

Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas

Manuel Rey¹, Jesús Delgado-Jarana², Ana M^a Rincón², M^a Carmen Limón² y Tahía Benítez²

¹IBVF, Isla de la Cartuja, CSIC-Universidad de Sevilla y ²Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España

Resumen

La utilización de cepas fúngicas del género *Trichoderma* para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos es una de las alternativas más prometedoras al empleo de fungicidas químicos. Con el fin de obtener cepas de *Trichoderma* que sean mejores agentes de control biológico que las cepas ya existentes, se han seguido varias estrategias encaminadas a aumentar su capacidad de degradar la pared celular de los hongos a los que ataca. Así, mediante la transformación de cepas de *Trichoderma harzianum* con genes de quitinasas y glucanasas, se han obtenido cepas con actividades enzimáticas muy superiores a las de la estirpe silvestre. No obstante, algunas de las enzimas producidas por los transformantes sufren procesos de proteólisis que se pueden evitar modificando las condiciones de cultivo. La obtención de enzimas híbridas mediante la fusión de dominios de unión a sustrato, es una alternativa al incremento de la dosis génica que también originaría cepas con mayor capacidad lítica. En ensayos de antagonismo realizados *in vitro*, las cepas transformadas con genes de hidrolasas muestran una capacidad antifúngica sobre el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* superior a la de la estirpe silvestre.

Trichoderma, Control biológico, Transformación, Quitinasas, Glucanasas

Improvement of *Trichoderma* strains for biocontrol

Summary

The use of the fungal genus *Trichoderma* to control fungal plant diseases is a promising alternative to the use of chemical compounds. The aim of this work has been to obtain *Trichoderma* strains with improved capacity as biological control agents. To do so, the hydrolytic capacity on fungal cell walls of strains of the fungus *Trichoderma harzianum* has been increased. On one hand, transformation experiments with genes which coded for chitinases and glucanases have been carried out in *T. harzianum* strains. On the other hand, the medium composition has also been modified in order to eliminate proteolytic degradation of some of the overproduced enzymes. Finally, hybrid chitinolytic enzymes with substrate-binding domains have been produced as an alternative to obtain improved biocontrol strains. The transformant strains, when compared with the wild type, showed improved antifungal capacity against the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, in *in vitro* experiments.

Key words

Trichoderma, Biological control, Transformation, Chitinases, Glucanases

Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, tales como bacterias, nematodos u hongos, constituyen la mayor causa de pérdida en la producción agrícola, tanto en cosecha como en postcosecha. Dentro de los distintos fitopatógenos, los hongos constituyen uno de los principales grupos tanto por la diversidad de especies existentes como por las pérdidas que originan [1-4]. La manera tradicional de combatir tales pérdidas se basa en el empleo de compuestos químicos (control químico), los cuales se caracterizan por una elevada eficacia y por una gran rapidez en el control, pero también por ser tóxicos inespecíficos que eliminan, junto con los organismos fitopatógenos, otros organismos beneficiosos. Los inconvenientes que presenta el control químico se han potenciado en los últimos años debido al cambio en los sistemas de cultivo (monocultivos, explotaciones intensivas, etc.). Esto, unido a una mayor concienciación social ante el enorme deterioro medioambiental que supone la

Dirección para correspondencia:

Dra. Tahía Benítez
Dpto. de Genética, Facultad de Biología,
Avda. Reina Mercedes s/n,
41012 Sevilla, España
Tel.: +34 954 557109; Fax: +34 954 557104
E-mail: Tahia@CICA.ES

utilización masiva de compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos [1-3,5]. En este sentido, una estrategia que esta dando un buen resultado es la utilización de microorganismos que son antagonistas de los agentes infecciosos y que desplazan a éstos de una manera natural (control biológico) [4-10].

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores [10-13]. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos: competición directa por el espacio o por los nutrientes [2,3,5,7,11], producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil [2,3,5,6] y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre el hongo fitopatógeno [2,5]. Durante el micoparasitismo, el antagonista localiza al patógeno y se enrolla alrededor de las hifas de éste, provocando su muerte. Estos tres mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada pareja de antagonista-patógeno y de las condiciones ambientales [2,5,11].

Un uso más extendido del control biológico requiere la obtención de agentes de biocontrol más eficaces de los que existen actualmente. En la búsqueda de tales agentes mejorados se podrían seguir varias estrategias ya que, como se ha indicado, son varios los mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción. No obstante, un análisis de los mecanismos de acción descritos anteriormente revela que en todos ellos participan enzimas hidrolíticas de la pared celular. Así, la capacidad saprofitica de un microorganismo está mediada por la cantidad de enzimas degradadoras de polímeros tales como la quitina o los glucanos. Por otra parte, esta bien establecido que los enzimas hidrolíticos de pared celular tienen un efecto sinérgico con los antibióticos [14-19], siendo la acción antifúngica de ambos compuestos muy superior a la de cualquiera de ellos por separado. En cuanto al micoparasitismo, una de las etapas claves del mismo consiste en la degradación de la pared celular de los fitopatógenos mediada por la acción de los enzimas hidrolíticos producidas por el antagonista [2,5]. Por todo ello, una buena estrategia de mejora podría ser el aumento de los niveles de enzimas hidrolíticas del agente de biocontrol, ya que al modificar este parámetro se estarían actuando directamente sobre los tres mecanismos mediante los cuales *Trichoderma* podría desplazar a los hongos fitopatógenos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de *Trichoderma harzianum* con genes de quitinasas y glucanasas. Una vía directa para la obtención de cepas de *Trichoderma* con un mayor nivel de expresión de enzimas hidrolíticas de pared celular (EHPC), se podría conseguir mediante el aumento de la dosis génica. Actualmente existen varios métodos de transformación que permiten aumentar de manera estable el número de copias de un gen de una manera rápida [2,20-23]. En este estudio, se llevó a cabo la cotransformación a partir de protoplastos para aumentar los niveles de transcripción de los genes que codifican EHPC en la cepa *T. harzianum* CECT 2413. El protocolo seguido fue el descrito por Penttila y colaboradores [22], utilizando como marcador de selección la capacidad de utilizar ace-

tamida como fuente de nitrógeno a través del gen de la acetamidasa de *Aspergillus nidulans* [24-26], mientras que el gen de interés quedaba en un segundo vector bajo el control del promotor *pki* (piruvato kinasa) y el terminador de la celobiohidrolasa I, ambos de *Trichoderma reesei* [21]. Mediante cotransformación se obtuvieron transformantes estables de *T. harzianum* para cuatro genes de EHPC distintos; dos de ellos que codificaban quitinasas, *chit42* [27] y *chit33* [128,31], y dos que codificaban dos glucanasas, *bgn16.2* [32,33] y *bgn13.1* [34].

a) **Análisis del patrón de integración.** El análisis Southern de distintos transformantes para cada uno de los genes, mostró un patrón similar de integración para la mayoría de los transformantes analizados (Figura 1). Este mismo fenómeno ya se ha descrito para otras cepas transformadas de *Trichoderma* [23,35], lo que pone de manifiesto la presencia de lugares preferentes de integración dentro del genoma de *Trichoderma*.

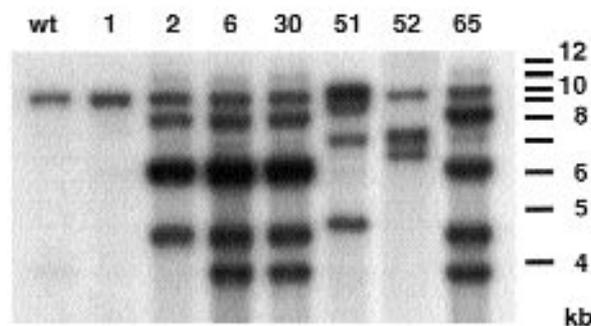


Figura 1. Southern de transformantes de la quitinasa *Chit33*. Los patrones similares muestran la existencia de un lugar preferente de integración.

Para valorar de una manera aproximada el número de copias extras que presentaban los transformantes se realizaron análisis densitométricos con un lector de radiaciones β . Los incrementos del número de copias que se obtuvieron para el gen de interés oscilaron entre 2 y 20 veces (Figura 2).

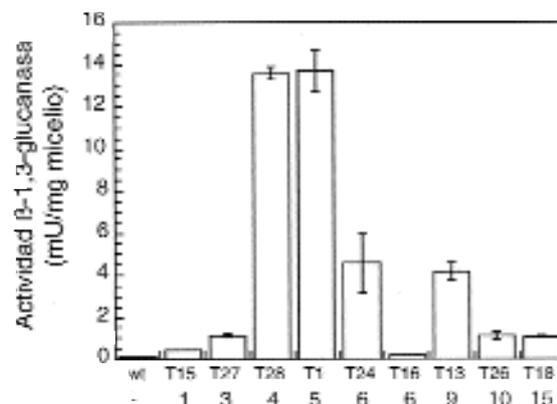


Figura 2. Actividad β -1,3-glucanasa en cultivos en condiciones de represión (glucosa 2% como fuente de carbono) de *T. harzianum* silvestre (wt) y cepas transformadas para el gen *bgn13.1*. Debajo de cada cepa se indica el número de copias ectópicas de dicho gen.

b) **Análisis de los niveles de expresión.** El siguiente paso fue comprobar mediante análisis northern si el aumento de dosis génica se traducía en un aumento equivalente de los niveles de ARNm para los distintos genes.

Para ello se realizaron análisis *northern* de micelios de *Trichoderma* cultivado en condiciones de represión por glucosa -ya que casi todos los genes de este estudio muestran represión transcripcional por glucosa y/o inducción por sustrato [36]- y en condiciones de desrepresión/inducción. Los resultados obtenidos fueron muy heterogéneos. En condiciones de represión por glucosa, como era de esperar, sólo los transformantes mostraban ARNm, ya que éstos quedaban bajo el control de un promotor constitutivo, aunque ligeramente modulable en función de la fuente de carbono [2,22]. Además, mientras que en algunos casos se observaba una correlación clara entre el número de copias extras que se habían integrado y los niveles de ARNm (i.e. β -1,6-glucanasa), en otros casos como el de la β -1,3-glucanasa no se observaba tal correlación (Figura 2). En condiciones en las que también se expresaban las copias endógenas (desrepresión/inducción), las diferencias entre los niveles de ARNm entre las cepas silvestres y las transformadas fueron menores de las que serían esperables en todos los casos, salvo para la β -1,6 glucanasa.

c) *Análisis de los niveles de proteínas y de actividad hidrolítica.* Aquí también se observaron discrepancias entre los niveles de ARNm y la actividad enzimática. Nuevamente, en condiciones de represión los transformantes presentaban mucha más actividad que las estirpes silvestres (Figura 2) mientras que en condiciones de desrepresión/inducción las diferencias se atenuaban. Estos datos, al igual que los del estudio de los niveles de ARNm, mostraban que, transformantes que habían integrado un número similar de copias extras, presentaban niveles muy dispares de ARNm y de actividad, lo que parece mostrar un efecto posicional muy claro, de manera que en la expresión de un gen no sólo influye el número de copias, sino el lugar del genoma en el que se integren esas copias. Además, los resultados indican que los mayores niveles de actividad se obtienen con un número intermedio de copias (Figura 2) y que por lo tanto un número mayor de copias del gen no produce mayores niveles de actividad, debido tal vez a un agotamiento de algunos factores transcripcionales [37,38]. Junto con esta falta de correlación entre el número de copias del gen integradas en el genoma y los niveles de ARNm y de actividad (Figura 2), ya descrita para transformantes de otros genes [37,38] el resultado más destacable fue el obtenido con la β -1,6-glucanasa. Los transformantes para este gen mostraban altos niveles de ARNm y en condiciones de desrepresión mostraban más actividad que el silvestre pero en condiciones de represión por glucosa, a pesar de existir ARNm, no se detectaba ni actividad enzimática ni proteína (Figura 3).

Estudio de factores post-traduccionales: optimización de las condiciones de cultivo. Debido fundamentalmente a los resultados obtenidos con los transformantes para la β -1,6-glucanasa, nos centramos en el estudio de cómo los procesos post-traduccionales estaban modulando los niveles finales de actividad de las distintas enzimas. Existen referencias en la literatura, en las que se muestra cómo alteraciones en los procesos de glicosilación, o saturación de sistema de transporte o proteólisis pueden provocar que niveles altos de transcripción de un gen no se vean reflejados en niveles altos de proteínas [28,35, 39,40]. Por ello, el estudio se centró en cuál de estos factores era el responsable de la falta de correlación entre ARNm y proteínas observada en los transformantes de la β -1,6-glucanasa. En primer lugar se estudió el grado de glicosilación de la proteína silvestre y de los transformantes, no encontrándose diferencias entre ellos. También se estudió la acumulación de proteína intracelular en los

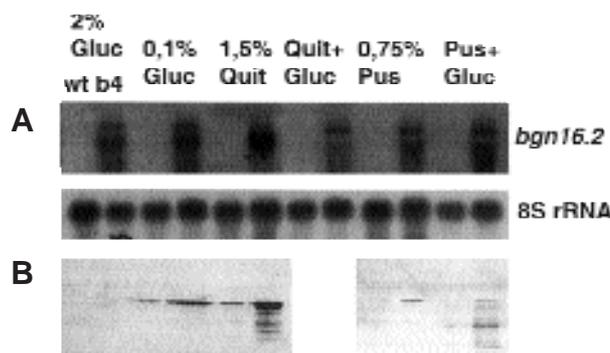


Figura 3. A: Análisis northern de ARN extraído de las cepas silvestre (wt) y transformante (B4) de *T. harzianum* cultivado durante 24 h en medio mínimo con las siguientes fuentes de carbono: glucosa 2%, glucosa 0.1%, quitina 1.5%, quitina mas glucosa 2%, pustulan 0.75% y pustulan mas glucosa 2%. Los micelios se precultivaron durante 40 h en medio mínimo con glucosa al 2% como fuente de carbono. B: Análisis western de proteínas extracelulares obtenidas de sobrenadantes de dichas cepas de *T. harzianum* cultivadas en las mismas condiciones que en A.

transformantes crecidos en distintos medios de cultivo, sin que se hallara nuevamente ninguna diferencia entre aquellos transformantes en los que se detectaba proteína extracelular y en los que no. Estos resultados parecían indicar que la causa más probable de la ausencia de proteína podría ser la proteólisis, como ya se había descrito en otros sistemas [39-41]. Para ver cómo afectaban las condiciones de cultivo a la actividad β -1,6-glucanasa, se ensayó esta actividad en medios con distintas fuentes de carbono y/o nitrógeno (Tabla 1). Puesto que uno de los factores que más influencia tienen sobre un gran grupo de proteasas es el pH del medio [25,28,42], también se estudió la evolución del pH en los medios en los que se detectaba proteína y en los que no se detectaba. El resultado fue que en medios donde había proteína el pH siempre era superior a 3, mientras que en medios donde no se detectaba proteína el pH era sensiblemente inferior (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad específica (U/g peso seco de micelio) de la actividad β -1,6-glucanasa medida en medio mínimo (MM) con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, o diferente pH.

	Silvestre	Transformante B4
Fuente de carbono		
2% glucosa	7,4 \pm 0,9 ^a	12,73 \pm 1,1
0,1% glucosa	294 \pm 32,8	8292 \pm 184
1,5% quitina	1062 \pm 80,9	12833 \pm 356
1,5% quitina + 2% glucosa	6,0 \pm 0,3	2,0 \pm 0,1
0,75% pustulan	203,1 \pm 2,4	1132 \pm 76,1
0,75% pustulan + 2% glucosa	10,42 \pm 1,3	13,7 \pm 1,4
2% glicerol	4,64 \pm 1,13	1,9 \pm 0,0
2% arabinosa	12,65 \pm 1,82	9,3 \pm 0,8
2% xilosa	66,8 \pm 17,6	282 \pm 102,1
2% citrato	3,7 \pm 0,9	670 \pm 70,3
2% lactosa	699,6 \pm 125,9	1131 \pm 151
Fuente de nitrógeno		
0,5% sulfato amónico	7,4 \pm 0,9	12,7 \pm 1,1
1% extracto de levadura	5,75 \pm 0,7	36150 \pm 8294
1% peptona	3,62 \pm 0,1	14330 \pm 2727
1% caseína	10,72 \pm 1,4	6262 \pm 182
0,52% prolina	31,99 \pm 0,6	1235 \pm 244,8
0,5% urea	8,20 \pm 1,9	6026 \pm 926
pH		
3	5,4 \pm 0,7	9,8 \pm 1,0
6	11,7 \pm 1,5	18946 \pm 309,4
8	103,5 \pm 9,4	11888 \pm 368,5

^a Los valores se representan con media \pm desviación estándar.

Este resultado apoyaba la hipótesis de que existiera alguna proteasa regulada por pH al igual que ocurre en otros hongos filamentosos [25,28,42], que sería la responsable de la falta de proteína. Para comprobar este extremo se realizaron isoelectroenfoces de sobrenadantes provenientes de cultivos con y sin glucosa y también de medios con glucosa tamponados a pH 5. Mediante zimogramas de actividad proteasa utilizando como sustrato BSA se detectó una actividad proteolítica debida a la presencia de una proteasa ácida que era regulada por pH y no por la fuente de carbono (Figura 4). Para comprobar si esta actividad era la causante de la proteólisis se incubó sobrenadante de medio ácido con β -1,6-glucanasa pura, observándose como ésta desaparecía.

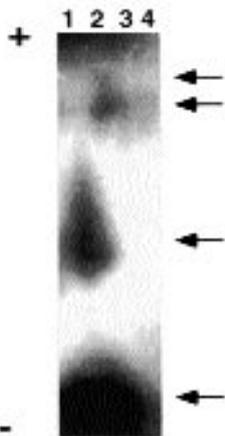


Figura 4. Isoelectroenfoco y zimograma de proteínas extracelulares de la cepa transformante B4 de *T. harzianum* cultivada en: 1) medio mínimo (MM) con quitina 1,5% como fuente de carbono; 2) MM con glucosa 2% como fuente de carbono y tamponado a pH 3 con tampón citrato; 3) como 2) pero tamponado a pH 6 con tampón MES; 4) como 2) pero tamponado a pH 8 con Tris-HCl. El isoelectroenfoco se realizó entre pH 3,5 y 9,5. Posteriormente, el gel se cubrió con otro gel de agarosa al 2%, BSA al 1% y tampón acético 50mM a pH 5,5 y se incubó el sandwich a 37°C.

Una vez identificada la causa de la desaparición de la proteína, el siguiente objetivo fue buscar condiciones de cultivo que no hicieran bajar el pH. Para ello se estudiaron, como se ha indicado, distintos sustratos para tamponar el medio de cultivo, así como distintas fuentes de carbono y nitrógeno. La utilización de medios tamponados dio un buen resultado, si bien el elevado coste de algunas de las sustancias empleadas para tamponar los medios (por ejemplo, tampón MES) no hacía viable tal solución. Resultados similares al empleo de medios tamponados se obtuvieron al utilizar una fuente de nitrógeno orgánica como la urea, por lo que éste puede ser el medio a utilizar para la obtención de grandes cantidades de proteína.

Modificación de la afinidad a sustrato: construcción de enzimas híbridas. Una estrategia distinta al aumento de los niveles enzimáticos podría ser la mejora de las propiedades líticas de las enzimas. Por lo descrito para otros sistemas, pueden darse diferencias importantes en la actividad específica de una enzima lítica (capaz de degradar la pared celular de un microorganismo) dependiendo de si posee o no un dominio de unión a sustrato, independiente del dominio catalítico [43-49]. Puesto que las enzimas que utilizamos en nuestro estudio no presentaban dominios claros de unión a sustrato, valoramos la posibilidad de que la adición de estos dominios le otorgaran superiores capacidades líticas. Para ello elegimos la quitinasa de 42kDa, por ser la que presenta mayores nive-

les de actividad específica [50], y se le fusionó el dominio de unión a quitina de un quitinasa de planta con demostrada actividad antifúngica [47]. En la figura 5 se muestra el esquema de construcción de la proteína híbrida. Como sistema de expresión se utilizó *Escherichia coli*, para lo que, la proteína híbrida, se fusionó a la GST para facilitar la purificación de la misma. Cuando se valoró la actividad específica de la proteína con el dominio de unión fusionado respecto a la silvestre, se observó que, para sustratos solubles, prácticamente no se observaban diferencias, mientras que para sustratos más complejos como puede ser la pared celular, la enzima híbrida presentaba mayores niveles de actividad que la silvestre (Tabla 2). Este resultado indica que la adición de un dominio de unión a sustrato podría ser una buena estrategia para mejorar las cualidades líticas de las enzimas objeto de estudio.



Figura 5. Esquema de las quitinasas híbridas. □ = Chit42 de *T. harzianum*. ▤ = Dominio de unión a celulosa de CBHII de *T. reesei*. ▥ = Bisagra de CBHII de *T. reesei*. ▨ = Dominio de unión a quitina de ChiA de *Nicotiana tabacum*.

Tabla 2. Especificidad de sustrato de la quitinasa Chit42 en comparación con las quitinasas híbridas.

Sustrato	Actividad Quitinasa específica (U/ mmol enzima) ^a		
	Chit 42	Chit42CeBD	Chit42ChBD
Paredes de <i>S. cerevisiae</i>	0	0	0
Paredes de <i>Botrytis cinerea</i>	166,6 ± 14,6	463,2 ± 8,4	261,1 ± 14,0
Paredes de <i>T. harzianum</i>	178,3 ± 34,6	135,7 ± 29,0	1431,6 ± 82,3
Quitina machacada	515,2 ± 739,4	783,3 ± 57,3	703,3 ± 18,7
Quitina coloidal	4014 ± 91,2	4123 ± 93,1	3238 ± 86,5
Glicol quitina	4600,2 ± 311,4	4733,6 ± 88,9	4600,2 ± 222,8
4-MU-(GINAc) ₃	7,8 ± 0,45	9,25 ± 0,02	8,09 ± 0,19

^a 1U = 1μmol NAcGI liberado/min; ^b 1U = 1μmol 4-MU liberado/min.

Análisis in vitro de la capacidad antifúngica de las estirpes silvestres y transformantes. Para comprobar si un aumento de los niveles de EHPC se veía traducido en una mayor capacidad antifúngica se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro*. Para ello cocultivamos en cajas de medio rico las cepas silvestres y algunos de las transformantes de *Trichoderma* frente a un hongo fitopatógeno (*Rhizoctonia solani*). Además, como control del experimento también se comprobó la capacidad antagonista de las cepas transformadas únicamente con el gen de la acetamidasa. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos con transformantes de la β -1,6-glucanasa, de la quitinasa de 33 kDa, y, como control positivo, un mutante supersecretor de enzimas líticas, PF1. Resultados similares se obtuvieron con las cepas que producían mayores niveles de enzimas, tanto transformantes como el mutante PF1 (Figura 6). Este ensayo de antagonismo *in vitro* muestra claramente que los transformantes poseen mayor actividad antifúngica que el silvestre o que el control transformado con el gen de la acetamidasa, ya que cuando los transformantes han sobrecrecido y esporulado sobre el hongo fitopatógeno, el silvestre no ha llegado a sobrecrecer al fitopatógeno.

Al comienzo de este trabajo apuntábamos la posibilidad de que el aumento de los niveles enzimáticos

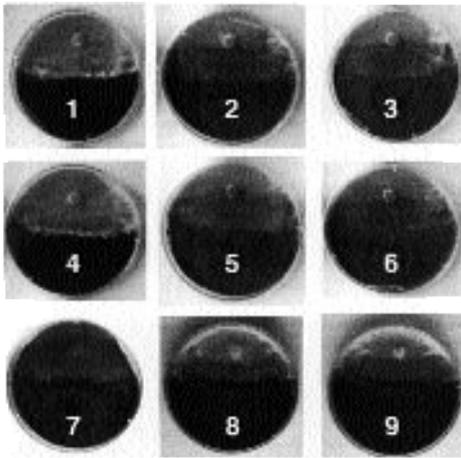


Figura 6. Antagonismo frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. 1= *T. harzianum* silvestre; 4= Control transformado con el marcador AmdS; 2 y 3= Transformantes de Chit33; 5 y 6= Transformantes de β -1,6-glucanasa; 7= Mutante supersecretor PF1; 8 y 9= Transformantes de Chit42.

podría resultar en la mejora de la capacidad de biocontrol de las cepas, ya que esta aumento podía repercutir directamente sobre los tres mecanismos por los que *Trichoderma* ejerce su acción antagonista. Con el test de antagonismo que hemos seguido tan sólo estamos valorando dos de ellas (la sinergia y el efecto antifúngico directo de las enzimas), ya que la capacidad competidora no se puede valorar con este ensayo. Por ello, es posible que en el campo, donde la competición por el sustrato y el espacio juegan un papel tan importante, las cualidades como antagonistas de los transformantes sean aún mayores que las que se observan *in vitro*.

Este trabajo ha sido posible gracias a las ayudas recibidas de la Junta de Andalucía (PAI grupo CV107), la Universidad Internacional de Andalucía, y la CICYT (proyectos BIO94-0289, BIO97-0521 y PTR94-0068).

Bibliografía

- Benítez T, Delgado-Jarana J, Rincón A Rey M, Limón MC. Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (Ed.) Recent Research Developments in Microbiology. Trivandrum, India, Research Signpost 1998; 2: 129-150.
- Harman GE, Kubicek CP. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, Taylor and Francis, 1998.
- Hornby D (Ed.). Biological control of soil-borne plant pathogens. Oxford, CAB International, 1990.
- Papavizas GC. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu Rev Phytopathol 1985; 23: 23-54.
- Chet I, Ibar J, Hadar I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT & Söderström B (Eds.) The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. New York, Springer Verlag, 1997: 165-192.
- Chet I. *Trichoderma*. Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet I. (Ed.) Innovative approaches to plant disease control. New York, Wiley and Sons 1987: 137-160.
- Chet I, Ibar J. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochem Biotechnol 1994; 48: 37-43.
- Papavizas GC, Lewis JA. Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. Phytopathology 1983; 73: 407-411.
- Papavizas GC, Lewis JA. Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean caused by *Sclerotium rolfsii*. Plant Pathol 1989; 38: 277-286.
- Papavizas GC, Lewis JA, Abd-El Moity TH. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology 1982; 72: 126-132.
- Belanger R, Dufour N, Caron J, Benhamou N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. Biocontrol Sci Technol 1995; 5: 41-54.
- Jin X, Taylor AG, Harman GE. Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. Biol Control 1996; 7: 267-274.
- Papavizas GC, Roberts DP, Kim KK. Development of mutants of *Gliocladium virens* tolerant to benomyl. Can J Microbiol 1990; 36: 484-489.
- Lorito M, Di Pietro A, Hayes CK, Woo SL, Harman GE. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. Phytopathology 1993; 83: 721-728.
- Lorito M, Farkas V, Rebuffat S, Bodo B, Kubicek CP. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. J Bacteriol 1996; 178: 6382-6385.
- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology 1993; 83: 302-307.
- Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Woo SL, Harman GE. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 1994; 84: 398-405.
- Lorito M, Mach RL, Sposato P, Strauss J, Peterbauer CK, Kubicek CP. Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein promoter sequences of the ech-42 (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 14868-14872.
- Lorito M, Peterbauer C, Hayes CK, Harman GE. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. Microbiology 1994; 140: 623-629.
- Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Harman GE. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plamid and genomic DNA. Curr Genet 1993; 24: 249-256.
- Mach RL, Schindler M, Kubicek CP. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. Curr Genet 1994; 25: 567-570.
- Penttilä M, Nevalinen H, Rättö M, Salminen E, Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene 1987; 61: 155-164.
- Sánchez-Torres P, González R, Pérez-González JA, González-Candelas L, Ramón D. Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *egl1* gene. Appl Microbiol Biotechnol 1994; 41: 440-446.
- Hynes MJ, Corrick CM, King JA. Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. Mol Cell Biol 1983; 3: 1430-1439.
- Van den Hombergh JPTW, Van de Vondervoort PJI, Fraissinet-Tachet L, Visser J. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. TIBTECH 1997; 15: 256-263.
- Vanhanen S, Penttilä M, Lehtovaara P, Knowles J. Isolation and characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*pgk*) from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Curr Genet 1989; 15: 181-186.
- García I, Lora JM, De la Cruz J, Benítez T, Llobell A, Pintor-Toro JA. Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Curr Genet 1994; 27: 83-89.
- Limón MC, Benítez T. A comparative study of overexpression of chitinases in *Trichoderma harzianum*. Forth European Conference on Fungal Genetics, León, Spain, 1998; abstr. Vlo-4: 158.
- Limón MC, Pintor-Toro JA, Benítez T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants which overexpresses a 33 kDa chitinase. Phytopathology 1999; 89: 254-261.
- Limón MC, Lora JM, García I, et al. Primary structure and expression pattern of the 33kDa. chitinase gene from the myco-

- parasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* 1995; 28: 478-483.
31. Limón MC, Llobell A, Pintor-Toro JA, Benítez T. Overexpression of chitinase by *Trichoderma harzianum* strains used as biocontrol fungi. In: Muzzarelli RAA. (Ed.) *Chitin Enzymology*, Vol.2, Italy, Atec Edizioni, 1996.
 32. De la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benítez T, Llobell A. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J Bacteriol* 1995; 177: 1864-1871.
 33. Lora JM, De la Cruz J, Benítez T, Pintor-Toro JA. Molecular characterization and heterologous expression of an endo- β -1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol Gen Genet* 1995; 247: 639-645.
 34. De la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benítez T, Llobell A, Romero LC. A novel endo-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* 1995; 177: 6937-6945.
 35. Harkki A, Uusitalo J, Bailey M, Penttilä M, Knowles JCK. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol* 1989; 7: 596-603.
 36. De la Cruz J, Rey M, Lora JM, et al. Carbon source control on β -glucanases, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch Microbiol* 1993; 159: 316-322.
 37. Margolles-Clark E, Harman GE, Penttilä M. Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2152-2155.
 38. Margolles-Clark E, Hayes C, Harman GE, Penttilä M. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2145-2151.
 39. Haab D, Hagspiel K, Szkmay K, Kubicek CP. Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. *J Biotechnol* 1990; 16: 187-198.
 40. Nakari-Setälä T, Penttilä M. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3650-3655.
 41. Mäntylä A, Saarelainen R, Fagerström R, Suominen P, Nevalainen H. Cloning of the aspartic protease gene of *Trichoderma reesei*. In *Second European Conference on Fungal Genetics*, Lunteren, The Netherlands, 1994 (abstr. B52).
 42. Miettinen-Oinonen A, Torkkeli T, Paloheimo M, Nevalainen H. Overexpression of the *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase gene in a heterologous host *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol* 1997; 58: 13-20.
 43. Blaak H, Schrempf H. Binding and substrate specificities of a *Streptomyces olivaceoviridis* chitinase in comparison with its proteolytically processed form. *Eur J Biochem* 1995; 229: 132-139.
 44. Linder M, Teeri T. The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12251-12255.
 45. Linder M, Lindeberg G, Reinikainen T, Teeri T, Pettersson G. The difference in affinity between two fungal cellulose-binding domains is dominated by a single amino acid substitution. *FEBS Lett* 1995; 372: 96-98.
 46. Linder M, Salovuori I, Ruohonen L, Teeri T. Synergistic high affinity binding to crystalline cellulose. *J Biol Chem* 1996; 271: 21268-21272.
 47. Shinshi H, Neuhaus J, Ryals J, Meins F. Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol* 1990; 14: 357-368.
 48. Svitil A, Kirchman D. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4- β -glucanases. *Microbiology* 1998; 144: 1299-1308.
 49. Tomme P, Driver D, Amandoron E, Miller R, Warren A, Kilburn D. Comparison of a fungal (family I) and bacterial (family II) cellulose-binding domain. *J Bacteriol* 1995; 177: 4356-4363.
 50. De la Cruz J, Hidalgo-Gallego A, Lora JM, Benítez T, Pintor-Toro JA, Llobell A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur J Biochem* 1992; 206: 859-867.