



Szent István Egyetem

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

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

## 1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLJAI

A gazdasági növények károsításával, növényi vírusok terjesztésével a szántóföldi és kertészeti kultúrákban a növénykártévő 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 lehet a vegyszeres fonálféregirtás kiváltására. A *Trichoderma* fajokat – melyek a növénykórokozó gombák ismert antagonistái – erőteljes kompetíciós képesség, valamint változatos kitino- és proteolitikus enzimrendszer jellemzi. Egyes fajai, illetve törzsei képesek lehetnek a fonálféreg petéit parazitálni, tápanyagforrásként hasznosítani, ezért alkalmasak lehetnek a növénykártévő fonálféreg visszaszorítására. A nematófág gombák csoportjába tartozó – szabadon élő 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. Ellenben a két csoport antagonista képességei miatt létezhetnek kevésbé előnyös 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 enzimjeit kódoló génjeinek fonálféregpete-parazitizmus alatti szimultán génexpressziós analízise, valamint a pete-parazitizmus és más biokontroll folyamatokban adott transzkriptomikai

válaszainak összehasonlítása rávilágítanak a gomba proteo-, és kitinolitikus enzimrendszereinek funkcionális és regulációs összefüggéseire. A megnyilvánuló gének komplex expressziós mintázatának megismerése olyan *Trichoderma* törzsek kiválasztását és nemesítését teszi lehetővé, amelyek hatékonyan és környezet kímélő módon szolgálják a növénykártévő fonálféregek visszaszorítását.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. Potenciális biokontroll szervezetek kombinálhatósági viszonyainak feltárása nematódcspadázó gombák és a *Trichoderma* nemzetség tagjainak bevonásával.
2. *In vitro* kísérleti rendszer létrehozása, amely alkalmas a leghatékonyabb fonálféregpete-parazita *Trichoderma* törzsek azonosítására és a gazda-parazita interakció molekuláris hátterének vizsgálatára.
3. A leghatékonyabb fonálféregpete-parazita *Trichoderma* faj kitino- és proteolitikus enzim-kódoló génjeinek transzkriptomikai vizsgálata és az ehhez szükséges *in vitro* gazda-parazita kísérleti modellrendszer kidolgozása.
4. A kiválasztott *Trichoderma* faj peteparazitizmusa és más biokontroll folyamatai során tapasztalt génexpressziós változások összehasonlítása és annak hátterében meghúzódó biológiai folyamatok jellemzése.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. Nematóda-csapdázó gombák és tenyésztésük

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

### 2.2. *Trichoderma* törzsek és tenyésztésük

A kísérletekhez használt *Trichoderma* fajok a Szegei Tudományegyetem mikrobiológiai törzsgyűjteményéből származtak, melyek kivétel nélkül őszi búza rizoszférájából származó hazai izolátumok. 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 sterilizált dialízis membránon, illetve Hewa celofánon 3 napig, 25°C-on, zárt inkubátorban növesztettük.

### 2.3. *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. A fonálférgek számára tápanyagforrásként az *Escherichia coli* OP50 törzsét alkalmaztuk.

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

A kísérletekhez CMA táptalajt használtunk. A különböző gomba fajok tenyészetekének növekedési ütemét a telepsugarak mérésével, 3-3 független ismétlésben, 5 napig követtük.

## **2.5. 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 tenyészetek 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 sterilizált dialízis membrán alkalmazásával is elvégeztük. 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.

## **2.6. *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 SM-táptalajon 3 napig növesztett *Trichoderma* telepek pereméhez körülbelül 5 mm széles sávban, törzsenként 3 ismétlést alkalmazva, tehát 3-3 Petri-csészébe egyenként  $3 \times 10^2$  db petét helyeztünk. Az így elkészült tenyészeteket kiértékelésig és a partnerek mikroszkopos megfigyelését lehetővé tevő kalkofluoros festésig (lásd 2.7.), 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) – segítségével jellemeztük. A PPI a *Trichoderma* jelenlétében – törzsenként három ismétlésben – kikelt lárvák átlagszámának és az axénikusan tenyésztett kontroll *C. elegans* tenyészetekben kikelt lárvák átlagszámának a hányadosa, mely egyszerűen számolható a különböző *Trichoderma*

törzsek fonálféregpete-parazitáló képességének jellemzésére. A kikelt lárvák számlálását 60 mm átmérőjű, négyzethálósra (négyzetenként 0,25 mm<sup>2</sup>) vonalkázott aljú, műanyag Petri-csészékbe helyezve végeztük. Az eredmények statisztikai értékelése egyszempontos varianciaanalízissel, Analysis ToolPak bővítménnyel kiegészített Microsoft Excel programmal történt.

## **2.7. Mikroszkópos megfigyelések**

A *Trichoderma* törzsek és a nematóda-csapdázó gombák, valamint a *Trichoderma* törzsek és a *C. elegans* peték interakciójának esetleges morfológiai jellegzetességei (rátekeredés, parazita hifák, hausztórium) kalkofluor-fehér (Calcofluor White Stain, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) alkalmazásával lettek megfigyelve. A fényképek fixáció nélkül, Nikon Eclipse E80i mikroszkóppal készültek.

## **2.8. *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 révén nyertük. Kontrollként pete nélküli kísérleti beállítást alkalmaztunk. A konfrontációs és kontroll tenyészeteket 25°C-on inkubáltuk.

A kísérlethez a *C. elegans* peték izolálása az Eisenmann által kidolgozott (2005) eljárással történt, azzal a különbséggel, hogy a peteizolálás utolsó tisztítási lépésében, a peték ülepitése után a mosófolyadékot úgy távolítottuk el, hogy a visszamaradó szuszpenzió µl-enként 15-20 db petét tartalmazzon.

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  $\mu$ l – átlagosan 300-400 db petét tartalmazó – szuszpenziót juttattunk ki. A Hewa celofán alkalmazása megkönnyítette a mintavételt és egyben elkerülhetővé vált, hogy a minták SM táptalajjal szennyeződjenek. A különböző inkubálási időknél 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.

## **2.9. Génexpressziós vizsgálatok**

A gomba-pete interakció és a pete nélküli mintákból Stiekema és mtsai. (1988) által közölt eljárást követve totál RNS-t izoláltunk. DNáz kezelést követően Agilent Bioanalyzer 2100 készülékkel (Agilent RNA 6000 Nano reagent kit) meghatároztuk a minták totál RNS tartalmának koncentrációját és minőségét (RNA integrity number; RIN). A reverz-transzkripcióhoz  $\geq 7,0$  RIN számmal jellemzett mintákat használtuk. A cDNS szintézist az „Applied Biosystem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” protokolljának megfelelően hajtottunk végre.

A következő lépésben a *T. harzianum* kitináz, peptidáz és potenciális referencia génjeire többszörös illesztést követően, Primer-3 programmal, 19-21 nukleotid hosszúságú, 61-63°C-on bekötődő „forward” és „reverse” primereket terveztünk.

A Master Mix és a PCR reakciók összemérése nagy pontosságú automata pipettázó robot (epMotion 5070, Eppendorf) felhasználásával történt. A kísérletekhez Power SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix-et (Applied



Biosystems) alkalmaztunk. A gének expressziós vizsgálatát kvantitatív valós idejű PCR készülékkel (Step One™ Real-Time PCR System) végeztük (Life Technologies). Az expressziós változások mérésére a Step One™ 2.0 számítógépes programba integrált, relatív kvantifikációt alkalmazó  $\Delta\Delta\text{CT}$  módszert (Livak és Schmittgen, 2001) alkalmaztuk. A PCR reakciók kezdő elődenaturációs lépése 95 °C volt 10 percig, 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 ismétlést alkalmaztunk mintánként. Az amplikonok homogenitását minden esetben olvadási görbe felvételével ellenőriztük. Méréseinkhez belső referenciaként az *aktin* gént választottuk melynek expressziós szintje állandónak, valamint a kísérleti körülményektől – fonálféreg pete jelenléte, tenyészetek fiziológiai állapota – függetlennek bizonyult. 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).

### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1. *Trichoderma* spp. és nematóda-csapdázó gombák kombinálhatósága

Kezdő lépésként a két faj kapcsolatának legelemibb tulajdonságainak jellemzésére *in vitro* növekedési és konfrontációs kísérleteket végeztünk.

Először megállapítottuk a monokultúrák növekedési ütemét. Az összes *Trichoderma* törzs hasonló *in vitro* növekedési ütemmel rendelkezett, azonban mind gyorsabb növekedést mutatott, mint a nematóda-csapdázó gombák. A nematóda-csapdázó gombák közül a *M. haptotylum* (CBS 200.50) volt jellemezhető a leggyorsabb növekedési ütemmel, amely még így is lassabbnak bizonyult, mint a leglassabban növekvő *Trichoderma tomentosum* (SZMC 1610). A legkisebb növekedési ütemmel a *M. haptotylum* (CBS 220.54) rendelkezett, mely olyan alacsonynak bizonyult, hogy a további konfrontációs kísérletekben nem teszteltük tovább.

A kilencven direkt konfrontációs kísérlet 80%-ában a *Trichoderma* fajok gyorsabb növekedési ütemmel rendelkeztek és 15%-ban antibiózissal antagonizálták a nematóda-csapdázó gombákat. Konfrontációs kísérleteinkben a *T. harzianum* törzsek (SZMC 1600, 1647, 1677 és 2636), valamint a *M. cionopagum* (CBS 228.52) közel azonos növekedési ütemmel rendelkeztek, és közöttük három hét után sem tapasztaltunk antibiózist vagy mikoparazitizmust.

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 hifaduzzanatokot. Ezek az esetek leginkább csak azokban a párosításokban voltak megfigyelhetőek, ahol az egyik partner az *A. oligospora* volt. Az *A. oligospora* a *Trichoderma*

fajokhoz hasonlóan szintén képes – behatolás nélküli – 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 a fajok kompatibilitásának eldöntésében, mivel ha az egyik partner képes a másikat parazitálni, a két faj együttes alkalmazása kizárható.

### **3.2. *Trichoderma* spp. – *C. elegans* pete interakció**

Az interakciók során a *Trichoderma* hifák a petékre tekeredtek, appresszóriumszerű képletekkel behatoltak, majd a petéket belülről kolonizálták. Az egyes *Trichoderma* törzsek pete-parazitáló képességét ún. „pete-parazita index” (PPI) segítségével határoztuk meg, mely az adott gombapartner jelenlétében kikelt *C. elegans* lárvák számának és a kontrollban a gombapartner jelenléte nélkül nevelt és kikelt lárvák számának hányadosa. 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. A *T. virens*-nek 0,31–0,48, a *T. atroviride*-nek 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, azaz az élő és elpusztult nematódák aránya mindkét fajnál közel azonosnak bizonyult. A legerősebb aktivitást a *T. harzianum* törzsek mutatták (PPI: 0,26–0,32). Továbbiakban a transzkriptomikai kísérleteinket a *T. harzianum* fajokra, illetve azon belül az egyik leghatékonyabb pete-parazita

képességgel rendelkező törzsre – az SZMC 1647-re (PPI: 0,26) – koncentráltuk.

### **3.3. *T. harzianum* kitino- és proteolitikus enzimeit kódoló gének transzkripciós vizsgálata *C. elegans* peteparazitizmus során**

#### **3.3.1. Endokitináz enzimeket kódoló gének transzkripciós aktivitása**

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 drasztikusan megemelkedett, majd fokozatosan tovább növekedett az interakció ötödik órájáig. Érdekes módon a következő mintavételi időpontban a génexpresszió igen alacsony szintre esett vissza, melyet az utolsó vizsgált időpontig ismét igen erőteljes, fokozatos növekedés követett.

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).

Az interakció hetedik óráját kivéve a *chi18-12* transzkripciójának mértéke a *chi18-5*-nél szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Az mRNS abundanciájuk nyilvánvaló különbségei ellenére viszont a két gén hasonló expressziós tendenciája arra enged következtetni, hogy a peteparazitizmus folyamatában valószínűleg egymást erősítve, illetve egymást kiegészítve játszanak szerepet.

### 3.3.2. Szerin endopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripció aktivitása

A *Trichoderma* fajok közül eddig csak a *T. harzianum* egy tripszin szerű savas (*pral*) valamint egy bázikus (*prbl*) 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. A *pral* gén növénykórokozó gomba sejtfalával, illetve kitinnel kiegészített minimál táptalajon szintén fokozott megnyilvánulást mutatott az indukciót követő negyedik órában. A következő vizsgált két időpontban (9 és 24 óra) a *pral* gén aktivitásának erős csökkenését tapasztalták (Suárez és mtsai., 2004), míg a *pral* mRNS abundanciája viszonylag stabil maradt a gomba-pete interakció hetedik és kilencedik órájában és a kísérlet végéig további növekedés jellemezte.

Kísérletünkben a *prbl* transzkripciója a petéket nem tartalmazó mintákban az ötödik, kilencedik és tizenegyedik 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 (0h). Feltételezhető, hogy a *prbl* funkciója nem elsődleges fontosságú a fonálféreg pete megtámadásában.

A *C. elegans* peték jelenlétére egy másik szubtilizin szerin endopeptidáz, melyet a *p8048* kódol, minden mintavételi időpontban gyengén indukálódott. A gén mRNS abundanciája általában szűk intervallumon belül változott, mely csak a kísérlet végére ért el egy mérsékelt expressziós értéket ( $\log_2$  RQ: 1,70). 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.

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, a 0h időponthoz és a kontrollhoz képest minden időmintában szignifikánsan alulregulálódott, így a peteparazitizmus folyamatában feltételezhetően alárendelt vagy nincsen szerepe.

Az *SS10* gén Yan és Qian (2009) kísérleteiben minden indukáló stimulusra (*B. cinerea* sejtfal, kitin) határozott transzkripciós emelkedést mutatott, azonban a peteparazitizmus során nem tapasztaltunk szignifikáns génexpressziós változást a negatív kontrollhoz képest. Érdeemes viszont rámutatni, hogy Suárez és munkatársai kísérletében (2007) az *SS10* gén homológjának (*p7129*) transzkripciója semmilyen biokontroll jellegű kísérletben (kitinnel, és öt különböző mikroszkopikus gomba sejtfalával kiegészített táptalajon) nem volt kimutatható.

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. A *p5216* gén már az interakció korai szakaszában emelt expressziós érték változást mutatott. Az ötödik órában még aktívabbá vált, majd ettől az időponttól kezdve a *C. elegans ex utero* egyedfejlődésének végéig transzkripciója megközelítőleg azonos, magas szinten maradt. Ez arra mutat, hogy a P5216 aorzin szerin endopeptidáznak alapvető szerepe lehet a *T. harzianum* fonálféregpete-parazitizmusában.

### 3.3.3. Aszpartil endopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripció aktivitása

Egy korábbi tanulmányban az aszpartil peptidáz P6281 transzkripció és fehérje expresszió vizsgálata során egyértelműen megállapították, hogy annak génszintű expresszióját különböző növénykórokozó gombák sejtfalai indukálni képesek (Suárez és mtsai., 2005). A gombasejtfal és a fonálféregpete által indukált transzkripció mintázat összehasonlítása hasonlóságokra és különbségekre is rámutat. Mindkét esetben megfigyelhető az mRNS korai felhalmozódása, de a gomba-pete interakcióban egy átmeneti csökkenés után egy második csúcs is észlelhető. Összehasonlítva a *p6281*, *pral* és *p8048* gének gomba-pete interakcióban megfigyelhető transzkripció mintázatát, az ötödik órától – figyelembe véve a *p6281* nagyobb arányú kilengéseit is – szembeötlő azok hasonlósága.

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 transzkripció 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 transzkripció aktivitást mértek. A kései transzkripció 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 során, mely a 0h időponthoz és a kontrollhoz képest mérsékelten magas mRNS abundanciával volt jellemezhető. Expresszió mintázata alapján a

*p9438* gén a fonálféreg-pete parazitizmusában feltehetőleg szerepet játszik.

Az *p7959* transzkripciója egyik időmintában sem mutatott lényeges változást a 0h időponthoz képest. Szimulált biokontroll jellegű folyamatokban, eltérő szinteken ugyan, de minden vizsgált időpontban megnyilvánult (Suárez és mtsai., 2007). Transzkripciójára nincs szignifikáns hatással a *C. elegans* peték jelenléte.

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

#### **3.3.4. Metalloendopeptidáz enzimeket kódoló gének transzkripciós aktivitása**

Szimulált biokontroll jellegű folyamatokban az aminopeptidázt kódoló *p2920* és a fentebb említett *p7959* aszpartil endopeptidázt kódoló gének – kitin tartalmú táptalajt kivéve – hasonló transzkripciós 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. A *p2920* gén mérsékelt szintű aktivitás változásai jelzik, hogy fonálféreg peték jelenléte ugyan fokozta a gén mRNS abundanciáját, azonban a legtöbb érték  $\log_2RQ$ : 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.



A metalloendopeptidáz *p7455* transzkripcióját előzőleg sem gombasejttel vagy más szén-, illetve nitrogénforrás jelenléte, sem pedig ezek hiánya nem indukálta, de kitin tartalmú táptalajon gyengén kifejeződött (Suzárec és mtsai., 2007). Érdekes módon, fonálféregpete-parazitizmus alatt a *p7455* az ötödik órától karakterisztikusan megnyilvánult. Transzkripciós profilja alapján feltételezhető, hogy a *T. harzianum* fonálféregpete-parazitizmusában szerepet játszik.

### **3.3.5. A kitináz és endopeptidáz kódoló gének relatív génexpressziós mintázatainak összehasonlítása**

A fehérje és kitin összetételű fonálféregpete kolonizációjának 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*, *pral*, *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.

Egymással összehasonlítva a kitino- és proteolitikus enzimek relatív génexpressziós mintázatait azok koordinált hatásmechanizmusokról

árulkodnak. A magasan átíródó *pral*, *p6281*, *p7455*, *chi18-5* és a legkiemelkedőbben indukálódó *p5216* és *chi18-12* gének rámutatnak, hogy ezen koexpresszálódó gének sarkalatos szerepet játszhatnak a *T. harzianum* fonálféregpete-parazitizmusában.

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 transzkripció kötőhellyel és hasonló génexpressziós mintázattal rendelkező endokitináz kódoló *chi18-5* és *chi18-12*, valamint a tripszinszerű savas szerin endopeptidáz *pral*, 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. 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 háttérben meghúzódó biológiai jelenségek, gén vagy gének szerepeinek tisztázására.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A növénykárttevő 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. 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* fonálféreg-peteparazitizmusa és mikoparazitizmusa között.

#### 4. IRODALOMJEGYZÉK

- 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.
- 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.
- Eisenmann D.M.** (2005): Wnt signaling. *WormBook*, (Ed.), The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, 7–8.
- 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.
- Nordbrink–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
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### I. Az értekezés témájával kapcsolatos közlemények listája:

#### Tudományos folyóirat (angol nyelvű):

**Szabó M.**, Csepregi K., Gálber M., Virányi F., Fekete C. 2012. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode egg-parasitism. *Biological Control* 63, 121-128. (IF: 1,92)

**Szabó M.**, Urbán P., Virányi F., Kredics L., Fekete C. 2013. Comparative gene expression profiles of *Trichoderma harzianum* proteases during in vitro nematode egg-parasitism. *Biological Control* 67, 337-343. (IF: 1,92)

Daragó Á., **Szabó M.**, Hrács K., Takács A., Nagy P.I. 2013. In vitro investigations on the biological control of *Xiphinema index* with *Trichoderma* species. *Helminthologia* 50, (2): 132-137. (IF: 0,78)

#### Tudományos folyóirat (magyar nyelvű):

**Szabó M.** 2011. Biokontroll szekunder gombametabolitok. *Mikológiai Közlemények* 50, (2): 231-238.

#### Konferencia összefoglaló:

**Szabó M.**, Virányi F., Fekete Cs. 2012. október 25. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species: Chitinase and proteinase gene expressions during nematode egg-parasitism – A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése – Hotel Helikon, Keszthely, Környezeti mikrobiológia és - biotechnológia szekció II., 6. előadás, 2012. október 25. Absztraktfüzet p.53.

#### Tudományos előadás:

**Szabó M.**, Virányi F., Fekete Cs., 2012. november 7. Mikoparazita fonalas gombák a növénykártevő fonálférgék visszaszorításának szolgálatában? A Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztályának 1004. szakülése. Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Budapest

**Szabó M.**, 2012. május 3. Parazita fonálférgék visszaszorításának lehetősége *Trichoderma* gombafajok segítségével. A Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportjának 246. szakülése. Ciszterci Rend Nagy Lajos Gimnáziuma, Pécs

## II. Az értekezés témájával nem kapcsolatos közlemények listája:

### Tudományos folyóirat (magyar nyelvű):

Nagy V., Nádasyné Ihárosi E., Héthelyi B. É, **Szabó M.**, Német B., Szabó L. Gy. 2010. A selyemmályva (*Abutilon theophrasti* Medic.) néhány fitokémiai jellemzője, hasznosításának lehetőségei. Olaj Szappan Kozmetika 59/2: 74-77.

Héthelyi É., Szarka Sz., Héthelyi I., **Szabó M.**, Szabó L. Gy. 2010. Pécsi Cirfandli fajtaborok illó szénhidrogén-származékainak, az illat- és illóanyagok SPME-GC/MS vizsgálata. Olaj Szappan Kozmetika 59/3: 102-110.

Héthelyi É., Szarka Sz., **Szabó M.**, Marsi K., Csurgó S., Szabó L. Gy. 2010. Az allelopátiás hajlamú ürömlevelű parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia* L.) illatanyagai és felhasználásának lehetőségei. Olaj Szappan Kozmetika 59/4: 130-135.

Héthelyi É., Szarka Sz., **Szabó M.**, Szabó L. Gy. 2011. Az illatos hunyor (*Helleborus odoratus* W. et K.) virágjára jellemző illatkomponensek kimutatása SPME-GC/MS analízissel. Olaj Szappan Kozmetika 60/1-2: 27-34.

Nagy V., Nádasyné Ihárosi E., **Szabó M.**, Héthelyi B. É, Szabó L. Gy. 2012. A selyemmályva (*Abutilon theophrasti* Medic.) allelokémiai jellemzői. Magyar Gyomkutatás és Technológia. XII/1: 3.

Pocsai K., **Szabó M.**, Szabó L. Gy. 2012. Biodízel-eredetű melléktermék bioherbicid hatása a parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia* L.) fitomassza-termelésére. Magyar Gyomkutatás és Technológia. XII/1: 51.

### Ismeretterjesztő szakközlemények (magyar nyelvű):

**Szabó M.** – Szabó L. Gy. 2008. A csicsóka „újrafelfedezése”. Biokultúra 19/6: 18.

**Szabó M.** – Szabó L. Gy. 2009. Allelopátia és növényvédőszer. Biokultúra 20/1: 23.

**Szabó M.** – Szabó L. Gy. 2009. Ehető gyomnövények. Biokultúra 20/3: 19-20.

**Szabó M.** 2009. Az ürömlevelű parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia* L.) szaporodásbiológiai jellemzői és az ellene való védekezés lehetőségei. Gyógyszerészet 53: 138-141.

Tudományos könyv, könyv fejezet (magyar nyelvű):

**Szabó M.** 2010. A csicsóka külső alakтана. In: Szabó L. Gy.: A csicsóka – *Helianthus tuberosus* L. Magyarország Kultúrflórája 73. (VI/16). Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő.

**Szabó M.** 2010. A csicsóka fejlődésélettana. In: Szabó L. Gy.: A csicsóka – *Helianthus tuberosus* L. Magyarország Kultúrflórája 73. (VI/16). Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő.

**Szabó M.** 2010. A csicsóka károsítói. In: Szabó L. Gy.: A csicsóka – *Helianthus tuberosus* L. Magyarország Kultúrflórája 73. (VI/16). Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő.

**Szabó M.** 2010. A csicsóka termesztése. In: Szabó L. Gy.: A csicsóka – *Helianthus tuberosus* L. Magyarország Kultúrflórája 73. (VI/16). Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő.

Konferencia összefoglaló (magyar nyelvű):

Héthelyi É., Szarka Sz., Galambosi B. Szabó L. Gy., **Szabó M.**, Lemberkovic É., Szőke É. 2011. *Artemisia* specierek és *Ambrosia artemisiifolia* SPME-GC/MS vizsgálata finn-magyar tudományos együttműködésben – XVII. Növénynevelési Tudományos Napok – „Növényneveléssel kultúrnövényeink sokféleségéért”, Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, VI. szekció 2. előadás, 2011. április 27. Összefoglalók (Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar), p. 64.

Héthelyi É., Szarka Sz., Héthelyi I., **Szabó M.**, Szabó L. Gy., Lemberkovic É., Szőke É. 2012. „In Vino Veritas” Az egészséges életmód, és a bor aromaanyagának meghatározása – Magyar Belgyógyász Társaság 44. Nagygyűlése – Budapest, Novotel Hotel, Zsolnay terem, Poszter szekció, 2012. december 13-15.

Tudományos előadás (magyar nyelvű):

Szabó L. Gy., **Szabó M.**, 2013. február 20., Egy volt bissei parasztkert növénygazdagsága. A Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportjának 251. szakkülése. Ciszterci Rend Nagy Lajos Gimnáziuma, Pécs