

5

10

Szczepy *Trichoderma*, sposób otrzymywania i zastosowanie tych szczepów jako środków biobójczych.

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy *Trichoderma* spp. o aktywności biobójczej, zwłaszcza mykopasożytniczej (przeciwrzybowej) oraz sposób otrzymywania tych szczepów a także ich zastosowanie jako środków biobójczych, zwłaszcza przeciwrzybowych. W szczególności szczepy według wynalazku mają zastosowanie w rolnictwie jako biofungicydy. Przedmiotem wynalazku jest także kompozycja biobójcza do biologicznego zwalczania niepożądanych organizmów.

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* wykazują naturalne właściwości przeciwrzybowe. Wiele z nich pasożytuje na grzybach patogennych dla roślin. W wyniku zastosowania metod inżynierii genetycznej opisanych dalej uzyskano przeciwrzybowe nowe szczepy *Trichoderma* o wyjątkowych właściwościach przeciwrzybowych. Znane są również grzyby z rodzaju *Trichoderma* o naturalnych właściwościach owadobójczych. Na przykład zmodyfikowane metodami inżynierii genetycznej szczepy *Trichoderma asperellum* mające wyjątkowe właściwości owadobójcze również są objęte wynalazkiem

Trichoderma konstytutywnie wydziela do środowiska niewielkie ilości enzymów hydrolitycznych. Gdy w środowisku wzrostu *Trichoderma* pojawi się inny grzyb, lub owad, posiadający w ścianie komórkowej polimery cukrowe mogą stać się one substratem dla enzymów hydrolitycznych wydzielanych przez *Trichoderma*. Ponadto uważa się, *Trichoderma* wydziela konstytutywnie niewielką ilość egzochitynaz, które natrafiając na ścianę komórkową innego grzyba lub owada odtrawiają cukry od chityny co staje się

sygnałem do wzmożonej ekspresji trichodermowych genów kodujących hydrolazy takie jak chitynazy, glukanazy i proteazy, przy czym rodzaj wydzielanych enzymów hydrolitycznych jest zależny od obiektu ataku. W konsekwencji zachodzi hydroliza polimerów ściany obcego grzyba lub owada i dochodzi do jego unicestwienia. W ten sposób *Trichoderma* atakuje wiele grzybów patogennych dla roślin albo owadów pozostając jednocześnie w symbiozie z rośliną.

W stanie techniki opisano wykorzystanie właściwości *Trichoderma* do kontrolowania niepożądanych grzybów niszczących produkcję rolniczą z wykorzystaniem nadekspresji genów kodujących poszczególne enzymy hydrolityczne. W zgłoszeniu patentowym P393021 przedstawiono sposób aktywacji właściwości biokontrolnych *Trichoderma*, zwłaszcza szczepu biokontrolnego *T. atroviride* poprzez uaktywnienie procesu O-glikozylacji, pozornie niezwiązanego z wydzielaniem białek sekrecyjnych. Rozwiązanie opisane w zgłoszeniu P393021 oparto na związku między procesem O-glikozylacji i sekrecją enzymów hydrolitycznych (Kruszewska i wsp. 1999).

Hydrolazy wydzielane przez *Trichoderma* stanowią ważny element ataku *Trichoderma* na grzyby patogene dla roślin. Hydrolazy są glikoproteinami i wydajność ich glikozylacji wpływa na ich wydajną produkcję i wydzielanie. Poprzez zwiększenie aktywności syntazy dolichylo fosfo mannozy (DPM), kluczowego enzymu procesu O-glikozylacji uzyskano bardziej wydajną, szybszą glikozylację hydrolaz i co za tym idzie zwiększone wydzielanie tych enzymów co spowodowało aktywniejsze trawienie ścian komórkowych organizmu patogennego uzyskując lepsze właściwości biokontrolne.

Wiele roślin użytkowych i ozdobnych co roku ulega uszkodzeniu przez zakażenia grzybowe oraz inne organizmy patogene. Zakażenia te zwalcza się przy pomocy fungicydów i pestycydów chemicznych, i co za tym idzie wprowadza się do środowiska związki chemiczne. Tego można uniknąć lub ograniczyć stosując rozwiązanie według wynalazku.

Zakażenia *Fusarium*, *Pythium*, *Botritis cinerea* *Phytophthora infestans* są jednymi z bardziej rozpowszechnionych i prowadzących do całkowitego zamierania roślin. Celem ataku tych grzybów są warzywa, owoce, rośliny ozdobne, drzewa i krzewy. Obok związków chemicznych służących do ochrony roślin można wspomagająco stosować

zabiegi biokontrolne. Stwierdzono, że dzięki jednoczesnemu zastosowaniu preparatów na bazie *Trichoderma* i tradycyjnych fungicydów można ograniczyć ilość tych drugich nawet o ponad 20%.

Zatem nadal istnieje potrzeba opracowania nowych, bardziej skutecznych, sposobów biologicznej kontroli przeciwgrzybowej upraw i plonów a także biofungicydów, które byłyby nieszkodliwe dla środowiska.

Ponadto nieoczekiwanie stwierdzono, że dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku nie tylko opracowano nowy, bardziej skuteczny sposób biokontroli upraw i plonów, ale również uzyskano lepszy wzrost roślin. Niespodziewanie stwierdzono także, że szczep *Trichoderma asperellum* zmodyfikowany według wynalazku, może mieć zastosowanie jako środek owadobójczy, również jednocześnie poprawiający wzrost roślin.

Zgodnie z wynalazkiem przedstawiono nowy sposób otrzymania szczepów *Trichoderma* o lepszych właściwościach przeciwgrzybowych i biokontrolnych. Sposób ten opiera się na zwiększeniu syntezy produktów szlaku mewalonowego.

Przedmiotem wynalazku jest zmutowany szczep *Trichoderma spp.* zawierający dodatkowo rekombinowaną cząsteczkę DNA obejmującą gen *ERG20* kodujący syntazę pirofosforanu farnezyli. Korzystnie *Trichoderma* jest *Trichoderma atroviride*. Korzystnie gen kodujący syntazę pirofosforanu farnezyli pochodzi z *Saccharomyces cerevisiae* i gen kodujący koduje syntazę pirofosforanu farnezyli o sekwencji nukleotydowej nr 2. Sekwencja aminokwasowa kodowana przez sekwencję nukleotydową nr 1 ma co najmniej 50%, co najmniej 55%, co najmniej 60%, co najmniej 65%, co najmniej 70%, co najmniej 75%, co najmniej 80%, co najmniej 85%, co najmniej 90%, co najmniej 95%, lub 100% identyczności z sekwencją nr 2. W korzystnym rozwiązaniu gen *ERG20* z *S. cerevisiae* jest zintegrowany z genomem *Trichoderma*. Korzystnie, gen *ERG20* jest zintegrowany z genomem i szczep wykazuje nadekspresję tego enzymu.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób otrzymywania szczepu transgenicznego *Trichoderma* według wynalazku, w którym wyodrębnia się DNA kodujący syntazę pirofosforanu farnezyli, następnie transformuje się szczep *Trichoderma* uzyskanym genem po czym uzyskuje się nadekspresję syntazy pirofosforanu farnezyli w otrzymanym szczepie transgenicznym.

Korzystnie prowadzi się do integracji rekombinowanego DNA kodującego syntazę pirofosforanu farnezyli z genomem *Trichoderma*.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób zwalczania niepożądanych organizmów w którym stosuje się szczep *Trichoderma* z nadeskpresją DNA kodującego syntazę pirofosforanu farnezyli. Korzystnie w sposobie według wynalazku stosuje się 5 szczep *Trichoderma atroviride* w którym występuje nadeskpresja heterologicznego DNA kodującego syntazę pirofosforanu farnezyli z *Saccharomyces cerevisiae*. Korzystniej zwalcza się choroby grzybowe roślin i plonów. Szczególnie korzystnie zwalcza się *Pythium ultimum*.

10 W innej odmianie przedmiotem wynalazku jest sposób zwiększania wzrostu rośliny i/lub wydajności plonów, w którym stosuje się szczep *Trichoderma* według wynalazku, z nadeskpresją DNA kodującego syntazę pirofosforanu farnezyli.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto kompozycja biobójcza, która zawiera szczep *Trichoderma* według wynalazku z nadeskpresją DNA kodującego syntazę pirofosforanu farnezyli. Co więcej, przedmiotem wynalazku jest kompozycja do zwiększania plonów, 15 która zawiera szczep *Trichoderma* określony w dowolnym z zastrz. 1-8, w którym występuje nadeskpresja DNA kodującego syntazę pirofosforanu farnezyli.

Szczegółowy opis wynalazku

W szlaku mewalonowym wykorzystywanym przez szczepy według wynalazku 20 produkowany jest między innymi dolichol, który w formie ufosforylowanej bierze udział w procesach glikozylacji a także ergosterol związek wchodzący w skład błon komórkowych i pęcherzyków sekrecyjnych co jest istotne z punktu widzenia sekrecji białek. Ponadto w szlaku mewalonowym produkowane są związki terpenowe o działaniu bakterio- i grzybobójczym takie jak trichodermin, harzianum A, mycotoxin T2, lignoren, 25 ergokonin A i B czy viridin (Sivasithamparam i Ghisalberti 1998).

Substratem dla powstania wszystkich tych związków w szlaku mewalonowym jest pirofosforan farnezyli (FPP), który jest syntetyzowany przy udziale enzymu syntazy pirofosforanu farnezyli kodowanej przez gen *ERG20*. Enzym ten ma dwie aktywności: katalizuje reakcję pirofosforanu dimetyloallilu (5-węglowy) z pirofosforanem izopentenylu 30 (5-węglowy) prowadzącą do powstania pirofosforan geranyli a następnie przeniesienia

następnej cząsteczki pirofosforanu izopentenylu na pirofosforan geranylu z utworzeniem pirofosforanu farnezyłu (15-węglowy). Pirofosforan farnezyłu jest substratem dla wszystkich odnóg szlaku mewalonowego.

Zgodnie z wynalazkiem zwiększenie aktywności przeciwgrzybowej i biokontrolnej *Trichoderma atroviride* polega na zwiększeniu aktywności syntazy pirofosforany farnezyłu. Zwiększenie aktywności syntazy pirofosforany farnezyłu osiąga się poprzez nadekspresję w *Trichoderma atroviride* P1 drożdżowego genu *ERG20* kodującego ten enzym. Gen *ERG20* jest zintegrowany z genomem *T. atroviride* w sposób przypadkowy przy użyciu metody transformacji.

W sposobie według wynalazku, korzystnie, przed wprowadzeniem do genomu *Trichoderma*, gen *ERG20* z *Saccharomyces cerevisiae* powiela się metodą PCR stosując starter ERGBam-U o sekwencji: CGGGATCCATGGCTTCAGAA i starter ERGBam-L o sekwencji: CGGGATCCCTATTTGCTTCTC

Zastosowana metoda PCR umożliwia uzyskanie odpowiednich końców w powielanym fragmencie DNA, dzięki czemu można go wklonować w konkretne miejsce w plazmidzie. Gen klonuje się pod promotor *gpdA* (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) i terminator *trpC* (syntaza fosforanu indolo-3-glicelolowego) do plazmidu pAN521N. Wybrany promotor i terminator, korzystnie, pochodzi z grzybów nitkowatych, zwłaszcza *Aspergillus* czyli z grzyba nitkowatego blisko spokrewnionego z *Trichoderma*. Aby uzyskać wymaganą ekspresję genu klonuje się go pod promotor rozpoznawany przez komórki gospodarza. Grzyby nitkowate są pod tym względem bardzo elastyczne i są w stanie rozpoznać również promotory np. drożdżowe.

Korzystnie, plazmid pAN521N przecina się enzymem restrykcyjnym BamHI, wkleja wstawkę *ERG20* (produkt PCR) stosując ligazę T_4 a następnie przecina konstrukt enzymem NcoI, uzyskuje tępe końce działając nukleazą Mung Bean lub nukleazą S1 i dokonuje samoligacji. W sposobie według wynalazku do transformacji *T. atroviride*, korzystnie, stosuje się metodę kotransformacji mieszanką plazmidów: plazmidem pAN521N niosącym gen *ERG20* oraz plazmidem pRMLex_30 niosącym gen oporności na higromycynę B.

Zastosowanie plazmidu pAN521N determinuje użycie enzymu BamHI do cięcia w

miejscu gdzie gen zostanie wklonowany. Powstałe dodatkowe miejsce ATG musimy usunąć tnąc plazmid enzymem NcoI i usuwając wolny koniec przy pomocy nukleazy Mung Bean lub nukleazy S1.

Do otrzymania transformantów użyto metody kotransformacji polegającej na
 5 użyciu do transformacji mieszaniny dwóch plazmidów, plazmidu zawierającego gen, którego nadekspresję chcemy uzyskać i plazmidu helperowego zawierającego gen markerowy. W tym przypadku korzystnie, pierwszy plazmid zawiera gen *ERG20*, a drugi gen oporności na Higromycynę B. Plazmidy, korzystnie, stosuje się w stosunku ilościowym 10-15:1 odpowiednio pierwszego plazmidu:plazmidu helperowego.

10 Ponieważ stosowanie mieszaniny plazmidów do transformacji ułatwia wchodzenie DNA do komórki grzybów nitkowatych. Transformację, korzystnie, wykonuje się w ten sposób, że transformanty selekcjonuje się na pożywkach z Higromycyną B i 0.1% Tritonem X-100. Pożywka powinna zawierać higromycynę B gdyż poszukiwane są transformanty, które nie są na nią wrażliwe i wyrosną na zawierającej ją pożywce. Triton
 15 X-100 jest natomiast związkiem zapobiegającym rozchodzeniu się kolonii grzyba po całej płytce co umożliwia wyselekcjonowanie pojedynczych transformantów.

Wśród transformantów opornych na higromycynę B wyszukuje się tych z genem *ERG20*. W tym celu otrzymuje się DNA z transformantów i na tak przygotowanej matrycy metodą PCR namnaża się fragment DNA stosując startery homologiczne do sekwencji
 20 drożdżowego genu *ERG20*. Następnie produkty PCR poddaje się analizie na żelu agarozowym, prążek o wielkości ok. 1200 par zasad izoluje się z żelu a następnie sekwencjonuje. Wykonuje się również dwie kontrolne reakcje PCR: kontrolę pozytywną wykonuje się na matrycy genomowego DNA z *S.cerevisiae* i kontrolę negatywną na matrycy DNA z rodzicielskiego szczepu *T.atroviride* P1 (szczep nietransformowany).
 25 Sekwencje otrzymane w wyniku sekwencjonowania porównuje się z sekwencją genu *ERG20*.

DNA z transformantów można również analizować metodą Southern blotting lecz taka analiza jest dłuższa i bardziej kosztowna. Wtedy DNA tnie się enzymem restrykcyjnym, korzystnie EcoRI, poddaje elektroforezie na żelu agarozowym, denaturuje,
 30 zobojętnia, przenosi na membranę nylonową i hybrydyzuje z sondą syntetyzowaną na

matrycy z genu *ERG20* (produkt PCR jak wyżej).

Genomowe DNA można ciąć również innymi enzymami restrykcyjnymi, które nie tną wewnątrz genu *ERG20* np. BamHI, ClaI, HpaI, HpaII, NdeI, NotI, PvuI, PvuII, Sall, SmaI, SphI, XbaI.

5 Z transformantów zawierających gen *ERG20* otrzymano również całkowite RNA i metodą Northern blotting stwierdzono, że zawierają one transkrypt *ERG20* czyli, że doszło do ekspresji wprowadzonego genu. Tak otrzymane i sprawdzone transformanty *ERG20* nazwane, SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10 stosuje się do dalszych badań.

10 Wynalazek został zilustrowany na rysunku, na którym

Fig. 1. Przedstawia ciąg reakcji w szlaku mewalonowym; **Fig. 2.** Przedstawia wpływ ekspresji genu *ERG20* kodującego syntazę pirofosforanu farnezyli (FPP) na aktywność enzymu. P1-szczep kontrolny *T.atroviride* P1; 20, 59, 104, 125, 133 – transformanty SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10;

15 **Fig. 3A** Przedstawia wzrost szczepów na płytce zawierającej pożywkę minimalną z karboksymetylocelulozą. P1-szczep kontrolny *T.atroviride* P1; 20, 59, 104, 125, 133 – transformanty SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10;

Fig. 3B Przedstawia wyniki halo wkoła kolonii rosnącej na płytce z pożywką minimalną z karboksymetylocelulozą. P1-szczep kontrolny *T.atroviride* P1; 20, 59, 104, 125, 133 – transformanty SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10;

Fig. 4A Przedstawia aktywność celulaz w pożywce po hodowli grzybów. P1-szczep kontrolny *T.atroviride* P1; 20, 59, 104, 125, 133 – transformanty SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10;

25 **Fig. 4B** Przedstawia aktywność N-acetyl- β -D-glukozaminidazy w pożywce po hodowli grzybów. P1-szczep kontrolny *T.atroviride* P1; 20, 59, 104, 125, 133 – transformanty SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10

Fig. 5 Przedstawia wydzielanie białek do pożywki podczas hodowli grzybów na pożywce z laktozą. P1-szczep kontrolny *T.atroviride* P1; 20, 59, 104, 125, 133 – transformanty SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10;

Fig. 6 Przedstawia wzrost *Pythium ultimum* na płytkach po hodowli *Trichoderma*.

Pythium – wzrost kolonii *P. ultimum* na czystej płytce, P1- wzrost kolonii *P. ultimum* na płytkach na których uprzednio hodowano szczep kontrolny *T. atroviride* P1; 20, 59, 104, 125, 133- wzrost kolonii *P. ultimum* na płytkach na których uprzednio hodowano szczepy transformowane SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10

Fig. 7 Przedstawia wzrost *Rhizoctonia solani* w atmosferze substancji lotnych wydzielanych przez *Trichoderma*. *Rhizoctonia* - *R. solani* hodowana bez *Trichoderma*; P1 - *R. solani* hodowana w atmosferze substancji lotnych wydzielanych przez szczep kontrolny P1; 20, 59, 104, 125, 133 - *R. solani* hodowana w atmosferze substancji lotnych wydzielanych przez transformanty SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10

Fig. 8 Przedstawia wzrost fasoli *Phaseolus vulgaris* L. (var. *nanus* L.) w ziemi zakażonej *Pythium ultimum*. Kontrola pozytywna (kontrola) oznacza hodowlę roślin w ziemi, która nie była zakażona ani *Pythium* ani *Trichoderma*. (Pyth) – kontrola negatywna hodowla w ziemi zakażonej tylko *Pythium ultimum*. Pozostałe słupki pokazują wzrost roślin w ziemi zakażonej *Pythium ultimum* i szczepami *Trichoderma* P1 (szczep kontrolny) i transformantami (SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10) (szare słupki) lub tylko zakażonej szczepami *Trichoderma* (czarne słupki)

Fig. 9 Przedstawia procent wykiełkowanych nasion *Phaseolus vulgaris* L. (var. *nanus* L.) obliczony po 10 dniach wzrostu roślin. Kontrola pozytywna (Kontrola) oznacza hodowlę roślin w ziemi, która nie była zakażona ani *Pythium ultimum* ani *Trichoderma*. (Pyth) – kontrola negatywna - hodowla w ziemi zakażonej tylko *Pythium ultimum*. Pozostałe słupki pokazują wzrost roślin w ziemi zakażonej *Pythium ultimum* i szczepami *Trichoderma* P1 (szczep kontrolny) i transformantami (SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10) (szare słupki) lub tylko zakażonej szczepami *Trichoderma* (czarne słupki)

Fig. 10 Przedstawia wzrost fasoli *Phaseolus vulgaris* L. (var. *nanus* L.) w ziemi zakażonej *Pythium ultimum*. Kontrola pozytywna (kontrola) oznacza hodowlę roślin w ziemi, która nie była zakażona ani *Pythium* ani *Trichoderma*. (Pyth) – kontrola negatywna hodowla w ziemi zakażonej tylko *Pythium ultimum*. Pozostałe słupki pokazują wzrost

roślin w ziemi zakażonej *Pythium ultimum* i szczepami *Trichoderma* P1 (szczep kontrolny) i transformantami PZ/06, PZ6/06 i PZ19/06 przedstawione w zgłoszeniu patentowym P393021

Fig. 11 przedstawia sekwencję nukleotydową i aminokwasową syntazy FPP z *S. cerevisiae*.

Poniżej przedstawiono przykłady wykonania wynalazku.

Przykład I. Gen *ERG20* z *S.cerevisiae* powielano metodą PCR stosując starter ERGBam-U o wzorze CGGGATCCATGGCTTCAGAA i starter ERGBam-L o wzorze CGGGATCCCTATTTGCTTCTC

Metoda PCR łańcuchowa reakcja polimerazy polega na wykorzystaniu oligonukleotydowych starterów zaprojektowanych do obu końców DNA, które będzie się powielać i na zastosowaniu cykli temperaturowych ogrzewania – chłodzenia, podczas których zachodzi łączenie starterów z homologicznym DNA i dobudowanie łańcucha nukleotydowego pomiędzy starterami. Podczas następnych cykli temperaturowych nowo zsyntetyzowane DNA staje się matrycą do dalszej syntezy. Uzyskany w ten sposób gen klonowano pod promotor *gpdA* (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfo glicerynowego) i terminator *trpC* (syntaza fosforanu indolo-3-glicelolowego) do plazmidu pAN521N (Accession number Z32697).

Plazmid pAN521N przecięto enzymem restrykcyjnym BamHI a następnie wligowano wstawkę *ERG20* (produkt PCR) stosując T_4 ligazę (Promega). Następnie plazmid przecięto NcoI, wytępiono końce nukleazą Mung Bean (Promega) i poddano selfligacji. Plazmid użyto do transformacji *T.atroviride* P1. Transformację wykonano według opisu Kubicek-Pranz, E.M., Gruber, F., Kubicek, C.P. (1991) Transformation of *Trichoderma reesei* with the cellobiohydrolase II gene as a means for obtaining strains with increased cellulase production and specific activity. J.Biotechnol. 20, 83-94 i Mach, R.L., Schindler, M., Kubicek, C.P. (1994) Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. Curr. Genet. 25, 567-570. Transformanty selekcjonowano na pożywkach z higromycyną B i 0.1% Tritonem X-100.

Wśród transformantów poszukiwano tych z kopią genu *ERG20*. W tym celu otrzymywano z nich DNA przy użyciu zestawu odczynników „Wizard Genomic DNA

purification kit " firmy Promega. Na matrycy DNA z transformantów, przy użyciu primerów ERGBam-U i ERGBam-L otrzymano fragment DNA, który po elektroforezie na żelu agarozowym, poddano sekwencjonowaniu potwierdzając, że otrzymaliśmy DNA *ERG20* z drożdży. Tak otrzymane transformanty oznaczone SGUL20/10, SGUL59/10,
 5 SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10 użyto do dalszych badań.

Z transformantów niosących kopie genu *ERG20* otrzymano również całkowite RNA i kropelkową metodą Northern blotting stwierdzono, że zawierają one transkrypt *ERG20* czyli, że doszło do ekspresji wprowadzonego genu. Tak otrzymane i sprawdzone transformanty *ERG20* nazwane SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i
 10 SGUL133/10 stosowano do dalszych badań.

Dokonana sposobem według wynalazku nadekspresja genu *ERG20* spowodowała wzrost aktywności syntazy FPP w komórkach *T.atroviride* (Fig. 2). Fig. 2 pokazuje, że nadekspresja genu *ERG20* spowodowała podniesienie aktywności syntazy FPP we frakcjach rozpuszczalnych wszystkich szczepów dochodząc do około 100 % wzrostu w
 15 szczepie SGUL104 (104) i SGUL125 (125).

Przykład II. Celem rozstrzygnięcia czy transformanty aktywniej hydrolizują polisacharydy, a więc wydzielają więcej hydrolaz lub wydzielane hydrolazy są bardziej aktywne, transformanty poddano wstępnej analizie na pożywkach zawierających złożone źródło węgla karboksymetylocelulozę. Szczepy posiano na środek płytek i każdego dnia
 20 mierzono przyrost grzybni. Wyniki pomiarów pokazane na wykresie 3A, potwierdzają wzrost grzybów na podłożach zawierających złożone źródła węgla oraz że transformanty rosną intensywniej niż szczep rodzicielski (nietransformowany) co sugeruje, że wydzielają więcej hydrolaz lub hydrolazy o podwyższonej aktywności.

Zmierzono również halo powstałe wokół kolonii grzybów rosnących na płytce z karboksymetylocelulozą. Wielkość halo świadczy o hydrolizie substratu wkoło kolonii. Czym więcej hydrolaz wydziela grzyb tym większe halo wkoło kolonii (Fig. 3B).
 25

Przykład III. W celu stwierdzenia, czy transformanty wydzielają więcej celulaz czy bardziej aktywne enzymy, oznaczono aktywność celulolityczną w pożywce w czasie hodowli. Wyniki przedstawiono na wykresie 4 A. Zbadano również aktywność N-acetyl-β-D-glukozaminidazy (Fig. 4B) obrazującej chitynolityczną aktywność wydzielanych
 30

hydrolaz. Aktywność celulaz jak i N-acetyl- β -D-glukozaminidazy w pożywce po hodowli transformantów (SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10) i szczepu kontrolnego (P1) oznaczano w różnych okresach wzrostu grzybów. Stwierdzono, że celulazy i N-acetyl- β -D-glukozaminidaza wydzielane przez transformanty wykazują

5 wyższą aktywność niż te wydzielane przez szczep dziki P1. Szczepy *Trichoderma* o wysokiej aktywności chitynolitycznej mogą być stosowane jako bioinsektycydy przeciwko owadom niszczącym plony. Ponieważ zewnętrzny szkielet owadów (kutikula) jest zbudowany w dużej części z chityny hydroliza chityny może zwiększać skuteczność działania bioinsektycydu.

10 **Przykład IV.** Oznaczono również ilość białka wydzielanego do pożywki przez transformanty i szczep kontrolny. Wyniki wydzielania białka przez transformanty (SGUL20/10, SGUL59/10, SGUL104/10, SGUL125/10 i SGUL133/10) i szczep kontrolny (P1) do pożywki w czasie hodowli przedstawiono na wykresie 5. Na tej podstawie stwierdzono, że ilość wydzielanych białek przez transformanty jest nawet 29% wyższa w

15 porównaniu ze szczepem kontrolnym P1.

Przykład V. Sprawdzone, jak wpływają na grzyby patogenne związki wydzielane przez *Trichoderma*. W tym celu *Trichoderma* była hodowana na płytkach pokrytych folią celulozową a następnie po zdjęciu folii na tych samych płytkach hodowano *Pythium ultimum*. Wzrost *Pythium* był poważnie zahamowany przez metabolity wydzielane przez

20 wszystkie szczepy lecz dużo większe hamowanie obserwowane na płytkach na których uprzednio rosły transformanty (Fig. 6).

Przykład VI. W szlaku mewalonowym powstaje wiele lotnych związków o działaniu przeciwgrzybowym. Hodowano więc patogen roślinny *Rhizoctonia solani* w atmosferze substancji lotnych wydzielanych przez szczep kontrolny P1 i transformanty. Stwierdzono

25 zwiększone właściwości przeciwgrzybowe związków wydzielanych przez transformanty co spowodowało większe zahamowanie wzrostu patogena Fig. 7.

Przykład VII Na koniec sprawdzono właściwości biokontrolne otrzymanych szczepów w stosunku do patogena roślin *Pythium ultimum*. Doświadczenie wykonano na fasoli *Phaseolus vulgaris* L. (var. *nanus* L.). Sterylna ziemia była mieszana z grzybnią

30 *Pythium ultimum* i z grzybnią *Trichoderma* po 2.g grzybni /1l ziemi. Do tak przygotowanej

ziemi wsadzano nasiona fasoli. Po 10 dniach dokonano pomiaru wzrostu roślin (Fig. 8) oraz zanotowano ile nasion wykiełkowało (Fig. 9). Zakażenie gleby *Pythium* prawie całkowicie zahamowało wzrost roślin. Rośliny są wyraźnie chronione przed zakażeniem przez wszystkie szczepy *Trichoderma* lecz w obecności transformantów fasola lepiej rosła w porównaniu do szczepu rodzicielskiego P1.

Poza tym szczepy transformowane w obecności patogena wyraźnie podnosiły procent wykiełkowanych nasion w stosunku do szczepu kontrolnego P1 (Fig. 9). Zaobserwowano dodatkowo korzystny wpływ samych szczepów *Trichoderma* na promocję wzrostu roślin czego nie obserwowano dla szczepów objętych zgłoszeniem P393021. Szczepy według wynalazku powodują nawet o 20% wyższy wzrost roślin w porównaniu do szczepu kontrolnego P1. W obecności patogena (*Pythium ultimum*) wzrost roślin dorównuje a w przypadku szczepów SGUL20/11, SGUL104/11 i SGUL125/11 przewyższa wzrost niczym nie zakażonych roślin kontrolnych co zanotowano tylko dla jednego szczepu (Fig.10) objętego zgłoszeniem P393021 .

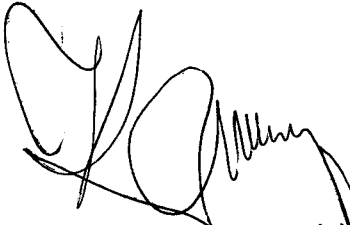
Przedstawione tu szczepy zapewniają kompleksowe zwiększenia produkcji wszystkich związków o działaniu przeciwgrzybowym produkowanych w szlaku miewalonowym i jednocześnie inną drogę zwiększenie aktywności procesów glikozylacji niż znane dotychczas w stanie techniki, np. w zgłoszeniu P393021.

Uzyskany nowy szczep *T. atroviride* zapewnia zwiększenie aktywności syntazy pirofosforany farnezyli prowadzące do zwiększenia aktywności N-acetylo- β -D-glukozaminidazy wydzielonej do podłoża. Ponadto zwiększenie aktywności syntazy pirofosforany farnezyli powoduje zwiększenie aktywności przeciwgrzybowej metabolitów wydzielanych do podłoża. Również zwiększenie aktywności syntazy pirofosforany farnezyli powoduje zwiększenie aktywności przeciwgrzybowej związków lotnych wydzielanych podczas wzrostu. Co więcej zwiększenie aktywności syntazy pirofosforany farnezyli powoduje zwiększenie aktywności biokontrolnej przeciwko *Pythium ultimum*.

Podsumowując, najbardziej spektakularną korzyścią jaką niesie wynalazek jest, zwiększone wydzielanie związków lotnych o charakterze przeciwgrzybowym, zwiększone wydzielanie białek hydrolitycznych, zwiększona aktywność celulaz, zwiększone wydzielanie metabolitów wtórnych osiągnięty u transformantów oraz znaczące

podniesienie właściwości biokontrolnych transformowanych szczepów w porównaniu do kontroli P1.

Jednocześnie uzyskanie lepszej ochrony roślin przy pomocy szczepów transformowanych nie wiąże się z żadnymi dodatkowymi kosztami związanymi z hodowlą
5 grzyba ani też z żadnymi dodatkowymi manipulacjami.



Dr inż. Zbigniew Kamiński
RZECZNIK PATENTOWY