

***Trichoderma reesei* peptaibol szintetáz expressziójának vizsgálata**

**Irinyi László – Sándor Erzsébet –
Kövics György**

Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
Mezőgazdaságtudományi Kar,
Növényvédelmi Tanszék, Debrecen
irinyil@yahoo.fr

ÖSSZEFOGLALÁS

A növénypatogén gombák elleni biológiai védekezésben fontos szerepet játszanak a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó mikoparazita gombák. A mikoparazitizmusban szerepet játszó peptaibol termelésének tanulmányozásához riporterrendszert hoztunk létre. Ehhez a glükóz oxidáz (*goxA*) gén elé a peptaibol szintetáz (*tex1*) 900 bp hosszúságú promóterét kapcsoltuk. Az így létrejött *tex1*-promóter: *goxA* fúziót tartalmazó *pTES1* plazmiddal transzformáltuk a *T. reesei* törzset.

Kulcsszavak: *Trichoderma*, biokontroll, peptaibol, transzformáció

SUMMARY

Because of the potential importance of peptaibols in the biological control of plant diseases, a transgenic, a *T. reesei* strain carrying a *tex1*-promoter: *goxA* fusion plasmid was constructed for further studies. The peptaibol synthetase gene (which is highly similar to *T. virens tex1*) was identified in the genome sequence of *T. reesei*. A 900 bp 5' upstream noncoding fragment, presumed to include the promoter region of *tex1*, was cloned into the *pSJ3* plasmid (which contains the *Aspergillus niger goxA* gene encoding glucose oxidase). Finally, we transformed *T. reesei* with the *tex1*-promoter: *goxA* fusion containing *pSJ3* plasmid.

Keywords: *Trichoderma*, biocontrol, peptaibol, transformation

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó talajlakó fonalas gombákat több mint 70 éve tanulmányozzák. Ennek oka részben az, hogy a növénypatogén gombák elleni biológiai védekezés (biokontroll) talán legígéretesebb fegyvereinek számítanak (Kubicek és mtsai, 2001). Napjainkban már kereskedelmi forgalomban is kaphatók különböző *Trichoderma* törzseket tartalmazó készítmények (pl.: PlantShield HC, Trichodex, Soilgard 12G, Primastop), melyek elvileg lehetőséget adnak a fungicid hatású vegyszerek mellőzésére, vagy csökkentett mértékű használatára (Hjeljord és Tronsmo, 1988).

A növénykórokozók elleni biológiai védekezés a növénytermesztésben vonzó alternatívája a kemikáliák használatának, mely gyakran környezetszennyezési problémákkal jár, ráadásul egyre gyakrabban figyelhető meg a különböző fungicidekkel szemben rezisztens törzsek megjelenése is. Számos *T. harzianum* törzset tartalmazó biopeszticidet használnak a biológiai

védekezésben, mivel hatékony parazitája sok gazdaságilag fontos növénypatogén gombának (pl.: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.*, *Pytium spp.*, *Botrytis cinerea*). A biokontroll törzsek alkalmazásának hatékonyságát nem könnyű megjósolni, ezért egyelőre szerény versenytársai a különböző kemikáliáknak (Harman és Björkman, 1998; Hjeljord és Tronsmo, 1988). A mikoparazitizmus folyamatának molekuláris szintű megismerése mindenképpen elősegíti a *Trichoderma* törzsek eredményesebb és megbízhatóbb felhasználását a biológiai védekezésben.

A mikoparazita *Trichoderma* fajok a fitopatogén gombákat többlépcsős folyamat során pusztítják el, amiben sejtfalbontó enzimek mellett a termelt antibiotikumok – köztük a peptaibolok – is szerepet játszanak (Lorito és mtsai, 1996). Feltételezések szerint a sejtfalbontó enzimek, köztük a kitinázok csökkentik a parazitált gomba sejtfalának rigiditását, míg a peptaibol antibiotikumok gátolják a membránhoz kötött enzimeket. Ezek közé az enzimek közé tartoznak a sejtfal komponensek szintetázai, így a parazitált gomba javító („repair”) enzimek nem képesek ellensúlyozni a sejtfalbontó enzimek hatását (Kubicek és mtsai, 2001).

A peptaibolok olyan gombák által termelt lineáris polipeptidek, melyek 7-20 aminosavból állnak, és közös jellemzőjük, hogy (i) viszonylag nagy arányban található bennük egy „abnormális” aminosav, az α -amino izobutánsav, (ii) N-terminális részükön alkil csoport (általában acetil), (iii) C-terminális részükön aminosav-alkohol (például fenilalaninol, vagy leucinol) található (Rebuffat és mtsai, 1999). A peptid típusú antibiotikumok közé tartozó peptaibolokat kizárólag gombák, köztük a *Trichoderma*, *Hypocrea*, *Gliocladium*, *Acremonium* nemzetség fajai termelik (Degencolb és mtsai, 2003). A peptaibolok a membránokat permeabilizálják.

A peptaibolok a nem riboszómán szintetizálódó polipeptidek közé tartoznak. *T. virens*-ből a közelmúltban klónoztak egy peptaibol szintáz enzimet kódoló szekvenciát (*tex1*). A *tex1* 62,8 kb. hosszúságú, intron nélküli „open reading frame”, amely 18 peptid szintáz modulból, valamint egy-egy, az N- és C-terminális részen található, fehérjét módosító doménből áll (Wiest és mtsai, 2002).

Tervezett munkánk célja megvizsgálni egy könnyen transzformálható, régóta tanulmányozott, peptaibolt termelő mikoparazita *Trichoderma* törzset, a *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) peptaibol termelését befolyásoló tényezőket, és felderíteni a bioszintézis molekuláris szintű szabályozását. Mivel a biológiai

védekezésben használt fajok legtöbbje nehezen transzformálható (C. P. Kubicek személyes közlés), a vizsgálatokhoz egy könnyen transzformálható, hosszú ideje tanulmányozott és peptaibolt is termelő (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol>), korábban már általunk is vizsgált (Seiboth és mtsai, 2002) *Trichoderma* fajt, a *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) pyr4 – (uridin prototróf) TU 6 törzsét használjuk majd, amely szintén igen aktív a növénypatogén (pl. *Pythium*) fajokkal szemben (C. P. Kubicek, nem publikált eredmény).

EREDMÉNYEK

A génextpresszió Northern analízissel történő vizsgálatát az intront nem tartalmazó *tex1* gén szokatlan nagysága miatt (csaknem 63 kb) elvetettük. A további vizsgálatokhoz egy riporterrendszert hoztunk létre, amelyben a peptaibol szintetáz kódozó *tex1* promóter szekvenciája után egy riportergént, nevezetesen az *Aspergillus niger* glükóz oxidáz génjét (*goxA*) ültettük be. A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó vad típusú fajok közös jellemvonása, hogy nem rendelkeznek glükóz oxidáz aktivitással (Mach és mtsai, 1999).

Első lépésként megkerestük a *T. virens tex1* génjéhez nagyon hasonló, peptaibol szintetáz kódozó szekvenciát a *T. reesei* genomjában. Ezt követően a kódozó résztől 5' irányban található 900 bp-nyi, a promóter régiót tartalmazó szakaszt PCR-el felszaporítottuk (1. ábra).

1. ábra: A *ptex1* amplifikációja PCR-el 50 (1) és 55 (2) °C-os anellációs hőmérsékleten

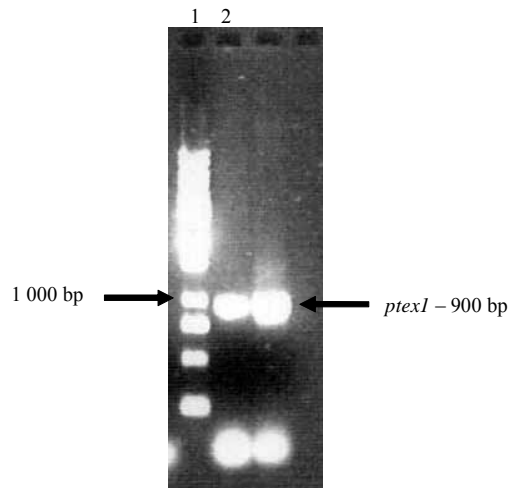


Figure 1: Amplification of *ptex1* with PCR at 50 and 55 °C amplification temperature

A pTES1 plazmid létrehozásához a *tex1* promóter régiót tartalmazó fragmentumot (*ptex1*) a megfelelő restriktions hasító-helyek segítségével „kicseréltük” a pSJ2 plazmid *pnag1* szakaszával (2. ábra). A *T. reesei* protoplasztokat kotranszformáltuk a *tex1*-promóter: *goxA* fúziót tartalmazó pTES1 plazmiddal és a pyr4 génnel PEG 6000 jelenlétében. Az így létrejött uridin auxotróf transzformánsok további szelektálásával kiválasztottuk a megfelelő *tex1*-promóter: *goxA* fúziót is tartalmazó *T. reesei* törzset.

2. ábra: A pTES1 plazmid létrehozása

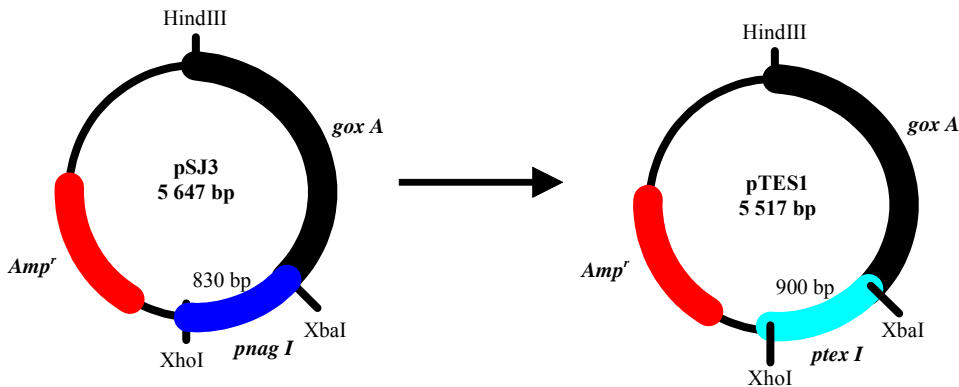


Figure 2: Construction of pTES1 plasmid

Az így létrehozott transzformáns segítségével a továbbiakban vizsgálni fogjuk a peptaibol termelést befolyásoló körülményeket. Célunk az optimális peptaibol termeléshez szükséges paraméterek

meghatározása, mely segítséget nyújthat hatékonyabb *Trichoderma* biopreparátumok előállításához, illetve az eredményes biológiai védekezéshez szükséges körülmények kialakításához.

IRODALOM

Degencolb, T.-Berg, A.-Gams, W.-Schlegel, B.-Grafe, U. (2003): The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibotics in fungi and their mass spectrometric identification via fragment ions. *J Peptide Sci*, 9. 666-678.
 Harman, G. E.-Björkman, T. (1998): Potential and existing use of

Trichoderma and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Harman, G. E.-Kubicek, C. P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Applications, 2. Taylor and Francis Ltd, London, UK, 229-266.

- Hjeljord, L.-Tronsmo, A. (1988): *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G. E.-Kubicek, C. P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Applications*, 2. Taylor and Francis Ltd, London, UK, 131-152.
- Kubicek, C. P.-Mach, R. L.-Peterbauer, C. K.-Lorito, M. (2001): *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J Plant Pathol*, 83. 11-23.
- Lorito, M.-Farkas, V.-Rebuffat, S.-Bodo, B.-Kubicek, C. P. (1996): Cell-wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol*, 178. 6382-6385.
- Mach, R. L.-Peterbauer, C. K.-Payer, K.-Jaksits, S.-Woo, S. L.-Zeilinger, S.-Kulling, C. M.-Kubicek, C. P. (1999): Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviridae* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl Environ Microbiol*, 65. 1858-1863.
- Rebuffat, S.-Goulard, C.-Bodo, B.-Roquebert, M. F. (1999): The peptaibol antibiotics from *Trichoderma* soil fungi; structural diversity and membrane properties. *Recent Res. Devel. Org. Biog.*, 3. 65-91.
- Seiboth, B.-Karaffa, L.-Sándor, E.-Kubicek, C. P. (2002): The *Hypocrea jecorina gal10* (UDP-glucose 4-epimerase-encoding) gene differs from yeast homologues in sequence, genomic organization and expression. *Gene*, 295. 143-149.
- Wiest, A.-Grzegorski, D.-Xu, B. W.-Goulard, C.-Rebuffat, S.-Ebbole, D. J.-Bodo, B.-Kenerley, C. (2002): Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of peptaibol synthetase. *J Biol Chem*, 277. 20862-20868.