



Szent István Egyetem

Növénykártevő fonalférgék visszaszorításának lehetősége nematóda-csapdázó és *Trichoderma* gombák segítségével: *in vitro* konfrontációs és génexpressziós vizsgálatok *Caenorhabditis elegans* modellrendszer felhasználásával

Doktori (PhD) értekezés

Szabó Márton

Gödöllő
2014

Doktori iskola: Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Helyes Lajos
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Intézet

Tudományág: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Témavezetők: Dr. Fekete Csaba
egyetemi docens, PhD, tanszékvezető
PTE Természettudományi Kar
Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszék

Dr. Virányi Ferenc
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Kutatóintézet

.....
Dr. Fekete Csaba
témavezető

.....
Dr. Virányi Ferenc
témavezető

.....
Dr. Helyes Lajos
doktori iskola vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A fonálférgekről röviden	7
2.2. A fonálférgek általános testfelépítése.....	8
2.3. A fonálféregpete általános bemutatása	8
2.4. A <i>Caenorhabditis elegans</i> , mint modellszervezet.....	9
2.5. Növénykártévő fonálférgek	10
2.6. Növénykártévő fonálférgek elleni védekezés.....	11
2.6.1. A fonálférgek elleni kémiai védekezés	11
2.6.2. Megelőzés.....	13
2.6.3. Mikrobiális biopeszticidek	13
2.7. Biokontroll szervezetek kombinálhatósága	15
2.8. Nematofág gombák	16
2.9. A <i>Trichoderma</i> nemzetség	18
2.9.1. <i>Trichoderma</i> fajok a növényvédelmi gyakorlatban.....	18
2.9.2. <i>Trichoderma</i> fajok a növénykártévő fonálférgek ellen (tények, lehetőségek)	20
2.9.3. A <i>Trichoderma</i> fajok biokontroll hatásának háttérében meghúzódó tulajdonságok és jelenségek.....	21
2.9.4. Kitinolitikus enzimrendszer.....	22
2.9.5. Proteolitikus enzimrendszer	23
2.9.6. Mikoparazita interakció.....	26
2.9.7. Antibiózis	27
2.9.8. Szaprobionta kompetíció	29
2.9.9. Egyéb biokontroll tulajdonságok.....	31
3. Anyag és módszer	33
3.1. Nematóda-csapdázó gombák és tenyésztésük	33
3.2. <i>Trichoderma</i> törzsek és tenyésztésük	33
3.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> tenyésztése	33
3.4. Nematóda-csapdázó gombák és a <i>Trichoderma</i> fajok növekedési-tesztje	34
3.5. Nematóda-csapdázó gombák és a <i>Trichoderma</i> fajok direkt konfrontációs-tesztje.....	35
3.6. <i>Trichoderma</i> törzsek peteparazita képességének megállapítása	35
3.7. Mikroszkópos megfigyelések	36
3.8. <i>T. harzianum</i> SZMC 1647 – <i>C. elegans</i> pete direkt interakciója génexpressziós kísérletekhez.....	37
3.9. Génexpressziós vizsgálatok.....	38
4. Eredmények és megvitatásuk	41
4.1. <i>Trichoderma</i> spp. és nematóda-csapdázó gombák kombinálhatósága.....	41
4.2. <i>Trichoderma</i> spp. – <i>C. elegans</i> pete interakció	45
4.3. <i>T. harzianum</i> kitino- és proteolitikus enzimeit kódoló gének transzkripciós vizsgálata <i>C. elegans</i> peteparazitizmus során	47
4.3.1. Endokitináz enzimeket kódoló gének transzkripciós aktivitása	48
4.3.2. Szerin endopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripciós aktivitása.....	50
4.3.3. Aszpartil endopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripciós aktivitása.....	56
4.3.4. Metalloendopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripciós aktivitása.....	59
4.3.5. A kitináz és endopeptidáz kódoló gének relatív génexpressziós mintázatainak összehasonlítása ...	61
4.4. Új tudományos eredmények	63
5. Összefoglalás	65
6. Summary	67
7. Irodalomjegyzék	69
Köszönetnyilvánítás	85

1. BEVEZETÉS

A gazdasági növények károsításával, növényi vírusok terjesztésével a szántóföldi és kertészeti kultúrákban a növénykártevő fonálféreg komoly kockázati tényezőt jelentenek. Ellenük még napjainkban is leginkább – az ökoszisztémára káros – totális hatású nematicideket alkalmaznak. A természetben számos olyan gombafaj található mely – mint biokontroll ágens – alkalmas lenne a vegyszeres fonálféregirtás kiváltására. A *Trichoderma* fajokat – melyek a növénykórokozó gombák ismert antagonistái – erőteljes kompetíciós képesség, valamint változatos kitino- és proteolitikus enzimrendszer jellemzi. A Trichodermák szintén fontos tulajdonsága, hogy egyes fajaik, illetve törzseik képesek lehetnek a fonálféreg petéjét parazitálni, tápanyagforrásként hasznosítani, ezért alkalmasak lehetnek a növénykártevő fonálféreg visszaszorítására. A nematófág gombák csoportjába tartozó – szabadonélő fonálféregre specializált – nematóda-csapdázó gombafajok szintén széleskörűen kutatott potenciális bionematicidek. A *Trichoderma* genus és a nematóda-csapdázó gombák egy-egy törzsét egyetlen készítményben alkalmazva a kapott biokontroll hatás összeadódhat, illetve kiegészülhet egymással. Azonban a két csoport antagonista képességei miatt létezhetnek egymással összeférhetetlen kombinációk, amelyekben az alkalmazott fajok, illetve törzsek, csökkenthetik vagy teljesen kiolthatják egymás kórokozó-visszaszorító képességét.

Különböző biokontroll folyamatokban egyes *Trichoderma* fajok számos kitináz és peptidáz kódoló génjét jellemezték, de e gének fonálféregpete-parazitizmusban betöltött szerepéről keveset tudunk. Adott *Trichoderma* faj, illetve törzs peptidáz és kitináz génjeinek fonálféregpete-parazitizmus alatti szimultán génexpressziós analízisei, valamint a pete-parazitizmus és más biológiai feltételek között adott transzkriptomikai válaszainak összehasonlításai rávilágíthatnak a gomba proteo-, és kitinolitikus enzimrendszereinek funkcionális és regulációs összefüggéseire. A gének komplex expressziós mintázatának megismerése olyan *Trichoderma* törzsek kiválasztását és nemesítését teheti lehetővé, amelyek hatékonyan és környezet kímélő módon szolgálják a növénykártevő fonálféreg visszaszorítását.

A kutatómunka célkitűzései:

- A nematóda-csapdázó és *Trichoderma* fajok, illetve törzsek kombinálhatósági viszonyainak feltárása, *in vitro* növekedési és direkt konfrontációs tesztekben.
- A különböző *Trichoderma* fajok és azok egyes törzsei erősen különbözhetnek fonálféregpete-parazita képességeik tekintetében. Ennek megállapítására a kísérletekhez szükséges nagyszámú valódi növénykártévő fonálféregpete laboratóriumi előállítása igen problematikus, ezért szükséges létrehozni egy olyan *in vitro* kísérleti rendszert, amely alkalmas a leghatékonyabb fonálféregpete-parazita *Trichoderma* törzsek azonosítására és a gazda-parazita interakció molekuláris hátterének vizsgálatára.
- A leghatékonyabb fonálféregpete-parazita *Trichoderma* faj kitino- és proteolitikus enzim-kódoló géneinek transzkriptomikai vizsgálata és az ehhez szükséges *in vitro* gazda-parazita kísérleti modellrendszer kidolgozása.
- A kiválasztott *Trichoderma* faj peteparazitizmusa és más biokontroll folyamatai során tapasztalt génexpressziós változások összehasonlítása és annak hátterében meghúzódó biológiai folyamatok jellemzése.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A fonálférgekről röviden

A fonálférgek a hengeresférgek (*Nemathelminthes*) törzsének egyik osztálya (*Nematoidea*) (Cavalier-Smith, 1998). Eddig több mint 28 000 fajtát határozták meg (Hugot és mtsai., 2001), de egyes becslések szerint fajsámuk a milliós nagyságrendet is elérheti (Lamshead, 1993), mellyel csak a legfajgazdagabb ízeltlábúakhoz mérhetőek.

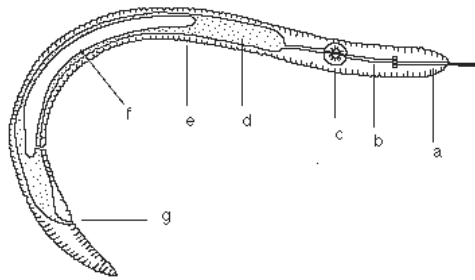
Igen kevés, de már a szárazföldi növényzet megjelenése előtről, a földtörténeti kambriumból ismertek 500 millió éves fossziliák (http1). Szinte mindenütt előfordulnak, ahol élet egyáltalán lehetséges. Megtalálhatóak sós- és édesvizekben, mohapárnákban, talajokban, avarban, trágyában, növényekben, állatokban és emberben is. Egyedszámukat tekintve a többsejtűek minden csoportját valamennyi élőhelyen felülmúlják (Andrássy és Farkas, 1988). A táplálék felszívására, megragadására specializált szájszervük igen sokféle (pl. szájszurony, fog), fajra és élőhelyre jellemző. Lehetnek baktérium-, gomba-, algaevők, állati-, növényi paraziták, sőt egymás ragadozói is (**1. ábra**). A talaj életközösségeiben betöltött szerepük felbecsülhetetlen. A tengerekben vagy állatokban megtalálható – néha méteres hosszúságú – fajoktól eltérően, a talajban, édesvízben vagy a növényekben élő fajok hossza 0,5 és 2 mm közé esik. Szabad szemmel nem láthatóak, de egy köbcentiméternyi szántóföldben, nagy általánosságban mintegy 100 darab fonálféreg található (Andrássy és Farkas, 1988). Parányiak, de nagy számuk miatt jelentős szerepet játszanak a szervesanyagok körforgalmában, részt vesznek a humuszképződésben, valamint porhanyítják, szellőztetik is a mezei, erdei talajokat, termőföldeket. A fonálférgek bioszférában betöltött nélkülözhetetlen szerepe ellenére az emberiség számos – antropocentrikusan fogalmazva – „kártévő” fonálféregfajjal van versenyben a növényi tápanyagforrásokért. Ebben a küzdelemben, lehetőleg úgy kellene elbánni a „rossz” férgekkel, hogy a „jóknak” ne ártsunk. Ez nem könnyű feladat.



1. ábra. A fonálférgek trofikus felosztása (Scow és mtsai., 1994)

2.2. A fonálféreg általános testfelépítése

A szabadon élő és növénykártevő fonálféregek színtelenek, testük csaknem üvegszerűen átlátszó. Viszonylag egyszerű felépítésű, szelvényezetlen, kétoldali szimmetriával rendelkező, nem valódi testüreges, zömében nagyon vékony, egyes kivételektől eltekintve – mint például a *Meloidogynidae* és *Heteroderidae* családok tagjai – megközelítően valóban fonál alakú állatok (**2. ábra**). Csillózat nélküli kültakarójuk háromrétegű, mely külső vázként szolgál. Ezek a kutikula, hipodermisz, és az izomréteg, melyek együttesen alkotják az ún. bőrizomtömlőt. A kevés sejtől felépülő idegrendszer központja a feji végen található garatideggyűrű. A bélcsatorna egyszerű, izmok nélküli, egyrétegű hengerhám béleli. A szájüreg szintén egyszerű, bizonyos esetekben fegyvertelen; míg másoknál életmódtól függően szájszurony (stylus), fog vagy tüköszzerű képződmények fordulnak benne elő. Az ajkakon vagy a fej peremén található sajátos alakú kinövések, függelékek igen változatos kialakulásúak lehetnek, melyek egy-egy faj jellegét alapvetően megszabják, ezért a rendszerezésben elsőrendű szerepük van (Andrássy és Farkas, 1988). Védényrendszerük, légzőszervük nincs, légzésük diffúz.



2. ábra. Szájszuronnyal rendelkező növénykártevő fonálféreg testének hosszanti keresztmetszete, **a:** stylus; **b:** nyelőcső; **c:** bulbus; **d:** bélcsatorna; **e:** kutikula; **f:** ivarszervek; **g:** végbélnyílás (Forrás: <http2>)

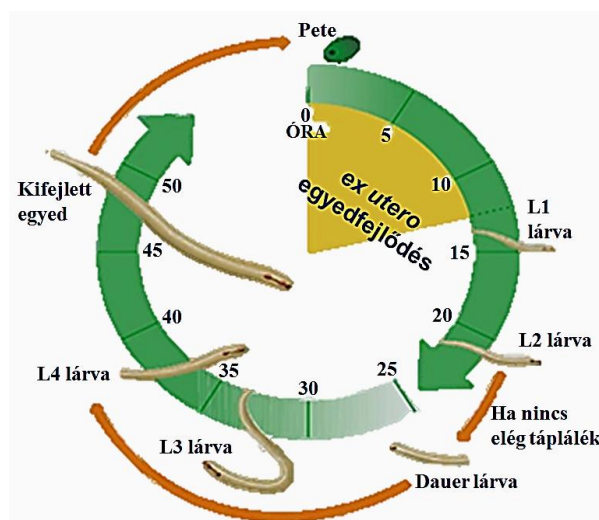
2.3. A fonálféregpete általános bemutatása

A fonálféregek többsége kétivarú, de előfordul a hímnősség (hermafroditizmus) és a szűznemzés (partenogenezis) is. Az embrionális fejlődés a petén belül megy végbe az anya testében, vagy a lerakott petében. A szabadon élő alakokban rendszerint csak egyet-kettőt, de a növényekben vagy állatokban élősködők uterusában akár több száz petét is meg lehet figyelni. A petén belüli embrionális fejlődés a megtermékenyítéstől számítva végbemehet néhány óra alatt, de akár eltarthat hetekig is. Ha a pete az anya testében érik tovább, akkor a megtermékenyítést követően csakhamar megindul az embrionális fejlődés. A lerakott peték viszont sokszor nyugalmi állapotban maradnak, és csak hosszabb-rövidebb idő elteltével fejlődnek tovább. Az egyedfejlődés hosszúságát leginkább a külső hőmérséklet szabja meg. A legtöbb fajnak a 20°C körüli hőmérséklet a legkedvezőbb (Andrássy és Farkas, 1988). A peték általában oválisak, ritkán gömbölydedek; a szabadon élők körében nagyságuk 40-90 × 20-50 μm között van. A pete héja sima vagy mintázott, a környezeti hatásoknak igen ellenálló. Fő felépítését tekintve egy külső vitelin, egy középső kitin (fehérjébe

ágyazott kitinfibrillumok), és egy belső lipoprotein rétegből áll (Kim és mtsai., 1992; Meyer és Wergin, 1998), melyek vastagsága fajonként eltérő lehet (Blaxter és Robertson, 1998). Az embrionális fejlődés végén a legtöbb fonálféreg (I. lárva) nem bújik ki rögtön a petéből, hanem az életük során lezajló – összesen – négy vedlésből az első már a petében lejátszódik. A kelés a fonálféreg életének egyik legkritikusabb pillanata, melyet mechanikus és kémiai tényezők segítenek. A tekeredett testű lárva rúgószerűen igyekszik szétfeszíteni a pete burkát, ha rendelkezik szájszuronyal, azzal egy ponton átszúrja a héjat, majd a szurony mozgatásával igyekszik minél nagyobb részt hasítani, továbbá enzimek segítségével puhítja, vékonyítja a pete héját (Andrássy és Farkas, 1988).

2.4. A *Caenorhabditis elegans*, mint modellszervezet

A *C. elegans* – könnyű, jól kidolgozott laboratóriumi tenyésztetősége és rövid ontogenezise miatt (3. ábra.) – az egyik leggyakoribb állati laboratóriumi modellszervezet (Donald, 1997). Egyszerű, soksejtes, a talajban szabadon élő szaprobionta fonálféreg. Nem patogén, szerves anyagokban gazdag komposztokban nagy számban található meg, ahol baktériumokkal, szerves törmelékkel táplálkozik. Kisebb számban hím ivarúként, de leginkább hermafroditaként fordul elő. A hímnős állat mind külső, mind belső felépítésében teljesen nőtény jellegű, csak a leggondosabb vizsgálattal mutatható ki, hogy önmegtermékenyítő (Andrássy és Farkas, 1988). Igen szapora, egy-egy hermafrodita 300-350 – hímekkel párosodva ennél is több - utódot hoz világra. Generációs ideje rövid, melynek során – szobahőmérsékleten - két nap alatt a petéből több lárvaállapoton keresztül fejlődik ki az új, szaporodóképes egyed (3. ábra) (Donald, 1997; Kenyon, 1988; Wood, 1988). A parazita és szaprobionta fonálféreg petéjének megközelítőleg egyöntetű felépítése miatt (Bird and McClure, 1976), a *C. elegans* modellszervezet alkalmas a parazita fonalgomba-fonálféregpete interakció hátterében meghúzódó folyamatok molekuláris vizsgálatára is.



3. ábra. A *C. elegans* ontogenezise

2.5. Növénykártevő fonálféreg

A növénykártevő fonálféreg főleg a tengermelléki, csapadékos klímájú országokban jelentenek problémát, így a nyugat-európai államokban, az Egyesült Államok óceáni partjain, valamint a nedves trópusi övezet országaiban, de szabadföldön, fóliasátrakban, üvegházakban Magyarországon is jelentős károkat okoznak (pl. gyökérgubacs-képződés, palántadőlés). A növénykártevő fonálféreg számos növényi kultúrát károsítanak: zöldségkertészeteket (pl. paradicsom), szántóföldi kultúrákat (pl. burgonya), erdőket (pl. fenyőerdők). Csak az Egyesült Államokban évi 10 milliárd dollár, világszerte 100 milliárd dollár veszteséget okoznak (Yildiz és mtsai., 2012). Jelentőségüket történelmi rangra emeli, hogy valószínűleg a fonálféreg kártételének köszönhető a maja (Mexikó) és a khmer (Indokína) civilizáció eltűnése. Annak ellenére, hogy Magyarországon az Alföld száraz nyara nem kedvező számukra, a kertészeti és szántóföldi növényeket ért hazai veszteségnek legalább 10%-a írható a fonálféreg rovására. Az ország csapadékosabb nyugati területein és öntözött kultúrákban gyakrabban mutatkozik kártételük. Elsősorban nagy szántóföldi növénykultúrákban pusztítanak, pl. a gabonátáblákban, cukorrépa- és burgonyaföldeken, nagyobb kertészetekben, melegegházakban. Az utóbbiban a kártétel akár a 100%-ot is elérheti (Andrássy és Farkas, 1988; Jermy és Balázs, 1990).

A fonálféreg a növény minden részét megtámadhatja: a gyökeret vagy a gumót (*Heterodera*, *Meloidogyne* fajok), a szárat (*Ditylenchus* fajok), a levelet (*Aphelenchoides* fajok) és a virágzatot (*Anguina* fajok). Táplálkozásuk helye szerint lehetnek növénybe hatoló, növényben táplálkozó „endoparaziták” (pl. *Meloidogyne*, *Heterodera* fajok), vagy a növény felületén, kívülről táplálkozó „ektoparaziták” (pl. *Xiphinema*, *Longidorus* fajok). Okozhatnak közvetlen károkat a szállítónyalábok eltömítése miatt hervadással, sárgulással, nekrozissal, törpüléssel, kései virágzással, torzult gumókkal, de a szívogatás helyén más kórokozónak utat nyitva, továbbá baktériumos, gombás vagy vírusos betegségek terjesztésével közvetlen kártételük is jelentős.

A megtámadott növény teljesen elpusztul vagy erősen visszamarad a fejlődésében. A szemes termények mennyiségét csökkentik, a gyökéren, gumón létrehozott torzulások miatt a fogyasztásra szánt növényi terméket eladhatatlanná teszik. Felléphetnek másodlagos élősködőkként is, és ilyenkor a másfajta kórokozók által megtámadott, legyengített növényeket tovább pusztítják (Jermy és Balázs, 1990). Szántóföldi növényeinket elsősorban a *Ditylenchus dipsaci* (szár-fonálféreg), a *Meloidogyne hapla* (szabadföldi gubacs-fonálféreg), a *Heterodera schachtii* (répa-fonálféreg) és az *Anguina tritici* (búza-fonálféreg) károsítja. A gyümölcsösökben, szőlőben és a szamócaültetvényekben a *Longidorus elongatus* (vírusoltó tūfonálféreg), és a *Xiphinema index* (szőlőszívó tūfonálféreg) kártétele a legjelentősebb. Kártételük elsősorban abban nyilvánul meg, hogy a növényeket vírusokkal fertőzik meg. A hőigényes zöldségfélékre, dísnövényekre, és a

hajtattott zöldségfélékre a *Meloidogyne* fajok a legveszélyesebbek (Andrássy és Farkas, 1988; Benedek, 2006).

2.6. Növénykártevő fonálféreg elleni védekezés

A nematodák elleni fizikai védekezés leggyakoribb módja – a talajgőzölés és a melegvizes kezelés – költségesek. A vegyszeres beavatkozás – azon kívül, hogy szintén költséges – igen drasztikus módszer, mivel a talaj élővilágát rendkívül elszegényíti.

Szerencsére ma már a gyakorlati növénytermesztésben egyre jobban megnyilvánul a biológiai és ökológiai folyamatokra, és ezek szerves összefüggéseinek alapos ismeretére alapuló gazdálkodási szemlélet. Csak az EU-ban, 1985 és 2007 között, az ökológiai gazdálkodásba bevont terület 125 ezer hektárról 6,8 millió hektárra, az ökológiai gazdaságok száma pedig a mintegy 5 ezerről 180 ezerre növekedett (Willer és mtsai., 2008). Még a jellemzően GMO cégek érdekszférájába eső USA-ban is 1,4 millió hektáron 9140 ellenőrzött ökológiai gazdaság működött 2011-ben, melyek a 2008-as évhez képest 340 millió dolláros többletet produkáltak (Certified Organic Production Survey, USDA, 2012). Hazánkban 1988-ban még csak mindössze 1000 hektáron, 15 üzemben folyt ellenőrzött ökológiai gazdálkodás. Az ökológiai gazdálkodásba bevont terület 2011-ben már több mint 130 ezer hektár (Solti, 2012). Mindezekkel együtt is, Farkas professzor intelme 1988-ból természetesen ma is érvényes, miszerint „szemléletünkől számítani kell azt a sajnálatos felfogást, hogy a fonálféreg ellen kizárólag drasztikus vegyszerekkel és módszerekkel lehet hatékonyan védekezni”. A talaj megfelelő vizsgálata, a tiszta vetőmag, vetőgumó, illetve a fejlődő növény lelkiismeretes gondozása nélkül a kártevő fonálféreg elleni hatékony védekezés nem képzelhető el.

2.6.1. A fonálféreg elleni kémiai védekezés

















Az erőteljes növényvédőszer-lobbi, a népesedési mutatók, továbbá rövidtávon a költséghatékonyságuk és viszonylag egyszerűbb alkalmazhatóságuk miatt, az egész világon még mindig a vegyszeres növényvédelemi eljárások a legelterjedtebbek. Megdöbbentő, de Magyarországon 2000-hez képest 2011-ben 22,8 ezer tonna – kétszer annyi – volt az értékesített növényvédőszer mennyisége. A növényvédő szerek felhasználása 2003-2008 között globális szinten is erőteljesen növekedett, majd 2009 és 2010-ben bekövetkezett megtorpanás után 2011-ben egy mérsékeltebb ütemű emelkedés mutatkozott (Statisztikai Jelentések, 2012).

Ha a növényvédőszer teljes életciklusa során betartanak az alapvető szabályokat – például az integrált növényvédelem szempontjait – nem jelentenének elfogadhatatlan kockázatot sem az emberekre, sem pedig a környezetre. Ennek ellenére sajnos mind a fejlett, és mind a fejlődő országokban, sok gazdálkodó a kémiai védekezést túlzott mértékben és felelőtlenül használja. Egyre

több növényvédőszeret használnak fel a fejlődő országokban, ahol számos nem szabadalmaztatott, olcsó, helyileg előállított szeret használnak fel (http3). A fejlett országokban is – az Európai Növényvédőszer-gyártók Szövetsége (ECPA) felmérése szerint – évről évre egyre komolyabb kockázatot jelentenek a hamisított és illegális növényvédő szerek (http4). Ezek összességében a termelési intenzitás növekedésével párhuzamosan – a komoly humán-egészségügyi kockázatokon túl – egyre növekvő fenyegetést jelentenek mind a helyi, mind a globális ökoszisztémákra.

Annak ellenére, hogy a leginkább használt és igen mérgező, környezetkárosító - ózonpusztító - metil-bromid 2001-től be lett tiltva, fonálféregirtásra ma is igen toxikus hatású szintetikus szerek vannak forgalomban (karbamátok, ditiokarbamátok, szerves foszforsavészterek) (**1. táblázat**). A vegyszerhasználat ennek tudomásulvételével is „közkedvelt”, mivel – sajnos - összességében olcsóbb, rövidtávon jobban megtérül, mint a körülményesebb, nagyobb háttértudást igénylő megelőzés vagy egyéb alternatív megoldások. Ugyanakkor a kemikáliák gyakori – sokszor nem kellően szakszerű – felhasználása miatt bizonyossággal számolni kell a célszervezetek rezisztenciájának kialakulásával, továbbá számos olyan problémával, amelyekhez a talajélet csökkenése vagy annak teljes kiirtása vezet el (humuszképződés hiánya, szél- és vízerózió, tápanyagok kimosódása, eutrofizáció, szikesedés, sivatagosodás).

1. táblázat. A Magyarországon használt nematocid növényvédőszer hatóanyagcsoportonkénti felosztása és legfontosabb veszélyességi besorolásai. Jelölések: N: környezeti veszély; T: mérgező; Xn: ártalmas; C: maró

	Hatóanyag-csoport	Hatóanyag	Veszélyesség vízi szervezetekre	Méh-veszélyesség	Környezeti veszélyesség	Méreg-kategória	Munka-egészségügyi várakozási idő (nap)
VYDATE 10 G	karbamát	oxamil	közepesen veszélyes	nem jelölésköteles	N 	T 	0
VYDATE 10 L		oxamil	közepesen veszélyes	nem jelölésköteles	N 	T 	1
BASAMID G	ditiokarbamát	dazomet	kifejezetten veszélyes	nem jelölésköteles	N 	Xn 	0-3
IPAM 40		metám-ammónium	kifejezetten veszélyes	nem jelölésköteles	N 	C 	4
DANADIM PROGRESS	szerves foszforsavészter	dimetoát	kifejezetten veszélyes	kifejezetten veszélyes	N 	Xn 	3
BI 58 EC		dimetoát	kifejezetten veszélyes	kifejezetten veszélyes	N 	Xn 	3
NEMACUR 240		fenamifosz	kifejezetten veszélyes	nem jelölésköteles	N 	Xn 	0
NEMATHORIN 10 G		fosztiazat	kifejezetten veszélyes	kifejezetten veszélyes	N 	Xn 	0

Forrás: PAN Pesticide Database (http5) és a „Növényvédőszer, termélnövelő anyagok 2013 I.”

2.6.2. Megelőzés

Az első és legfontosabb a fonálférgék károsításának csökkentésében a prevenció. A fonálférgék talajjal, öntözővízzel, széllel messze terjedhetnek, ezért a szerszámokat, művelő eszközöket tisztán kell tartani, továbbá kizárólag növényegészségügyi bizonylattal ellátott – így kártevőmentes – szaporítóanyagot szabad használni. Fontos és hatékony megelőzési, vagy védekezési eljárás a megfelelő vetési sorrend betartása, melyhez elengedhetetlen a károsító fajok és tápnövényeik pontos ismerete.

Az ültetvényeket nemcsak a természetett, vagy gyom gazdanövények távoltartásával lehet megkímélni a kártevő fonálférgektől, hanem bizonyos növényfajok természetével, előveteményként vetve, vagy beszántva, fonálféreg repellens hatást lehet elérni (pl. *Tagetes* fajok). Továbbá saláta vagy „csírácsirás burgonya” ún. csalogató vetésével a fonálféregpopulációk sérülékenyebb állapotba hozhatóak, e növények korai betakarításával pedig a burgonyába hatolt fonálférgeknek nincs esélye a kifejlődésre.

Megelőző hatása van a talajművelésnek is, így például a mélyművelés következtében az állatok és petéik a felszínre kerülve kiszáradnak, vagy télen megfagynak. A talajmarózás a petéket, a lárvákat és a kifejlett példányok egy részét roncsolja. A talajhoz adott szerves trágya, egyéb ipari, mezőgazdasági szervesanyagok pedig a talaj szerkezetének és termőképességének javításán túl, a fonálféreg-antagonista mikroorganizmusokat is (baktériumok, ragadozó gombák) stimulálják. Nemcsak a szerves trágya, de egyes szervetlen trágyafajták is lehetnek fonálféreg-gyérítő hatásúak. Farkas (Andrássy és Farkas, 1988) arról számol be, hogy nagyüzemi körülmények között jó eredménnyel használták az ammónium-nitrátot, továbbá a folyékony ammónia, a cukorgyári mészszip, az oltott és az oltatlan mészszip is nematicid hatásúak.

2.6.3. Mikrobiális biopeszticidek

A fentiekén kívül egyéb „természetadta” lehetőségek is léteznek a kártevő fonálférgék gyérítésére. Számos tudományos cikkben számoltak már be gyomnövényeket, rovarkártevőket, kórokozókat és kártevő fonálférgeket (Akhtara és Malik, 2000) gyérítő mikroorganizmusokról, ún. mikrobiális biopeszticidekről. Mindezek ellenére csak kevés mikroorganizmust tartalmazó biopeszticid terjedt el a gyakorlatban. Ennek oka az, hogy a kemikáliáknál kényesebbek a kijuttatás körülményeire, hatásukat lassabban és nem totálisan fejtik ki, továbbá eredményességük jobban függ a környezet adottságaitól (interakciótól bennszülött mikroorganizmusokkal, talajállapottól, klimatikus viszonyoktól, időjárástól, földrajzi elhelyezkedéstől). Ezek az EU-ban többnyire rovar- és (*Bacillus thuringiensis*, *Cydia pomonella*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, sejtmagpolihedrózis-vírus) talajlakó növénykórokozó patogén ellenes mikroorganizmusokat (*Trichoderma*

harzianum, *Coniothyrium minitans*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*) tartalmazó készítményként vannak forgalomban. Jóllehet az USA-ban több biológiai szer is forgalomban van, az EU-ban a fonálféreg ellen használatban lévő mikrobiális biopeszticidok száma ennél is kevesebb (*Pasteuria usgae*, *Paecilomyces lilacinus*) (Statisztikai Jelentések, 2012) (2. táblázat).

A természetben még további fonálféreg gyérítő, illetve a fonálféregkártételt – kísérletekkel igazoltan – mérsékelni tudó mikroorganizmusok találhatóak: nematofág (csapdázó-, endoparazita-, peteparazita-, lárvaparazita-, toxintermelő) gombafajok, endofita gombafajok (*Glomus* spp.), rizobaktériumok (*A. radiobacter*, *Pseudomonas* spp.), endobionta baktériumok (*Kocuria varians*, *Microbacterium esteraromaticum*), továbbá az egyik legtanulmányozottabb, de a tömeges előállításra alkalmatlan *Pasteuria penetrans* (Akhtara és Malikb, 2000).

2. táblázat. A kereskedelmi forgalomban elérhető legfontosabb mikrobiális biopeszticidok

	Mikroorganizmus	Hatás kifejtés módja	Felhasználás (ország)		
BIONEMAGON	Baktérium	<i>Bacillus firmus</i>	kompetíció és toxikus hatás	Izrael	
DENY		<i>Burkholderia cepacia</i>	a pete kelésének és a juvenilis mozgóképességének csökkentése	USA	
PASTEURIA USGAE BLI		<i>Pasteuria usgae</i>	endoparazita	EU	
BIOCON	Nematofág gomba	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	fonálféreg pete és nőtény parazita	Fülöp-szigetek	
MELOCON WG			fonálféreg pete és nőtény parazita	EU	
MIEXIANNING			fonálféreg pete és nőtény parazita	Kína	
NEMOUT			csapdázó-képletekkel	USA	
PAECIL			fonálféreg pete és nőtény parazita	Fülöp-szigetek	
DĪTERA			<i>Myrothecium sp. fermentációs terméke</i>	toxikus hatás	USA
ROYAL 350			<i>Arthrobotrys irregularis</i>	csapdázó-képletekkel	Franciaország
XIANCHONGBIKE			<i>Pochonia chlamydosporia</i>	peteparazita	Kína

Forrás: Dong és Zhang, 2006; Chandler és mtsai., 2011

2.7. Biokontroll szervezetek kombinálhatósága

A fenntarthatóan működő – biológiai és integrált – mezőgazdaság elképzelhetetlen az adott ökoszisztémára jellemző élőlények hatékony segítsége nélkül. Fonálférgek és kórokozó gombák elleni biológiai növényvédőszerként számos mikroorganizmus alkalmazható lenne (Meyer és Roberts, 2002), de – a szintetikus növényvédő vegyszerekkel összehasonlítva – a gyakorlati felhasználásuk mégis igen limitált. Az okok között – melyek a nem totális hatásuk miatt éppen előnyösek a környezetkímélő és fenntartható mezőgazdaságban – az egyik legfontosabb a szűk spektrumú-, lassú és a nem teljeskörű „ölő” hatás. További nehézségeket okoz a biológiai szer engedélyeztetési eljárása, formulázása, szállítása, tárolása és sok esetben a kijuttatása is. A biológiai növényvédelemre potenciálisan alkalmas mikroorganizmusok – ún. biokontroll ágensek – többsége ráadásul igen érzékenyen reagál a környezeti tényezők változásaira (időjárás, talajviszonyok) (Larkin és mtsai., 1998; Meyer és Roberts, 2002), ezért nem meglepő, hogy alkalmazásuk leginkább természetöberendezésekben volt sikeres (Paulitz és Bélanger 2001; Freeman és mtsai., 2004).

Mindezen okok oda vezettek, hogy az utóbbi időben egyre több kutatásban foglalkoztak egynél több biokontroll ágens együttes (kombinált) alkalmazásának lehetőségével (Datnoff és mtsai., 1995; Duffy és mtsai., 1996; Hafeez és mtsai., 2001; Meyer et al, 2001; Woo és mtsai., 2002; Roberts és mtsai., 2005). Ezzel további megoldandó problémák merültek fel, mivel a biológiai növényvédelemben felhasználható mikroorganizmusok általános és igen jó antagonisták képességei miatt létezhetnek ún. „inkompatibilis” kombinációk, amelyekben az alkalmazott fajok, illetve törzsek csökkenthetik egymás kórokozó-antagonista képességét, sőt egymásnak antagonistái is lehetnek (Baker, 1990; Janisiewicz és Bors 1995; Raupach és Kloepper, 1998). Kísérletekkel igazolták, hogy különböző mikroorganizmusok által termelt vegyületek együttes alkalmazásával egyszerre több kórokozó faj kártétele csökkenthető, azonban vannak olyan „párosítások”, melyek együttes biokontroll aktivitása jelentősen kisebb, mint ha az adott szervezeteket külön-külön alkalmaznák. Az egyidejű alkalmazást tekintve ez utóbbiakat Reaves és Crawford (1994) inkompatibilis szervezeteknek nevezte. Roberts és munkatársainak (2005) megközelítésében azok a biokontroll ágensek kompatibilisek, melyek túlélési ideje (perzisztenciája) és betegség-, illetve kárcsökkentő hatása kombinációban nem alacsonyabb, mint külön-külön alkalmazva.

Egy nemrég elkészült tanulmányban (Xu és mtsai., 2011) az eddig kipróbált kombinált biokontroll ágensek gyakorlati felhasználhatóságára nézve általában hátrányos következtetésre jutottak. Elméleti statisztikai modellek (Bliss independence, Loewe additivity) és a biokontroll mikroorganizmusok kombinált felhasználásáról szóló – majdnem összes (36 cikk, 465 kezelés) – tudományos értekezés feldolgozása alapján megállapították, hogy a biológiai növényvédelemben a kombinációban alkalmazott mikroorganizmusok közötti antagonizmus valószínűsége jelentősen meghaladja az alkalmazott szervezetek szinergista együttműködését, amely az összes vizsgált eset

mindössze 2%-a; továbbá az egynél több biokontroll mechanizmussal – pl. antibiózissal, kompetícióval, mikoparazitizmussal, enzimgátlással, hipovirulenciával és indukált rezisztenciával – rendelkező mikroorganizmusok önmagukban általában hatékonyabbak, mint az egyetlen biokontroll mechanizmussal rendelkező, de kombinációban alkalmazott szervezetek. Mindezek mellett az egynél több biokontroll hatású organizmus együttes alkalmazásának lehetőségét nem zárták ki, de nyomatékosították, hogy csak azon biokontroll ágensek kombinált alkalmazása jöhet szóba, melyek főbb biokontroll mechanizmusa és a partnerek interakciójának természete teljes mértékben ismert.

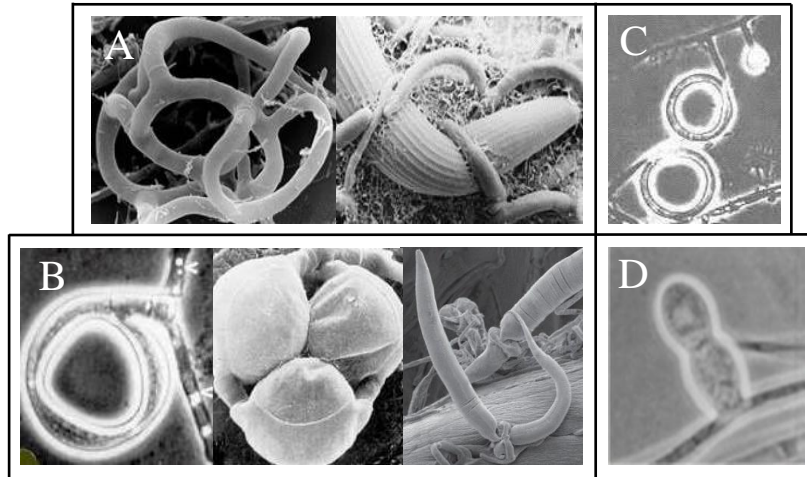
2.8. Nematofág gombák

Számos törzs – Oomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota és többségében a Deuteromycota – kettőszáznál is több faja tartozik a nematofág gombák csoportjába, mely nem taxonómiai, hanem életformára utaló kategória. Szerves anyagokban gazdag talajokban különösen nagy számban, de a trópustól egészen az Antarktiszig szinte minden elképzelhető talajtípusban előfordulnak. Leginkább a szaprobionta életmód jellemző rájuk, de közös tulajdonságuk, hogy képesek megtámadni és kiegészítő, nitrogéntápanyagforrásként hasznosítani a fonálférget. A fonálféreg elejtése alapján három nagyobb csoportba sorolhatók: nematóda-csapdázó (nematódaragadozó), endoparazita, és pete-, illetve cisztaparazita gombákra.

- A nematóda-csapdázó gombák ősei a cellulóz- és ligninbontó gombáktól származnak (Barron, 1992). A fonálféregparazita képesség kifejlődése az ilyen gombák élőhelyére általában jellemző – magas szén-nitrogén arány miatti – nitrogénhiányos állapotra adott evolúciós válasz. A szaprofita/parazita életmód fejlettsége a csoporton belül nem egyöntetű. Azok a fajok, amelyek hatékony paraziták, egyben gyengébb szaprobionta képességekkel rendelkeznek (pl. lassabb növekedési eréllyel rendelkeznek). A fonálféreg elejtésére speciális hifamódosulatokat fejlesztenek, melyek struktúrája fajra – egyes esetekben törzsré – jellemző. A csapdaképletek képződését a környezeti viszonyok nagyban meghatározzák, a legfontosabb biotikus kiváltó tényező az élő fonálféreg jelenléte. Az *Arthrobotrys oligospora* ragadós hurkok hálózatát (**4. ábra. A**), az *Arthrobotrys dactyloides* összezáródó gyűrűket („lasszókat”) (**4. ábra. B**), az *Arthrobotrys candida* merev gyűrűket és/vagy tapadós hifaduzzanatokat (**4. ábra. C**), a *Monacrosporium cionopagum* pedig ún. oszlopszerű tapadós hifaduzzanatokat (**4. ábra. D**) fejlesztenek a fonálféreg elfogására.
- A legtöbb nematóda-csapdázó és peteparazita gombával ellentétben – amelyek jó cellulózbontók is – az endoparazita gombákra leginkább az obligát fonálféregélősködés jellemző. Spórákkal, illetve tapadós konídiumokkal fertőznek, amelyek a fonálférgekbe a

külső kutikulán, vagy – annak lenyelése után – az emésztőrendszeren keresztül hatol be (pl. *Drechmeria coniospora*).

- Míg a nematóda-csapdázó és peteparazita gombák leginkább a szabadonélő fonálférgeken élőködhetnek, a bizonyos életszakaszában helyhez kötött fonálféreg fajok (pl. gyökérgubacs-fonálférgek) ellenségei a pete-, cisztaparazita gombák (pl. *Pochonia chlamydosporia*). Appresszórium segítségével hatolnak az éretlen (immatur) – vagy akár juvenilist tartalmazó – petébe (Chen és Dickson, 2004; Nordbring-Hertz és mtsai., 2006).



4. ábra. Nematóda-csapdázó gombák fonálféreg elfogására specializálódott hifamódosulatai (Forrás: Nordbring-Hertz és mtsai., 2006)

A nematóda-csapdázó gombák közül az *A. oligospora* micéliuma nem csak csapdaképletek fejlesztésére, hanem más gombák hifája köré tekeredve – behatolás nélkül – mikoparazitizmusra is képes. Továbbá ugyanez a faj és a *P. chlamydosporia* appresszóriumképzéssel képesek a növények gyökereibe hatolni, azokban – a vaszkuláris szövetek kivételével – inter- és intracellulárisan növekedni (Bordallo és mtsai., 2002). Búzában és rozsban a *P. chlamydosporia* például a növénykártevő gomba *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* kártételét jelentősen csökkentette (Monfort és mtsai., 2005).

Mint potenciális biológiai nematicidekkel, a 30-as évek végén kezdtek el kísérletezni ragadozó gombákkal (Linford és mtsai., 1938), azonban a 80-as évek végéig nem volt kereskedelmi forgalomban nematofág gomba alapú biológiai növényvédőszer (BioconTM) (Timm, 1987). A legtöbb hasonló készítmény az utóbbi három évtizedben került forgalomba (Singh és mtsai., 2013). A legfontosabb biológiai nematicideket a 2. táblázat összegzi.

2.9. A *Trichoderma* nemzetség

A *Trichoderma* nemzetség tagjai ivartalanul szaporodó, igen elterjedt – kozmopolita - talajlakó gombák. Szaporítóképleteit szinte minden mérsékelt és forró égövi talaj tartalmazza 10^1 - 10^3 kolónia formáló egység/g mennyiségben (Harman és mtsai. 1998). Mint taxonómiai csoport több mint 200 éve létezik, bevezetése Persoon (1794) nevéhez fűződik (Persoon, 1794). A nemzetség kapcsolata a leginkább lágy- és fásszárú növényi maradványokon előforduló, ivarosán szaporodó teleomorf *Hypocrea* nemzetséggel, pedig már a 19. század közepétől bizonyított (Tulasne és Tulasne, 1865). Megjegyzendő, hogy ennek ellenére a két nemzetség közti kapcsolat kutatása csak az ezredforduló után kezdődött el igazán (Chaverri és Samuels, 2003). Az intenzív rendszertani kutatások következtében több mint hatszáz *Trichoderma/Hypocrea* fajt írtak le. A molekuláris módszerekkel meghatározott fajok száma száz körüli (Schuster és Schmoll, 2010).

A biológiai védekezésben használatos törzsek leginkább az anamorf csoportba tartoznak. Tenyészetben telepeik rendszerint gyors növekedésűek, felületük kezdetben sima, majd a képződő légmicéliumtól és a képződő konídiumtartóktól pelyhes vagy csomós tömörülések jelentkeznek, melyek jellegzetesen zöldes, fehér vagy halványbarna színűek. A hifák színtelenek, szeptáltak, sima falúak, ritkán szemcsésnek tűnnek, erősen elágazók. A legtöbb faj klamidospórát is képez. A konídiumtartók tenyészetben a teljes felületen elszórtan, vagy koncentrikus gyűrűkbe, illetve csomókba tömörülve képződnek. A konídiumtartók elágazásai fialidokban végződnek. A fialidok alakja jellegzetes, faj- illetve faj-aggregátum szintű határozóbélyeg lehet (Vajna, 1987).

2.9.1. *Trichoderma* fajok a növényvédelmi gyakorlatban

A *Trichoderma* nemzetség képviselőiről már régről ismert (Weindling, 1932), hogy segítségükkel a növénykórokozó gombák által a gazdasági növényekben okozott kártétel – a kémiai növényvédőszeres mennyiségének csökkentésével, esetleg elhagyásával – környezetbarát módon csökkenthető. A 30-as évek óta nemcsak hogy számos publikáció jelent meg a *Trichoderma* gombafajok gyakorlati felhasználhatóságával kapcsolatban (Wells és mtsai., 1972; Elad és mtsai., 1983, 1993; Kraft és Papavizas, 1983; Papavizas, 1985; Lifshitz és mtsai., 1986; Chet, 1987; Lorito és mtsai., 1994a; Highley, 1997; Elad és Kapat, 1999; Yedidia és mtsai., 1999; Harman, 2000; Hjeljord és mtsai., 2001; Howell, 2003; Benitez és mtsai., 2004), de a kilencvenes évektől kezdve a kereskedelemben is megjelentek, valamint a gyakorlatban is alkalmazásra kerültek *Trichoderma*-t tartalmazó biológiai növényvédőszeresek (**3. táblázat**). A táblázatban található példaként felsorolt készítményeken kívül, számos országban léteznek még *Trichoderma* alapú mikrobiális fungicidek. Ilyen például a *T. asperellum*-ot tartalmazó, hazai fejlesztésű és gyártású Trifender (Biovéd 2005 Kft.), mely a kertészeti gyakorlatban eredményesen használható (Bíró és Tóth, 2009).

3. táblázat. Trichodermát tartalmazó, forgalomban lévő mikrobiális fungicidok

Termék	Gyártó,	Engedélyezés helye (OECD)	Növénykultúra	Antagonista	Célszervezet
Binab T Pellets, Binab T Vector, Binab TF WP, Binab T WG	Binab Bio-Innovation EFTR AB, Svédország	Dánia, Svédország, USA	zöldség, gyümölcs, dísznövény, gomba, faiskola, legelő	<i>Trichoderma polysporum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Botrytis</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Didymella</i> , <i>Chondrostereum</i> , <i>Heterobasidion</i>
Green-all T WP	Green Biotech Company Ltd., Korea	Korea	zöldség, fűszer, fű	<i>Trichoderma harzianum</i> GBF-0208	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i>
PlantShield HC	Bioworks Inc., USA	Hollandia, Kanada, Mexikó, USA	zöldség, fűszer, gyümölcs, dísznövény	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	<i>Cylindrocladium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Thielaviopsis</i>
Rootshield Drench WP	Bioworks Inc., Kanada	Hollandia, Kanada, Mexikó, USA	zöldség, gyümölcs, dísznövény, fűszernövény	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai KRL-AG2	<i>Cylindrocladium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Thielaviopsis</i>
Sentinel	Agrimm Technologies Ltd., Új-Zéland	Új-Zéland	szőlő, paradicsom	<i>Trichoderma</i> LC52	<i>Botrytis</i>
Suprevisit	Borregaard Bioplant, Dánia	Dánia	hüvelyesek és levélzöldegek vetőmagcsávázása	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Botrytis</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>
T-22 Granules	Bioworks Inc., USA	Hollandia, Kanada, Mexikó, USA	zöldség, gyümölcs, faiskola	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai KRL-AG2	<i>Cylindrocladium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Thielaviopsis</i>
Trich-A-Soil	Becker Underwood Pty Ltd., Ausztrália	Ausztrália	üvegházi-, szántóföldi növények, fű	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>	talajlakó kórokozó gombák
Trichodex	Makhteshim, Izrael	Magyarország, Németország, Olaszország, Spanyolország, USA	szántóföldi növény, zöldség, gyümölcs, dísznövény,	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T-39	<i>Botrytis</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Fulvia</i> , <i>Monilia</i> , <i>Plasmopara</i> , <i>Pseudoperonospora</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Sclerotinia</i>
Trichomic	AMC Chemical /Trichodex, Spanyolország	Olaszország, Spanyolország, Törökország	dísznövény, gyümölcs, olajfa, pázsit	<i>Trichoderma</i> spp.	talajlakó kórokozó gombák
Trichospray	Agrimm Technologies Ltd., Új-Zéland	Ausztrália, Törökország, Új-Zéland	levélfelületre, dísznövény	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Phytophthora</i>

Forrás: Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries. Todd Kabaluk and Katka Gazdik. Catalogue No. A42-107/2007E-PDF. ISBN 987-0-662-47103-5. Agriculture and Agri-Food Canada. Revised October 2007. (<http6>)

2.9.2. *Trichoderma* fajok a növénykártévő fonálféreg ellen (tények, lehetőségek)

A *Trichoderma* fajokat biokontrollként jelenleg, mint mikoparazitákat és növénykondicionálót tartja nyilván a szakirodalom és a gyakorlat. Ellenben nemcsak opportunistá, avirulens növénymutualisták (allianca), továbbá számos növénykórokozó gomba antagonistái, illetve hiperparazitái (Vinale és mtsai., 2008), hanem kártevő fonálféreggyérítő képességgel is rendelkeznek. Szabadföldi, üvegházi és laboratóriumi kísérletekben egyes *Trichoderma* fajok – önmagukban vagy kombinálva más mikroorganizmusokkal, illetve talajkezelési módszerekkel – képesek voltak egyes növénykártévő fonálféreg kártételét csökkenteni. Yang és munkatársai kísérletében (2010) *T. viride*, *T. harzianum*, *T. piluliferum* és *T. compactus* szűrletei toxikus hatást mutattak *Panagrellus redivivus* és *C. elegans* ellen. Egyes *Trichoderma* fajok nematódagyérítő hatása növénykísérletekben is bizonyított. Így a *T. harzianum* hatásosnak bizonyult a *Citrus*-féléken élősködő fonálféreggel (*Tylenchulus semipenetrans*) szemben (Parvatha és mtsai., 1996). Ugyanez a faj a *Meloidogyne incognita* és *Meloidogyne javanica* kártételét is szignifikánsan csökkentette (Rao és mtsai., 1998; Spiegel és Chet, 1998; Sharon és mtsai., 2001; Sahebani és Hadavi, 2008; Poornima és Pandey, 2009). Windham és munkatársai (1986) *T. harzianum* és *T. koningii* kombinációját sikerrel alkalmazták *Meloidogyne arenaria* ellen kukoricában.

A *Trichoderma* fonálféreggyérítő képessége valószínűleg összetett – számos enzim és szekunder metabolit koordinált kiválasztásával járó – folyamatban nyilvánul meg (Lorito és mtsai., 1996a). Egyes szerzők szerint, a jelenség magyarázata a vizsgált *Trichoderma* fajok pete-parazitáló képességében rejlik, melyet a parazita interakciókra jellemző megnövekedett proteáz és kitináz szintek is kellően alátámasztanak (Sharon és mtsai., 2001; Suárez és mtsai., 2004; Sahebani és Hadavi, 2008). Annak ellenére, hogy a fonálféregpete komplex felépítésű, többrétegű burka kiválóan ellenáll a legtöbb kedvezőtlen környezeti hatásnak (pl. nematicidek, antagonistá mikroorganizmusok) (Wharton, 1980), célpontjává válhat olyan mikroorganizmusoknak, amelyek rendelkeznek a burok megbontásához szükséges – megfelelő összetételű – enzimek és toxinok arzenáljával. A *Trichoderma* nemzetség egyes fajaiban, törzseiben megvan vagy meg lehet ez a potenciál. Két *T. harzianum* peptidáz kódoló génről már bebizonyosodott, hogy közrejátszanak a nematicid hatás elérésében. Mindkét gén szerin peptidáz, a *pra1* az S1 (PRA1), a *prb1* az S8 (PRB1) peptidáz család egy-egy tagját kódolja (4. táblázat). Tisztított PRA1-el inkubált *Meloidogyne incognita* petéi szignifikánsan csökkenő tendenciájú kelést mutattak (Suárez és mtsai., 2004), a *prb1*-el visszatranszformált – és így a nevezett gén több másolatát hordozó – *T. harzianum* törzs pedig *M. javanica* kártételét csökkentette jelentősen *in vivo* üvegházi kísérletekben (Sharon és mtsai., 2001).

Már korábban rámutattak, hogy az eltérő szubsztrátumra ható, litikus enzimeket tartalmazó, tisztított sejtfalbontó enzimkeverékek igen aktív – nemegyszer a szintetikus peszticideknél is

aktívabb – antifungális hatással rendelkeznek. Egyes kutatók szerint az antifungális – és ennek analógiájára valószínűleg a nematicid – hatás növelése elérhető a *Trichoderma* termelte enzimek szintetikus peszticidekkel, sejtmembránra ható vegyületekkel, antagonistá gombákkal történő kombinálásával (Lorito és mtsai., 1994b; Lorito és mtsai., 1996a; Baek és mtsai., 1999; Carsolio és mtsai., 1999).

Az egyes gének szerepének ismeretében felmerülhetne – a természetben előforduló társaiknál hatékonyabb enzimkeverékeket termelő – transzgénikus fonálféregpete-parazita *Trichoderma* törzsek nemesítése is. Számos génmódosított mikroorganizmust használnak gyógyászati hasznú emberi fehérjék tömegtermelésére (inzulin, véralvadási faktor, növekedési hormon), amelyek ellen a társadalom nem emel kifogást. Azonban a rekombináns DNS technológiával nemesített élőlények (GMO) mezőgazdasági felhasználása (termesztőberendezésekben, szabadföldön) sem társadalmilag, sem törvényileg nem elfogadott Magyarországon. Az egyik megoldás az lenne, ha a mezőgazdasági gyakorlatban nem magát a GM *Trichoderma* törzseket, hanem – kizárva a „génszennyezés” lehetőségét – azok termékeit használnák fel. Egy másik megoldási lehetőség szerint – génmódosítás nélkül – a mesterségesen tenyésztett *Trichoderma* fenntartási körülményeinek – például a tenyésztő közeg típusának, összetételének, kémhatásának, az inkubátor hőmérsékletének – befolyásolásával a biológiai védekezésben használható aktív komponensek szelektív termeltetése érhető el (Lorito és Scala, 1999; Mach és mtsai., 1999; Woo és Lorito, 2007).

2.9.3. A *Trichoderma* fajok biokontroll hatásának hátterében meghúzódó tulajdonságok és jelenségek

A *Trichoderma* fajok a növényi partnerre számos úton gyakorolhatnak pozitív hatást. Egyes törzsek képesek más gombák sejtfalát feloldani, az áldozatot kolonizálni, így azt tápanyagforrásként hasznosítani. Antagonista hatásukat – kis távolságon belül – képesek lehetnek a fizikai kontaktust mellőzve kifejteni. Sőt egyes kutatók már a hatvanas évek végén rámutattak arra, hogy bizonyos *Trichoderma* fajoknak növényi növekedés serkentő hatásuk van (Lindsey és Baker, 1967). A *Trichoderma* gombák növénykórokozókkal és növényi fonálféreggel szembeni antagonistá hatása több – egymással összefüggő – tulajdonságuknak köszönhető (Harman, 2000). Ezek: parazita interakció növénykórokozók micéliumával, fonálféreg petéjével; antibiózis; versengés mikroelemekért, élőhelyért (szaprobionta kompetíció); növénykórokozók behatolásának gátlása enziminaktiváció útján. Ezekon kívül a *Trichoderma* fajok közvetlen gomba és növényi fonálféreg antagonistá hatása kiegészül azzal, hogy képesek fokozni a növényi partner önálló védekezési mechanizmusát (növénykondicionálás): indukált növényi rezisztenciával, robosztus gyökérszövet fejlesztésével és a növényi partner számára nélkülözhetetlen szervetlen elemek felvételének és kiválasztásának megkönnyítésével. A következőkben röviden összefoglalom a

Trichodermák által kifejlesztett antagonisták mechanizmusok biológiai hátteréről eddig felhalmozódott ismereteket, különös tekintettel a közvetlen gomba-antagonista – és feltételezhetően a kártevő fonálféreggyérítő hatásukban jelentős – intenzív hidroláz típusú enzimekre.

2.9.4. Kitinolitikus enzimrendszer

A kitin nemcsak a valódi gombák sejtfalának fontos építőeleme. Sok mikroba számára – kitinázrendszerük hatékony működtetésével – a kitin biopolimer egyben kiváló szén- és nitrogénforrás is. A mikoparazitizmus folyamatában leginkább vizsgált hidroláz típusú enzimek a kitinázok. Szerepük a *Trichoderma*-gazdagomba interakcióban régóta ismert (Harman és mtsai., 1996).

A legtöbb gomba kitinázrendszere minimum két komponensből áll: endokitinázokból (enzimkategória száma: EC3.2.1.14) és N-acetilglükóz-aminidázokból. Az endokitinázok a kitin biopolimer belsejében vízmolekulák beépítésével random módon hasítják a N-acetil-D-glükózamin egységek közti β -1,4-glikozidos kötések. A N-acetilglükóz-aminidázok (NAG-ázok) pedig az endokitinázok hasítása által képződött kitin oligomerek nem redukáló végéről N-acetil-D-glükózamin egységeket hasítanak le. A szűk specificitású NAG-ázok (EC3.2.1.29) – amelyet a celluláz enzimrendszer analógiájára Harman és munkatársai (1993) kitobiozidázoknak neveztek el – kitobióz dimereket hasítanak le a kitinszál nem redukáló végéről (http7). Azok a NAG-ázok, amelyek valamennyi kitin oligomerről – még az intakt kitinlánc végéről is – képesek N-acetil-D-glükózamin egységeket hidrolizálni az exokitinázok (β -(1,4)-N-acetil-glükózaminidáz EC3.2.1.30). Mivel a β -(1,4)-N-acetil-glükózaminidáznak igen tág a szubsztrátspecificitása, a szakirodalom β -(1,4)-N-acetil-hexózaminidáznak is nevezi (EC 3.2.1.52) (Duo-Chuan, 2006). A kitinázok erős gombagátló hatása, a gazdagombákon okozott morfológiai változások (Lorito és mtsai., 1993), a penetrációt kísérő sejtfallízis (Benhamou és Chet, 1997) mind arra utalnak, hogy ezek az enzimek fontos szerepet töltenek be a Trichodermák parazita életmódjában.

Az endokitinázok nemcsak – extracelluláris enzimként – a mikoparazitizmusban, de a sejtek, hifák növekedésében is nagy jelentőségűek azáltal, hogy a sejtfallat a megfelelő kitintartalmú részekben fellazítják, így hifaelágazódások képződésére van lehetőség.

A kitinázok a legtöbb vizsgálatban induktív és glükózzal represszálható enzimeknek bizonyultak (Jakucs és Vajna, 2003). Számukra az optimális hőmérséklet 20-40 °C, a közeg optimális pH tartománya pedig 4,0-7,0 közé esik (Duo-Chuan, 2006).

A legtöbb gomba egynél többfajta kitinázt termel. A *T. harzianum* legkevesebb 9-féle kitinázzal rendelkezik: kettő β -(1,4)-N-acetil-glükózaminidázzal (CHIT102, CHIT72), hat endokitinázzal (CHIT52, CHIT42, CHIT37, CHIT36, CHIT33, CHIT31,) és egy kitobiozidázzal (CHIT40) (Viterbo és mtsai., 2001; Duo-Chuan, 2006). Biokémiai jellemzői mellett *in vitro* kísérletekben több

T. harzianum kitinázról megállapították, hogy a sejtfalában kitint tartalmazó gombák ellen erős gombagátló hatásukat szinergista, valamint egymást kiegészítő (komplementer) módon fejtik ki (De La Cruz és mtsai., 1992). Közülük is a 42 kDa méretű endokitináz (CHIT42) bizonyult a leghatékonyabbnak (Lorito és mtsai., 1993).

A kitináz enzimek nemcsak egymással, hanem más sejtfalbontó enzimekkel, membránkárosító antibiotikumokkal és fungicidekkel együtt alkalmazva is szinergizmust mutatnak. Egyes esetekben *Trichoderma* kitinázok együttes gombaölő hatása összevethető volt a kontrollként használt szintetikus fungicidek hasonló értékeivel (Lorito és mtsai., 1996a).

A mikoparazitizmusban részt vevő enzimek közül a legrészletesebben a 42, 33 és 36 kDa endokitinázokat kódoló gének szabályozása ismert. A *T. harzianum* *chit42*, *chit36*, *chit33* és a *nag1* (egy N-acetilglükóz-aminidáz) indukálható gombasejtfal, kitinkolloid valamint éheztetés hatására. Kifejeződésükre gátló hatású a magas koncentrációjú glükóz és glicerol. Továbbá a kitin biopolimert felépítő N-acetil-D-glükózamin egységek a *chit33* és *nag1* géneket igen, de a *chit42* és *chit36* expresszóját nem képesek indukálni. Konfrontációs kísérletek *T. harzianum* és *Botrytis cinerea* valamint *T. harzianum* és *Rhizoctonia solani* között rámutattak, hogy a *chit42* és *chit36* gének transzkripciós aktivitása már a fizikai kontaktus előtt megnőtt, amihez makromolekulák diffúziója szükséges (Zeilinger és mtsai., 1999). A *chit33* viszont a *T. harzianum* és *R. solani* közvetlen érintkezése nélkül nem expresszálódott (Duo-Chuan, 2006).

Seidl és munkatársai (2005) a *Hypocrea jecorina* (anamorf: *Trichoderma reesei*) teljes genomjának *in silico* analízise során 18 nyitott leolvasási keretet azonosítottak (open reading frame, ORF), melyek feltételezett (putative) kitináz enzimeket kódolnak és mind a glikozid hidroláz enzimek 18. családjába tartoznak. Erre alapozva az IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature előírásai és Henrissat (1999) javaslata alapján új nevezéktant készítettek, melynek logikája szerint az enzim 3 betűs azonosítóját (CHI), a glikozid hidroláz család száma (18), valamint az adott enzim izoelektromos pontját jelző (pI) szám követi (pl. CHI18-1). Ennek megfelelően munkánk során a *T. harzianum* CHIT42, CHIT33, és CHIT36 enzimjeit kódoló géneket *chi18-5*, *chi18-12* és *chi18-15*-nek neveztük.

2.9.5. Proteolitikus enzimrendszer

Régóta bizonyított, hogy a gombasejtfal lebontása enzimkeverékek segítségével történik (Scott és Schekman, 1980), nem meglepő tehát – mivel a legtöbb gomba sejtfala fehérjemátrixba ágyazott kitint és/vagy β -glükánt tartalmaz (Wessels, 1986) – hogy a proteolitikus enzimeknek is kiemelt szerep tulajdonítható a mikoparazitizmus folyamatában.

A proteolitikus enzimek – más szóval peptidázok (Barrett és McDonald, 1985) – hidrolázok, melyek az oligopeptideket felépítő aminosavak közti peptidkötéseket bontják vízmolekula

beépítésével. Az enzim nevezéktan (Enzyme Nomenclature) által alkalmazott csoportosítás szerint a peptidázok a hidroláz osztályba (EC-száma: 3), ezen belül a peptid-hidroláz alosztályba (EC 3.4) tartoznak. A proteolitikus enzimek leghelyénvalóbb elnevezése a „peptidáz”, melynek még elterjedt szinonimája a „proteáz” név. Egyes szerzők szerint a 20-as évek végén használatba került „proteáz” és főleg „proteáz” (endopeptidáz szinonimája) elnevezések használata már a 30-as évektől sem korszerű (Barrett és McDonald, 1985; 1986).

Bár minden peptidáz ugyanazt a kötést, a peptidkötést hasítja, a peptidázok mind specifikusban, mind aktív centrumukban különbségeket mutatnak. Aszerint, hogy milyen szubsztráton működnek, milyen aminosav mögött és milyen gyorsan hasítanak, milyen molekula helyezkedik el az enzim aktív centrumában az enzimrendszer egyes komponensei többféleképpen csoportosíthatóak.

Az alapján, hogy a polipeptid lánc belső vagy terminális elhelyezkedésű aminosav molekulájánál hasítanak, megkülönböztethetők endopeptidázok (pl. tripszin, kimotripszin, pepszin) és exopeptidázok (pl. aminopeptidáz). Az exopeptidázok a peptidlánc N-, ill. C-terminális végéről hasítanak le egy vagy két aminosavat, így képesek monomerjeire lebontani a peptidláncot. Általánosságban elmondható, hogy a gombák többségében az exopeptidázok intracelluláris elhelyezkedésűek, az endopeptidázok viszont extracellulárisan és intracellulárisan (lizoszómákban, vakuólumokban) egyaránt megtalálhatóak. Az intracelluláris peptidázok főleg a saját, hibás illetve előregedett fehérjék lebontásában, valamint szekréciós és szabályozási folyamatokban játszanak szerepet, míg az extracelluláris peptidázok a gomba környezetében előforduló fehérjéket bontják le aminosavakig, illetve oligopeptidekig pl. a szaprotróf táplálkozáskor vagy a mikoparazitizmus során (Jakucs és Vajna, 2003; http8).

A peptidlánc belsejében hasító endopeptidázokat a katalízis pontos helyét meghatározó aminosavak alapján sorolják tovább csoportokba. A katalitikus helyen a szerin-peptidázok (EC 3.4.21) általában szerint és hisztidint, a cisztein-peptidázok (EC 3.4.22) ciszteint és hisztidint tartalmaznak. Az aszpartil-peptidázokban (EC 3.4.23) két savas csoport, míg a metallo-peptidázokban (EC 3.4.24) egy fémion és egy glutaminsav részvételével megy végbe a katalízis. A peptidázok rokonság alapján történő csoportosítása (Rawlings és Barrett, 1993) szintén tartalmazza a katalízis mechanizmusa szerinti besorolást, mely szerint megkülönböztetünk szerin-, treonin-, cisztein-, aszpartil- és metallo-peptidázokat (jelölésük S, T, C, A és M).

A peptidázokat továbbá klánokba és családokba is sorolják, melynek alapja az aminosav-szekvencia homológiája. Azok a peptidáz családok, amelyek bizonyítottan egy közös ősről vezethetők vissza, egy klánt alkotnak. A közös eredetre utaló bizonyíték lehet a hasonló térszerkezet, vagy ha az nem áll rendelkezésre, a katalitikus funkcióval bíró aminosavak pozíciója, ill. a katalitikus aminosavak körüli hasonló szekvenciamotívumok (Rawlings és Barrett, 1994).

A *T. harzianum* szimulált mikoparazita interakciói során szerin-, aszpartil- és metalloendopeptidázok, valamint egy metalloexo-peptidáz (aminopeptidáz) szerepére derítettek fényt (**4. táblázat**). Biokémiaiilag az első mikoparazita interakcióban szerepet játszó, tisztított *Trichoderma* peptidáz enzimet – egy bázikus szerin peptidázt (PRB1; EC 3.4.21) – Geremia és munkatársai jellemezték (1993). A szerzők Northern analízissel szintén megállapították, hogy a kódoló gén (*prb1*) autoklávozott micélium, *Rhizoctonia solani* gombasejttel és kitin hatására emelt génextpressziót mutatott, míg glükóz hatására represszált maradt. Egy későbbi tanulmányban, melyben a *prb1* emelt kópiaszámának hatását vizsgálták *T. harzianum* és *R. solani* *in vitro* konfrontációs kísérletben, a *prb1* átírása már a hifák érintkezése előtt detektálható volt, az interakció későbbi szakaszában pedig fokozott aktivitást mutatott. Továbbá a transzformáns törzs üvegházi kísérletben is képesnek bizonyult szignifikánsan csökkenteni *R. solani* kártételét (Flores és mtsai., 1997).

Colletotrichum acutatum és *Botrytis cinerea* sejtfalán, valamint kitinen, egy másik *T. harzianum* szerin peptidázt (PRA1) találtak a legaktívabb fehérjebontó enzimnek. Northern analízissel megállapították, hogy a *pral* kitin és gomba-sejttel hatására hasonló mértékben expresszálódik, valamint represszáva marad szervesen nitrogén és glükóz jelenlétében (Suárez és mtsai., 2004).

Amíg a Trichodermák biokontroll folyamataiban szerepet játszó extracelluláris enzimek többségében szerin peptidázok (Suárez és mtsai., 2005), addig az aszpartil peptidázok egyes extracelluláris enzimek (pl. celluláz) lebontása miatt kerültek a figyelem középpontjába (Haab és mtsai., 1990). Mégis, proteomikai és funkcionális genomikai vizsgálatok alapján Suárez és munkatársai (2005) egy olyan – az A1 (pepsin A) családba tartozó – pepszin-szerű aszpartil peptidázzal (P6281) számolnak be, mely az egyes gombasejttel szubsztrátok (*Phytium ultimum*, *R. solani*, *B. cinerea*) hatására különböző mértékben, de erőteljesen indukálódott. A szerzők valószínűsítik, hogy a P6281-nek szerepe lehet a gomba-sejttel fehérjéinek lebontásában.

Különböző szimulált biokontroll folyamatokban (*R. Solani in vitro* konfrontációs tesztekben; szénhidrát vagy nitrogén hiányos táptalajon; glükózzal, kitinnel vagy különböző kórokozó gombák sejtfalával kiegészített táptalajokon) a közelmúltban a *T. harzianum* faj még több extracelluláris peptidázát jellemezték. Kiderült, hogy a szerin- S1, S8 és S53, az aszpartil- A1 és a metalloendopeptidáz M35, valamint az aminopeptidáz M28 peptidázcsaládok tagjai (**4. táblázat**) az eltérő tenyésztési feltételekre különbözőképpen reagálnak. A válaszok sokszínűsége felveti azt a lehetőséget, hogy a vizsgált enzimek eltérő módon járulnak hozzá a *T. harzianum* antagonista hatásához (Suárez és mtsai., 2007).

További két *T. harzianum* peptidázzal számol be Yan és Qian (Yan és Qian, 2007; 2009). Az egyik egy aszpartil- (SA76), a másik egy szubtilizin szerin endopeptidáz (SS10). *Saccharomyces*

cerevisiae-be transzformálva, több növénypatogén gomba hatására mindkét gén expressziójának jelentős emelkedésével reagált.

4. táblázat. Mikoparazitizmussal összefüggésbe hozható peptidázok *T. harzianum*-ban

	Katalízis mecha- nizmusa	Peptidáz	Peptidáz klán	Peptidáz család
PRA1	szerin	tripszin A	PA	S1
PRB1	szerin	szubtilizin	SB	S8
P8048	szerin	szubtilizin	SB	S8
P5431	szerin	szubtilizin	SB	S8
SS10	szerin	szubtilizin	SB	S8
P5216	szerin	aorzin	SB	S53
P6281	aszpartil	pepszin A	AA	A1
P9438	aszpartil	pepszin A	AA	A1
P7959	aszpartil	pepszin A	AA	A1
P1324	aszpartil	pepszin A	AA	A1
SA76	aszpartil	pepszin A	AA	A1
P2920	metallo	aminopeptidáz S	MH	M28
P7455	metallo	deuterolizin	MA	M35

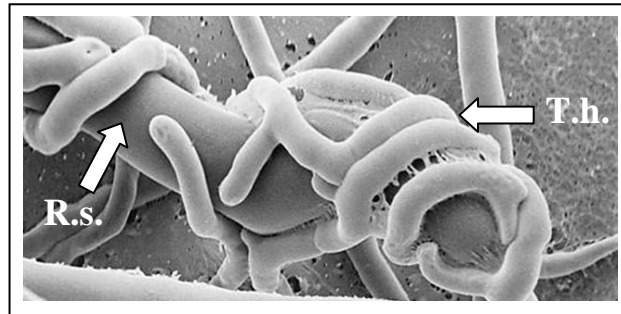
Forrás: MEROPS adatbázis: Rawlings és mtsai., 2012

2.9.6. Mikoparazita interakció

A Trichodermák által kifejtett mikoparazita hatás számos összehangolt lépésből álló komplex eseménysor. A folyamat elején a *Trichoderma* micéliumot a célgomba irányába mutató atipikusan elágazó és feltételezhetően nem gazdaspecifikus növekedésre egyszerű, kis molekulatömegű aminosavak, cukrok indukálják (pozitív kemotropizmus) (Goldman és mtsai., 1994; Chet és mtsai., 1998). Ezután egy specifikus – lektin-szénhidrát típusú – felismerési folyamat eredményeként (Inbar és mtsai., 1996; Omero és mtsai., 1999) a *Trichoderma* micéliuma a gazda hifája köré tekeredik (**5. ábra**). A folyamat korai szakaszában a lektineken kívül egyes sejtfalbontó enzimek is részt vesznek (pl. CHIT42) (Zeilinger és mtsai., 1999). A gazda hifájába történő behatolást apresszóriumszerű képletek (Goldman és mtsai., 1994), sejtfalbontó enzimek (Chet és mtsai., 1998) és toxikus másodrendű anyagcseretermékek (pl. peptaibol) (Schirmböck és mtsai., 1994) egyaránt segíthetik.

Megannyi gén és géntermék vesz részt a mikoparazitizmus kialakításában. Lorito (Lorito, 1998), kiemelve jelentőségüket, számos kitinolitikus enzimet sorol fel, de az interakcióban hasonlóan

fontos szerepük van a különböző glükánázoknak (1,3-béta-glükánáz, 1,4-béta-glükánáz, 1,6-béta-glükánáz) és proteolitikus enzimeknek is, melyek közül sok egymás hatását kiegészítve, illetve felerősítve – szinergistaként – vesz részt a folyamatban (Harman, 2000).



5. ábra. Elektron mikroszkópos felvétel a *T. harzianum* (T.h.) és a *Rhizoctonia solani* (R.s.) interakciójáról (Forrás: <http9>).

2.9.7. Antibiózis

A mikroorganizmusok közötti antagonista kölcsönhatások legjobban tanulmányozott és vitatott megnyilvánulása az amenzalizmus fogalmkörébe tartozó antibiózis jelensége (Szabó, 1988), melynek során – szervesen (pl. ammónia, kén-hidrogén, nitrit), alacsony toxicitású szerves (pl. egyszerű zsírsavak, etanol, tejsav, ecetsav) és igen toxikus szerves (pl. antibiotikum) másodlagos anyagcsere-termékekkel – a „létért vívott küzdelemben” az antagonista megszabadulhat ellenfelétől. A *Trichoderma* fajok biokontroll folyamataiban az antibiotikumok szerepe már régen felmerült (Weindling, 1934). Sivasithamparam és Ghisalberti (1998) 43 antibiotikus hatású – *Trichoderma* törzsekből izolált – vegyületet sorol fel, melyek közül számos összefüggésbe hozható a *Trichoderma* fajok biokontroll hatásával (pl. alkil-pironok, izonitrilek, poliketidek, peptaibolok, diketopiperazinok, szeszkviterpének és szteroidok), amelyet Howell munkája is alátámaszt (1998). Ezek a vegyületeket három kategóriába sorolhatók: 1. illékony antibiotikumok (pl. 6-pentil- α -piron, izocianid származékok); 2. vízoldható összetevők (pl. a szeszkviterpén-lakton származék „koningic acid”) 3. peptaibolok (Ghisalberti és Sivasithamparam, 1991).

A *Trichoderma* antibiotikumok kémiai tulajdonságai kétféle hatásmechanizmust feltételeznek (Vinale és mtsai., 2008): az alacsony molekulásúlyú, apoláris, illékony összetevők viszonylagosan távol, míg a poláris antibiotikumok és a peptaibol a termelő hifákhoz közel fejtik ki hatásukat. Ghisalberti és munkatársai (1990) kísérletében az alkalmazott *T. harzianum* törzsek *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*-vel szembeni antagonista hatékonysága nagyban függött a törzsek piron-szerű antibiotikum termelő képességétől. Egy másik tanulmány arról számolt be, hogy *in vitro* antagonista tesztekben a vizsgált *Trichoderma* fajok hifái nem hatoltak be a *Fusarium moniliforme* vagy az *Aspergillus flavus* hifáiba, viszont a *Trichoderma* gátló hatása mégis megnyilvánult, ezzel azt feltételezve, hogy az adott *Trichoderma* törzsek esetében nem a

mikoparazitizmus az egyedüli antagonista interakció (Calistru és mtsai., 1997). Más esetekben viszont egyes, másodlagos anyagcseretermék deficiens (gliotoxin) mutáns *Trichoderma* törzsek kevésbé gátolták a *Pythium ultimum* okozta palántadőlést, mint a vad típusú törzs, viszont nem változott a *Rhizoctonia solani* által okozott palántadőlés elleni hatásuk (Wilhite és mtsai., 1994; Howell és Stipanovic, 1995). A közelmúltban *in vitro* antagonizmus tesztekben Vinale és munkatársai (2006) két kereskedelmileg forgalmazott *T. harzianum* (T-22 és T-39) törzs másodlagos anyagcseretermékeit jellemezték. Megállapították, hogy a 6-n-pentil-6H-pirán-2-on-t, mely a legjelentősebb *Trichoderma* antibiotikum, egyik törzs sem termelte, ellenben két új bioaktív vegyületet fedeztek fel. A T-22-es törzs által termelt szerves heterociklusos vegyület az „azaphilone” minden tesztelt növényi kórokozó növekedését gátolta, míg a T-39-es törzs termelte furán-származék („butenolide”) a *P. ultimum*-ra nem, de a *G. graminis* var. *tritici*-re és a *R. solani*-ra eredményesen hatott.

Adott *Trichoderma* bioaktív másodlagos anyagcseretermékeinek termelése nagy valószínűséggel faj- és törzsfüggő tulajdonság. Például a SoilGard™ (Certis, USA) készítményben található *T. virens* aktivitásához a gliotoxin elengedhetetlenül szükséges. Ellenben a gyakorlati gazdálkodásban is jól bevált *T. harzianum* T-22 törzs egyáltalán nem termel gliotoxint (Harman, 2000).

A *Trichoderma* fajok komplex antagonista hatásmechanizmusát jól jellemzi az a tény is, hogy a folyamat során számos antibiotikum sejtfalbontó enzimekkel szinergizál (Di Pietro és mtsai., 1993; Lorito és mtsai., 1996a). Lorito és munkatársai (1996b) megállapították továbbá, hogy a gazdaparazita interakcióban a peptaibolok a gazdagomba β -glükán-szintetáz aktivitásának egyidejű gátlásával elősegítették a *T. harzianum* β -glükán-hidrolázának működését. Amíg a peptaibolok szerepe és hatása tisztázottnak tűnik, addig számos más bioaktív másodlagos anyagcseretermék (pl. pironok) hatásmecahnizmusa és lehetséges szinergizáló képessége még nem ismert (Vinale és mtsai., 2008).

A *Trichoderma* fajok által termelt, biológiailag aktív másodlagos anyagcseretermékek nemcsak a növénykórokozó gombák elleni védelemben használhatóak fel. A *T. virens* által termelt viridiol például olyannyira fitotoxikus hatású, hogy felmerült herbicidként való alkalmazása (Howell, 2006). Számos fonalas gombából izoláltak nematicid hatású vegyületeket (Li és mtsai., 2007), köztük *Trichoderma*kból is (**5. táblázat**). Djian és munkatársai (1991) kísérletében a *T. longibrachiatum* szűrletében található 0,044 mol/liter koncentrációjú ecetsav pH-függő toxicitást mutatott juvenilis fonálférgek ellen. A gliotoxin és a peptaibol trichorzianinnal szerkezeti hasonlóságot mutató chrysospermin szintén mutattak anthelmintikus és nematicid hatást. A *T. aggressivum* által termelt kumarin-származék melleinnek és a szteroid jellegű viridinnek szintén lehet enyhe nematicid hatása (Bacíková és mtsai., 1965; Li és mtsai., 2007; Reino és mtsai., 2008). Yang és munkatársai (2010) 329 *Trichoderma* törzset teszteltek *in vitro* kísérletekben *Panagrellus*

redivivus és *C. elegans* ellen. Mindkét fonálféregfaj ellen 8 törzs, közülük is a *Trichoderma* sp. YMF1.02647 bizonyult a leghatásosabbnak. A szerzők szerint a nematocid hatásban a – *Trichoderma* sp. YMF1.02647 etil-acetátos kivonatából kinyert – trichotecén vázas trichodermin mikotoxinnak jelentős szerepe van.

5. táblázat. Nematicid hatású vegyületek *Trichoderma* fajokban

Szekunder metabolit	Faj
Ecetsav	<i>T. longibrachiatum</i>
Gliotoxin	<i>T. virens</i>
Mellein	<i>T. aggressivum</i>
Trichodermin	<i>T. spp.</i>
Peptaibol	<i>T. harzianum</i>
Viridin	<i>T. spp.</i>

2.9.8. Szaprobionta kompetíció

A természetben zajló folyamatok során a lokális mikrobaközösségek faji összetétele állandóan változik, egy faj sem tartja pozícióját a végtelenségig. A kompetíció során nincsen abszolút győztes, mivel a versengés tárgyának mennyisége (pl. nitrogén, foszfor, kálium, oxigén, tér) véges, a „versenyzők” a források elapadása után visszavonulni kényszerülnek. Az egyes fajok populációinak versenyképességét biokémiai potenciáljuk és ökológiai toleranciájuk, valamint az ezek háttérben rejlő geno- és fenotípusos plaszticitásuk szabja meg (Szabó, 1988).

A mikrobák legfontosabb kompetitív képességei a szaporodás sebessége és az abiotikus tényezők (hőmérséklet, fényintenzitás, nedvességtartalom stb.) fluktuációjával szembeni tolerancia. A biológiai növényvédelemben egy antagonista mikroorganizmus csak akkor fejtheti ki hatását, ha adottságai által képes: a meglévő körülmények között gyorsan növekedni, szaporodni és a már helyben található hasonló ökológiai niche-sel rendelkező kórokozó mikroorganizmusokat legalább a szükséges növényvédelmi hatás idejére kiszorítani (kompetitív kiszorítás elve). Ilyen kompetitív potenciállal számos fonalas gomba rendelkezik, közülük is kiemelkednek a *Trichoderma* nemzetség fajai (Herrera-Estrella és Chet, 2004; Harman, 2006; Vinale és mtsai., 2008). A térért, tápanyagokért és egyéb életfeltételekért folytatott kompetíció nagy valószínűséggel komoly szereppel bír a biokontroll mikroorganizmusok fegyvertárában, melyet egyben igen nehéz is bizonyítani, mivel a versengés tárgyáért a mikrobák világában nem sportszerű a küzdelem. A klasszikus értelemben vett kompetíció mellett, számos más fegyver áll a küzdők rendelkezésére, így sok más jelenség is beleszól a mikrobaközösségek felépítésébe, szerveződésébe (pl. amenzalizmus, parazitizmus, predáció). Így a *Trichoderma* fajok eredményessége sem csak a kompetíciónak, hanem számos más tulajdonság kombinációjának köszönhető.

A *Trichoderma* fajok erőteljes kompetíciós képessége, mely a biokontroll folyamatokban igen előnyös lehet, régóta ismert (Chet, 1987). Gyors növekedési rátájuk, nagyarányú konídium képzésük, valamint széleskörű és hatékony szubsztrát hasznosító képességük révén képesek lehetnek hatékonyan kiszorítani a kórokozókat a rizoszférából, így megakadályozhatják azok elszaporodását. Sivan és Chet (1989) dinnye és gyapot rizoszférájában végzett vizsgálatai igazolták, hogy a *T. harzianum* T-35 törzsének *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* elleni antagonista hatásában jelentős szerepe van a szénért és nitrogénért folytatott kompetíciónak. Kísérleteikben a *Trichoderma* gátló hatása sokkal kisebb volt, amikor könnyen hasznosítható szén, illetve nitrogénforrást, glükózt és aszparagint adtak a talajhoz.

A Trichodermák kompetíciós képessége nemcsak a rizoszférára korlátozódik. A *T. harzianum* képes volt kiszorítani *B. cinerea*-t szőlő virágzatából (Gullino, 1992), továbbá a *T. harzianum* T-39 törzsét levélfelületre jutattva, lelassították a kórokozó *B. cinerea* konídiumainak csírázását (Elad és mtsai., 1999). Mivel a kórokozó konídiumainak csírázásához külső tápanyagforrások is szükségesek, a jelenséget részben a *Trichoderma* gyors terjedésének, és a kórokozóval a közös tápanyagokért való sikeres versengésének tulajdonították. Ezek mellett egyes *Trichoderma* izolátumok képesek gyorsan kolonizálni – a *Sclerotinia*, illetve *Botrytis* számára kiváló támadási pontot nyújtó – szeneszencs növényi szöveteket is, így megelőzve a betegséget (Harman és Björkman, 1998).

A Trichodermákra jellemző erős kompetíciós képesség nem minden helyzetben nyilvánul meg. A kompetíció során a talajkörnyezet biotikus elemeinek jelentős hatása lehet a Trichodermák biokontroll aktivitására. Bae és Knudsen (2005), zöld fluoreszcens proteinnel jelölt mutáns *Trichoderma* törzs segítségével kimutatta, hogy minél magasabb a különböző mikroorganizmusok egyedszáma a talaj mikroflórájában, a Trichodermák hifális növekedés helyett, annál inkább a sporuláció stratégiáját választják. Ezzel az általuk kifejtett biokontroll folyamatok hatékonysága jelentősen csökkenhet. Ez a negatív hatás összefüggésbe hozható a talaj mikroflórájának összetételétől nagyban függő „fungisztázis” jelenségével (de Boer és mtsai., 2003).

2.9.9. Egyéb biokontroll tulajdonságok

Enziminaktiváció jelensége: kísérletekkel igazolták, hogy levélfelületre jutattva egyes *T. harzianum* törzsek konídiumai enzimatikusan – szerin peptidázzal – képesek voltak inaktiválni a *Botrytis cinerea* sejtfalbontó enzimjeit (Elad és Kapat, 1999).

Növényi fejlődésre gyakorolt hatás: a *Trichoderma* és növények valódi mutualisztikus (pl. mikorrhiza) kapcsolatára nincsen adat, de egyes kutatók eredményei rámutatnak, hogy a növényi partnerre – legalábbis azok gyökérzetén keresztül – bizonyos *Trichoderma* törzsek képesek növekedésserkentő hatást elérni (Altomare és mtsai., 1999; Harman, 2000; Ezzi és Lynch, 2002; Harman és mtsai., 2004; Verma és mtsai., 2007).

Indukált növényi rezisztencia: a *T. harzianum* T-39 és T-203 törzsei az alkalmazás helyétől térben elkülönülve is képesek voltak a növényben szisztémikus rezisztencia mechanizmusokat indukálni (De Meyer és mtsai., 1998; Elad és mtsai., 1999; Yedidia és mtsai., 1999, 2000).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Nematóda-csapdázó gombák és tenyésztésük

A munkánk során felhasznált *Arthrobotrys* és *Monacrosporium* törzsek nemzetközi törzsgyűjteményből származnak (**6. táblázat**), fenntartásuk CMA (Corn Meal Agar; Oxoid), illetve SP (Soya Peptone) táptalajon történt (Ahrén és mtsai., 2005).

6. táblázat. A kísérletekben használt nematóda csapdázó gombák

Faj	Törzs száma
<i>Monacrosporium haptotylum</i>	CBS 220.54
<i>Monacrosporium haptotylum</i>	CBS 200.50
<i>Monacrosporium cionopagum</i>	CBS 228.52
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	ATCC 24927
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	ATCC 24928
<i>Arthrobotrys tortor</i>	CBS 361.94

3.2. *Trichoderma* törzsek és tenyésztésük

A kísérletekhez használt *Trichoderma* fajok a Szegedi Tudományegyetem mikrobiológiai törzsgyűjteményéből származtak, melyek kivétel nélkül őszi búza rizoszférájából származó hazai izolátumok (**7. táblázat**). Laboratóriumi fenntartásukhoz PDA táptalajt használtunk, amely 39 g/l burgonya dextrózt és 2 % agart tartalmazott (Potato Dextrose Agar; Oxoid).

A *Trichoderma* törzsek és a *C. elegans* peték interakcióihoz, a gomba törzseket szintetikus minimál táptalajra (SM) helyezett sterilizett dialízis membránon, illetve Hewa celofánon 3 napig, 25°C-on, zárt inkubátorban növesztettük. Az SM táptalaj (pH 7,0) összetétele [g/l]: 2,8 (NH₄)₂SO₄; 0,6 urea; 4,0 KH₂PO₄; 0,6 CaCl₂·2H₂O; 0,2 MgSO₄; 0,01 FeSO₄·7H₂O; 0,0028 ZnSO₄·H₂O; 0,0032 CoCl₂·6H₂O; 5,0 glükóz; 20,0 agar.

3.3. *Caenorhabditis elegans* tenyésztése

A kísérletekhez a vad típusú *C. elegans* Bristol N2 törzs fenntartása és felszaporítása zárt inkubátorban, 25°C-on, NGM (Nematode Growth Medium) táptalajon történt (Brenner, 1974). A fonálférgék számára tápanyagforrásként az *Escherichia coli* OP50 törzsét alkalmaztuk.

7. táblázat. A kísérletekhez használt *Trichoderma* törzsek

Faj	Törzs (SZMC)	Származás	ITS azonosítási száma	ITS genotípus
<i>T. harzianum</i>	1600	Algyő	DQ345793	2b ¹
<i>T. harzianum</i>	0559	Deszk	DQ118087	1 ¹
<i>T. harzianum</i>	1630	Ruzsa	DQ345828	HarII ²
<i>T. harzianum</i>	1629	Ruzsa	DQ345827	5 ¹
<i>T. harzianum</i>	2636	Ruzsa	DQ345834	HarI ²
<i>T. harzianum</i>	2637	Tiszasziget	DQ345835	2a ¹
<i>T. harzianum</i>	1677	Tiszasziget	DQ345875	2b ¹
<i>T. harzianum</i>	1647	Kunszentmiklós	DQ345845	2a ¹
<i>T. virens</i>	1605	Algyő	DQ345798	ex-type ³
<i>T. virens</i>	0931	Ruzsa	DQ118083	ex-type ³
<i>T. virens</i>	1616	Deszk	DQ345811	VirI ²
<i>T. virens</i>	1685	Tiszasziget	DQ345883	ex-type ³
<i>T. virens</i>	1671	Kunszentmiklós	DQ345869	VirI ²
<i>T. atroviride</i>	1609	Deszk	DQ345802	MA3643 ⁴
<i>T. atroviride</i>	1624	Deszk	DQ345820	MA3643 ⁴
<i>T. atroviride</i>	1663	Kunszentmiklós	DQ345861	epitype ⁵
<i>T. rossicum</i>	1703	Kunszentmiklós	DQ345901	MA2995 ⁴
<i>T. tomentosum</i>	1610	Deszk	DQ345804	-

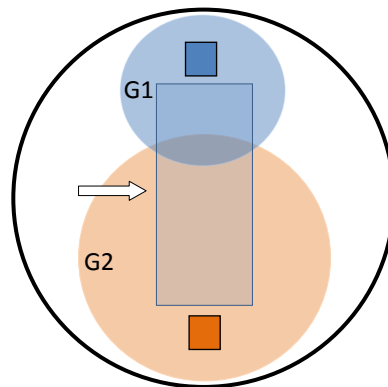
SZMC: Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Gyűjteménye; ITS szekvenciák génbanki azonosítási száma; az ITS genotípusokat ¹Kulling és mtsai. 2000b; ²Kredics és mtsai. 2011; ³Kulling és mtsai. 2001; ⁴Wuczkowski és mtsai. 2003; ⁵Dodd és mtsai. 2003; határozták meg.

3.4. Nematóda-csapdázó gombák és a *Trichoderma* fajok növekedési-tesztje

A kísérletekhez CMA táptalajt használtunk (Mustafa és mtsai., 2009). A különböző gomba fajokat külön-külön Petri-csészékbe 3-3 független ismétlésben a szervezetet tartalmazó agaróz blokk átvitelével oltottuk, majd a zárt Petri-csészéket sötétben, 25°C-on inkubáltuk. A tenyészetek növekedési ütemét 5 napig naponta, a telepsugarak mérésével követtük.

3.5. Nematóda-csapdázó gombák és a *Trichoderma* fajok direkt konfrontációs-tesztje

A nematóda-csapdázó gombák és a *Trichoderma* fajok konfrontációs-tesztjeit SM táptalajt használva végeztük. Az egyes gomba fajok 3 napos eredeti tenyészetének széléről származó inokulumokat az SM táptalajt tartalmazó Petri-csészék két ellentétes pontjára oltottuk, majd 25°C-on inkubáltuk. A mikroszkopos megfigyelés megkönnyítése érdekében a teszt sorozatot a gombapartnerek közé helyezett sterilizett dialízis membrán alkalmazásával is elvégeztük (6. ábra). A párosítások közül azokat tekintettük kompatibilisnek, melyeknél antibiózis és/vagy mikoparazitizmus – a fizikai találkozás után egy héttel – egyáltalán nem, vagy alig volt megfigyelhető, s a két faj a Petri-csészében közel azonos területet foglalt el.



6. ábra. A mikroszkopos megfigyeléshez készült konfrontációs-teszt sematikus ábrája. G1, G2: gombapartnerek; steril tenyészetből származó inokulum (négyzetek); dialízis membrán (fehér nyíl).

3.6. *Trichoderma* törzsek peteparazita képességének megállapítása

Az interakciókhoz szükséges *C. elegans* peték izolálása az Eisenmann által kidolgozott (2005) nátrium-hidroxid- és nátrium-hipoklorit-os eljárással történt. Az NGM-ről a fonálférgeket steril desztillált vízzel centrifugacsövekbe mostuk, majd ülepedés után a kapott szuszpenziót 3,5 ml-re állítottuk be. Centrifugacsövenként 0,5 ml 5 M-os NaOH és 1 ml NaOCl hozzáadása után a szuszpenziókat tíz percen át, két percenként, pár másodperces rázatással elegyítettük, majd 30 mp-ig 1300 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. A centrifugálást követően a felülúszó folyadékot eltávolítottuk, majd a petéket 5-5 ml steril desztillált vízzel kétszer átmostuk. A peték ülepedése után a visszamaradó szuszpenzió körülbelül 15 db petét tartalmazott µl-enként.

Az SM-táptalajon 3 napig növesztett *Trichoderma* telepek pereméhez körülbelül 5 mm széles sávban, törzsenként 3 ismétlést alkalmazva, tehát 3-3 Petri-csészébe egyenként 3×10^2 db petét helyeztünk. Az így elkészült tenyészeteket kiértékelésig (lásd alább) és a partnerek mikroszkopos megfigyelését lehetővé tevő kalkofluoros festésig (lásd 3.7.), azaz 11 órán keresztül, sötétben, 25°C-on inkubáltuk.

Az egyes *Trichoderma* törzsek fonálféregpete-parazitáló képességét a *Trichoderma* törzsek és a *C. elegans* peték 11 órányi interakcióját követően a kikelt lárvák száma alapján egy mérőszám – a pete-parazita index (PPI) (**9. táblázat**) – segítségével jellemeztük. A PPI a *Trichoderma* jelenlétében – törzsenként három ismétlésben – kikelt lárvák átlagszámának és az axénikusan tenyésztett kontroll *C. elegans* tenyészetekben kikelt lárvák átlagának a hányadosa, mely egyszerűen számolható a különböző *Trichoderma* törzsek fonálféregpete-parazitáló képességének jellemzésére. A kikelt lárvák számlálását 60 mm átmérőjű, négyzethálósra (négyzetenként 0,25 mm²) vonalkázott aljú, műanyag Petri-csészékbe helyezve végeztük. Az eredmények statisztikai értékelése egyszempontos varianciaanalízissel, Analysis ToolPak bővítménnyel kiegészített Microsoft Excel programmal történt.

3.7. Mikroszkópos megfigyelések

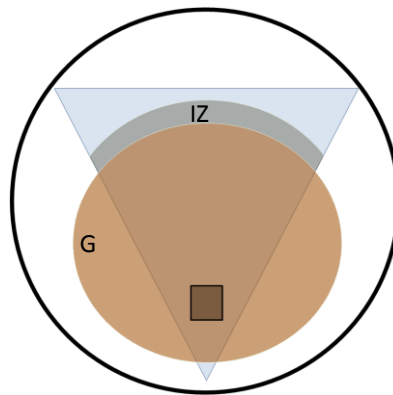
A *Trichoderma* törzsek és a nematóda-csapdázó gombák, valamint a *Trichoderma* törzsek és a *C. elegans* peték interakciójának esetleges morfológiai jellegzetességeit (rátekeredés, parazita hifák, hausztórium) kalkofluor-fehér festést (Calcofluor White Stain, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) alkalmazva figyeltük meg. A kalkofluor-fehér egy nem fluoreszkáló anyagokat is fluoreszkálóvá tevő ún. nem-specifikus fluorokróm színezék, mely kitin és cellulóz tartalmú sejtösszetevőkhöz kötődik. Kalkofluor-fehér M2R-t és Evans kéket (Evans Blue) tartalmaz 1 g/l, illetve 0,5 g/l koncentrációban. A gyártó tanácsának megfelelően 10%-os NaOH-ot használtunk a parazita gomba jellegzetes morfológiai képleteinek megfigyelésére. A fényképek fixáció nélkül, Nikon Eclipse E80i mikroszkóppal készültek.

3.8. *T. harzianum* SZMC 1647 – *C. elegans* pete direkt interakciója génexpressziós kísérletekhez

A *C. elegans* pete hatására indukálódó *T. harzianum* peptidáz és kitináz gének expressziós értékeinek meghatározásához – lefedve a *C. elegans ex utero* egyedfejlődési idejét (11 óra) – hét mintavételi időpontot tartalmazó (0, 1, 3, 5, 7, 9 és 11 óra) sorozat készült, melyek biomassza tömegét egyenként 30-30 interakció egyesítésével kaptuk. Kontrollként pete nélküli kísérleti beállítást alkalmaztunk. A konfrontációs és kontroll tenyészeteket 25°C-on inkubáltuk.

A kísérlethez a *C. elegans* peték izolálása a korábban leírt (3.6.) Eisenmann által kidolgozott (2005) nátrium-hidroxid- és nátrium-hipoklorit-os eljárással történt.

A fonálféreg-petéket tartalmazó szuszpenzióból az SM táptalajra helyezett és Hewa celofánon növesztett *T. harzianum* SZMC 1647 telepeinek pereméhez, körülbelül 5 mm széles sávban, petricsészénként 20 µl – átlagosan 300-400 db petét tartalmazó – szuszpenziót juttattunk ki (7. ábra). A Hewa celofán alkalmazása megkönnyítette a mintavételt és egyben elkerülhetővé vált, hogy a minták SM táptalajjal szennyeződjenek. A különböző inkubálási időknek megfelelően a gomba micélium telepek petéket tartalmazó peremének mintegy 5 mm-nyi zónáját távoltítottuk el, sterilizett mikro poradagoló spatulával. A mintákat folyékony nitrogén segítségével azonnal fagyasztottuk, majd az RNS extrakciójáig -80 °C-on tároltuk.



7. ábra. A génexpressziós vizsgálathoz használt kísérleti elrendezés sematikus ábrája. G: gombatelep; steril tenyészetből származó inokulum (négyzet)
IZ: gombatelep és a fonálféregpeték interakciós zónája; Hewa celofán (háromszög).

3.9. Génexpressziós vizsgálatok

A gomba-pete interakció és a pete nélküli mintákból Stiekema és munkatársai által közölt (1988) eljárást követve izoláltuk a totál RNS-t. Röviden: folyékony nitrogénnel hűtött steril dörzsmozsárban a fagyott 20-30 mg-os mintát 1 ml extrakciós puffer jelenlétében [0,2 M Na-acetát (Sigma); 10 mM EDTA (Sigma); 1 % SDS (Sigma); dietil-pirokarbonát (DEPC) kezelt vízben oldva] porítottuk, majd 1 ml savas fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keverékét alkalmazva a mintákat extraháltuk. Az ismételt szerves oldószerrel történő extrakciók között, centrifugálási lépéseket alkalmaztunk (10 perc, 4°C, 12 000 rpm) mindaddig, amíg a két fázis határa fehérje csapadéktól mentes nem lett. A következő lépésben a vizes fázist – azzal azonos térfogatú – 100%-os kloroformmal extraháltuk. Ismételt centrifugálást (5 perc, 4°C, 12 000 rpm) követően a vizes fázist a kloroformtól elválasztottuk, majd annak RNS tartalmát 2,5 M végkoncentrációjú LiCl oldat alkalmazásával egy éjszakán át tartó inkubálást (4°C) követően kicsaptuk. Majd az RNS-t centrifugálással üleptítettük (10 perc, 4°C, 15 000 rpm) és az RNS csapadékot 2,5 M-os LiCl-oldattal újra mostuk. 5 perc centrifugálás (15000 rpm, 4°C) és a LiCl-os mosóoldat eltávolítása után az RNS csapadékot egymás után kétszer 500 µl 4°C-os, 75%-os etanollal – rázás, vortexelés mellőzésével – ismét mostuk. Az RNS csapadékot szárítás után 20-50 µl RNáz-mentes vízben oldottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az RNS minták minőségét 1,0 %-os denaturáló agaróz gélen ellenőriztük (Sambrook és mtsai., 1989).

A NanoDrop 2000 készülékkel meghatározott nukleinsav koncentráció alapján, az RNS mintákat fél órára, 37°C-on 10 µl végtérfogatban DNáz kezelésnek vetettük alá az alábbi reakció komponensek bemérése révén: 1 µl 10×DNáz I puffer; 1 µl 10 U/µl koncentrációjú RQ1 DNáz enzim (Promega), kiegészítve a kívánt végtérfogatra DEPC-el kezelt vízzel. A reakciót 1 µl Stop oldat hozzáadásával és 10 perc 65°C-on történő inkubálás segítségével állítottuk le.

A DNáz kezelést követően Agilent 2100 Bioanalyzer készülékkel, RNA 6000 Nano reagent kit alkalmazásával meghatároztuk a minták totál RNS-nek minőségét és koncentrációját. A reverz-transzkripcióhoz $\geq 7,0$ RIN számmal (RIN: RNA integrity number) jellemzett mintákat használtunk, mely megfelel a qPCR-el szemben támasztott minőségi követelményeknek (Fleige és Pfaffl, 2006; Schroeder et al, 2006; http10).

A reverz transzkripciót az „Applied Biosystem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Life Technologies) protokolljának megfelelően, reakciónként 20 µl végtérfogatban hajtottuk végre a következők szerint: a minták 1-1 µg-nyi (10-10 µl) totál RNS-éhez 10-10 µl 2×Reverse Transcription Master Mix adtunk, mely a komponenseket tartalmazta: 2 µl 10×RT puffer; 2,0 µl RT random primerek; 0,8 µl 25×dNTP (100 mM); 1 µl MultiScribe™ reverz transzkriptáz; 4,2 µl nukleázmentes víz. A reakciót hagyományos PCR készülékben (GeneAmp PCR System 9700)

végeztük a következő paraméterek beállításával: primerek kapcsolódása a komplementer célszekvenciához 25°C, 10 perc; reverz transzkripció 37°C, 120 perc; enzimdenaturáció: 85°C. Az elkészült cDNS-t felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A következő lépésben a *T. harzianum* kitináz, peptidáz és potenciális referencia génjeire többszörös illesztést követően, Primer-3 programmal (Rozen és Skaletsky, 2000), 19-21 nukleotid hosszúságú, 61-63°C-on bekötődő „forward” és „reverse” primereket terveztünk (8. táblázat). A Master Mix-ek és a PCR reakciók összeméréséhez nagy pontosságú pipettázó-adagoló robotot (epMotion 5070, Eppendorf) használtunk. A valós idejű kvantitatív PCR reakciókhoz Power SYBR[®] Green Master Mix-et (Applied Biosystems) alkalmaztunk, mely tartalmazta a puffer, a dNTP, a DNS-polimeráz, a SYBR Green és a passzív referencia festék (ROX) megfelelő mennyiségét. Az amplifikáció 25 µl végtérfogatban történt, amelybe összemértünk 12,5 µl Power SYBR[®] Green Master Mixet; 0,5 - 0,5 µl „forward” és „reverse” primert (0,5 µM); 10,5 µl nukleázmentes vizet (Ambion); valamint 1 µl 10× higított cDNS mintát. A Master Mix-eket a pipettázó robot előírásának megfelelően az egyes összetevők 10 %-os rászámolásával készítettük. A kísérleteket Step One™ Real-Time PCR System alkalmazásával végeztük (Life Technologies). Az expressziós változások mérésére a készülék számítógépes programjába integrált, relatív kvantifikációt alkalmazó $\Delta\Delta$ CT módszert (Livak és Schmittgen, 2001) alkalmaztuk.

A PCR reakciók kezdő elődenaturációs lépése 95 °C volt 10 percre, melyet 45 ciklusból álló DNS sokszorosítás követett: denaturáció 95 °C-on 15 mp-ig, tapadás 58 °C-on 20 mp-ig és elongáció 72 °C-on 20 mp-ig. A 45 ciklust egy záró elongációs lépés követte 72 °C-on 20 mp-ig. A mérések során 3 technikai replikátumot alkalmaztunk mintánként. Az amplikonok homogenitását minden esetben olvadási görbe felvételével ellenőriztük. Ennek során a reakció elegyet 95°C-ra melegítettük, majd 58 °C-ra hűtöttük vissza. Ezt követően fokozatosan ismét denaturációs hőmérsékletre melegítettük, miközben 0,3°C-onként regisztráltattuk a fluoreszcencia értékeket.

Az *aktin*, az *alfa-tubulin* és a *glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz* referenciagénekre tervezett primerpárok közül az *aktin* és a *tubulin* expressziós szintje állandónak, valamint a kísérleti körülményektől – fonálféreg pete jelenléte, tenyészetek fiziológiai állapota – függetlennek bizonyultak. Méréseinkhez belső referenciának az *aktin* gént választottuk. A kitináz és peptidáz enzimeket kódoló gének időben történő expressziós változását (1, 3, 5, 7, 9, 11 óra) a 0. időpontban (ún. kalibrációs pont) mért expressziós értékhez viszonyítva állapítottuk meg, majd az egyes gének megnyilvánulását logaritmikus (\log_2) skálán ábrázoltuk. Minden qPCR reakciót a MIQE (Minimum Information for Publication of qPCR Experiments) előírásainak megfelelően hajtottunk végre (Bustin és mtsai., 2009).

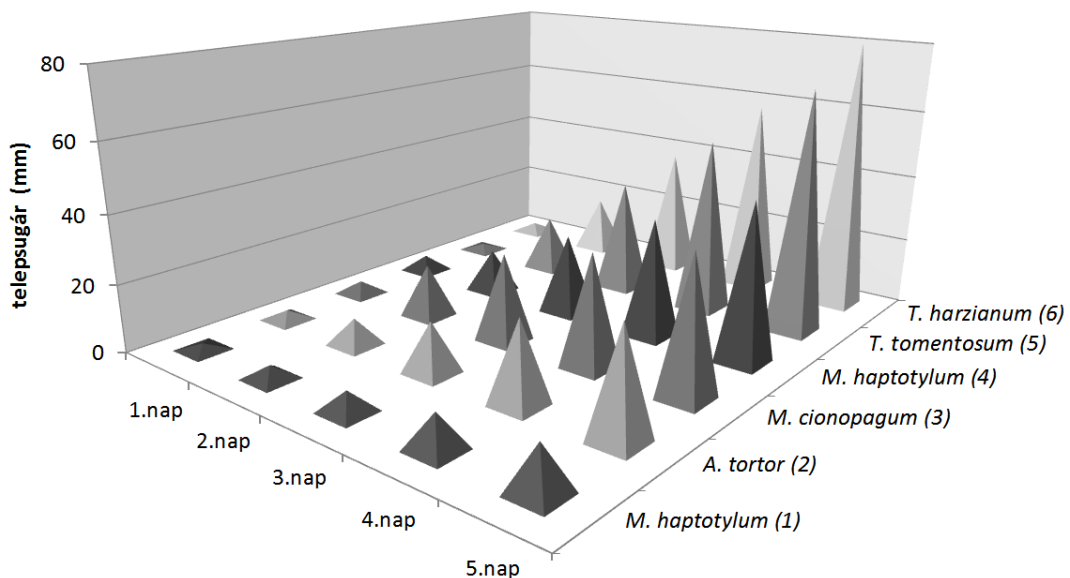
8. táblázat. A PCR amplifikációhoz használt primerek szekvenciái, és az amplifikált gének azonosítói

Amplifikált gén	Génbanki azonosító szám	Primer (5'- szekvencia - 3')	
		Forward	Reverse
<i>chi18-5</i>	FJ179590	GGCCGGTATCTGGGATTACA	GCCTCCCAGAACATGCTACC
<i>chi18-12</i>	X80006.1	CTTCTCTGCTGCTCCCCAGT	CTCGTCTTGGCCCAGTTCTC
<i>chi18-15</i>	AY028421	TCCAAGGCACCACAATCAAG	GTCCAGTTACCCGCTCCATC
<i>pra1</i>	AJ249721	CTTGCGACAGCGACTACGAT	CCCTGACCCCAAGAAACAAC
<i>prb1</i>	M87516	ATGGCGACTCTCTGGGAAAC	CCGCTGATTGTGTTGGTAGC
<i>p8048</i>	AM294978	ATACACATCCTGGGGGCCTA	CAATCAACGCAGGGTCAAAG
<i>p5431</i>	AM294975	TTGGCACTCTCTCCGACATC	AAGGTCTTGGCACCCCTTGAC
<i>ss10</i>	EF063644	CCCCCGGTGTTAATGTTCTC	TGATGAGGTTGCTGACATCGT
<i>p5216</i>	AM294974	CGGCAAGTGGTTGTTGTCT	GTCCGGCACAGGGAAGTAGT
<i>p6281</i>	AJ967001	GCCAAGGTTCCATCTCGACT	AGCAGCAGAGCCACTCTTGA
<i>p9438</i>	AM294979	GCTGTTCACTGCTGCGTTTT	GTTGCCGGATTGTGAGATTG
<i>p7959</i>	AM296483	AAGGGATGGAGCGGAGTATG	CAGGGCCAGGAATTGTCTTT
<i>p1324</i>	AM294972	TGGACTGCAAGTCCGTGA	TCGCCCATCAAAGTACCAAA
<i>sa76</i>	EF063645	TCCCAGCTACAGCCGTTACA	CTGCATCTTCGTCTCCTCCA
<i>p2920</i>	AM294973	AAGATGTTGTTGGCGGGTCT	GTTCCCTGGACAAAGCCAGT
<i>p7455</i>	AM294976	AGGACCAGGCCACCACTAAC	AACCCGAATCAAGCCAAATC
<i>aktin</i>	FJ442478	CGTTCGTGACATCAAGGAGAA	CGCTCTCAAGACCAAGGACA
<i>alfa-tubulin</i>	EF063142	CTGGTCTTCCCTCTCCCTCA	GGCAGCAACCTCCTCGTAAT
<i>GAPDH</i>	Y12542.1	AGGAGATTACCAGCGCCATC	CCCCTCGTTGTCGTACCAG

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. *Trichoderma* spp. és nematóda-csapdázó gombák kombinálhatósága

A *Trichoderma* fajok igen aktívak a növények gyökérszónájában, biokontroll szervezetként sikerrel alkalmazhatóak talajlakó növénykórokozó baktériumok, gombák és növénykártevő fonálférgék ellen, a nematófág gombák pedig speciális micéliális struktúráik segítségével képesek “elkapni”, megölni és tápanyagként hasznosítani a szabadon élő nematódákat, petéiket és cisztáikat. A két faj egyes törzseinek egyidejű vagy időben váltakozó alkalmazása kórokozók és/vagy növénykártevő fonálférgék ellen elméletileg megvalósítható. *In vitro* kísérleti rendszerekben 4 nematóda-csapdázó gombafaj 6 törzsét, és 5 *Trichoderma* faj 18 törzsét vizsgáltuk (6. táblázat) annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk azok kombinálhatósági viszonyaiba. Kezdő lépésként a két potenciális biokontroll hatású szervezet (*Trichoderma*-nematóda-csapdázó) kapcsolatának legegységesebb tulajdonságainak jellemzésére *in vitro* növekedési és konfrontációs kísérleteket végeztünk, melynek során először megállapítottuk a monokultúrák növekedési ütemét. A növekvő gomba kolóniák sugárirányú növekedését 5 napon át 24 óránként mértük. Megállapítható, hogy az összes *Trichoderma* törzs hasonló *in vitro* növekedési ütemmel rendelkezik, azonban mind gyorsabb növekedésű, mint a nematóda-csapdázó gombák (8. ábra).



8. ábra. A nematóda-csapdázó gombák és a *Trichoderma* fajok növekedési üteme (1) CBS 220.54; (2) CBS 361.94; (3) CBS 228.52; (4) CBS 200.50; A *T. tomentosum* SZMC 1610 (5) és a *T. harzianum* SZMC 1647 (6) törzsek a *Trichoderma* fajok leglassabb-, illetve leggyorsabb növekedési ütemét reprezentálják.

A nematóda-csapdázó gombák közül a *M. haptotylum* (CBS 200.50) jellemezhető a leggyorsabb növekedési ütemmel, amely még így is lassabbnak bizonyult, mint a leglassabban növekvő *T. tomentosum* (SZMC 1610).

Az alkalmazott *in vitro* körülmények között a legkisebb növekedési ütemmel a *M. haptotylum* (CBS 220.54) rendelkezett, mely olyan alacsonynak bizonyult, hogy a további konfrontációs kísérletekben nem teszteltük tovább.

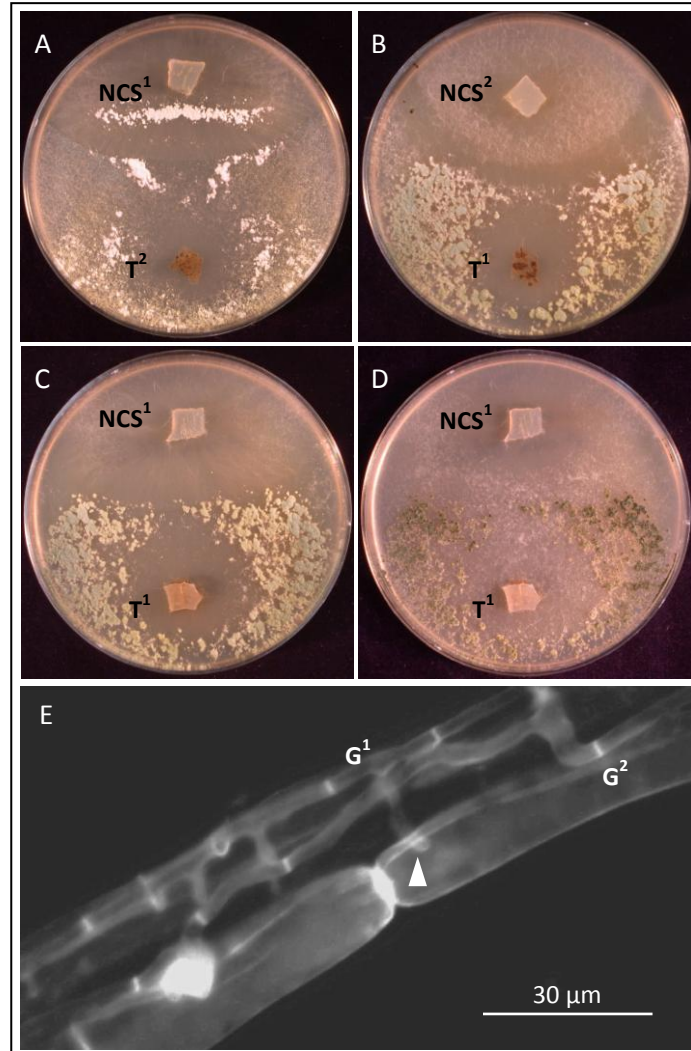
A partnerek az azonos forrásokért nemcsak a növekedésük sebességével versengenek, hatással lehetnek egymás terjeszkedésére inhibitorokkal (enzimek, másodlagos anyagcseretemékek) is, ezért a potenciális partnerek meghatározásához a niche-kolonizáló sebesség mellett figyelembe kellett venni az antibiózist és a parazita képességet egyaránt.

A kilencven direkt konfrontációs kísérlet 80%-ában a *Trichoderma* fajok gyorsabb növekedési ütemmel rendelkeztek (**9. A. ábra**) és 15%-ban antibiózissal antagonizálták a nematóda-csapdázó gombákat (**9. B. ábra**).

A biokontroll ágensek kórokozó és kártevő visszaszorító hatékonysága időben változó (Jeger és mtsai., 2009; Xu és mtsai., 2010). Ez alapján feltételezhető, hogy a több ágenst tartalmazó preparátumokban a mikroorganizmusok között fenálló kölcsönhatások jellege (szinergista vagy antagonista) és azok fokozata időben szintén változást mutathat.

Konfrontációs kísérleteinkben a *T. harzianum* törzsek (SZMC 1600, 1647, 1677 és 2636), valamint a *M. cionopagum* (CBS 228.52) közel azonos növekedési ütemmel bírtak (**9. C. ábra**), és közöttük három hét után sem tapasztaltunk antibiózist vagy mikoparazitizmust (**9. D. ábra**).

A *Trichoderma* fajokra jellemző mikoparazita megjelenési forma – a parazitált gomba hifáinak körülnövése – nem volt megfigyelhető a kísérletekben, az interakciókban e helyett inkább a gombapartnerek hifáinak egymással való párhuzamos növekedését figyeltük meg. A gombapartnerek hifáinak érintkezése esetén csak néhány alkalommal detektáltunk mikoparazita interakcióra esetleg utaló hifaduzzanatokat (**9. E. ábra**). Ezek az esetek leginkább azokban a párosításokban voltak megfigyelhetőek, ahol az egyik partner az *A. oligospora* volt. Az *A. oligospora* a *Trichoderma* fajokhoz hasonlóan szintén képes – igaz behatolás nélkül – mikoparazitizmusra (Nordbring-Hertz és mtsai., 2006). A két gomba hifájának nem szelektív festése miatt nem eldönthető, hogy ezekben az esetekben a megfigyelt hifaduzzanatokat a *Trichoderma* és/vagy az *A. oligospora* képezte-e. Ez a tény nem változtat az adott fajok kompatibilitásának eldöntésében, mivel ha az egyik partner képes a másikat parazitálni, a két faj együttes alkalmazása kizárható.



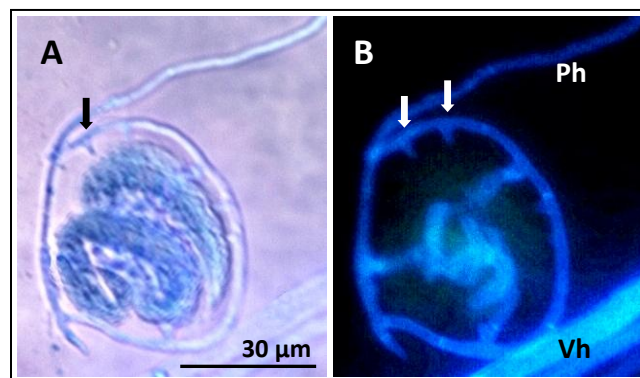
9. ábra. *Trichoderma* spp. és nematóda-csapdázó gombák interakciói (T^1 : *T. harzianum* SZMC 1647; NCS^1 : *M.cionopagum* CBS 228.52; T^2 : *T. tomentosum* SZMC 1610; NCS^2 : *A. tortor* CBS 361.94; T^3 : *T. virens* SZMC 1605; NCS^3 : *A. oligospora* CBS 869.97); **A.** kép: átnövés miatti erőteljes sporuláció; **B.** kép: antibiózis; **C.** és **D.** képek: ugyanaz a tenyészet 5 nappal (**C.**), illetve 3 héttel a táptalajra oltás után (**D.**); **E** kép: a *T. virens* SZMC 1605 (G^1 vagy G^2) és az *A. oligospora* CBS 869.97 (G^1 vagy G^2) hifái egymás mellett párhuzamosan futnak, a nyílhegy azokat a helyeket jelöli, ahol a hifák találkoznak.

Xu és munkatársai (2011) tanulmányukban rámutattak, hogy az egynél több biokontroll hatású organizmus együttes alkalmazásának feltétele, a potenciális partnerek főbb biokontroll mechanizmusainak és interakcióinak teljes ismerete. *In vitro* tesztekkel ennek tisztázására tettünk kísérletet, jóllehet a természetben a partnerek az ismert interakcióktól eltérő jellegű és fokozatú viszonyokat is kialakíthatnak. Az emberi beavatkozás nélküli, természetes folyamatok útján kialakuló biokontroll folyamatokban (pl. szuppresszív talajok) a betegség-, illetve kártevő elnyomó hatás hosszú idő alatt, és nagy valószínűséggel számos – nem kimondottan biotikus – környezeti tényező összehatásának eredményeként alakul ki, ezért az interakció pontos megértéséhez további *in vivo* kísérletek szükségesek.

A természetben előforduló folyamatok az egyetlen biokontroll hatású szervezetet tartalmazó készítmények hatásfokát nagymértékben befolyásolhatják, ezért a kombinált biokontroll ágensek használatának éppen az lehet az előnye, hogy csökkenthetik a biokontroll folyamatok környezetfüggő megnyilvánulásának hatásfokát (Guetsky és mtsai., 2001). Így a kombinált biokontroll készítmények elméletileg szélsőséges környezeti feltételek mellett is alkalmazhatóak, hiszen a több eltérő környezeti igényű és/vagy hatásmechanizmusú mikroorganizmus közül nagyobb valószínűséggel lesznek olyan „túlélők”, amelyek a változó és kompetitív környezetben képesek biokontroll hatást kifejteni. Ezek alapján további *in vivo* kísérletek szükségesek annak tisztázása érdekében, hogy az alkalmazás helyén meglévő mikrobaközösségek és a változó környezet milyen hatást gyakorolnak a kombinációban alkalmazott *Trichoderma*-nematóda-csapdázó gombák kórokozó és kártevő visszaszorító képességének kialakítására.

4.2. *Trichoderma* spp. – *C. elegans* pete interakció

A *C. elegans* faj igen gyorsan szaporodó, életciklusa laboratóriumi feltételek között körülbelül három napig tart. A megtermékenyítéstől a lárvá kikeléséig az embriógenézis 14 órát vesz igénybe, melyből a pete méhen kívüli – *ex utero* – fejlődése körülbelül 9-11 óra. Így a *Trichoderma* fajok és a *C. elegans* peték közötti interakció vizsgálatára mindösszesen 11 óra állt rendelkezésre. A petegomba interakciók mikroszkópos megfigyelései egyértelműen igazolták, hogy a *Trichoderma* fajok – a mikoparazita interakciókból már ismert morfológiai képleteikkel – ezen időintervallum alatt képesek voltak a *C. elegans* peték parazitálására. Az interakciók során a *Trichoderma* hifák a petékre tekeredtek, apresszóriumszerű képletekkel behatoltak, majd a petéket belülről kolonizálták (10. ábra).



10. ábra. *T. harzianum* SZMC 1647 peteparazitizmus, látható és UV fényben egyszerre (A), valamint csak UV fényben (B). A kelés előtti *C. elegans* L₁ lárvá körül apresszóriumszerű képződmények (nyilak), parazitáló- (Ph), valamint vegetatív hifa (Vh) figyelhetőek meg.

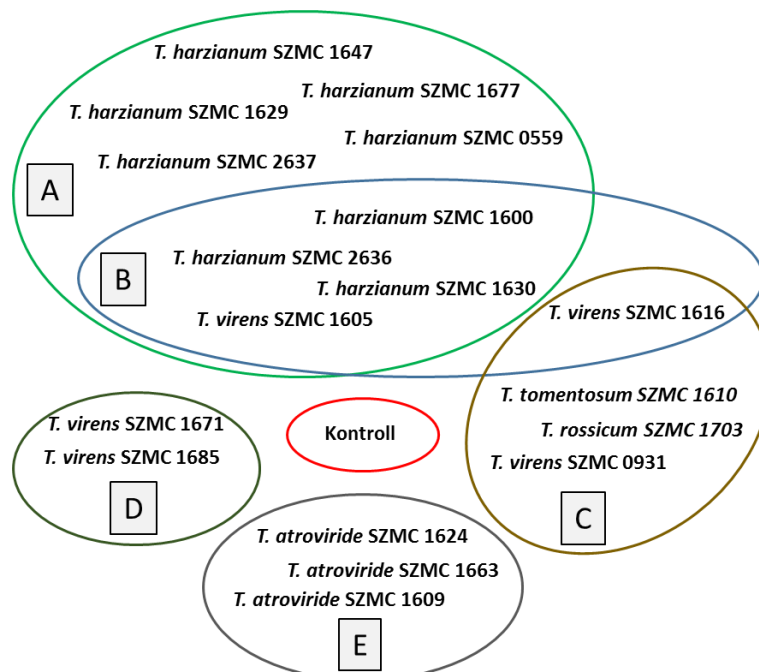
Az egyes *Trichoderma* törzsek pete-parazitáló képességét ún. „pete-parazita index” (PPI) segítségével határoztuk meg (9. táblázat), mely az adott gombapartner jelenlétében kikelt *C. elegans* lárvák számának és a kontrollban a gombapartner jelenléte nélkül nevelt és kikelt lárvák számának hányadosa. Az így kapott szám (nullától egyig terjedő érték) adott *Trichoderma* faj *in vitro* pete-parazitáló képességéről nyújt információt.

A PPI fajonként és törzsenként is eltéréseket mutatott, értéke 0,26–0,70 között változott. Az egyes törzsek kontrolltól való eltérései statisztikailag mind szignifikánsnak ($P \leq 0,05$) bizonyultak, továbbá a *T. harzianum* és *T. atroviride* fajok törzsei fajon belül hasonló, míg több esetben a *T. virens* törzsei egymástól szignifikánsan ($P \leq 0,05$) különböző PPI értékekkel jellemezhetőek (11. ábra). A *T. virens* törzseinek 0,31–0,48, míg a *T. atroviride* törzsek esetében 0,68–0,71 közé esett a PPI értéke. Az összes *Trichoderma* faj közül az utóbbi törzsek rendelkeztek a leggyengébb nematóda-pete-parazitáló képességgel. A *T. rossicum* és a *T. tomentosum* pete-parazita indexe 0,40, tehát az élő és elpusztult nematódák aránya mindkét fajnál közel azonosnak bizonyult.

A legerősebb aktivitást a *T. harzianum* törzsek mutatták (PPI: 0,26–0,32) ezért a további transzkriptomikai kísérleteinket a *T. harzianum* fajokra, illetve az egyik leghatékonyabb pete-parazita képességgel rendelkező törzsrre – az SZMC 1647-re (PPI: 0,26) – koncentráltuk.

9. táblázat. *Trichoderma* fajok törzseinek pete-parazita indexe (PPI)

Faj/Törzs	PPI	Faj/Törzs	PPI	Faj/Törzs	PPI	Faj/Törzs	PPI
<i>T. harzianum</i> SZMC 1647	0,26	<i>T. virens</i> SZMC 1605	0,31	<i>T. atroviride</i> SZMC 1624	0,68	<i>T. rossicum</i> SZMC 1703	0,40
<i>T. harzianum</i> SZMC 1677	0,26	<i>T. virens</i> SZMC 1616	0,35	<i>T. atroviride</i> SZMC 1663	0,71	<i>T. tomentosum</i> SZMC 1610	0,40
<i>T. harzianum</i> SZMC 1629	0,26	<i>T. virens</i> SZMC 0931	0,37	<i>T. atroviride</i> SZMC 1609	0,72		
<i>T. harzianum</i> SZMC 0559	0,27	<i>T. virens</i> SZMC 1671	0,47				
<i>T. harzianum</i> SZMC 2637	0,27	<i>T. virens</i> SZMC 1685	0,48				
<i>T. harzianum</i> SZMC 1630	0,28						
<i>T. harzianum</i> SZMC 1600	0,28						
<i>T. harzianum</i> SZMC 2636	0,32						



11. ábra. *Trichoderma* fajok törzseinek csoportosítása hasonló és szignifikánsan különböző ($P \leq 0,05$) pete-parazita indexek (PPI) alapján. Az egyes csoportok PPI értékei: **A**: 0,26-0,31; **B**: 0,28-0,35; **C**: 0,35-0,40; **D**: 0,47 és 0,48; **E**: 0,68-0,72. A csoportokon belül és az átfedő területeken található törzsek PPI értékei szignifikánsan nem különböznek egymástól.

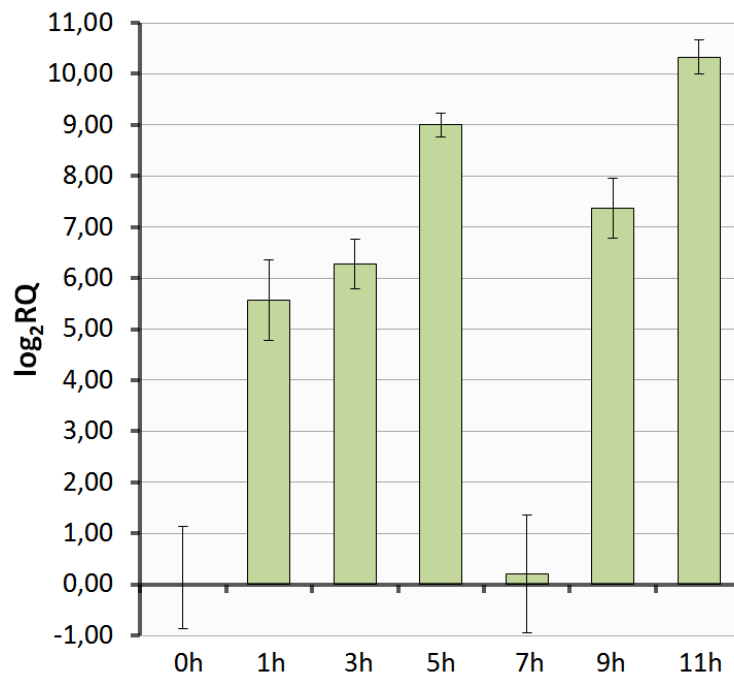
4.3. *T. harzianum* kitino- és proteolitikus enzimjeit kódoló gének transzkripció vizsgálata *C. elegans* peteparazitizmus során

Számos – a sejtfalában kitint tartalmazó – növénykórokozó gomba ellen sikerrel alkalmazott *Trichoderma* faj, a kitin hatékony lebontásának köszönheti kiemelkedő biokontroll képességét (Lorito és mtsai., 1993; Carsolio és mtsai., 1994, 1999; Inbar and Chet, 1995; Haran és mtsai., 1995, 1996; Chet és mtsai., 1998; Cortes és mtsai., 1998; Kulling és mtsai., 2000a; Viterbo és mtsai., 2001; Brunner és mtsai., 2003). Szakirodalmi adatok alapján az is ismert, hogy bizonyos *Trichoderma* fajok képesek egyes növénykártevő fonálféreg petéjének parazitizmusára. Ezekben a folyamatokban egyes szerzők különleges szerepet tulajdonítanak a kitinolitikus enzimeknek (Seidl és mtsai., 2005; Duo-Chuan, 2006; Gortari and Hours, 2008), melyek feltételezhetően egymással és más enzimekkel (pl. peptidázokkal) (Suárez és mtsai., 2004) – egymás hatását kiegészítve vagy felerősítve – vesznek részt a fonálféregpeték és növénykártevő gombák megtámadásában (Elad és mtsai., 1982; Sivan and Chet, 1989; Chet és mtsai., 1997; Lorito, 1998).

4.3.1. Endokitináz enzimeket kódoló gének transzkripció aktivitása

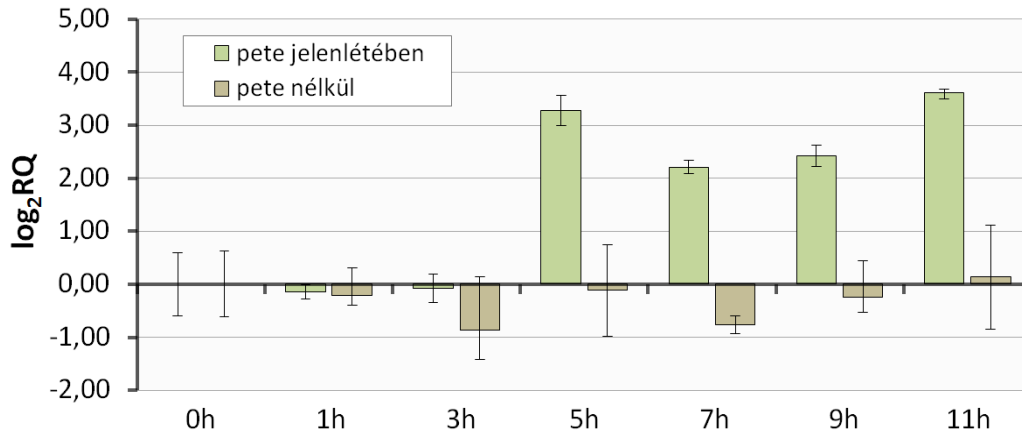
Mivel a *Trichoderma* fajok erőteljes növekedéssel és komoly fegyverténynek számító enzimatikus arzenállal rendelkeznek, feltételezhetőnek tartottuk, hogy az előkísérletekben kiválasztott *T. harzianum* SZMC 1647 képes transzkriptomikailag is jellemezhető génaktivitást mutatni a parazita interakció során a *C. elegans* pete *ex utero* egyedfejlődési fázisában (11 óra).

A *chi18-12* transzkripciója a pete nélküli mintákban nem mutatott statisztikailag értékelhető génexpressziót ($Ct \geq 42$), de a petéket tartalmazó mintákban, az interakció kezdete után egy órával a *chi18-12* transzkriptum abundanciája (**12. ábra**) drasztikusan megemelkedett ($\log_2 RQ$: 5,56), majd fokozatosan tovább növekedett az interakció ötödik órájáig (\log_2 fold: 8,99). Érdekes módon a következő mintavételi időpontban a génexpresszió igen alacsony szintre esett vissza ($\log_2 RQ$: 0,20), melyet az utolsó vizsgált időpontig ismét igen erőteljes, fokozatos növekedés követett (9 óra $\log_2 RQ$: 7,37; 11 óra $\log_2 RQ$: 10,32).



12. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 endokitináz *chi18-12* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

A *chi18-12* génnel ellentétben a *chi18-5* gén csak az interakció ötödik órájától mutatott erőteljes kifejeződést (\log_2 RQ: 3,28) (**13. ábra**). A következő időpontban (7 óra) – ha nem is olyan drasztikus mértékben, de a *chi18-12* tendenciájához hasonlóan – egy átmeneti csökkenés után expressziója ismét fokozatosan emelkedett a vizsgálat végéig (11 óra \log_2 RQ: 3,60).



13. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 endokitináz *chi18-5* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

A valós idejű génexpressziós vizsgálatokhoz viszonyítási pontként a peték gomba hifái elé történő helyezését (0h) választottuk, jóllehet ebben az időpontban a negatív kontrollhoz hasonlóan szignifikáns génexpressziós változás még nem várható.

A *chi18-5* gén esetében a gomba-pete kölcsönhatás első mintavételi pontjához képest (0h) az ötödik óráig nem mérhető szignifikáns génexpressziós növekedés. Ezzel ellentétben a mikoparazita interakcióban az említett gén transzkripciója már igen korai fázisban, a gazda-parazita fizikai kontaktusa előtt emelkedni kezd (Zeilinger és mtsai., 1999). Szintén érdekes, hogy a mikoparazita interakcióban csak gyengén expresszálódó *chi18-12* (Dana és mtsai. 2001) a gomba-pete interakciója során igen erőteljesen kifejeződött (\log_2 RQ: 5,56-1,32), sőt ebben az esetben 3–4 órával hamarabb mutatott emelt expressziós értéket, mint a *chi18-5*.

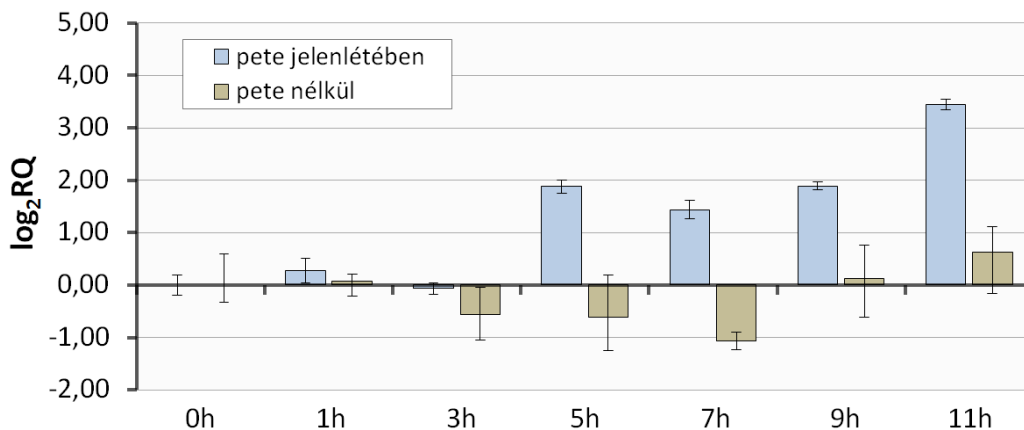
Általánosságban megállapítható, hogy a két kitináz gén (*chi18-5* és *chi18-12*) transzkripció szintjei jelentős különbségeket mutattak. Az interakció hetedik óráját kivéve (*chi18-5* \log_2 RQ: 2,21; *chi18-12* \log_2 RQ: 0,20) a *chi18-12* értékei (\log_2 RQ: 5,56-1,32) a *chi18-5*-nél (\log_2 RQ: 2,21-3,60) szignifikánsan magasabbnak bizonyultak. A mRNS abszolút szintjeiben megnyilvánuló különbségek ellenére a két gén időben hasonló expressziós tendenciái arra engednek következtetni, hogy a *chi18-5* és a *chi18-12* a peteparazitizmus folyamatában valószínűleg egymást erősítve, illetve egymást kiegészítve játszanak szerepet.

Szakirodalmi adatok alapján a harmadik ismert *T. harzianum* kitináz kódoló gén (*chi18-15*) transzkripciója – mely kitin jelenlétében és mikoparazita interakcióban egyaránt indukálódott (Viterbo és mtsai., 2001) – a peteparazitizmus során nem volt kimutatható.

4.3.2. Szerin endopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripció aktivitása

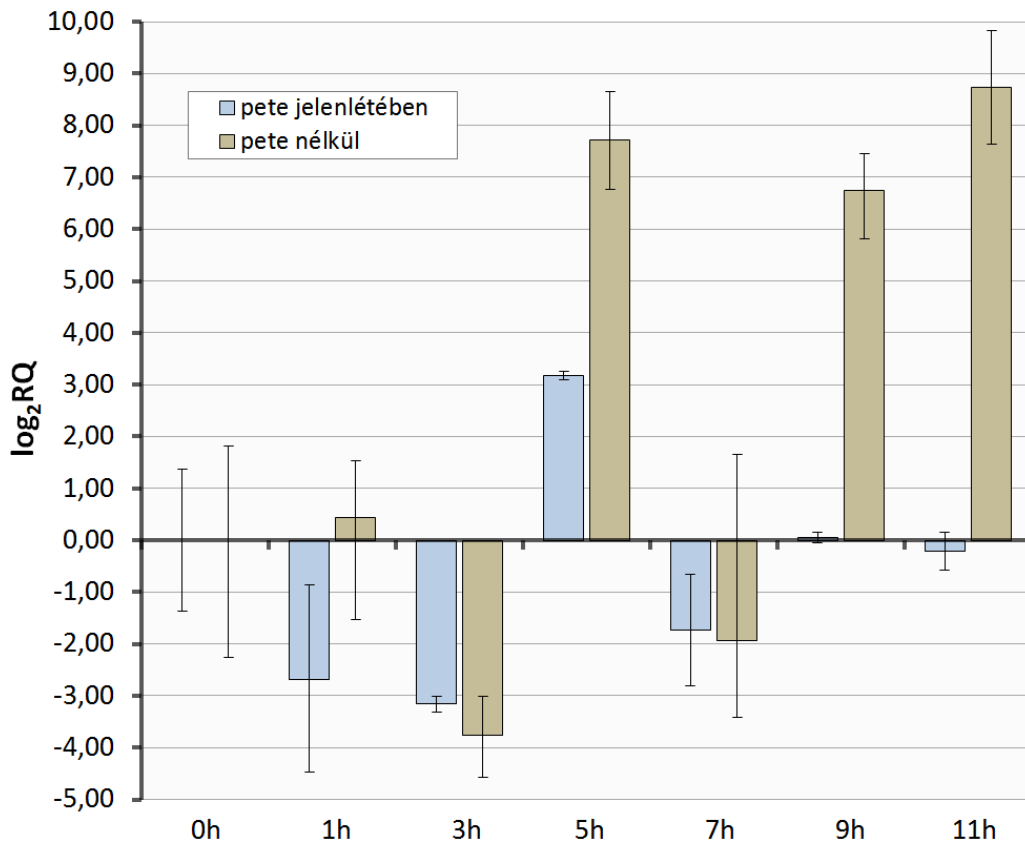
A *Trichoderma* fajok közül eddig csak a *T. harzianum* egy tripszin szerű savas (*pral* és paralógja *p7480*, GenBank AC number: AM294977) valamint egy bázikus (*prbl* és homológja *p10261*, GenBank AC number: AM294980) szerin peptidázról volt ismert, hogy nematocid hatással rendelkeznek (Sharon és mtsai., 2001; Suárez és mtsai., 2004).

A *T. harzianum*-fonálféregpete interakció ötödik órájától a *pral* transzkripció mintázata szignifikáns emelkedést mutatott (\log_2 RQ: 1,88–3,44) (**14. ábra**). Suárez és munkatársai (2004) szintén korai időpontban – az indukciót követő negyedik órában – tapasztalták a *pral* gén fokozott megnyilvánulását növénykórokozó gomba sejtfalával, illetve kitinnel kiegészített minimál táptalajon. Az általuk vizsgált két következő időpontban (9 és 24 óra) viszont a *pral* gén aktivitásának erős csökkenését tapasztalták, míg a gén mRNS abundanciája viszonylag stabil maradt a gomba-pete interakció hetedik (\log_2 RQ: 1,4) és kilencedik (\log_2 RQ: 1,89) órájában, valamint a kísérlet végéig további növekedés jellemezte (11 óra \log_2 RQ: 3,44).



14.ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 szerin endopeptidáz *pral* transzkripció profilja. (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

Kísérletünkben a másik – nematicid hatásáról szintén ismert – szerin endopeptidáz (*prb1*) transzkripciója a petéket nem tartalmazó mintákban az ötödik (\log_2 RQ: 7,70), kilencedik (\log_2 RQ: 6,75) és tizenegyedik (\log_2 RQ: 8,73) órában igen magasnak bizonyult, míg a petéket tartalmazó mintákban a gén leginkább csökkent génexpressziót mutatott, vagy nem mutatott szignifikáns különbséget az első mintavételi időponthoz képest (7 óra \log_2 RQ: -1,74; 9 óra \log_2 RQ: 0,05; 11 óra \log_2 RQ: -0,21) (15. ábra).



15. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 szerin endopeptidáz *prb1* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

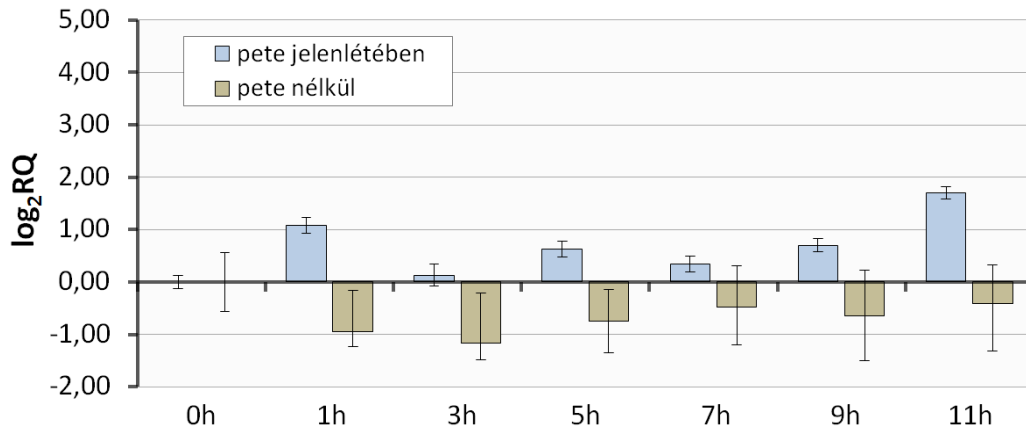
A *prb1* génnek a pete nélküli mintákban megfigyelhető változékony mintázata összefüggésbe hozható a Suárez és munkatársai (2007) által tapasztaltakkal. Kísérletünkben a *p10261* – mely a *prb1* homológja – alacsony szintű nitrogénforrást tartalmazó táptalajon szintén karakterisztikus autoregulációt mutatott.

Olmedo-Monfil és munkatársai (2002) tanulmányukban rámutatnak, hogy a *prb1* transzkripciója nitrogén katabolit repressziós szabályozás alá esik. A nitrogén katabolit repressziós szabályozás során az elsődleges nitrogénforrások (pl. ammónia, glutamin és glutamát) nitrogén katabolit represszió indukálásával elnyomják azokat a géneket, amelyek a másodlagos nitrogénforrások anyagcseréjének szabályozásában játszanak szerepet (Marzluf 1997; ter Schure 2000). Amikor az elsődleges nitrogénforrások nem elérhetőek, vagy csak alacsony koncentrációban vannak jelen,

akkor ún. másodlagos anyagcsereforrások: nitrát, nitrit, purinok, amidok, aminosavak és fehérjék kerülnek hasznosításra. Ha másodlagos nitrógenforráson tenyésztett sejtek elsődleges nitrógenforrást jelentő tápanyaghoz jutnak, akkor bizonyos gének – mint például a *prb1* – amelyek a szegényebb nitrógenforrás hasznosításának szabályozásában vesznek részt represszálódnak, géntermékeik inaktiválódnak és/vagy degradálódnak (Magasanik, 1992; Wiame és mtsai., 1985).

A *prb1* gén aktivitása pete jelenlétében a negatív kontrollhoz hasonlítva a kísérlet ötödik órája (\log_2 RQ: 3,16) után nem mutatott emelkedett génexpressziót. Ezekben az időpontokban (9 és 11 h) a *prb1* gén alacsony aktivitásának az egyik lehetséges magyarázata az, hogy miután a *T. harzianum* parazita hifái áthatoltak a pete külső rétegén, a petében található nagy mennyiségű fehérje bontásából származó NH_4^+ megakadályozhatta a *prb1* további indukcióját. Egy másik magyarázat szerint az ok éppen a *prb1* és a többi gén egymásra ható komplex szabályozási folyamataiban kereshető. Feltételezhető, hogy mivel a *prb1* funkciója nem elsődleges fontosságú a fonálféreg pete parazitizmusban, a gomba a parazita interakció kialakítása során optimalizálja a folyamathoz szükséges enzimek termelésére fordított energiáit. Későbbiekben a kérdés teljeskörű tisztázása annál is érdekesebb lenne, mivel egy korábbi tanulmány szerint a *Trichoderma hamatum chi18-5* és a *prb1* génjei koexpressziót mutattak glicerint tartalmazó táptalaj, és *Sclerotinia sclerotiorum*-mal történő konfrontáció esetén. A koexpresszió tényét magyarázza, hogy a két gén promoter régióiban olyan közös motívumokat találtak (MYRE1-MYRE4), amelyek felelőssé tehetőek a mikoparazita válaszreakció kialakításáért (Steyaert és mtsai., 2004). Mivel a *T. harzianum* és *C. elgenas* pete interakciójában a *chi18-5* és a *prb1* transzkripciós mintázata igen különböző (**13. és 15. ábrák**), a két génre a peteparazita interakció indukáló elemei valószínűleg nem a Steyaert és munkatársai által feltételezett közös motívumokon keresztül fejtik ki hatásukat.

A *C. elegans* peték jelenlétében egy másik szubtilizin szerin endopeptidázt kódoló gén (*p8048*), minden mintavételi időpontban gyengén indukálódott (**16. ábra**). A gén mRNS abundanciája általában szűk intervallumon belül változott (\log_2 RQ: 0,13–1,08), az csak a kísérlet végére ért el egy mérsékelt expressziós értéket (\log_2 RQ: 1,70).

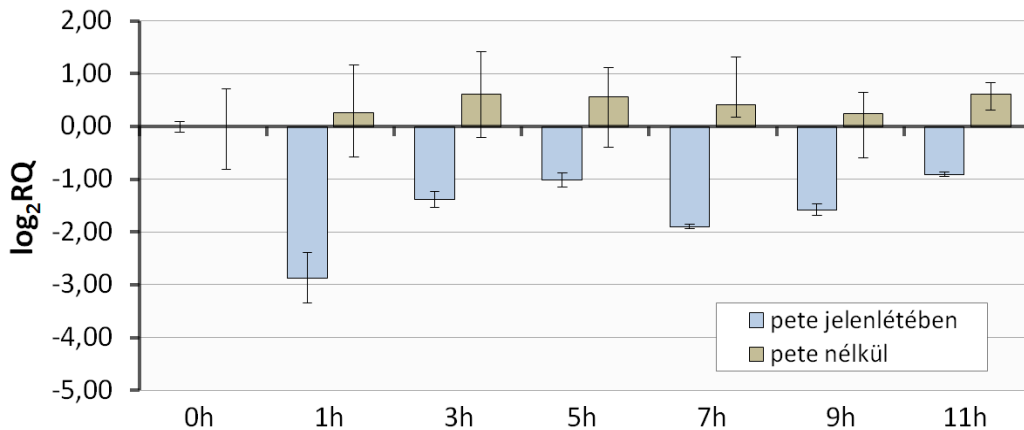


16. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 szerin endopeptidáz *p8048* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

A *p8048* alacsonyabb szinten manifesztálódott, mint a *pral*, de génexpressziós mintázatuk mutat némi hasonlóságot. A két gén expressziós mintázatának hasonlóságát gombasejtfallal és kitinnel kiegészített táptalajon is megfigyelték (Suárez és mtsai. 2007), ellenben a gomba-pete interakciótól eltérően ezekben az esetekben a *p8048* erősebben indukálódott.

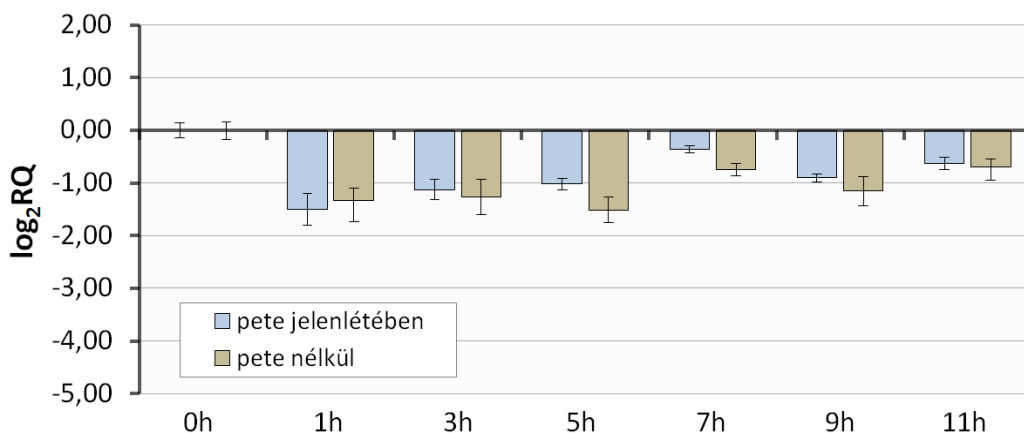
Annak ellenére, hogy a Suárez és munkatársai által használt összehasonlító Northern blot analízis nem alkalmas a *pral* és a *p8048* kifejeződése közötti finom különbségek kimutatására, arra a vitatható megállapításra jutottak, hogy kísérletükben a két gén expressziójának erőssége nem korrelál a promoterükben található karbon represszióért felelős CreA transzkripció faktor kötőhelyek számával (2 db a *p8048* és 5db a *pral* promoterében). Tudomásunk szerint nincsen szakirodalmi utalás vagy bizonyíték arra nézve, hogy a CreA transzkripció faktor kötőhelyek száma milyen befolyást gyakorol a *pral* és a *p8048* gének kifejeződésének erősségére. A kísérleteinkhez használt kvantitatív valós idejű PCR eredményei mindenesetre alátámasztják azt az elméletet, amely szerint ugyanolyan kísérleti körülmények között a hasonló transzkripció mintázatú gének szabályozó régiói közös elemeket hordozhatnak (Zhang, 1999; Vilo and Kivinen, 2001).

Suárez és munkatársai kísérletében (2007) a *p5431* gén mind glükóz, kitin, *Botrytis cinerea* sejtfal, nitrogén, valamint szénforrás hiányában, minden vizsgált időpontban konstitutívan expresszáldott. A *T. harzianum* és *C. elegans* pete interakciójában minden vizsgált időpontban szignifikánsan csökkent génexpressziót mértünk a 0h időponthoz és a kontrollhoz képest (**17. ábra**), ezért a génnek a peteparazitizmus folyamatában feltételezhetően nincs, vagy alárendelt szerepe van. A gomba a vizsgált időpontokban valószínűleg a parazita interakcióhoz nélkülözhetlenebb enzimek termelésére fordítja energiáit.



17. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 szerin endopeptidáz *p5431* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

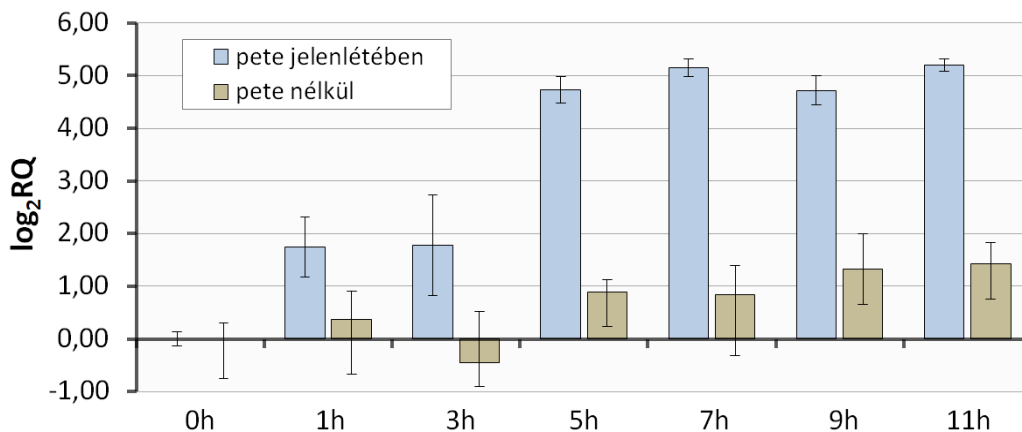
Az *SS10* gén Yan és Qian (2009) kísérleteiben minden indukáló stimulusra (*B. cinerea* sejtfal, kitin) határozott transzkripció emelkedést mutatott, azonban a peteparazitizmus során nem tapasztaltunk szignifikáns génexpressziós változást a negatív kontrollhoz képest (**18. ábra**), tehát a pete jelenléte nem volt hatással az *SS10* transzkripciójára.



18. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 szerin endopeptidáz *SS10* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

Érdemes viszont rámutatni, hogy Suárez és munkatársai kísérletében (2007) az *SS10* gén homológjának (*p7129*) transzkripciója semmilyen biokontroll jellegű kísérletben (kitinnel, és öt különböző mikroszkópikus gomba sejtjfalával kiegészített táptalajon) nem volt kimutatható.

Jól ismert, hogy a mikroszkópikus gombák az evolúciós fegyverkezési verseny során a környezetükben lehetségesen előforduló fehérjeforrások hasznosítására nagyszámú peptidázt „fejlesztettek ki” (St. Leger és mtsai., 1997), mégis meglepő, hogy különböző biokontroll jellegű kísérletekben valamint a gomba-fonálféregpete interakcióban, a *T. harzianum* egyes génjei alapvetően különböző transzkripciós profillal rendelkeznek. Például az aorzin szerin endopeptidázt kódoló *p5216* gén, mely az S53 peptidáz család tagja, egyetlen korábbi biokontroll eseményt szimuláló kísérletben sem mutatott válaszreakciót (Suárez és mtsai., 2007), azonban *C. elegans* pete jelenlétében az összes tesztelt peptidázt kódoló gén közül a legmagasabb és időben legkiegyenlítettebb transzkriptum abundanciát mutatta (**19. ábra**).



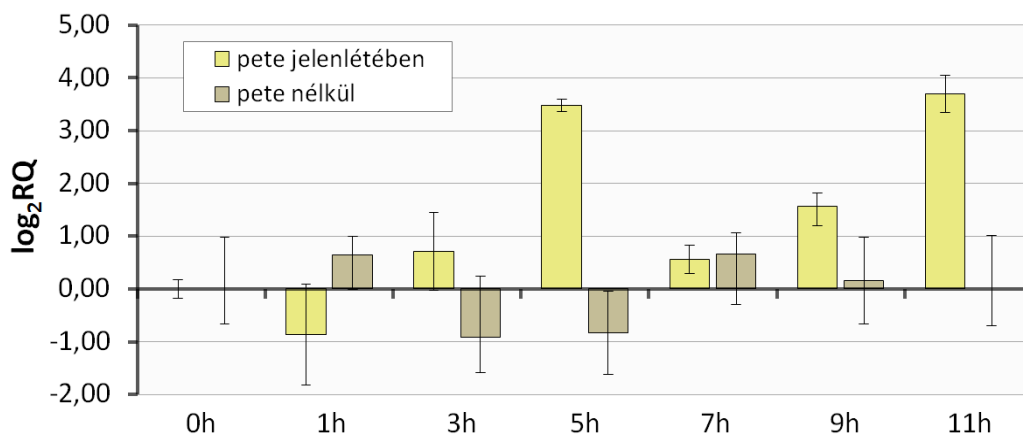
19. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 szerin endopeptidáz *p5216* transzkripciós profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

A *p5216* gén már az interakció korai szakaszában (1 óra log₂ RQ: 1,74; 2 óra log₂ RQ: 1,78) emelt expressziós érték változást mutatott. Az ötödik órában még aktívabbá vált (log₂ RQ: 4,73), majd ettől az időponttól kezdve a *C. elegans ex utero* egyedfejlődésének végéig transzkripciója megközelítőleg azonos szinten maradt (7 óra log₂ RQ: 5,15; 9 óra log₂ RQ: 4,72; 11 óra log₂ RQ: 5,20). Ez arra mutat, hogy a P5216 aorzin szerin endopeptidáznak alapvető szerepe lehet a *T. harzianum* fonálféregpete-parazitizmusában.

4.3.3. Aszpartil endopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripció aktivitása

A közelmúltig a biológiai védekezésben kipróbált, vagy *in vitro* szimulált biokontroll folyamatokban vizsgált *Trichoderma* spp. extracelluláris proteolitikus enzimjei közül, a kutatások célkeresztjében a szerin peptidázok álltak (Flores és mtsai., 1997; De Marco and Felix, 2002; Hanson and Howell, 2004; Pozo és mtsai., 2004; Suárez és mtsai., 2004; Grinyer és mtsai., 2005). Egyes kutatók eredményei viszont rávilágítanak, hogy számos biokontroll folyamatban az aszpartil peptidázok szintén jelentős szerepet játszhatnak (Suárez és mtsai., 2004; 2007; Yan and Qian, 2007). Figyelembe véve az aszpartil endopeptidázok potenciális jelentőségét, a *T. harzianum* pete-parazitáló képességének vizsgálata során öt aszpartil endopeptidázt kódoló gén (*p6281*, *p9438*, *p7959*, *p1324* és *SA76*) transzkripció vizsgálatát végeztük el.

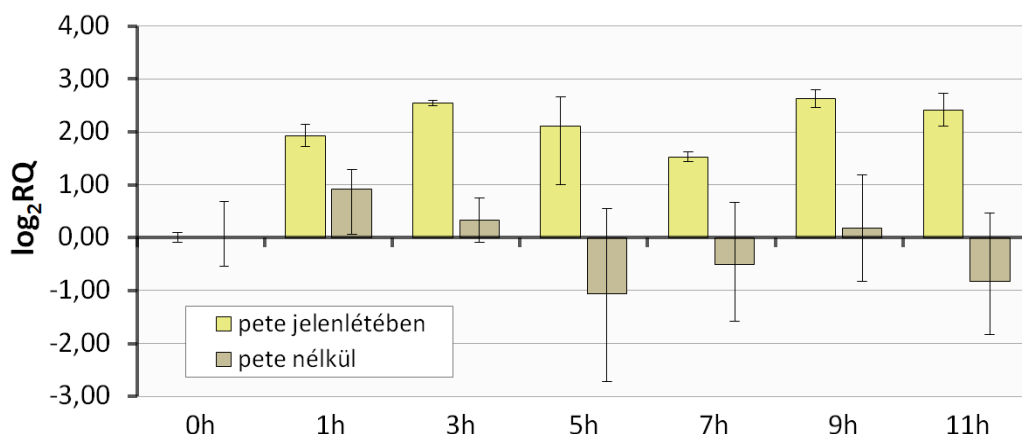
Egy korábbi tanulmányban (Suárez és mtsai., 2005) az aszpartil peptidáz P6281 transzkripció és fehérje expresszió vizsgálata során egyértelmű megállapítást nyert, hogy génszintű expresszióját különböző növénykórokozó gombák sejtfalai indukálni képesek. A gombasejtfal és a fonálféregpete által indukált transzkripció mintázat összehasonlítása azonban hasonlóságokra és jelentős különbségekre is rámutatott. Mindkét esetben megfigyelhető az mRNS korai felhalmozódása (5 óra \log_2 RQ: 3,48), de a gomba-pete interakcióban egy átmeneti csökkenés után (7 óra \log_2 RQ: 0,56) egy második csúcs is észlelhető (11 óra \log_2 RQ: 3,70) (20. ábra) ellentétben a gomba sejtfallal indukált kísérletekben tapasztalt génexpresszió csökkenéssel.



20. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 aszpartil endopeptidáz *p6281* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissza értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

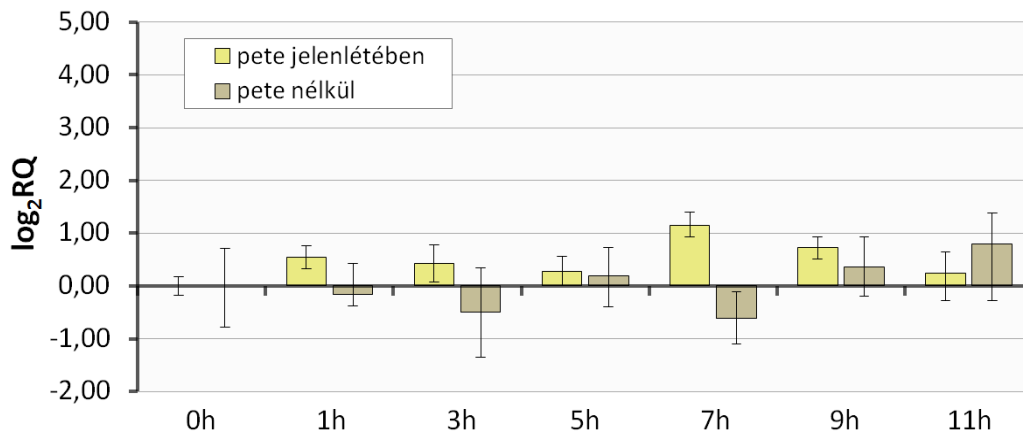
Összehasonlítva a *p6281*, *pra1* és *p8048* gének gomba-pete interakcióban megfigyelhető transzkripciós mintázatát – figyelembe véve a *p6281* nagyobb arányú kilengéseit is – az ötödik órától szembeötlő azok hasonlósága. A már korábban említettek szerint azok a gének, amelyek hasonló transzkripciós profillal rendelkeznek, promoter régióikban nagy valószínűséggel közös szabályzó elemeket hordozhatnak (Zhang, 1999; Vilo és Kivinen, 2001). Szekvencia adatok bizonyítják, hogy a *p8048* gén promoter régiójában kettő, a *pra1* gén esetében öt CreA transzkripciós kötőhely található. Mivel a *p6281* karbon katabolit szabályozását kísérleti úton bizonyították és *in silico* 3 CreA transzkripciós faktor kötőhelyet is azonosítottak annak promoter régiójában (Suárez és mtsai., 2005), a *p6281*, *pra1* és *p8048* gének hasonló transzkripciós profilja nem meglepő, azonban a kérdés egyértelmű tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

Suárez és munkatársai tanulmányában (2007) egy másik aszpartil endopeptidázt kódoló gén (*p9438*) vizsgálata során kettő kivételével az összes biokontroll jellegű kísérletben csak igen későn, huszonnégy óra után tapasztaltak transzkripciós aktivitást. Kitinnel kiegészített táptalaj alkalmazása során csupán a negyedik órában tapasztaltak minimális mRNS abundancia növekedést, míg nitrogén hiányos táptalajon folyamatosan növekvő, huszonnégy óra múlva pedig igen magas transzkripciós aktivitást mértek. A kései transzkripciós aktivitást azzal magyarázták, hogy a szóban forgó gén által kódolt enzim N-terminális aminosav régiójában nem található az extracelluláris enzimekre jellemző szignál szekvencia, így az valószínűleg nem szekretált peptidáz. Érdekes módon a gén átíródása folyamatosnak bizonyult a *T. harzianum* és *C. elegans* pete interakciója alatt, mely a 0h időponthoz és a kontrollhoz képest mérsékelten magas mRNS abundanciával volt jellemezhető (\log_2 RQ: 1,53 minimum és 2,63 maximum értékek között) (21. ábra). Expressziós mintázata alapján a *p9438* gén a fonálféreg-pete parazitizmusában feltehetőleg szerepet játszik.



21. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 aszpartil endopeptidáz *p9438* transzkripciós profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissza értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

A *p7959* gén transzkripciója a 0. időponthoz képest egyik időmintában sem mutatott lényeges változást, végig alacsony aktivitással jellemezhető (\log_2 RQ: 0,25 minimum és 1,15 maximum értékek között) (**22. ábra**). Szimulált biokontroll jellegű folyamatokban (glükóz jelenlétében, szén-, és nitrogén-hiányos táptalajon, valamint kitinnel és *Botrytis cinerea* sejtfal preparátummal kiegészített táptalajon), eltérő szinteken ugyan, de a gén minden vizsgált időpillanatban megnyilvánult (Suárez és mtsai., 2007). Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a *C. elegans* peték parazitizmusában a *p7959* gén nem tölt be jelentős szerepet.



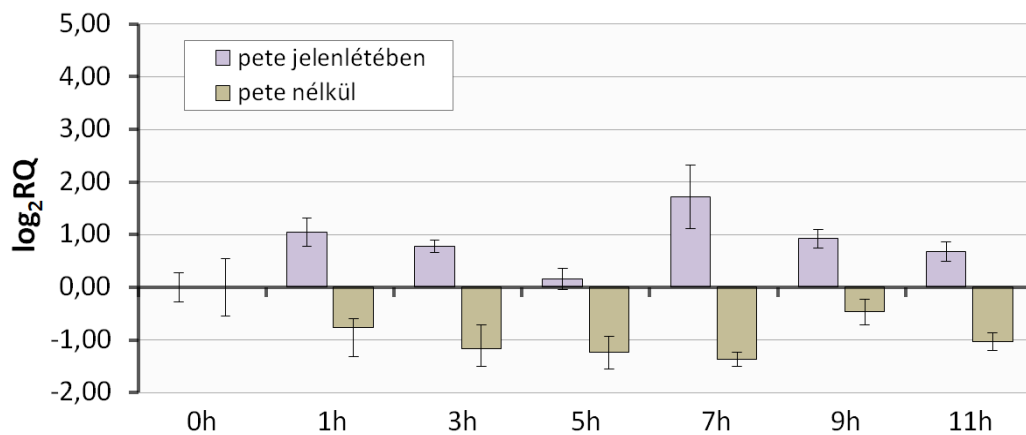
22. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 aszpartil endopeptidáz *p7959* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissza értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

A *p1324* jelű aszpartil endopeptidázt kódoló gén – hasonlóan Suárez és munkatársai által tapasztalt eredményekhez (2007) – a peteparazitizmus során sem mutatott a detektálási zajsíntet meghaladó génaktivitást.

A fonálféregpeték szintén nem gyakoroltak hatást az aszpartil endopeptidázt kódoló *SA76* génre, jóllehet erről a génről korábban azt állapították meg, hogy transzkripciója különböző növénykórokozó gombák sejtfalával és kitinnel kiegészített táptalajon indukálható (Yan and Qian, 2007).

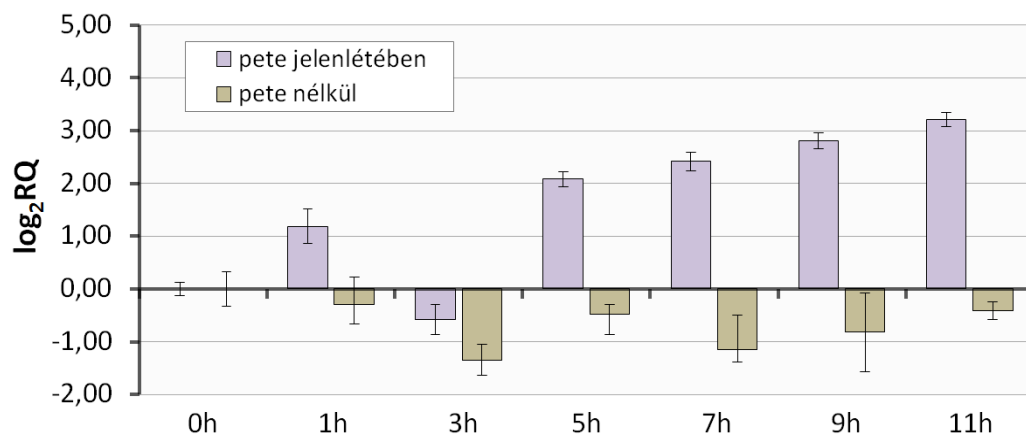
4.3.4. Metalloendopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripció aktivitása

Szimulált biokontroll jellegű folyamatokban az aminoszavakat kódoló *p2920* és a fentebb említett *p7959* aszpartil endopeptidáz kódoló gének – kitin tartalmú táptalajt kivéve – hasonló transzkripció mintázattal voltak jellemezhetőek (Suárez és mtsai., 2007). Ez a megállapítás igaznak bizonyult a *T. harzianum* és *C. elegans* pete interakciója során mért génexpressziós változásokra is (22. és 23. ábrák). A *p2920* gén mérsékelt szintű aktivitás változásai jelzik, hogy fonalféreg peték jelenléte ugyan fokozta a gén mRNS abundanciáját, azonban a legtöbb érték \log_2 RQ: 1 és -1 közé esett, mely konvencionálisan az adatok értékelésének kritikus zónája. Ezért a vizsgált kísérleti körülmények között a peteparazitizmus kialakításában a *p2920* a *p7959* génhez hasonlóan nem, vagy csak alárendelt szerepet játszik.



23. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 aminoszavakat kódoló *p2920* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

A metalloendopeptidáz *p7455* az ötödik órától nyilvánult meg karakterisztikusan (\log_2 RQ: 2,08). Transzkripciója a kísérlet végéig egyenletesen növekedett (\log_2 RQ: 3,21) (24. ábra).



24. ábra. A *T. harzianum* SZMC 1647 metalloendopeptidáz *p7455* transzkripció profilja (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

Suárez és munkatársai (2007) a *p7455* gén promoter régiójában számos CreA és AreA szabályzó elemet azonosítottak. Így elvárható lett volna, hogy hasonló transzkripciós mintázatot mutasson azokkal a géekkel, amelyek szintén tartalmazznak CreA transzkripciós faktor kötőhelyet. Ezzel ellentétben a *T. harzianum* és a fonálféregpeték interakciójában a többi CreA kötőhellyel rendelkező géntől eltérő transzkripciós mintázatot detektáltunk. Ezt a tényt támasztja alá Suárez és munkatársainak (2007) megállapítása is miszerint a *p7455* transzkripciós mintázata eltér a többi szintén CreA szabályzó elemmel rendelkező géntől, ugyanis sem gombasejttel vagy más szén-, illetve nitrogénforrás jelenléte, sem pedig ezek hiánya nem indukálta gén átírását. Egyedül kitinnel kiegészített táptalajon, és akkor is csak egyetlen időpontban tudtak gyenge transzkripciós aktivitást detektálni. Transzkripciós profilja alapján feltételezhető, hogy a *T. harzianum* fonálféregpete-parazitizmusában szerepet játszik.

4.3.5. A kitináz és endopeptidáz kódoló gének relatív génexpressziós mintázatainak összehasonlítása

A pete parazitizmus során aktiválódó sok komponesű enzimrendszer időben történő ki- és bekapcsolásának háttérben meghúzódó okok ugyan nem teljesen tisztázottak, de az a tény, hogy a parazitizmus sikere az abban résztvevő számos komponens eredőjeként alakul ki megkérdőjelezhetetlen. A különböző komponensek transzkripcionális aktivitásának alakulását a **25.** összefoglaló **ábra** szemlélteti.

A fehérje és kitin összetételű fonálféregpete kolinizációjának legkorábbi szakaszában – az interakció első és harmadik órája között – a legintenzívebben indukálódó gén az endokitináz *chi18-12* volt. Ezzel párhuzamosan az aorzin szerin endopeptidáz *p5216* gén aktivitása is szignifikáns növekedést mutatott, de korántsem olyan mértékben, mint azt a *chi18-12* gén esetében tapasztaltuk.

Világosan megállapítható azonban, hogy amíg egyes gének esetében az első értékelhető génaktivitás növekedés az interakció ötödik órájában volt mérhető (pl. *chi18-5*, *pra1*, *prb1*, *p6281*), addig más gének transzkripciói ettől az időponttól kezdve további növekedést mutattak (*p5216*, *p7455*).

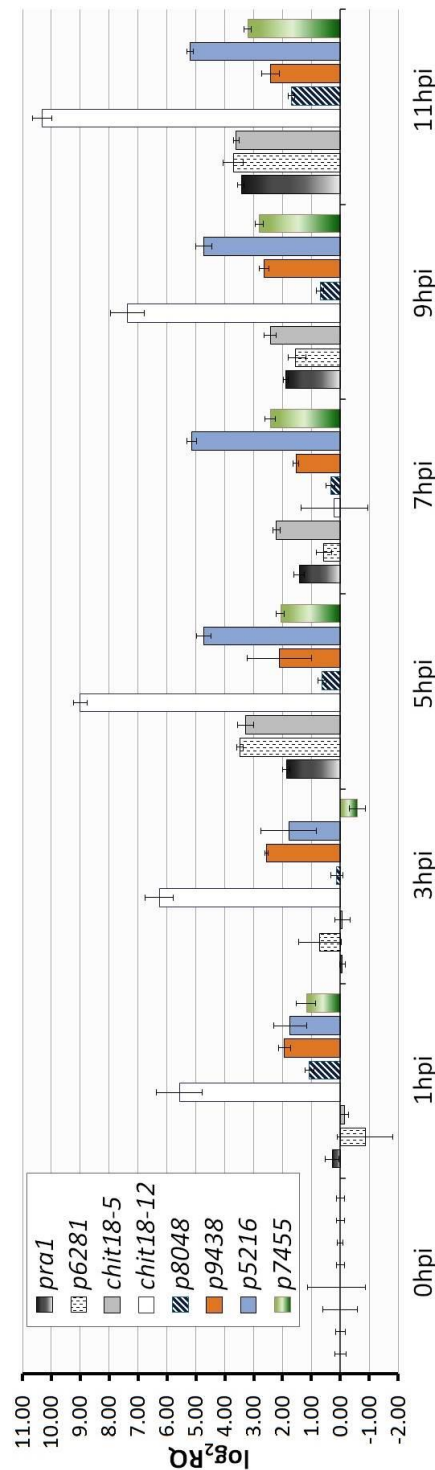
Az interakció hetedik órájában az endokitináz *chi18-12*, az aszpartil endopeptidáz *p6281*, valamint a szerin endopeptidáz *prb1* gén transzkripciója drasztikusan csökkent. Ezzel ellentétben az aminopeptidáz *p2920* és az aszpartil endopeptidáz *p7959* gének mRNS abundanciái éppen a hetedik órában voltak a legmagasabbak. A későbbi mintákban viszont a *chi18-12* és a *p6281* gének átírása ismét jelentős mértékben – egészen a kísérlet végéig – emelkedett.

Érdekes módon az aszpartil endopeptidáz *p9438* génexpressziós mintázata az interakció során minimális fluktuációval „konstitutív” módon nyilvánul meg, mely más vizsgált gén esetében nem volt jellemző.

Egymással összehasonlítva a kitino- és proteolitikus enzimek relatív génexpressziós mintázatait azok koordinált hatásmechanizmusokról árulkodnak. A magasan átíródó ($\log_2 RQ > 2$) *pra1*, *p6281*, *p7455*, *chi18-5* és a legkiemelkedőbben indukálódó ($\log_2 RQ > 5$) *p5216* és *chi18-12* gének rámutatnak, hogy ezen koexpresszálódó gének sarkalatos szerepet játszhatnak a *T. harzianum* fonálféregpete-parazitizmusában (**25. ábra**).

Jól ismert, hogy a rendszerszerűen, dinamikusan egymásra ható gének egymáshoz hasonló, vagy egymást kiegészítő mintázatú komplex génexpressziós profillal rendelkeznek. Ennek ismeretében levonható az a következtetés, miszerint a promoter régiójában CreA transzkripciókötőhellyel és hasonló génexpressziós mintázattal rendelkező endokitináz kódoló *chi18-5* és *chi18-12*, valamint a tripszinszerű savas szerin endopeptidáz *pra1*, a szerin endopeptidáz *p8048*, az aszpartil endopeptidáz *p6281* gének valószínűleg összehangolt genetikai szabályozás alá esnek (koregulálnak).

Egy-egy összetett biológiai folyamatban az alacsony ($\log_2 \text{RQ} < 2$), – statisztikailag sokszor nem szignifikáns – de koordinált expressziós változásoknak is jelentős összelettani hatása lehet (Subramanian és mtsai., 2005; Karlen és mtsai., 2007). Így annak ellenére, hogy ha nem is minden átíródó *T. harzianum* gén mutatott erőteljes aktivitást a vizsgált időpontokban (*p8048*, *p7959* és *p2920*), minden kismértékű génaktivitás növekedés jelentős lehet, hiszen önmagában néhány gén magas expressziós értéke nem mindig elegendő az adott jelenség háttérében meghúzódó biológiai jelenségek, gén vagy gének szerepeinek tisztázására.



25. ábra. A peteparazitizmus során aktiválódó kitináz és a fontosabb endopeptidáz kódoló gének relatív génextpressziós mintázatainak összefoglaló ábrája. (RQ: a 0. időponthoz viszonyított transzkriptum felhalmozódás). Az abszcissa értékei a mintavételi időpontokat órákban jelölik.

4.4. Új tudományos eredmények

1. A növénykártévő fonálférgék kártételének csökkentésére a vizsgált gombafajok és törzsek közül a *Monacrosporium cionopagum* (CBS 228.52) és minden vizsgált *Trichoderma harzianum* törzs alkalmas lehet kombinációs partnerként.
2. A *C. elegans ex utero* egyedfejlődési szakaszára alapozva olyan *in vitro* kísérleti rendszert hoztunk létre, mely alkalmas a gazda-parazita interakció *in vitro* mikrobiológiai és molekuláris biológiai hátterének vizsgálatára.
3. Szakirodalmi adatok alapján a fonálféregpete-parazitizmus a *Trichoderma* fajok fontos tulajdonsága, mely fajonként, és azon belül törzsenként is különböző hatásfokú lehet. Öt *Trichoderma* faj 18 törzsének *in vitro* összehasonlítása révén megállapítottuk, hogy a *T. harzianum* törzsek rendelkeznek a leghatékonyabb pete-parazitáló képességgel.
4. A leghatékonyabb pete-parazitáló képességgel rendelkező *T. harzianum* törzs (SZMC 1647) részletes összehasonlító génexpressziós vizsgálata során, megállapítottuk, hogy a fonálféregpete parazitizmus alatt legkevesebb két szerin endopeptidáz (*p5216*, *pra1*), két aszpartil endopeptidáz (*p6281*, *p9438*), egy metalloendopeptidáz (*p7455*), valamint két endokitináz (*chi18-12*, *chi18-5*) gén fontos szerepet játszik.
5. Vizsgálataink és azok szakirodalmi adatokkal történő összevetése alapján, bizonyos hasonlóságok mellett (pl. *p1324*) jelentős génexpressziós különbségeket (pl. *p5216*, *p7455*, *p9438*, *p5431*, *prb1*, *SS10* és *SA76*) tártunk fel a *T. harzianum* fonálféregpeteparazitizmusa és mikoparazitizmusa között.

ÖSSZEFOGLALÁS

A növények gyökerének, szárának és virágkezdeményeinek károsításával, növényi vírusok terjesztésével a szántóföldi és kertészeti kultúrákban a növénykártevő fonálférgesek komoly kockázati tényezőt jelenthetnek. Ellenük még ma is leginkább nematicideket alkalmaznak, amelyek a talajlakó élőlények nagy részére letális hatásúak, ráadásul használatukkal könnyen kiszelektálódhatnak rezisztens fonálféregtörzsek is. A természetben számos olyan gombafaj található amely, mint biokontroll ágens alkalmas lehet a vegyszeres fonálféregirtás kiváltására. Így a *Trichoderma* fajok, amelyek a növénykórokozó gombák ismert antagonistái, képesek lehetnek környezetkimélő módon visszaszorítani a növénykártevő fonálférgeseket is. A nematofág gombák szintén széleskörűen kutatott potenciális bionematicidek. A *Trichoderma* genus és a nematofág gombák csoportjába tartozó fajok egy-egy törzsét egy készítményben alkalmazva a kapott biokontroll hatás összeadódhat, illetve kiegészülhet egymással. Öt *Trichoderma* faj (*T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. rossicum*, *T. tomentosum* és *T. virens*) tizennyolc, és négy nematóda-csapdázó gombafaj (*Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys tortor*, *Monacrosporium haptotylum* és *Monacrosporium cionopagum*) hat törzsének növekedési és direkt-konfrontációs tesztje felfedte, hogy egyes *T. harzianum* törzsek *M. cionopagum*-mal *in vitro* körülmények között kombinálhatóak.

A *Trichoderma* nemzetség egyes fajainak, illetve törzseinek szintén fontos tulajdonsága, hogy képesek lehetnek a fonálférges petéjét parazitálni, tápanyagforrásként hasznosítani. Öt *Trichoderma* faj tizennyolc törzsének összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy *in vitro* körülmények között a *T. harzianum* törzsek rendelkeztek a leghatékonyabb peteparazita képességgel.

Mivel a *Caenorhabditis elegans* és a növénykártevő fonálférges petéjének felépítése hasonló, kísérleteinkhez *C. elegans* peték használatán alapuló modellrendszert használtunk. A pete-gomba interakciók mikroszkópos megfigyelései egyértelműen igazolták, hogy a *Trichoderma* fajok a *C. elegans ex utero* egyedfejlődési ideje alatt (11 óra) képesek voltak a peték parazitálására. Az interakciók során a gombák hifái a petékre rátekeredtek, appressórium szerű képletekkel a behatoltak, lehetővé téve a peték kolonizációját.

Amíg különböző biokontroll folyamatokban a *Trichoderma* fajok számos kitináz és peptidáz kódoló génjét jellemezték már, addig e gének fonálféregpete-parazitizmusban betöltött szerepéről keveset tudunk. Valószínűsíthető, hogy a fonálféregpete-parazitizmus képessége többféle enzimmódoló gén koordinált együttműködésének köszönhető. Kísérleteinkben három kitináz- és tizenhárom peptidáz-kódoló *T. harzianum* gén expresszióját jellemeztük, mely alapján kijelenthető, hogy a magasan átíródó endokitináz *chi18-5* (\log_2 RQ: 3,60) és *chi18-12* (\log_2 RQ: 10,32); a savas szerin peptidáz *pra1* (\log_2 RQ: 3,44); az aszpartil peptidáz *p6281* (\log_2 RQ: 3,70) és aorzin szerin peptidáz *p5216* (\log_2 RQ: 5,20) gének koexpresszáltak, és így feltehetően együttesen alakítják ki a

T. harzianum fonálféregpete-parazitizmusának folyamatát. Az említett géneknél ugyan alacsonyabb expressziós értéket mutatott az aszpartil peptidáz kódoló *p9438* (\log_2 RQ: 2,62) és a metalloendopeptidáz *p7455* (\log_2 RQ: 3,21) gén, azonban szerepük nem elhanyagolható. Érdekes módon a bázikus szerin peptidáz *prb1* – melynek hatása bizonyított *Meloidogyne javanica* ellen – az esetek nagy részében nem mutatott szignifikáns változást a kísérletsorozat kezdő (0h) időpontjához képest.

Vizsgálataink eredményeinek szakirodalmi adatokkal történő összevetése alapján, bizonyos hasonlóságok mellett jelentős génexpressziós különbségeket tártunk fel a *T. harzianum* fonálféregpeteparazitizmus és egyéb, előzőleg vizsgált biokontroll jellegű folyamatai között. Így az aszpartil peptidáz-kódoló *p1324* gén sem pete jelenlétében, sem más biokontroll jellegű folyamatban nem mutatott génexpresszió változást. Szintén nem tapasztaltunk fonálféregpete indukált génexpresszió változást sem a szubtilizin-szerű szerin endopeptidázt kódoló *SS10*, sem az aszpartil peptidázt kódoló *SA76* gének esetében, bár korábban mindkét gén transzkripciójának szignifikáns növekedését mutatták ki különböző gombasejtfal és kitin szubsztrátok jelenlétében. A szerin peptidázt kódoló *p5431*, mely előzőleg minden vizsgált biokontroll folyamatban konstitutív módon történő génexpresszió növekedéssel válaszolt, meglepő módon pete jelenlétére minden vizsgált időpontban szignifikáns génexpresszió csökkenéssel reagált. Az aszpartil peptidázt kódoló *p9438*, mely kitin tartalmú táptalaj kivételével minden biokontroll folyamatban igen későn válaszolt, a peteparazita interakció során, érdekes módon, a kísérletsorozat kezdő (0h) időpontjához képest, minden időpontban mérsékelt emelkedést mutatott. A metalloendopeptidáz *p7455*, amely csupán kolloid kitin tartalmú táptalaj alkalmazása esetén mutatott génexpresszió változást, de nem reagált gombasejtfal és glükóz jelenlétére, illetve szén- és nitrogén forrás hiányára, fonálféregpete jelenlétében transzkripciójának karakterisztikus és egyenletes ütemben növekvő változásával reagált. Az aorzin szerin endopeptidázt kódoló *p5216* egyetlen megelőző biokontroll jellegű tesztben sem mutatott válaszreakciót, mégis *C. elegans* pete jelenlétében az összes tesztelt peptidáz kódoló gén közül a legmagasabb és időben is a legkiegyenlítettebb génexpresszió növekedéssel volt jellemezhető.

A *T. harzianum* proteolitikus és kitinolitikus enzimrendszereit kódoló gének szimultán génexpressziós analízise rávilágított arra, hogy a fonálféregpete-parazitizmus során aktiválódó gének funkcionális és regulációs tekintetben komplex mintázatot és eltérést mutatnak a már korábban megismert biokontroll folyamatokhoz képest. A bemutatott kísérleti eredmények hozzájárulhatnak, olyan törzsek kiválasztásához és nemesítéséhez, amelyek hatékonyan és környezet kímélő módon szolgálják a növénykártevő fonálféreg visszاسzorítását.

6. SUMMARY

Plant-parasitic nematodes have a substantial impact on human welfare and economy either by attacking root systems, stems, buds or by acting as vectors of plant viruses. Despite the propensity of nematicides to be lethal to a broad range of soil organisms, and to induce the development of resistant strains among nematodes, they are still widely used to control plant-parasitic nematodes.

However there are certain fungi that possess features that make them potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes. *Trichoderma* species are able to antagonize plant pathogens and they have also potential to control plant-parasitic nematodes without negative impact on the environment. Nematophagous fungi have been also widely investigated potential bionematicides. In theory, their biocontrol activities can be synergistic in combined preparation. Ninety combinations of eighteen strains of five *Trichoderma* species (*T. atroviridae*, *T. harzianum*, *T. rossicum*, *T. tomentosum*, *T. virens*) and six strains of four nematode-trapping fungi (*Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys tortor*, *Monacrosporium haptotylum* and *Monacrosporium cionopagum*) revealed that certain strains of *T. harzianum* can be combined with *M. cionopagum* under *in vitro* conditions.

Nematode egg-parasitism can be also an important attribute of *Trichoderma* which may vary among species and strains. *In vitro* comparison of eighteen strains of five *Trichoderma* species revealed that *T. harzianum* strains possess the strongest egg-parasitic ability. For the experiments, *Caenorhabditis elegans* was used as a model system since plant-parasitic nematodes and *C. elegans* eggs share many essential features. The microscopic observation of egg-fungus interactions revealed clear evidence that all characteristic events of egg-parasitism *ie.* coiling hyphae around eggs, formation of appressorium-like structures, trophic hyphae growing inside the eggs occur in a time period of the *ex utero* development of *C. elegans* (11 hours).

While several chitinase and peptidase-encoding genes of *Trichoderma* spp. have been characterized under different biocontrol conditions, their functional role in the nematode egg-infection process has been poorly understood to date. However it seems that the ability of the egg-parasitism of nematodes by *T. harzianum* may involve the production and co-ordinated secretion of various eggshell-degrading enzymes. In this study, parallel expressional characterization of three chitinase and thirteen peptidase-encoding genes clearly suggests that the highly transcribed genes encoding chitinase *chi18-5* (\log_2 fold change: 3.60) and *chi18-12* (\log_2 fold change: 10.32); acidic serine peptidase *pra1* (\log_2 fold change: 3.44); aspartic peptidase *p6281* (\log_2 fold change: 3.70) and the most prominently induced sedolisin serine peptidase *p5216* (\log_2 fold change: 5.20) were co-expressed and they may play pivotal roles in the egg-parasitic process. Upregulation of aspartic peptidase *p9438* (\log_2 fold change: 2.62) and metalloendopeptidase *p7455* (\log_2 fold change: 3.21) genes were also characteristic; however the overall fold changes were lower than other proteases.

Interestingly, the alkaline serine peptidase *prb1* which has proven biocontrol activity against *Meloidogyne javanica* was mostly downregulated or has shown minimal or no significant variation in its corresponding messenger RNA levels relative to the zero time point during *C. elegans* egg-parasitism.

Gene expression profiles also indicated similarities as well as characteristic differences between egg-parasitism and other biocontrol-related processes of *T. harzianum*. In a good agreement with earlier findings where aspartic protease-encoding gene *p1324* was not regulated by any of the tested culture conditions remained also unaffected in the present study. Nematode eggs were also not able to trigger significant up-regulation of the subtilisin-like serine endopeptidase-encoding gene *SS10* and the aspartic protease-encoding genes *SA76*, although they had been earlier successfully induced by different fungal cell walls and chitin. The serine peptidase encoded by *p5431*, which was previously constitutively transcribed in every biocontrol-related condition, was significantly downregulated relative to the reference sample at each time point during nematode egg-parasitism. Among all biocontrol-related conditions, the putative aspartic peptidase encoding *p9438* was late-responding except when cultured in the presence of colloid chitin. Interestingly, during nematode-egg parasitism, *p9438* showed up-regulation at a moderately high level relative to the reference sample at each time point. Similarly neither the presence of fungal cell walls nor the absence of carbon/nitrogen sources nor addition of glucose was able to induce the expression of metalloendopeptidase encoding *p7455*. It has shown a slight up-regulation only on chitin. However, during nematode egg-parasitism, *p7455* was characteristically transcribed showing a unique time-course pattern among all examined peptidases. Transcripts of the aorsin serine peptidase-encoding gene *p5216* were found not to respond to any of the previously tested biocontrol related conditions; however *p5216* revealed the highest transcript abundance among all studied peptidase-encoding genes in the presence of *C. elegans* eggs.

These new insights into the host-pathogen interaction of nematode eggs and *T. harzianum* reveal and underline the diversity and the functional specialization of fungal chitinase and protease genes. Our results contribute to a better understanding of the complex host-pathogen interactions and provide a foundation for further analyses.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahrén D., Tholander M., Fekete C., Rajashekar B., Friman E., Johansson T., Tunlid A.** (2005): Comparison of gene expression in trap cells and vegetative hyphae of the nematophagous fungus *Monacrosporium haptotylum*. *Microbiology*, 151: 789–803.
- Akhtara M., Malikb A.** (2000): Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant–parasitic nematodes. A review. *Bioresource Technology*, 74: 35–47.
- Altomare C., Norvell W.A., Björkman T. and Harman G.E.** (1999): Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant–growth–promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295–22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2926–2933.
- Andrássy I. és Farkas K.** (1988): Kertészeti növények fonálféreg kártevői, Agronematológiai kézikönyv, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Bacíková D., Betina V., Nemeč P.** (1965): Antihelminthic activity of antibiotics. *Nature*, 206: 1371–1372.
- Bae Y.S., Knudsen G.R.** (2005): Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Biological Control*, 32: 236–242.
- Baek J.M., Howell C.R., Kenerley C.M.** (1999): The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29–8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 35: 41–50.
- Baker R.** (1990): An overview of current and future strategies and models for biological control, in: Hornby, D. (Ed.), *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 375–388.
- Barrett A.J. and McDonald J.K.** (1985): Nomenclature: a possible solution to the 'peptidase anomaly' *Biochemical Journal*, 231: 807
- Barrett A.J. and McDonald, J.K.** (1986): Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal*, 237: 935.
- Barron G.L.** (1992): Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. In: Carroll G.C. and Wicklow D.T. (eds) *The Fungal Community, Its Organization and Role in the Ecosystems*, Marcel Dekker, New York, pp. 311–326.
- Benedek P.** (2006): Mezőgazdasági állattan, Biológiai és Környezettudományi Intézet, Mosonmagyaróvár
- Benhamou N. and Chet I.** (1997): Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2095–2099.
- Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codon A.C.** (2004): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249–260.

- Bird A.F. and McClure M.A.** (1976): The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. *Parasitology*, 72: 19–28.
- Bíró T. és Tóth F.** (2009): A Trifender (*Trichoderma asperellum*) hatása a szabadföldi gyökérgubacsfonálféreg (*Meloidogyne hapla* Chitwood) paprikában okozott kártételének mértékére. *Növényvédelem*, 45: 535–541.
- Blaxter M.L. and Robertson W.M.** (1998): The Cuticle. In *The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes*, (ed. R.N. Perry and D.J. Wright) pp. 25–48. CAB International, New York.
- Bordallo J.J., Lopez-Llorca L.V., Jansson H-B., Salinas J., Persmark L., Asensio L.** (2002): Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist*, 154: 491–499.
- Brenner S.** (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77: 71–94.
- Brunner K., Peterbauer C.K., Mach R.L., Lorito M., Zeilinger S., Kubicek C.P.** (2003): The *nagl* N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current Genetics*, 43: 289–295.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T.** (2009): The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611–622.
- Calistru C., McLean M., Berjak P.** (1997): In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species 1. Macroscopical and microscopical observations of fungal interactions, *Mycopathologia*, 139: 115–121.
- Carsolio C., Gutierrez A., Jimenez B., van Montagu M., and Herrera-Estrella A.** (1994): Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 10903–10907.
- Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortes C., Gutierrez A., Chet I., Herrera-Estrella A.** (1999): Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 929–935.
- Cavalier-Smith T.** (1998): A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73: 203–266.
- Certified Organic Production Survey** (2012): National Agricultural Statistics Service 2011, USDA
- Chandler D., Bailey A.S., Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J. and Grant W.P.** (2011): The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 366: 1987–1998.

- Chaverri P. and Samuels G.J.** (2003): *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS): Utrecht, pp. 116.
- Chen S. and Dickson D.W.** (2004): Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: Chen Z.X., Chen S.Y., Dickson D.W.: *Nematology: Advances and Perspectives, Volume 2*. CABI
- Chet I.** (1987): *Trichoderma*—Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. in: *Innovative Approaches to Plant Disease Control. I*. Chet, ed. John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 137–160.
- Chet I., Inbar J., Hadar Y.** (1997): Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, D.T., Söderström, B. (Eds.), *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 165-184.
- Chet I., Benhamou N. and Haran S.** (1998): Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Harman, G.E. and Kubicek, C.P. (eds), *Trichoderma and Gliocladium, Vol 2.*, Taylor and Francis Ltd., London, UK, pp. 153–172.
- Cortes C., Gutierrez A., Olmedo V., Inbar J., Chet I., Herrera-Estrella A.** (1998): The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Molecular and General Genetics*, 260: 218–225.
- Dana M.D.L.M., Limon M.C., Mejias R., Mach R.L., Benitez T., Pintor-Toro J.A., Kubicek C.P.** (2001): Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, 38: 335–342.
- Datnoff L.E., Nemeč S. and Pernezny K.** (1995): Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control*, 5: 427–431.
- de Boer W., Verheggen P., Klein Gunnewiek P.J., Kowalchuk G.A., van Veen J.A.** (2003): Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 835–844.
- De La Cruz J., Rey M., Lora J.M., Hidalgo-Gallego A., Dominguez F., Pintor-Toro J.A., Llobell A., Benitez T.** (1992): Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*, 206: 859–867.
- De Marco J.L., Felix C.R.** (2002): Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochemistry* 3, 3.
- De Meyer G., Bigirimana J., Elad Y. and Höfte M.** (1998): Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 279–286.

- Di Pietro A., Lorito M., Hayes C.K., Broadway R.M., and Harman G.E.** (1993): Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology*, 83: 308–313.
- Djian C., Pijarouovski L., Ponchet M., Arpin N.** (1991): Acetic acid, a selective nematicidal metabolite from culture filtrate of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samsan and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. *Nematologica*, 37: 101–102.
- Dodd S.L., Lieckfeldt E., Samuels G.J.** (2003): *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, 95: 27–40.
- Donald D.L.** (1997): *C. elegans* II., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Dong L.Q., Zhang K.Q.** (2006): Microbial control of plant–parasitic nematodes: a five–party interaction. *Plant and Soil*, 288: 31–45.
- Duffy B.K., Simon A. and Weller D.M.** (1996): Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent Pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, 86: 188–94.
- Duo–Chuan L.** (2006): Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161: 345–360.
- Eisenmann D.M.** (2005): Wnt signaling. *WormBook*, (Ed.), The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, 7–8.
- Elad Y., Chet I., Henis Y.** (1982): Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28: 719–25.
- Elad Y., Chet I., Boyle P., Henis Y.** (1983): Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfii* – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73: 85–88.
- Elad Y., David D.R., Levi T., Kapat A., Kirshner B., Guvrin E. and Levine A.** (1999): *Trichoderma harzianum* T39–mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. pp. 459–467 in: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II*. H. Lyr, ed. Intercept Ltd., Andover, Hampshire, UK.
- Elad Y. and Kapat A.** (1999): The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177–189.
- Ezzi M.I. and Lynch J.M.** (2002): Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 1042–1047.
- Fleige S., Pfaffl M.W.** (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Review. Molecular Aspects of Medicine*, 27: 126–139.
- Flores A., Chet I. and Herrera–Estrella A.** (1997): Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over–expression of the proteinase–encoding gene *prb1*. *Current Genetics*, 31: 30–37.
- Freeman S., Minz D., Kolesnik I., Barbul O., Zveibil A., Maymon M., Nitzani Y, Kirschner, B., Rav-David D., Bilu A., Dag A., Shafir S. and Elad Y.** (2004): *Trichoderma* biocontrol of

Colletotrichum acutatum and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 361–370.

Geremia R., Goldman G.H., Jacobs D., Ardiles W., Vila S.B., Van-Montagu M., Herrera-Estrella A. (1993): Molecular characterization of the proteinase-encoding gene *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular Microbiology*, 8: 603–613.

Ghisalberti E.L., Narbey M.J., Dewan M.M., Sivasithamparam K. (1990): Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant and Soil*, 121: 287–291.

Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K. (1991): Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 23: 1011–1020.

Goldman G., Hayes C. and Harman G.E. (1994): Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnology*, 12: 478–482.

Gortari M.C., Hours R.A. (2008): Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress*, 7: 221–238.

Grinyer J., Hunt S., McKay M., Herbert B.R. and Nevalainen H. (2005): Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 47: 381–388.

Guetsky R., Shtienberg D., Elad Y. and Dinoor A. (2001): Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 91: 621–627.

Gullino M.L. (1992): Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. In: Tjamos, E.C., Papavizas, G.C., Cook, R.J. (eds), *Biological Control of Plant Diseases, Progress and Challenges for the Future*. Plenum Press, New York, pp. 125–132.

Haab D., Hagspiel K., Szakmary K., Kubicek C.P. (1990): Formation of the extracellular protease from *Trichoderma reesei* QM9414 involved in cellulose degradation. *Journal of Biotechnology*, 16: 187–198.

Hafeez U.K., Riaz A., Waqar A., Khan S.M., Khan M.A. (2001): Evaluation of the combined effects of *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against root-knot disease of tomato. *On Line Journal of Biological Sciences*, 1: 139–142.

Hanson L.E., Howell C.R. (2004): Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 94: 171–176.

Haran S., Schickler H., Oppenheim A., Chet I. (1995): New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*, 99: 441–446.

Haran S., Schickler H., Chet I. (1996): Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2321–2331.

- Harman G.E., Hayes C.K., Lorito M., Broadway R.M., Di Pietr, A., Peterbauer C. and Tronsmo A.** (1993): Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*, 83: 313–318.
- Harman G.E. and Björkman T.** (1998): Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2., Taylor and Francis Ltd., London, UK, pp. 229–266.
- Harman G.E. Hayes C.K., Ondik K.L.** (1998): *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 1. (eds) Kubicek, C. P. and Harman, G. E. pp. 243–270 Taylor and Francis, London
- Harman G.E.** (2000): Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377–393.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M.** (2004): *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43–56.
- Harman G.E.** (2006): Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190–194.
- Henrissat B.** (1999): Classification of chitinases modules. *Experientia Supplementum*, 87:137–156.
- Herrera–Estrella A., Chet I.** (2004): The biological control agent *Trichoderma*—from fundamentals to applications. In: Arora DK (ed) *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 147–156.
- Highley T. L.** (1997): Control of wood decay by *Trichoderma (Gliocladium) virens* I. Antagonistic properties. *Material und Organismen*, 31: 79–90.
- Hjeljord L.G., Stensvand A., Tronsmo A.** (2001): Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum (atroviride)* P1 against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 91: 1172–1180
- Howell C.R. and Stipanovic R.D.** (1995): Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology*, 85: 469–472.
- Howell C.R.** (1998): The role of antibiosis in biocontrol. pp. 173–184 in: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. G. E. Harman and C. P. Kubicek, eds. Taylor and Francis, London.
- Howell C.R.** (2003): Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4–10.
- Howell C.R.** (2006): Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, 96: 178–180.
- Hugot J–P., Baujard P., Morand S.** (2001): Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3: 199–208.
- Inbar J. and Chet I.** (1995): The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 141: 2823–2829.

- Inbar J., Menendez A. and Chet I.** (1996): Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 757–763.
- Jakucs E., Vajna L.** (2003): Mikológia, 4. fejezet 139–192., Agroinform Kiadó, Budapest
- Janisiewicz W. and Bors B.** (1995): Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3261–3267.
- Jeger M.J., Jeffries P., Elad Y. and Xu X.M.** (2009): A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. *Journal of Theoretical Biology*, 256: 201–214.
- Jermy T. és Balázs K.** (1990): A növényvédelmi állattan kézikönyve. Akadémiai Kiadó, Budapest
- Karlen Y., McNair A., Perseguers S., Mazza C. and Mermod N.** (2007): Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8: 131.
- Kenyon C.** (1988): The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 240: 1448–1452.
- Kim D.G., Riggs R.D., Kim K.S.** (1992): Ultrastructure of *Heterodera glycines* parasitised by Arkansas Fungus 18. *Phytopathology*, 82: 429–433.
- Kraft J.M. and G.C. Papavizas** (1983): "Use of host resistance, *Trichoderma*, and fungicides to control soilborne diseases and increase seed yields of peas." *Plant Disease*, 67: 1234–1237.
- Kredics L., Ládai M., Körmöczi P., Manczinger L., Rákhely G., Vágvölgyi C., Szekeres A.** (2011): Genetic and biochemical diversity among *Trichoderma* isolates in soil samples from winter wheat fields of the Pannonian Plain. *Acta Biologica Szegediensis* in press.
- Kulling C.M., Mach R.L., Lorito M., Kubicek C.P.** (2000a): Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2232–2234.
- Kulling C.M., Szakacs G., Kubicek C.P.** (2000b): Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*, 104: 1117–1125.
- Kulling C.M., Krupica T., Woo S.L., Mach R.L., Rey M., Benítez T., Lorito M., Kubicek C.P.** (2001): Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, 105: 770–772.
- Lamshead P.J.D.** (1993): Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis*, 19: 5–24.
- Larkin R.P., Roberts D.P., Gracia-Graza J.A.** (1998): Biological control of fungal diseases, in Hutson, D. and Miyamoyo, J. (Eds.), *Fungicidal Activity: Chemical and Biological Approaches to Plant Protection*. John Wiley and Sons, New York, NY, U.S.A., pp. 149–191.

- St. Leger R.J., Joshi L., Roberts D.W.** (1997): Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* 143: 1983–1992.
- Li G.H., Zhang K.Q., Xu J.P., Dong J.Y., Liu Y.J.** (2007): Nematicidal substances from fungi. *Recent Patents on Biotechnology*, 1: 212–233.
- Lifshitz R., Windham M.T., Baker R.** (1986): Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 720–725.
- Lindsey D.L., Baker R.** (1967): Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions, *Phytopathology*, 57: 1262–1263.
- Linford M.B., Yap F., Oliveiraj M.** (1938): Reduction of soil populations of the root-knot nematode during decomposition of organic matter. *Soil Science*, 45: 127–141.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D.** (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, 4: 402–408.
- Lorito M., Harman G.E., Hayes C.K., Broadwa, R.M., Tronsmo A., Woo S.L. and Di Pietro A.** (1993): Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 302–307.
- Lorito M., Hayes C.K., Zoina A., Scala F., Del Sorbo G., Woo S.L. and Harman G.E.** (1994a): Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides. *Molecular Biotechnology*, 2: 209–217.
- Lorito M., Peterbauer C., Hayes C.K., Harman G.E.** (1994b): Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140: 623–629.
- Lorito M., Woo S.L., D'Ambrosio M., Harman G.E., Hayes C.K., Kubicek C.P. and Scala F.** (1996a): Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 9: 206–213.
- Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B., Kubicek C.P.** (1996b): Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178: 6382–6385.
- Lorito M.** (1998): Chitinolytic enzymes and their genes. pp. 73–99 in: *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. G.E. Harman, and C.P. Kubicek, eds. Taylor and Francis, London.
- Lorito M., Scala F.** (1999): Microbial genes expressed in transgenic plants to improve disease resistance. *Journal of Plant Pathology*, 81: 73–88.
- Mach R.L., Peterbauer C.K., Payer K., Jaksits S., Woo S.L., Zeilinger S., Kullnig C.M., Lorito M., Kubicek C.P.** (1999): Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma*

- atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 1858–1863.
- Magasanik B.** (1992): Regulation of nitrogen utilization. In: Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R. (Eds.), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 283–317.
- Marzluf G.A.** (1997): Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 17–32.
- Meyer S.L.F. and Wergin W.P.** (1998): Colonisation of soybean cyst nematode females, cysts and gelatinous matrices by the fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Nematology*, 30: 436–450.
- Meyer, S.L.F., Roberts, D.P., Chitwood, D.J., Carta, L.K., Lumsden, R.D., Mao, W.** (2001): Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica*, 31: 75–86.
- Meyer S.L.F. and Roberts D.P.** (2002): Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of Nematology*, 34: 1–8.
- Monfort E., Lopez-Llorca L.V., Jansson H-B., Salinas J., Park J.O., Sivasithamparam K.** (2005): Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis var. tritici* and development of root-rot. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1229–1235.
- Mustafa, A., Aslam Khan, M., Inam-ul-Haq, M., Aslam Pervez, M. and Ummad-ud-Din, U.** (2009): Usefulness of different culture media for *in-vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against seed-borne fungi of economic importance. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 21: 83–88.
- Nordbring-Hertz B., Jansson H.B., Tunlid A.** (2006): Nematophagous Fungi. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, doi:10.1038/npg.els.0004293
- Olmedo-Monfil V., Mendoza-Mendoza A., Gómez I., Cortés C., Herrera-Estrella A.** (2002): Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*. *Molecular Genetics and Genomics*, 267: 703–712.
- Omero C., Inbar J., Rocha-Ramirez V., Herrera-Estrella A., Chet I. and Horwitz B.A.** (1999): G protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*, 103: 1637–1642.
- Papavizas G.C.** (1985): *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and the potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 23–54.
- Parvatha R.P., Rao M.S., Nagesh M.** (1996): Management of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by integration of *Trichoderma harzianum* with oil cakes. *Nematologia Mediterranea*, 24: 265–267.

- Paulitz T.C. and Bélanger R.R.** (2001): Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 103–133.
- Persoon C.H.** (1794): *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues Mag Bot, 1: 81–128
- Poornima S. and Pandey R.** (2009): Biological control of root–knot nematode; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; *Withania somnifera* and the effect of biocontrol agents on plant growth. *African Journal of Agricultural Research*, 4: 564–567.
- Pozo M.J., Baek J.-M., García J.M., Kenerley C.M.** (2004): Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. *Fungal Genetics and Biology* 41: 336–348.
- Rao M.S., Reddy P.P., Nagesh M.** (1998): Evaluation of plant based formulations of *Trichoderma harzianum* for management of *Meloidogyne incognita* on egg plant. *Nematologia Mediterranea*, 26: 59–62.
- Raupach G.S. and Kloepper J.W.** (1998): Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88: 1158–1164.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett** (1993). "Evolutionary families of peptidases." *Biochemical Journal*, 290: 205–18.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett** (1994). "Families of serine peptidases." *Methods in Enzymology*, 244: 19–61.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. and Bateman A.** (2012): MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 40: D343–D350.
- Reaves J.L. and Crawford R.H.** (1994): *In vitro* colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. Res. Pap. PNW-RP-474. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.
- Reino J.L., Guerrero R.F., Hernández–Galán R. and Collado I. G.** (2008): Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7: 89–123.
- Roberts D.P., Lohrke S.M., Meyer S.L.F., Buyer J.S., Bowers J.H., Baker C.J., Li W., Souza J.T., Lewis J.A., Chung S.** (2005): Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection*, 24: 141–155.
- Rozen S. and Skaletsky H.J.** (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365–386.
- Sahebani N., Hadavi N.** (2008): Biological control of the root–knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2016–2020.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA Flors.

- Schirmböck M., Lorito M., Wang Y.L., Hayes C.K., Arisan–Atac I., Scala F., Harman G.E., Kubicek C.P.** (1994): Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4364–4370.
- Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M. and Ragg T.** (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7: 3.
- Schuster A. and Schmoll M.** (2010): Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 787–799.
- Scott J.H., Schekman R.** (1980): Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *Journal of Bacteriology*, 142: 414–423.
- Scow K., Somasco O., Gunapala N., Lau S., Venette R., Ferris H., Miller R., Shennan C.** (1994): Transition from conventional to low–input agriculture changes soil fertility and biology. *California Agriculture*, 48: 20–26.
- Seidl V., Huemer B., Seiboth B., Kubicek C.P.** (2005): A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *The FEBS Journal*, 272: 5923–5939.
- Sharon E., Bar–Eyal M., Chet I., Herrera–Estrella A., Kleifeld O., Spiegel Y.** (2001): Biological control of the root–knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 91: 687–693.
- Singh R.K., Trivedi D.K., Srivastava A.** (2013): Role of Nematode–Trapping Fungi for Crop Improvement under Adverse Conditions. In *Crop Improvement Under Adverse Conditions* pp. 271–283. Springer, New York.
- Sivan A., Chet I.** (1989): The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 79: 198–203.
- Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L.** (1998): Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London, pp. 139–192
- Solti G.** (2012): Az ökológiai gazdálkodás helyzete Magyarországon – X. Sárközy Péter Tudományos Emlékülés
- Spiegel Y., Chet I.** (1998): Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant–parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews*, 3: 169–175.
- Statisztikai Jelentések**, Növényvédő szerek értékesítése, XII. évfolyam, 1. szám, 2012, Agrárgazdasági Kutató Intézet

- Steyaert J.M., Stewart A., Jaspers M.V., Carpenter M., Ridgway H.J.** (2004): Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. *Mycologia*, 96: 1245–1252.
- Stiekema W.J., Heidekamp F., Dirkse W.G., van Beckum J., de Haan P., ten Bosch C., and Louwerse J. D.** (1988): Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 11: 255–269.
- Suárez B., Rey M., Castillo P., Monte E., Llobell A.** (2004): Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 46–55.
- Suárez M.B., Sanz L., Chamorro M.I., Rey M., González F.J., Llobell A., Monte E.** (2005): Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 924–934.
- Suárez M.B., Vizcaíno J.A., Llobell A., Monte E.** (2007): Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Current Genetics*, 51: 331–342.
- Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P.** (2005): Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102: 15545–15550.
- Szabó I.M.** (1988): A bioszféra mikrobiológiája I–III. Akadémiai Kiadó, Budapest
- ter Schure E.G., van Riel N.A. and Verrips C.T.** (2000): The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 67–83.
- Timm M.** (1987): 'Biocon' controls nematodes biologically. *Bio-Technology*, 5: 772–774.
- Tulasne L.R., Tulasne C.** (1865): *Selecta fungorum carpologia*. Jussu, Paris
- Vajna L.** (1987): A biológiai védekezés. In: *Növénypatogén gombák*. Szerk.: Vajna L. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, p.180–291.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Valéro, J.R.** (2007): Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37: 1–20.
- Vilo J. and Kivinen K.** (2001): Regulatory sequence analysis: application to the interpretation of gene expression. *European Neuropsychopharmacology*, 11: 399–411.
- Vinale F., Marra R., Scala F., Ghisalberti E.L., Lorito M., Sivasithamparam K.** (2006): Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 143–148.

- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M.** (2008): Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1–10.
- Viterbo A., Haran S., Friesem D., Ramot O., Chet I.** (2001): Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiology Letters*, 200: 169–174.
- Weindling R.** (1932): *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22: 837–845.
- Weindling R.** (1934): Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, 24: 1153–1179.
- Wells H.D., Bell D.K., Jaworski C.A.** (1972): Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62: 442–447.
- Wessels J.G.H.** (1986): Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *Int Rev Cytol* 104: 37–79
- Wharton D.** (1980): Nematode egg–shells. *Parasitology*, 81: 447–463.
- Wiame J.M., Grenson M. and Arst Jr. H.N.** (1985): Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 26: 1–88.
- Wilhite S.E., Lumsden R.D. and Straney D.C.** (1994): Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium* damping off. *Phytopathology*, 84: 816–821.
- Willer H., Youssefi–Menzler M. and Sorensen N.** (eds.) (2008): The world of organic agriculture - statistics and emerging trends. The Research Institute of Organic Agriculture FiBL, pp. 160–163.
- Windham G.L., Windham M.T., Williams W.P.** (1986): Effect of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. *Plant Disease Reporter*, 73: 493–494.
- Woo S., Fogliano V., Scala F. and Lorito M.** (2002): Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 353–356.
- Woo S.L., Lorito M.** (2007): Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, pp. 107–130.
- Wood W.B.** (Ed.). (1988): The nematode *Caenorhabditis elegans*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Wuczkowski M., Druzhinina I., Gherbawy Y., Klug B., Prillinger H., Kubicek C.P.** (2003): Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid–European, primeval floodplain–forest. *Microbiological Research*, 158: 125–133.
- Xu X.M., Salama N., Jeffries P. and Jeger M.J.** (2010): Numerical studies of biocontrol efficacies of foliar plant pathogens in relation to the characteristics of a biocontrol agent. *Phytopathology*, 100: 814–821.

- Xu X.M., Jeffries P., Pautasso M. and Jeger M.J.** (2011): Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101: 1024–1031.
- Yan L., and Qian Y.** (2007): Cloning and heterologous expression of aspartic protease SA76 related to biocontrol in *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 277: 173–181.
- Yan L., and Qian Y.** (2009): Cloning and heterologous expression of SS10, a subtilisin-like protease displaying antifungal activity from *Trichoderma harzianum* *FEMS Microbiology Letters*, 290: 54–61.
- Yang Z.S., Li G.H., Zhao P.J., Zheng X., Luo S.L., Li L., Niu X.M., Zhang K.Q.** (2010): Nematicidal activity of *Trichoderma* spp. and isolation of an active compound. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26: 2297–2302.
- Yedidia I., Benhamou N., Chet I.** (1999): Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1061–1070.
- Yedidia I., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I.** (2000): Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203, *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 863–873.
- Yildiz S., Hando, Z.A., Carta L.K., Skantar A.M., Chitwood D.J.** (2012): A survey of plant-parasitic nematodes associated with forage crops in Bingol, Turkey. *Nematologia Mediterranea*, 40: 73–77.
- Zeilinger S., Galhaup C., Payer K., Woo S.L., Mach R.L., Fekete C., Lorito M., Kubicek C.P.** (1999): Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology*, 26: 131–140.
- Zhang M.Q.** (1999): Promoter analysis of co-regulated genes in the yeast genome. *Computers and Chemistry*, 23: 233–250.

INTERNETES FORRÁSOK

http1: Introduction to the Nematoda

<http://www.ucmp.berkeley.edu/phyla/ecdysozoa/nematoda.html>

http2: Said-Agri: Les Nématodes

<http://www.said-agri.net/les-cours/les-nematodes/>

http3: FAO Statistical Yearbook 2012

<http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/yearbook2012/en/>

http4: A Nemzeti Agrárgazdasági Kamara hírei: „Egyre terjed a hamisított növényvédő szer! - figyelmeztet a Magyar Agrárkamara”, 2011.04.18

http://www.agrarkamara.hu/AMagyarAgr%C3%A1rkamarah%C3%ADrei/tabid/118/Default.aspx?udt_495_param_detail=12656

http5: PAN Pesticide Database

<http://www.pesticideinfo.org/>

http6: Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries, Revised October 2007

<http://publications.gc.ca/site/eng/359060/publication.html>

http7: Bevezetés a prokarióták világába - ELTE TTK online: 7.2.1.1.3. Kitin bontás

<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/prokariotak/ch07s02.html>

http8: Wikipedia: Protease

<http://en.wikipedia.org/wiki/Protease>

http9: Biophoto Associates/Science Photo Library

<http://www.sciencephoto.com/media/156725/view>

http10: Agilent Technologies: RNA Integrity Number (RIN)

<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/qpcr2004/pub/Mueller.pdf>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Fekete Csaba egyetemi docensnek a Pécsi Tudományegyetem Általános és Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy megteremtette a vizsgálataimhoz és tanulmányaimhoz szükséges feltételeket, és dr. Virányi Ferencnek, a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének emeritus professzorának, hogy szakmai tanácsokkal segített munkám során.

Hálás köszönet dr. Kredics László egyetemi docensnek, a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszék munkatársának, hogy a kutatásaim alapjául szolgáló *Trichoderma* törzsgyűjteményt a rendelkezésünkre bocsátotta.

Köszönet illeti Csepregi Kittit, Tóth Zsuzsannát, Valasek Andreát, dr. Gazdag Zoltánt és dr. Papp Gábort a Pécsi Tudományegyetem Általános és Mikrobiológiai Tanszék munkatársait, hogy segítették és túrték a laboratóriumi ténykedéseimet.

Köszönöm dr. Nagy Péter Istvánnak a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszék vezetőjének a gondolatébresztő beszélgetéseket, és a közös publikációhoz nyújtott segítségét.

Köszönet Daragó Ágnesnek a hosszadalmas fonálféregfuttatásokért, és Hrács Krisztinának a statisztikai értékeléshez nyújtott kiváló segítségéért.

Köszönöm dr. Sánta Imrének és dr. Német Bélának a Környezetfizika és Lézerspektroszkópia Tanszék egyetemi docenseinek, hogy elindítottak a PhD fokozat megszerzésének hegyekkel és völgyekkel szabdalt útjain.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom szüleimnek, akik a tudomány rögös ösvényein mindvégig támogattak és kitartásra ösztönöztek.