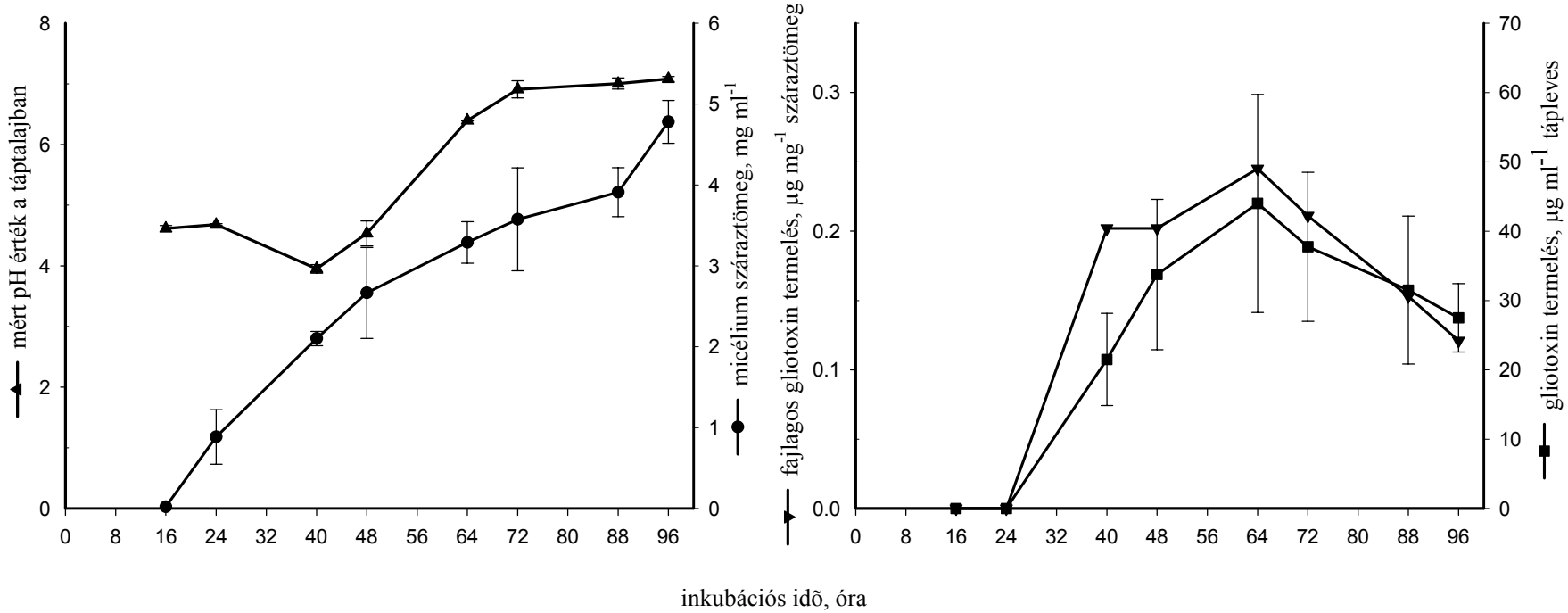


12. ábra: Kilenc gliotoxintermelő *T. virens* törzs gliotoxin termelésének kinetikája maláta táplevesben. Törzsek: MUCL 8445 (●), 14058 (○), 18139 (▼), 19014 (▽), 29415 (■), 34687 (□), 44898 (◆), 44899 (◇), 44922 (▲). MDW: szárazanyagtömeg.

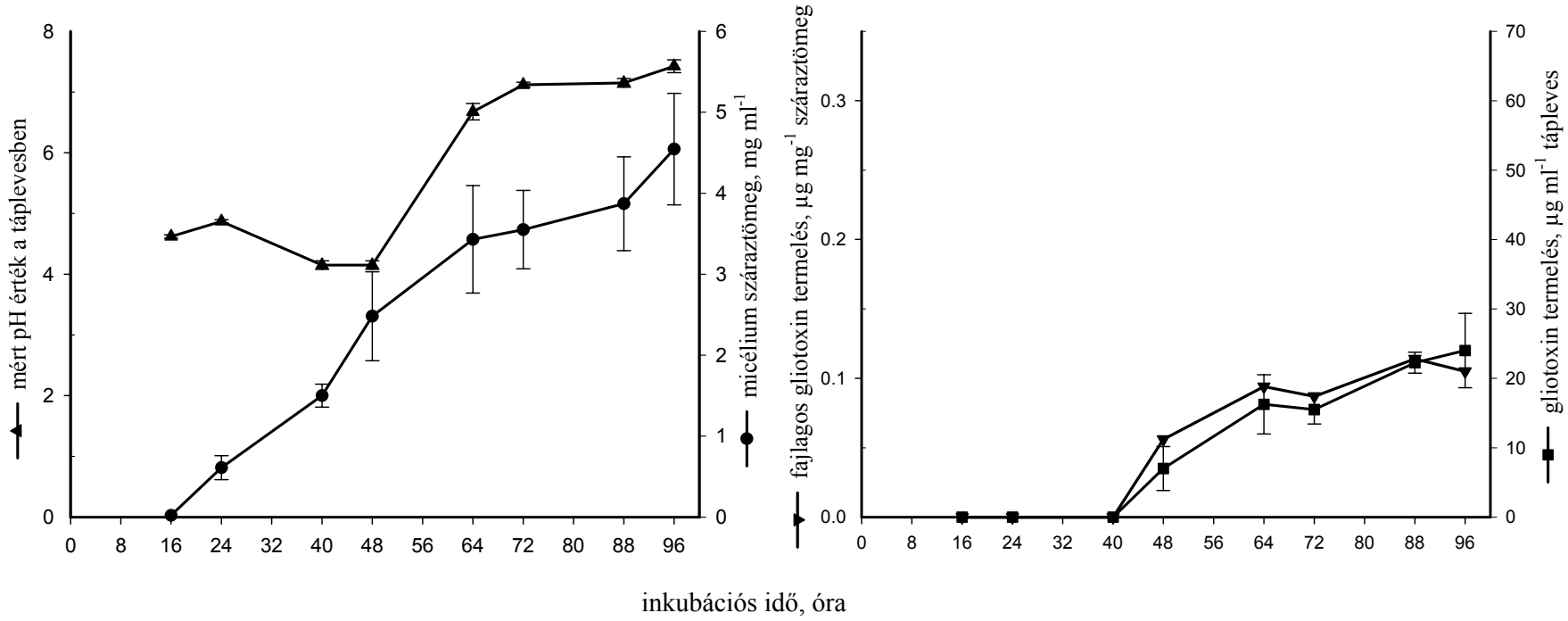


13. ábra: Szárazanya-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM^{TM}/MUCL 8445 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben.

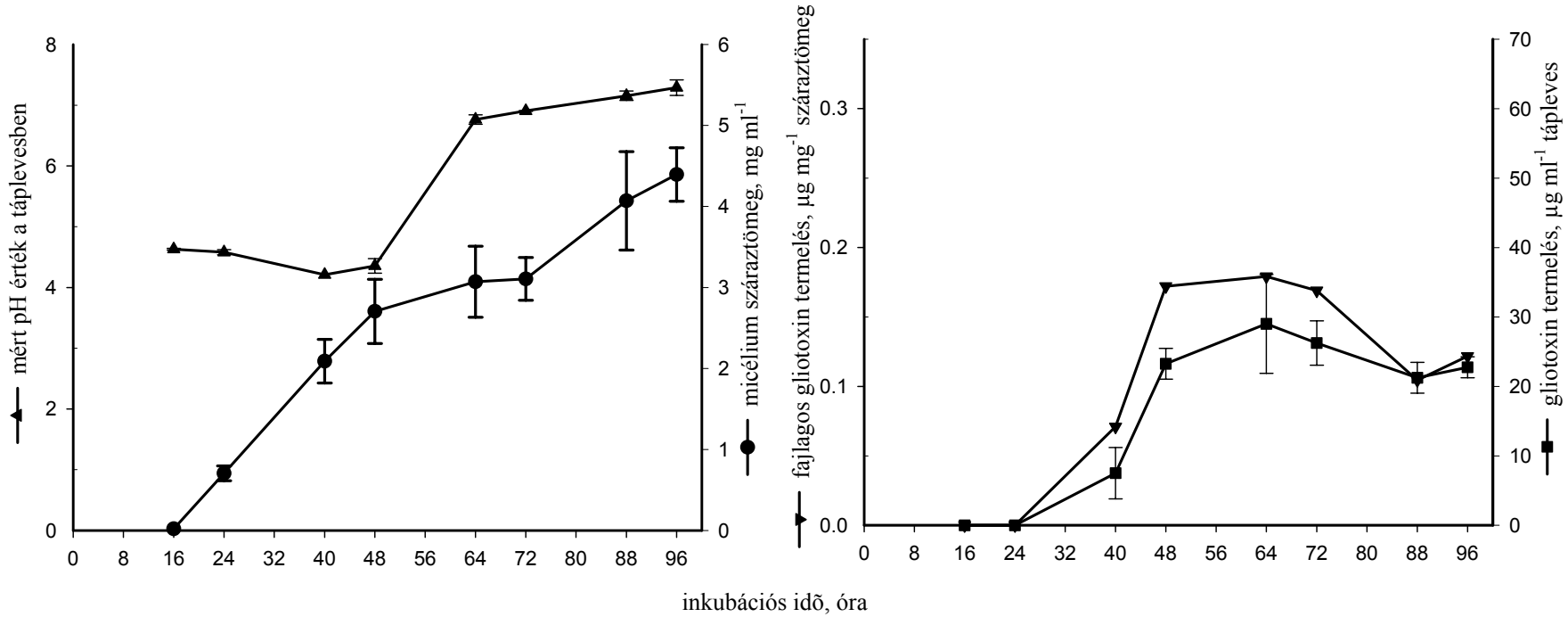
.



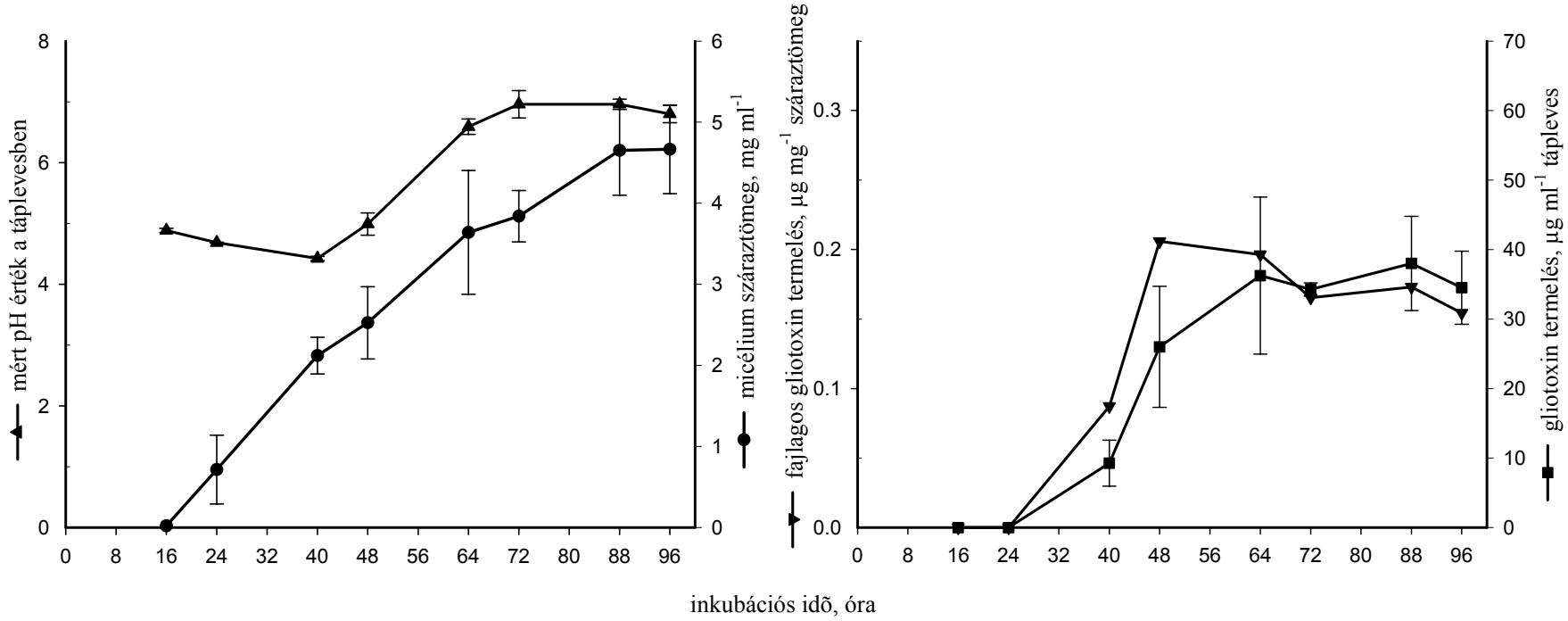
14. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 14058 *Trichoderma virens* törzs esetébemaláta táplevesben.



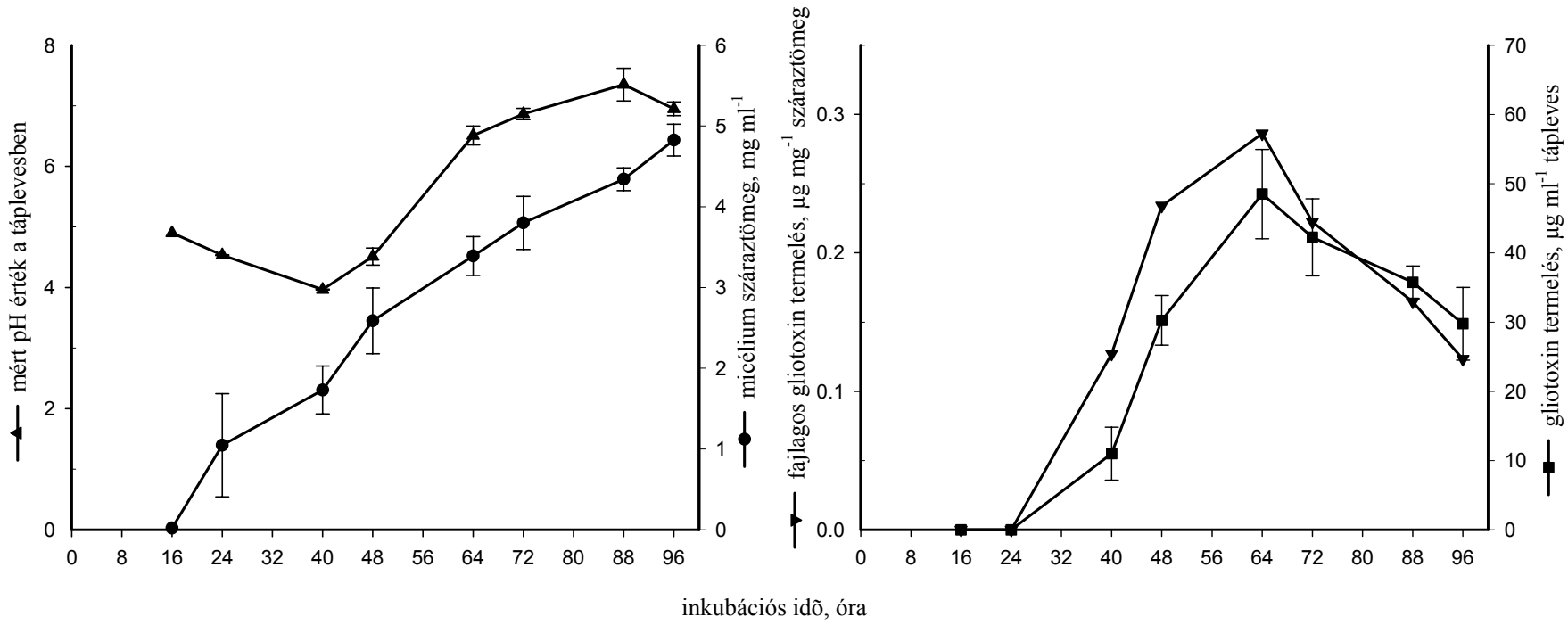
15. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 18139 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben.



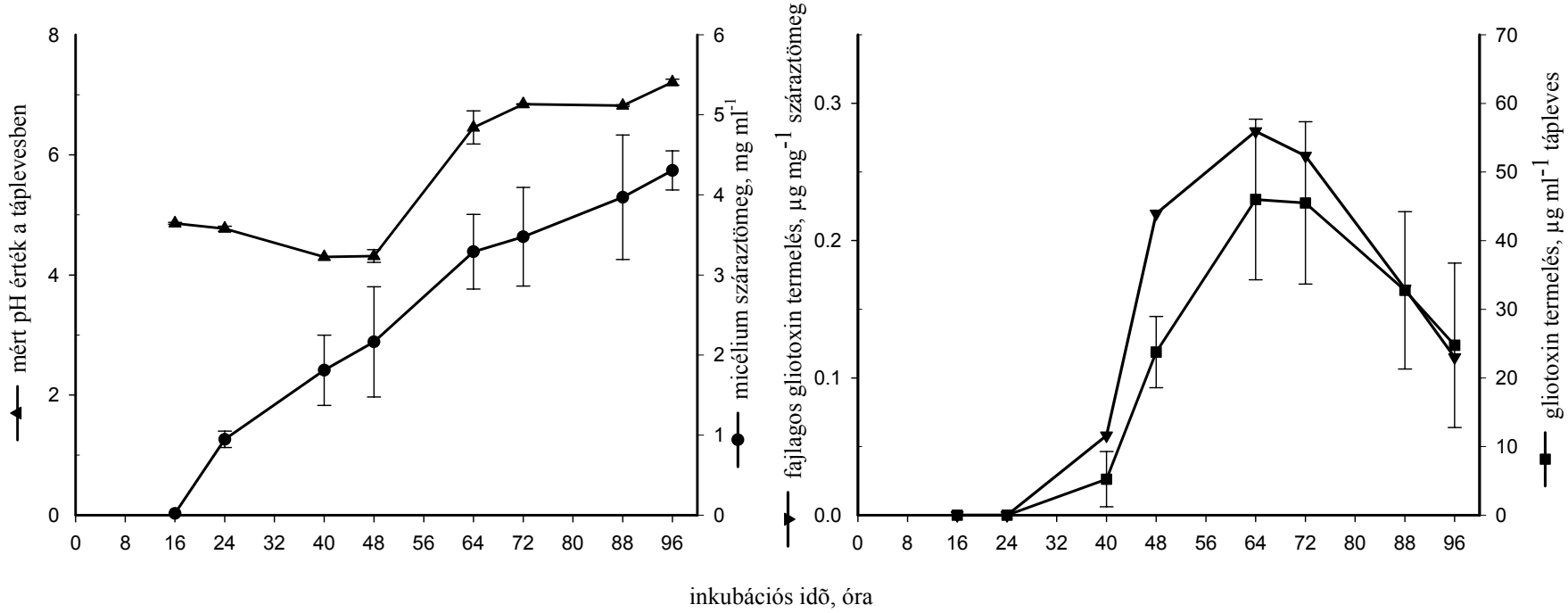
16. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 19014 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben.



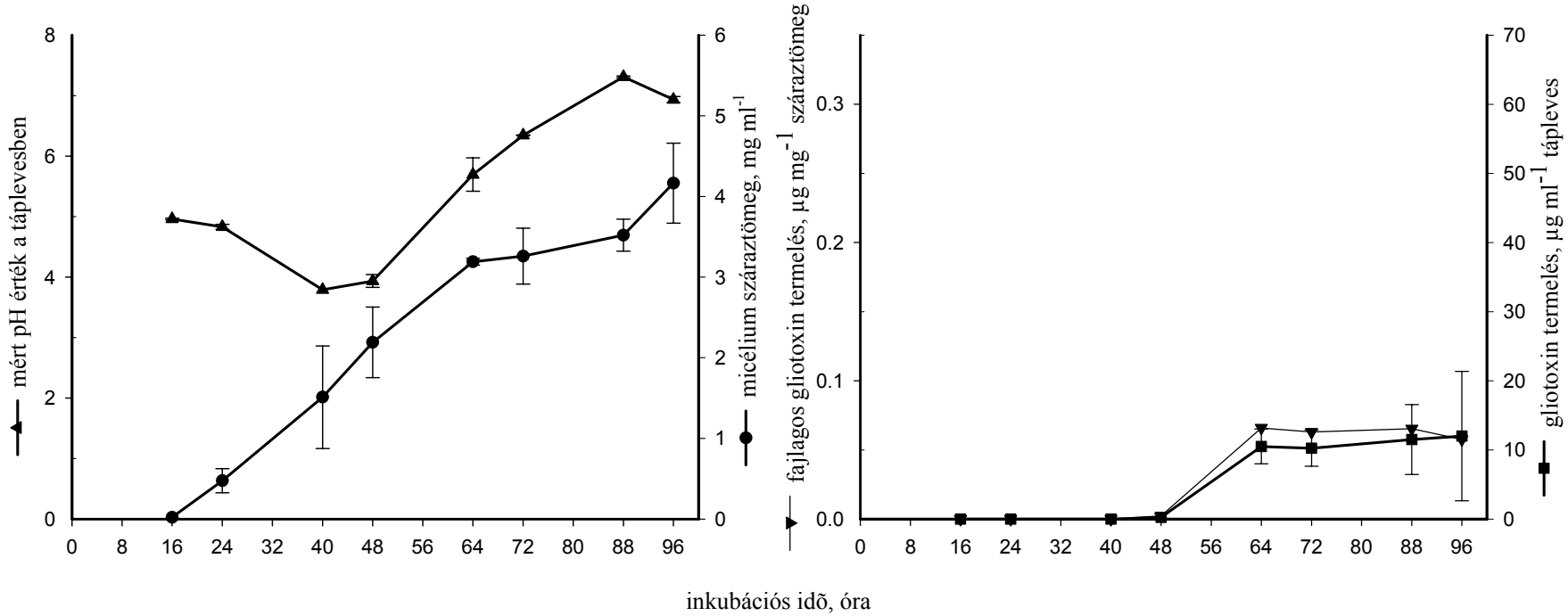
17. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 29415 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben.



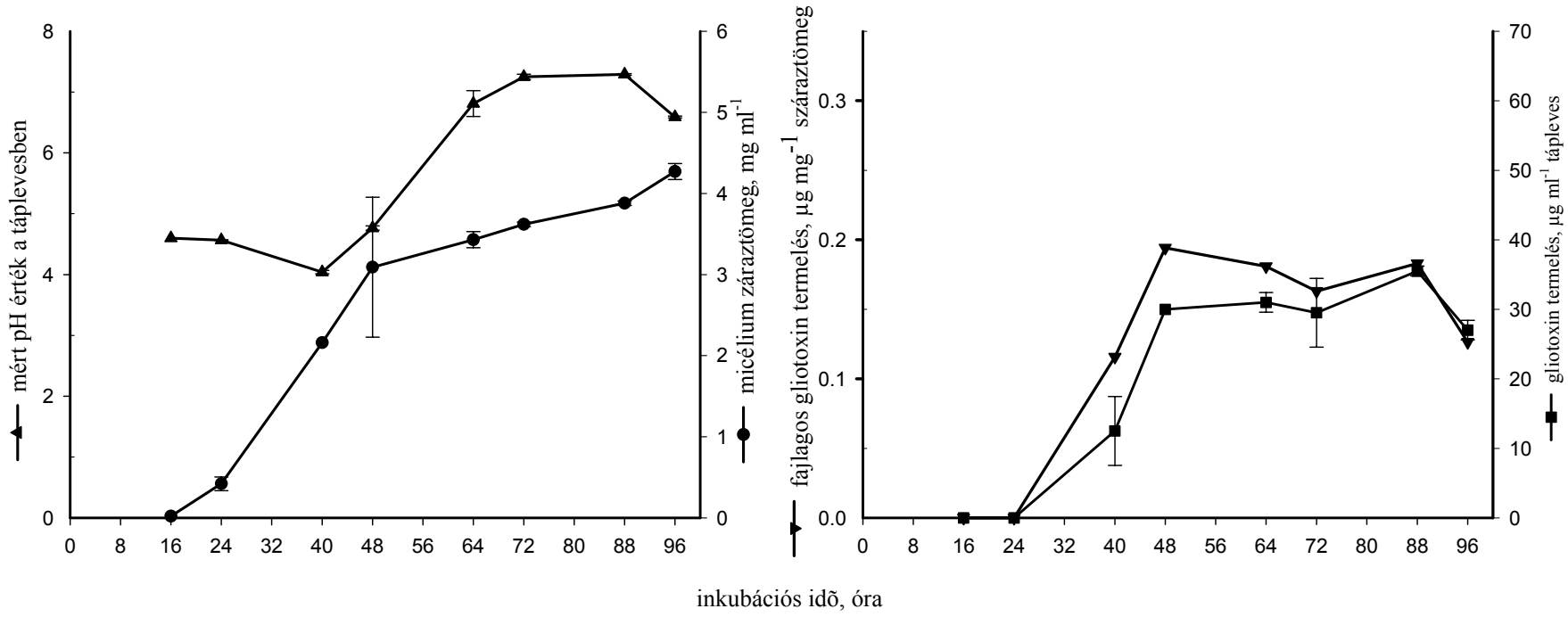
18. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 34687 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben.



19. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 44898 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben.



20. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM^{TM}/MUCL 44899 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben.



21. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 44922 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben.

4.5. *T. virens* törzsek in vitro antagonizmusa *Rhizoctonia solani*-val szemben

A patogén és az antagonista törzsek leoltása után 4 óránként mértük a telepek sugarát a másik telep középpontjának irányában azzal a céllal, hogy a konfrontáció hatásait egyenlő mértékben és a legerősebben tudjuk érzékelni.

A mérések eredménye, a patogén növekedésének üteme a különböző *Trichoderma* törzsekkel szembe oltva a 7. és a 8. táblázatokban nyomon követhető.

Az 7. táblázatból jól látható, hogy a konfrontációs antagonizmus teszt folyamán a különböző kezelések azonos időpontjaiban mért középértékeinek statisztikailag is alátámasztott összehasonlítása alapján kiderül, hogy a kontrollhoz képest szignifikáns ($P < 0,05$) eltérés a kísérlet 32. órájában jelentkezik először, majd ettől az időponttól az antagonistával szembeoltott *R. solani* telepsugár növekedése minden esetben elmarad, a kezeletlen kontroll növekedésétől, vagy esetleg megegyezik vele. A teszt 32. órájától az a-val jelölt középértékű kontrolltól az összes többi kezelés középértéke szignifikánsan, negatív irányban eltér, amelyeket az eltérő betűjelzés is jelöl.

A 8. táblázatban kapott eredmények azt mutatják, hogy a különböző *Trichoderma virens* törzsekkel szembeoltott *Rhizoctonia solani* telepe folyamatosan növekszik. Az eltérő időpontokban mért telepsugarak egymástól szignifikánsan ($P < 0,05$) különböznek, amely szignifikáns különbség a gomba növekedésére utal. A szignifikáns különbségek azonban eltűnnek, kezelésektől függően a kísérlet 28.-36. órájában, melynek oka a *R. solani* telep-növekedésének a gátlása, melyet feltételezhetően az antagonista által termelt gátló hatású anyagok, majd később pedig az antagonista közvetlen parazitizmusa okoz.

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 kimutatott gliotoxin mennyiségével (specifikus gliotoxin termelés, SGT). A statisztikai összehasonlítás kétváltozós korreláció vizsgálattal történt (Pearson-féle teszt).

A 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 termelt 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 kimutathatók 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.

8. táblázat: A *Rhizoctonia solani* telep sugárirányú növekedésének (mm) egytényezős varianciaianalízis eredményei, a mérési időpontonkénti felbontásban

BCCM™/MUCL törzsek	időpontok										
	4h	8h	12h	16h	20h	24h	28h	32h	36h	40h	44h
8445	21,33 a	23,00 a	24,00 a	25,33 a	27,00 ab	27,67 b	29,67 ab	30,67 b	31,33 bc	31,33 cd	31,33 c
14058	21,00 a	23,00 a	25,00 a	26,00 a	27,33 ab	28,67 ab	30,33 ab	31,33 b	31,67 bc	32,00 bcd	32,33 bc
18139	20,33 a	22,33 a	24,33 a	26,00 a	26,67 ab	27,33 b	29,67 ab	31,00 b	31,67 bc	32,67 bc	32,67 bc
19014	21,33 a	23,00 a	24,67 a	26,00 a	27,67 a	29,67 a	31,33 a	33,00 a	33,00 ab	33,67 ab	33,67 b
29415	21,00 a	23,00 a	24,00 a	25,67 a	26,67 ab	28,00 ab	29,33 b	30,67 b	30,67 c	30,67 d	30,67 c
34687	20,67 a	23,00 a	24,00 a	25,33 a	26,67 ab	27,67 b	30,00 ab	30,33 b	31,00 c	31,00 cd	31,00 c
41468	20,00 a	22,33 a	24,00 a	24,67 a	25,67 b	27,00 b	28,67 b	30,33 b	30,67 c	30,67 d	30,67 c
44898	20,00 a	22,33 a	24,00 a	25,00 a	25,67 b	28,00 ab	29,00 b	30,00 b	30,67 c	31,33 cd	31,33 c
44899	19,67 a	22,00 a	24,00 a	25,00 a	26,67 ab	28,00 ab	29,00 b	30,67 b	30,67 c	30,67 d	30,67 c
Kontroll	19,67 a	22,67 a	24,67 a	25,00 a	27,33 ab	28,33 ab	30,00 ab	33,00 a	33,67 a	35,00 a	37,00 a
SzDP=5%	1,7032	1,3554	1,3193	1,6454	1,7863	1,7863	1,8657	1,6158	1,6746	1,8915	2,1988
Std hiba	0,8165	0,6498	0,6325	0,7888	0,8563	0,8563	0,8944	0,7746	0,8028	0,9068	1,0541

9. táblázat: A *Rhizoctonia solani* telep sugárirányú növekedésének (mm) egytényezős varianciaianalízis eredményei, a szembeoltott *T. virens* törzsenkénti felbontásban.

	Kezelések									
időpontok	8445	14058	18139	19014	29415	34687	41468	44898	44899	kontroll
4h	21,33 a	21,00 a	20,33 a	21,33 a	21,00 a	20,67 a	20,00 a	20,00 a	19,67 a	19,67 a
8h	23,00 b	23,00 b	22,33 b	23,00 b	23,00 b	23,00 b	22,33 b	22,33 b	22,00 b	22,67 b
12h	24,00 b	25,00 c	24,33 c	24,67 c	24,00 bc	24,00 c	24,00 bc	24,00 bc	24,00 bc	24,67 c
16h	25,33 c	26,00 c	26,00 d	26,00 c	25,67 cd	25,33 d	24,67 c	25,00 c	25,00 cd	25,00 c
20h	27,00 d	27,33 d	26,67 de	27,67 d	26,67 de	26,67 e	25,67 cd	25,67 c	26,67 de	27,33 d
24h	27,67 d	28,67 e	27,33 e	29,67 e	28,00 ef	27,67 f	27,00 de	28,00 d	28,00 ef	28,33 de
28h	29,67 e	30,33 f	29,67 f	31,33 f	29,33 fg	30,00 g	28,67 ef	29,00 de	29,00 fg	30,00 e
32h	30,67 ef	31,33 fg	31,00 g	33,00 g	30,67 g	30,33 hi	30,33 f	30,00 def	30,67 g	33,00 f
36h	31,33 f	31,67 g	31,67 gh	33,00 g	30,67 g	31,00 i	30,67 f	30,67 ef	30,67 g	33,67 fg
40h	31,33 f	32,00 g	32,67 h	33,67 g	30,67 g	31,00 i	30,67 f	31,33 f	30,67 g	35,00 g
44h	31,33 f	32,00 g	32,67 h	33,67 g	30,67 g	31,00 i	30,67 f	31,33 f	30,67 g	37,00 h
SzDP=5%	1,2154	1,1029	1,1416	1,3826	1,9992	0,9776	2,321	2,2642	2,2833	1,6933
Std hiba	0,586	0,5318	0,5505	0,6667	0,964	0,4714	1,1192	1,0918	1,101	0,8165

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Ebben a munkában 96 *Trichoderma* törzset vizsgáltunk meg, hogy jobban megismerjük a gliotoxin-termelésük sajátosságait, illetve megerősítsük (revideáljuk) a gliotoxint termelő gombák taxonómiai helyét a *Trichoderma* genuszon belül illetve választ kerestünk a gliotoxin termelő képesség antagonizmusban játszott szerepére.

A maláta-kivonat (komplex) táplevest mint tenyészközeget sikeresen használtuk a gliotoxin termelést vizsgáló kísérleteinkben. Martin és Demain (1980) utaltak arra, hogy komplex táptalajokban a gomba növekedésében nagyobb eltérések mutatkoznak a trofofázis és az idiofázis szakasza között, mint szintetikus táptalajokban. Wilhite és Straney (1996) kísérleteikben szintén malátakivonat táplevest mint komplex tápforrást használtak gliotoxin termelésre. A szintetikus tápközegben a gomba növekedése és a gliotoxin-termelése egyaránt elmaradt a komplex tápleveshez képest.

A gliotoxin termelő képesség céljából tesztelt kilencvenhat *Trichoderma* törzsből mindössze tíz (10,4%) törzs esetében tapasztaltunk gliotoxin-termelést folyadék-kultúrában. A tíz törzs a *Trichoderma* (syn: *Gliocladium*) *virens* fajt képviselte.

A *Trichoderma virens* faj taxononómiai helye sokat változott a múltban. A faj elkülönítése a nemzetség többi fajától igen fontos. Napjainkban erre a morfológiai bélyegek összehasonlítása mellett a molekuláris biológiai módszerek is lehetőséget teremtenek, de egy nemzetségen belüli, fajspecifikus metabolittermelése is határozóbélyeg lehet.

A gliotoxint termelő fajt először *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz néven említette Weindling (1932), amely ma már nem használatos fajnév, de megegyezik a *Trichoderma viride* Pers. fajjal (Hughes, 1958). Később ugyanezen gliotoxintermelő-törzsről *Gliocladium fimbriatum* Gilman & Abbott fajként számol be Wendling (1941), majd *Trichoderma viride* Pers. ex. Fries -ként (Brian, 1945; Brian és Hemming, 1945). 1964-ben, amikor Webster és Lomas (1964) különböző *Trichoderma* izolátumokat tanulmányoztak, és ismerték a Weindling antibiotikumot-termelő gombája körüli identifikációs problémát (*Trichoderma viride* vagy *Gliocladium fimbriatum*?) megismételték Weindling és Brian izolátumaival és számos *T. viride* izolátummal az antibiotikum-termelési kísérletet, melynek eredményeként bebizonyosodott hogy

Weindling gliotoxintermelő izolátuma – az akkori genusz koncepció szerint – *Gliocladium virens* J. Miller, Giddens & Foster (=*Trichoderma virens*) faj volt, és egyetlen más fajba tartozó izolátum sem termelte ezt az antibiotikumot.

A jelen munka is igazolja és megerősíti azt az eredményt, amelyet Webster és Lomas is tapasztaltak, hogy csak *T. virens* törzsek termelik ezt az antibiotikumot. Egyáltalán nem tudtuk kimutatni ezt az anyagot a többi *Trichoderma* faj törzsei esetében. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a gliotoxin-termelés a *T. virens* faj sajátsága, de ugyanakkor gliotoxint nem-termelő *T. virens* törzseket is találtunk, ami a gliotoxin-termelés képességének fajon belüli változatosságát mutatja.

A gliotoxin-termelés időzítésében és a termelés kinetikájában eltéréseket tapasztaltunk a termelő törzsek között. Míg a nagymennyiségű gliotoxint termelő törzsek esetében a termelés optimális időszakának az inkubáció 48-64. óra közötti intervalluma tűnt, addig a kismennyiséget termelő törzsek ezidőszakban nem, vagy alig termeltek gliotoxint.

A magas szinten termelő törzsek termelési kinetikája alapján a gliotoxin szintézise valószínűleg elkezdődik és be is fejeződik a gomba intenzív növekedési fázisának ideje alatt. A törzsek gliotoxin-termelő kinetikájának vizsgálata is eltérő eredményeket mutatott. A nagy mennyiségű gliotoxint termelő törzsek esetében a maximális gliotoxin-termelést az intenzív növekedés fázisában (40-64. óra) tapasztaltuk. A gliotoxin-produkció alkalmanként elérte az alacsony szinten termelő törzsek metabolit-mennyiségének a hatszorosát.

A gliotoxintermelésben jelentkező, fajon belüli változatosság egyik magyarázata a gliotoxin bioszintézisében, illetve ennek szabályozásában keresendő. A gliotoxin bioszintézisének lépései ismertek (Sivasithamparam és Ghisalberti, 1998), melynek kiindulásaként egy fenilalanin egyesül egy szerinnel, majd ezt több lépés követi a gliotoxinmolekula felépüléséig. A gliotoxinképződés genetikai háttere, szabályozó mechanizmusai még nem ismertek, de valószínőleg több enzim is részt vesz a molekula szintézisében, tehát több gén is felelős lehet a gliotoxintermelő tulajodonság meglétért. Az alacsonyabb szinten termelő törzsek esetében valőszínűleg egy, a gliotoxinképződés egy lépéséért felelős gén kifejeződése, vagy pedig az enzim működése gátolt. További részletes molekuláris biológiai vizsgálatok szükségesek ennek megállapítására.

Szintetikus tápközegben, a legmagasabb gliotoxinszintet 8 napos inkubáció után mérték (Park *et al.*, 1991). Saját eredményeink azt mutatták, hogy a *T. virens* törzsek intenzívebb micélium-növekedést mutattak a trofofázis ideje alatt maláta-kivonat táplevesben, mint szintetikusban. A két tápközegben jelentkező növekedébeli különbségek, illetve a toxintermelésbeni eltérések a táplevesek összetételére vezethetők vissza. A maláta tápfolyadék sokkal összetettebb (komplex), többféle szénhidrátot, fehérjét és aminosavat tartalmaz készen, mint a meghatározott összetételű, recept alapján összeállított szintetikus táptalaj. A készen felvehető aminosavak hasznosítása kevésbé energiaigényes a gomba számára, így intenzívebben képes növekedni.

A gliotoxin szintézise kezdetben a biomassza termelődésével párhuzamosan fokozódott, majd hirtelen lelassult (a nagymennyiségű gliotoxint termelő törzsek esetében). A gliotoxin szintézise eltér a többi másodlagos anyagcsere termékétől, amelyek képződése főként tápanyaghiány esetén jelentkezik (Bu'Lock, 1975). A tenyészközeg pH-ja a gomba növekedését és fejlődési fázisait követve változott, és ez feltételezhetően közvetett kapcsolatban van a gliotoxin bioszintézissel és a tápközegben található gliotoxin koncentrációjával is. A pH érték először 4 ± 0,5 értékre csökkent, a gomba intenzív növekedése idején, amikor szerves savak termelődnek. Ezek az anyagok változtatják savanyú kémhatásúvá a tápközeget, melyben a fenilalanin és más nitrogénforrások a gomba számára könnyebben felvehetővé válnak. Korábban a fenilalanint, mint a gliotoxin bioszintézisben szereplő fontos prekurzort említették (Kirby *et al.*, 1978). A savanyú közeg emellett biztosítja a gliotoxin molekula kémiai stabilitását is (Weindling és Emerson, 1936; Brian és Hemming, 1945). Az inkubáció 64. óráját követően, az intenzív növekedési fázis végével a gombasejtek elöregedtek, majd szétestek, miközben ez a folyamat közvetve és közvetlenül is a pH emelkedéséhez vezetett. Mindemellett a gliotoxinképződés lelassult, és a meglévő gliotoxin lebomlása pedig felgyorsult, mivel a magas pH nem kedvez a gliotoxin molekula stabilitásának. Azt több irodalmi forrás is alátámasztja, hogy pH 7,0 érték körül és a felett gyors gliotoxin lebomlás jelentkezik (Weindling és Emerson, 1936; Brian és Hemming, 1945).

Számos tanulmány foglalkozott a *T. virens* faj gliotoxin termelésének sajátosságaival (Park *et al.*, 1991; Lumsden *et al.*, 1992; Wilhite *et al.*, 1994; Wilhite és Straney, 1996), azonban legtöbbször egy törzs (Gl-20; GlioGard, Lumsden és Locke, 1989) illetve egy másik, az előzőből származtatható törzs (Gl-21) felhasználásával.

Jelen disszertációban a gliotoxin-termelés jelenségét kiemelten vizsgáltuk, nagyobb számú törzs esetében. Megerősítést nyert az a tény, hogy ezen metabolit termelése a *T. virens* faj kizárólagos sajátossága a *Trichoderma* genuson belül.

A gliotoxintermelésben és a telepek morfológiájában jelentkező eltérések felvetik a faji diverzitás kérdését, illetve azt, hogy a *Trichoderma virens* faj mennyire tekinthető egységesnek? Korábban más *Trichoderma* izolátumok esetében igazolták, hogy az egy fajba tartozónak vélt izolátumok valójában több fajt képviseltek. Bisby (1939) a *Trichoderma* nemzetségre jellemző morfológiai változékonyságot a *Trichoderma viride* Pers. faj változatainak tudta be. Hermosa *et al.* (2000) 17, biológiai védekezésben használt *T. harzianum* izolátumot vizsgáltak meg, amelyek valójában 4 különböző fajt képviseltek (*Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*). Kubicek *et al.* (2001) szintén megvizsgáltak nyolc *Trichoderma harzianum* fajnak vélt izolátumot ITSrDNS (ITS1 és ITS2) szekvencia-analízis, illetve 42-kDa endokitinázt kódoló régió alapján, hogy meghatározzák a pontos taxonómiai helyüket. Eredményeik szerint a nyolc izolátum a következő három fajt képviselt: *T. harzianum*, *T. atroviride*, és a *T. asperellum*.

Chaverri *et al*. (2001) hét *Trichoderma* izolátum (közöttük 5 *T. virens* izolátum is szerepelt) morfológiai analízisét végezték el és szignifikáns ($P < 0,05$) különbségeket találtak a különböző morfológiai jellegek között, de ezek az eltérések nem voltak elegendőek ahhoz, hogy taxonómiailag is eltérőnek tekintsék az izolátumokat. A molekuláris biológiai vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy az ITS szekvenciák analízise nem mutatott akkora különbségeket a *T. virens* izolátumok között, mint a tef-1α szekvenciák analízise. Chaverri *et al*. (2001) véleménye szerint a *Trichoderma virens* fajon belüli nagyfokú morfológiai és egyéb változékonyság betudható annak is, hogy a faj nem szigorúan anamorf, hanem rendelkezik teleomorf formával is (*Hypocrea virens*) amelynek megléte magában hordozhatja az ivaros szaporodás, és a gének szélesebbkörű rekombinálódásának lehetőségét is.

Samuels (1996) felvetette a kérdést, hogy vajon hány *Trichoderma* faj létezhet? A nemzetség első leírásakor (Persoon, 1794) említett négy fajból mára csak egy, a *Trichoderma viride* maradt meg. 1939 és 1969 között hosszú időn át úgy tűnt, hogy a *Trichoderma* nemzetség mindösszesen egy fajt képviseltetett, egészen Rifai 1969-es génusz-revíziójáig. Később Doi és Doi (1986) listát készítettek az 1986 előtt ismert

fajokról. Napjainkban a leírt fajok száma már 75 körüli, de ugyanakkor az ismert *Hypocrea* fajok száma alapján 100 körüli feltételezhető (Samuels, 1996).

Eredményeink azt mutatják, hogy a morfológiailag és gliotoxintermelő képességben egyaránt heterogén *T. virens* törzsek az ITS szekvenciájuk alapján egymástól nem különíthetők el. Más, a *T. virens* faj esetében specifikusabb DNS szakasz felszaporítása célravezető lehet az egyes izolátumok elkülönítésénél. Chaverri *et al.* (2001) szerint a *tef-1* szekvencia alapján a *T. virens* izolátumok jobban elkülöníthetők. A jövőben más, specifikus szekvenciák alapján szükséges az eltérő gliotoxin-termelésű *T. virens* izolátumok újbóli összehasonlítása.

Napjainkban a genomi DNS felszaporításán és vizsgálatán alapuló módszereket széles körben alkalmazzák faji szintű meghatározásokra, filogenetikai osztályozásra, revízióra. Az egyik elterjedt molekuláris biológiai vizsgálati módszer az RAPD PCR, melyet főleg különböző törzsek összehasonlítására illetve osztályozására használnak (Zimand *et al.*, 1994).

Munkánk során mi is, RAPD PCR analízist alkalmaztunk, hogy – véletlenszerű primereket használva – az amplifikált sávok jelenlétét vagy hiányát fenológiai analízissel értékeljük. A PCR amplifikáció analízisének 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 kimutatható 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. Ebből következően lényeges folytatni a gliotoxintermelő gombák klasszikus *in vitro* analitikai kémiai úton történő vizsgálatát. Fontos megjegyezni azt is, hogy a gliotoxin-termelés mennyisége eltérő lehet *in vivo* körülmények között, ugyanis az antibiotikumok termelése nagymértékben függ a környezeti hatásoktól is. Fontos lehet az *in vivo* körülmények között (pl. talaj) termelődő gliotoxin mennyiségének, illetve ennek patogénekkel szembeni hatékonyságának vizsgálata.

A gliotoxin mint a növénypatogénekkel szembeni biológiai védekezés során potenciális szerepet játszó anyagot több publikációban említik (Brian és Hemming, 1945; Lumsden *et al.*, 1992; Wilhite *et al.*, 1994).

A konfrontációs antagonizmus kísérlet eredményei alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a termelt gliotoxin nem játszik elsődleges szerepet a *Rhizoctonia solani* elleni *in vitro* antagonizmusban, de ugyanakkor más antibiotikus hatású anyagok és litikus enzimek jelenlétét feltételezhetjük a gátlási zóna megléte alapján.

Ha egy biológiai növényvédelmi készítményt vizsgálunk, fontos, hogy biztonságos legyen a felhasználó számára, ne tartalmazzon az emberi egészségre káros anyagokat, toxinokat. A biológiai védekezésben felhasználható szervezetek által termelt toxinok nem csak gombapatogénekre, hanem növényekre, melegvérűekre is károsak lehetnek ugyanúgy, mint a készítmények gyártása során közreműködő emberekre, vagy a felhasználókra, akiknél légzőszervi megbetegedéseket, allergiát okozhatnak. A jelen dolgozatban vizsgált metabolit kémiai tulajdonságaiból következően gomba-toxinként is viselkedhet. A kísérleteink során azt figyeltük meg, hogy a gliotoxin csak a gomba intenzív növekedési szakaszának kezdetén jelenik meg, majd az intenzív növekedési szakasz végén a képződése lelassul, majd leáll. Ezt követően a gliotoxin mennyisége folyamatosan csökken. Másrészt, a tápleves beoltására használt konídiumok kimutatható mennyiségben nem tartalmazhatták ezt a metabolitot, mivel a fermentált táplevesből vett első mintákból nem sikerült ezt a toxint HPLC segítségével kimutatni. Az előzetes tapasztalatok és a molekula oxidációra való rendkívüli érzékenysége alapján azt állapítottuk meg, hogy a gliotoxint termelő *T. virens* törzset tartalmazó kész biopreparátum-termékeken, a termék szárítása és tárolása után a toxin nincs jelen, tehát a megfelelően formulázott biopreparátumnak nincs munka és közegészségügyi kockázata.

Amennyiben a gliotoxin termelés fontosnak és hasznosnak is tűnik a növénypatogének elleni biológiai védekezésben, nem szabad megfeledkezni más antimikrobiális és antifungális hatású metabolitról sem, mint a viridin (Brian *et al.*, 1945), a gliovirin (Howell és Stipanovic, 1983), a peptaibol antibiotikumok (Wiest *et al.*, 2002), a trichodermin, trichodermol továbbá a *T. virens* által termelt lítikus enzimek jelentősége sem lebecsülendő. Ezért további átfogó vizsgálatok szükségesek a jelentősebb metabolitok egyedi és összetett hatásairól, *in vivo* körülmények között is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Ebben a munkában *Trichoderma* törzseket vizsgáltunk, hogy jobban megismerjük a gliotoxin termelésük sajátosságait, illetve, hogy áttekintsük a gliotoxint termelő gombák taxonómiai helyét a *Trichoderma* nemzetségen belül.

Szintetikus és komplex tápleveseket hasonlítottunk össze a táplevesben növekvő gomba gliotoxintermelése és szárazanyaggyarapodása szempontjából. Eredményeink azt mutatták, hogy a *T. virens* törzsek statisztikailag igazolhatóan intenzívebb micéliumnövekedést és magasabb gliotoxin-termelést mutattak a trofofázis ideje alatt 2 %-os maláta táplevesben, mint szintetikusban. A nagy mennyiségű gliotoxint termelő törzsek esetében gliotoxin szintézise kezdetben a biomassza növekedésével párhuzamosan fokozódott, majd hirtelen lelassult.

Kilencvenhat, gliotoxin-termelő képesség céljából tesztelt *Trichoderma* törzsből mindösszesen tíz (10,4 %) törzs esetében tapasztaltunk gliotoxin termelést folyadékkultúrában. A tíz törzs a *Trichoderma* (syn: *Gliocladium*) *virens* fajt képviselte, a törzsgyűjteményekben szereplő fajmeghatározás alapján.

Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy a gliotoxin termelés a *T. virens* faj sajátsága, de ugyanakkor gliotoxint nem termelő *T. virens* törzseket is találtunk, ami a gliotoxintermelés képességének változatosságát mutatja a fajon belül. Továbbá, a gliotoxintermelés kinetikájában eltéréseket tapasztaltunk a termelő törzsek között is. Míg a nagy mennyiségű gliotoxint termelő törzsek esetében a termelés optimális időszakának az inkubáció 48-64. óra közötti intervalluma tűnt, addig a kis mennyiséget termelő törzsek ez időszakban nem, vagy alig termeltek giotoxint.

A törzsek genetikai polimorfizmusának alátámasztására RAPD PCR analízist alkalmaztunk, hogy a véletlenszerűen összeállított primereket használva, az amplifikált sávok jelenlétét fenológiai analízissel értékeljük. A PCR amplifikáció analízisének eredményei összefüggést mutattak a gliotoxintermelés meglétével, a nem termelő izolátummnál ugyanakkor az RAPD PCR megközelítéssel nem tudtuk elkülöníteni a nagy mennyiségű gliotoxint termelő törzseket. A gliotoxin mennyisége nem korrelált a fenológiai analízis eredményeivel.

Eredményeink azt mutatják, hogy a morfológiailag és gliotoxintermelő képességben egyaránt heterogén *T. virens* törzsek az ITS szekvenciájuk alapján

egymástól nem különíthetők el. Más, a *T. virens* faj esetében specifikusabb DNS szakasz felszaporítása esetleg célravezetőbb lehet az egyes izolátumok elkülönítésénél.

Konfrontációs antagonizmus tesztet végeztünk a *T. virens* (antagonista) és *Rhizoctonia solani* (patogén) gombák szembeoltásával, maláta-kivonat tartalmú agaron. A patogén és az antagonista sugárirányú telepnövekedését mértük, majd ebből következtettünk a gátlás mértékére, illetve a gátlás, illetve a gliotoxin-termelés ismeretében a gliotoxin antagonizmusban betöltött szerepére próbáltunk következtetni *in vitro*. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a gliotoxin-termelő *T. virens* törzsek gliotoxin produktuma nem állt összefüggésben az antagonizmus-teszt eredményeivel.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Adams, P.M., Hanson, J.R. 1972. Sesquiterpenoid metabolites of *Trichoderma polysporum* and *T. sporulosum*. Phytochemistry 11. 423.

Almassi, F., Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., Sivasithamparam, K. 1991. New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum.* J. Nat. Prod. 54. 396-402.

Arisan-Atac, I., Heidenreich, E., Kubicek, C.P. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* spp. capable of chestnut blight biocontrol. FEMS Microbiol. Lett. 126. 249-256.

Arx, J.A., von 1987. Plant Pathogenic Fungi. Nova Hedwigia Beihefte. 87. 288 pp.

Askew, D.J., Laing, M.D. 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. Plant. Path. 42. 686-690.

Baker, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 6: 263-294.

Baker, K.F., Cook, R.J. 1982. Biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.

Baldwin, J.E., O'Neil, I.A., Russel, A.T. 1991. Isonitrin A: revision of the structure and total synthesis in racemic form. Synletters 551-552.

Bamburg, J.R., Strong, F.M. 1969. Mycotoxins of the trichothecene family produced by *Fusarium tricinctum* and *Trichoderma lignorum*. Phytochemistry 8. 2405-2410.

Bennett, J. W. 1983. Differentation and secondary metabolism in mycelial fungi 1-32 in: Lemke P. A. Ed., Vol 5.: Secondary metabolism and differentation in Fungi, Mycology series, Series editors: J. W. Bennett and A. Ciegler, New York and Basel. 1983.

Bennet, J.W., Bentley, R. 1989. What's in a name? Microbial secondary metabolism. Adv. Appl. Microbiol. 34. 1-28.

Betina, V. 1994. Bioactive secondary metabolites of microorganisms. Progress in Industrial Microbiology. Vol. 30. Elsevier, Amsterdam

Bisby, G.R. 1939. *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. and notes on *Hypocrea*. Trans. Br. Mycol. Soc. 23. 149-168.

Bisset, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can. J. Bot. 62. 924-931.

Bisset, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69. 2357-2372.

Bisset, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma.* III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69. 2373-2417.

Bisset, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Can. J. Bot. 69. 2418-2420.

Bisset, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Can. J. Bot. 70. 639-641.

Brewer, D., Hannah, D.E., Taylor, A. 1966. The biological properties of 3,6-epidithiadiketopiperazines; Inhibition of growth of *Bacillus subtilis* by gliotoxin, sporidesmins and chetomins. Can. J. of Microbiol. 12. 1187-1195.

Brian, P.W., Hemming, H.G. 1945. Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol. 32. 214-220.

Brian, P.W., Curtis, P.J., Hemming, H.G., McGowan, J.C. 1946. The production of viridin by pigment forming strains of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol. 33. 190-200.

Buchert, J., Ranua, M., Siika-aho, M., Pere, J., Viikari, J., 1994. *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. App. Microb. and Biotecnol. 40. 941-945.

Bu'Lock, J.D. 1961. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Ann. Rev. Appl. Microbiol. 3. 293-342.

Bu'Lock, J.D. 1975. Secondary metabolism in fungi and its relationships to growth and development. in: Smith J. E. and Berry D. R (eds.) The filamentous fungi. Vol I., pp. 33-58. Wiley. New York.

Campbell, I.M. 1983. Correlation of secondary metabolism and differentation. 55-72. in: Lemke P. A. Ed., Vol 5.: Secondary metabolism and differentation in Fungi, Mycology series, Series editors: J. W. Bennett and A. Ciegler, New York and Basel. 1983.

Chaverri, P., Samuels, G.J., Stewart, E.L. 2000. Convergent evolution of *Gliocladium* morphology in *Hypocrea*. Newsletter of the Mycol. Soc. Am. Mycologia 51(supplement): 24.

Chaverri, P., Samuels, G.J., Stewart, E.L. 2001. *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. Mycologia 93. 1113-1124.

Chen, X., Romaine, C.P., Tan, Q., Schlagnhaufer, B., Ospina-Giraldo, M.D., Royse, D.J., Huff, D.R. 1999. PCR-based genotyping of epidemic and preepidemic

Trichoderma isolates associated with green mold of *Agaricus bisporus*. Appl. Env. Microbiol. 65. 2674-2678.

Chet, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil-borne plant pathogenic fungi. in: I. Chet (ed): Innovative approaches to plant disease control. John Wiley & Sons. New York.

Claydon, N., Allan, M., Hanson, J.R., Avent, A.G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 88. 503-513.

Collins, R.P., Halim, A.F. 1972. Characterisation of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. J. Agric. Food. Chem. 20. 437-438.

Corley, D.G., Miller-Wideman, M., Durley, R.C. 1994. Isolation and structure of harzianum A: a new trichotechene from *Trichoderma harzianum*. J. Nat. Prod. 57. 422-425.

Demain, A.L. 1972. Cellular and environmental factors affecting the synthesis and extraction of metabolites. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22. 345-362.

Dennis, C., Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57. 25-29.

Dennis, C., Webster, J. 1971b. Antagonistic properties of species groups of Trichoderma. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57. 41-48.

Dennis, C., Webster, J. 1971c. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Trans. Br. Mycol. Soc. 57. 363-369.

Dickinson, J.M., Hanson, J.R., Truneh, A. 1995. Metabolites of some biological control agents. Pestic. Sci. 44: 389-393.

Dingley, J.M. 1957. Life history studies in the genus *Hypocrea* Fr. Trans. R. Soc. N. Z. 84. 689-693.

Doi, N., Doi, Y. 1986. Notes on *Trichoderma* and its allies 4. A list of specific names proposed for the genus *Trichoderma*. Bulletin of the National Science Museum Series B (botany) 12. 1-15.

Doi, Y. 1967. Revision of the Hypocreales with cultural observations. III. Three species of the genus *Podostroma* with *Trichoderma* or *Trichoderma*-like conidial states. Trans. Mycol. Soc. Japan 8. 54-57.

Doi, Y. 1972. Revision of the Hypocreales with cultural observations IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan (2). Enumeration of the species. Bulletin of the National Science Museum 15. 649-751.

Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 1980. Compendium of soil fungi, Vol. 1. Academic Press, London.

Donnely, D.M.X., Sheridan, H.M. 1983. Anthraquinones from *Trichoderma polysporum*. Phytochemistry 25. 2303-2304.

Drew, S.W., Wallis, D.A. 1983. Regulation of secondary metabolism and keys to its manipulation. 35-54. Lemke P. A. Ed., Vol 5.: Secondary metabolism and differentation in Fungi, Mycology series, Series editors: J. W. Bennett and A. Ciegler, New York and Basel. 1983.

Dula Bné., Aponyiné G.I., Vajna L. 1987. A görögdinnye fuzáriumos tőhervadasa elleni biológiai védekezés *Trichoderma* antagonista gombával. Növényvédelem 23. 249-251.

Elad, Y., Hadar, Y., Chet, I., Henis, Y. 1981. Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* in carnation. Plant Disease. 65. 675-677.

Fekete C, Weszely T, 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 (3). 385-391.

Fekete C, Posta K, Hornok L. 2001. Primary structure and transcription patterns of RPL36, a ribosomal protein-encoding gene of the mycoparasitic fungus, *Trichoderma hamatum*. Curr. Genet. 39 (3).183-189.

Felsenstein, J. 1989. Phylip–Phylogeny interference package (version 3.2). Cladistics. 5. 164-166.

Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influensae*. Brit. J. Exp. Pathol 10. 226.

Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26. 75-91.

Fujita, T., Takaishi, Y., Okamura, A., Fujita, E., Fuji, K., Hratsuka, N., Komatsu, M., Arita, I. 1981. New peptide antibiotics, trichopolyns I and II, from *Trichoderma polysporum*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 585-587.

Fujita, T., Takaishi, Y., Takeda, Y., Fujiyama, T., Nishi, T. 1984. Fungal metabolites. II. Structural elucidation of minor metabolites, valinotricin, cyclonerodiol oxide, epicyclonerodiol oxide from *Trichoderma polysporum*. Chem. Pharm. Bull. 32. 4419-4425.

Fujiwara, A., Okuda, T., Masuda, S., Shiomi, Y., Miyamoto, C., Sekine, Y., Tazoe, M., Fujiwara, M. 1982. Fermentation, isolation and characterisation of isonitrile antibiotics. Agric. Biol. Chem. 46: 1803-1809.

Gams, W., Bisset, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma,* in: Cubicek C.P.- Harman G.E. (eds): *Trichoderma* and Gliocladium, Vol 1.,UK, London 278. pp.

Ghisalberti, E.L., Hockless, D.C.R., Rowland, C., White, A.H. 1992. Harziandione, a new class of diterpene from *Trichoderma harzianum*. J. Nat. Prod. 55. 1690-1694.

Godfersten, W.O., Vangedal, S. 1965. Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. Acta Chemica Scandinavica 18. 1088-1102.

Golder, W.S., Watson, T.R. 1980. Lanosterol derivatives as precursors in the biosynthesis of viridin. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 422-425.

Haraguchi, H., Hamatani, Y., Hamada, M., Fujii-Tachino, A. 1996. Effect of gliotoxin on growth and branched-chain amino acid biosynthesis in plants. Phytochemistry. 42: 645-648.

Harcz, P., Kövics, G.J., Naár, Z. 2001. Biological control against *Rhizoctonia* damping-off disease of tomato by *Trichoderma* strains. Prospects for the 3rd Millenium Agriculture International Symposium. 25-27. October 2001, Cluj-Napoca, Romania. Buletinul USAMV-CN, Sec. Horticultura 55-56/2001. 63-68.

Harris, G.H., Jones, E.T.T., Meinz, M.S., Nallin-Omstead, M., Helms, G.L., Bills, G.F., Zink, D., Wilson, K.E. 1993. Isolation and structure elucidation of viridiofungins A, B and C. Tetrahedron Lett. 34. 5235-5238.

Harman, G.E., Björkman, T. 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enchancement. in: Kubicek, C.P. and Harman, G. E. (eds): *Trichoderma* and *Gliocladium*-vol. 2. London, UK. 393 pp.

Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas in biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84: 377-392.

Hermosa, M.R., Grondona, I., Itturiaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66. 1890-1898.

Highley, T.L., Anantha Padmanabha, H.S., Howell, C.R. 1997. Control of wood decay by *Trichoderma* (*Gliocladium*) *virens*. II. Antibiosis. http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1997/highl97b.pdf

Hjeljord, T.L., Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. in: Kubicek, C.P. and Harman, G. E. (eds): *Trichoderma* and *Gliocladium*-vol. 2. London, UK. 393 pp.

Hjeljord, L.G., Stensvand, A., Tronsmo, A. 2001. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (*atroviride*) P1 against *Botrytis cinerea*. Phytopathology. 91. 1172-1180.

Howell, C.R. 1987. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens*. Phytopathology 77: 992-994.

Howell, C.R. 1999. Selective isolation from soil and separation *in vitro* P and Q strains of *Trichoderma virens* with differental media. Mycologia 91. 930-934.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87. 4-10.

Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology. 90. 248-252.

Howell, C.R., Stipanovic, R.D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. Can. J. Microbiol. 29. 321-324.

Howell, C.R., Stipanovic, R.D., Lumsden, R.D. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. Biocontrol Science and Technology 3. 435-441.

Hughes, S.J. 1958. Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. Can. J. Bot. 36. 727-836.

Hussain, S.A., Noorani, R., Qureshi, I.H. 1975. Microbiological chemistry. Part I. Isolation and characterization of gliotoxin, ergosterol, palmitic acid and

mannitol-metabolites of *Trichoderma hamatum* Bainier. Pak. J. Sci. Ind. Res. 18. 221-243.

Itoh, Y., Takahashi, S., Haneishi, T., Arai, M. 1980. Structure of heptelidic acid, a new sesquiterpene antibiotic from fungi. J. Antibiot. 33. 525-526.

Manczinger, L., Pócsi, I., Vetter, J. 2003. Gombaélettan. in: Jakucs E. és Vajna L. (szerk): Mikológia. Agroinform Kiadó. Budapest.

Jeffries, P., Young, T.W.K. 1994. Interfungal parasitic relationships. CAB International-University Press. Cambridge.

Jones, R.W., Pettit, R.E., Taber, R.A. 1984. Lignite and stillage: Carrier and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil. Phytopathology 74. 1167-1170.

Jones, R. W., Hancock, J.G. 1988. Mechanism of gliotoxin action and factors mediating gliotoxin sensitivity. J. of Gen. Microbiol. 134. 2067-2075.

Johnson, J.R., Bruce, W.F., Dutcher J.F. 1943. Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. Production, physical and biological properties. J. Amer. Chem. Soc. 65. 2005-2009.

Kattner, D. 1990. Zur pathogenität von *Trichoderma hamatum* Bain an Fichtenkeimlingen. Allgemeine Forst- und Jagdzeitung 161. 1-6.

Kikuchi, T., Mimura, T., Harimya, K., Yano, H., Arimoto, T., Masada, Y., Inoue, T. 1974. Volatile metabolite of aquatic fungi. Identification of 6-pentyl-pyrone from *Trichoderma* and *Aspergillus* species. Chem. Pharm. Bull. 22. 5439-5440.

Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G.J., Kubicek, C.P. (1998). Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA clade. Fungal Genetics and Biology 24. 298-309.

Kirby, G.W., Patrick, G. L., and Robin, D.J. 1978. Cyclo-(L-phenylalanine-L-seryl) as an intermediate in the biosynthesis of gliotoxin. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 1336-1338.

Kobayashi, M., Uehara, H., Matsunami, K., Aoki, S., Kitagawa, I. 1993. Trichoharzin, a new polyketide produced by the imperfect fungus *Trichoderma harzianum* separated from the marined sponge *Micale cecilia*. Tetraherdon Lett. 34. 7925-7928.

Koch, E. 1999. Evaluation of commercial products for microbial control of soil-borne plant diseases. Crop Protection 18. 119-125.

Komatsu, M. 1976. Studies on *Hypocrea*, *Trichoderma* and allied fungi antagonistic shiitake, *Lentinus edodes*. Reports of the Tottori Mycological Institute 13. 1-113.

Kovacs, K., Szakacs, G., Pusztahelyi, T., and Pandey, A. 2004. Production of chitinolytic enzymes with *Trichoderma longibrachiatum* IMI92027 in solid substrate fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology 118. 189-204.

Kraft, J.M., Papavizas, G.C. 1983. Use of host resistance, *Trichoderma*, and fungicides to control soilborne diseases and increase seed yields of peas. Plant Disease 67. 1234-1237.

Kredics L, Antal Z, Manczinger L. 2000. Influence of water potential on growth, enzyme secretion and in vitro enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. Curr. Microbiol. 40 (5). 310-314.

Kubicek, C.P., Eveleigh, D.E., Esterbauer, H., Steiner, W., Kubicek-Pranz, E.M. (eds) 1990. *Trichoderma reesei* cellulases: Biodiversity, genetics, physiology and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Lorito, M. 2001. Trichoderma: From genes to biocontrol. J. Plant Path. 83.(special issue) 11-23.

Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. Fungal Genet. Biol. 38 (3).310-319.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T., Kubicek, C.P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 93. 7755-7760.

Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P. 2002. Phylogeny of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. Mycol. Res. 106. 757-767.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. 17. 1244-1245.

Lewis, J.A., Fravel, D.R., Lumsden, R.D., Shasha, B.S. 1995. Application of biological control fungi in granular formations of pregelatinized stratch flour to control damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani*. Biol. Control. 5. 397-404.

Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Börner, T., Gams, W. 1998. *Trichoderma koningii*: neotypification and *Hypocrea* teleomorph. Can. J. of Bot. 76. 1507-1522.

Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Nirenberg, H.I., Petrini, O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. Appl. Env. Microbiol. 65. 2418-2428.

Lieckfeldt, E., Kullnig, C.M., Kubicek, C.P., Samuels, G.J., Börner, T. 2001. *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. Mycol. Res. 105. 313-322.

Lorito, M., Hayes, C.K., Zoina, A., Scala, F., Del Sorbo, G., Woo., S.L., Harman, G.E. 1994. Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides. Mol. Biotechnol. 2: 209-217.

Luckner, M. 1990. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin.

Lumsden, R.D., Locke, J.C. 1989. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. Phytopathology 79. 361-366.

Lumsden, R. D., Locke, J. C., Adkins, S. T., Walter, J. F., Ridout, C. J. 1992a. Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. Phytopathology 82. 230-235.

Lumsden, R.D., Ridout, C.J., Vendemia, M.E., Harrison, D.J., Wares, R.M., Walter, J.F. 1992b. Characterisation of major secondary metabolites produced in a soilless mix by a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. Can. J. Microbiol. 38. 1274-1280.

Manczinger, L., Molnár, A., Kredics, L., Antal, Zs. 2002. Production of bacteriolytic enzymes by mycoparasitic *Trichoderma* strains. World J. of Microbiol. Biotech. 18. 147-150.

Martin, J.F., Demain, A.L. 1980. Control of antibiotic synthesis. Microbiol. Rev. 44. 230-251.

Meyer, R.J., Plaskowitz, J.S. 1989. Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. Mycologia 81. 312-317.

Middleton, M. C. 1974. Effects of the mycotoxin sporidesmin on swelling and respiration of rat liver mitochondria. Biochemical Pharmacology 23. 801-810.

Moffatt, J.S., Bu'Lock, J.D., Yuen, T.H. 1969. Viridiol, a steroid like product from *Trichoderma viride*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 839.

Munaut, F., Hamaide, N., Stappen, J. van der, Maraite, H. 1998. Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. Plant Pathology 47. 641-648.

Muthumeenakshi, S., Mills, P.R., Brown, A.E., Seaby, D.A. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. Microbiology (UK) 140. 769-777.

Müllbacher, A., Waring, P., Eichner, R. 1985. Identification of an agent in culture of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity *in vivo*. J. of Gen. Microbiol. 131. 1251-1258.

Naár, Z., Kecskes, M. 1995. Antagonism of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma viride* against *Sclerotinia minor* as influenced by mancozeb, benomyl and vinclozolin. Acta Phytopath. et Entomol. Hung. 33. 123-130.

Naár, Z. 1997. Antagonista Trichodermák talajban való megtelepedését befolyásoló tényezők ökológiai értékelése. Kandidátusi értekezés, Gödöllő-Eger, 1-113.

Naár, Z., Kecskés, M. 1998a. A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotinia minor*. Mycol. Res. 150. 239-246.

Naár, Z., Kecskés, M. 1998b. Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma* species. Microb. Res. 153. 119-129.

Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., Deerfield, D.W. II. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. EMBNEW NEWS 4. 14.

Nieminen, S.M., Karki, R., Auriola, S., Toivola, M., Laatsch, H., Laatakinen, R., Hyvarinen, A., Wright, A., von 2002. Isolation and identification of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins on growth medium and some building materials. Appl. and Environ. Microbiol. 68. 4871-4875.

Nigam, P. 1994. Process selection for protein-enrichment: fermentation of the sugar industry by-products molasses and sugarbeet pulp. Process Biochemistry 29. 337-342.

Nobuhara, M., Tazima, H., Shudo, K., Itai, A., Okamoto, T., Yitaka, Y. 1976. A fungal metabolite, novel isocyano epoxide. Chem. Pharm. Bull. 24: 832-838.

Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12.357-358.

Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23: 23-54.

Park, Y., Stack, J.P., Kenerely, C.M. 1991. Production of gliotoxin by *Gliocladium virens* as a function of source and concentration of carbon and nitrogen. Mycol. Res. 95. 1242-1248.

Persoon, C.H. 1794. Neuer Versuch Einer Systematischen Eintheilung der Schwämme (Dispositio methodica fungorum). Römmer's Neues Mag. Bot. 1. 63-128.

Rechner, S.A., Samuels, G.J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Mycol. Res. 98. 625-634.

Rechner, S.A., Samuels, G.J. 1995. Molecular systematics of the *Hypocreales*: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. Can. J. Bot. 73. (suppl.) 816-823.

Reese, E.T., Mandels, M. 1989. Rolling with the times; production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. Annual Reports of Fermentative Processes 7. 1-20.

Richard, J.L., Debey, M.C., Chermette, R., Pier, A.C., Hasegawa, A., Lund, A., Bratberg, A.M., Padhye, A.A., Connole, M.D. 1994. Advances in veterinary mycology. J. Med Vet. Mycol. 32. 169-187.

Ridout, C. J., Lumsden, R. D. 1993. Polypeptides associated with gliotoxin production in the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. Phytopathology 83. 1040-1045.

Rifai, M.A., Webster, J. 1966. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. III. *H. lactea* (=*H. citrina*) and *H. pulvinata*. Trans. Br. Mycol. Soc. 49. 297-310.

Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma.* Mycological Papers. 116. 1-56.

Rifai, M.A., Krambadibrat, K., Basuki, T. 1985. The anamorph of *Sarawakus succisus*. Reinwardtia 10. 265-270.

Rightsel, W.A., Schneider, H.G., Sloan, B.J., Graf, P.R., Miller, F.A., Bartz, Q.R., Ehrlich, J., Dixon, G.J. 1964. Antiviral activity of gliotoxin and gliotoxin acetate. Nature 204. 1333-1334.

Rozsnyai, Zs.D., Hevesi, M., Klement, Z., Vajna, L. 1992. Biological control against canker and dieback diseases of apricots. Acta Phytopatho. et Entomol. Hung. 24. 551-556.

Sakai, M., Watanuki, M., 1987. Inhibitory effect of gliotoxin on platelet aggregation: importance of disulfide structure. Agric. Biol. Chem. 51: 2167-2170.

Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma:* a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100. 923-935.

Samuels, G.J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Kubicek, C.P. 1998. The *Hypocrea schweintzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. Studies in Mycology 41. 1-54.

Samuels, G.J., Pardo-Schultheiss, R., Hebbar, K.P., Lumsden, R.D., Bastos, C.N., Costa, J.C., Bezerra, J.L. 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. Mycol. Res. 104. 760-764.

Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A., Petrini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia. 94. 146-170.

Savard, M. E.;, Miller, J. D., Blais, L. A., Seifert, K. A., Samson, R. A. 1994. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50. Mycopathologia 127. 19-27.

Shah, D.T., Larsen, B. 1991. Clinical isolates of yeast produce a gliotoxin like substance. Mycopathologia 116. 203-208.

Seifert, K.A. 1985. A monograph of *Stilbella* and some allied Hyphomycetes. Stud. Mycol. 27. 1-235. pp.

Seigle-Murandi, F., Krivobok, S., Steiman, R., Marzin, D. 1990. Production, mutagenicity, and immunotoxicity of gliotoxin. J. Agric. Food Chem. 38. 1854-1856.

Simon, A., Dunlop, R.W., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K. 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. Soil Biol. Biochem. 20. 263-264.

Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*, Chapter 7. in: Kubicek, C.P. and Harman, G. E. (eds): *Trichoderma* and *Gliocladium*-vol. 2. London, UK. 393 pp.

Szekeres, A., Kredics, L., Antal, Z., Kevei, F., Manczinger, L. 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters 233: 215-222.

Szentirmai, A. 1993. Antibiotikumok kémiája és biológiája. Műegyetem Kiadó, Budapest. 160 pp.

Tamura, A., Kotani, H., Naruto, S. 1975. Trichoviridin and dermadin from *Trichoderma* sp. TK-1. J. Antibiot. 28. 161-162.

Taylor, A. 1971. The toxicology of sporidesmin and other epipolythiadioxopiperazines. 337-376. pp. in: Kadis, S., Ciegler, A., Ajl, S.J. (eds): Microbial toxins VII. Academic Press. New York,

Taylor, A. 1986. Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hypocrea* and its anamorphs, *Trichoderma* and *Gliocladium*. Proc. Nova Scootia Inst. Sci. 36. 27-58.

The Merck Index, Tenth Edition. 1983. p. 635.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analisys tools. Nucl. Acids Res. 25: 4876-4882.

Tronsmo, A., Ystaas, J. 1980. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. Plant Disease 64. 1009.

Turner, W.B., Aldridge, D.C. 1983. Fungal metabolites II. Academic Press. London.

Turóczi Gy., Vajna L., Bratek Z. 1994. More *Trichoderma* species from Hungary. Acta Phytopath. et Entomol. Hung. 29. 259-271.

Turoczi G, Fekete C, Kerenyi Z, Nagy R, Pomazi A, Hornok L. 1996. Biological and molecular characterisation of potential biocontrol strains of *Trichoderma*. J Basic Microbiol. 36 (1). 63-72.

Turóczi Gy. 1999. Biológiai védekezés növényi kórokozókkal szemben. 15-48. in: Polgár A.L. (szerk): A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon 1999. Budapest.

Ubrizsy G. (szerk) 1952. Növénykórtan. Akadémiai Kiadó, Budapest

Ubrizsy, G., Reichart, 1958. Termesztett növényeink védelme. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 447 pp.

Ubrizsy G., Vörös, J. 1965. A biológiai védekezés lehetőségei a növénykórtanban. In: Ubrizsy G. (Ed): Növénykórtan I. kötet, pp. 154. Akadémiai Kiadó, Budapest. 1965.

Ubrizsy G., Vörös, J. 1968. Mezőgazdasági mykológia. 1-576. Akadémiai Kiadó, Budapest

Vajna L. 1983. *Trichoderma* species in Hungary. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung. 18. 291-301.

Vajna L. 1984. *Trichoderma* fajok és alkalmazásuk a növényi gombabetegségek elleni védekezésben. Növenyvédelem 20. 193-201.

Vajna L. 1987. A biológiai védekezés. 189-286. pp. in: Vajna L. (szerk): Növénypatogén gombák. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 303 pp.

Vörös, J. 1957. Fungi Imperfecti aus Ungarn. I. Sydowia, Annales Mycologici. Ser. II. 133-137.

Waring, P., Beaver, J. 1996. Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. General Pharmacology 27. 1311-1316.

Waring, P., Eichner, R.D., Tiwari-Palni, U., Mullbacher, A. 1987. Gliotoxin E : a new biologically active epipolythiodioxodiketopiperazine from *Penicillium terlikowskii*. Aust. J. Chem. 40. 991-997.

Waring, P., Newcombe, N., Edel, M., Lin, Q.H., Jiang, H., Sjaarda, A., Piva, T., Müllbacher, A. 1994. Cellular uptake and release of the immunomodulating fungal toxin gliotoxin. Toxicon 32. 491-504.

Waring, P., Sjaarda, A., Lin, Q.H. 1995. Gliotoxin inactives alcohol dehydrogenase by either covalent modification or free radical damage mediated by redox cycling. Biochem. Pharmacol. 49. 1195-1201.

Webster, J., Lomas, N. 1964. Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin ? Trans. Br. Mycol. Soc. 47. 535-549.

Webster, J., Rifai, M.A. 1968. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. IV. *Hypocrea pilulifera* sp. nov. Trans. Br. Mycol. Soc. 51. 511-514.

Weinberg, E.D. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites: Roles of trace metals. Adv. Microb. Physiol. 4. 1-44.

Weinberg, E.D. 1974. Secondary metabolism: Control by temperature and inorganic phosphate. Dev. Ind. Microb. 15. 70-81.

Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22. 837-845.

Weindling, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology 24. 1153-1179.

Weindling, R., Emerson, O.H. 1936. The isolation of a toxic substrate from the culture filtrate of *Trichoderma*. Phytopathology 26. 1086-1090.

Wenehed, V., Solyakov, A., Thylin, I., Haggblom, P., Forsby, A. 2003. Cytotoxic response of *Aspergillus fumigatus*-produced mycotoxins on growth medium, maize and commercial animal feed substrates. Food and Chemical Toxicology 41. 395-403.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in: Innis, M.A., Gelgard, D.H., Snisky, J.J., White, T.J. (eds): PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. New York.

Wiest, A., Grzegorski, D., XU, B., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J., Bodo, B., and Kenerley, C. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. The Journal of Biological Chemistry, 23: 20862-20868.

Wilhite, S.E. Straney, D.C., Lumsden, R.D. 1994. Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium* damping-off. Phytopathology 84. 816-821.

Wilhite, S. E., Straney, D. C. 1996. Timing of gliotoxin biosynthesis in the fungal biological control agent *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*) Appl. Microbiol. Biotechnol. 45. 513-518.

Wright, J.M. 1956a. Biological control of a soil-borne *Pythium* infection by seed inoculation. Plant Soil. 8: 132-140.

Wright, J.M. 1956b. The production of antibiotics in soil. III. Production of gliotoxin in wheat staw buried in soil. Ann. Appl. Biol. 44: 461-466.

Wright, J.M. 1956c. The production of antibiotics in soil. IV. Production of antibiotics in coats of seeds sown in soil. Ann. Appl. Biol. 44: 561-566.

Yamamoto, I., Hemmi, S., Yamano, T., 1969. Sesquiterpenoid antibiotics from moulds. Takeda Kenkyusho Nempo 69-75. (Chem. Abstr. 1970, 72: 76058.)

Zimand, G., Valinsky, L., Elad, Y., Chet, I., Manulis, S. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. Mycol. Res. 98. 531-534.

ÁBRÁK, TÁBLÁZATOK ÉS KÉPEK JEGYZÉKE

Old.

1. táblázat: Néhány példa növényi kórokozók ellen alkalmazható trichodermákat tartalmazó készítményekre a világban 5
2. táblázat: *Trichoderma* fajok által termelt legfontosabb, az antibiózisban is szerepet játszó vegyületek a kémiai tulajdonságaik alapján csoportosítva 15
1. ábra: A gliotoxin molekula szerkezeti képlete 17
3. táblázat: A gliotoxin néhány kémiai jellemzője 18
4. táblázat: Az MUCL/BCCM vizsgálatba vont izolátumainak listája az izolátumok eredetével 25
2. ábra: DNS marker a bázispárméretekkel 31
3. ábra: A HPLC rendszer beállítása után tapasztalt retenciós idő (5,72 min), és a 270 nm hullámhossznál tapasztalt abszorpciós optimum 39
4. ábra: A konfrontációs kísérlet vázlata (T= *Trichoderma* törzs, R= *Rhizoctonia solani*) 40
5. ábra A-B: Az A-01(A) és az A-04 (B) primerek amplifikációja során kapott mintázat az RAPD analízis során. 48
6. ábra C-D: Az A-10(C) és az A-17(D) primerek amplifikációja során kapott mintázat az RAPD analízis során. 49
5. táblázat: A gélmintázat alapján összesített polimorfikus sávok jelenléte, illetve hiánya a tesztelt törzsek esetében 50
7. ábra: RAPD analízis genetikai távolságmátrix a hasonlósági koefficiens értékekkel 50
8. ábra: A szekvenáláshoz kivont, felszaporított és tisztított DNS gélfotója 52
9. ábra: Filogenetikai analízis az ITS1 és ITS2 szekvenciák alapján (filogram). 53
6. táblázat: A táplevesek hatása a *Trichoderma* törzsek növekedésére és a gliotoxin-termelés szintjére 25°C-on, 62 és 86 órás inkubációs időszakban 57
7. táblázat: A rangkorrelációs vizsgálat (Wilcoxon Signed Rank) eredménytáblázata. 57
12. ábra: Kilenc gliotoxintermelő *T. virens* törzs gliotoxin termelésének kinetikája maláta táplevesben. 60
13. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 8445 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben. 61
14. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 14058 *Trichoderma virens* törzs esetébemaláta táplevesben. 62
15. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 18139 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben. 63
16. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 19014 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben. 64
17. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 29415 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben. 65
18. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 34687 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben. 66
19. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM™/MUCL 44898 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben. 67

20. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM^{TM}/MUCL 44899 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben. 68
21. ábra: Szárazanyag-termelés (●), a fermentlé pH-ja (▲), az összes (■) és a fajlagos (▼) gliotoxin termelésének kinetikája a BCCM^{TM}/MUCL 44922 *Trichoderma virens* törzs esetében maláta táplevesben. 69
8. táblázat: A *Rhizoctonia solani* telep sugárirányú növekedésének (mm) egytényezős varianciaianalízis eredményei, a mérési időpontonkénti felbontásban 72
9. táblázat: A *Rhizoctonia solani* telep sugárirányú növekedésének (mm) egytényezős varianciaianalízis eredményei, a szembeoltott *T. virens* törzsenkénti felbontásban. 73
1. kép: *Trichoderma virens* MUCL 8445 101
2. kép: *Trichoderma virens* MUCL 14058 101
3. kép: *Trichoderma virens* MUCL 18139 102
4. kép: *Trichoderma virens* ATCC 9645; MUCL 19014 102
5. kép: *Trichoderma virens* MUCL 29415 103
6. kép: *Trichoderma virens* MUCL 34687 103
7. kép: *Trichoderma virens* MUCL 41468 104
8. kép: *Trichoderma virens* D/090; MUCL 44898 104
9. kép: *Trichoderma virens* I-7; EGR-55; D/121; MUCL 44899 105
10. kép: *Trichoderma virens* D/128; MUCL 44922 105

MELLÉKLETEK

M1.

Folyékony táptalaj, gliotoxin termelésre optimalizálva Park és munkatársai által (1991)

25 g glükóz
5.0 g fenilalanin
2.0 g KH_2PO_4
1.0 g
0.01 g
1 liter desztillált víz, a pH 3.5-re beállítva 25%-os foszforsav felhasználásával

---

Folyékony maláta tápleves (2%)

maláta kivonat 10g
desztillált víz 500ml

<u>*Trichoderma*-szelektív táptalaj (Askew és Laing, 1993)</u>

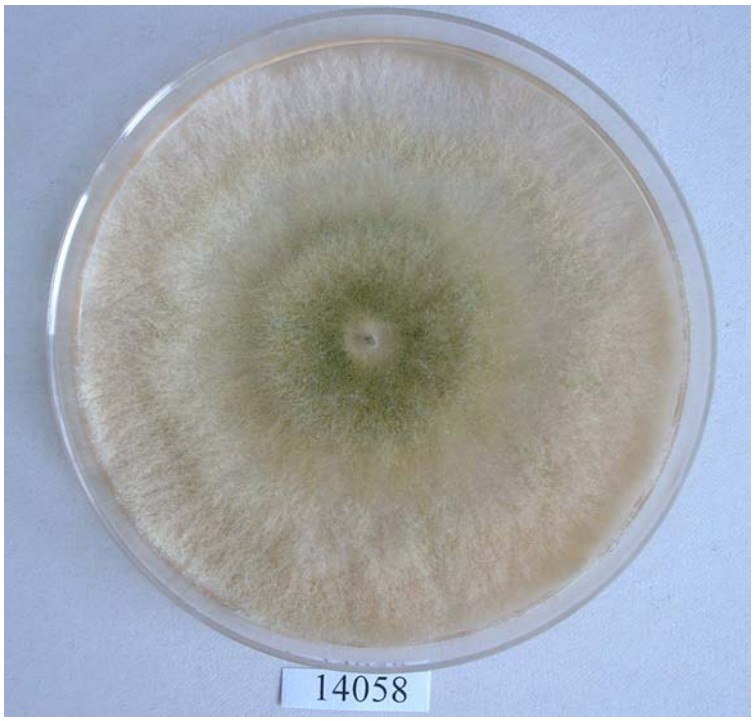
3 g glükóz
0,2 g MgSO4×7H2O
0,9 g K2HPO4
0,15 g KCl
1 g NH4NO3
0,15 g bengálrózsa
20 g agar
950 ml desztillált víz

<u>Szelektív komponensek:</u>

0,25 g kloramfenikol
0,2 g PCNB
0,2 g kaptán
1,2 ml propanokarb (vagy 1,6 mg metalaxyl)

M2

1. kép: ***Trichoderma virens*** **MUCL 8445**



2. kép: ***Trichoderma virens*** **MUCL 14058**

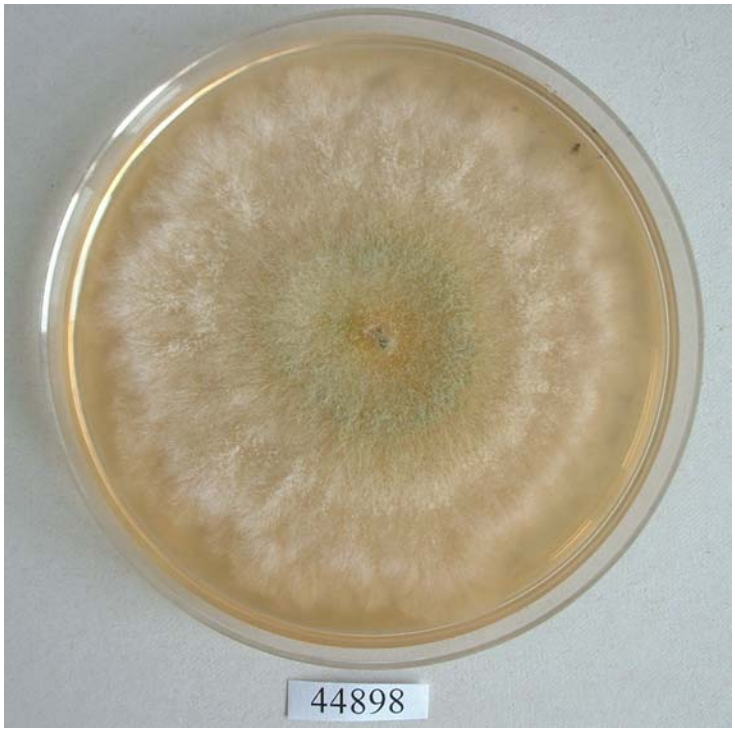
3. kép: ***Trichoderma virens*** **MUCL 18139**

4. kép: ***Trichoderma virens*** **ATCC 9645; MUCL 19014**

5. kép: ***Trichoderma virens*** **MUCL 29415**

6. kép: ***Trichoderma virens*** **MUCL 34687**

7. kép: ***Trichoderma virens*** **MUCL 41468**



8. kép: ***Trichoderma virens*** **D/090; MUCL 44898**

9. kép: ***Trichoderma virens*** **I-7; EGR-55; D/121; MUCL 44899**

10. kép: ***Trichoderma virens*** **D/128; MUCL 44922**

M3.

A molekuláris biológiai vizsgálatok során használt anyagok, eszközök illetve az oldatok összetétele

Fenol/kloroformos módszerrel történő sejtfeltárás és genomi DNS kivonás, illetve az ezt követő RAPD PCR során felhasznált anyagok, oldatok

a) **Eszközök:** 1,5 ml-es Eppendorf csövek, automatikus pipetták (50-200 µl, 200-1000 µl), steril Pasteur pipetták

b)

Anyagok
Fenol pH 7,9
izoamilalkohol
Kloroform (Sigma)
100 % etanol
EDTA
Na-dodecil-szulfát (SDS) 10%
β-merkapto etanol
sósav
NaOH
H_2O (MilliQ rendszer)

c)

Berendezések
Hűtött Eppendorf Centrifuga 5415R
Speed Vac SC 110 Savant
BT 100 blokktermosztát, Kleinfeld Labortechnik

Kivonópuffer:

Lízispuffer	Törzsoldat
50 mM Tris-HCl	5 ml 1M Tris-HCl
50 mM Na_2EDTA	10 ml 0,5 M Na2EDTA
3 % SDS	30 ml SDS 10 %
H_2O	55 ml H_2O
1% β-mercapto-etanol (100 µl 10 ml pufferba, a felhasználáskor)	

Tris-H_2O pH 7,2 beállítása HCl-val; EDTA pH 8 beállítva NaOH-dal, szemcsés

Az izolált genomi DNS tisztítása „GENECLEAN III Kit”-tel

d) **Eszközök:** a pontban leírtakkal megegyezik

e)

Anyagok
Geneclean III Kit (BIO 101 Systems (Q.BIOgene)): üveggyöngyök (glassmilk), New Wash buffer
Abszolút etanol
NaI
H2O (milliQ rendszer)

f)

Berendezések

5417C Eppendorf centrifuga

g) <u>A mosópuffer (New Wash Buffer) előkészítése:</u>

500 ml-es DURAN hőálló üvegedényben 280 ml sterilizált MilliQ rendeszerű vízhez adtunk310 ml tömény etanolt, majd ezt követően 14 ml-t a kit New Wash Buffer –ből. A kész oldatot 4°C-on tároltuk.

Az agaróz gélelektroforézis során felhasznált anyagok, oldatok

h)

<u>TBE futtatópuffer (10x)</u>
Tris-bázis
Bórsav (Gibco)
EDTA (dinátrium só) (Gibco)
pH 8,3; 121°C-on, 20 percig autoklávozva

<u>Töltőpuffer</u> (Maniatis *et al.*, 1982)
Brómfenolkék (Sigma)
Glicerin (Reanal)
Agaróz (Gibco)
Etídium-bromid (Sigma)

<u>DNS marker</u>
GeneRuler DNA Ladder Mix ready-to-use #SM0338

M4.

A molekuláris biológiai vizsgálatok során használt anyagok, eszközök illetve az oldatok összetétele

Sejtek feltárása és a genomi DNS kivonása „Dneasy Plant Mini kit”-tel, illetve az ezt követő PCR reakció és szekvenálás során használt eszközök és anyagok.

a) **Eszközök:** 1,5 ml-es Eppendorf tubusok, automatikus pipetták (50-200 µl, 200-1000 µl), QIAShredder oszlopok (2ml), MagNa Lyser sejtfeltáró berendezés (Roche), Microcon YM-100 szűrő

b)

Anyagok:
Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen)
Feltáró steril kerámiagolyócskák „Green Beads” (Roche)

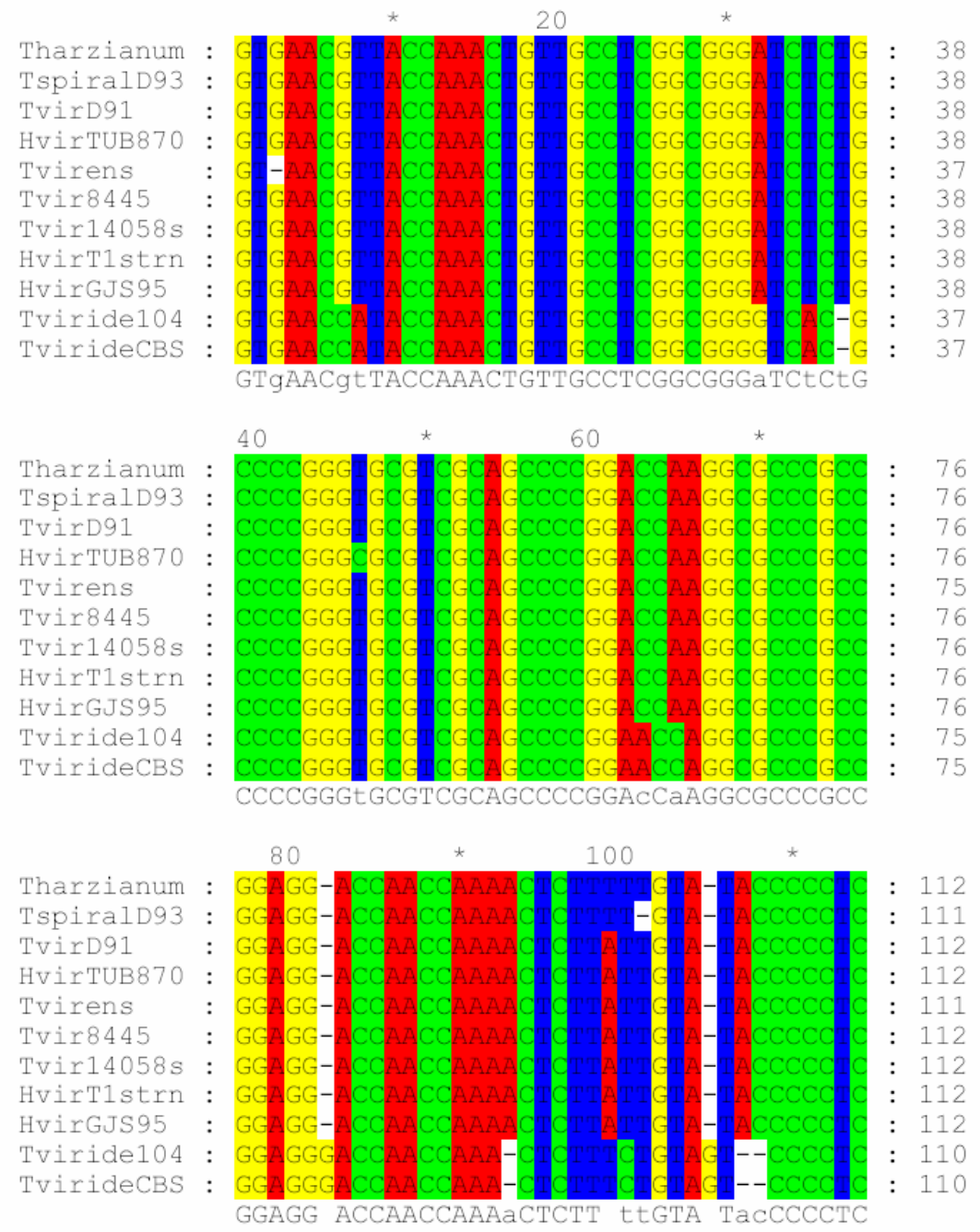
AP1 (lízis) puffer
AP2 puffer (detergens)
AP3/E puffer
AW (mosó) puffer

Szekvenálás:

Pfu DNS polimeráz puffer (Promega)
dNTP (Fermentas)
LR1 primer (5’-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3’)
SR6R primer (5’-AAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3’)
Pfu polimeráz puffer

M5.

A gliotoxintermelő vizsgálatban résztvevő 3 reprezentatív *T. virens* törzs (TvirD91, Tvir8445, Tvir14058), továbbá az NCBI szekvenciagyűjteményéből származó *T. virens* (Tvirens, HvirT1strn, HvirTUB870, HvirGJS95) *T. harzianum* (Tharzianum), *T. spirale* (TspiralD93), *T. viride* (Tviride104, TvirideCBS) törzsek ITS szekvenciáinak megfeleltetése (alignment).



```
                 120         *       140         *
Tharzianum  : GCGGG----TTTTTTA-TAA-TCTGAGCC----TTCTC : 140
TspiralD93  : GCGGG----TTTTT-A-TA--TCTGAGCC----ATCTC : 137
TvirD91     : GCGGG----TTTTTTACTA--TCTGAGCC----ATCTC : 140
HvirTUB870  : GCGGG----TTTTTTACTA--TCTGAGCC----ATCTC : 140
Tvirens     : GCGGG----TTTTTTACTA--TCTGAGCC----ATCTC : 139
Tvir8445    : GCGGG----TTTTTTACTA--TCTGAGCC----ATCTC : 140
Tvir14058s  : GCGGG----TTTTTTACTA--TCTGAGCC----ATCTC : 140
HvirT1strn  : GCGGG----TTTTTTACTA--TCTGAGCC----ATCTC : 140
HvirGJS95   : GCGGG----TTTTTTACTA--TCTGAGCC----ATCTC : 140
Tviride104  : GCGGACGTTATTTTTAC-AGCTCTGAGCAAAAATTC-- : 145
TvirideCBS  : GCGGACGTTATTTTTAC-AGCTCTGAGCAAAAATTC-- : 145
              GCGGg     tTTTTtActA  TCTGAGCc     TCtc

                  160         *       180         *
Tharzianum  : GGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 178
TspiralD93  : GGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 175
TvirD91     : GGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 178
HvirTUB870  : GGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 178
Tvirens     : GGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 177
Tvir8445    : GGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 178
Tvir14058s  : GGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 178
HvirT1strn  : GGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 178
HvirGJS95   : GGCGCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACT : 178
Tviride104  : ----------------------AAAATGAATCAAAACT : 161
TvirideCBS  : ----------------------AAAATGAATCAAAACT : 161
              ggcgcc ctcgt ggcgtttcgAAAATGAATCAAAACT

                 200         *       220
Tharzianum  : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 204
TspiralD93  : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 201
TvirD91     : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 204
HvirTUB870  : TTCAACAACGGATCTCTTGGTTATGCTCTTGGTTCTGG : 216
Tvirens     : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 203
Tvir8445    : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 204
Tvir14058s  : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 204
HvirT1strn  : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 204
HvirGJS95   : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 204
Tviride104  : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 187
TvirideCBS  : TTCAACAACGGATCTCTTGGTT------------CTGG : 187
              TTCAACAACGGATCTCTTGGTT            CTGG
```

```
                 *        240         *        260
Tharzianum  : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 242
TspiralD93  : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 239
TvirD91     : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 242
HvirTUB870  : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 254
Tvirens     : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 241
Tvir8445    : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 242
Tvir14058s  : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 242
HvirT1strn  : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 242
HvirGJS95   : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 242
Tviride104  : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 225
TvirideCBS  : CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT : 225
              CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT

                   *        280         *        300
Tharzianum  : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 280
TspiralD93  : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 277
TvirD91     : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 280
HvirTUB870  : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 292
Tvirens     : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 279
Tvir8445    : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 280
Tvir14058s  : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 280
HvirT1strn  : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 280
HvirGJS95   : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 280
Tviride104  : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 263
TvirideCBS  : GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG : 263
              GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG

                     *        320         *        340
Tharzianum  : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 318
TspiralD93  : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 315
TvirD91     : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 318
HvirTUB870  : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 330
Tvirens     : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 317
Tvir8445    : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 318
Tvir14058s  : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 318
HvirT1strn  : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG-CGGGCATGCCTGT : 317
HvirGJS95   : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 318
Tviride104  : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 301
TvirideCBS  : CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT : 301
              CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGgCGGGCATGCCTGT
```

```
                          *         360
Tharzianum  : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 338
TspiralD93  : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 335
TvirD91     : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 338
HvirTUB870  : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 350
Tvirens     : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 337
Tvir8445    : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 338
Tvir14058s  : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 338
HvirT1strn  : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 337
HvirGJS95   : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 338
Tviride104  : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 321
TvirideCBS  : CCGAGCGTCATTTCAACCCT : 321
              CCGAGCGTCATTTCAACCCT
```