MIKOPARAZITA GOMBÁK SEJTFALBONTÓ ENZIMGÉNJEINEK IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

GICZEY GÁBOR

Gödöllő
2001.

A doktori program

címe:	**A mikroorganizmusok változékonyságának molekuláris háttere**
tudományága:	**biológiai tudomány**
vezetője:	**Dr. Hornok László egyetemi tanár, az MTA doktora Mikrobiológiai Tanszék**
Témavezető:	**Dr. Hornok László egyetemi tanár, az MTA doktora Mikrobiológiai Tanszék**

.....

Dr . Hornok László
programvezető

.....

Dr. Hornok László
témavezető

ELŐZMÉNYEK, KITŰZÖTT CÉLOK

A biológiai növényvédelem segítségével csökkenti lehet a környezet szintetikus peszticidekkel való terhelését. A növénykórokozó gombák elleni biológiai védekezésben legelterjedtebben antagonista mikroorganizmusokat használnak. Legnépszerűbbek a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó mikoparaziták, amelyek rendkívül széles fajspektrumban fejtenek ki gátló hatást gombák, közöttük számos növénykórokozó ellen. Szintén ígéretes mikroorganizmusa a biológiai védekezésnek a *Coniothyrium minitans* gomba, amely egyes szkleróciumos növénykórokozók hatékony parazitája. Ellentétben a *Trichodermá*kkal, e fajnak szűk a gazdaspektruma, áldozatai főként a *Sclerotinia* nemzetségbe tartozó fajok, amelyek ellen rendkívül hatékonyan alkalmazható. Ennek a mikoparazitának az a különlegessége, hogy a gazdagombák által képzett ellenálló kitartó képleteket, a szkleróciumokat képes elpusztítani.

A *Trichodermá*k biológiájáról, antagonista aktivitásának hátteréről viszonylag nagy mennyiségű információ halmozódott fel, a mikoparazita gombákkal foglalkozó kutatások modellszervezeteinek tekinthetjük ezeket a fajokat. Antagonista aktivitásukat különböző mechanizmusoknak köszönhetik, ezek egyike, és minden bizonnyal legjelentősebbike a közvetlen mikoparazitizmus, amelyet extracelluláris sejtfalbontó enzimek termelésével képesek elérni. A gomba sejtfalbontó enzimek, főként kitinázok és β-1,3-glükanázok a gazda sejtfal lebontását és ezen keresztül a behatolást teszik lehetővé a parazita számára.

Jóval kevesebb ismeret gyűlt eddig össze a *C. minitans* parazitizmusának biológiájáról, szinte semmit sem tudunk a gomba sejtfalbontó enzimrendszeréről, ami pedig feltehetően fontos szerepet játszik áldozatainak elpusztításában, és igen hatékony komponensekből állhat. Erre utal, hogy ez a mikoparazita a szklerócium parazitizmus során áthatol a rendkívül ellenálló szklerócium sejtfal rétegein.

A mikroorganizmusokkal történő biológiai védekezés jelenleg az esetek többségében kevésbé hatékony és megbízható, mint a szintetikus peszticideken alapuló védekezés. E környezetbarát módszer szélesebb körű alkalmazását elősegítheti a mikoparazita gombák biológiájának, genetikájának alaposabb megismerése. Ezek az ismeretek felhasználhatók a törzsnemesítésben, a természetes törzsek szelektálásában, továbbá a mikrobák alkalmazási módjának optimalis megválasztásában.

Doktori értekezésemben tárgyalt kutatómunkám biológiai védekezésre alkalmas mikoparazita gombák sejtfalbontó enzimeit kódoló génjeiről szól. Egyrészt a molekuláris biológiai módszerekkel történő törzsnemesítés egyik lehetséges útját kíséreltük meg a *Trichoderma hamatum* kitinázaktivitásának növelésével, másrészt a specializálódott

szklerócium parazita *C. minitans* biológiai aktivitásában minden bizonnyal fontos szerepet betöltő kitináz- és glükanázgének megismerését és jellemzését vettük célba. A kutatómunka célkitűzései részletesebben az alábbiak voltak:

1. Megnövekedett kitinázaktivitású *T. hamatum* törzsek előállítása és jellemzése, ezen belül:
   - a 42 kDa kitinázt kódoló gén és szabályozó régióinak izolálása,
   - a gén kópiaszámának megnövelése a gazda törzsben genetikai transzformáció útján,
   - a transzformáns törzsek jellemzése.

2. A *C. minitans* szklerócium parazita gomba hidrolitikus enzimrendszerének alaposabb megismerése, ezen belül:
   - kitináz és β-1,3-glükanáz enzimeket kódoló gének klónozása,
   - a gének és termékeik jellemzése.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mikrobiológiai módszerek

A *C. minitans* Cm-2 törzset fertőzött szkleróciumokon tartottuk fenn annak érdekében, hogy kizárjuk a biológiai aktivitásának elvesztését. A többi fonalas gombát és a heterológ expressziós gazdaként használt élesztőt hagyományos alaptechnikákkal tartottuk fenn, oltottuk, inokuláltuk és szaporítottuk.

A *T. hamatum* Tam-61 transzformálása

A transzformálást az irodalomban leírt, a Tam-61 törzsre adaptált eljárással végeztük. Fiatal micéliumból protoplasztokat izoláltunk, amelyeket polietilén-glikol és Ca^{2+} ionok jelenlétében transzformáltuk a szelekciós markerként higromicin rezisztenciát hordozó plazmiddal. A higromicin rezisztens primér transzformánsokat monospóráztuk és teszteltük stabilitásukat nem-szelektív körülmények között.

Molekuláris biológiai eljárások

A nukleinsavak kivonását, enzimatikus manipulációját, a genomi és a cDNS könyvtár készítését, a polimeráz láncreakciót, a hibridizálást, valamint a szekvencia meghatározást a molekuláris biológiában általánosan használt, illetve a gyártó cégek által javasolt eljárásokkal végeztük el.

Fehérje analitikai módszerek

Az élesztőben kifejeztetett glükanázt ioncsere-kromatográfiával tisztítottuk a töményített tenyészetszűrletből. A frakciók β-1,3-glükanáz aktivitását laminarin szubsztrátumon dinitroszalicilsavas redukálócukor teszttel mértük. Az N-terminális aminosavsorrend meghatározáshoz SDS-poliakrilamid-gélelektroforézist követően polivinilidén-difluorid membránra blottoltuk a glükanázt, majd Coomassie festés után kivágtuk a fehérjét tartalmazó membrán csíkot és szekvencia analízis alá vetettük az Edman-féle módszerrel.

Számítógépes elemzések

Oligonukleotid primerek tervezéséhez az Oligo 4.0 programot, DNS szekvencia elemzéséhez a GCG programcsomagot, a szekvencia összehasonlításokhoz a BLAST módszert alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

A *Trichoderma hamatum* homológ transzformálása a *Tham-ch* génnel

A *Trichoderma harzianum* 42 kDa endokitinázáról ismert volt, hogy *in vitro* gomba gátlási tesztekben igen nagy aktivitást mutat. Az enzimet kódoló génről (*ech42*) pedig kimutatták, hogy a parazita kölcsönhatás alatt indukálódik. Célul tűztük ki a gén homológjának izolálását a *T. hamatum* erős mikoparazita aktivitású Tam-61 törzséből. A kitűzött stratégia az volt, hogy a gazdatörzset transzformáljuk a saját szabályozó elemei által irányított génnel, tehát a 42 kDa kitinázgén kópiaszámát emeljük meg abban a reményben, hogy a megnövelt kitinázaktivitású törzsek parazita képessége erősödni fog. PCR technika segítségével, szekvencia homológiák alapján kiemeltük a kódoló régiónak megfelelő szakaszt, majd ezt próbaként használva λ fág könyvtárból izoláltuk a teljes gént szabályozó régióival együtt. Plazmidba klónoztunk egy 4 kilobázis (kb) hosszú szakaszt, amely 1,5 kb-t tartalmazott a promóterből és 1 kb-t a terminátor régióból. Meghatároztuk ennek a szakasznak a teljes szekvenciáját. A szekvencia analízise megerősítette, hogy a kezünkben van a *T. hamatum* 42 kDa kitinázt kódoló génje a *cis* szabályozó elemeivel együtt. A gént *Tham-ch*-nak neveztük el. A kódoló régióban közel 95% hasonlóságot tapasztaltunk a *T. harzianum ech42* génnel, a nem-kódoló részeken kisebbet, de a promóter ATG-hez közeli 350 bp-os szakaszán ez az érték még megközelítette a 90%-ot. Ráadásul jónéhány transzkripciós faktor kötőhelyet tudtunk azonosítani, amelyek az *ech42* gén promóterében is jelen voltak.

Igazoltuk, hogy az általunk kiszemelt Tam-61 törzsben a *Tham-ch* gén erősen indukálódik modellezett parazitizmus körülmények között, azaz ha kizárólagos szénforrásként *Rhizoctonia solani* sejtfalán növesztjük a gombát. A *Tham-ch* gén promóterének szekvencia analízise, valamint expressziós mintázatának vizsgálata arra utalt, hogy a gén alkalmas a tervezett transzformációs kísérletekbe való bevonásra, joggal várhatunk emelkedett aktivitást a transzformánsoktól a parazitizmus során.

A génszakaszt, amely a struktúrgénen felül tartalmazta a promóter és terminátor régiót, beépítettük a szelekciós markerként higromicin rezisztenciagént hordozó pCSN43 plazmidba k. Az így létrehozott, pECTR1-nek elnevezett vektorral transzformáltuk a *T. hamatum* Tam-61 törzséből készített protoplasztokat. Tíz monospórázott, nem-szelektív körülmények között is stabil higromicin rezisztens utód törzset állítottunk elő.

A transzformáló plazmid kromoszómába integrálódását és típusát Southern hibridizációval igazoltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az esetek többségében (tízből kilenc esetben) homológia alapján, az endogén kitináz lokuszba integrálódott a vektor. Három transzformáns esetén tapasztaltunk tandem beépülést, a tandem kópiák azonban instabilnak bizonyultak, mind a homológ integránsok, mind az egyetlen nem-homológ integráns esetében. Az általunk használt transzformációs rendszerrel tehát a gén kópiaszámának megkétszerezését lehetett elérni.

A transzformánsokban a gén sejtfal-indukált expressziója, valamint extracelluláris kitinázaktivitása is megnőtt a vad típushoz képest (a T8 törzs kivételével, amely az egyetlen nem-homológia alapján történt beépülést mutatta). Az aktivitás emelkedésének mértéke változó volt, a T9 jelű törzs esetén volt a legmagasabb, közel ötszöröse a vad típusának.

In vitro csészetesztekben ellenőriztük, hogy a három kiválasztott transzformáns képes-e gyorsabban átnőni áldozatát, a *Sclerotinia sclerotiorum*ot, illetve a *R. solani*t, mint a Tam-61 recipiens. Minden párosítás esetén átnőtte a *Trichoderma* törzs a tesztgombát és erősen sporulált rajta, az átnövés sebességében azonban nem tapasztaltunk különbséget a transzformánsok és a vad típusú recipiens törzs között.

A *Coniothyrium minitans* sejtfalbontó enzimgénjei

Gomba eredetű β-1,3-glükanáz és kitináz enzimek konzervatív régiói alapján degenerált primereket terveztünk, amelyeket RT-PCR reakciókban alkalmazva izoláltunk egy feltételezett β-1,3-glükanázt (*cmg1*) és egy feltételezett kitinázt (*cmch1*) kódoló gént a *C. minitans*ból készített cDNS könyvtárból.

Alaposabban jellemeztük a glükanázt kódoló *cmg1* gént és termékét. Tekintettel arra, hogy struktúra és nem aktivitás alapján klónoztuk a gént, a további analízis előtt igazolni akartuk hogy a cDNS valóban enzimaktivitást mutató fehérjét kódol, ezért a

cDNS-t *S. cerevisiae*ben kifejeztettük. A *cmg1* gént hordozó élesztő egy ~100 kDa β-1,3-glükanáz enzimet választott ki a tápoldatba.

Meghatároztuk a *cmg1* gén teljes nukleotidsorrendjét, amely a szekvencia analízis szerint egy 792 aminosavból álló fehérjét kódol. A CMG1 protein teljes hossza mentén nagyfokú hasonlóságot mutat fonalas gombákból izolált exo-β-1,3-glükanáz enzimek szekvenciájához. Számítógépes elemzés szerint az N-terminálisán egy 24 aminosav nagyságú szekréciós szignál peptidet hordoz. A szekretált fehérje számított molekulatömege 83,3 kDa, izoelektromos pontja 4,73.

Ioncsere-kromatográfiával tisztítottuk az élesztő által expresszált rekombináns enzimet. Megállapítottuk, hogy a szekretált enzim N-terminálisa és a számítógép által jelzett szignálpeptid hasítóhely között egy hét aminosavból álló szakasz helyezkedik el, ami arra utal, hogy a CMG1 enzim többlépcsős proteolitikus érésen megy keresztül, legalább is a heterológ gazdában. A tisztított rekombináns enzim specifikusan hasított 1,3-β-glikozidos kötéseket, és kizárólag glükóz monomereket szabadított fel a szubsztrátumból, azaz a CMG1 exo-β-1,3-glükanáz enzim. A CMG1 képes volt bontani a *S. sclerotiorum* szkleróciumaiból tisztított sejtfal preparátumot, ráadásul 300, illetve 600 μg/ml koncentrációban alkalmazva 35, illetve 85%-ban gátolta az említett növénykórokozó gomba micélium növekedését.

Megállapítottuk, hogy a *cmg1* gén egy kópiában van jelen a *C. minitans* genomban. Ellentétben a fonalas gombákból izolált hidroláz gének többségével, expressziója nem teljesen gátolt 2% glükóz jelenlétében. A transzkripció szintje erősödik szénforráshiány okozta éhezés hatására, valamint akkor, ha a tápoldatban őrölt szklerócium az egyedüli szénforrás. A *S. sclerotiorum*mal létrejött parazita kölcsönhatás során szintén emelkedik a *cmg1* gén expressziós szintje, ami arra utal, hogy a *cmg1* génnek szerepe van a szklerócium parazitizmusban.

Ugyancsak a fent vázolt PCR alapú stratégiával izoláltuk a *cmch1* cDNS klónt, amely 1758 bázispárból áll, és egy 443 aminosavból álló, 45,7 kDa méretű feltételezett kitináz enzimet kódol, amely nagyfokú homológiát (54-65% azonosságot) mutat különböző organizmusokból származó kitináz enzimekkel.

Új tudományos eredmények

1. Izoláltuk a *Trichoderma hamatum* 42 kDa endokitináz enzimét kódoló gént (*Tham-ch*) és *cis* szabályozó elemeit. Meghatároztuk a *Tham-ch* gén nukleotidsorrendjét (génbanki azonosító: U88560).
2. Transzformáció útján kétszeresére növeltük a *Tham-ch* gén kópiaszámát a gazdatörzsben (*T. hamatum* Tam-61).

3. Megállapítottuk, hogy a kitinázgént több kópiában hordozó transzformáns törzsek extracelluláris kitinázaktivitása nagyobb, mint a vad típusú recipiens törzsé. A T9 jelű törzs aktivitása közel ötszöröse volt a vad típusú törzs aktivitásának.
4. A specializálódott szklerócium parazita *Coniothyrium minitans* sejtfal-indukált cDNS bankjából izoláltunk egy β-1,3-glükanázt (*cmgl*) és egy kitinázt (*cmchl*) kódoló gént. Meghatároztuk mind a két gén nukleotidsorrendjét (génbanki azonosítók: *cmchl* – AF285086; *cmgl* – AF247649).
5. Heterológ gazdában kifejeztettük a *cmgl* gént, a rekombináns enzimet tisztítottuk, jellemeztük: szubsztrát specificitását és hidrolízis termékeit megvizsgálva igazoltuk, hogy a CMG1 exo-β-1,3-glükanáz.
6. Megállapítottuk, hogy a CMG1 enzim képes bontani a *Sclerotinia sclerotiorum* szkleróciumaiból tisztított sejtfal preparátumot, továbbá 300, illetve 600 μg/ml koncentrációban alkalmazva 35, illetve 85%-ban gátolja e növénykórokozó gomba micélium növekedését.
7. Igazoltuk, hogy a *cmgl* gén expressziója felerősödik szklerócium parazitizmus során, s bizonyítottuk, hogy a gén 2% glükóz hatására sincs teljes represszió alatt.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A *T. hamatum* homológ transzformálása a *Tham-ch* génnel

A biológiai védekezés mint környezetbarát növényvédelmi technológia szélesebb körű elterjedéséhez hozzárárulhat a jelenleg használt mikroba törzseknél hatékonyabbak előállítása. A törzsnemesítés egyik útja lehet transzgénikus mikroorganizmusok molekuláris biológiai módszerekkel való előállítása. Bár aligha valószínű, hogy a közeli jövőben engedélyeznék genetikailag módosított mikroorganizmusok szabadföldi kibocsátását, a biológiai védekezésre alkalmas törzsek genetikai manipulálásának mégis van létjogosultsága, ugyanis a transzgénikus törzsek vizsgálata hasznos információt szolgáltathat egy adott gén biológiai védekezésben betöltött szerepéről, és így például támpontot adhat a természetből izolált törzsek szelekciós kritériumainak meghatározásához.

Az volt a célunk, hogy a *T. hamatum* Tam-61 törzsben megemeljük a 42 kDa endokitinázgén (*Tham-ch*) kópiaszámát, saját, indukálható promóterével vezérelve. A konstitutív promóterek használatával szemben a törzsnemesítésben az indukálható promóterek előnye az, hogy a transzgénikus organizmus gazdaságosabban használja fel energia forrásait, nem „pazarolja" energiáit a transzgén és terméke kifejeztetésére, csak amikor szüksége van rá.

A *T. hamatum* Tam-61 törzsét transzformáltuk a saját promóterével és terminátor régiójával irányított *Tham-ch* gént tartalmazó plazmiddal, a pECTR1-el. Mielőtt a transzformáns törzseket jellemeztük, monospórázással biztosítottuk a primér transzformánsok genetikai homogenitását. Erre azért volt szükség, mert a primér transzformánsok többnyire heterokariotikusak, amit az okoz, hogy a *Trichoderma* protoplasztok többmagvúak és a sejtmagoknak csak kis hányada "fogadja be" az idegen DNS-t. Mivel a *Trichoderma* konídiumok egymagvúak, a várakozásnak megfelelően a monospórázott utód törzsek egységesek voltak; telepmorfológiában, növekedési sebességben, konídium termelésben nem különböztek a vad típusú recipiens törzstől, továbbá higromicin rezisztenciájukat nem-szelektív körülmények között is megőrizték.

A transzformáló vektor (pECTR1) az általunk használt rendszerben a homológia alapján történő integrálódást részesítette előnyben. A homológ beépülés előnye az lehet, hogy a megfelelő kromoszómális környezetbe kerül a transzgén, ahol működését nem érik a pozíciójából eredő negatív hatások

A transzformánsok többségében megemelkedett kitináz génexpressziót és megnövekedett extracelluláris kitinázaktivitást mutattunk ki a vad típusú recipienshez viszonyítva. Nem bizonyultak viszont hatékonyabb parazitának a transzformánsok a recipienshez képest *in vitro* csészetesztben két fontos talajlakó növénykórokozó, a *S. sclerotiorum* és a *R. solani* ellen. Ez jelentheti azt, hogy a két említett gazda hatékonyabb legyűrésében nem a kitinázaktivitás jelenti a „szűk keresztmetszetet". Előfordulhat az is, hogy hiába van jelen nagyobb mennyiségű 42 kDa endokitináz, ha a fokozott parazita aktivitáshoz egy másik kitináz izoenzim szintjének a növekedésére lenne szükség. A mi munkánk megjelenése idején nem volt kísérletesen alátámasztott információ arról, hogy egyetlen enzimgén milyen mértékben járul hozzá egy olyan összetett képesség kialakításához, mint a mikoparazita aktivitás. Csak 1999-ben jelent meg három független tudományos közlemény arról, hogy inaktiválták az *ech42* gént egy mikoparazita *Trichodermá*ban és tesztelték a mutánsok biológiai védekezésre való alkalmasságát. Az eredmények látszólag ellentmondanak egymásnak, összegzésként azt állapíthatjuk meg, hogy egy adott litikus enzimgén fontossága, a mikoparazitizmusban és ezzel összefüggésben a biológiai védekezésben játszott szerepe törzsfüggő és gazdafüggő is. Nem várhatunk tehát általános hatékonyság javulást egyetlen enzim túltermeltetésével, de azért szelektív módon növelhetjük ezen az úton a biológiai növényvédelem hatékonyságát.

A *C. minitans* sejtfalbontó enzimgénjei

Sejtfalbontó enzimek, elsősorban β-1,3-glükanázok és kitinázok termelését számos esetben hozták összefüggésbe mikoparazita gombák biológiai aktivitásával. Feltehetően

a gazdagomba sejtfalán keresztül történő behatolást segítik ezek az enzimek. Ezen felül szerepük lehet az elpusztított áldozat kolonizálásában és táplálékként való elfogyasztásában. A legismertebb és a biológiai védekezésben legyakrabban alkalmazott mikoparaziták, a *Trichodermák* litikus enzimrendszeréről viszonylag nagy mennyiségű infomáció gyűlt már össze. Ezzel szemben a *C. minitans* szklerócium parazita gomba hidroláz rendszeréről alig van adat az irodalomban, jóllehet igen hatékony komponensekből állhat ez a rendszer, hiszen a parazita képes áthatolni a rendkívül kemény, ellenálló szklerócium sejtrétegein.

Gomba eredetű kitinázokban és β-1,3-glükanázokban azonosított konzervatív régiók alapján izoláltunk a *C. minitans*ból egy kitináz (*cmch1*) és egy glükanáz gént (*cmg1*). Eredményeink arra utalnak, hogy az általunk tervezett és használt degenerált primerek alkalmasak más fonalas gombák hasonló génjeinek klónozására.

A heterológ gazdában kifejeztetett *cmg1* gén termékét tanulmányozva megállapítottuk, hogy ez a gén a *S. sclerotiorum* növekedését gátló, exo-β-1,3-glükanáz enzimet kódol. A rekombináns fehérje mérete eltért a számítógép által megjósolttól. A becsült ~81 kDa helyett ~100 kDa volt a mérete az élesztő által szekretált CMG1 enzimnek. Ez nagy valószínűséggel a heterológ gazda túlzott glikozilációs aktivitásának a következménye, amit valószínűsít az enzim szekvenciájában azonosított nagy számú glikozilációs szignál.

Mikoparazita gombák sejtfalbontó enzimeit kódoló gének szabályozásáról egyre több ismeret lát napvilágot. Az általunk izolált *cmg1* gén expressziójának vizsgálatakor némi meglepetésre azt tapasztaltuk, hogy a glükóz csak kis mértékben represszálja. Ez különösen igaz a tenyésztés korai stádiumára, amikor még erőteljesen növekvő fázisban van a gomba. Éhezési körülmények között (0,1% glükóz), valamint egyedüli szénforrásként *S. sclerotiorum* szklerócium őrleményt tartalmazó tápoldatban a *cmg1* transzkripciós szintje nagyobb volt, mint 2% glükózon. Az éheztetett és a szkleróciumon tenyésztett gombát mikroszkóppal ellenőriztük, és megállapítottuk, hogy a megemelkedett expresszióban az autolízis nem játszik szerepet. Az *in vitro* rázatott tenyészetben elvégzett vizsgálatok mellett csészetesztekben kimutattuk, hogy a *cmg1* gén expressziója felerősödik *S. sclerotiorum* szkleróciumával létrejött parazita kölcsönhatás során. Eredményeink arra utalnak, hogy a *cmg1* sokrétű szabályozás alatt áll, aminek alaposabb megismerése további kísérleteket igényel, valamint azt is sugallják, hogy ennek a génnek szerepe van a szklerócium parazitizmusban.

Gomba eredetű sejtfalbontó enzimek génjeit eredményesen fel lehet használni a biológiai védekezés hatékonyságának javítására. Ezek a gének (1) alkalmasak lehetnek antagonista mikroorganizmus törzsek nemesítésére, (2) növényekbe való beültetésük

esetén gombák elleni rezisztencia fokozására és (3) hatékony expressziót biztosító heterológ gazdában kifejeztetve a tisztított géntermék használható hatóanyagként.

Úgy gondoljuk, hogy a *C. minitans*ból általunk izolált és jellemzett glükanáz gént, a *cmgl*-et érdemes a fent felsorolt stratégiák valamelyikével a biológiai növényvédelem hatékonyságának fokozását célzó kísérletekbe bevonni. Ezt alátámasztja a rekombináns enzim *S. sclerotiorum* ellen kifejtett gátló hatása. Érdemes lenne azonban a *C. minitans*ból további enzimeket (és génjeiket) izolálni, amelyek együttes alkalmazásával csökkenteni lehetne a gátláshoz szükséges koncentrációt, hiszen e lítikus enzimek szinergisztikusan hatnak.

Minthogy a közelmúltban kidolgozták a *C. minitans* transzformációs rendszerét, adva van a lehetőség a *cmgl* gén funkciójának géninaktivációs kísérletekkel történő vizsgálatára.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Tudományos dolgozatok

Giczey G., Kerényi Z., Fülöp L., Hornok L. (2001). Expression of *cmgl*, an exo-β-1,3-glucanase gene from *Coniothyrium minitans* increases during sclerotial parasitism. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:865-871.

Giczey G., Kerényi Z., Dallmann G., Hornok L. (1998). Homologous transformation of *Trichoderma hamatum* with an endochitinase encoding gene, resulting in increased levels of chitinase activity. *FEMS Microbiology Letters* **165**:247-252.

Hornok L., **Giczey G.**, Kerényi Z. (1998). Strain improvement in biocontrol fungi. *Phytoprotection* 79(SL):136-138.

Ismeretterjesztő cikk

Hornok L., **Giczey G.** (1998). Növényvédő háziasított mikrobák. *Élet és Tudomány* 53:995-997.

A doktori képzés ideje alatt más témában megjelent tudományos dolgozatok

Fekete C., Logrieco A., **Giczey G.**, Hornok L. (1997). Screening of fungi for the presence of the trichodiene synthase encoding sequence by hybridization to the *Tri5* gene cloned from *Fusarium poae*. *Mycopathologia* **138**:91-97.

Fekete C., **Giczey G.**, Papp I., Szabó L., Hornok L. (1995). High-frequency occurence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiology Letters* **131**:295-299.

Konferencia-előadások, poszterek

Giczey G., Kerényi Z., Hornok L. (2000). Isolation and characterization of a β-1,3-glucanase gene from the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *5th European Conference on Fungal Genetics, Arcachon, France.*

Giczey G., Kerényi Z., Fülöp L., Hornok L. (2000). The expression pattern of *cmg1*, an exo-β-1,3-glucanase gene of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely.*

Giczey G., Kerényi Z., Hornok L. (2000). A *Coniothyrium minitans* β-1,3-glükanáz génjének jellemzése *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest.*

Giczey G., Kukolya J., Hornok L. (1999). Kitináz és glükanáz izoenzimek kimutatása *Coniothyrium minitans* tenyészetszűrletéből. *I. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest.*

Giczey G., Kukolya J., Hornok L. (1999). A hiperparazita *Coniothyrium minitans* sejtfalbontó enzimei. *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest.*

Giczey G., Kukolya J., Hornok L. (1998). A biológiai növényvédelemben alkalmazott *Coniothyrium mimitans* extracelluláris hidrolitikus enzimeinek jellemzése. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Miskolc.*

Giczey G., Kerényi Z., Dallmann G., Hornok L. (1997). Improvement of chitinase activity of the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* by homologous transformation with an endogenous endochitinase gene. *TRICEL '97 conference, Gent, Belgium.*

Giczey G., Kerényi Z., Dallmann G., Hornok L. (1997). Antagonista *Trichoderma*-törzsek nemesítése a kitináz-aktivitás növelésével. *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest.*

Giczey G., Kerényi Z., Dallmann G., Hornok L. (1997). Homologous transformation of *Trichoderma hamatum* with an endochitinase gene. *8th European Congress on Biotechnology, Budapest.*

Giczey G., Kerényi Z., Hornok L. (1997). A *Trichoderma hamatum Tham-ch* génnel történő transzformálása változatos integrálódási eseményekkel és a kitináz-aktivitás növekedésével jár. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Szekszárd.*