

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Gombapatogén *Trichoderma* fajok: előfordulás, biodiverzitás, kimutatás és
extracelluláris enzimek termelése

Hatvani Lóránt



Témavezetők:

Dr. Manczinger László

egyetemi docens

Dr. Kredics László

adjunktus

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Mikrobiológiai Tanszék

2008

1. BEVEZETÉS

Világszerte a három legnagyobb mennyiségben termesztett gomba a csiperke (*Agaricus bisporus*), a shiitake (*Lentinula edodes*) és a laska (*Pleurotus ostreatus*). Régóta ismert, hogy a termesztett gombákat érintő, *Trichoderma* fajok által okozott zöldpenész betegség jelentős károkat képes okozni, az eredmény akár teljes termés kiesés is lehet. A patogén zöldpenészek kolonizálhatják a termesztési szubsztrátot, vagy nőhetnek akár a fejlődő termőtesteken is, melyek ezáltal komoly károsodást szenvednek, de súlyosabb esetben teljesen meg is gátlódhat a termőtestképzés. Bizonyos *Trichoderma* fajok csiperkekompozttal történő asszociációja régóta a termelés hátráltató tényezője, de a probléma az Észak-Írországban 1985-ben megjelent zöldpenész járvánnyal vált igazán komollyá. A fertőzés ezek után hamarosan megjelent Írországban (1986), Angliában és Skóciában (1987), Hollandiában (1994), Franciaországban (1997), Spanyolországban (1998) és Magyarországon is (2004). Az 1990-es évek elején pedig hasonló betegséget észleltek az Egyesült Államokban és Kanadában. A kórokozókat morfológiai bélyegeik, valamint az ITS (internal transcribed spacer) 1 régió és a *tef1* (the translation elongation factor 1-alpha) gén filogenetikai elemzése alapján új fajokként írták le *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (Európa) és *T. aggressivum* f. *aggressivum* (Észak-Amerika) néven. A laskatermesztésben is számos kórokozó képes veszteségeket okozni, és ezen gomba esetében szintén régóta ismert a *Trichoderma* fajok kártétele. Az általuk okozott zöldpenész betegségből adódó jelentős termés kieséseket elsőként Dél-Koreában közölték (2002), de rövidesen súlyos fertőzésekről számoltak be Olaszországban (2004), Magyarországon (2004) és Romániában is (2004). A betegségért felelős gombák morfológiai alapon és DNS szekvenciáik tekintetében is különböztek a *T. aggressivum*-tól, amely a csiperke zöldpenész kórokozója, és nemrég *T. pleurotum* and *T. pleurotica* néven új fajokként írták le őket.

2. CÉLJAINK

Magyarország Európa egyik vezető gombatermesztője és –exportőre, de az utóbbi évek során hazánkban is megjelent mind a csiperke, mind a laskagomba *Trichoderma*-okozta zöldpenész betegsége, ami jelentősen visszavetette a termelést. Tudomásunk szerint Magyarországon eddig még nem vizsgálták a termesztett gombákat károsító *Trichoderma* fajokat, ezért munkánk során a következő kérdésekre szeretnénk volna választ kapni:

- A csiperke-zöldpenészeért hazánkban is a *T. aggressivum* f. *europaeum* felelős? Vagyis a Nyugat-Európában észlelt fertőzés terjedt át Közép-Európába?
- Mely *Trichoderma* fajok a laska-zöldpenész betegség kórokozói Magyarországon?

- A *T. aggressivum* és a laskapatogén *Trichoderma* fajok vajon specializálódtak a gazdaszervezeteikre?

További céljaink voltak:

- Egy polimeráz láncreakción (PCR) alapuló módszer kifejlesztése a laska-zöldpenész kórokozóinak gyors és specifikus kimutatására
- A *Trichoderma* fajok biodiverzitásának vizsgálata a laskagomba természetes környezetében

3. MÓDSZEREK

3.1. *Trichoderma* törzsek izolálása

Három magyarországi (a továbbiakban A, B és C) és két romániai gombatermesztő üzem csiperkekomposzt- és laskaszubsztrát mintáiból izoláltunk *Trichoderma* törzseket. Az A vállalatnál laskát, a B-nél csiperkét termesztnek, míg a C üzemben mindkét gomba termesztése, valamint a megfelelő szubsztrát és komposzt előállítása folyik. A törzsek izolálása a minták szilárd élesztő-glükóz táptalajra (YEG: glükóz 5 g l⁻¹, élesztőkivonat 1 g l⁻¹, KH₂PO₄ 5 l⁻¹ és agar 20 g l⁻¹ desztillált vízben, 0,1 g l⁻¹ streptomycinnel és 0,1 g l⁻¹ klóramfenikollal kiegészítve) való helyezésével történt.

A fent leírt módon izoláltunk *Trichoderma* törzseket magyarországi erdőkben, valamint Szeged városban gyűjtött, vadon növény laska termőtestjéről és növekedési szubsztrátjából.

3.2. *T. aggressivum* izolátumok polimeráz láncreakción alapuló azonosítása

Egy diagnosztikus polimeráz láncreakcióban (PCR) vizsgáltuk az izolátumaink DNS mintáit a Th-F és Th-R, *T. aggressivum*-specifikus primerekkel (Chen *et al.* 1999a).

3.3. Az ITS1 és 2 regions, valamint a *tefl* és a *chi18-5* gének amplifikációja és szekvenálása

A sejtmagi DNS egy az ITS (internal transcribed spacer) 1 és 2 régiókat, valamint az 5,8S rRNS gént tartalmazó szakaszát PCR módszerrel amplifikáltuk fel az SR6R és LR1 primerek segítségével (Gams and Meyer 1998). A *chi18-5* (régibbi nevén *ech42*) gén egy 0,4 kb nagyságú részének amplifikációja a Chit42-1a és Chit42-2a primerek segítségével történt, míg a *tefl* (translation elongation factor 1-alpha) egy nagyjából 1 kb hosszúságú, a 4. és 5. intront, valamint az utolsó nagy exon egy részét tartalmazó szakaszát az EF1 és EF2 (O'Donnell *et al.* 1998) vagy az EF1728F és TEF1LLErev (Jaklitsch *et al.* 2005) primerek

felhasználásával szaporítottuk fel. A PCR-termékeket automatizált szekvenálásnak vetettük alá, majd a kapott szekvenciákat a ClustalX és a GeneDoc programok segítségével illesztettük, és feltöltöttük őket az NCBI GenBank és a www.isth.info adatbázisokba.

3.4. Fajazonosítás

Az ITS1 és 2, valamint a *tef1* szekvenciák elemzését a *TrichOKey* 1.0 (Druzhinina *et al.* 2005) és 2.0 (Druzhinina *et al.* 2006b) illetve a *TrichoBLAST* (Kopchinskiy *et al.* 2005), az International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy honlapján (www.isth.info) online elérhető programok segítségével végeztük.

3.5. Filogenetikai elemzés

A filogenetikai elemzéshez a DNS-szekvenciákat sequences a ClustalX program felhasználásával illesztettük, és a Genedoc 2.6 verziójával (Nicholas *et al.* 1997) szerkesztettük. A kapott NEXUS filet először a PAUP* program 4.0b10 verziója (Swofford 1998) segítségével, majd manuálisan formáztuk a MrBayes program 3.0B4 verziója számára. A Bayesian filogenetikai rekonstrukciót a Jaklitsch *et al.* (2006) által leírtak alapján végeztük. Leache és Reeder (2002) módszerét követve a 0,95 alatti posterior valószínűség értékeket nem tekintettük szignifikánsnak, míg 0,9-nél alacsonyabbak nem szerepeltek a a konszenzus filogramon.

3.6. A mitokondriális DNS RFLP vizsgálata

A mitokondriális DNS (mtDNS) RFLP vizsgálatát az Antal *et al.* (2006) és Varga *et al.* (1993) által leírt módszerekkel végeztük. A liofilizált micéliumokból össz DNS-kivonást végeztünk Leach *et al.* (1986) módszerével, majd Hin6I (G/CGC) restrikciós enzimes emésztést alkalmaztunk. A DNS-fragmenzeket agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk, meghatároztuk a méretüket (GelBase/GelBlot Pro Gel Analysis szoftver), majd a mtDNS-profilokat hasonlósági mátrixba konvertáltuk, és a távolságokat a PhylTools program (Buntjer 1997) segítségével számítottuk ki. A dendrogramokat unweighted pair group módszerrel készítettük el aritmetikus átlagokat alkalmazva (NEIGHBOR program, PHYLIP 3.57-es verzió, Felsenstein 1995).

3.7. Specifikus PCR primerek tervezése a *T. pleurotum* és a *T. pleuroticola* kimutatásához

Az FPforw1 (5'- CAC ATT CAA TTG TGC CCG ACG A -3'), PSrev1 (5'- GCG ACA CAG AGC ACG TTG AAT C -3') és FPrev1 (5'- ACC TGT TAG CAC CAG CTC GC -3') primereket számos *T. pleurotum*, *T. pleuroticola*, *T. harzianum*, *T. aggressivum* f. *europaeum* és f. *aggressivum* izolátum *tef* szekvenciáinak ClustalX program segítségével történő illesztését követően a *T. pleurotum* megfelelő DNS-szakasza alapján manuálisan terveztük. Az FPforw1 FPrev1 primernek egy 447 bp nagyságú fragmentet kell felamplifikálnia mindkét faj esetében, míg az FPforw1-PSrev1 kombinációnak egy 218 bp-os PCR terméket kell eredményeznie, de kizárólag a *T. pleurotum* fajjal.

3.8. A *T. pleurotum* és a *T. pleuroticola* fajok PCR-rel történő kimutatása

A reakciót 21 µl végtérfogatban viteleztük ki, amely 95 mM 5X Green GoTaq™ reakciópuffert, 0,38 mM dNTP keveréket, 3,57 mM MgCl₂-ot, 0,8 U GoTaq™ DNS polimerázt (Promega), az FPforw1, FPrev1 és PSrev1 primerekből 190, 71 és 190 nM-nyi mennyiséget, 0,5 µl bidesztillált vizet, valamint 2 µl templát DNS-t tartalmazott. Minden kísérletben szerepelt egy negatív kontroll, ahol a templát DNS helyett 2 µl bidesztillált vizet alkalmaztunk. Az amplifikáció a következőképpen folyt:

1 ciklus 94 °C-on 2 percig, 35 ciklus 94 °C-on 10 s-ig és 68 °C-on 20 s-ig, valamint 1 ciklus 72 °C-on 30 s-ig.

3.9. A *T. pleurotum* C15 törzs mutagénkezelése

Szilárd YEG táptalajon, 28 °C hőmérsékleten, 5 napig tartó növesztést követően a *T. pleurotum* C15 vad törzs spórázó telepeiből 14 ml steril desztillált vízzel konídiumszuszpenziót készítettünk. A túlélési százalék meghatározásához 1 ml kezeletlen szuszpenziót overnight 10 °C-on tartottunk. A maradékot UV fényel sugároztuk be (Philips TUV 30 W germicidlámpa, 254 nm hullámhossz, 30 cm távolságról 5 percen át). Minden perc után kivettünk a szuszpenzióból 1 ml-t, és overnight 10 °C-on tároltuk. Az egyes mintákból 7 tagú, 10-es léptékű hígítási sort készítettünk, és az egyes lépésekből 100 µl-t szélesztettünk szilárd YEG táptalajra, amit előzőleg 0,1 % Triton X-100-zal egészítettünk ki annak érdekében, hogy kompakt növekedésű, könnyen számolható telepeket kapjunk. A túlélő telepeket 2-3 napos, 28 °C-on történő inkubációt követően számoltuk meg. 95 %-os mortalitást kívántunk elérni, de a kezelés ennél jóval alacsonyabbat eredményezett, ezért a folyamatot megismételtük 7-12 perces besugárzási idővel.

3.10. Enzimtesztek

A pektináz, amiláz, celluláz, lipáz, proteáz, kitináz és glükánáz enzimek termelésében bekövetkezett esetleges változásokat az enzimeknek megfelelő szubsztrátokat: pektint, keményítőt, karboximetil-cellulózt (CMC), Tween 20-at, zselatint, koloid kitint, illetve laminarint tartalmazó szilárd táptalajokon vizsgáltuk. A különböző táptalajokon mutatott növekedéstől függően a telepek és a bontási zónák átmérőjét 2-7 napos, 28 °C-on történő inkubációt követően mértük.

3.11. *In vitro* konfrontációs kísérletek

A *T. pleurotum* C15 izolátum különféle enzimrendszerek termelésében megváltozott képességű, mutáns származékainak laskával szembeni képességét a szülői törzssel összehasonlítva vizsgáltuk 3 különböző táptalajon: WAM (20 g l⁻¹ agar desztillált vízben), YEGM (2 g l⁻¹ glükóz, 0,5 g l⁻¹ élesztőkivonat, 20 g l⁻¹ agar desztillált vízben) és YEXM (2 g l⁻¹ xilóz, 0,5 g l⁻¹ élesztőkivonat, 20 g l⁻¹ agar desztillált vízben) (Tokimoto 1982, Kitamoto *et al.* 1984). A laskatelepből agarkorongokat oltottunk az egyes táptalajokra, majd nagyjából 1 cm-es telepsugár elérése után a *T. pleurotum* C15 szülői izolátumot, valamint annak a különféle enzimrendszerek termelésében megváltozott képességű származékait hasonló módon oltottuk a növekvő laskatelep középpontjától 3 cm távolságra. 5-7 napos, szobahőn történő inkubációt követően vizsgáltuk, hogy az egyes *Trichoderma* törzsek képesek-e növekedni és konídiumot hozni a laskatelep felszínén.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A csiperkekomposztból és laskaszubsztrátból izolált *Trichoderma* törzsek azonosítása

Publikáció: Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C. and Kredics, L. 2007. Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different *Trichoderma* Species. *Phytopathology* 97: 532-537.

Összesen 66 *Trichoderma* törzset izoláltunk 3 magyarországi gombatermesztő üzemből származó csiperkekomposzt- és laskaszubsztrát-mintákból: 26-ot az A cégtől (laskatermesztő), 32-t a B üzemből (csiperketermesztő), valamint 8-at a C vállalatától (csiperke

és laska). Annak felmérésére, hogy van-e az izolátumok között *T. aggressivum*, egy diagnosztikus PCR-t hajtottunk végre fajspecifikus primerekkel (Th-F és Th-R, Chen *et al.* 1999a). Ennek eredményei alapján 16 törzs bizonyult *T. aggressivum*-nak, de néhány másik izolátum esetében is kaptunk gyenge, mégis észlelhető jelet, ami az eredmények más módszerrel történő megerősítését tette szükségessé. Ezért elvégeztük az ITS1 és 2 szekvenciák elemzését a *TrichOKey* program segítségével. Ezzel 17 izolátumot azonosítottunk *T. aggressivum*-ként, ami alátámasztotta az előbbi eredményeket, és még egy, a diagnosztikus teszt során igen gyenge jelet adó izolátumot tudtunk a *T. aggressivum* fajba sorolni. A többi 49 izolátumot az ITS1 és 2 szekvenciák elemzésével (*TrichOKey*) azonosítottuk, és a következő fajokat találtuk: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum* és *T. ghanense* (3, 9, 4 és 1 izolátum). Négy izolátum tartozott a *T. longibrachiatum/Hypocrea orientalis* fajcsoportba, melyek ITS1 és 2 szekvenciák alapján nem különíthetők el, ezért esetükben *tefl* szekvenciák elemzését végeztük el (*TrichoBLAST*), amiből kiderült, hogy a *T. longibrachiatum* fajba tartoznak. A fennmaradó 27 izolátumot pedig az akkor még tudományosan nem leírt *Trichoderma* sp. DAOM 175924 fajként azonosítottuk.

4.2. Az egyes *Trichoderma* fajok megoszlása a csiperkekomposzt- és laskaszubsztrátmintákban

Publikáció: Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C. and Kredics, L. 2007. Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different *Trichoderma* Species. *Phytopathology* 97: 532-537.

A *T. aggressivum* faj képviselőit csak csiperkekomposztból tudtuk izolálni (B üzem), míg a *Trichoderma* sp. DAOM 175924 fajt kizárólag laskaszubsztrátban találtuk meg. A többi faj csak kis számban képviseltette magát, és leginkább a csiperkekomposztra voltak jellemzőek. A C üzem - ahol nem tapasztaltak jelentős, *Trichoderma*-fertőzésből adódó károkat a csiperketermesztésben - komposztmintáiban csak *T. harzianum* izolátumokat azonosítottunk. Eredményeink alapján a *T. aggressivum* és a *Trichoderma* sp. DAOM 175924 fajok specifikusak a csiperke-, illetve a laskatermesztés körülményeire, ami abban az esetben is fennáll, ha a két gombát egymás közvetlen közelében termesztik. Morfológiai, valamint egyes DNS-szekvenciákban (ITS1 és 2, *tefl*, valamint *chi18-5*) fellelhető különbségek alapján a *Trichoderma* sp. DAOM 175924 fajt a mi munkánkkal párhuzamosan két különálló fajként írták le *T. pleurotum* and *T. pleuroticola* néven (Park *et al.* 2006). A magyarországi

izolátumaink döntő többsége ezek alapján a *T. pleurotum* fajba tartozik, mindössze *T. pleurotica* izolátumot találtunk.

4.3. A *Trichoderma* sp. DAOM 175924 kospecifikus a Koreából származó laskapatogén *Trichoderma* izolátumokkal

Publikáció: Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C. and Kredics, L. 2007. Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different *Trichoderma* Species. *Phytopathology* 97: 532-537.

Miután kimutattuk, hogy Magyarországon a laska-zöldpenészt nem a *T. aggressivum* a felelős, mint a csiperketermesztésben, tisztázni kívántuk, hogy a *Trichoderma* sp. DAOM 175924 azonos lehe-e a Dél-Koreában leírt laskapatogén *Trichoderma* fajok (Park *et al.* 2004a) valamelyikével. Ehhez felkutattuk a *T. koreana* and *T. pleuroti* fajok hozzáférhető ITS1 és ITS2 szekvenciáit (accession number. DQ164405 - DQ164410), és leellenőriztük őket a *TrichOKey* és a *TrichoBLAST* programokkal. A törzsek mindegyikét *Trichoderma* sp. DAOM 175924-ként azonosítottuk, és a szekvenciáikban tapasztalható variabilitás (1 nukleotid különbség az ITS2 szekvenciákban) megegyezett a más *Trichoderma* sp. DAOM 175924 izolátumok esetében tapasztaltakkal. Ebből arra következtettünk, hogy a Dél-Koreában laska-zöldpenészt okozó *Trichoderma* izolátumok azonos fajba tartoznak az általunk magyarországi mintákból izolált törzsekkel.

4.4. A magyarországi *T. aggressivum* izolátumok mtDNS RFLP mintázata az Egyesült Királyságból származó törzsekkel

Publikáció: Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C. and Kredics, L. 2007. Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different *Trichoderma* Species. *Phytopathology* 97: 532-537.

Hogy kiderítsük, hogy a Magyarországon észlelt fertőzés a Nyugat-Európában tapasztalt csiperke-zöldpenész terjedéséből adódik-e, elvégeztük a járvány kitörésekor Írországból és Angliából izolált *T. aggressivum* f. *europaeum* törzsek (Seaby 1998) mtDNS RFLP vizsgálatát is, és összehasonlítottuk a saját *T. aggressivum* izolátumaink mintázatával. Kimutattuk, hogy két populáció mtDNS RFLP egységes és megegyező mintázatot mutat, ami

viszont jelentősen eltér a *T. aggressivum* f. *aggressivum* izolátumok (Észak-Amerika) esetében megfigyellettől.

4.5. A *Trichoderma* sp. DAOM 175924 heterogén mtDNS RFLP mintázattal rendelkezik

Publikáció: Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C. and Kredics, L. 2007. Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different *Trichoderma* Species. *Phytopathology* 97: 532-537.

A *T. aggressivum* f. *europaeum*-tól eltérően a *Trichoderma* sp. DAOM 175924 izolátumokat mtDNS RFLP mintázatuk alapján három csoportba tudtuk sorolni: az A mintahelyről származó izolátumok két csoportot reprezentálnak, amelyek megfelelnek a későbbiekben leírt *T. pleurotum* és *T. pleuroticola* fajoknak, a harmadik csoportba pedig a C izolátumok tartoznak.

4.6. A laskával asszociált izolátumok két különálló *Trichoderma* fajt alkotnak

Publikáció: Komoń-Zelazowska, M. Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P. and Druzhinina, I. S. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause world-wide green mould disease in oyster mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22): 7416-7426.

A magyarországi, romániai, olaszországi és koreai, súlyos zöldpenész-problémával küszködő gombatermesztő üzemekből származó *Trichoderma* izolátumok ITS1 és ITS2 szekvenciái azonosnak vagy nagyon hasonlóknak bizonyultak, a korábban felismert, lehetséges új faj, a "*Trichoderma* cf. *aureoviride* DAOM 175924" (NCBI GenBank accession no. AY605726) (Kullnig-Gradinger *et al.* 2002) és a koreai laska-zöldpenész nemrég leírt kórokozója, a *T. pleuroticola* CNUMH 601 (NCBI GenBank DQ164409) (Park *et al.* 2006) szekvenciáihoz. Három különböző filogenetikai markert, az ITS1-5,8S rRNS-ITS2 régiót, a *tef1* és a *chi18-5* gén egy amplifikáltunk fel és szekvenáltunk meg, a kapott szekvenciákat a *TrichoBLAST* programmal (Kopchinskiy *et al.* 2005; www.isth.info) hasonlítottuk össze, és kizárólag a *Trichoderma* sp. strain DAOM 175924-el találtunk azonosságot. A *chi18-5* szekvenciák alapján készült fán viszont a laskapatogén fajok és a rokon izolátumok két elkülönülő csoportot alkotnak. Hasonló különbség mutatkozott a *tef1* fán: az egyik klád a DAOM 175924 törzset, a legtöbb olaszországi, egy magyarországi, két romániai laska-

zöldpenész izolátumot, valamint Iránból, Észak-Amerikából és Új Zélandról származó környezeti izolátumokat (*T. pleurotica*) foglalja magába, míg a másik kládba a legtöbb magyarországi, két romániai és egy németországi izolátum (*T. pleurotum*) tartozik. A laskafarmokról származó izolátumok két ITS2 típusba sorolhatók, melyek mindössze egy nukleotidban térnek el, és ez a különbség erősen korrelál a *tef1* és *chi18-5* szekvenciák alapján készült fákkal, ami két külön filogenetikai fajra utal. A DAOM 175924 és CNUMH 601, valamint CPK 1532 és CNUMH 501 (NCBI GenBank DQ164405) izolátumok ITS1 és ITS2 szekvenciáinak azonossága, valamint hasonló ökofiziológiai jellemzők alapján arra következtettünk, hogy a felfedezett új fajok a mi kutatásainkkal egyidőben Park *et al.* (2006) által leírt, *T. pleurotica* CNUMH 601 és *T. pleurotum* CNUMH 501 típus törzsekkel azonosak.

4.7. A *T. pleurotica* és *T. pleurotum* fajok biogeográfiája

According to: Komoń-Zelazowska, M. Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P. and Druzhinina, I. S. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause world-wide green mould disease in oyster mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22): 7416-7426.

A laska-zöldpenész fajok elterjedésének biogeográfiai jellegének meghatározása érdekében elvégeztük a *T. pleurotica* és *T. pleurotum* izolátumok *tef1* alléljainak részletes vizsgálatát. Hat magyarországi és két romániai *T. pleurotum* izolátum között alig mutatkozott intraspecifikus variabilitás, mivel két, négy-négy izolátumot magában foglaló csoport *tef1* szekvenciái mindössze egy A-G tranzícióban különböztek. Ezzel szemben a *T. pleurotica* esetében két fő allélt tudtunk elkülöníteni öt diagnosztikus tranzíció alapján. Hat olaszországi laska-zöldpenész izolátum polimorfnek mutatkozott. Egyikük *tef1* allélját a GJS 04-01 törzsével találtuk azonosnak, amelyet *Cercospora* elleni biológiai védekezésben használnak cukorrépan (Montana, USA). Három izolátum allélja azonos volt a DZ56 törzsével, melyet csiperkekomposztból izoláltak Iránban, míg a fennmaradó kettő *tef1* allélja a Kanadában izolált DAOM 175924 referenciatörzsével mutatott azonosságot. A Hollandiában, laskacsírából izolált GJS 95-81 törzs egy pozícióban különbözött a típus törzs alléljától, míg az egyetlen magyar *T. pleurotica* izolátum (CPK 2104) az első fő alléltípust mutatta.

4.8. A *T. pleurotum* és a *T. pleuroticola* fajok specifikus kimutatása PCR módszerrel

A *T. pleurotum* and *T. pleuroticola* fajokra specifikus primerek tervezése érdekében megvizsgáltuk számos *T. harzianum*, *T. aggressivum* f. *europaeum* and *T. aggressivum* f. *aggressivum* (cf. Komoń-Zelazowska *et al.* 2007) ITS1 és 2, *tef1* és *chi18-5* szekvenciáit tartalmazó illesztéseket. A *tef1* génben három szekvenciárészletet találtunk, melyek lehetővé tették specifikus primerek (FPforw1, FPrew1 és Psrev1) tervezését. A primerek tesztelése során 13 *T. pleurotum* és 17 *T. pleuroticola* izolátum DNS mintáit vizsgáltunk meg, és a *T. pleurotum* esetében elvárásainknak megfelelően egy 447 és egy 218 bp nagyságú PCR product terméket kaptunk, míg a *T. pleuroticola* fajjal csak a nagyobbik fragment képződött. A primerek specifitásának ellenőrzése érdekében 28 egyéb *Trichoderma* faj (*T. harzianum*, *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. aggressivum* f. *aggressivum*, *T. minutisporum*, *T. crassum*, *T. oblongisporum*, *T. tomentosum*, *T. rossicum*, *T. fertile*, *T. cerinum*, *T. velutinum*, *T. polysporum*, *T. helicum*, *T. spirale*, *T. virens*, *T. brevicompactum*, *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. viridescens*, *T. gamsii*, *T. koningiopsis*, *T. aureoviride*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride* és *T. ghanense*), valamint 12 más nemzetégekbe tartozó gombafaj (*Penicillium expansum*, *Aspergillus* sp., *A. niger*, *Mortierella* sp., *Thermomyces* sp., *Mucor circinelloides*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* és *Pleurotus ostreatus*) DNS mintáit teszteltük a reakcióban. Fontos megjegyezni, hogy a *P. expansum*, *Aspergillus* sp., *Mortierella* sp., és *Thermomyces* sp. törzseket laskatermesztéshez használt szalmából izoláltuk, míg a laska (*Pleurotus ostreatus*) attól a gomatermesztő üzemből származott, melynek fertőzött mintáiból előzőleg számos *T. pleurotum* és *T. pleuroticola* törzset izoláltunk. Egyik esetben sem képződött PCR-termék, míg a *T. pleurotum* és *T. pleuroticola* kontrollok mindig pozitívak voltak. Ezek alapján arra következtettünk, hogy az általunk kifejlesztett multiplex PCR módszer alkalmas alkalmas a laskapatogén *Trichoderma* fajok specifikus kimutatására.

4.9. A *T. pleuroticola* és *T. pleurotum* fajok kimutatása laskaszubsztrátból

Három, a szubsztátkészítés különböző fázisaiból származó minta (szalma, laskával átszövetett egészséges és fertőzött szubsztrát) DNS-kivonatait teszteltük az FPforw1, FPrew1 és PSrev1 primerekkel. Nem kaptunk PCR-terméket a szalma és az egészséges szubsztrát esetében, míg a *Trichoderma*-fertőzött mintákban kimutattuk a *T. pleurotum* jelenlétét, amit kitenyésztés után igazoltunk is az ITS szekvenciák elemzésével igazoltunk is.

4.10. Vadon növény laska termőtestjéről és szubsztrátjából izolált *Trichoderma* törzsek azonosítása

A multiplex PCR segítségével a laskapatogén *Trichoderma* fajok a laskagomba természetes környezetében történő előfordulását vizsgáltuk, ehhez öt magyarországi erdőből származó, laskagomba élőhelyeül szolgáló tuskókról (*Populus alba*, *P. canadensis* és *Tilia* sp.) izolált *Trichoderma* törzseket tanulmányoztunk, és nagyon eltérő eredményeket kaptunk. Az 1-es mintából származó mind a 28 izolátumot *T. pleuroticola*-ként azonosítottuk. A fajt nem tudtuk kimutatni a 2-es és az 5-ös mintából, míg a 4-esben 19-ből 5, a 3/B-ben pedig a 11-ből 1 izolátum bizonyult *T. pleuroticola*-nak. A *T. pleurotum* fajt egyik mintából sem mutattuk ki. A többi izolátum azonosításához elvégeztük az ITS1 és 2, valamint indokolt esetben *tefl* szekvenciák elemzését, és kizárólag a *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* és *T. atroviride* fajok képviselőit találtuk. A *T. harzianum* volt a 2-es minta kizárólagos, valamint a 4-es domináns faja (19 izolátumból 14), az 5/B mintában pedig az izolátumok felét alkotta (20-ből 10). A *T. longibrachiatum* faj csak a 3/B mintában volt jelen, ahol erősen dominált (11 izolátumból 9). A *T. atroviride* faj képviselőit csak a 3/B (11 izolátumból 1) és az 5-ös mintákban találtuk, ahol az izolátumok felét adták (20-ből 10). A 3-as és 5-ös mintákban talált termőtesteken szintén megvizsgáltuk a laskapatogén *Trichoderma* fajok esetleges előfordulását. Az 5-ös minta termőtestjéről nem tudtunk *Trichoderma* fajokat izolálni, ezzel szemben a 3/B minta esetében azt találtuk, hogy a termőtestről izolált törzsek jelentős része (20-ből 14) a *T. pleuroticola* fajhoz tartozik, míg az izolátumok fennmaradó részét *T. longibrachiatum*-ként azonosítottuk.

4.11. A *T. pleurotum* C15 törzs túlélése UV-kezelést követően

Bizonyos extracelluláris hidrolitikus enzimek génjében bekövetkezett mutációk elérése céljából a *T. pleurotum* C15 törzset UV-besugárással véletlenszerű mutagenézissel tettük ki. 95%-os mortalitás elérése (7, 8, 9 és 10 perces UV-kezelés) után 163 túlélő telepet izoláltunk, majd megvizsgáltuk növekedésüket és spóratermelő képességüket. Minden túlélő izolátumot tanulmányoztunk az enzimtesztben, de csak azokat tekintettük enzimtermelésben mutánsnak, melyek a szülői örökséhez hasonló növekedést és sporulációt mutattak.

4.12. Enzimtesztek

A különböző szubsztrátokat tartalmazó táptalajokon történő inkubációt követően megmértük a bontási zónák és a telepek átmérőjét, és hogy a polimerek lebontását

növekedésre vonatkozathasuk, ezen értékek átlagát vettük. Eredményeink alapján az egyes enzimszerek termelésében a következő törzsek esetében tapasztaltunk eltéréseket a szülői izolátumhoz viszonyítva:

Pektinázok:

- erősebb pektinbontás: P3
- gyengébb pektinbontás: E6, F1, F5, O15, P13, T10, U3, V5

Cellulázok:

- erősebb CMC-bontás: C4, D1, D2
- nincs CMC-bontás: H2, T14

Amilázok:

- erősebb keményítőbontás: T3, U4
- gyengébb keményítőbontás: E5, T2

Lipázok:

- erősebb Tween 20-bontás: S17, T8, U25
- gyengébb Tween 20-bontás: P2, T13, U17

Proteázok:

- erősebb zselatinbontás: nem tapasztaltunk
- gyengébb zselatinbontás: F7, R4, S10, S13, S16, U8, V5 (az S13 és a V5 egyáltalán nem volt képes a zselatint hidrolizálni)

Kitinázok:

- erősebb kitinbontás: P16
- gyengébb kitinbontás: R2, R3, R4, T14

Glükanázok:

- erősebb laminarinbontás: C3, D1, H1, M1
- gyengébb laminarinbontás: F1, R2, R3, R4, T3

4.13. *In vitro* konfrontációs kísérletek

A szülői törzs minden vizsgált táptalajon ránőtt a laskatelepre, és azon konídiumokat is termelt. Az antagonista képességben a vad típus és a mutáns törzsek közti leglátványosabb különbségeket YEX táptalajon figyeltük meg. Az agresszivitás erősödését egyik esetben sem tapasztaltuk, viszont számos mutáns mutatott a szülői törzséhez képest jelentősen lecsökkent mikoparazita tulajdonságot, és ezek nagy része más vizsgált táptalajokon is megfigyelhető volt.

YEX táptalajon csökkent mikoparazita-aktivitást kifejtő mutánsok:

H2 (amiláz -, celluláz --, pektináz -, proteáz -), megerősítve YEG és WA táptalajon
O15 (pektináz -), megerősítve WA táptalajon
P2 (lipáz -)
P13 (pektináz -)
P16 (kitináz +, lipáz +), megerősítve YEG táptalajon
R2 (amiláz +, kitináz -, glükánáz -, lipáz -, proteáz -), megerősítve WA táptalajon
R3 (kitináz -, glükánáz -, pektináz +), megerősítve YEG és WA táptalajon
R4 (kitináz -, glükánáz -, pektináz +, proteáz -), megerősítve YEG táptalajon
S10 (proteáz -), megerősítve YEG táptalajon
S13 (amiláz ++, celluláz -, kitináz -, proteáz --), megerősítve YEG táptalajon
S16 (amiláz +, proteáz -), megerősítve YEG és WA táptalajon
T8 (celluláz -, proteáz -)
T14 (celluláz --, kitináz -), megerősítve YEG és WA táptalajon

Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az általunk vizsgált enzimszerek közül a proteázok, lipázok, kitinázok és glükánázok játszhatnak szerepet *T. pleurotum* laskával szembeni mikoparazitizmusában.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Kimutattuk, hogy a csiperkegomba zöldpenész betegségéért Magyarországon is a *T. aggressivum* f. *europaeum* a felelős, vagyis a nyugat-európai járvány érte el Közép-Európát.
- Bebizonyítottuk, hogy a laska-zöldpenészt más országokhoz hasonlóan hazánkban is a *T. pleurotum* és a *T. pleuroticola* fajok okozzák, és ez világméretű járványt vetíthet elő. Ezen túl az újonnan leírt fajokról a korábbinál részletesebb jellemzést adtunk, amivel alátámasztottunk a két faj identitását.
- A *T. aggressivum* és a laskapatogén zöldpenész fajok specializálódtak a gazdaszervezeteikre.
- Kifejlesztettünk egy PCR-alapú módszert a laskapatogén *Trichoderma* fajok gyors és specifikus kimutatására.
- Megfigyeltük, hogy a laskapatogén *T. pleuroticola* előfordul, és jelentősen fel is dúsulhat a laskagomba természetes környezetében.
- Eredményeink alapján a proteázok, lipázok, kitinázok és glükánázok játszhatnak szerepet *T. pleurotum* laskával szembeni mikoparazitizmusában.

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk listája

Folyóiratcikkek:

Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nagy A, Nagy E, Vágvölgyi C, Kredics L

Green mould diseases of Agaricus and Pleurotus are caused by related but phylogenetically different Trichoderma species

PHYTOPATHOLOGY 97(4): 532-537 (2007)

IF: 2,377

Komoń-Zelazowska M, Bissett J, Zafari D, Hatvani L, Manczinger L, Woo S, Lorito M, Kredics L, Kubicek CP, Druzhinina IS

Genetically closely related but phenotypically divergent Trichoderma species cause world-wide green mould disease in oyster mushroom farms

APPL ENVIRON MICROBIOL 73(22): 7415-7426 (2007)

IF: 4,004

Konferenciakiadványban megjelent cikkek:

Hatvani L, Kocsubé S, Manczinger L, Antal Z, Szekeres A, Druzhinina IS, Komoń-Zelazowska M, Kubicek CP, Nagy A, Vágvölgyi C, Kredics L

Green mould disease: a global threat to the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). A review

In: Gruening M (ed.) Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII: Proceedings of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science, Cape Town, South Africa, 20–24 May, pp. 485-495 (2008)

Referált folyóiratban megjelent összefoglalók:

Antal Z, Hatvani L, Varga J, Kredics L, Szekeres A, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E

Double-stranded RNA elements in Trichoderma strains obtained from mushroom farms
ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 52(S): 5- (2005)

Antal Z, Hatvani L, Kredics L, Szekeres A, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E
Polymorphism of mitochondrial DNA among Trichoderma strains obtained from mushroom farms
ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 52(S): 4- (2005)

Hatvani L, Kredics L, Szekeres A, Antal Z, Manczinger L, Vágvölgyi C
Extracellular enzyme production of Trichoderma strains causing mushroom green mold in Hungary
ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 52(S): 54-55 (2005)

Hatvani L, Kredics L, Szekeres A, Antal Z, Nagy A, Manczinger L, Vágvölgyi C
Genetic diversity of Trichoderma strains and occurrence of T. aggressivum in Hungarian mushroom compost and substrate samples
ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 52(S): 55- (2005)

Antal Z, Kredics L, Varga J, Hatvani L, Szekeres A, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E
Double stranded DNA plasmids in the mitochondria of Trichoderma strains associated with green mould disease
ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 53(3): 240- (2006)

Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Druzhinina IS, Kubicek CP, Szekeres A, Vágvölgyi C, Nagy E, Kredics L
Monitoring the occurrence of Trichoderma species during compost production and cultivation of Agaricus bisporus in Hungary
ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 53(3): 272- (2006)

Kredics L, Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Druzhinina IS, Kubicek CP, Szekeres A, Nagy A, Vágvölgyi C, Nagy E
Green mould disease of oyster mushroom in Hungary and Transylvania
ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 53(3): 306-307 (2006)

Antal Z, Sajben E, Manczinger L, Nagy A, Hatvani L, Kredics L, Vajna B, Márialigeti K, Vágvölgyi C

Succession of fungal community in wheat straw compost

ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 54(S1): 3-4 (2007)

Hatvani L, Kocsubé S, Manczinger L, Druzhinina IS, Kubicek CP, Vágvölgyi C, Kredics L

A PCR-Based Test for the Rapid Detection of *Trichoderma pleurotophilum* and *T. fulvidum*, the Causative Agents of the Newly Emerged Worldwide Green Mold Disease of *Pleurotus ostreatus*

INT J MED MUSHROOMS 9(3-4): 309-310 (2007)

Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Druzhinina IS, Kubicek CP, Szekeres A, Vágvölgyi C, Kredics L

Worldwide Green Mold Disease of the Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) is Caused by Two New Species of *Trichoderma*, *T. fulvidum* and *T. pleurotophilum*

INT J MED MUSHROOMS 9(3-4): 241-242 (2007)

Hatvani L, Kocsubé S, Manczinger L, Antal Z, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Vágvölgyi C, Kredics L

Pleurotus green mould disease: a PCR-based test for the rapid detection of the causative agents, *Trichoderma pleurotophilum* and *Trichoderma fulvidum*

ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 54(S1): 45-46 (2007)

Antal Z, Sajben E, Brunner S, Varga N, Manczinger L, Nagy A, Hatvani L, Kredics L, Vágvölgyi C

Regularity of fungal succession in wheat straw compost

ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 55(2): 172- (2008)

Hatvani L, Kocsubé S, Nagy L, Komon-Zelazowska M, Manczinger L, Cseh T, Körmöczi P, Antal Z, Nagy A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Vágvölgyi C, Kredics L

A new agricultural pest emerging: the green mould disease of cultivated oyster mushroom

ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 55(S): in press (2008)

Kredics L, Kocsubé S, Manczinger L, Antal Z, Szekeres A, Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Kubicek CP, Vágvölgyi C, Hatvani L

Detection of *Trichoderma pleurotum* and *T. pleuroticola*, the causative agents of oyster mushroom green mould in the cultivation substrate of *Pleurotus ostreatus* by a PCR-based test
ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 55(2): 209-210 (2008)

Kredics L, Cseh T, Körmöczi P, Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Vágvölgyi C

Proteolytic enzyme production of the causative agents of oyster mushroom green mould under inductive and non- inductive conditions

ACTA MICROBIOL IMMUNOL HUNG 55(2): 211-212 (2008)

Egyéb konferenciakiadványban megjelent összefoglalók:

Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nagy A, Vágvölgyi C, Kredics L

Green mould disease in Hungary: identification of the causative agents on *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*

In: Mach RL, Zeilinger S (eds.), 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Book of Abstracts, Wien: Vienna University of Technology, pp. T31 (2006)

Antal Z, Varga J, Kredics L, Hatvani L, Szekeres A, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E
Mitochondrial plasmids in *Trichoderma* strains associated with green mould disease of commercially grown mushrooms

In: Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Kubicek CP (eds.), 8th European Conference on Fungal Genetics, Book of Abstracts, Wien: Vienna University of Technology, pp. 419- (2006)

Komon-Zelazowska M, Zafari D, Bissett J, Hatvani L, Zhang C-L, Xu T, Woo S, Manczinger L, Lorito M, Kredics L, Kubicek CP, Druzhinina IS

A recently emerging green mold disease in Eurasian oyster mushroom farms is caused by new species of *Trichoderma*

In: Proceedings of the Eighth International Mycological Congress, Cairns, Australia pp. 37- (2006)

Antal Z, Sajben E, Manczinger L, Nagy A, Hatvani L, Kredics L, Vajna B, Márialigeti K, Vágvölgyi C

A komposztálódó búzaszalma gombaközössége / Fungal habitat of the composted wheat straw

In: "Lippay János - Ormos Imre - Vas Károly" Scientific Conference, 7-8 November, 2007, Budapest, Publications of Buda Campus, Abstracts pp. 326-327 (2007)

Kredics L, Hatvani L, Kocsubé S, Komon-Zelazowska M, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Vágvölgyi C, Kubicek CP, Druzhinina IS

Green mould diseases of cultivated mushrooms: global developments and the situation in Hungary

In: Kosalec I; Pigac J; Vujaklija D (eds): Power of Microbes in Industry and Environment. Programme and Abstracts. Croatian Microbiological Society, pp. 40- (2007)

Hatvani L, Kocsubé S, Manczinger L, Druzhinina IS, Kubicek CP, Vágvölgyi C, Kredics L
Specific PCR reveals that the substrate of wild grown *Pleurotus ostreatus* is a potential source of green mould affecting oyster mushroom production

The 6th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, September 29 - October 3. 2008, Bonn, Germany, Book of Abstracts, in press (2008)

Kredics L, Cseh T, Körmöczy P, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C

Extracellular enzyme production of the two causative agents of oyster mushroom green mould under inductive and non-inductive conditions

The 6th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, September 29. - October 3. 2008, Bonn, Germany, Book of Abstracts, in press (2008)

Hatvani L, Kocsubé S, Manczinger L, Antal Z, Szekeres A, Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Kubicek CP, Nagy A, Vágvölgyi C, Kredics L

Green mould disease: a global threat to the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). A review

Abstracts of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science, Cape Town, South Africa, 20–24 May 2008. pp. 34 (2008)

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

A „Komoń-Zelazowska, M. Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P. and Druzhinina, I. S. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause world-wide green mould disease in oyster mushroom farms. Appl. Environ. Microbiol. 73(22): 7416-7426.” publikáció társszerzőiként, valamint a doktorjelölt témavezetőiként igazoljuk, hogy Hatvani Lóránt „Mushroom pathogenic *Trichoderma* species: occurrence, biodiversity, diagnosis and extracellular enzyme production” című doktori disszertációjában szereplő, nevezett publikációból származó megjelölt eredmények (4.6. és 4.7. tézispontok) jelentős mértékben tükrözik a jelölt saját munkáját, és azokat más doktori disszertációban nem szerepeltettük, valamint a jövőben sem fogjuk. Továbbá kijelentjük, hogy jelölt munkája számottevő mértékben járult hozzá a publikáció létrejöttéhez.

Dr. Manczinger László
egyetemi docens

Dr. Kredics László
adjunktus

Szeged, 2008. augusztus 27.