

TRICHODERMA ENDOKITINÁZ GÉN FELHASZNÁLÁSA SZÜRKEPENÉSZ-ELLENÁLLÓSÁG KIALAKÍTÁSÁRA

Kálai Katalin¹, Giczey Gábor¹, Mészáros Annamária^{1,3}, Dénes Ferenc² és Balázs Ervin^{1,3}

¹Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4.

²Fertődi Gyümölcsstermesztési Kutató-Fejlesztő Intézet Kht. 9435 Sarród, Kossuth u. 57.

³MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, 2462 Martonvásár, Brunszvik u. 2.

Az antagonista hatásáról ismert *Trichoderma hamatum* 42 kDa-os endokitinázát kódoló gént transzformáltuk dohánynövényekbe. A kitinázok a gombák sejtfalában található kitint hidrolizálják, így a transzgenikus vonalaknál megnövekedett toleranciát vártunk a gombás betegségekkel szemben. A szelektív táptalajon nőtt növények morfológiailag és élettanilag nem különböztek a vad típusú növényektől. PCR tesztek bizonyították, hogy a felnevelt és vizsgált növények tartalmazták a *Trichoderma hamatum* endokitinázgénjét. Az ellenőrzött körülmények között történő szürkepenész-fertőzések során megállapítottuk, hogy a transzgenikus vonalak különböző mértékű, de nagyobb toleranciát mutatnak a gombával szemben, mint a vad típusú növények. A vizsgált gén a második és harmadik utódnemzedékből is kimutatható volt.

A gombák által okozott betegségek jelentős termés kiesést okoznak, az ellenük való védekezés során kijuttatott vegyszerek pedig erősen terhelik a környezetet. A rezisztens vagy toleráns fajták termesztésével csökkenteni lehetne a károkat. Hagyományos nemesítés során nehéz ilyen fajtákat előállítani, de a biotechnológiai módszerek alkalmazásával már jó néhány sikeres kísérletet hajtottak végre. Az egyik legígéretesebb módszer, amikor olyan géneket fejeztetnek ki a növényben, amelynek a terméke vagy toxikus a kórokozó számára, vagy csökkenti annak növekedését. Ilyenek a hidrolitikus enzimek (kitinázok, glükánázok), gombák ellen ható fehérjék, antimikrobiális peptidek és a fitoalexinek termeléséért felelős gének (Punja és mtsai 2001).

Több sikeres kísérletről számoltak be azokban az esetekben, amelyek során hidrolitikus enzimek génjeit fejezték ki a növényekben. A hidrolitikus enzimek nagyon fontos szerepet játszanak a gombák elleni védekezésben, mert hidrolizálják a kitint, amely fontos alkotója nagyon sok növénykórokozó gomba sejtfalának. Többféle élőlény termel kitináz enzimet, de kü-

lönböző minőségben és mennyiségben. A következő kísérletek során értek el megnövekedett rezisztenciát a gombás betegségekkel szemben: rizs-kitinázgént fejezték ki krizantémában (Takatsu és mtsai 1999) és szőlőben (Yamamoto és mtsai 2000); baculovírus-kitinázgént dohányban (Shi és mtsai 2000); vad paradicsom kitinázgénjét termesztett paradicsomban (Tabaizadeh és mtsai 1999).

A legígéretesebb eredményeket akkor érték el, amikor *Trichoderma* fajok kitinázgénjeivel dolgoztak. A *Trichoderma* nemzetségébe tartozó gombák a biológiai növényvédelemben is ismertek. Az egyik legelső közlemény, amelyben a *Trichoderma*-indukált rezisztenciáról írtak, azt mutatta be, hogy a *Trichoderma harzianum* gátolta a *Botrytis cinerea* csírázását babnövényeken (Zimand és mtsai 1996). Ebben a kísérletben közvetlenül használták fel a gombát, Lorito és mtsai (1998) azonban már úgy alakították ki rezisztenciát dohányban és burgonyában, hogy a *Trichoderma harzianum* endokitináz génjét fejezték ki a növényekben. Hasonló vizsgálatokat végeztek Bolar és mtsai (2001), Faize és mtsai (2003), Kikkert és mtsai

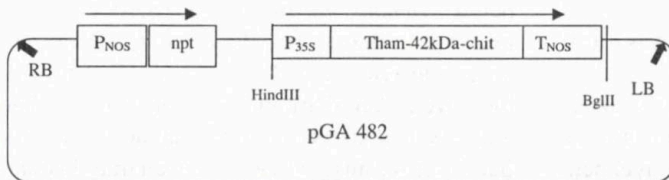
(1998), akik szintén *Trichoderma harzianum*-ból származó endokitináz segítségével idéztek elő rezisztenciát almában és szőlőben.

A biológiai növényvédelemben azonban nemcsak a *Trichoderma harzianum* használható. Hazai kutatások során más *Trichoderma* fajokat is vizsgáltak. Fekete és mtsai (1996) a *Trichoderma hamatum* endokitinázgénjét klónozták. Ezt a munkát Giczey és mtsai folytatták (1998), akik megnövelték a gén kópiaszámát a gombában, ezáltal annak kitinázaktivitása is megnövekedett. Úgy gondoltuk, hogy ennek a gennek a növényekben való kifejezése megnöveli a növény kitinázaktivitását, ezáltal toleranciát, esetleg rezisztenciát idézhetünk elő a transzgenikus vonalakban.

Mielőtt gazdaságilag fontos növények transzformálásába kezdtünk volna, egy modellnövényen, a dohányon teszteltük a rendszer alkalmazhatóságát.

Anyag és módszer

A transzformációhoz használt konstrukció alapját a pGA 482 jelű plazmid képezte, amelybe a *Trichoderma hamatum* 42 kDa-os endokitinázát kódoló gént építettük be a karfiol mozaik vírus 35 S promóterének és a nopalin szintáz gén terminátor régiójának irányítása alatt. A konstrukció kanamycin-rezisztenciát hordoz (1. ábra), így a növények szelektív táptalajon tartva egyszerűen szelektálhatóak. A transzformációhoz a C58C1 jelű *Agrobacterium tumefaciens* törzset használtuk. *Nicotiana tabacum* 'Xanthi' dohányfajtát használtuk a kísérletekben, a transzformációt Horsch és mtsai (1985)



1. ábra. Transzformációs vektor: RB, LB: T-DNS határszekvenciák; P_{NOS}: nopalin szintáz promóter; npt: kanamycin rezisztenciáért felelős neomycin foszfortranszferáz-gén; P_{35S}: karfiol mozaik vírus 35S promótere; Tham-42kDa-chit: a *Trichoderma hamatum* 42 kDa-os endokitinázát kódoló gén; T_{NOS}: nopalin szintáz terminátor

munkája alapján végeztük. A transzformánsokból magot fogtunk, és az utódnemzedékeket is vizsgáltuk.

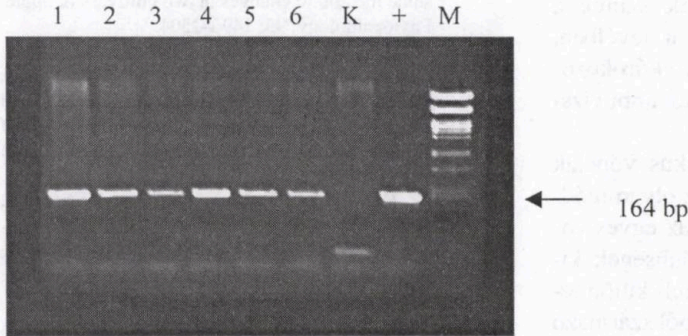
A szelektív táptalajon nőtt növényeket polimeráz láncreakcióval (PCR) teszteltük, hogy megbizonyosodjunk arról, tartalmazzák-e a *Trichoderma hamatum* endokitinázgénjét. A gén egy 164 bp-os darabját felismerő primerpárt használtunk a vizsgálatokhoz. A felszaporított DNS-szakasz nukleotidsorrendjét meghatároztuk, és az ismert adatbázisokkal hasonlítottuk össze.

A fertőzési kísérletekhez olyan *Botrytis cinerea* törzset használtunk, amelyet fertőzött málnanövényről, szabadföldről gyűjtöttünk be, és burgonya-dextróz-agaron tartottunk fenn. A fertőzés különböző módszerekkel, független kísérletek során, 2 ismétlésben történt: (1) az előzetesen túvel megsebzett levelekre gombamicéliumot tartalmazó agarkorongokat helyeztünk (1 korong/levél, 3 korong/növény), (2) a gomba szkleróciúmat a növények talajára helyeztük, vagy (3) a sporuláló gomba táptalajáról steril desztillált vízzel lemosott spóraszuspenziót permeteztünk a növényekre. Mindhárom esetben nagyon fontos körülmény volt a nagy páratartalom, illetve a 20 °C alatti hőmérséklet. Az első esetben a léziók nagyságát hasonlítottuk össze 2 nappal a fertőzés után, a másik két fertőzési mód során a fertőzöttség százalékát határoztuk meg a növény egészéhez viszonyítva, 2 héttel a fertőzés után. Kontrollként transzformálatlan növényeket használtunk.

Eredmények és következtetések

A szelektív táptalajon nőtt növényeket PCR-rel vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy a *Trichoderma hamatum* endokitinázgénje stabilan beépült a növényekbe (2. ábra). A gént a 2. és 3. utódnemzedékben is kimutattuk.

Annak ellenére, hogy a felszaporított nukleotidszakasz nem volt megtalálható a transzformálatlan kontrollnövényben, mindenképpen szerettünk volna



2. ábra. A PCR vizsgálat eredménye. 1–6. oszlop: az egyes transzgenikus vonalak; 7. oszlop (K): transzformálatlan kontroll; 8. oszlop (+): plazmid kontroll; 9. oszlop: marker

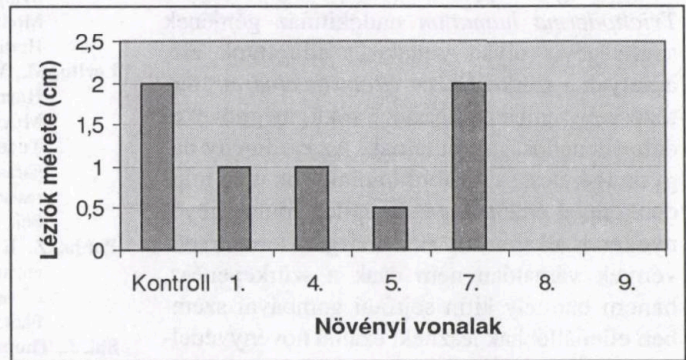
megbizonyosodni arról, hogy nem egy növényi eredetű kitinázgént szaporítottunk fel a reakció során. Ezért a szakaszt szekvenáltuk, és a kapott eredményt összehasonlítottuk az adatbázisokban található szekvenciákkal. Megállapítottuk, hogy a fragmentum 100%-os homológiát mutat a *Trichoderma hamatum* endokitinázgénjének adatbázisban található szekvenciáival, de nem mutat homológiát növényi eredetű kitinázgénekkel.

A transzgenikus vonalakat *Botrytis cinerea*-val fertőztük. Az első fertőzési mód esetén – amikor gombamicéliummal átszőtt agarkorongokat helyeztünk a levelekre – megállapíthattuk, hogy a kontrollhoz képest kisebb léziók voltak megfigyelhetők a transzformáns növényeken, kivéve a 7. vonalat, amelyen a kontrollhoz hasonló tüneteket figyeltünk meg. A 8. és 9. vonal esetében nem alakultak ki tünetek (3. ábra).

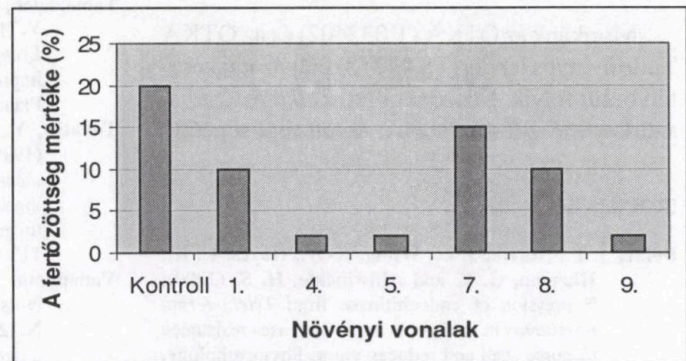
A spóraszuspenzióval permetezett növényeken keletkezett tüneteket 2 héttel a fertőzés után vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a 7. vonal itt is a legerősebb tüneteket mutatta, a többi esetében a fertőzöttség szintje

alacsonyabb volt, mint a kontrollnövényé (4. ábra). Mindkét fertőzés során a 9. vonalnál lehetett a legenyhébb tüneteket megfigyelni.

Érdekes megfigyelést tettünk abban a kísérletben, amelyben a gomba szkleróciómát helyeztük a növény talajára. Abban az esetben, ha a gomba a növény szárát támadta meg, a növény elpusztult, függetlenül attól, hogy transzgenikus volt-e vagy sem. Ha azonban a növény levelét fertőzte meg, a 4. ábrán látható mértékben fertőzöttek a növények. Ebből arra következtettünk,



3. ábra. A szürkepenész által okozott léziók nagysága a növények levelén 2 nappal a fertőzés után, az (1) jelű fertőzési kísérlet során. Az értékek az egyes vonalakon belül mért értékek átlagát mutatják



4. ábra. A *Botrytis cinerea*-fertőzés hatása a spóraszuspenzióval permetezett dohány-növényekre, 2 héttel a fertőzés után. Az értékek a fertőzött részek százalékos arányát mutatják az egészhez viszonyítva

hogy a kitinázgén kifejeződésének szintje a szárban jóval alacsonyabb, mint a levélben, ezért ott nem tud védelmet nyújtani a kórokozóval szemben. Ezt a hipotézist még további vizsgálatokkal kell megerősíteni.

Folyamatban van a transzgenikus vonalak kitinázszintjének vizsgálata. Ehhez olyan módszert kell kidolgoznunk, amellyel az egyes vonalak közötti kitinázaktivitás-különbségek kimutathatóak. A módszer során el kell különítenünk a növényi eredetű és a gombából származó kitináz enzimeket is.

Növelnünk kell továbbá a kitinázgén kifejeződését a szárban, hiszen sok növényen a szürkepenész éppen a növény szárán okozza a legveszélyesebb fertőzést. Ezt specifikus promóterek alkalmazásával érhetjük el.

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a *Trichoderma hamatum* endokitináz génjének segítségével olyan vonalakat állítottunk elő, amelyek a szürkepenész- (*Botrytis cinerea*) fertőzéssel szemben különböző fokú, megnövekedett ellenállóságot mutatnak. Az eredmény nagyon ígéretes, és további finomítások után mindenképpen érdemes gazdaságilag fontos növényeken is alkalmazni. A kitinázgént termelő növények várhatóan nem csak a szürkepenész, hanem bármely kitin sejtfalú gombával szemben ellenállóbbak lesznek, ezáltal növényvédelmük környezetkímélőbbé válhat, hiszen természetük során kevesebb vegyszert kell használni.

Köszönetnyilvánítás

Munkánk az OTKA (T 032402) és az OTKA Tudományos Iskola (TS 44778) pályázatai keretén belül folyik. Köszönet illeti *Zalka Andreát* a szürkepenész-fertőzésben nyújtott segítségéért.

IRODALOM

Bolar, J. P., Norelli, J. L., Wong, K.-W., Hayes, C. K., Harman, G. E. and Aldwinckle, H. S. (2000): Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology*, 90: 72–77.

Faize, M., Malnoy, M., Dupuis, F., Chevalier, L., Parisi, L. and Chevreau, E. (2003): Chitinases of *Trichoderma atroviride* induce scab resistance and

some metabolic changes in two cultivars of apple. *Phytopathology*, 93: 1496–1504.

Fekete, Cs., Weszely, T. and Hornok, L. (1996): Assignment of a PCR-amplified chitinase sequence cloned from *Trichoderma hamatum* to resolved chromosomes of potential biocontrol species of *Trichoderma*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 145: 386–391.

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

Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. I., Eicholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229–1231.

Kikkert, J. R., Ali, G. S., Wallace, P. G., Reisch, B. and Reustle, G. M. (1998): Expression of a fungal chitinase in *Vitis vinifera* L. 'Merlot' and 'Chardonnay' plants produced by biolistic transformation. Proceedings of the VIIth International Symposium on Grapevine Breeding and Genetics, Montpellier, France, July 6–10, 1998, Acta Horticulturae

Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S. and Scala, F. (1998): Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 7860–7865.

Punja, Z. K. (2001): Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. *Can. J. Plant Pathol.*, 23: 216–235.

Shi, J., Thomas, C. J., King, L. A., Hawes, C. A., Possee, R. D., Edwards, M. L., Palett, D. and Cooper, J. I. (2000): The expression of baculovirus-derived chitinase gene increased resistance of tobacco cultivars to brown spot (*Alternaria alternata*) *Ann. Appl. Biol.*, 136: 1–8.

Tabaizadeh, Z., Agharbaoui, Z., Harrak, H. and Poysa, V. (1999): Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. *Plant Cell Rep.*, 19 (2): 197–202.

Takatsu, Y., Nishizawa, Y., Hibi, T. and Akatsu, K. (1999): Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to grey mold (*Botrytis cinerea*). *Sci. Hort.*, 82: 113–123.

Yamamoto, T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, T. and Matsuta, N. (2000): Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.*, 19 (7): 639–646.

Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I. (1996): Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology*, 86: 1255–1260.

TRICHODERMA ENDOCHITINASE GENE AS A TOOL FOR OBTAINING GREY MOULD RESISTANCE

Katalin Kálai¹, G. Giczey¹, A. Mészáros^{1,3}, F. Dénes² and E. Balázs^{1,3}

¹ Agricultural Biotechnology Center, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4. Hungary

² Fertőd Research Institute for Fruit Growing, 9435 Sarród, Kossuth u. 57. Hungary

³ Agricultural Research Institute, Hungarian Academy of Sciences, 2462 Martonvásár, Brunsvik u. 2. Hungary

Trichoderma species are known to have strong antifungal effect caused by their extracellular chitinase enzymes, which hydrolyse the chitin, an important constituent of the fungal cell wall. The 42 kDa endochitinase gene of *Trichoderma hamatum* was introduced to *Nicotiana tabacum* plants by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. The transformed plantlets grown on selective medium showed no morphological or physiological difference as compared to the wild type plants. They all were positive in PCR tests performed to screen a 164 bp sequence of the *Trichoderma* endochitinase gene. The sequence of the amplified fragment was analysed and showed 100% homology with the *Trichoderma hamatum* endochitinase gene. We did not detect homology with plant origin chitinase enzymes. Compared to the untransformed control, all transgenic lines showed higher tolerance to *Botrytis cinerea* in fungal infection experiments, although differences between the lines could be detected. Several further experiments should be done, but it can be stated that this gene could be used to induce fungal resistance in commercially important plants too.

Érkezett: 2004. december 15.

Ösztöndíj tudományos kutatásért

Kiíró: Széchenyi István Ösztöndíj Alapítvány

Pályázhatnak: A műszaki, gazdasági, orvosi, agrár- és természettudományok területén kiemelkedő teljesítményt nyújtó fiatal kutatók, szakemberek

Beadási határidő: minden év január elsejétől augusztus 31-éig, folyamatosan

A Széchenyi István ösztöndíj Alapítvány pályázata

Az alapítvány 1–12 hónapos külföldi ösztöndíjat ad a műszaki, gazdasági, orvosi, agrár- és természettudományok területén kiemelkedő teljesítményt nyújtó fiatal kutatóknak, szakembereknek. Az elbíráláskor előnyben részesülnek azok, akiknek tudományos fokozatuk van.

Pályázni minden év január elsejétől augusztus 31-éig, folyamatosan lehet. Az évente egyszer beérkező pályázatokról a kuratórium októberi ülésén dönt.

A kitöltendő pályázati ívet – részletes pályázati feltételekkel és tájékoztatóval együtt – a jelentkezők a Széchenyi István Ösztöndíj Alapítvány Titkárságától postán vagy személyesen igényelhetik a következő címen:

1051 Budapest, Nádor u. 18. MTA KSZI. Tel.: 312-3022