

**MEZŐGAZDASÁGI ÉS KLINIKAI SZEMPONTBÓL JELENTŐS *TRICHODERMA*
FAJOK TAXONÓMIAI ÉS ÖKOFIZIOLÓGIAI VIZSGÁLATA, MOLEKULÁRIS
DIAGNOSZTIKÁJUK LEHETŐSÉGEI**

HABILITÁCIÓ TÉZISEI

DR. KREDICS LÁSZLÓ



Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar

2009

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	2
1.1. A Trichoderma nemzetség taxonómiája	2
1.2. A Trichoderma nemzetség jelentősége	3
1.2.1. A Trichoderma nemzetség ipari jelentősége	4
1.2.2. Trichoderma fajok a biológiai növényvédelemben	4
1.2.3. Trichoderma fajok kártétele a gombatermesztésben	5
1.2.4. A Trichoderma nemzetség klinikai jelentősége	7
1.3. Trichoderma törzsek ökofiziológiai tulajdonságai	7
2. CÉLKITŰZÉSEK	10
3. A KÍSÉRLETEK KIVITELEZÉSE	11
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	11
4.1. Trichoderma törzsek izolálása és azonosítása, biodiverzitásuk felmérése	11
4.1.1. Búza, illetve rizs termesztésébe bevont mezőgazdasági területekről izolált törzsek azonosítása, biodiverzitásuk felmérése	14
4.1.2. Csiperke, illetve laskagomba termesztésére alkalmazott alapanyagokból izolált törzsek azonosítása, biodiverzitásuk felmérése	16
4.1.3. Klinikai mintákból izolált törzsek azonosítása, biodiverzitásuk felmérése	17
4.2. Különböző élőhelyekről származó Trichoderma törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése	19
4.2.1. Mezőgazdasági területekről izolált törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése	19
4.2.2. Gombatermesztési alapanyagból izolált törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése	20
4.2.3. Klinikai mintákból izolált törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése	21
4.3. Gyakorlati szempontból jelentős Trichoderma törzsek/fajok diagnosztikai kimutatásának, nyomonkövetésének lehetőségei	23
4.3.1. Egy, a biológiai növényvédelemben potenciálisan felhasználható T. harzianum törzs nyomonkövetését lehetővé tévő, törzsspecifikus monitoring rendszer kidolgozása	23
4.3.2. A laskagomba zöldpenészes megbetegedését okozó Trichoderma fajok specifikus kimutatására alkalmas molekuláris diagnosztikai módszer kidolgozása	24
4.3.3. Klinikai szempontból jelentős Trichoderma fajok diagnosztikai kimutatásának lehetőségei	27
5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	28
6. IRODALOMJEGYZÉK	30
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37

1. BEVEZETÉS

1.1. A *Trichoderma* nemzetség taxonómiája

A mezőgazdasági és ipari szempontból egyaránt jelentős mikroorganizmusok közé tartoznak a *Trichoderma* fonalgomba-nemzetség tagjai. E mikroszkópikus fonalgombák teleomorfiáik alakjai az *Ascomycota* törzs *Pezizomycotina* altörzse, Sordariomycetes osztályának *Hypocreales* rendjén belül a *Hypocreaceae* családba tartoznak. A *Hypocrea* fajok heterotallikusak, a szexuális folyamathoz két párosodási típus szükséges. Anamorfiáikat, melyeknél az ivaros szakasz hiányzik, a *Hypocreaceae* családon belül elkülönített, mitospórás *Hypocreaceae* egységbe sorolják. A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó törzsek rendszerint gyors növekedésűek, telepeik zöld, fehér vagy barnás színűek. Kitartó- illetve szaporítóképleteik a végálló, vagy közbülső helyzetű sejtekből képződő klamidospórák, valamint az erősen elágazó konídiumtartók végén elhelyezkedő fialidok által lefűzött konídiospórák, melyek színtelenek, sárgászöldek vagy zöldek lehetnek.

Annak ellenére, hogy a *Trichoderma* nemzetséget már 1794-ben leírták (Persoon 1794), a nemzetség taxonómiája és tagjainak azonosítása a mai napig nehézkes és ellentmondásokkal terhelt. 1969-ig csaknem minden *Trichoderma* törzset *T. viride*-ként azonosítottak az irodalomban, köszönhetően a Bisby (1939) által bevezetett koncepciónak, mely szerint a *Trichoderma* nemzetséget ez az egyetlen faj alkotja. Rifai (1969) vizsgálatai hozták meg az áttörést, aki bevezette a nemzetség taxonómiájába a „fajaggregátumok” koncepcióját és 9 fajcsoportot különített el. Már Rifai is valószínűsítette, hogy számos aggregátum – különösen a *T. hamatum* - tartalmazhat több, morfológiailag nehezen elkülöníthető fajt. Bissett munkássága során átdolgozta a folytonos morfológiai jellegek kis különbségeinek felismerésén alapuló Rifai rendszert (Bissett, 1984; 1991a, b,c, 1992; Gams és Bissett, 1998), kiterjesztve más *Hypocrea* anamorfokra és a korábbi *Gliocladium* fajokra. Bizonyos Rifai fajaggregátumok azonban elég helyállóknak bizonyultak az elemzések során, ezért Bissett (1991a) a nemzetség szekciókra (*Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Hypocreanum*) történő felosztását javasolta.

A molekuláris technikák elterjedésével a gombák rendszertana is jelentős változásokon ment keresztül, melynek látható jelei a 90-es évek közepén mutatkoztak meg a *Trichoderma* nemzetség taxonómiájában. Megtörtént a Bissett-féle *Longibrachiatum* szekció revíziója az ITS (internal transcribed spacer) szekvenciák analízisével és RAPD- (random amplified polymorphic DNA), valamint izoenzim-mintázatok segítségével (Kuhls és mtsai. 1996, 1999; Samuels 1996; Samuels és mtsai. 1998; Turner és mtsai. 1997). A munkák során a szekció monofiletikusnak bizonyult és első ízben igazoltak néhány konkrét anamorf-teleomorf kapcsolatot (*H. schweinitzii*/*T. citrinoviride*; *H. pseudokoningii*/*T. pseudokoningii*; *H. jecorinal*/*T. reesei*). A szekcióhoz csatolták a két fajt (*T. saturnisporum* és *T. ghanense*; Doi és mtsai. 1987) tartalmazó korábbi *Saturnisporum* szekciót is, és az is kiderült, hogy a *T. ghanense* és a *T. parceramosum* azonos fajok.

A *Longibrachiatum* szekció azonban csak egy kis szelete a nemzetségnek, a legkisebb szekció, mely filogenetikailag a legtávolabb helyezkedik el a többi szekciótól. Kindermann és mtsai. (1998) tettek először kísérletet a teljes nemzetség molekuláris filogenetikai elemzésére az ITS 1 szekvenciák alapján, és azt tapasztalták, hogy a legnagyobb szekció, a *Pachybasium* parafiletikus, és két nagy csoportra ágazik. A filogenetikai vizsgálatok ma már több gén együttes elemzésén alapulnak (Kullnig-Gradinger és mtsai. 2002; Chaverri és mtsai. 2003), ennek köszönhetően új molekuláris filogenetikai kapcsolatokra derült fény. Bebizonyosodott például, hogy a *T. hamatum* nem tagja a Bissett féle *Pachybasium* kládnak, hanem egy csoportban van a *T. pubescens* és a *T. strigosum* fajokkal és egy klaszterben helyezkedik el más *Trichoderma* szekcióbeli fajokkal is.

A konkrét morfológiai különbségek hiányában a *Pachybasium* A és B elnevezés továbbra is használatban maradt. Problémás továbbá a *Pachybasium* B szekció fajainak (pl. *T. harzianum*) taxonómiai elemzése, nagyon nagy molekuláris szintű genetikai variabilitásuk ugyanis azt sugallja, hogy egy-egy mai fajnév több további fajt is takarhat, annak ellenére, hogy határozott morfológiai különbségek nem mutathatók ki közöttük (Kullnig és mtsai. 2000; Kubicek és mtsai. 2003; Wuczkowski és mtsai. 2003; Gherbawy és mtsai. 2004; Druzhinina és mtsai. 2005; Druzhinina és Kubicek, 2005). Így szükséges lenne az eredeti morfológiai fajfogalom módosítására és a Taylor és mtsai. (2000) által bevezetett, a filogenetikai leszármazással összhangban lévő fajfogalom (GCPSR: Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition) adaptálására a nemzetség taxonómiájában (Druzhinina és Kubicek, 2005). Ehhez több független gén analízisére van szükség. Druzhinina és Kubicek (2005) a GenBank internetes adatbázisában fellelhető különböző DNS-szakaszok szekvenciáinak részletes vizsgálata után arra következtetett, hogy a *tef1* (transzlációs elongáció faktor $1-\alpha$) nagy intronja és utolsó nagy exonja, az *rpb2* (RNS polimeráz B alegység 2) gén, a *chi18-5* (korábban *ech42*, 42 kD méretű endokitináz) utolsó nagy exonja és az ITS 1 és 2 szekvenciák együttes vizsgálata megbízható filogenetikai eredményre vezethet. Közleményükben jelent meg a nemzetség jelenleg elfogadott legújabb felosztása is, mely 49 *Hypocrea*, 25 *Trichoderma* és 14 anamorf-telemorf párosított taxont tartalmaz 3 szekcióba és 14 kládba rendezve (*Longibrachiatum*; *Trichoderma*: *Rufa*, *Pachybasium* A; *Pachybasium* B: *Pachybasioides*, *Hypocreanum*, *Chlorospora*, *Lixii/catoptron*, *Virens*, *Semiorbis*, *Strictipilis*, *Stromatica*, *Ceramica*, *Lutea*, *Psychrophila*, „*Lone lineages*”).

Annak ellenére, hogy a filogenetikai elemzések ilyen komplex molekuláris háttér munkát kívánnak, az egyes fajok azonosítása viszonylag egyszerűen kivitelezhető az ITS 1 és 2 régiók szekvenciájának elemzésével. Ezek a szekvenciák nagy számban (90 kópia) fordulnak elő a genomban és könnyen amplifikálhatók (Druzhinina és Kubicek, 2005). Druzhinina és mtsai. (2005) az ITS 1 és 2 szekvenciák diagnosztikus oligonukleotid szekvenciáriszerein alapuló „vonalkód”-módszert vezetett be, melynek internetes felülete *TrichOkey* 2.0 néven szabadon hozzáférhető (www.isth.info) és nagyban megkönnyíti az egyes izolátumok azonosítását. (A *TrichOkey* 2.0 először 5 nemzetség-specifikus szekvenciaelemet, ún. „horgonyt” keres a beküldött szekvenciában. Ezek megtalálása esetén a szekvenciának megfelelő fajt a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fajként azonosítja, majd fajspecifikus szekvenciák keresésével folytatja az elemzést.) A program széles háttér adatbázisa alapján a 77 *Hypocrea* és *Trichoderma* fajból hetvenet nagy biztonsággal képes azonosítani.

1.2. A *Trichoderma* nemzetség jelentősége

A *Trichoderma* nemzetség képviselői széles körben elterjedt, talajlakó imperfekt penészgombák, csaknem minden szerves anyagot tartalmazó talajban és természetes élőhelyen megtalálhatók, és az élő szervezetek hulladékanyagainak lebontásával részt vesznek a biogén elemek körforgalmában. Ipari és mezőgazdasági szempontból egyaránt kiemelkedő jelentőségű mikroszkopikus szervezetek: az iparban elsősorban kiváló cellulózbontó képességük miatt alkalmazzák őket (Kubicek 1992; Kubicek és Penttilä, 1998), mezőgazdasági szempontból pedig egyfelől a növénykórokozó gombák elleni biológiai védekezés céljaira történő felhasználásuk érdemel kiemelt figyelmet (Herrera-Estrella és Chet, 2003), másfelől az étkezési gombák termesztésében súlyos gazdasági károkat okozó „zöldpenész” tünetegyüttes kialakulásáért felelősek (Seaby 1998; Hatvani és mtsai. 2008a, Kredics és mtsai. 2009b). Az orvosi szakirodalomban pedig,

bár kis számban, de napvilágot láttak *Trichoderma* által okozott fertőzésekről szóló tudósítások is (Kredics és mtsai. 2003a).

1.2.1. A *Trichoderma* nemzetség ipari jelentősége

Ipari szempontból jelentős a *Trichoderma* fajok cellulózbontó képessége. A *T. reesei* olyan enzimkomplexet termel, mely még a kristályos állapotú cellulózt is képes lebontani glükózig (Kubicek és Penttilä, 1998). Ez a tulajdonsága felhasználható cellulóztartalmú anyagok hasznosítására. Ipari méretekben termeltetett xilanázait felhasználják az élelmiszer-, és a papíripar, valamint a takarmányozás területén (Haltrich és mtsai. 1996). Molekuláris biológiai kutatásokban a *Trichoderma* enzimeket tartalmazó Novozyme 234 készítményt protoplasztok előállítására alkalmazzák.

1.2.2. *Trichoderma* fajok a biológiai növényvédelemben

A *Trichoderma* nemzetség képviselőinek neve sokszor merül fel növénypatogén gombákkal szembeni antagonizmusuk révén is. Egyes *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimeik segítségével képesek más gombák sejtfalát feloldani (Sivan és Chet, 1989). Különböző fonalagombákat tudnak ezáltal parazitálni, köztük növénypatogén *Fusarium* (Sivan és Chet, 1993), *Pythium* (Naseby és mtsai. 2000), *Rhizoctonia* (Lewis és Larkin, 1997), *Botrytis* (Elad 2000) és *Sclerotinia* (Elad 2000; Naár és Kecskés, 1995) fajokat. Számos faj termel különböző típusú antibiotikumokat (Sivasithamparam és Ghisalberti, 1998; Szekeres és mtsai. 2005a), melyek extracelluláris enzimekkel szinergizáló hatása a mikoparazitizmus során már bizonyított. Az antagonizmus hátterében álló mechanizmusok közül feltétlenül meg kell említeni a növénypatogén gombákkal szembeni hatékony kompetíciós képességeket is. Az élőhelyen fellelhető szénforrásokért extracelluláris enzimek (pl. cellulázok, xilanázok) segítségével folytatott kompetíció mellett a hatékony biokontroll képesség hátterében a mikroelemekért folytatott kompetíció jelentősége is feltételezett. A jó biokontroll képességekkel rendelkező *T. atroviride* és *T. virens* fajok teljes genomszekvenciájának annotációja, és a gyenge biokontroll képességekkel rendelkező *T. reesei* genomjával történő összehasonlítása során fényt derült pl. arra, hogy a *T. atroviride* és a *T. virens* a *T. reesei*-nél sokkal nagyobb, a vas felvételéért felelős génkészlettel (vas-reduktázok, vas-transzporterek, sziderofór-transzporterek) rendelkezik (Kubicek, Kredics, Antal és mtsai. nem publikált adatok). A jó biokontroll képességekkel rendelkező *Trichoderma* törzsek gyors kolonizációra képesek a rizoszférában, emellett hatékony biofertilizációon keresztül segítik a növények növekedését, valamint stimulálják a növények védekezési reakcióit (Harman és mtsai. 2004). Az így kialakult rezisztencia az indukciótól számítva akár több hónapig is fennmaradhat.

A *T. virens*, *T. harzianum* és *T. atroviride* fajok az említett előnyös tulajdonságaik révén kiválóan alkalmasak arra, hogy belőlük a növénypatogén gombák elleni biológiai védekezésben felhasználható biofungicid törzseket állítsunk elő (Papavizas 1985; Benítez és mtsai. 2004; Manczinger és mtsai. 2002). A folyamat része az ígéretes törzsek izolálása, ökofiziológiai tulajdonságaik feltérképezése és az egyes törzsek nemesítése.

A *Trichoderma*-alapú biokontroll készítményekkel szemben alapvető elvárás a megfelelő hatékonyság. Amennyiben a biológiai védekezés céljára szelektált kiindulási törzs nem felel meg ennek az elvárásnak, a probléma megoldását fokozott biokontroll aktivitású *Trichoderma* törzsek nemesítése jelentheti (Manczinger és mtsai. 2002). Hatékonyabbak lehetnek azok a nemesített vonalak, amelyek nem igényelnek olyan hosszú indukciós folyamatot a lebontó enzimek termeléséhez, mint a kiindulási törzsek, vagy amelyek

nagyobb mennyiségben, és lehetőség szerint konstitutívan termelik a mikoparazitizmusban szerepet játszó β -1,3-glukanázt, kitináz és proteáz enzimszerek bizonyos összetevőit. A nemesítési munkák másik fő célja a fungicidrezisztencia kialakítása vagy fokozása az egyes törzsekben, amely lehetőséget biztosíthat a talajban a már korábbi vegyszeres kezelések során visszamaradt esetleges fungicid szermaradványok toleranciájára, vagy éppen a törzsek fungicidekkel történő együttes alkalmazására az integrált növényvédelem keretein belül. Az antagonista *Trichoderma* törzsek nemesítési lehetőségeiről Manczinger és mtsai. (2002) nyújtanak áttekintést. A transzformáció lehetőséget biztosít az adott sajátságért felelős gének közvetlen sejtbejuttatására, ehhez azonban használható transzformációs rendszerekre van szükség. Az irodalomban egyaránt találunk adatokat *Trichoderma* gének, pl. kitinázok, endoglukanázok, β -glükoronidáz és proteázok klónozásáról és transzformációjáról, és heterológ gének expressziójáról is (Manczinger és mtsai. 2002; Karaffa és mtsai. 2006). A protoplaszt-fúzió az ígéretes törzsek kedvező tulajdonságainak kombinálását teszi lehetővé, melyet sikerrel alkalmaztak *Trichoderma* törzsek nemesítése során kedvezőbb sajátságokkal rendelkező genetikai rekombinánsok létrehozására. Viszonylag kevés publikációt találhatunk a mutagenezissel történő nemesítésről. Előfordulnak közlések random izolátumok teszteléséről és fungicidrezisztens mutánsok izolálásáról, de az enzimszékreciós képességek mutagenezissel történő fokozásáról csak néhány adat áll rendelkezésre (Manczinger és mtsai. 2002), pedig a környezetvédelmi szervek az így előállított törzsek szabadföldi alkalmazását könnyebben engedélyezik, mint a protoplaszt-fúzióval vagy a transzformációval nemesített törzsekét. Szekeres és mtsai. (2004a) mutagenezissel törzsnemesítést végeztek az extracelluláris proteáz enzimeket túltermelő mutánsok előállítására céljából. Az egyes mutáns törzseket *p*-fluoro-fenilalaninnal szembeni rezisztenciára, és megváltozott telepmorfológiára szelektálták. Számos proteáztúltermelő mutáns törzs hatásos antagonista partnernek bizonyult az alkalmazott növénypatogén gombákkal szemben. A klasszikus mutagenezis és protoplaszt-fúzió módszerei kombinálhatók is egymással (Hatvani és mtsai. 2006; Besoain és mtsai. 2007).

Egy ideje már a kereskedelemben is megjelentek *Trichoderma*-tartalmú készítmények, mint például a Bio-Fungus, Binab T, RootShield, T-22G, T-22 Planter Box, Bio-Trek, Promote, Supresivit, Trichodex, Trichopel, Trichoject, Trichodowels, Trichoseal, és a Trichoderma 2000.

1.2.3. *Trichoderma* fajok kártétele a gombatermesztésben

Miközben a mezőgazdaságban egyre nagyobb területeken alkalmazzák a *Trichoderma*-tartalmú készítményeket, az étkezési gombák termesztésével foglalkozó gazdálkodók világszerte egyre gyakrabban szembesülnek a *Trichoderma* törzseknek tulajdonítható, úgynevezett „zöldpenész” tünetegyüttesével (Castle és mtsai. 1998; Mumpuni és mtsai. 1998; Hatvani és mtsai. 2008b). A zöldpenész problémája abból adódik, hogy a penészgomba tápanyagként hasznosítja a gombatermesztésre alkalmazott alapanyagot, így versenyhelyzetbe kerül a termesztett gombával, és képes azt kiszorítani (1. ábra). A kártevő gomba megtelepedése esetén a termesztőnek folyamatos fertőzési forrással kell szembenéznie, a penészspórák ugyanis kifejezetten hatékonyan képesek terjedni az esetleges higiéniai hiányosságok következtében a levegő vagy a ruházat útján.

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó penészgombák régebben is okoztak kisebb mértékű károkat a csiperke (*Agaricus bisporus*) termesztésében, a 80-as évek közepe táján azonban új, agresszív penésztörzsek jelentek meg Írországból, Nagy-Britanniában



1. ábra. *Trichoderma* zöldpenész tünetei A) a csiperke termesztése során alkalmazott komposzton, és B) a laskagomba termesztése során alkalmazott, szalmaalapú szubsztrátumon

(Muthumeenakshi és mtsai. 1994, 1998; Hermosa és mtsai. 1999; Mamoun és mtsai. 2000) és Észak-Amerikában (Castle és mtsai. 1998; Ospina-Giraldo és mtsai. 1998, 1999). A kórokozókat a *T. harzianum* Th2 és Th4 biotípusaként azonosították (Muthumeenakshi és mtsai. 1994, 1998), de később bebizonyosodott, hogy egy új faj, a *T. aggressivum* két változata (*T. aggressivum* f. *europaeum* és *T. aggressivum* f. *aggressivum*) tehető felelőssé a csiperke zöldpenészes fertőzéséért (Samuels és mtsai. 2002). Ezt a fajt mindeztáig csak gombakomposztból sikerült izolálni, terjedési módja és a lehetséges fertőzési utak így nem ismertek.

Az elmúlt években a *Trichoderma* által okozott zöldpenész-fertőzések a laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) termesztésében is jelentkeztek (Park és mtsai. 2004; Woo és mtsai. 2004; Kredics 2008). Az első jelentős termés kiesést okozó betegséget Dél-Koreában írták le (Yu 2002). Több mint 100 laskatermesztésből származó mintát vizsgáltak meg. Kimutatták a *T. viride*, *T. harzianum* és *T. koningii* fajok előfordulását, az izolátumok többsége (65,5%) viszont egy azonosítatlan *Trichoderma* fajhoz tartozott. ITS 1 és 2 szekvenciák, random amplifikált DNS-polimorfizmusok (RAPD) és restrikciós fragmenthossz-polimorfizmusok (RFLP) alapján ezek az izolátumok a *T. harzianum*-hoz közeli, de különálló filogenetikai kládot alkottak. Olaszországban a laskagomba súlyos zöldpenészes fertőzöttségét írták le, ami a laskagombatermesztés válságához vezetett (Woo és mtsai. 2004). Az előzetes morfológiai és genetikai jellemzésből nyert adatok arra utaltak, hogy a fertőző ágens a *T. harzianum* fajba tartozik.

1.2.4. A *Trichoderma* nemzetség klinikai jelentősége

Napjainkban az opportunista gombafertőzések gyakorisága egyre növekvő tendenciát mutat, ami nagyrészt a gyengült immunrendszerű betegek emelkedő számának köszönhető. Ebbe a rizikócsoporthoz tartoznak a HIV vírussal fertőzött emberek, valamint a szervátültetésen átesett páciensek, ugyanakkor egyéb tényezők, például a sebészeti beavatkozások, a citotoxikus kemoterápiák és a szélesspektrumú antibiotikumok alkalmazása szintén jelentősen növeli a gombafertőzések kialakulásának lehetőségét. Az orvosi szakirodalomban napvilágot láttak *Trichoderma* törzsek által okozott fertőzésekről szóló tudósítások, többek között máj-, csontvelő- és veseátültetéssel, valamint peritoneális dialízissel összefüggő esetek leírásai (Kredics és mtsai. 2003a). A fertőzések egy részét sikerült antimikotikumokkal kezelni, másik részük azonban halálos kimenetellel végződött. A fertőzéseket okozó törzseket a szerzők a *T. longibrachiatum*, a *T. citrinoviride*, a *T. pseudokoningii*, a *T. harzianum*, a *T. koningii* és a *T. viride* fajokba sorolták (Kredics és mtsai. 2003a). Ezzel kapcsolatban felmerül a kérdés, hogy a *Trichoderma* nemzetségen belül valóban ilyen sok faj képes-e humán fertőzéseket okozni.

1.3. *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai tulajdonságai

A modern agrártechnológiában nagy a jelentősége a jól jellemzett ökofiziológiai tulajdonságokkal rendelkező biokontroll izolátumok növényvédelemben történő alkalmazásának, velük ugyanis kiválthatóak a környezetszennyező, vegyi alapú szintetikus fungicidok, melyek mezőgazdasági alkalmazása számos szárazföldi- és vízi ökoszisztémát veszélyeztet. A biokontroll képességű *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai jellemzése során kulcsfontosságú a különböző környezeti tényezők stresszhatást kiváltó értékeivel szembeni tolerancia vizsgálata. Ilyen környezeti tényező pl. a hőmérséklet és a pH, melyek hatással lehetnek a spórácsírázásra és csíratömlő-növekedésre, a micélium-növekedésre és kompetitív képességekre, a szaprofita képességre és az extracelluláris enzimaktivitásokra (Kredics és

mtsai. 2003b). Jelentős a törzsek alkalmazhatóságának tekintetében a környezet vízviszonyainak hatása a különböző életfolyamatokra (növekedés, szaprofita képességek, toxintermelés, enzimtermelés) (Kredics és mtsai. 2000, 2003b, 2004a). A nehézfémek szintén befolyásolják a *Trichoderma* törzsek életfolyamatait (Kredics és mtsai 2001a,b, 2003b). Az abiotikus környezeti hatásokhoz sorolhatók a különböző peszticidek is, melyek *Trichoderma* törzsek általi toleranciájának vizsgálata kiemelkedő jelentőségű a növényvédőszerrel történő kombinált alkalmazás szempontjából. A peszticidek hatással lehetnek a szubsztrátum-kolonizáló képességre és magára a vitalitásra is (Kredics és mtsai. 2003b).

A *Trichoderma* nemzetség képviselőinek egyik legjelentősebb fiziológiai eszköze az összehangoltan szabályozott, egyedi enzimekből álló extracelluláris enzimrendszer, amely mind az abiotikus, mind a biotikus hatásokra adott válaszreakciókban szerepet játszik. A szekretált extracelluláris enzimek alapvető szerepet töltenek be mind a kompetíció, mind a mikoparazitizmus folyamataiban. A kompetíció ebben az esetben az élőhelyen elérhető tápanyagok minél gyorsabb energiává alakítását, míg a mikoparazitizmus a gazdaszervezetet felépítő biopolimerek hatékony enzimikus hidrolízisét és sejtbe transzportálható formába alakítását jelenti.

A *Trichoderma* cellulázokat főként ipari jelentőségük miatt tanulmányozzák intenzíven (Kubicek és mtsai. 1990). A természetben ez az enzimrendszer végzi a növényi sejtfal legelemibb összetevőjének glükózig történő lebontását. A cellulóz több lépcsőben történő fokozatos lebontását három fő enzimescsoport végzi. Az endoglukanázok véletlenszerűen hasítanak a β -1,4-glukán láncban, melynek következtében az adott enzim specificitásától függő polimerizációs fokú oligoszacharidok keletkeznek. A cellobiohidrolázok az oligoszacharidok nem-redukáló végéről cellobióz-egységeket vágnak le, melyet a β -glükozidázok hasítanak glükóz-egységekre. A cellulóztartalmú sejtfallal rendelkező Oomycota *Pythium* fajok elleni mikoparazitizmusban a *Trichoderma* törzsek cellulázai is fontos szerepet játszhatnak, elősegíthetik az antagonista bejutását a gazda hifájába (Benhamou és Chet, 1997).

A növényi hulladékanyagok legnagyobb mennyiségben jelenlevő alkotói a cellulózon kívül a hemicellulóz és a pektin. A növényi sejtfal bonyolult hemicellulóz frakciójának lebontásában a xilanáz enzimrendszer játssza a főszerepet. A *Trichoderma* fajok jelentős endo- β -1,4-xilanáz és β -xilozidáz (Antal és mtsai. 2001; Cacaís és mtsai. 2001) és acetil-xilán-észteráz (Biely és mtsai. 1997; Kremnický és mtsai. 2004) szekréciós képességgel rendelkeznek. Az arabinofuranozidázok (Nogawa és mtsai. 1999), az α -glükuronidázok (Margolles-Clark és mtsai. 1996), a β -mannanázok (Hägglund és mtsai. 2003) és a mannozidázok (Kulminkaya és mtsai. 1999) szintén részét képezik a nemzetség hemicellulózbontást végző extracelluláris enzimrendszerének.

A növényi sejtfalban szintén nagy mennyiségben jelen lévő pektin fő gerincének bontását a pektináz enzimrendszer végzi, melynek részei a különböző pektin- és pektátliázok, valamint poligalakturonázok. Mivel a pektin a cellulózzal, a ligninnel és a hemicellulózzal asszociáltan fordul elő komplex polimerhálózatot alkotva, ezért lebontásában részt vehetnek a korábban említett észterázok is. A *Trichoderma* fajok is képesek a pektin hidrolízisére, Markovič és mtsai. (1985) pektin észterázt és poligalakturonázt, míg Mohamed és mtsai. (2003) két poligalakturonáz izoenzimet tisztítottak és jellemeztek *Trichoderma reesei* törzsekből. A különböző, részlegesen hidrolizált növényi polisacharidok lebontásában, valamint a főbb szénhidrát-polimerek oldalláncainak lehasításában az előbbieket mellett részt vesznek az α - és β -D-galaktozidázok is, mely enzimek szintén képviseltetik magukat a *Trichoderma* törzsek extracelluláris enzimrendszerében (Zeilinger és mtsai. 1993; Savel'ev és mtsai. 1997; Seiboth és mtsai. 2005).

Az elhullott növényi részekben található keményítő lebontását az amiláz enzimszisztéma biztosítja, amelynek jelenléte a *Trichoderma* fajoknál is igazolt (De Azevedo és mtsai. 2000; Pacheco-Chávez és mtsai. 2004).

A *Trichoderma* nemzetség a mikoparazitizmusban mutatott aktivitását a kitináz, glukanáz és proteáz extracelluláris enzimszisztemeknek köszönheti, a lehetséges gazda Basidiomycota és Ascomycota gombák sejtfaa ugyanis főleg kitin és β -glukan fibrillumokat tartalmaz amorf fehérjehálózatba ágyazva.

Sahai és Manocha (1993) szerint a kitinbontó enzimeket három csoportra oszthatjuk: endokitinázokra, melyek internális helyeken véletlenszerűen hasítják a kitin mikrofibrillumot, s működésük nyomán kitotetraóz, kitotrióz és diacetyl-kitobióz egységek szabadulnak fel; β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázokra, melyek a kitotetraóz, kitotrióz és diacetyl-kitobióz molekulák nem redukáló végéről *N*-acetyl-glükózamin monomereket hasítanak le; valamint exokitinázokra, melyek diacetyl-kitobióz egységeket hasítanak le a kitin mikrofibrillum nem redukáló végéről. Ulhoa és Peberdy (1992) *T. harzianum*-ból tisztított és jellemzett egy extracelluláris endokitinázt és egy, a β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázok csoportjába tartozó extracelluláris kitobiázt (Ulhoa és Peberdy, 1991). Haran és mtsai. (1995) hat különböző enzimet azonosítottak: két β -1,4-*N*-acetyl-glükózaminidázt, és négy endokitinázt. Az újabb kutatások a kitináz gének biokontroll-specifikus, kaskádszerű expressziójáról számolnak be (Kubicek 2003).

A β -glukanázok szubsztátjai a glukánok, melyek β -kötéssel kapcsolódó D-glükóz egységekből felépülő homopolimerek. A β -glukanázokat működésük szerint két részre oszthatjuk. Az endo- β -glukanázok láncon belüli kötéseket hasítanak véletlenszerűen a poliszacharid gerinc mentén, míg az exo- β -glukanázok a lánca nem redukáló végéről glükóz egységeket hasítanak le. A β -glukánt hidrolizáló enzimeket a hasított kötés típusa (β -1,3-; β -1,4-; β -1,6-) alapján is csoportosíthatjuk. A *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* és *Pythium aphanidermatum* fajok sejtfaának *Trichoderma* törzsek általi lebontásában a kitinázokat és β -1,3-glukanázokat találták a legfontosabb enzimeknek (Elad és mtsai. 1982; Sivan és Chet, 1989). Az első, kizárólag glukánokat hasító *Trichoderma* β -1,3-glukanázt *T. longibrachiatum*-ból tisztították (Tangarone és mtsai. 1989). A *T. harzianum* β -1,3-glukanáz bontó rendszere laminarinnal való indukció alapján legalább hét extracelluláris enzimből áll (Vázquez-Garciduenas és mtsai. 1998). De la Cruz és mtsai. (1995) endo- β -1,6-glukanázt tisztítottak és jellemeztek, és igazolták jelentőségét a *T. harzianum* mikoparazitizmusában.

A proteázok a mikoparazitizmus folyamata során mind a korai, mind a késői penetrációs fázisban szerephez jutnak, szubsztátjaik a fonalgombák sejtfaában és citoplazmájában megtalálható fehérjék. A gazdaszervezet lízise során felszabaduló peptideket, oligopeptideket aminosavakká bontják, melyeket aztán a törzsek táplálékforrásként hasznosítanak. A preproenzimként szintetizálódott proteázok más enzimeket, valamint *Trichoderma* toxinokat is aktiválnak. A *Trichoderma* fajok extracelluláris proteázainak termelési profiljait, az eddig tisztított enzimek jellemzőit, a leírt proteázokat kódoló géneket, valamint a proteázok mikoparazitizmusban betöltött szerepét és ipari jelentőségét foglalja össze Kredics és mtsai. (2005a) rendszerező munkája.

A lipázok mikoparazitizmusban betöltött szerepét is valószínűsítik (Benhamou és Chet, 1993). Calistru és mtsai. (1997) lipolitikus aktivitásokat detektáltak *T. viride* és *T. harzianum* esetében, melyek fonalgombákra (*Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*) gátló hatást gyakoroltak. Van Tilburg és Thomas (1993) a *T. virens* magas lipáz aktivitását figyelték meg *R. solani* sejtfaát tartalmazó tápközegben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaink fő céljai a következők voltak:

1. *Trichoderma* törzsgyűjtemény létrehozása, törzsek izolálása, gyűjtése a következő élőhelyekről:
 - A) Búza, illetve rizs termesztésébe bevont mezőgazdasági talajokból.
 - B) A csiperke, illetve laskagomba termesztésére alkalmazott alapanyagokból.
 - C) Klinikai mintákból (*Trichoderma* törzsek beszerzése nemzetközi törzsgyűjteményekből és a SZTE Egyetemi Klinikájáról).
2. Az izolált törzsek fajsztípus azonosítása az ITS (internal transcribed spacer) szekvenciákon alapuló „barcoding” rendszer (*TrichOKey* 2.0, www.isth.info) segítségével, szükség esetén a fajazonosítás megerősítése a *tefl* gén egy fragmentjének szekvenálásával. A *Trichoderma* fajok biodiverzitásának felmérése az egyes élőhelyeken.
3. Az izolált törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése:
 - A) A mezőgazdasági talajokból izolált törzsek
 - screen-elése *in vitro* antagonizmus-tesztekben, növénypatogén gombák elleni biológiai védekezés céljaira alkalmazható potenciális biokontroll törzsek azonosítása céljából,
 - extracelluláris cellulolitikus, xilanolitikus, kitinolitikus és proteolitikus enzimaktivitások, illetve antibakteriális és antifungális metabolitok termelésére való képességének vizsgálata,
 - B) A gombatermesztési alapanyagból izolált törzsek
 - hőmérséklet-, pH- és vízaktivitás-függésének meghatározása
 - szénforráshasznosítási képességeik felmérése
 - termesztett gombákkal szembeni *in vitro* antagonizmusának felmérése,
 - mezőgazdasági gyakorlatban széles körben alkalmazott fungicidekkel szembeni érzékenységeik felmérése,
 - extracelluláris enzimek termelésére való képességének felmérése.
 - C) A klinikai mintákból izolált törzsek
 - hőmérséklet- és pH-függésének meghatározása,
 - szénforráshasznosítási képességeik felmérése,
 - extracelluláris enzimek és citotoxikus metabolitok termelésére való képességének felmérése,
 - orvosi gyakorlatban alkalmazott gombaellenes antibiotikumokkal szembeni érzékenységeik felmérése.
4. Molekuláris markerek keresése és diagnosztikai eljárások kidolgozása a gyakorlati szempontból jelentős *Trichoderma* fajok/törzsek nyomkövetése céljából:
 - A) Ígéretes biokontroll törzsek nyomkövetésére alkalmas, törzsspecifikus markerek keresése és rájuk épülő monitoring módszerek kidolgozása.
 - B) A laskagomba zöldpenészes megbetegedését okozó *Trichoderma* fajok specifikus kimutatására alkalmas molekuláris diagnosztikai módszer kidolgozása.
 - C) A humán fertőzéseket okozó *Trichoderma* fajok kimutatására, ill. az ezen fajokon belül esetlegesen meglévő patogén és nem patogén szubpopulációk elkülönítésére alkalmas molekuláris markerek keresése.

3. A KÍSÉRLETEK KIVITELEZÉSE

Az izolátumok rázatott tenyészetéből a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) segítségével tisztítottunk össz DNS-t. A PCR-ek során amplifikált DNS-t GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) segítségével tisztítottuk. Az amplifikált és tisztított DNS automatikus szekvencia-meghatározását külső szolgáltatások (MTA Szegedi Biológiai Központ; ill. Macrogen, Szöul, Dél-Korea) igénybevételel végeztük.

Az UP-PCR (Universally Primed PCR) kísérleteket az AA2M2, AS15inv, 3-2 (Bulat és mtsai. 2000), valamint az L15/AS19 és L45 (Lübeck és mtsai. 1999) indítószekvenciák (primerek) segítségével végeztük, 30 ciklusos polimeráz láncreakcióban (PCR; denaturáció: 92°C, 50s, annealing: 55,7°C, 80s, extenzió: 72°C, 60s). A kiválasztott biokontroll *T. harzianum* törzsre specifikus fragmenteket TOPO vektorba (Invitrogen) klónoztuk, majd szekvenciájuk meghatározását követően összesen 14 db, 50% körüli GC-tartalmú, 57-59 °C közötti számított T_m -értékű SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) indítószekvenciát terveztünk (1. táblázat). Az egyes specifikus UP-PCR fragmentekre tervezett forward és reverz SCAR-indítószekvenciák különböző kombinációit 35 ciklusos PCR-ben (denaturáció: 94°C, 10s, annealing és extenzió: 67°C, 35s) teszteltük.

A laskapatogén *Trichoderma* fajok kimutatására alkalmazható specifikus indítószekvenciákat (1. táblázat) a nemzetség *Lixii/Catoptron* kládjába tartozó fajok *tefl* génszekvenciáinak illesztése alapján terveztük.

A kutatómunka során alkalmazott további fontosabb módszerekről nyújt áttekintést a 2. táblázat.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. *Trichoderma* törzsek izolálása és azonosítása, biodiverzitásuk felmérése

Munkánk során összesen 400 *Trichoderma* törzset gyűjtöttünk különböző élőhelyekről. A 3. táblázat az izolátumok fajok közötti megoszlását mutatja a tanulmányozott élőhelyeken, a *Trichoderma* nemzetségre jelenleg elfogadott taxonómiai tagolás szerint (Druzhinina és Kubicek, 2005). A táblázatból kitűnik, hogy a különböző élőhelyeken más-más *Trichoderma* fajok dominálnak (búzafield és rizsfield: *T. harzianum* és *T. virens*; csiperkekomposzt: *T. aggressivum*; laskagomba termesztésére alkalmazott alapanyag: *T. pleurotum*; klinikai minták: *T. longibrachiatum*), egyes *Trichoderma* fajokat pedig csak bizonyos élőhelyeken sikerült kimutatni (csak búzafieldön: *T. oblongisporum*, *T. rossicum*, *T. spirale*; csak rizsfieldön: *T. hamatum*; csak csiperkekomposztban: *T. aggressivum*; csak laskagomba termesztésére alkalmazott alapanyagban: *T. pleurotum*; csak klinikai mintákban: *Hypocrea orientalis*).

A *Trichoderma* nemzetség legnagyobb biodiverzitását (11 faj) a búzafieldről származó mintákban, míg a legkiseb biodiverzitást (3 faj) a klinikai mintákban tapasztaltuk.

1. táblázat. A kísérleti munka során tervezett indítószekvenciák (primerek)

Cél	Név	Hossz (bp)	Szekvencia	T _m (°C)
Biokontroll <i>T. harzianum</i> törzs specifikus nyomkövetése	15invFL1	22	5'...CTGTGCTCCAATTGATCGACGA...3'	57,21
	15invF2	22	5'...TTGCTGGCGAATCGGAGGATAC...3'	58,58
	15invRL1	26	5'...GACAACCTTGAAGGTAGACGAATCGTC...3'	57,67
	15invFS1	23	5'...GCTTCAGTCGTATCAACCTTGGT...3'	56,93
	15invRS1	22	5'...GTGTGATGTGCAAATCGGCAAG...3'	57,50
	AA2M2FL1	22	5'...GCCGGAGACTTACCTGAACCAT...3'	58,17
	AA2M2RL1	24	5'...AACTCGCGAGGCAACTTTATTTCAG...3'	57,91
	AA2M2FS1	24	5'...ACCATCATCGGGTCGTTATTAAGC...3'	57,00
	AA2M2RS1	23	5'...CGTGCTGTCTAAAGTCTACGACC...3'	57,13
	M2invFL1	21	5'...CCGAACATTGCACGCAGTTCT...3'	58,41
	M2invF2	22	5'...CGGTAAGAACCGAACATTGCAC...3'	58,93
	M2invRL1	22	5'...GCACCACTATGGGCCTCTAACT...3'	57,89
	M2invFS1	25	5'...GTCAAATAGCCACTTGGACATGTCA...3'	57,39
	M2invRS1	22	5'...GCCGTCAAATTACACACGCATC...3'	57,33
Laskapatogén <i>Trichoderma</i> fajok specifikus kimutatása	FPforw1	22	5'...CACATTCAATTGTGCCCGACGA...3'	58,22
	FPrev1	20	5'...ACCTGTTAGCACCAGCTCGC...3'	59,21
	PSrev1	22	5'...GCGACACAGAGCACGTTGAATC...3'	58,89

2. táblázat. A kutatómunka során alkalmazott fontosabb módszerek

Módszer megnevezése	Módszer részletes ismertetése
<i>Trichoderma</i> törzsek izolálása szelektív Rose Bengal táptalajon	Szekeres 2006
ITS régió amplifikálása az ITS1 és ITS4 primerekkel	White és mtsai. 1990
ITS-szekvenciák elemzése a <i>TrichO</i> key 2.0 szoftverrel	Druzhinina és mtsai. 2005
a <i>tef1</i> gén 4. és 5. intronját tartalmazó fragment amplifikálása EF1-728F és TEF1-LLErev primerekkel	Hatvani és mtsai. 2007a
a <i>chi18-5</i> endokitináz gén (korábban <i>ech42</i>) egy 0.4 kb méretű fragmentjének amplifikálása	Jaklitsch és mtsai. 2006
A <i>cal1</i> kalmodulin gén egy fragmentjének amplifikálása CAL-228F és CAL-737R primerekkel	Chaverri és mtsai. 2003
A <i>tef1</i> , <i>chi18-5</i> és <i>cal1</i> szekvenciák elemzése az NCBI nukleotid-nukleotid BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) és a <i>Tricho</i> BLAST (www.isth.info) szoftverek segítségével	Altschul és mtsai. 1990; Kopchinskiy és mtsai. 2005
DNS-szekvenciák illesztése és filogenetikai törzsfák készítése a CLUSTAL X 1.83 szoftverrel	Thompson és mtsai. 1997
Izoenzim-analízis cellulóz acetát elektroforézissel	Hebert és Beaton, 1993; Szekeres és mtsai. 2006a
Távolsági mátrix és dendrogrammok készítése az izoenzim-adatokból a PHYLIP (v.3.57c) programcsomag segítségével	Felsenstein 1995
Izoenzim mintázatok és ITS szekvencia- adatok együttes elemzése a MrBayes (v.3.1) szoftverrel	Ronquist és Huelsenbeck, 2003
Regressziós fa-analízis	Szekeres 2006
A <i>Trichoderma aggressivum</i> fajra specifikus PCR Th-F és Th-R primerekkel	Chen és mtsai. 1999
A mitokondriális DNS restrikciós fragmenthossz-polimorfizmusának vizsgálata <i>Bsu</i> RI és <i>Hin</i> 6I enzimekkel	Varga és mtsai. 1993; Antal és mtsai. 2006b
Enzimtermelés- vizsgálatok kromogén paranitrofenil- és paranitroanilid szubsztrátokkal	Szekeres 2006; Kredics és mtsai. 2008a
Gélszűréses Sephadex oszlopkromatográfia	Antal és mtsai. 2001; Szekeres 2006
Antibiotikum-szekréción vizsgálatok	Szekeres 2006
<i>In vitro</i> antagonizmus-vizsgálatok	Szekeres és mtsai. 2006b; Komoń-Zelazowska és mtsai. 2007
A biokontroll index meghatározása képanalízisen alapuló módszerrel	Szekeres és mtsai. 2006b
<i>Trichoderma</i> izolátumok biokontroll képességének felmérése illékony metabolitok hatásának vizsgálata, a szkleróciumok életképességére gyakorolt hatás vizsgálata, hiperparazitizmus-tesztek és üvegházi kísérletek útján	Naeimi és mtsai. 2008b,c
A hőmérséklet <i>Trichoderma</i> törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálata	Antal és mtsai. 2000

2. táblázat –folytatás

Módszer megnevezése	Módszer részletes ismertetése
A vízviszonyok <i>Trichoderma</i> törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálata	Kredics és mtsai. 2000, 2004a
A pH <i>Trichoderma</i> törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálata	Kredics és mtsai. 2004a
<i>Trichoderma</i> törzsek mezőgazdasági gyakorlatban széles körben alkalmazott antifungális szerekekkel szembeni érzékenységének vizsgálata	Hatvani 2008
Szén- és nitrogénforrások felhasználásának vizsgálata	Antal és mtsai. 2005; Komoń-Zelazowska és mtsai. 2007
Egyes enzimszerek termelésében csökkent képességű mutáns <i>Trichoderma</i> törzsek előállítása UV-mutagenézissel	Hatvani 2008
<i>Trichoderma</i> törzsek klinikai gyakorlatban alkalmazott antimikotikumokkal szembeni érzékenységének meghatározása a fonalagombákra módosított E-teszt módszerével	Dóczi és mtsai. 2004
<i>Trichoderma</i> törzsek toxikológiai vizsgálata szemikvantitatív spermatocitási teszt segítségével	Andersson és mtsai. 1997

4.1.1. Búza, illetve rizs termesztésébe bevont mezőgazdasági területekről izolált törzsek azonosítása, biodiverzitásuk felmérése

Száztizenhat *Trichoderma* törzset izoláltunk 5 dél-magyarországi mezőgazdasági terület 18 mintavételi helyéről. Az izolálás közvetlenül a téli búza növények gyökeréről történt. A törzsek azonosítása az ITS régió *TrichOkey* 2.0 programmal történő szekvenciaelemzésével, valamint cellulóz-acetát elektroforézissel végzett izoenzim-analízissel történt. A teljes, 116 törzsre kiterjedő izoenzim-analízist öt kiválasztott enzim (6-foszfoglükonát-dehidrogenáz, glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, glükóz-6-foszfát-izomeráz, peptidáz B és foszfoglükomutáz) mintázatainak vizsgálatával végeztük, melynek során 26 elektroforetikus típusba tartozó 38 elektromorfot regisztráltunk. A törzsek fajok szerinti eloszlását mutatja a 3. táblázat. Az ITS szekvenciák elemzése során a *Longibrachiatum* szekcióba tartozó 5 jól elkülönülő *T. longibrachiatum* törzset használtuk külcsoportként. A 41 *T. harzianum*-nak bizonyult törzs 4 már leírt ITS-genotípust, és 4 újonnan azonosított, magyarországi genotípust képviselt. Három izolátum egy korhadó fatönkről Kanadában izolált *Trichoderma* törzsszel, a *Trichoderma* sp. DAOM 175924 izolátummal mutatott hasonlóságot. Ezek a törzseket később a laskagomba termesztésében problémát okozó *T. pleurotica* faj (lásd 4.1.2. szakasz) képviselőinek bizonyultak. Az általunk izolált *T. virens* törzsek (31) a filogenetikai elemzések alapján 4 genotípusba sorolhatók, melyből egy azonos az extípussal, három pedig új genotípusnak bizonyult. A *T. atroviride* izolátumok (9) az elfogadott extípus ikerágaként jelentek meg. Három izolátum a *T. oblongisporum* fajhoz, négy a *T. brevicompactum* fajhoz, egy izolátum a *T. spirale* fajhoz, míg öt izolátum két genotípussal a *T. rossicum* fajhoz tartozott. Az eddig leírt fajoktól teljesen elkülönülve, viszonylag nagy filogenetikai távolsággal helyezkedett el 14 izolátum, melyből 9 a *Rufa* kládhoz, 5 pedig a *Stromatica* kládhoz tartozott. Ezek az izolátumok valószínűleg 5 új faj képviselői. A *T. rossicum*, *T. spirale*, *T. brevicompactum* és *T. oblongisporum* fajok magyarországi előfordulásáról elsőként tudósítottunk (Szekeres és mtsai. 2005b, c, 2006c).

3. táblázat. A különböző élőhelyekről izolált *Trichoderma* törzsek fajok közötti megoszlása

Szekció	Klád	Faj	Izolált törzsek száma (db)					Összesen
			Búza föld	Rizs föld	Csiperke - komposzt	Laska - szubsztrátum	Klinikai minták	
<i>Longibrachiatum</i>		<i>T. longibrachiatum</i>	5	0	3	1	12	21
		<i>H. orientalis</i>	0	0	0	0	3	3
		<i>T. ghanense</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Trichoderma</i>	<i>Rufa</i>	<i>T. atroviride</i>	9	11	8	1	0	29
		<i>Trichoderma</i> sp.	9	0	0	0	0	9
	<i>Pachybasium A</i>	<i>T. hamatum</i>	0	3	0	0	0	3
		<i>T. asperellum</i>	0	1	3	1	0	5
<i>Pachybasium B</i>	<i>Lixii/catoptron</i>	<i>T. harzianum</i>	41	116	3	0	1	161
		<i>T. aggressivum</i>	0	0	17	0	0	17
		<i>T. pleuroticola</i>	3	0	0	1	0	4
		<i>T. pleurotum</i>	0	0	0	27	0	27
	<i>Virens</i>	<i>T. virens</i>	31	70	0	0	0	101
	<i>Semiorbis</i>	<i>T. oblongisporum</i>	3	0	0	0	0	3
	<i>Stromatica</i>	<i>T. rossicum</i>	5	0	0	0	0	5
	<i>Lutea</i>	<i>T. brevicompactum</i>	4	1	0	0	0	5
		<i>Trichoderma</i> sp.	5	0	0	0	0	5
		„Lone lineages”	<i>T. spirale</i>	1	0	0	0	0
Összesen (db)			116	202	35	31	16	400

Naeimi és mtsai. (2008a) Irán Mazandaran tartományának különböző régióiból, rizsföldekről összesen 202 *Trichoderma* törzset izoláltak. A mintavételezés a talajból, illetve a rizs filloszférájából történt. A rizsföldekről izolált *Trichoderma* törzsek azonosítását ITS és *tefl* szekvenciák elemzésével végeztük. A törzsek fajok közötti megoszlását a 3. táblázat mutatja. A leggyakrabban izolált fajok a biokontroll szembontból is jelentős *T. harzianum* (116) és *T. virens* (70) voltak (Naeimi és mtsai. 2008b). A rizs filloszférájából izolált 34 törzs között a *T. harzianum* dominált (31), emellett még a *T. virens* fordult elő (3). Utóbbi faj sokkal gyakoribbnak bizonyult a talajban (67), mint a filloszférában. A talajmintákból ezen kívül még a *T. atroviride* (11), *T. hamatum* (3), *T. asperellum* (1) és *T. brevicompactum* (1) fajok képviselőit sikerült izolálni (Naeimi és mtsai. 2008a). A 116 *Trichoderma* izolátum 14 ITS-genotípust és 12 *tefl*-genotípust képviselt, míg a *T. virens* törzsek (2 ITS-típus) és a *T. atroviride* törzsek (1 genotípus) sokkal homogénebbnek bizonyultak.

4.1.2. Csiperke, illetve laskagomba termesztésére alkalmazott alapanyagokból izolált törzsek azonosítása, biodiverzitásuk felmérése

A *Trichoderma* törzsek biodiverzitásának és genetikai variabilitásának tanulmányozását csiperkekomposztból és a laska termesztésére alkalmazott, szalmaalapú szubsztrátumból izolált 66 *Trichoderma* törzsön végeztük (Hatvani és mtsai. 2007a). Az izolált törzsek azonosítását első lépésben a csiperke termesztésében komoly károkat okozó *Trichoderma aggressivum* fajra specifikus indítószekvenciák (Chen és mtsai. 1999) segítségével végeztük. Egyes csiperkekomposztból származó mintákban nagy mennyiségben kimutatható volt a jelentős gazdasági károkat okozó „csiperkevész” tünetegyüttes kialakulásáért felelős *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, a laskagomba termesztésére alkalmazott szubsztrátumból izolált törzsek viszont nem adtak pozitív jelet a *T. aggressivum*-ra specifikus indítószekvenciákkal. Ezt a törzsek ITS-szekvenciáinak meghatározása, majd a *Trichoderma* törzsek fajsztintú azonosítására kifejlesztett *TrichOkey* és *TrichoBLAST* programok alkalmazása követte. A szekvenciaelemzés során a mintákban az alábbi *Trichoderma* fajokat sikerült azonosítanunk (3. táblázat): *T. aggressivum* f. *europaeum* (17), *T. harzianum* (3), *T. longibrachiatum* (4), *T. asperellum* (4), *T. atroviride* (9), *T. ghanense* (1 – az első adat ennek a fajnak a hazai előfordulásáról). A fennmaradó 28, laska termesztésére alkalmazott szubsztrátumból származó izolátumról bebizonyosodott, hogy ezek egy, a *T. harzianum* és *T. aggressivum* fajokkal közeli rokonságban álló, de attól filogenetikailag egyértelműen elkülönülő, eddig még le nem írt, új *Trichoderma* csoport képviselői (Hatvani és mtsai. 2007a). Ez az új csoport az ITS-szekvenciák alapján egy korhadó fatönkről Kanadában izolált *Trichoderma* törzsszel, a *Trichoderma* sp. DAOM 175924 izolátummal mutat nagyfokú hasonlóságot. A *tefl* gén 4. és 5. intronjának, valamint a *chl8-5* gén egy szakaszának szekvenciaanalízise rávilágított, hogy a csoport két részre bontható: 1 izolátum a szekvenciaadatok alapján a DAOM 175924 jelű törzsszel azonos fajba tartozik, míg a fennmaradó 27 törzs attól filogenetikai szinten elkülönül (Komoń-Zelazowska és mtsai. 2007). A két csoport képviselői morfológiai jellegeik és elterjedtségük tekintetében is különböznek egymástól. A DAOM 175924 törzsnek megfelelő, *T. harzianum*-szerű morfológiát mutató faj a GenBank adatbázisában végzett homológiakeresések alapján széles körben elterjedt a természetben, képviselői kanadai, iráni, kínai, indiai, új-zélandi és európai talajokban egyaránt előfordulnak, hazánkban is sikerült megtalálnunk az őszi búza rizoszférájából származó mintákban (ld. 4.1.1. szakasz). A másik, 27 *Trichoderma* törzs által képviselt faj izolátumai viszont *Gliocladium*-szerű morfológiát mutatnak, és eddig csak a laskagomba termesztésére alkalmazott szubsztrátumból sikerült izolálni őket, természetbeli előfordulásukról egyelőre nincs adat. A két új fajra a *T. fulvidum* és *T. pleurotophilum*

elnevezéseket javasoltuk. Részletes jellemzésük során bebizonyosodott, hogy az általunk *T. fulvidum* és *T. pleurotophilum* néven javasolt fajok megegyeznek a koreai kutatók által *T. pleurotica* és *T. pleurotum* néven leírt fajokkal (Park és mtsai. 2006). Szükségessé vált azonban az új fajok leírásának a nemzetközi tudományos igények figyelembe vételével történő pontosítása, a koreai kutatók ugyanis a típusörzseket nem helyezték letétbe nemzetközi törzsgyűjteményekben, a DNS-szekvenciákat pedig nem töltötték fel nemzetközi adatbázisokba. Osztrák-magyar együttműködés keretében elvégeztük a két faj részletes morfológiai, molekuláris és fiziológiai jellemzését. A morfológiai fajleírást alátámasztottuk az ITS, *tefl* és *chi18-5* lokuszok szekvenciáinak filogenetikai elemzésével, mely igazolta, hogy a laskagomba zöldpenészes fertőzését előidéző *T. pleurotica* és *T. pleurotum* valóban két, egymástól egyértelműen különböző filogenetikai faj. A két új faj ITS 1 és 2-szekvenciákon alapuló azonosítására alkalmas DNS-vonalkódok bekerültek a www.isth.info internetes honlapon elérhető, *Hypocrea/Trichoderma* törzsek azonosítására szolgáló *TrichOkey* 2.0 programba (Komoń-Zelazowska és mtsai. 2007). Törzsgyűjteményben elhelyeztük az új fajok általunk kiválasztott típusörzseit, a *T. pleurotica* típusörzse a DAOM 175924-es izolátum, a *T. pleurotum* típusörzse pedig egyik hazai izolátumunk lett.

Meg kell említeni, hogy míg a búza rizoszférájának *Trichoderma*-közösségeiben a *T. harzianum* bizonyult a domináns fajnak (lásd 4.1.1. szakasz), addig a laskagomba termesztésére alkalmazott, hőkezelt, átszövetett búzaszalma-alapú szubsztrátumból nem sikerült *T. harzianum* törzseket izolálnunk. A szubsztrátum hőkezelését közvetlenül követő mintavételezéseink során egyszer sem sikerült *Trichoderma* törzseket izolálni. A fentiek arra engednek következtetni, hogy a laskapatogén fajok termesztési rendszerbe jutása nem a búzaszalma útján történik, hanem a fertőzés feltehetően a termesztőhelyiségekben éri a már hőkezelt, átszövetett termesztőzsákot.

Megállapítottuk, hogy a hazai csiperketermesztésben a leggyakrabban előforduló és a zöldpenész tünetegyüttes kialakításáért felelős *Trichoderma* faj nem más, mint a Nyugat-Európában a 80-as évek közepe óta ismert *T. aggressivum* f. *europaeum* (Hatvani és mtsai. 2007a). A törzsek biodiverzitásának ITS-szekvenciákon és mtDNS RFLP-analízisen alapuló vizsgálata során az is bebizonyosodott, hogy a hazai izolátumok genetikailag megegyeznek az első, írországi járvány kórokozójával. Igazoltuk tehát, hogy a Nyugat-Európai csiperkevész kórokozója érte el Magyarországot. A kártevő *Trichoderma* faj hazai populációi genetikailag homogénnek bizonyultak, különbségeket az izolátumok között csak egy általunk felfedezett, 5 kilobázis nagyságú, mitokondriális lokalizációjú, kétszálú DNS-plazmid jelenlétében, ill. hiányában tapasztaltunk (Antal és mtsai. 2006a). A hazai laskatermesztésben ezzel szemben a *T. pleurotum*-ként leírt, új *Trichoderma* faj felelős a zöldpenész-probléma kialakulásáért. Eredményeink alapján a kétféle termesztett gombát támadó, kártevő *Trichodermák* erősen specializálódtak a gazdaszervezetre és a termesztési körülményekre, kevert megjelenésük még akkor sem fordul elő, ha egy termesztőhelyen csiperke- és laskatermesztés egyaránt folyik (Hatvani és mtsai. 2007a).

4.1.3. Klinikai mintákból izolált törzsek azonosítása, biodiverzitásuk felmérése

Nemzetközi törzsgyűjteményekből összesen 13, a Szegedi Tudományegyetem Klinikájáról pedig további 3 klinikai *Trichoderma* izolátumot szereztünk be. A legtöbb klinikai mintából izolált *Trichoderma* törzset eredetileg morfológiai jellegeik alapján határozták meg, azonban a törzsek azonosításához és rendszertani besorolásához megbízhatóbb eredményt szolgáltatnak a molekuláris biológiai módszerek. Az ITS 1 és 2 szekvenciák *TrichOkey* 2.0 programmal történő elemzését elvégezve megállapítottuk, hogy összesen hét, morfológiai bélyegeik alapján eredetileg *T. citrinoviride*-nek (1), *T. koningii*-

nek (1), *T. pseudokoningii*-nek (2), illetve *T. viride*-nek (3) meghatározott izolátum a *T. longibrachiatum/Hypocrea orientalis* fajok valamelyikének képviselője, tehát reidentifikálásra szorul (Kredics és mtsai. 2003c). Mivel ez a két faj az ITS-régió szekvenciaelemzésével nem elkülöníthető, elvégeztük a vizsgált klinikai izolátumok *tefl*-szekvenciaelemzését. Eredményeink alapján a 16 klinikai *Trichoderma* izolátum többsége (12) a *T. longibrachiatum* faj képviselője, míg három törzs a közeli rokon *H. orientalis* faj képviselőjének, egy további törzs pedig *T. harzianum*-nak bizonyult. A *T. longibrachiatum*-ot egy hazai, szinusztisztes betegből, a közeli rokon *H. orientalis*-t pedig két hazai, leukémiás betegből származó mintából sikerült azonosítani (Kredics és mtsai. 2006). Ezek az első adatok a *Hypocrea/Trichoderma* nemzetség klinikai mintákban történő előfordulásáról Magyarországon. Meg kell jegyezni, hogy a SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai és Diagnosztikai Intézetében a klinikai minták fonalaszgombákra történő feldolgozását olyan kollégán végzi, aki korábban kutatócsoportunkban a *Trichoderma* nemzetség vizsgálatával foglalkozott, ami nagyban segítette az izolátumok felismerését. Feltételezhető, hogy a *Hypocrea/Trichoderma* nemzetség képviselői más intézményekben is előfordulnak klinikai mintákban, csak – mivel a nemzetség klinikai jelentősége kevésbé közismert – esetleg kontaminációnak tekintik őket.

Összehasonlító populációgenetikai elemzést végeztünk a klinikai *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* izolátumok, valamint környezeti mintákból, gombatermesztési alapanyagokból és épületek faláról izolált *T. longibrachiatum*, illetve talajmintákból izolált *H. orientalis* törzsek bevonásával (Druzhinina és mtsai. 2008), melynek során az ITS és *tefl* markerek mellett a *call* és *chit18-5* gének egy-egy szakaszát is vizsgáltuk. Az elemzések során bebizonyosodott, hogy a *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* egymástól reprodukciós szempontból izolálódott, így a két faj a korábbi nézetekkel (Samuels és mtsai. 1998) ellentétben nem tekinthető egymás teleomorf-anamorf párjának. A *T. longibrachiatum* faj széles körben elterjedt, de a talajból izolált *Trichoderma* közösségeknek csak viszonylag kis gyakoriságú komponense (lásd 4.1.1. szakasz). Ezzel ellentétben zárt élőhelyeken, pl. vízkárosult épületekben (Thrane és mtsai. 2001), vagy gombatermesztő helységekből (lásd 4.1.2. szakasz) nagyobb gyakorisággal fordul elő. Érdekes, hogy a *T. longibrachiatum* fajt a Tatársztán Köztársaságban egy vaskori kripta régészeti feltárásakor vett mintákból is sikerült izolálni, ami arra utalhat, hogy a faj számára élőhelyként a mélyebb talajrétegek kedvezőbbek lehetnek (Druzhinina és mtsai. 2008). A populációgenetikai vizsgálatok eredményeként megállapítható, hogy míg a *T. longibrachiatum* szigorúan klonális imperfekt faj, addig a genetikailag közeli rokonságban álló, klinikai szempontból szintén jelentős *H. orientalis*-t szexuális rekombináción alapuló reprodukciós stratégia jellemezi (Druzhinina és mtsai. 2008).

A klinikai mintából származó, illetve a talajból izolált *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* törzsek esetében előállított mtDNS RFLP-mintázatok különbözőségeinek alapján a klinikai törzsek 5, a talajizolátumok pedig négy mtDNS-típusba sorolhatók (Antal és mtsai. 2006b). Bár azonos méretű fragmentek megfigyelhetők voltak a klinikai és a talajból származó törzsek mintáiban, teljesen egyező mintázatot nem találtunk. Ezen eredmények alapján a *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* fajokon belül is nagyfokú polimorfizmus jellemzi az izolátumokat mtDNS-szinten. Az emésztett mtDNS-fragmentjeinek méretmeghatározása alapján a klinikai és a szaprofita *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* törzsek mtDNS-e a 34,9 és 39,5 kbp közötti tartományba esik (Antal és mtsai. 2006b). A mtDNS RFLP vizsgálata az ITS szekvenciák elemzésénél jobb felbontást eredményezett, és a megfigyelt mintázatok 3 *T. longibrachiatum* és 1 *H. orientalis* csoport elkülönítését tették lehetővé a dendrogrammon.

Az általunk vizsgált klinikai illetve szaprofita *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* törzsek minden esetben mentesnek bizonyultak dsRNS-molekulák és extrakromoszómális

dsDNS-plazmidok jelenlététől. Mivel a magas tenyésztési hőmérséklet ezen extrakromoszómális genetikai elemek jelenlétére és stabilitására gyakorolt negatív hatásáról már más fonalgombanemzetségek esetében is beszámoltak, így valószínűleg a *T. longibrachiatum* fajra jellemző, magasabb hőmérsékleti optimumon való növekedés magyarázhatja ezen extrakromoszómális elemek hiányát a vizsgálatba bevont szaprofita és klinikai *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* törzsek esetében (Antal és mtsai. 2004).

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a klinikai mintákból izolált törzsek döntő többsége a *Trichoderma* nemzetség *Longibrachiatum* szekciójába, azon belül is a *T. longibrachiatum* fajba tartozik, a más szekcióba tartozó fajok előfordulásáról szóló tudósítások a morfológiai azonosítás nehézségeiből adódóan a legtöbb esetben pontatlanok voltak. Ennek megfelelően a klinikai gyakorlatban nagyobb figyelmet érdemel a *T. longibrachiatum* faj, mint potenciális oportunista kórokozó.

4.2. Különböző élőhelyekről származó *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése

4.2.1. Mezőgazdasági területekről izolált törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése

Az ökofiziológiai tanulmányok során a téli búza gyökeréről származó törzsek extracelluláris enzimtermelését, antibiotikum-termelését és biokontroll tulajdonságait vizsgáltuk (Szekeres és mtsai. 2004b). Az extracelluláris kimoelasztáz-, tripszin- és kimotripszin-típusú proteáz, Leu-aminopeptidáz (Szekeres és mtsai. 2006d), β -1,4-*N*-acetilglükózaminidáz, β -glükozidáz, β -galaktozidáz, β -xilozidáz és cellobiohidroláz enzimek konstitutív aktivitásait mértük a törzsek fermentleveinek felülúszóiból, mivel ezek az enzimek fontos szerepet játszanak mind a kompetíció, mind a mikoparazitizmus folyamataiban. Jellemeztük az enzimek szekréciójának eloszlását a vizsgált populációban, és statisztikai módszerekkel vizsgáltuk az esetleges kapcsolatokat az egyes enzimek termelődése között. Magas enzimszekrécióval jellemezhető törzsek minden vizsgált enzim esetében előfordultak, de az esetek nagy részében nem volt kimutatható szignifikáns korreláció az egyes enzimek szekréciója között. Az egyes taxonómiai csoportok és a termelt enzimek szintje közötti kapcsolatok tanulmányozása során sem találtunk kimutatható statisztikai összefüggéseket (Szekeres et al. 2005b). Az izolátumok közül 17 törzs bizonyult antibiotikum-termelőnek, a termelt vegyületek Gram-pozitív baktériumokkal szemben mutattak jelentős biológiai aktivitást. A fajok és az antibiotikumok termelése között erős összefüggés mutatkozott, az antibiotikumot termelő izolátumok ugyanis egy *T. harzianum* törzs kivételével a *T. virens* fajhoz tartoztak (Szekeres és mtsai. 2005d). A törzsek biokontroll képességeinek meghatározása céljából kidolgoztunk egy új, az *in vitro* antagonizmus-tesztek képanalízisén alapuló módszert, mely lehetőséget teremt a jövőben fonalgomba-törzsek biokontroll tulajdonságainak mennyiségi kiértékelésére megfelelő szabványosított körülmények között (Szekeres és mtsai. 2005a, 2006b). Ennek révén a különböző helyszíneken elvégzett tesztek eredményei összehasonlíthatóvá, összevethetővé válnak, lehetőség nyílik az egyes izolátumok rangsorolására antagonista tulajdonságaik alapján, mely egy relatív Biokontroll Index (BCI) értékkel jellemezhető. A BCI-értékeket fő változónak, az extracelluláris enzimaktivitási adatokat magyarázó változónak tekintve regressziós fa-analízissel vizsgáltuk a kapcsolatokat az egyes enzimek termelésének jellemzői és a biokontroll képesség között (Szekeres és mtsai. 2005b). Megállapítottuk, hogy mind a mikoparazitizmusban szerepet játszó, mind a kompetíciós enzimek aktivitásai befolyásolták az *in vitro* antagonizmus eredményességét, de azt, hogy mely enzimek játszanak igazán fontos szerepet a folyamatban, az alkalmazott tápközeg is nagymértékben befolyásolja.

Az iráni rizsföldekről származó *Trichoderma* izolátumok biokontroll képességeinek felmérése *in vitro* konfrontációs tesztek, illékony metabolitok hatásának vizsgálata, szkleróciumok életképességére gyakorolt hatás vizsgálata, hifakapcsolatok vizsgálata (hiperparazitizmus-teszt) és üvegházi kísérletek útján történt (Naeimi és mtsai. 2008b). A tesztekben 6 izolátum, köztük 5 *T. harzianum* és 1 *T. virens* mutatta a legkiválóbb biokontroll képességeket. A biodiverzitás-vizsgálatok (lásd 4.1.1. szakasz) során az 5 *T. harzianum* izolátum közül 4 azonos ITS- és *tefl*-genotípusba tartozónak bizonyult. Mivel ezek az izolátumok ugyanabból a talajmintából származnak, minden jel arra utal, hogy ugyanakkor a törzsnek a képviselői. A 4 izolátum egy új, eddig még nem ismert ITS-genotípust képvisel, mely a kiváló biokontroll képesség indikátora lehet.

4.2.2. Gombatermesztési alapanyagból izolált törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése

Tanulmányoztuk környezeti tényezők (hőmérséklet, pH, vízáktivitás) micéliumnövekedésre gyakorolt hatását szintetikus minimál- és laskakivonatot tartalmazó táptalajokon, összehasonlítva a laskakártevő fajokat a *T. aggressivum* f. *aggressivum*, *T. aggressivum* f. *europaeum* és *T. harzianum* fajok képviselőivel (Kredics és mtsai. 2009a). A *T. pleurotum* a *T. aggressivum* izolátumokhoz hasonlóan szűkebb hőmérsékleti tartományban (15-30°C) volt képes növekedni, mint a *T. pleuroticola* és *T. harzianum* törzsek (10-35°C). Eredményeink alapján az átszövetési szakasz utáni fázisra 15°C és 18°C közötti hőmérsékleti érték fenntartása javasolható a zöldpenész-fertőzés kialakulásának és terjedésének megelőzése céljából. A *Trichoderma* törzsek micéliumnövekedésének a savas és neutrális (pH 5-7) körülmények kedveztek. Ezek alapján a termesztési alapanyag pH-jának 8-9 közötti értékre történő beállítása lassíthatja a *Trichoderma* növekedését, melynek eredményeként mérséklődhet a fertőzés terjedése. A vízáktivitás hatásának vizsgálata során a törzsek nagyobb telepeket képeztek a laskakivonatos táptalajon, növekedési rátájuk pedig csökkent a vízáktivitás csökkenésével. A *Trichoderma* törzsek növekedésének a magasabb vízáktivitás-értékek kedveztek (Kredics és mtsai. 2009a).

Felmértük a zöldpenészt okozó *Trichoderma* érzékenységet a mezőgazdasági gyakorlatban széles körben alkalmazott antifungális szerekkel szemben. Az eredmények alapján a karbendazim, a benomil és a prokloráz alkalmazható lehet a zöldpenész elleni védekezésre (Hatvani 2008). A különböző szénforrások felhasználásának BIOLOG módszerrel történő vizsgálata kimutatta, hogy a *T. pleurotum* bizonyos szénforrásokat nem képes hasznosítani, így ez a faj feltehetőleg erősebben specializálódott a laskatermesztés körülményeire (Komoń-Zelazowska és mtsai. 2007). Az *in vitro* antagonizmus-vizsgálatok eredményei alapján a két új faj a csiperkét a *T. aggressivum*-hoz hasonlóan képes antagonizálni, ezért - bár csiperkén történő kártételéről nincs adat - a *T. aggressivum*-hoz hasonló szénforráshasznosítási spektrummal rendelkező *T. pleuroticola* a csiperketermesztésre is potenciális veszélyt jelenthet (Komoń-Zelazowska és mtsai. 2007). Az *in vitro* antagonizmus-vizsgálatok eredményeit felhasználva megkezdtük egy, a Szekeres és mtsai. (2006b) által kidolgozott, képanalízisen alapuló módszerhez hasonló eljárás kidolgozását a gombakártevő *Trichoderma* törzsek agresszivitási fokának kvantitatív meghatározására.

Míg a *T. pleurotum*-ot eddig csak laskatermesztésből sikerült izolálni, addig a *T. pleuroticola* környezeti mintákban (talaj, fa) történő előfordulásáról számos adat áll rendelkezésre a világ különböző részeiről. Ezek alapján is feltételezhetően a *T. pleuroticola* jelenti a súlyosabb fenyegetést a gombatermesztésre. Érdekes, hogy ezt a penészgombafajt Új-Zélandon biológiai védekezésre alkalmazzák az *Armillaria novae-*

zealandiae és *A. limonea* növénypatogén gombák ellen, kivi és fenyő védelmében (Dodd és mtsai. 2000). Az alkalmazott „HEND” jelű törzset annak idején *T. harzianum*-ként azonosították, és csak munkánk kapcsán derült ki, hogy valójában egy olyan új *Trichoderma* faj képviselőjéről van szó, amelynek növényvédelmi célokra történő alkalmazása katasztrofális következményekkel járhat, ha az alkalmazási terület közelében laskagombát természetnek. *Trichoderma* törzseken alapuló biológiai védekezési eljárások kifejlesztésekor ezért elengedhetetlen a széleskörű kockázatbecslés, melynek feltétele a felhasználni kívánt törzsek molekuláris módszerekkel történő pontos, fajszintű azonosítása. A *T. pleuroticola* fajt hazánkban is sikerült kimutatni búzaföldekről származó talajmintákban, bár ezen az élőhelyen nem tartozik a gyakori *Trichoderma* fajok közé (3. táblázat). Érdekesség viszont, hogy míg az olaszországi laskafarmokon a *T. pleuroticola* dominál, addig a magyarországi laskatermesztő üzemekből származó izolátumok többsége a *T. pleurotum* fajba sorolható.

Enzimológiai vizsgálataink során extracelluláris enzimek termelését vizsgáltuk nem-induktív (minimál tápoldat) és induktív (laskakivonatot, szalmakivonatot, ill. ezek kombinációját tartalmazó tápoldatok) körülmények között (Kredics és mtsai. 2008a). Jelentős eltérést tapasztaltunk a két laskakártevő faj proteolitikus enzimeinek aktivitásában. A *T. pleurotum* proteolitikus rendszerét nagymértékben indukálta a laskatermesztés alapanyagként alkalmazott szalma kivonata, míg a *T. pleuroticola* proteázait a laskakivonatot jelenléte indukálta, nem pedig a szalmakivonatot. További érdekesség, hogy ellentétben a *T. aggressivum* fajjal, az újonnan leírt laskakártevő fajok esetében nem tapasztalható konstitutív *N*-acetil-glükózaminidáz aktivitás. Eredményeink arra utalnak, hogy a két, közeli rokon laskakártevő faj számos ponton eltérő enzimátikus stratégiát alkalmaz a laskatermesztésben fennálló körülményekhez történő alkalmazkodás céljára (Kredics és mtsai. 2008a).

Az egyes enzimrendszerek termelésében csökkent képességű mutáns törzseket állítottunk elő UV-mutagenézissel, és *in vitro* antagonizmus-vizsgálatokat végeztünk a vad típusú és mutáns *Trichoderma* törzsekkel az egyes enzimek fertőzési folyamatban betöltött szerepének tisztázása céljából. A proteáz, lipáz, kitináz és glukanáz enzimrendszerekben deficiens *T. pleurotum* mutánsok laskával szemben jelentősen csökkent antagonistikus képességgel rendelkeztek (Hatvani és mtsai. 2009).

4.2.3. Klinikai mintákból izolált törzsek ökofiziológiai és enzimológiai jellemzése

A környezet élő és élettelen elemei közül tanulmányoztuk a hőmérséklet és a pH különböző értékeinek klinikai *T. longibrachiatum* törzsek életműködéseire gyakorolt hatását, elvégeztük a törzsek szén- és nitrogénforrás-hasznosítási spektrumának, valamint gombaellenes antibiotikumokkal szembeni érzékenységének felmérését, környezeti mintákból izolált *Trichoderma* törzsekkel összehasonlításban.

A magas hőmérsékleten való növekedés képessége egyike az opportunistáknak, mivel az emberi szervezetben hosszán fennmaradni, illetve szaporodni csak azok a kórokozók képesek, melyek tolerálják a 37°C körüli hőmérsékletet. Első lépésben ezért felmértük klinikai illetve természetes élőhelyről származó *T. longibrachiatum* törzsek növekedésének hőmérsékletfüggését szintetikus minimál, valamint élesztőkivonatot tartalmazó táptalajon. A klinikai törzsek képesek voltak növekedni a 10°C és 40°C közé eső hőmérsékleti értékeken, a legnagyobb növekedési rátát 30°C-on mutatva (Antal és mtsai. 2005).

A környezet pH értéke komoly hatást gyakorol a mikroorganizmusok életfolyamataira. A fonalgombák általában a savas kémhatású környezetet kedvelik, a

kórokozók azonban képesek tolerálni a semlegeshez közeli értékeket is. Az általunk vizsgált, környezeti mintákból származó *Trichoderma* törzsek nagy része élesztőkivonatot tartalmazó táptalajon a 2,0-tól 7,0-ig terjedő pH tartományban mutatott növekedést, legkedvezőbbnek a pH 4,0-es érték bizonyult, ugyanakkor a klinikai izolátumok még pH 9,0-es értéken is életképesnek bizonyultak (Antal és mtsai. 2005).

Nyolcvan vegyület szénforrásként, valamint 34 vegyület nitrogénforrásként történő hasznosításának képességét vizsgálva megállapítottuk, hogy a klinikai izolátumok számos aminosavat képesek egyedüli szén- és nitrogénforrásként hasznosítani. A szénforrás-hasznosítási spektrumok alapján hasonlósági mátrixot hoztunk létre, és törzsfán ábrázoltuk a törzsek rokonsági viszonyait (Antal és mtsai. 2005). Az izolátumok szénforráshasznosítási képességeit a BIOLOG fenotipizálási módszerrel is tanulmányoztuk (Druzhinina és mtsai. 2008).

A törzsek *in vitro* antimikotikum-érzékenységet E-teszt segítségével határoztuk meg. Az összes vizsgált törzs rezisztensnek bizonyult flukonazollal szemben (MIC érték = 64 µg/ml) függetlenül a származási helyüktől. Az itrakonazol esetében egy törzs mutatott dóziszfüggő érzékenységet (minimális gátló koncentráció – MIC: 0,25 - 0,5 µg/ml) a többi rezisztensnek mutatkozott (MIC = 1 µg/ml). Amfotericin B-vel szemben a klinikai törzsek egy kivételével rezisztensek voltak (MIC > 2 µg/ml), a szaprofita törzsek fele érzékenyek fele rezisztensnek bizonyult. A ketokonazol esetében mind a szaprofita, mind pedig a klinikai izolátumok érzékenyek mutatkoztak (MIC < 8 µg/ml). Összességében megállapítható, hogy bár az amfotericin B esetében megfigyelhető volt bizonyos eltérés, jelentős különbség nem volt mérhető a klinikai és a szaprofita törzsek antimikotikum érzékenysége között (Kredics és mtsai. 2003c, 2005b; Antal és mtsai. 2005).

Tizenegy kromogén paranitroanilin szubsztrát alkalmazásával vizsgáltuk meg a klinikai *Trichoderma* izolátumok induktív körülmények között termelt extracelluláris proteázainak aktivitását. Valamennyi törzs esetében kimutatható volt tripszin-, kimotripszin- és kimoelasztáz típusú aktivitás. A tripszin- és kimotripszin-típusú proteázok enzimprofilja, az oszlopkromatográfiás elválasztások alapján, összetettnek mutatkozott, számos izoenzim jelenlétére utalva. Ugyanezen proteázok aktivitásának pH-függését tanulmányozva kitűnt, hogy mindkét enzimtípus magas aktivitást mutat egy széles, 5-től 9-ig terjedő pH-tartományban, mely a különböző izoenzimiek eltérő pH-optimumára utal. A vizsgált enzimek tehát aktívnak bizonyultak fiziológias pH-n, továbbá egyes törzsek 37°C-on nagyobb mennyiségben szekretálták mindkét vizsgált enzimtípust mint 25°C-on. Ezek alapján feltételezhető, hogy az ilyen típusú aktivitások hozzájárulhatnak az opportunistá *Trichoderma* törzsek virulenciájához (Kredics és mtsai. 2004b).

A Helsinki Egyetem kutatóival kialakított együttműködés keretében lehetőség nyílt a klinikai *Trichoderma* törzsek toxikológiai vizsgálatának elvégzésére is, szemikvantitatív spermatoxicitási teszt segítségével. Négy törzs esetében a vaddisznó-spermatozoák elvesztették mozgási képességüket, ami arra utal, hogy ezek a törzsek a spermasejtekre toxikus metabolitokat termelnek. E négy törzs kivonata kioltotta a JC-1-el festett vaddisznóspermák középrészének fluoreszcenciáját, ami a mitokondriális membránpotenciál megszűnésére enged következtetni. Ezek alapján a toxikus metabolitok termelésére való képesség a *Trichoderma* törzsek, mint opportunistá kórokozók lehetséges virulenciafaktorai közé sorolható (Sundell és mtsai. 2006).

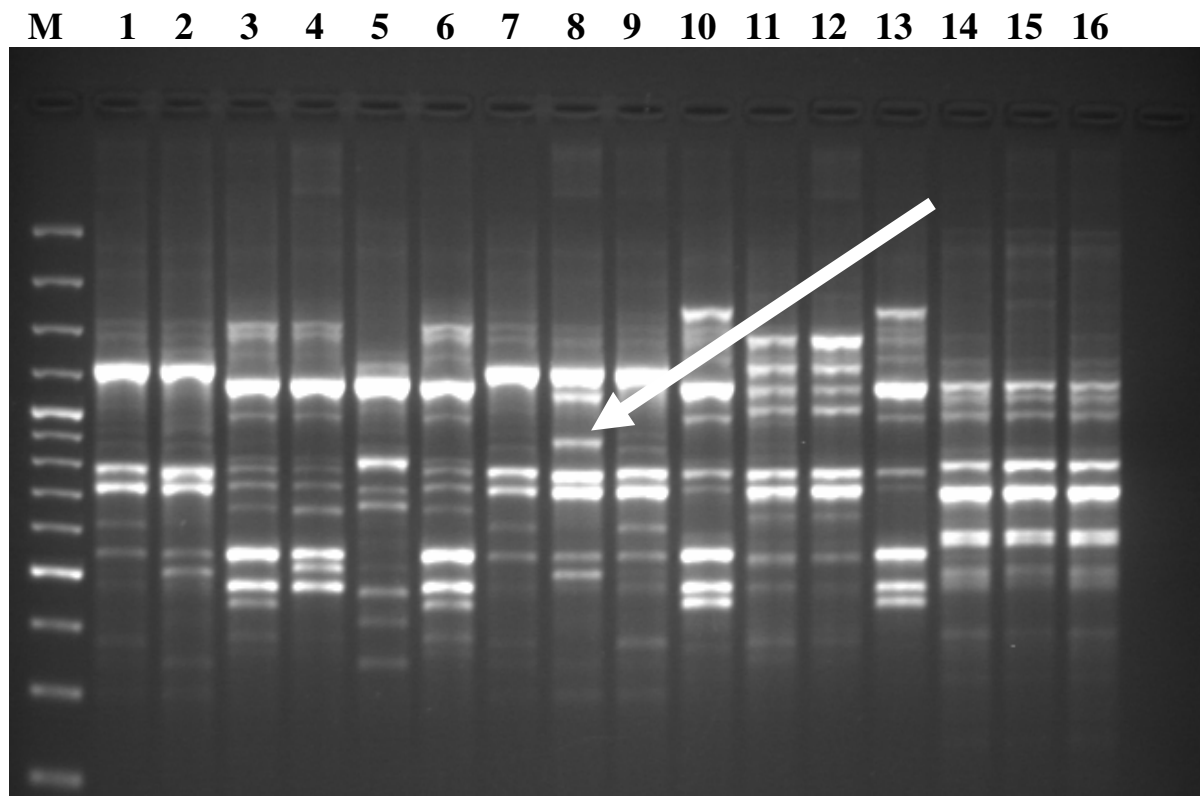
A magas hőmérsékleten való növekedés képessége a gombák virulenciafaktorainak egyike. Emellett a törzsek azon tulajdonságai, hogy képesek elviselni a semleges pH értéket, valamint képesek több aminosavat egyedüli szén- és nitrogénforrásként hasznosítani, elősegíthetik opportunistá kórokozóként való növekedésüket. Az egyes antifungális szerekkel szembeni alacsony érzékenység a fertőzések orvosi kezelése során okozhat komoly nehézségeket.

4.3. Gyakorlati szempontból jelentős *Trichoderma* törzsek/fajok diagnosztikai kimutatásának, nyomonkövetésének lehetőségei

4.3.1. Egy, a biológiai növényvédelemben potenciálisan felhasználható *T. harzianum* törzs nyomonkövetését lehetővé tevő, törzsspecifikus monitoring rendszer kidolgozása

Biokontroll *Trichoderma* törzsek növényvédelmi célokra történő alkalmazása esetén szükséges a kijuttatott törzsek megkülönböztetése az adott élőhelyen jelen lévő természetes *Trichoderma* populációktól. A biokontroll törzsek jelölhetőek exogén markerekkel (green fluorescent protein, hygromycin B rezisztencia, β -glükuronidáz), a genetikailag módosított szervezetek kijuttatásával szembeni erős ellenállás miatt azonban az exogén markerekkel ellátott törzsek alkalmazása kevésbé preferált. Mindez kiküszöbölhető endogén markerek (pl. törzsspecifikus DNS-szekvenciareszletek) alkalmazásával.

Bár a legkiválóbb biokontroll sajátosságú izolátumok közé tartozó 4, egy mintából származó, 1 törzset képviselő izolátum új, egyedi ITS-genotípust mutatott, az ITS-szekvencia eltérései alapján nem volt megoldható törzsspecifikus primerek tervezése. A törzs nem képzett elkülönülő csoportot a *tefl* szekvenciák alapján készített filogenetikai törzsfán, így a vizsgált *tefl* szakasz alapján sem tervezhető törzsspecifikus primerek. Az UP-PCR a RAPD-technikához hasonló, de annál komplexebb sávmintázatot adó, nagyfokú reprodukálhatósággal jellemezhető fingerprinting-technika. Az alkalmazott, viszonylag hosszú, tervezett (nem random) primerekkel elsősorban a genom variábilisabb, intergénikus régióit célozza, ezáltal alkalmas az intraspecifikus variabilitás detektálására. Az UP-PCR kísérleteket az AA2M2, AS15inv, 3-2, L15/AS19 és L45 primerek segítségével végeztük. Az AS15inv primer (2. ábra) és az AA2M2 önmagukban 1-1, a nyomonkövetni kívánt törzsrre specifikus sávot, míg e két indítószekvenciának a kombinációja 1 további törzsspecifikus sávot eredményezett. A *T. harzianum* AS12-2 törzsrre specifikus három, egyenként 904 bp, 684 bp és 842 bp méretű fragmentet vektorba klónoztuk, majd szekvenciájuk meghatározását követően összesen 14 db, 50% körüli GC-tartalmú, 57-59 °C közötti számított T_m -értékű SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) indítószekvenciát terveztünk (1. táblázat), melyek 3' vége NCBI BLAST elemzések alapján nem mutat teljes homológiát sem az ismert *Trichoderma* és *Rhizoctonia solani* szekvenciákkal, sem egyéb ismert fonalgomba szekvenciákkal, továbbá a rizs ismert genomszekvenciájának egyetlen részletével sem. Az egyes specifikus UP-PCR fragmentekre tervezett forward és reverz SCAR-indítószekvenciák különböző kombinációit PCR-ben teszteltük a *T. harzianum* 14 ITS-genotípusának képviselőivel. Két primerkombináció (15invFL1/15invRL1 és 15invF2/15invRL1) kizárólag a nyomonkövetni kívánt *T. harzianum* törzsből amplifikált fragmentet. Negatív eredményt kaptunk 145 rizsföldről izolált *Trichoderma* törzsszel, köztük a fennmaradó 13, rizsföldön detektált *T. harzianum* ITS-genotípus, valamint a *T. virens*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. brevicompactum* fajok képviselőivel, a *R. solani*-val, és egyéb rizsföldön előforduló fonalgombákkal is. Eredményeink alapján a két primer és az optimalizált reakciókörülmények alkalmasak a *T. harzianum* AS12-2-es törzs biológiai növényvédelmi célokra történő alkalmazása esetén a törzs nyomonkövetésére (Kocsubé és mtsai. 2008).



2. ábra. Különböző genotípusú *T. harzianum* és *T. viride* törzsek AS15inv indítószekvenciával generált UP-PCR mintázatai. 1-13. sáv: *T. harzianum* törzsek (8. sáv: *T. harzianum* AS12-2), 14-16. sáv: *T. viride* törzsek. A fehér nyíl a kiváló biokontroll képességekkel rendelkező AS12-2-es jelű törzs esetében kapott törzsspecifikus sávot mutatja.

4.3.2. A laskagomba zöldpenészes megbetegedését okozó *Trichoderma* fajok specifikus kimutatására alkalmas molekuláris diagnosztikai módszer kidolgozása

A laskagomba zöldpenészes fertőzésének gyors terjedése miatt sürgetővé vált egy hatékony diagnosztikai módszer kidolgozása. A két laskapatogén *Trichoderma* faj epidemiológiai nyomkövetésének céljából kidolgoztunk egy multiplex PCR-alapú, specifikus diagnosztikai módszert (Hatvani és mtsai. 2007b; Kredics és mtsai. 2008b). A specifikus indítószekvenciákat (1. táblázat) a nemzetség *Lixii/Catoptron* kládjába tartozó fajok *tefl* génszekvenciáinak illesztése alapján terveztük, melyek 3' vége NCBI BLAST elemzések alapján nem mutat teljes homológiát sem az ismert *Trichoderma* és *Pleurotus ostreatus* szekvenciákkal, sem egyéb ismert fonalagomba szekvenciákkal, továbbá a laskagomba termesztésére alapanyagként alkalmazott búza ismert genomszekvenciájának egyetlen részletével sem. A *tefl* gén 4. és 5., variábilis intronjainak szekvenciáján alapuló rendszer három indítószekvenciát foglal magába (3. ábra), melyből egy indítószekvencia-pár specifikusan elkülöníti a két laskapatogén fajt a többi *Trichoderma* fajtól, míg a 3. indítószekvencia kizárólag a *T. pleurotum*-ra specifikus. Az optimalizált PCR a *T. pleurotum* törzsekből 2, a *T. pleuroticola* faj képviselőiből pedig 1 fragmentet eredményez, ezzel lehetővé téve a laskapatogének kimutatását és egymástól való elkülönítését. A *T. pleurotum* és *T. pleuroticola* törzseken kívül még további 28 *Trichoderma* fajjal és számos más gombával is teszteltük a fent vázolt multiplex PCR-rendszert, és egyik esetben sem tapasztaltunk keresztreakciót. Az eredmények alapján tehát ennek a hármas primer-

készletnek az alkalmazásával a *T. pleurotum* és a *T. pleurotica* egyértelműen elkülöníthető egymástól és más gombafajoktól is. Módszerünk tiszta tenyészet készítése nélkül alkalmazhatónak bizonyult a két fajnak közvetlenül, a laskagomba termesztésére alkalmazott szalmaalapú szubsztrátumból történő kimutatására is (Kredics és mtsai. 2008b). Így ez a módszer segíthet abban, hogy a laskagomba zöldpenészes fertőződétsége már a korai szakaszban felismerhető legyen, megnyitva az utat a megfelelő védekezési eljárások alkalmazása előtt.

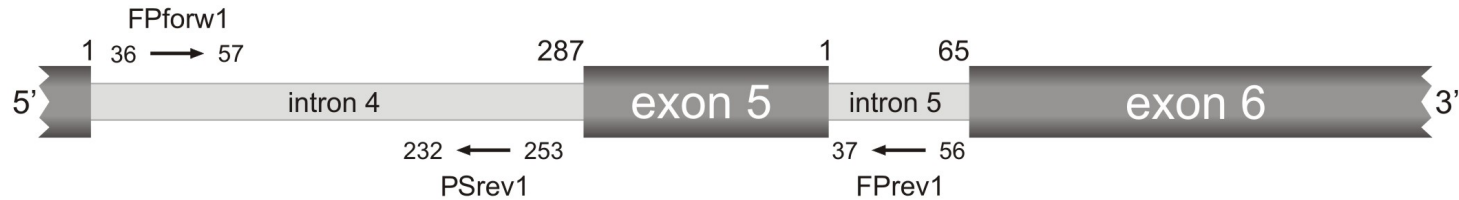
Ennek a PCR-technikának a segítségével sikerült a *T. pleurotica* előfordulását kimutatni a vadon termő laskagomba természetes szubsztrátumában is. Érdekesség, hogy míg ez a faj a búzaföldön kis gyakorisággal izolálható (3. táblázat), addig a laskagomba természetes szubsztrátumának *Trichoderma* közösségeiben gyakran domináns fajként jelenik meg. Ezek alapján feltételezhető, hogy a laskagomba természetes szubsztrátuma a természetközvetlen bekövetkező *T. pleurotica*-fertőzések rezervoárja lehet (Hatvani és mtsai. 2008b). A vadon termő laskagomba természetes szubsztrátuma a termesztési rendszerekben alkalmazott búzaszalma-alapú szubsztrátumtól merőben különböző élőhely. Ezen kívül, bár Dél-Koreában a laskagomba termesztése más alapanyagokon, pl. fűrészporon, rizsszalmán, gyapotmaradványokon zajlik, a laskapatogén *Trichoderma* fajok kártétele ezekben a termesztési rendszerekben is jelentkezik (Park és mtsai. 2004). Ezek alapján a laskagomba zöldpenészes megbetegedését okozó *Trichoderma* fajok elterjedését nem a termesztési szubsztrátum minősége, hanem a laskagomba jelenléte befolyásolja.

Egy magyarországi laskatermesztéssel foglalkozó cég természetközvetlen helyeiből származó, légyapár segítségével elfogott rovarok felszínéről 24 *Trichoderma* törzset izoláltunk (Körmöczy és Cseh, 2008). A multiplex PCR-en alapuló technika alkalmazásával a 24 törzs közül 19 esetben kaptunk pozitív jelet. Ebből 17 esetben a reakció 2 fragmentet eredményezett, arra utalva, hogy a rovarok felszínéről izolált *Trichoderma* törzsek többsége, 70,83%-a a *T. pleurotum* fajba tartozik. A másik laskakártevő *Trichoderma* faj, a *T. pleurotica* 2 izolátummal (8,33%) képviseltette magát a mintában. Eredményeink összhangban vannak a *Trichoderma* nemzetség hazai laskatermesztőhelyeken megfigyelhető biodiverzitásáról tudósító korábbi adatainkkal (Hatvani és mtsai. 2007a; Komoń-Zelazowska és mtsai. 2008), melyek szerint a Magyarországon vizsgált természetközvetlen helyeken a *T. pleurotum* a laskagomba zöldpenészes fertőzésének fő okozója. A diagnosztikus PCR-rel kapott eredményeket a *Trichoderma* izolátumok ITS-szekvenciáinak a *TrichOKEY* 2.0 programmal történő elemzésével ellenőriztük. A szekvenciaelemzés mind a 19 laskakártevő törzs esetében igazolta a diagnosztikus PCR-rel kapott eredményeket, és kimutatta, hogy a fennmaradó 5 izolátum, melyek a multiplex reakcióban nem adtak sávot, 3 további *Trichoderma* fajt (*T. harzianum*, *T. longibrachiatum* és *T. citrinoviride*) képvisel.

Módszerünk segítségével sikerült tehát igazolni azt a feltételezést, hogy a laskagomba zöldpenészes fertőzésének terjesztésében szerepet játszhatnak a természetközvetlen telepeken jelenlevő rovarok. Entomológus szakértő bevonásával további vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy vajon bármelyik, a természetközvetlen helyeken előforduló rovar részt vehet-e a zöldpenész terjesztésében. Elképzelhető ugyanis, hogy csak bizonyos faj, vagy fajok játszanak szerepet ebben a folyamatban. A *T. aggressivum* terjesztésében például a paprikaatka döntő szerepe valószínűsíthető, a feltételezések szerint ugyanis a penészgomba által termelt metabolitok specifikusan vonzzák a paprikaatkákat (Seaby, 1998).

A

tef1 α



B

pozíció a 4. intronon belül

29↓

91↓

FPforw1: 5'...CACATTCAATTGTGCCCGACGA...3'

T. pleurotum CPK 2814:.....5'...CTCCCTCCACATTCAATTGTGCCCGACGATTCTGCAGAGAATTTTCGTGT-CGACAATTGAT-AT...3'
T. pleuroticola DAOM 175924:.....5'...CTCCCTCCACATTCAATTGTGCCCGACGATTCTGCAGAGAATTTTCGTGT-CGACAATTTTTCAT...3'
T. aggressivum f. *aggressivum* DAOM 222154:..5'...CTCCCTCCACATTCAATTGTGCTCGATCATTCTGAAGAGAATT-----GT-CGACAATTTTTCAT...3'
T. aggressivum f. *europaeum* CBS 100525:.....5'...CTCCCTCCACATCCAATTGTGCTCGATCATTCTGAAGAGAATT-----GT-CGACAATTTTTCAT...3'
T. harzianum CBS 273.78:.....5'...CTCCCTCTACATTCAATTGAAACCGACAATTCTGAAGAGAATTTTCGTGTTTCGACAATTTTTCAT...3'

pozíció a 4. intronon belül

196↓

256↓

PSrev1: 3'...CTAAGTTGCACGAGACACAGCG...5'

T. pleurotum CPK 2814:.....5'...TTTTTCTGCTTCACTCCCCCACTGGCCAGTCATGATTCAACGTGCTCTGTGTCTGC-----CAT...3'
T. pleuroticola DAOM 175924:.....5'...TTT---CTGCTTCACTCTCCC-ACTG-CCCAGTCATCATTCAACGTGCTCTGTGTCTTC---CAT...3'
T. aggressivum f. *aggressivum* DAOM 222154:..5'...TTTTT-GTGCTTCACTATCACTA----CCCAGCCGTGCGTTCAACGTGCTCTGTCTCTC---TCAT...3'
T. aggressivum f. *europaeum* CBS 100525:.....5'...TTTTTGTGCTTCACTATCACTA----CCCAGCCGTGCGTTCAACGTGCTCTGTCTCTC---GTCAT...3'
T. harzianum CBS 273.78:.....5'...TTTTCT--GCTTCAC--TCACTT----CCCAGCCATCATTTCAGCGTGTCTGTGTCTCTGTTGTCAT...3'

pozíció az 5. intronon belül

1↓

65↓

FPrev1: 3'...CGCTCGACCACGATTGTCCA...5'

T. pleurotum CPK 2814:.....5'...GTATGTCTGCTGCTCCATCACCTCCATGCAGGAATGGCGAGCTGGTGCTAACAGGTCATGCGCAG...3'
T. pleuroticola DAOM 175924:.....5'...GTATGTCTGCT---CCATCATCTTGATGCAGGAATTGCGAGCTGGTGCTAACAGGTAATTGCGCAG...3'
T. aggressivum f. *aggressivum* DAOM 222154:..5'...GTATGTCTCTCT--TC-ATCACCCCGATGCAGCAATTACAAGCCAGTGCTAACAGGCAATTCACAG...3'
T. aggressivum f. *europaeum* CBS 100525:.....5'...GTATGTCTCTCT--TC-ATCACCCCGATGCAGCAATTACAAGCCAGTGCTAACAGGCAATTCACAG...3'
T. harzianum CBS 273.78:.....5'...GTATGTCTTCT--TC-ATTAACCTTCATGCTTCAATTGCAAGTCAAGTGCTAACAGGCAATTCACAG...3'

3. ábra. A laskapatogén *Trichoderma pleuroticola* és *T. pleurotum* fajok specifikus kimutatására tervezett indítószekvenciák kötőhelye sematikusán ábrázolva (A) és szekvenciaszinten (B)

4.3.3. Klinikai szempontból jelentős *Trichoderma* fajok diagnosztikai kimutatásának lehetőségei

A 4.1.3. szakaszban ismertetett eredmények alapján a klinikai *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* törzsek gyors, diagnosztikai célú azonosítása ITS-szekvenciájuk alapján nem lehetséges, ezt ki kell, hogy egészítse a *tefl*-szekvenciák analízise. Mivel a nemzetség képviselői által okozott fertőzések legyengült immunrendszerű betegekben gyakran halálos kimenetelű fertőzéseket okoznak, megbízható és gyors diagnosztizálásuk létfontosságú. A búza rizoszférájából izolált törzsek azonosítására alkalmazott, cellulóz-acetát elektroforézisen alapuló izoenzim-analízis (lásd 4.1.1. szakasz) a *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* fajok gyors azonosítására is alkalmas lehet. Tizenhárom enzim aktivitásának cellulóz-acetát elektroforézissel történt elemzése során hét: a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, a glükóz-6-foszfát-izomeráz, a 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz, a peptidáz A, B, és C, valamint a foszfoglükomutáz alkalmasnak bizonyult az összes vizsgált klinikai *T. longibrachiatum* törzs tesztelésére (Szekeres és mtsai. 2006a). Az alkalmazott enzimek polimorfnak mutatkoztak a vizsgált populációban, a foszfoglükomutáz interspecifikusnak, míg a többi enzim intraspecifikusnak bizonyult. Az enzimmintázatokat felhasználva 10 elektroforetikus típust tudtunk elkülöníteni, melyek az előállított dendrogramon a vizsgált *T. longibrachiatum* izolátumokat négy elkülönülő csoportra bontották, és egyértelműen elkülönítették a *H. orientalis* törzsektől. Eredményeink alapján a cellulóz acetát elektroforézissel végzett izoenzim-analízis a *T. longibrachiatum* fajba tartozó törzsek gyors azonosítására és tipizálására egyaránt alkalmas, így diagnosztikai célokra történő felhasználása is elképzelhető (Szekeres és mtsai. 2006a).

Fontos megjegyezni, hogy sem az ITS, *tefl*, *chit18-5* és *cal1* gének szekvenenciaanalízise, sem a mtDNS RFLP (lásd 4.1.3. szakasz), sem a szénforráshasznosítási profilok vizsgálata (lásd 4.2.3. szakasz), sem pedig az izoenzim-analízis nem különítették el egymástól a vizsgált klinikai mintákból származó *T. longibrachiatum* izolátumokat a környezeti mintákból származóktól. Tehát míg bizonyos klinikai jelentőségű gombáknál – pl. az *Exophiala dermatitidis* (Matos és mtsai. 2003) esetében – a kórokozó faj patogén és nem patogén szubpopulációkra bontható, addig eredményeink alapján a *T. longibrachiatum* fajon belül – a *Pseudallescheria boydii* (Rainer és mtsai. 2000) és *Aspergillus fumigatus* (Varga és Tóth, 2003) fajokhoz hasonlóan – valószínűleg nincsenek ilyen szubpopulációk, tehát mindegyik *T. longibrachiatum* törzs képes lehet megbetegedést okozni. A *T. longibrachiatum* törzsek biológiai védekezés céljaira történő mezőgazdasági alkalmazásának tervezése (Migheli és mtsai. 1998; Sánchez és mtsai. 2007) ezért nem javasolt, biotechnológiai alkalmazásuk (Sidhu és Sandhu, 1980) pedig – potenciális opportunistáknak humán patogén fajról lévén szó – csak megfelelő óvintézkedések betartása mellett javasolt.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Különböző élőhelyekről (búzafield, rizsfield, csiperke termesztésére alkalmazott komposzt, laskagomba termesztésére alkalmazott szubsztrátum, klinikai minták) összesen 400 *Trichoderma* törzset izoláltunk. Elvégeztük az izolátumok fajszintű azonosítását, ökofiziológia jellemzését, és diagnosztikai módszereket dolgoztunk ki több, gyakorlati szempontból jelentős faj, illetve törzs specifikus kimutatása/nyomonkövetése céljából.

A tézisekben ismertett kutatások legfontosabb új eredményei a következők:

A mezőgazdasági területekről izolált *Trichoderma* törzsek vizsgálata során:

- hazánkban elsőként mutattuk ki a *T. rossicum*, *T. spirale*, *T. brevicompactum* és *T. oblongisporum* fajok előfordulását,
- a *T. harzianum*, *T. virens* és *T. atroviride* fajok esetében új genotípusokat azonosítottunk,
- kidolgoztunk egy új, az *in vitro* antagonizmus-tesztek képanalízisén alapuló módszert (biokontroll index meghatározása), mely megfelelő szabványosított körülmények között lehetőséget teremt a fonalgomba-törzsek biokontroll sajátosságainak mennyiségi kiértékelésére,
- egy, a *R. solani* által okozott szárhüvelybarnulás elleni biológiai védekezésre kiválóan alkalmas *T. harzianum* törzsre kidolgoztunk egy SCAR-indítószekvenciákon alapuló PCR-módszert, mely alkalmas a biokontroll törzs specifikus kimutatására és nyomonkövetésére.

A gombatermesztésből izolált *Trichoderma* törzsek vizsgálata során:

- hazánkban elsőként mutattuk ki a *T. ghanense* faj előfordulását,
- megállapítottuk, hogy a laskagomba zöldpenészes fertőzéséért hazánkban is a közelmúltban leírt *T. pleurotum* és *T. pleuroticola* fajok felelősek,
- elvégeztük a két újonnan leírt laskapatogén *Trichoderma* faj tudományos igényeknek megfelelő molekuláris taxonómiai és fiziológiai jellemzését,
- kidolgoztunk egy, a két laskapatogén *Trichoderma* faj kimutatását és egymástól történő elkülönítését lehetővé tevő, multiplex PCR-en alapuló diagnosztikai módszert, mely közvetlenül a laskagomba termesztésére alkalmazott, szalmaalapú szubsztrátumból is képes kimutatni a fajok jelenlétét,
- kimutattuk a *T. pleuroticola* előfordulását a vadon termő laskagomba természetes szubsztrátumában, mely eredményeink alapján a termesztőüzemekben bekövetkező *T. pleuroticola*-fertőzések természetes rezervoárja lehet,
- laskagomba termesztőhelyeiből származó, légyapapír segítségével elfogott rovarok felszínén kimutattuk a *T. pleurotum* és *T. pleuroticola* fajok előfordulását, igazolva azt a feltételezést, hogy a laskagomba zöldpenészes fertőzésének terjesztésében szerepet játszhatnak a termesztőhelyekben jelenlévő rovarok,
- kimutattuk, hogy a hazai csiperketermesztésben jelentkező zöldpenészes fertőzéseket a *T. aggressivum* f. *europaeum* faj 1980-as években, Írországban felbukkant genotípusával megegyező genotípusú törzs okozza, tehát a Nyugat-Európai csiperkevész kórokozója érte el Magyarországot.

A klinikai mintákból izolált *Trichoderma* törzsek vizsgálata során:

- megállapítottuk, hogy a törzsek döntő többsége a *Trichoderma* nemzetség *Longibrachiatum* szekciójába, azon belül is a *T. longibrachiatum* fajba tartozik, a más szekcióba tartozó fajok előfordulásáról szóló tudósítások a legtöbb esetben pontatlanok voltak,
- igazoltuk, hogy a *T. longibrachiatum*-mal közeli rokon, de szexuális reprodukciós stratégiát alkalmazó *H. orientalis* is képes humán fertőzéseket okozni,
- hazánkban elsőként mutattuk ki a *T. longibrachiatum* és *H. orientalis* fajokat klinikai mintákból,
- megállapítottuk, hogy a cellulóz-acetát elektroforézisen alapuló izoenzim-analízis módszere alkalmas a *T. longibrachiatum* és a *H. orientalis* fajok gyors azonosítására és tipizálására, így diagnosztikai célokra történő felhasználása is elképzelhető,
- molekuláris biológiai és biokémiai tipizálási vizsgálataink eredményei alapján a *T. longibrachiatum* fajon belül valószínűleg nincsenek patogén és nem patogén szubpopulációk, tehát mindegyik *T. longibrachiatum* törzs képes lehet megbetegedést okozni.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Andersson MA, Nikulin M, Koljalg U, Andersson MC, Rainey F, Reijula K, Hintikka EL, Salkinoja-Salonen M. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 63: 387-393 (1997).
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J MOL BIOL* 215: 403-410. (1990)
- Antal Z, Manczinger L, Szakács G, Tengerdy RP, Ferenczy L. Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *MYCOL RES* 104: 545-549. (2000)
- Antal Z, Kredics L, Manczinger L, Ferenczy L. Extracellular enzyme profiles of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *IOBC/WPRS BULL* 24: 337-340. (2001)
- Antal Z, Kredics L, Szekeres A, Manczinger L, Hatvani L, Nagy E. Klinikai mintákból izolált *Trichoderma* törzsek extrakromoszomális elemeinek vizsgálata. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium: Előadás kivonatok. 2004. pp. 2-3.
- Antal Z, Kredics L, Pakarinen J, Dóczy I, Andersson M, Salkinoja Salonen M, Manczinger L, Szekeres A, Hatvani L, Vágvölgyi C, Nagy E. Comparative study of potential virulence factors in human pathogenic and saprophytic *Trichoderma longibrachiatum* strains. *ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG* 52: 341-350 (2005)
- Antal Z, Kredics L, Varga J, Hatvani L, Szekeres A, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E. Double stranded DNA plasmids in the mitochondria of *Trichoderma* strains associated with green mould disease. *ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG* 53:(3) 240 (2006a)
- Antal Z, Varga J N, Kredics L, Szekeres A, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E. Intraspecific mitochondrial DNA polymorphism within the emerging filamentous fungal pathogen *Trichoderma longibrachiatum*. *J MED MICROBIOL* 55: 31-35 (2006b)
- Benhamou N, Chet I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold chemistry of the mycoparasitic process. *PHYTOPATHOLOGY* 83: 1062-1071. (1993)
- Benhamou N, Chet I. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 63: 2095-2099. (1997)
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7: 249-260. (2004)
- Besoain XA, Pérez LM, Araya A, Lefever L, Sanguinetti M, Montealegre JR. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici*. *ELECTRON J BIOTECHN* 10: (4) <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue4/full/16/> (2007)
- Biely P, Côté GL, Kremnický L, Greene RV, Tenkanen M. Action of acetylxylan esterase from *Trichoderma reesei* on acetylated methyl glycosides. *FEBS LETT* 420: 121-124. (1997)
- Bisby GR. *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. *TRANS BRIT MYCOL SOC* 23: 149-168. (1939)
- Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Sect. *Longibrachiatum* sect. nov. *CAN J BOT* 62: 924-931. (1984)
- Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *CAN J BOT* 69: 2357-2372. (1991a)
- Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. *Pachybasium*. *CAN J BOT* 69, 2373-2417. (1991b)
- Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *CAN J BOT* 69: 2418-2420. (1991c)
- Bissett J. *Trichoderma atroviride*. *CAN J BOT* 70: 639-641. (1992)
- Bulat SA, Lübeck M, Alekhina IA, Jensen DF, Knudsen IMB, Lübeck PS. Identification of a universally primed-PCR-derived Sequence-Characterized Amplified Region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 66: 4758-4763. (2000)
- Cacais AOG, Silveira FQP, Filho EXF. Production of xylan-degrading enzymes by a *Trichoderma harzianum* strain. *BRAZ J MICROBIOL* 32: 141-143. (2001)
- Calistru C, McLean M, Berjak P. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *A study of the production of extracellular metabolites by Trichoderma species*. *MYCOPATHOLOGIA* 137: 115-124. (1997)
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D. és Bissett, J. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 64: 133-137. (1998)

- Chaverri P, Castlebury LA, Samuels GJ, Geiser D. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *MOL PHYLOGENET EVOL* 27: 302-313. (2003)
- Chen X, Romaine CP, Ospina-Giraldo MD, Roysse DJ. A polymerase chain reaction-based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mold epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* 52: 246-250. (1999)
- De Azevedo AMC, De Marco JL, Felix CR. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *FEMS MICROBIOL LETT* 188: 171-175. (2000)
- De la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benítez T, Llobell A. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitisms. *J BACTERIOL* 177: 1864-1871. (1995)
- Dodd SL, Crowhurst RN, Rodrigo AG, Samuels GJ, Hills RA, Stewart A. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *MYCOL RES* 104: 23-34. (2000)
- Doi Y, Abe Y, Sugiyama J. *Trichoderma* sect. *Saturnisporum*, sect. nov. and *Trichoderma ghanense*, sp. nov. *Bull Nat Sci Museum Ser B (Botany)* 12: 1-9. (1987)
- Dóczy I, Dósa E, Varga J, Antal Z, Kredics L, Nagy E. Etest for assessing the susceptibility of filamentous fungi. *ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG* 51: 271-281 (2004)
- Druzhinina IS, Koptchinski A, Komon M, Bissett J, Szakács G, Kubicek CP. A DNA-barcode for strain identification in *Trichoderma*. *FUNGAL GENET BIOL* 42: 813-828. (2005)
- Druzhinina I, Kubicek CP. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J ZHEJIANG UNIV SCI* 6B, 100-112. (2005)
- Druzhinina IS, Komoń-Zelazowska M, Kredics L, Hatvani L, Antal Z, Belayneh T, Kubicek CP. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable to cause invasive MYCOSES of humans. *MICROBIOL-SGM* 154: 3447-3459 (2008)
- Elad Y, Chet I, Henis Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *CAN J MICROBIOL* 28: 719-725. (1982)
- Elad Y. *Trichoderma harzianum* T39 Preparation for Biocontrol of Plant Diseases-Control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *BIOCONTROL SCI TECHNOL* 10: 499- 507. (2000)
- Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.57c. Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle. (1995)
- Gams W, Bissett J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., Harman GE. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd., London, p. 3-34. (1998)
- Gherbawy Y, Druzhinina I, Shaban GM, Wuczkowsky M, Yaser M, El-Naghy MA, Prillinger HJ, Kubicek CP. *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *MYCOL PROG* 3: 211-218. (2004)
- Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, Steiner W, Zupancic S. Production of fungal xylanases. *BIORES TECHNOL* 58: 137. (1996)
- Haran S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *MYCOL RES* 99: 441-446. (1995)
- Harman GE, Howel CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *NATURE REV MICROBIOL* 2: 43-55. (2004)
- Hatvani L, Manczinger L, Kredics L, Szekeres A, Antal Z, Vágvölgyi C. Production of *Trichoderma* strains with pesticide-poliresistance by mutagenesis and protoplast fusion. *ANTON LEEUW INT J G* 89: 387-393 (2006)
- Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nagy A, Nagy E, Vágvölgyi C, Kredics L. Green mould diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *PHYTOPATHOLOGY* 97: 532-537 (2007a)
- Hatvani L, Kocsuó S, Manczinger L, Druzhinina IS, Kubicek CP, Vágvölgyi C, Kredics L. A PCR-based test for the rapid detection of *Trichoderma pleurotophilum* and *T. fulvidum*, the causative agents of the newly emerged worldwide green mold disease of *Pleurotus ostreatus*: *INT J MED MUSHROOMS* 9: 309-310 (2007b)
- Hatvani L. Isolation, characterization and improvement of *Trichoderma* strains with mycoparasitic activity. PhD-értekezés, Témavezetők: Kredics L, Manczinger L. Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék (2008)
- Hatvani L, Kocsuó S, Manczinger L, Antal Z, Szekeres A, Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Kubicek CP, Nagy A, Vágvölgyi C, Kredics L. The green mould disease global threat to the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*): a review. In: Gruening M (szerk.) Science and cultivation of edible and

- medicinal fungi: Mushroom Science XVII : Proceedings of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science, Cape Town, South Africa, 20–24 May 2008. Cape Town, Dél-Afrika, pp. 485-495. (2008a)
- Hatvani L, Kocsubé S, Manczinger L, Druzhinina IS, Kubicek CP, Vágvölgyi C, **Kredics L**. Specific PCR reveals that the substrate of wild grown *Pleurotus ostreatus* is a potential source of green mould affecting oyster mushroom production. Sixth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 29th September - 3rd October, 2008, Bonn, Germany, Programme and Abstracts p 57. (2008b)
- Hatvani L, Sarrocco S, Vannacci G, Forti M, Manczinger L, Vágvölgyi C, **Kredics L**. Involvement of extracellular enzyme systems in the pathogenesis of *Trichoderma pleurotum* towards oyster mushroom. FEMS 2009: 3rd Congress of European Microbiologists, Book of Abstracts, in press (2009)
- Hägglund P, Eriksson T, Collén A, Nerinckx W, Claeysens M, Stålbrand H. A cellulose-binding module of the *Trichoderma reesei* β -mannanase Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex substrates. J BIOTECHNOL 101: 37-48. (2003)
- Hebert PDN, Beaton MJ. Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis. A Practical Handbook. Helena Laboratories, Beaumont, Texas. (1993)
- Hermosa MR, Grondona I, Monte E. Isolation of *Trichoderma harzianum* Th2 from commercial mushroom compost in Spain. PLANT DIS 83: 591. (1999)
- Herrera-Estrella A, Chet I. The biological control agent *Trichoderma*: from fundamentals to applications. In: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications (Arora DK, Bridge PD, Bhatnagar D. szerk.), pp. 147–156. Marcel Dekker, New York (2003)
- Jaklitsch WM, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS. *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a whited-spored *Trichoderma* anamorph. MYCOLOGIA 98: 500-514. (2006)
- Karaffa L, Fekete E, Gamauf C, Szentirmai A, Kubicek CP, Seiboth BD. Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. MICROBIOLOGY-SGM 152: 1507-1514. (2006)
- Kindermann J, El-Ayouti Y, Samuels GJ, Kubicek CP. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA clade. FUNGAL GENET BIOL 24: 298-309. (1998)
- Kocsubé S, Naeimi S, Antal Z, Okhovvat SM, Javan-Nikkhah M, Vágvölgyi C, **Kredics L**. UP-PCR based SCAR-primers for the specific detection and monitoring of a *Trichoderma harzianum* isolate selected for the biological control of rice sheath blight. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és a XI. Fermentációs Kollokvium, Absztraktfüzet, pp. 40-41. (2008)
- Komoń-Zelazowska M, Bissett J, Zafari D, Hatvani L, Manczinger L, Woo S, Lorito M, **Kredics L**, Kubicek CP, Druzhinina IS. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause world-wide green mould disease in oyster mushroom farms. APPL ENVIRON MICROB 73: 7415-7426 (2007)
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS. *TrichoBLAST*: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. Mycol. Res. 109: 657–660. (2005)
- Körmöczy P, Cseh T. Laskagomba zöldpenészes fertőzését okozó *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai, enzimológiai és epidemiológiai vizsgálata. TDK-dolgozat, témavezető: **Kredics L**. Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék (2008)
- Kredics L**, Antal Z, Manczinger L. Influence of water potential on growth, enzyme secretion and *in vitro* enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. CURR MICROBIOL 40: 310-314 (2000)
- Kredics L**, Antal Z, Manczinger L, Nagy E. Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance. LETT APPL MICROBIOL 33: 112-116 (2001a)
- Kredics L**, Dóczy I, Antal Z, Manczinger L. Effect of heavy metals on growth and extracellular enzyme activities of mycoparasitic *Trichoderma* strains. B ENVIRON CONTAM TOX 66: 249-254 (2001b)
- Kredics L**, Antal Z, Dóczy I, Manczinger L, Kevei F, Nagy E. Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 50: 105-117. (2003a)
- Kredics L**, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. FOOD TECHNOL BIOTECH 41: 37-42 (2003b)
- Kredics L**, Antal Z, Varga J, Manczinger L, Szekeres A, Kocsubé S, Dóczy I, Ládai M, Kevei F, Nagy E. Genetic variability and antifungal susceptibilities of clinical *Trichoderma* isolates. In: Monduzzi Editore (szerk.) Trends in Medical Mycology. Bologna: Monduzzi Editore, pp. 133-136. (2003c)
- Kredics L**, Manczinger L, Antal Z, Péntes Z, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. J APPL MICROBIOL 96: 491-498 (2004a)
- Kredics L**, Antal Z, Szekeres A, Manczinger L, Dóczy I, Kevei F, Nagy E. Production of extracellular proteases by human pathogenic *Trichoderma longibrachiatum* strains. ACTA MICROBIOL IMMUNOL

- HUNG 51: 283-295 (2004b)
- Kredics L**, Antal Z, Szekeres A, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E. Extracellular proteases of *Trichoderma* species. A review. ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 52: 169-184 (2005a)
- Kredics L**, Antal Z, Dóczy I, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E. Anti-fungal susceptibility testing of clinical and non-clinical *Trichoderma longibrachiatum* isolates. MYCOSES 48: (S2) 84 (2005b)
- Kredics L**, Dóczy I, Antal Z, Bartyik K, Molnár EG, Manczinger L, Hatvani L, Vágvölgyi C, Nagy E. Emergence of the filamentous fungal opportunist *Trichoderma longibrachiatum* in Hungary. ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 53: 305 (2006)
- Kredics L**. Penészinvázió: Bajban a gombatermesztők. ÉLET ÉS TUDOMÁNY LXIII:(25) 777-779 (2008)
- Kredics L**, Cseh T, Körmöczy P, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C. Extracellular enzyme production of the two causative agents of oyster mushroom green mould under inductive and non-inductive conditions. Sixth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 29th September - 3rd October, 2008, Bonn, Germany, Programme and Abstracts p 48. (2008a)
- Kredics L**, Kocsubé S, Manczinger L, Antal Z, Szekeres A, Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Kubicek CP, Vágvölgyi C, Hatvani L. Detection of *Trichoderma pleurotum* and *T. pleuroticola*, the causative agents of oyster mushroom green mould in the cultivation substrate of *Pleurotus ostreatus* by a PCR-based test. ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 55: 209-210 (2008b)
- Kredics L**, Körmöczy P, Cseh T, Hatvani L, Manczinger L, Nagy A, Vágvölgyi C. Green mould disease of oyster mushroom in Hungary and Romania: ecophysiology of the causative agents. In: Kiss, I (szerk): Proceedings of the 10th INTERNATIONAL SYMPOSIUM "INTERDISCIPLINARY REGIONAL RESEARCH", Hunedoara, Romania, 23-24 April, 2009, CD-ROM, paper S3-10, pp. 1-6. (2009a)
- Kredics L**, Cseh T, Körmöczy P, Nagy A, Kocsubé S, Manczinger L, Vágvölgyi C, Hatvani L. A termesztett laskagomba zöldpenészes fertőzése. MIKOL KÖZL CLUSIANA in press (2009b)
- Kremnický L, Mastihuba V, Côté GL. *Trichoderma reesei* acetyl esterase catalyzes transesterification in water. J MOL CATAL B: ENZYM 30: 229-239. (2004)
- Kubicek CP. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. ADV BIOCHEM ENG BIOTECHNOL 45: 1-27. (1992)
- Kubicek CP, Penttilä ME. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis Ltd., London, p.49-71. (1998)
- Kubicek CP. Molecular biology of biocontrol *Trichoderma* In: Arora D.K., Bridge P.D., Bhatnagar, D. (Eds.), Fungal biotechnology in agricultural food and environmental applications, Marcel Dekker Inc., New York, p. 135-145. (2003)
- Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger CM, Szakács G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. FUNGAL GENET BIOL 38: 310-319. (2003)
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Börner T, Kubicek CP. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. PROC NATL ACAD SCI USA 93: 7755-7760. (1996)
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Börner T, Gueho E Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. MED MYCOL 37: 25-33. (1999)
- Kulminkayaa AA, Eneiskayaa EV, Isaeva-Ivanovaa LS, Savel'ev AN, Sidorenkoa IA, Shabalina KA, Golubeva AM, Neustroeva KN. Enzymatic activity and β -galactomannan binding property of α -mannosidase from *Trichoderma reesei*. ENZYME MICROB TECHNOL 25: 372-377. (1999)
- Kullnig CM, Szakács G, Kubicek CP. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. MYCOL RES 104: 1117-1125. (2000)
- Kullnig-Gradinger CM, Szakács G, Kubicek CP. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma*-a multigene approach. MYCOL RES 106: 757-767. (2002)
- Lewis JA, Larkin RP. Extruded granular formulation with biomass of biocontrol *Gliocladium virens* and *Trichoderma* spp. to reduce damping-off of eggplant caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soil-less mix. BIOCONTROL SCI TECHNOL 7: 49- 60. (1997)
- Lübeck M, Alekhina IA, Lübeck PS, Jensen DF, Bulat SA. Delineation of *Trichoderma harzianum* into two different genotypic groups by a highly robust fingerprinting method, UP-PCR, and UP-PCR product cross-hybridization. MYCOL RES 103: 289-298. (1999)
- Mamoun ML, Savoie JM, Olivier JM. Interactions between the pathogen *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost. MYCOLOGIA 92: 233-240. (2000)
- Manczinger L, Antal Z, **Kredics L**. Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains (a review). ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 49: 1-14. (2002)
- Margolles-Clark E, Saloheimo M, Siika-aho M, Penttilä M. The α -glucuronidase-encoding gene of *Trichoderma reesei*. Gene 172: 171-172. (1996)

- Markovič O, Slezárik A, Labudová I. Purification and characterization of pectinesterase and polygalacturonase from *Trichoderma reesei*. FEMS MICROBIOL LETT 27: 267-271. (1985)
- Matos T, Haase G, Van Den Ende AHGG, De Hoog GS. Molecular diversity of oligotrophic and neurotrophic members of the black yeast genus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis*. ANTON LEEUW INT J G 83: 293-303. (2003)
- Migheli Q, González-Candelas L, Dealessi L, Camponogara A, Ramón-Vidal D. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the beta-1,4-endoglucanase gene *eglI* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. Phytopathology 88: 673-677. (1998)
- Mohamed SA, Christensen TMIE, Mikkelsen JD. New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. CARBOHYDR RES 338: 515-524. (2003)
- Mumpuni A, Sharma HSS, Brown AE. Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. APPL ENVIRON MICROBIOL 64: 5053-5056. (1998)
- Muthumeenakshi S, Mills PR, Brown-Averil E, Seaby D. A. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. MICROBIOLOGY (UK) 140: 769-777. (1994)
- Muthumeenakshi S, Brown AE, Mills PR. Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and the British Isles. MYCOL RES 102: 385-390. (1998)
- Naár Z, Kecskés M. A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotinia minor*. MICROBIOL RES 150: 239-246. (1995)
- Naeimi S, Kocsubé S, Okhovvat SM, Javan-Nikkhah M, Vágvölgyi C, Kredics L. Biodiversity of the genus *Trichoderma* on rice fields in Northern Iran. ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 55: 226-227 (2008a)
- Naeimi S, Okhovvat SM, Javan-Nikkhah M, Khosravi V, Vágvölgyi C, Kredics L. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the casual agent of rice sheath blight disease, with *Trichoderma* strains in Iran. ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 55: 225-226 (2008b)
- Naeimi S, Okhovvat SM, Javan-Nikkhah M, Kredics L, Khosravi V. Introducing *Trichoderma* spp. isolated from rice fields in Mazandaran province, Iran. 18th Iranian Plant Protection Congress, 24-27 August 2008, Book of Abstracts (ed. Abbasi M) p 626 (2008c)
- Naseby DC., Pascual JA., Lynch JM. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. J APPL MICROBIOL 88: 161-169. (2000)
- Nogawa M, Yatsui K, Tomioka A, Okada H, Morikawa Y. An α -L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* containing a noncatalytic xylan-binding domain. APPL ENVIRON MICROBIOL 65: 3964-3968. (1999)
- Ospina-Giraldo MD, Royse DJ, Thon MR, Chen X, Romaine CP. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* from world-wide sources. MYCOLOGIA 90: 76-81. (1998)
- Ospina-Giraldo MD, Royse DJ, Chen X, Romaine CP. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. PHYTOPATHOLOGY 89: 308-313. (1999)
- Pacheco-Chávez, R.A., Carvalho, J.C.M., Converti, A., Perego, P., Tavares, L.C., Sato, S. Production of α -amylase and glucoamylase from different starches by a new *Trichoderma* sp. isolate. ANN MICROBIOL 54: 169-180. (2004)
- Papavizas GC. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. ANNU REV PHYTOPATHOL 23: 23-54. (1985)
- Park MS, Bae KS, Yu SH. Molecular and morphological analysis of *Trichoderma* isolates associated with green mold epidemic of oyster mushroom in Korea. J Huazhong Agric Univ 23: 157-164. (2004)
- Park MS, Bae KS, Yu SH. Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. MYCOBIOLOGY 34: 111-113. (2006)
- Persoon CH. (1794) Dispositio methodica fungorum in classes, ordines, familias et genera. In: Römer JJ. (Ed.), Neues Magazin für Botanik. Ziegler und Söhne, Zürich, p. 63-128.
- Rainer J, De Hoog GS, Wedde M, Graser Y, Gilges S. Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. J CLIN MICROBIOL 38: 3267-3273. (2000)
- Rifai MA. A revision of the genus *Trichoderma*. MYCOL PAP 116: 1-116. (1969)
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. BIOINFORMATICS 19: 1572-1574. (2003)
- Sahai AS, Manocha MS. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite

- interaction. *FEMS MICROBIOL REV* 11: 317-338. (1993)
- Samuels GJ. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *MYCOL RES* 100: 923-935. (1996)
- Samuels GJ, Petrini O, Kuhls K, Lieckfeldt E, Kubicek CP. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *STUD MYCOL* 41: 1-54. (1998)
- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA, Petrini O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *MYCOLOGIA* 94: 146-170. (2002)
- Sánchez V, Rebolledo O, Picaso RM, Cárdenas E, Córdova C, González O, Samuels GJ. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *MYCOPATHOLOGIA* 163: 49-58. (2007)
- Savel'ev AN, Eneyskaya EV, Isaeva-Ivanova LS, Shabalin KA, Golubev AM, Neustroev KN. The carbohydrate moiety of α -galactosidase from *Trichoderma reesei*. *GLYCOCONJ J* 14: 897-905. (1997)
- Seaby D. *Trichoderma* as a weed mould or pathogen in mushroom cultivation. In: C. P. Kubicek és G. E. Harman (szerk.): *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis, London, pp. 267-287. (1998)
- Seiboth B, Hartl L, Salovuori N, Lanthaler K, Robson GD, Vehmaanpera J, Penttila ME, Kubicek CP. Role of the bga1-encoded extracellular beta-galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 71: 851-857. (2005)
- Sidhu MS, Sandhu DK. Single cell protein production by *Trichoderma longibrachiatum* on treated sugar-cane bagasse. *BIOTECHNOL BIOENG* 22: 689-692. (1980)
- Sivan A, Chet I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J GEN MICROBIOL* 135: 675-682. (1989)
- Sivan A, Chet I. Integrated control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization. *CROP PROT* 12: 380-386. (1993)
- Sivasithamparam K, Ghisalberti EL. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd., London, p.139-191. (1998)
- Sundell N, Kredics L, Andersson M, Antal Z, Salkinoja-Salonen M. Biological activity of toxins produced by environmental, indoor and clinical *Trichoderma longibrachiatum* isolates. *ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG* 53: 339-340 (2006)
- Szekeres A, Kredics L, Antal Z, Kevei F, Manczinger L. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS MICROBIOL LETT* 233: 215-222 (2004a)
- Szekeres A, Ládai M, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L. Investigation of *Trichoderma* strains isolated from winter wheat rhizosphere. *IOBC-WPRS BULL* 27: 155-158 (2004b)
- Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L, Vágvolgyi C. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma* – a review. *ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG* 52: 137-168. (2005a)
- Szekeres A, Hatvani L, Manczinger L, Vágvolgyi C, Leitgeb B, Péntzes Z, Kredics L, Antal Z. Biocontrol properties and hydrolytic enzymes of *Trichoderma* strains isolated from Hungarian winter wheat rhizosphere. In: BioMicroWorld-2005, 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Book of Abstracts. p. 918. (2005b)
- Szekeres A, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L, Vágvolgyi C. Genetic diversity of *Trichoderma* strains isolated from winter wheat rhizosphere in Hungary. *ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG* 52: 156 (2005c)
- Szekeres A, Kredics L, Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Nagy A, Vágvolgyi C. Investigation of peptide antibiotics produced by *Trichoderma* strains isolated from winter wheat rhizosphere. *J BIOTECHNOL* 118: (S1) 116 (2005d)
- Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L, Vágvolgyi C. Relationship between taxonomic positions and biocontrol properties of *Trichoderma* isolates from Hungary. *ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG* 52: (S) 156-157 (2005e)
- Szekeres A. Hazai talajmintákból izolált *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai és molekuláris vizsgálata. PhD-értekezés, Szegedi Tudományegyetem (2006)
- Szekeres A, Ládai M, Kredics L, Varga J, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L, Vágvolgyi C, Nagy E. Rapid identification of clinical *Trichoderma longibrachiatum* isolates by cellulose-acetate electrophoresis mediated isoenzyme analysis. *CLIN MICROBIOL INFEC* 12: 369-375 (2006a)
- Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Manczinger L, Vágvolgyi C. A novel, image analysis-based method for the evaluation of *in vitro* antagonism. *J MICROBIOL METH* 65: 619-622 (2006b)
- Szekeres A, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L, Vágvolgyi C. New genotypes of *Trichoderma* detected in Hungarian soil samples. *ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG* 53: 346-347 (2006c)
- Szekeres A, Leitgeb B, Péntzes Z, Kredics L, Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Vágvolgyi C. Proteases of *Trichoderma* strains from Hungarian winter wheat rhizosphere. In: Méndez-Vilas A (szerk.) *Modern*

- Multidisciplinary Applied Microbiology. Exploiting Microbes and Their Interactions. Weinheim: Wiley - VCH, pp. 664-668. (2006d)
- Tangarone B, Royer JC, Nakas JP. Purification and characterization of an endo-(1,3)- β -D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. APPL ENVIRON MICROBIOL 55: 177-184. (1989)
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. FUNGAL GENET BIOL 31: 21-32. (2000)
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882. (1997)
- Thrane U, Poulsen SB, Nirenberg HI, Lieckfeldt E. Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. FEMS MICROBIOL LETT 203: 249-255. (2001)
- Turner D, Kovacs W, Kuhls K, Lieckfeldt E, Peter B, Arisan-Atac I, Strauss J, Samuels GJ, Börner T, Kubicek CP. Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. MYCOL RES 101: 449-459. (1997)
- Ulhoa CJ, Peberdy JF. Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. CURR MICROBIOL 23: 285-289. (1991)
- Ulhoa CJ, Peberdy JF. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14: 236-240. (1992)
- Van Tilburg AUB, Thomas MD. Production of Extracellular Proteins by the Biocontrol Fungus *Gliocladium virens*. APPL ENVIRON MICROBIOL 59: 236-242 (1993)
- Varga J, Kevei F, Fekete C, Coenen AF, Kozakiewicz Z, Croft JH. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. MYCOL RES 97: 1207-1212. (1993)
- Varga J, Tóth B. Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus*: a review. INFECT GENET EVOL 3: 3-17. (2003)
- Vázquez-Garciduenas S, Leal-Morales CA, Herrera-Estrella A. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. APPL ENVIRON MICROBIOL 64: 1442-1446. (1998)
- Woo SL, Di Benedetto P, Senatore M, Abadi K, Gigante S, Soriente I, Ferraioli S, Scala F, Lorito M. Identification and characterization of *Trichoderma* species aggressive to *Pleurotus* in Italy. J ZHEJIANG UNIV AGRIC LIFE SCI 30: 469-470. (2004)
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego p. 315-322. (1990)
- Wuczowski M, Druzhinina I, Gherbawy Y, Klug B, Prillinger H, Kubicek CP. Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. MICROBIOL RES 158: 125-133. (2003)
- Yu SH. Integrated control of oyster mushroom green mould. <http://www.mushworld.com> (2002)
- Zeilinger S, Kristufek D, Arisan-Atac I, Hodits R, Kubicek CP. Conditions of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. APPL ENVIRON MICROBIOL 59: 1347-1353. (1993)

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton fejezem ki hálás köszönetemet:

- **Dr. Vágvölgyi Csabának**, valamint **Dr. Kevei Ferencnek**, **Prof. Ferenczy Lajosnak** (SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék) és **Prof. Nagy Erzsébetnek** (MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport), hogy tanszékvezetőként ill. kutatócsoportvezetőként messzemenően támogatták kutatómunkámat,
 - A SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékéről **Dr. Manczinger Lászlónak**, **Dr. Antal Zsuzsannának**, **Dr. Szekeres Andrásnak**, **Dr. Hatvani Lórántnak**, **Kocsubé Sándornak**, **Körmöczy Péternek**, **Cseh Tímeának**, **Nagy Lászlónak**, **Terecskei Katának**, **Sajben Enikőnek**, **Dr. Varga Jánosnak**, **Dr. Papp Tamásnak**, **Dr. Gácser Attilának** és **Németh Tibor Mihálynak** az eredményekben gazdag, közös kutatómunkáért, **Lele Máriának** a laboratóriumi munkában feladatkörét messze meghaladóan nyújtott technikai segítségéért, **Dr. Palágyi Andrásnének** és **Kreisch Zsuzsannának** a pályázatok kezeléséhez szükséges, és egyéb adminisztrációs feladatok elvégzésében nyújtott értékes segítségükért, továbbá **a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi munkatársának és hallgatójának**, akik tapasztalataik megosztásával segítőkészségükkel és emberségükkel hozzájárultak munkám eredményességéhez,
 - **Prof. Christian P. Kubicek-nek**, **Dr. Irina Druzhininá-nak**, **Dr. Monika Komoń-Zelazowská-nak**, **Dr. Monika Schmoll-nak** (Research Division "Gene Technology and Applied Biochemistry", Institute of Chemical Engineering and Applied Life Sciences, Vienna University of Technology, Ausztria), **Prof. Mirja Salkinoja-Salonen-nek**, **Dr. Maria Andersson-nak** (Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finnország), **Shahram Naeimi-nek** (Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Irán), **Palanisamy Manikandan-nak** (Ocular Microbiology Laboratory, Aravind Eye Hospital, Coimbatore, Tamilnadu, India), **Dóczi Ilonának** (SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai és Diagnosztikai Intézet), **Láday Miklósnak** (MTA Növényvédelmi Kutatóintézet, Növénykórtani Osztály) és **Leitgeb Balázsnak** (MTA SZBK Biofizikai Intézet) a szakmailag inspiráló, gyümölcsöző együttműködésekért,
- valamint családomnak: **Feleségemnek**, **Szüleinknek** és **Kisfiunknak** szeretetükért, türelmükért, megértő támogatásukért és biztatásukért.