

FUNGII FILAMENTOȘI: SURSE DE SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE CU IMPORTANȚĂ BIOTEHNOLOGICĂ

IRINA GREBENIȘAN, CĂLINA PETRUȚA CORNEA, GH. CÂMPEANU

Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București, Facultatea de Biotehnologii,

Bl. Mărăști 59, sector 1, tel: 012242576, fax:012242815, e-mail: grebenisan@xnet.ro

Introducere

Acum aproximativ 200 de ani, genul *Trichoderma* a fost inclus ca taxon pentru a denumi un grup special de fungi filamentoși nou descoperit. Abia după 150 de ani, genul *Trichoderma* a atras din nou atenția când s-a observat, în cursul celui de-al doilea război mondial, că specii aparținând acestui grup (*T. viride*) sunt capabile să degradeze celuloza. Ulterior, în cadrul grupului au fost identificate mai multe specii (*T. viride*, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. koningii* etc.), dintre care unele s-au dovedit a fi extrem de eficiente în degradarea substraturilor celulozice, iar altele, prin compușii produși inhibă creșterea unor fitopatogeni.

În ultimii ani, fungii filamentoși din genul *Trichoderma* au fost supuși unor studii amănunțite atât în privința particularităților morfologice, fiziologice, biochimice sau genetice cât mai ales pentru identificarea, purificarea și utilizarea compușilor de interes economic. Din acest punct de vedere, se poate spune că fungii filamentoși din genul *Trichoderma* prezintă un interes biotehnologic deosebit, fiind elaborate până în prezent numeroase tehnologii de obținere a unor substanțe biologice active sintetizate de aceștia.

1. Particularități morfologice ale fungilor filamentoși din genul *Trichoderma*

Fungii sunt eucariote heterotrofe, incapabile de fotosinteză, care își obțin energia prin oxidarea compușilor organici. Ei se găsesc în special în sol unde participă la degradarea unor substraturi foarte variate; pot prezenta un mod de viață saprofit sau parazit (parazitează plantele, animalele și omul).

Celulele fungilor au o organizare tipic eucariotă, corpul vegetativ fiind denumit tal. Acesta variază în complexitate și dimensiune: de la formele unicelulare (levuri), la mucegaiurile pluricelulare și până la ciupercile macroscopice. Celulele prezintă un perete celular gros, al cărui principal component este chitina (poliglucid rezistent și flexibil, alcătuit din resturi de N-acetilglucozamină). De asemenea, celulele fungice au, de obicei, mai mulți nuclei dar nu conțin plastide. Fungii sunt caracterizați prin formarea unui miceliu alcătuit din hife ramificate .



Figura 1. Aspectul macroscopic al unei culturi de *Trichoderma viride* (original)

Organizarea hifelor este coenocitică: în interiorul structurii filamentose ramificate, protejată de pereții celulari rigizi, se găsește o masă citoplasmatică multinucleată. În unele cazuri, hifele sunt neseptate (*Phycomycetes*) dar, de cele mai multe ori, ele prezintă pereți transversali despărțitori străbătuți de pori (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes*). Datorită acestei forme de septare a hifelor, se consideră că și în acest caz este vorba de organizare coenocitică.

Reproducerea fungilor se realizează prin germinarea sporilor: se formează mai întâi o hifă din care apoi se regenerează miceliul care poate fi haploid, diploid sau dicariotic (heterocarion sau homocarion). La fungi au fost descrise două tipuri de reproducere: asexuată și sexuată. În cadrul fungilor au fost însă evidențiate numeroase specii care au pierdut capacitatea de a se reproduce sexuat, ele fiind grupate în categoria „fungi imperfecti” (*Deuteromycetes*). În acest grup sunt cuprinse multe dintre speciile de fungi filamentoși importanți din punct de vedere biotehnologic.

Cercetările asupra ciclurilor de viață ale multor specii de fungi au evidențiat o serie de diferențe (figura 2), iar în cazul speciilor ce se reproduc exclusiv asexuat s-a dovedit că există fenomene de parasexualitate.

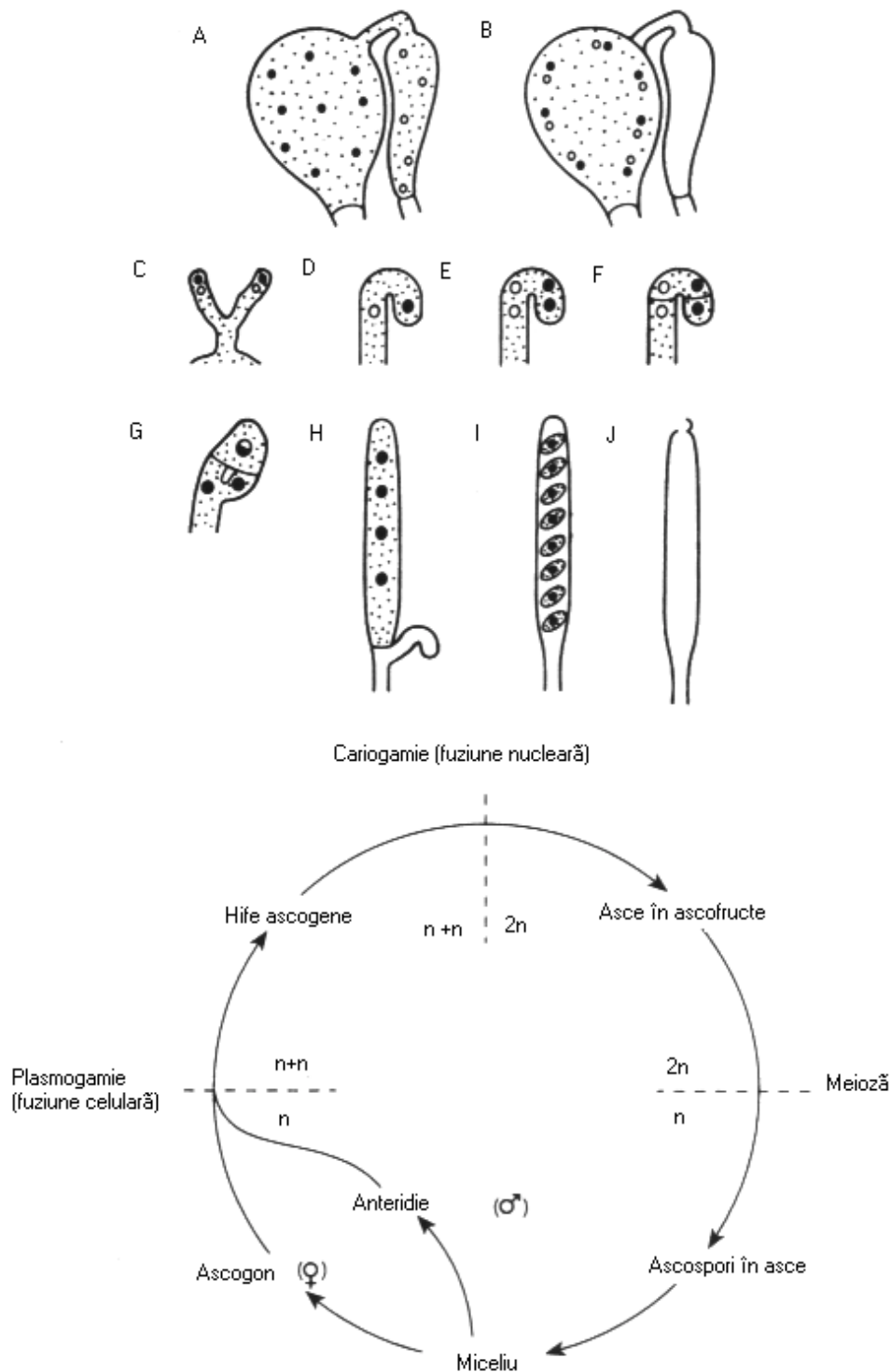


Figura 2. Ciclul de viață și fazele producerii ascelor la ascomiceta *Pyrenema omphalodes*. A - fuziunea ascogonului cu anteridia. Nucleii ascogonului sunt reprezentați cu negru, iar ai anteridiei cu alb; B - anteridia își varsă conținutul în ascogon și are loc împerecherea nucleilor; C - dezvoltarea hifelor ascogene la suprafața ascogonului; D - Formarea cârjei în vârful unei hife ascogene; E - Are loc diviziunea nucleului; F - Se formează septa în cârjă; G - În penultima celulă are loc fuziunea nucleului (cariogamia) și se inițiază dezvoltarea ascei; H - Se produce diviziunea meiotică în ască; I - asca matură prezintă opt ascospori; J - golirea ascei (după M. Carlile și colab., 2001)

Procesul de parasexualitate a fost descris în detaliu la multe genuri de fungi: *Verticillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Beauveria*, *Paecilomyces*; el presupune parcurgerea mai multor etape (Hartman și col., 1998):

- două celule aparținând unor tulpini diferite fuzionează printr-un proces natural de anastomoză sau, *in vitro*, prin fuziunea protoplaștilor;
- se formează un tal care este un heterocarion, conținând nucleii ambelor celule parentale;
- are loc fuziunea nucleilor de origine diferită, unul de la o tulpină și altul de la cealaltă tulpină, doi câte doi, formând câte un diploid recombinat;
- nucleii heterozigoți rezultați se multiplică alături de nucleii haploizi parentali în noile condiții heterocariotice;
- uneori, se pot forma diploizi homocariotici care se stabilizează și devin noi tulpini, distincte față de cele parentale;
- în cursul multiplicării tulpinii diploide se poate produce procesul de crossing-over mitotic;
- are loc eliminarea progresivă a unor cromosomi, rezultând în final o tulpină haploidă recombinată.

Pe baza faptului că fuziunea celulară determină procesul de recombinare genetică la fungii filamentoși, au fost realizate o serie de cercetări asupra posibilității inducerii *in vitro* a acestui fenomen, prin utilizarea protoplaștilor. Numeroase cercetări au fost realizate în cazul speciilor de fungi producătoare de enzime (*Aspergillus*, *Trichoderma*) sau de antibiotice (*Penicillium*), obținându-se o serie de tulpini recombinate cu particularități utile.

2. Metode de identificare a speciilor de *Trichoderma*

Multă vreme, principalele criterii de clasificare a microorganismelor au fost reprezentate de particularitățile morfologice, de cultură și cele fiziologice. În ultimii ani însă, punerea la punct a noi metode moleculare de identificare și caracterizare a microorganismelor, a permis o ordonare mai clară a speciilor incluse în cadrul genului *Trichoderma*.

Metodele moleculare bazate pe caracterizarea proteinelor și /sau acizilor nucleici și a polimorfismului lor asigură experimentatorului un număr practic nelimitat de markeri moleculari potențiali pentru studiile de taxonomie și reflectă relațiile filogenetice dintre organismele studiate.

2.1. Markerii proteici (izoenzimele)

Una dintre cele mai utilizate metode pentru estimarea variabilității genetice a organismelor este examinarea profilului electroforetic al izoenzimelor. Prima caracterizare a

speciilor de *Trichoderma* cu ajutorul izoenzimelor a fost realizată în 1985 de către Zamir și Chet. Ei au examinat 23 de tulpini fungice aparținând speciei *T. harzianum*, izolate din diverse zone și au reușit împărțirea acestora în cinci tipuri pe baza profilului electroforetic al unor izoenzime. Ulterior, Stasz și colab. (1989) au examinat 71 de tulpini fungice folosind 16 markeri enzimatici: în urma acestor studii ei au elaborat o propunere de clasificare a tulpinilor analizate în cinci specii: *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* și *T. viride*.

De asemenea, prin utilizarea markerilor proteici, Samuels și colab. (1994), iar apoi Leuchtmann și colab. (1996) au identificat noi tulpini de *Trichoderma* care, anterior fuseseră încadrate la alte specii și au stabilit că anumiți markeri sunt utili pentru încadrarea tulpinilor fungice înrudite la o anumită specie.

2.2. Markerii ADN

Caracterizarea moleculară a fungilor din genul *Trichoderma* a fost posibilă și prin utilizarea markerilor ADN. Aceștia, în funcție de tehnica utilizată, pot fi de mai multe tipuri: markeri RFLP, markeri RAPD, secvențializarea anumitor regiuni din ADN sau chiar cariotiparea.

Polimorfismul lungimii fragmentelor de ADN obținute prin utilizarea enzimelor de restricție (tehnica RFLP) reprezintă o categorie importantă de markeri moleculari care permite evidențierea diferențelor de la nivelul ADN în ceea ce privește localizarea situsurilor de clivare pentru enzimele alese. Mai mult, separarea electroforetică a fragmentelor de ADN obținute prin clivarea cu o anumită enzimă de restricție și apoi utilizarea unor sonde moleculare au permis evidențierea unui polimorfism evident atunci când au fost analizate probe de ADN izolate de la diferite specii de *Trichoderma*. ADN mitocondrial și ADN ribosomal au fost intens folosite în studiile taxonomice la fungi deoarece ambele tipuri de ADN se găsesc în număr mare de copii și prezintă anumite secvențe conservate și altele cu variabilitate accentuată.

Astfel, Meyer și colab. (1991) au analizat 12 tulpini de *T. viride* prin aplicarea tehnicii menționate asupra ADN mitocondrial și a plasmidelor izolate de la tulpinile de interes. Ulterior, Kubicek și colab. (1996) au analizat mai multe tulpini celulozolitice de *Trichoderma* prin utilizarea tehnicii RFLP și au dovedit că fragmentul de ADN ce codifică gena *cbhI* pentru celobiohidrolaza I prezintă un polimorfism specie-specific.

Alți cercetători au utilizat pentru hibridizarea cu fragmentele de restricție de ADN genomic o serie de oligonucleotide sintetice: (CT)₈, (GTG)₅, (GACA)₄, rezultatele obținute reprezentând argumente serioase pentru o reclasificare a anumitor specii de *Trichoderma* (Meyer și colab., 1992).

O altă metodă de analiză genetică a genomului fungic este reprezentată de tehnologia RAPD („randomic amplified polymorphic DNA”) care se bazează pe amplificarea unor

segmente de ADN prin utilizarea unor primeri arbitrari bogați în GC (Williams și colab., 1990) și apoi separarea electroforetică a secvențelor rezultate. „Amprintarea” cu ajutorul metodei PCR („polymerase chain reaction”) este în prezent utilizată frecvent în scopuri variate: identificarea unor tulpini de *Trichoderma* și determinarea purității culturilor; caracterizarea tulpinilor folosite în biocontrol (producătoare de substanțe inhibitorii pentru patogeni); identificarea tulpinilor de *Trichoderma* care contaminatează culturile de ciuperci comestibile; încadrarea taxonomică a unor noi izolate fungice; evidențierea prezenței unor fragmente de ADN de interes clonate în anumite tulpini de *Trichoderma* (Lieckfeldt și colab., 1998).

Determinarea secvenței de ADN permite obținerea unor date importante referitoare la structura ADN și la înrudirea genetică dintre diferitele tulpini microbiene analizate. În prezent se realizează numeroase cercetări referitoare la stabilirea secvenței de nucleotide a genomului multor specii de viețuitoare, inclusiv fungi filamentoși. Cu toate acestea, pentru a obține mai rapid informații asupra particularităților de secvență a anumitor tulpini, se preferă examinarea succesiunii de nucleotide a anumitor regiuni ale ADN genomic. Cel mai frecvent se examinează ADN ribosomal care, așa cum s-a precizat și mai sus, se află în mai multe copii la nivelul genomului fungic și conține o serie de regiuni conservate (gena pentru ARNr 18S, gena pentru ARNr 5,8S și gena pentru ARNr 28S) ca și porțiuni ce prezintă o mare variabilitate (de exemplu, regiunile spațiate dintre genele pentru ARNr). Astfel, determinarea secvenței de nucleotide a regiunilor spațiate a evidențiat diversitatea genetică intraspecifică, în cadrul speciei *T. harzianum* ca și cea interspecifică, în cadrul genului *Trichoderma*.

Datorită dimensiunilor extrem de reduse, numărul și mărimea exactă a cromosomilor fungilor filamentoși sunt dificil de stabilit dacă se utilizează doar metodele de microscopie (Zolan, 1995). Dezvoltarea și diversificarea tehnicilor de electroforeză în câmp pulsatoriu (PFGE) a permis realizarea cariotipării electroforetice la mai multe specii de fungi. Astfel, în cazul speciilor de *Trichoderma*, s-a dovedit că lungimea genomului este de aproximativ 31-39 Mb, iar numărul de cromosomi variază între 3 și 7, chiar între tulpinile din cadrul aceleiași specii. Cu toate acestea polimorfismul cromosomal la fungii filamentoși apare mai rar comparativ cu levurile, iar atunci când se produce noul cariotip rămâne stabil pentru mai multe sute de generații (Zolan, 1995).

În cazul tulpinilor de *Trichoderma* examinate s-a observat că apariția variației numerice și de dimensiuni a cromosomilor s-ar datora producerii de mutații, dar mecanismul fenomenului nu este pe deplin elucidat. De asemenea, se pare că fenomenul polimorfismului poate avea consecințe la nivelul particularităților biosintetice ale tulpinilor, indicând astfel speciile celulozolitice de *Trichoderma* și pe cele active în biocontrol (Herrera-Estrella și col., 1993).

De asemenea, diferențe la nivel de cariotip au mai fost evidențiate și la specii de fungi fitopatogeni: *Fusarium oxysporum*, *Septoria nodorum*, *S. tritici*, *Leptosphaeria maculans*, *Nectria haematococca*. În schimb, la specia *Aspergillus nidulans*, la tulpinile

capabile de reproducere sexuată, variația cariotipului se reduce doar la cei mai mici cromosomi (mai mici de 2 Mb) (Harman și col., 1998).

Kistler și Miao (1992) au avansat o ipoteză care încearcă să explice apariția și menținerea polimorfismului cromosomal de la fungii filamentoși. Astfel, fungii filamentoși pot prezenta doar rareori ciclul sexuat, ceea ce înseamnă că procesul de meioză care necesită împerecherea cromosomilor omologi nu este necesar. De aceea, se poate spune că polimorfismul cromosomal previne sau chiar exclude procesul de recombinare intertulpini, tulpinile fiind incompatibile din punct de vedere sexual. Mai mult, odată ce a atins un anumit nivel, polimorfismul cromosomal determină izolarea genetică a tulpinilor ceea ce conduce la apariția de populații independente (Goldman și col., 1998).

Uneori, pentru analizarea tulpinilor de *Trichoderma* utile din punct de vedere biotehnologic, se examinează și profilul plasmidial al acestora.

Plasmidele mitocondriale de la fungii filamentoși pot fi lineare (1,1-9,2 kb) sau circulare (0,8-5,2 kb), ele găsindu-se de obicei într-un număr mare de copii per celulă (Samac și Leong, 1989). Deoarece plasmidele nu sunt pierdute de tulpinile de laborator care le conțin, se poate spune că ele sunt elemente genetice stabile deși ele nu sunt esențiale pentru creșterea normală a celulelor. Se pare că plasmidele mitocondriale fungice pot codifica diferite ADN polimeraze, ARN-polimeraze sau reverstranscriptaze, pot fi implicate în procesul de senescență sau pot fi criptice (nu codifică funcții detectabile fenotipic) (Arganoza și col., 1995). În cazul anumitor specii de fitopatogeni s-a dovedit că unele plasmide lineare conțin informația genetică asociată cu spectrul de gazdă a tulpinilor respective.

Plasmidele lineare, deseori numite invertroni, prezintă de obicei secvențe terminale repetate inversat, iar la extremitățile 5' se găsesc proteine legate covalent. Ele au fost izolate de la numeroase specii de fungi cum ar fi: *Agaricus*, *Ascolobus*, *Ceratocystis*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Morchella*, *Podospora*, *Trichoderma*, *Pleurotus* sau *Neurospora*. Conform unor date recente (Schaffrath și Meacock, 1996), plasmidele lineare nu derivă din genomul mitocondrial sau nuclear.

De remarcat faptul că analiza plasmidelor fungice oferă date importante asupra utilizării acestora pentru construirea de vectori de clonare care să permită transferul controlat de gene utile în această categorie de microorganisme.

3. Modificarea genetică a fungilor din genul *Trichoderma*

Obținerea unor cantități mai mari de substanțe biologice active necesită ameliorarea capacităților de biosinteză a microorganismelor de interes biotehnologic. Pentru aceasta se pot aplica mai multe tipuri de metode între care fuziunea protoplaștilor și transformarea genetică a celulelor fungice cu molecule de ADN recombinant (tehnologia ADN recombinant) ocupă un loc foarte important.

Cercetările privind modificarea genetică a fungilor filamentoși necesită, pentru realizare, îndeplinirea a două condiții esențiale: existența unor vectori de clonare specifici și a unor metode eficiente de introducere a moleculelor de ADN de interes în celulele fungice.

3.1. Metode de transformare genetică a fungilor filamentoși

Pentru introducerea ADN exogen în celulele de fungi au fost elaborate mai multe metode, dintre care, majoritatea utilizează protoplaștii.

Pentru inducerea formării protoplaștilor (pentru îndepărtarea peretelui celular) se utilizează tratamentul enzimatic al miceliului fungilor filamentoși: se folosește, de obicei, un amestec enzimatic ce conține celulaze, chitinază și β -glucuronidază. Pentru a se asigura viabilitatea protoplaștilor, soluțiile de lucru trebuie să conțină un stabilizator osmotic. Natura acestuia variază în funcție de specia fungică testată (*T. reesei* sau *T. harzianum*) sau de autori: de cele mai multe ori se preferă sorbitolul în concentrație de 1,2 M sau $MgSO_4$ în aceeași concentrație, eficiența protoplastizării fiind de peste 90%. Pentru transformarea propriu-zisă, protoplaștii sunt amestecați cu soluția de ADN transformat și cu o soluție de polietilenglicol (PEG) care stimulează preluarea moleculelor de ADN exogen.

O condiție esențială a experimentelor cu protoplaști este stabilirea condițiilor optime care să asigure regenerarea peretelui celular și apoi multiplicarea celulelor transformate. Eficiența regenerării și deci și a transformării variază și ea în funcție de specia examinată și de markerul de selecție urmărit: 150-400 transformanți / μ g ADN atunci când drept marker s-a utilizat gena *argB* (care restabilește caracterul prototrof al unor mutante auxotrofe) sau 600 transformanți / μ g ADN atunci când markerul urmărit a fost gena *amd S*.

Inconvenientul principal al experimentelor cu protoplaști se referă la sensibilitatea acestora la orice variație a condițiilor de lucru, astfel că eficiența procesului de transformare poate fi foarte mică. Pentru a fi depășite aceste probleme au fost aplicate și alte metode de transformare care presupun folosirea celulelor intacte. Una dintre aceste metode este electroporarea celulelor parțial protoplastizate, în prezența PEG, metoda fiind deja aplicată pentru transformarea mai multor tulpini de *Trichoderma* (Goldman și col., 1990).

O altă metodă de introducere a ADN exogen în celulele fungice este cea a „bombardării” celulelor cu microparticule învelite cu ADN de interes (metoda biolistică). Aplicarea acestei metode asupra celulelor intacte de *Trichoderma harzianum* a condus la obținerea unui randament de transformare 600-800 transformanți / μ g ADN exogen, ceea ce înseamnă cu 30% mai mult decât în cazul utilizării metodei standard de transformare a protoplaștilor (Lorito și col., 1993).

3.2. Vectori de clonare pentru fungi

O condiție ca experimentele de transfer de gene să poată fi posibile este existența unor vectori de clonare specifici.

Primele experimente de transfer de gene realizate la fungi au vizat stabilirea metodologiei de transformare genetică și de selecție a celulelor modificate. Astfel, s-a pus problema existenței unor markeri genetici selectabili și a unor tulpini acceptoare în care ADN de interes să se poată exprima. La început, markerii de selecție utilizați au fost reprezentați de cei de auxotrofie care necesitau utilizarea unor tulpini acceptoare marcate (auxotrofe). Pentru a depăși dezavantajele acestor markeri, au fost realizate experimente în urma cărora s-a reușit elaborarea unui set de markeri dominanți exprimabili într-o gamă largă de gazde („broad host range”)(tabel 1.).

Tabelul 1. Markeri de selecție utilizați în cazul transformării fungilor filamentoși.

Gena marker	Specia de origine	Funcția codificată	Specia transformată
AmdS	<i>Aspergillus nidulans</i>	Acetamidază	<i>A. niger</i> , <i>Trichoderma sp.</i>
Bar	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Fosfinotricin-acetilaza	<i>Neurospora crassa</i>
BenA	<i>Aspergillus nidulans</i>	β-tubulină rezistentă la benomil	<i>Aspergillus nidulans</i>
Ble	<i>Escherichia coli</i>	Proteina de legare la fleomicină	<i>Penicillium chrysogenum</i>
G418	<i>Escherichia coli</i>	Geneticin/neomicin/kanamicin fosfotransferaza	<i>Ustilago maydis</i>
Bml	<i>Neurospora crassa</i>	β-tubulină rezistentă la benomil	<i>N. crassa</i> , <i>Trichoderma sp.</i>
Hph	<i>E. coli</i>	Higromicin B fosfotransferaza	<i>Cephalosporium acremonium</i> , <i>Trichoderma sp.</i>
OliC	<i>Aspergillus nidulans</i>	Subunitatea 9 a ATP-sintetazei mitocondriale	<i>Aspergillus nidulans</i>
OliC	<i>A. niger</i>	Subunitatea 9 a ATP-sintetazei mitocondriale	<i>A. niger</i>
tub A	<i>Septoria nodorum</i>	β-tubulină rezistentă la benomil	<i>Septoria nodorum</i>

Așa cum se poate remarca, majoritatea markerilor se bazează pe rezistența la anumite substanțe chimice, fiind reprezentate fie de gene fungice mutante cum este cea pentru β-tubulina rezistentă la benomil, fie de gene bacteriene de rezistență la antibiotice plasate sub controlul unor semnale de exprimare derivate de la fungi. Un exemplu de vector utilizat pentru transformarea celulelor de *Trichoderma sp.*, pRLM_{EX30}, conține ca marker dominant gena bacteriană de rezistență la higromicină (fig. 3). Gena *hph* se găsește sub controlul unor secvențe reglatoare de la *T. reesei*: promotorul genei pentru piruvat kinaza (*ppki*) și secvența terminatoare a genei pentru celobiohidrolaza II (*tcbh2*) (Mach și col., 1994).

Vectorul prezentat mai jos conține o serie de secvențe din plasmida pUC19, ceea ce înseamnă că este capabil de menținere și multiplicare și în *E. coli* (este vector de tip „navetă”).

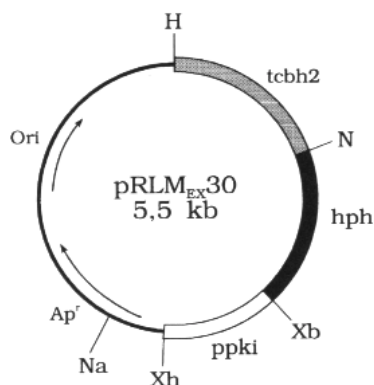


Figura. 3 Reprezentarea schematică a vectorului pRLM_{EX}30 capabil de exprimare în celulele de *Trichoderma sp.*

Dintre markerii de selecție prezentați în tabelul 1 gena *amdS* conferă celulelor purtătoare capacitatea de a utiliza acrilamida sau acetamidaza unică sursă de carbon și azot. În general, fungii nu sunt capabili să utilizeze asemenea compuși astfel că acest sistem de marcarea a celulelor transformate poate fi aplicat la o gamă largă de specii de fungi, inclusiv la *T. reesei* și *T. harzianum*.

În majoritatea cazurilor, după transformare nu se poate realiza selecția directă a transformanților care au primit gena dorită. De aceea, se utilizează anumite gene marker existente fie la nivelul aceleiași molecule de ADN transformant fie pe o altă moleculă de ADN considerată ajutătoare. Experimentele realizate cu fungi au arătat că dacă celulele sunt incubate simultan cu două tipuri de ADN transformant, probabilitatea ca ele să preia ambele categorii de molecule este foarte mare (Fincham și col., 1989). Fenomenul respectiv a primit denumirea de **co-transformare** el necesitând însă cantități mai mari de ADN transformant. În cazul cotransformării la *T. reesei*, s-au obținut rezultate bune atunci când s-au folosit doi markeri selectabili plasați pe două plasmide diferite (Penttila și col., 1987). Abia în 1991 au fost realizate primele experimente reușite de co-transformare, cu o eficiență de aproximativ 50% prin utilizarea unui vector cu un marker selectabil (ADN co-transformant) și a unui vector ce conține gena de interes neselectabilă în mod direct (ADN transformant), raportul dintre cele două tipuri de ADN fiind 1:15 (Kubicek-Pranz și col., 1991).

3.3. Selectarea și caracterizarea transformanților

Deoarece majoritatea protoplaștilor sau alte structuri celulare de la *Trichoderma* sunt multinucleate, în urma procesului de transformare genetică se formează transformanți heterocariotici. În cazul speciilor de fungi filamentoși ce produc conidii uninucleate (de exemplu, la *Aspergillus*), purificarea transformanților este relativ simplă. În cazul speciilor de *Trichoderma* care produc conidii polinucleate selecția transformanților derivați de la un

singur nucleu este mai complicată necesitând cultivarea conidiilor și selecția coloniilor izolate după mai multe pasaje succesive.

Majoritatea plasmidelor utilizate pentru transformarea fungilor filamentoși nu conțin originea replicării în celulele acestora astfel că genele clonate la nivelul lor se pot menține în noile gazde doar dacă se integrează în genomul celular. Analizele biochimice ale ADN cromosomal al transformanților au arătat că integrarea genelor de interes se poate realiza în trei moduri:

- prin integrarea vectorului prin recombinare omoloagă;
- prin integrarea vectorului la întâmplare prin recombinare nelegitimă;
- prin înlocuirea genei.

În primul caz, o parte a plasmidei se recombina cu o regiune din genomul fungic față de care prezintă omologie, frecvența de integrare observat la *T. reesei* fiind de aproximativ 2% (Mach și col., 1995). În urma recombinării se poate integra o singură copie a genei de interes sau două copii ale acesteia, în tandem alături de gena similară, „autohtonă” din genomul țintă (fig. 4).

În cel de-al doilea caz, integrarea plasmidei se face la întâmplare, situația fiind frecventă în cazul în care plasmida nu conține secvențe de ADN omologe cu genomul țintă. Și în acest caz se poate integra o singură copie a ADN exogen sau mai multe copii ale acestuia în tandem, localizarea acestora fiind diferită de a copiei rezidente din genom.

În ceea ce privește cea de-a treia modalitate de integrare, aceasta se referă la înlocuirea secvenței din genom cu copia din plasmida transformantă, fără ca restul plasmidei să se integreze, fenomenul fiind numit și conversie genică.

Integrarea mai multor copii plasmidiale plasate în tandem reprezintă un fenomen larg răspândit la fungii filamentoși. Eficiența procesului de transformare la fungii filamentoși depinde și de conformația moleculară a ADN transformant. Dacă la *Saccharomyces cerevisiae* folosirea ADN linear a condus la obținerea unei frecvențe de transformare mai mare decât cu ADN circular, în cazul tulpinilor de *Trichoderma* testate aceste observații nu sunt adevărate. Cu toate acestea, utilizarea pentru transformare a ADN linear a determinat creșterea ratei evenimentelor de recombinare pe bază de omologie.

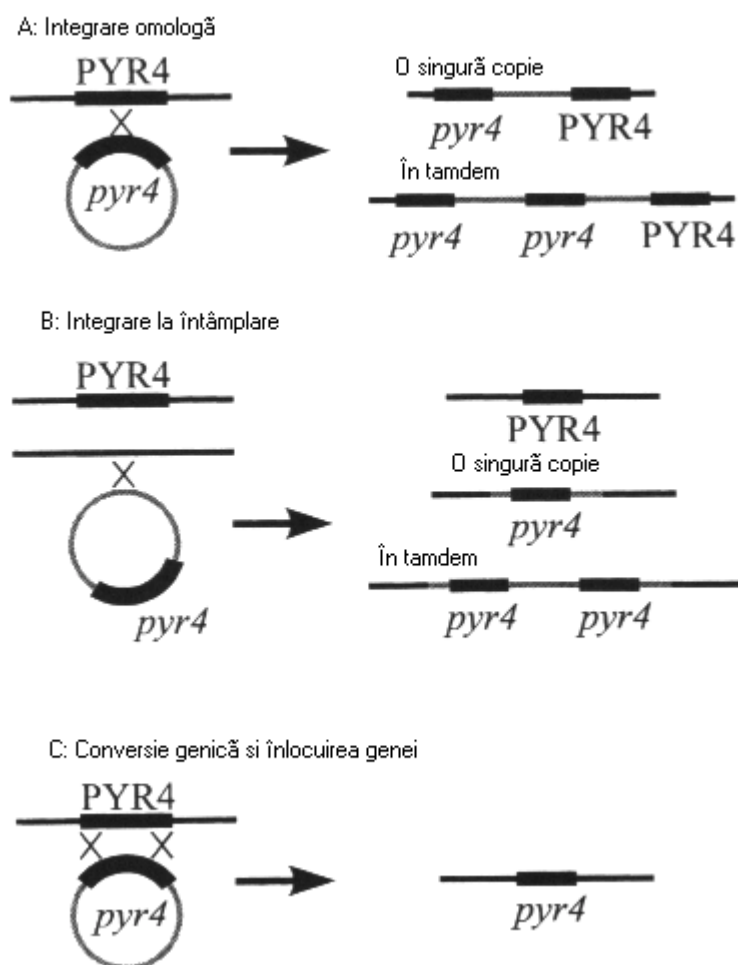


Figura 4. Modalități de integrare a ADN transformant în genomul celulelor țintă.

Toate sistemele de transformare elaborate până acum pentru fungii din genul *Trichoderma* au evidențiat o eficiență convenabilă fiind deci posibilă identificarea anumitor secvențe de interes din bănci de gene. Spre exemplu, pentru a clona gena pentru invertază de la *Aspergillus niger* s-a utilizat drept vector o cosmidă, iar tulpina acceptoare a fost *T. reesei* QM 9414 *ura⁻*. Atât în cazul folosirii cosmidelor cât și în cel al plasmidelor recombinante, nu au fost observate modificări ale acestora în tulpinile de *Trichoderma* folosite drept gazde.

Așa cum s-a menționat deja, sistemele de transformare și integrare a ADN transformant reprezintă instrumente de bază pentru studiile moleculare referitoare la caracterizarea genetică a diferitelor tulpini de fungi filamentoși cât și pentru îmbunătățirea însușirilor tulpinilor de interes biotehnologic.

3.4. Obținerea de tulpini de *Trichoderma* recombinate prin fuziunea protoplaștilor

Inducerea fenomenelor de parasexualitate la fungi prezintă un mare interes deoarece poate permite obținerea de tulpini recombinate cu caracteristici îmbunătățite, utile pentru biosinteza unor cantități sporite de compuși de interes biotehologic sau mai eficiente în procesele de biocontrol (Migheli și col., 1995, Harman și col., 1998). Așa cum s-a menționat într-un capitol anterior, fenomenul de parasexualitate poate fi realizat *in vitro* prin fuziunea protoplaștilor care permite obținerea de heterocarioni. De obicei, pentru fuziune se folosesc tulpini microbiene mutante, auxotrofe, iar pentru selectarea recombinanților se urmărește complementația genică și apariția de tulpini prototrofe, procesul de fuziune fiind indus de prezența CaCl₂ și a PEG (polietilenglicolului).

La fungii din genul *Trichoderma* procesul de fuziune se poate realiza atât prin utilizarea protoplaștilor izolați de la aceeași tulpină microbiană (autofuziune) sau de la tulpini diferite, în ambele situații fuziunea fiind intraspecifică, cât și prin utilizarea protoplaștilor izolați de la specii diferite (fuziune interspecifică).

Atunci când pentru fuziune s-au folosit protoplaști de la aceeași tulpină (mutante auxotrofe diferite), s-au obținut, cu o frecvență foarte mare, tulpini prototrofe la care s-a realizat fenomenul de complementație genică și care sunt identice din punct de vedere fenotipic cu tulpinile parentale prototrofe. Totuși, din punct de vedere genetic, fuzionații sunt diferiți de tulpinile de origine ei fiind heterocarioni, iar între nuclei nu s-a produs recombinarea genetică. În cazul în care protoplaștii provin de la tulpini diferite rezultatele fuziunii au fost diferite: coloniile regenerare cresc mult mai greu, devenind vizibile după cel puțin o săptămână de cultivare pe mediu minimal, iar atunci când ele sunt trecute pe mediu proaspăt, multe dintre ele formează sectoare cu morfologie diferită. Prin urmare, fuzionații prezintă un anumit grad de instabilitate ceea ce conduce la apariția unei mari diversități fenotipice a tulpinilor progene.

Analiza genetică a fuzionaților obținuți a arătat un profil electroforetic al unor izoenzime asemănător cu al uneia dintre tulpinile parentale, ca de altfel și profilul electroforetic al cromosomilor conținuți.

În cazul în care fuziunea s-a realizat între protoplaști ce provin de la specii diferite de *Trichoderma*, rezultatele obținute au fost paradoxale: s-a obținut o mare diversitate și instabilitate fenotipică dar, analizele genetice ale fuzionaților au evidențiat că aceștia nu au suferit recombinare și prezintă asemănări foarte mari cu una dintre tulpinile parentale. Cu toate acestea, pentru a explica modificările fenotipice ce apar în cazul fuzionaților interspecifici a fost propus mecanismul transferului interspecific de gene. Acest mecanism presupune că în celulele fuzionate are loc degradarea preferențială a nucleilor uneia dintre tulpinile parentale, proces în cursul căruia sunt produse mai multe fragmente de ADN nuclear. Aceste fragmente se integrează ulterior în genomul celeilalte tulpini conducând la apariția de noi genotipuri. În ceea ce privește „soarta” fragmentelor de ADN străin, se pare

că acestea se mențin pentru un timp în genomul fuzionaților, probabil sub forma unor plasmide lineare putând fi ulterior pierdute sau integrate stabil la nivelul unor situsuri cromosomale. Consecințele acestor fenomene sunt, pe de o parte instabilitatea fuzionaților și, pe de altă parte marea variabilitatea fenotipică a progenilor (Hayes și col., 1998).

În continuare vor fi prezentate o serie de aspecte legate de particularitățile biochimice ale unor enzime de interes biotehnologic produse de tulpinile de *Trichoderma*, de genele codificatoare, precum și de aplicațiile acestora în domenii variate.

4. Enzime de interes biotehnologic produse de fungii filamentoși din genul *Trichoderma*

Fungii filamentoși din genul *Trichoderma* sunt capabili de a degrada o gamă foarte variată de substraturi naturale datorită faptului că pot sintetiza și apoi elibera în mediu categorii variate de enzime: endochitinază, chitobiozidază, β -N-acetilhexozaminidază, N-acetil- β -galactozaminidază, β -1,3-glucanază, β -1,6-glucanază, protează, DN-ază, RN-ază, α -amilază, celulază, lipază, manază, xilanază, urează, pectinază, pectinliază, lacază, peroxidază și mutanază.

Dintre enzimele produse de aceste microorganisme, celulele și chitinazele prezintă un mare interes biotehnologic. Alături de enzime, fungii din genul *Trichoderma* produc o serie de metaboliți primari (aminoacizi, glucide, acizi grași, acizi nucleici) sau secundari (poliketide, terpene, compuși fenolici, alcaloizi, compuși derivați de la aminoacizi etc), dintre care unii au efecte antifungice, antivirale, antibacteriene putând fi folosiți pentru obținerea de biopreparate cu utilizări variate.

Cu toate acestea, cele mai multe aplicații actuale ale fungilor din genul *Trichoderma* se datorează enzimelor pe care aceste microorganisme le produc și le secretă în mediu.

4.1. Particularitățile secreției proteinelor la *Trichoderma* sp.

La levuri și în celulele animale, proteinele secretoare sunt sintetizate la nivelul ribosomilor legați la reticulul endoplasmic (RE), de unde sunt apoi translocate în lumenul RE printr-un mecanism mediat de sistemul secvență semnal-receptor. La nivelul RE, proteine suferă o serie de modificări posttraducere ce conduc în final la activarea proteinelor respective și la secreția lor în spațiul extracelular.

Studiile de microscopie electronică efectuate asupra fungilor filamentoși (*Aspergillus niger* și *Trichoderma* sp.) au evidențiat faptul că mecanismele secretorii prezintă aceleași caracteristici de bază ca și mecanismele descrise pentru levuri și celulele eucariotelor superioare (Hemming, 1995)(fig. 5).

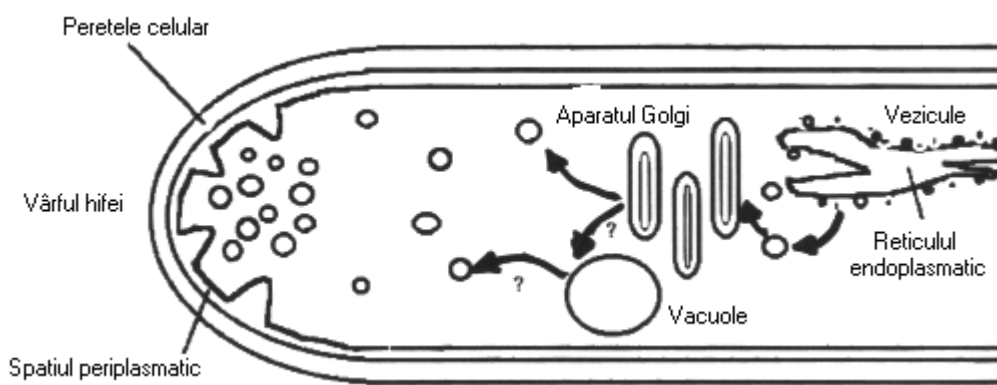


Figura 5. Reprezentarea schematică a procesului de secreție proteică la fungii filamentoși (după Palamarczyk și colab., 1998).

Astfel, proteinele ce vor fi secretate sunt trecute în interiorul RE printr-un mecanism de translocare. Secreția este mediată de peptide semnal, evidențiindu-se faptul că toate proteinele fungice secretate conțin secvențe de recunoaștere pentru clivarea proteolitică, localizate la extremitatea amino-terminală (tabelul 2).

Tabelul 2. Exemple de exoproteine produse de tulpini de *Trichoderma* (după Palamarczyk și col., 1998).

Enzima	Organismul	Secvența de aminoacizi a regiunii pre-pro a proteinei
Celobiohidrolaza I	<i>T. reesei</i>	MYRKLAVISAFLATARA <u>Q</u> SA ..
Celobiohidrolaza I	<i>T. viride</i>	MYQKLALISAFLATARA <u>Q</u> SA ..
Celobiohidrolaza II	<i>T. reesei</i>	MIVGILTTLATLATAASVPLEER <u>Q</u> AC ...
Endoglucanaza I	<i>T. reesei</i>	MAPSVTLPLTTAILAIARLVAA <u>Q</u> QP
β -glucozidaza I	<i>T. reesei</i>	MRYRTAAALALATGPFARADSHSTSGASAE <u>A</u> VVP...
33kDa endochitinaza	<i>T. harzianum</i>	MPSLVTAALASLLALVPSALAGWNVNS <u>K</u> QNA ...
Serin proteinaza	<i>T. harzianum</i>	MTSJRRLLALYLGALLPAVJA <u>A</u> PA

Secvențele semnal necesare pentru secreție sunt indicate prin litere italice; secvențele subliniate indică situsul de clivare proteolitică; litera îngroșată marchează primul aminoacid din proteina matură (activă).

La nivelul membranei RE se găsesc enzimele responsabile de procesul de glicozilare al proteinelor, iar în lumenul RE există enzimele implicate în împachetarea proteinelor (de exemplu, protein disulfid-izomeraza, peptidil proil izomeraza sau unele chaperone). După translocarea precursorului proteic în lumenul RE și eliminarea secvenței semnal, proteinele secretate sunt supuse unor prelucrări posttraducere: de exemplu, O- sau N- glicozilare, formarea de punți disulfidice sau rearanjări structurale. O parte dintre genele ce codifică

enzimele implicate în procesele menționate au fost identificate și la *Trichoderma* (Punt și col., 1996).

O altă etapă a procesului de secreție este transportul proteinei secretate din RE în aparatul Golgi prin intermediul unor vezicule specifice. Recent, au fost identificate genele de la *Aspergillus niger* și *Trichoderma sp.* implicate în acest proces: *sar 1-A* și, respectiv *sar T*, ambele codificând o proteină de legare a GTP (Punt și col., 1996, Saloheimo și col., 1996).

La nivelul aparatului Golgi au loc următoarele modificări posttraducere ale proteinele secretate: prelucrări proteolitice ce se produc la nivelul unor situsuri specifice (proces realizat de proteazele de tip Kex2) (tabelul 2) și finalizarea procesului de O-glicozilare (Goller și col., 1997). Procesele menționate sunt foarte importante pentru secreția proteinelor: de exemplu, inhibarea proteazelor Kex2 determină scăderea procesului de secreție și acumularea simultană a formei neclivate a proteinei respective (Goller și col., 1997).

În final, după parcurgerea tuturor compartimentelor aparatului Golgi, veziculele de secreție transportă proteinele la nivelul unor regiuni țintă cum ar fi vacuolele sau membrana plasmatică. Clonarea genelor ce codifică proteinele de legare a GTP (implicate în transportul proteinelor prin vezicule) a adus argumente suplimentare care se adaugă dovezilor de microscopie electronică pentru existența veziculelor secretorii la *Trichoderma* (Kurzatkowski și col., 1996). Veziculele fuzionează la nivelul vârfurilor hifelor cu membrana plasmatică și eliberează conținutul lor în spațiul periplasmic.

Importanța procesului de secreție a proteinelor este evidentă mai ales atunci când se dorește obținerea unor cantități mari dintr-o anumită substanță. Pentru clarificarea procesului de secreție au fost izolate mai multe categorii de mutante secretorii, cum ar fi mutantele termosensibile (incapabile de secreție la temperaturi nepermissive) și cele hipersecretoare. De asemenea, s-a observat faptul că, la tulpinile de *Trichoderma* există o serie de variații în ceea ce privește secreția anumitor enzime: de exemplu, creșterea temperaturii de cultivare reduce secreția celulelor dar stimulează secreția xilanazelor (Merivouri și col., 1990).

După ce procesul de secreție s-a încheiat, o mare parte a proteinelor extracelulare rămân asociate cu peretele celular pe parcursul perioadei de creștere. Acest fenomen a fost observat în cazul mai multor proteine sintetizate de tulpinile de *Trichoderma*, β -glucozidaza fiind un model de studiu extrem de util. S-a dovedit astfel că, la fungii filamentoși, aproximativ 80% din β -glucozidaza extracelulară rămâne asociată cu peretele celular, procesul reprezentând un inconvenient atunci când se dorește obținerea unor cantități mari de enzime extracelulare.

O caracteristică a proteinelor extracelulare produse de fungii din genul *Trichoderma* este aceea că ele sunt glicozilate. Spre exemplu, toate celulele investigate conțin oligozaharide atașate la catena polipeptidică prin legături N-glicozidice. În plus, s-a dovedit că la nivelul celobiohidrolazei I de la *T. reesei* există mai multe situsuri de N-glicozilare

precum și situsuri de O-glicozilare. Importanța glicozilării pentru stabilitatea termică sau proteolitică, pentru secreția eficientă ca și pentru activitatea biologică diferă în funcție de glicoproteina studiată. Este în general acceptată ideea că oligoglucidele reprezintă factori determinanți pentru conformația glicoproteinei; atunci când structurile glucidice sunt absente sau alterate, se formează o nouă conformație ceea ce conferă glicoproteinei noi proprietăți (Palamarczyk și col., 1998).

4.2. Enzimele chitinolitice

Enzimele chitinolitice sunt prezente la protiste, bacterii, fungi, plante, nevertebrate și vertebrate, inclusiv omul. Chitina, un homopolimer al N-acetil-D-glucozaminei cu legături β - (1-4), este unul dintre cei mai numeroși polimeri din biosferă. Degradarea enzimatică a chitinei este implicată în numeroase procese biologice, cum ar fi autoliza, morfogeneza și nutriția. În relațiile dintre organisme, interacțiunile plante - fungi, insecte - fungi și fungi - fungi degradarea enzimatică are un rol foarte important.

4.2.1. Particularitățile biochimice ale enzimelor chitinolitice

Fungii din genul *Trichoderma* sunt bine cunoscuți producători de enzime chitinolitice și sunt utilizați ca surse ale acestor proteine. Interesul pentru aceste enzime este stimulat de faptul că fungii chitinolitici din genul *Trichoderma* sunt printre cei mai eficienți agenți de control biologic ai bolilor plantelor de cultură.

Studierea enzimelor chitinolitice produse de *Trichoderma* a luat amploare în ultimii ani, pornind de la purificarea și caracterizarea proteinelor active și ajungând la clonarea secvențelor de nucleotide codificatoare. Numeroase laboratoare din întreaga lume utilizează aceste enzime în diferite strategii de biocontrol și studiază mecanismul antagonismului și micoparazitismului fungic.

4.2.1.1. Nomenclatura enzimelor chitinolitice

Toate enzimele capabile să catalizeze degradarea chitinei sau chito oligomerilor prin hidroliza legăturilor β -(1-4) ale N-acetilglucozaminei sunt definite ca enzime chitinolitice și sunt diferențiate în funcție de produșii finali de reacție:

➤ **Endochitinaza (EC 3.2.1.14)** corespunde definiției chitinazei din Enzyme Nomenclature (Webb, 1992). Chitinaza clivează aleator chitina și oligomerii de chitină și eliberează un amestec de produși finali solubili cu masă moleculară mică, cu dimensiuni diferite; produșii finali conțin în principal diacetilchitobioză (GlcNAc)₂ (fig. 6 A). Termenul de chitinază ar trebui utilizat doar pentru a indica activitatea endochitinazică.

➤ **Chitin 1,4-β-chitobiozidaza (chitobiozidaza)** este un nume nou pentru activitatea unei exochitinaze deja descrise (fig. 6 B). Acesta clivează chitina și oligomerii de chitină [(GlcNAc)_{≥3}] progresiv de la capătul nereducător și eliberează doar (GlcNAc)₂. Termenul chitobiozidază nu este recunoscut oficial și numerotat de EC, este derivat prin analogie de la nomenclatura enzimelor celuloitice - celulozo 1,4-β-celobiozidaza (EC 3.2.1.91) și ar trebui preferat termenului chitobiohidrolază, care evocă clasificarea sistematică a celulazelor (Webb, 1992). Chitobiozidazele produse de *Trichoderma*, care au fost caracterizate, diferă față de enzimele chitinolitice în ceea ce privește specificitatea de substrat, secvența de aminoacizi, activitatea antifungică, proprietățile serologice și alte caracteristici.

➤ **β-N-acetilhexozaminidaza (EC 3.2.1.52)** include enzime care clivează chitina și oligomerii de chitină progresiv de la capătul nereducător și eliberează doar monomeri de N-acetilglucozamină (GlcNAc) (fig. 6 C). Acest termen se referă la enzime cu activitate similară pe N-acetilgalactozide. Astfel, această enzimă este un tip de exoenzimă care diferă de chitobiozidază și este singura enzimă capabilă să cliveze dimerii (GlcNAc)₂. Termenul sinonim chitobiază trebuie evitat pentru că poate fi confundat cu chitobiozidaza, iar termenul N-acetil-β-D-glucozaminidaza nu mai este recomandat de Enzyme Nomenclature (Webb, 1992).

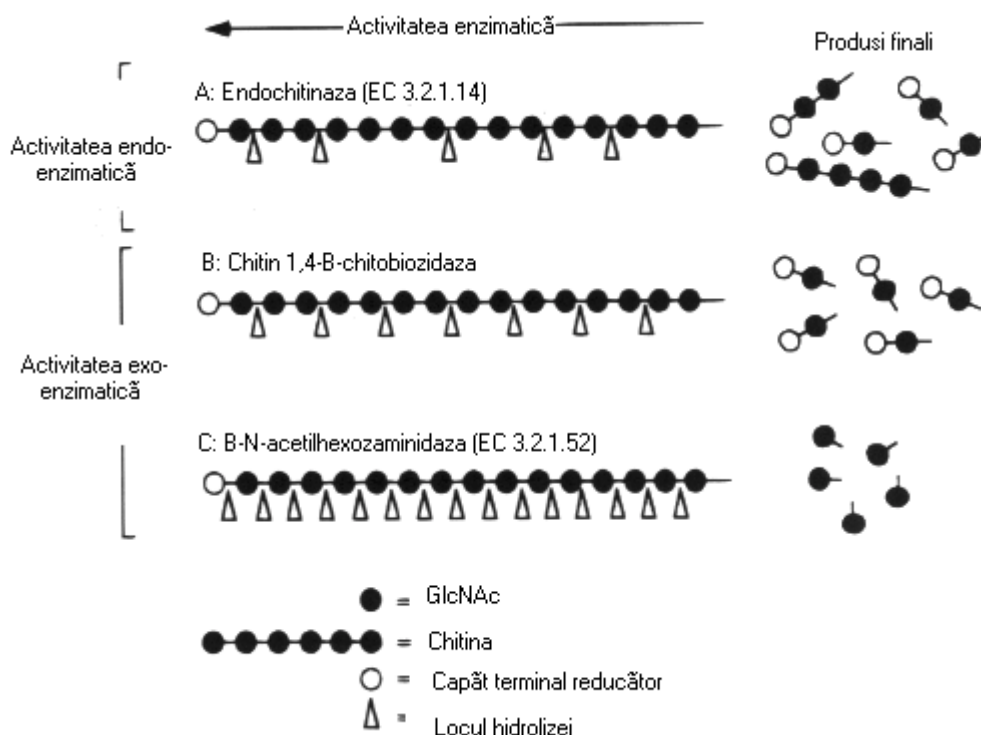


Figura. 6. Mecanismul acțiunii enzimelor chitinolitice produse de fungii din genul *Trichoderma*.

Testarea, purificarea și caracterizarea enzimelor chitinolitice produse de *Trichoderma* se poate face pe substraturi ca: p-nitrofenil chito oligomeri, chitină pură sau pereți celulari fungici, derivați 4-metilumbeliferil (De La Cruz și colab., 1992; Harman și colab., 1993).

Utilizarea chitinei purificate și substraturilor sintetice poate afecta specificitatea activității enzimei pentru că interacționează "nenatural" cu situsurile catalitice, ceea ce duce la obținerea unor informații inexacte despre modul de acțiune al enzimei. Dacă se utilizează chitina, care-și păstrează structura nativă, preparată din fungii antagoniști sau gazdă poate fi studiat mecanismul de acțiune al enzimelor chitinolitice produse de *Trichoderma* prin examinarea produșilor finali de reacție (De la Cruz și colab., 1992). Astfel se poate stabili dacă endochitinazele, chitobiozidazele sau β -N-acetilhexozaminidazele exercită în natură același mod de acțiune cu cel manifestat *in vitro*, fapt care ar facilita înțelegerea rolului lor în biologia acestor fungi.

Sistemul chitinolitic de la *T. harzianum* a fost cel mai studiat. Enzimele au fost identificate și caracterizate prin examinarea electroforetică în gel de poliacrilamidă. Ele au fost împărțite în două grupe:

- grupa I - include enzime cu masa moleculară mai mare de 60 kDa (CHIT 102, CHIT 64, CHIT 72, CHIT 73), toate fiind β -N-acetilhexozaminidaze;
- grupa II - include enzime cu masa moleculară mai mică de 60 kDa (CHIT 52, CHIT 42, CHIT 41, CHIT 40, CHIT 37, CHIT 33, CHIT 31, CHIT 28), care sunt în principal endochitinaze.

Cele mai răspândite enzime chitinolitice la diferitele tulpini de *T. harzianum* sunt β -N-acetilhexozaminidazele din grupa I și unele endochitinaze (CHIT 42, CHIT 33) din grupa II.

4.2.1.2. Mecanismul inducției enzimatic

Mecanismul inducției enzimelor chitinolitice de la *Trichoderma* nu este pe deplin elucidat, însă în urma testării *in vitro* s-a constatat că enzimele chitinolitice extracelulare sunt induse prin creșterea fungilor pe chitină purificată, pereți celulari fungici sau miceliu ca unice surse de carbon. În timp ce, dacă fungii sunt crescuți pe celuloză, chitină nepurificată, chitozan sau laminarină inducția nu se realizează sau este foarte mică, ceea ce indică o inducție specifică. Mecanismul de inducție poate să difere de la o enzimă la alta. Astfel, N-acetil-glucozamina induce specific producerea de β -N-acetil-glucozaminidază nu și endochitinază sau chitobiozidază în *T. harzianum* (Ulhoa și Peberdy, 1991).

In vitro sinteza diferitelor enzime chitinolitice este represată prin creșterea cantității de glucoză, zaharoză și produși finali ceea ce sugerează că sinteza enzimelor este specific reglată prin represia catabolică.

Nivelul inducției și producției diferitelor enzime (CHIT 102, CHIT 72, endochitinaze) la *T. harzianum* în timpul activității micoparazitice sunt specifice pentru

fiecare tip de gazdă cu care interacționează aceasta (Inbar și Chet, 1995). Inbar și Chet (1992, 1995) au demonstrat că sinteza enzimelor chitinolitice la tulpini micoparazite de *T. harzianum* este condiționată de interacțiunea mediată de lectine cu gazda.

Inducția biosintezei de celulază poate fi stimulată de lumină, sporulare, și /sau contactul fizic dintre celule și substrat insolubil. De asemenea, sinteza enzimelor chitinolitice poate fi afectată și de inducerea altor enzime cum ar fi proteinaze și glucaze.

În concluzie, nu există un singur tip de mecanisme de inducție, dar sinteza enzimelor chitinolitice poate fi indusă atât prin stimuli specifici (recunoașterea lectinelor, contactul cu substratul, formarea chitooligomerilor sau interacțiunile specifice cu alte microorganisme), cât și nespecifici (lumina, sporularea, stresul datorat epuizării nutrienților sau antagonismul).

4.2.1.3. Producerea, purificarea și caracterizarea enzimelor chitinolitice

Enzimele chitinolitice produse de *Trichoderma* se obțin prin cultivarea fungilor pe diferite substraturi, care conțin în principal săruri minerale și diferite surse de carbon și azot: pereți celulari fungici purificați, miceliu autoclavat și extract de ciuperci macroscopice. Caracterizarea enzimelor se face cu ajutorul diferitelor tehnici de analiză: gel cromatografie, cromatografie de afinitate, determinarea punctului izoelectric, HPLC, precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, etc.

Proprietățile fizico-chimice ale enzimelor chitinolitice sunt tipice:

- masa moleculară este cuprinsă între 20 - 100 kDa;
- prezența N-glicozilării (este asociată cu stabilitatea mare a enzimelor);
- valoarea optimă de pH și temperatura optimă de acțiune sunt 4,0-5,5, respectiv 40° - 60 °C;
- sensibilitate la unele proteinaze;
- nu necesită cofactori pentru acțiune și sunt inhibate doar de ioni de Zn^{2+} și de EDTA;
- cu excepția lui CHIT 52 și CHIT 102 sunt termorezistente.

Endochitinazele, chitobiozidazele și β -N-acetilhexozaminidazele pot degrada chitina coloidală, pereți celulari purificați, chitooligomeri. Pereții celulari chitinoși reprezintă substratul cel mai bun pentru endochitinaze, decât pentru chitobiozidaze sau β -N-acetilhexozaminidaze. Chitooligomerii $(\text{GluNAc})_{\geq 3}$ pot fi clivați de toate cele trei enzime, dar β -N-acetilhexozaminidazele acționează mai încet asupra chitinei coloidale. $(\text{GluNAc})_2$ este un bun substrat pentru β -N-acetilhexozaminidaze, dar nu este clivat de endochitinaze sau chitobiozidaze, deci poate fi folosit pentru diferențierea activității enzimelor. De asemenea, mărimea produșilor finali (GluNAc) , $(\text{GluNAc})_2$, sau amestec de diferite mărimi poate diferenția activitatea celor trei enzime.

4.2.1.4. Activitatea litică și antifungică a enzimelor chitinolitice produse de *Trichoderma* sp.

Enzimele CHIT 42, CHIT 40 și CHIT 72 produse de *T. harzianum* și *T. virens* au efect inhibitor asupra germinării și alungirii hifelor mai multor fungi patogeni, printre care și *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Ustilago avenae*, *Uncinula necator* (Schirmbock și colab., 1994).

Endochitinazele sunt printre cele mai eficiente enzime chitinolitice cu activitate antifungică și litică. Activitatea enzimatică mare a tulpinilor de *Trichoderma* față de cea a plantelor, bacteriilor sau altor fungi testați în aceleași condiții sugerează că enzimele produse de acestea au un rol important în activitatea biologică, atât în procesele de nutriție, cât și în procesele defensive. După tratarea unor hife cu amestec enzimatic au fost observate diferite modificări morfologice precum: umflarea, necrozarea și vacuolizarea acestora (Lorito și colab., 1993). Enzimele produse de *Trichoderma* sunt capabile să degradeze pereții chitinoși duri ai hifelor mature, conidiilor, clamidosporilor și scleroților. Aceste observații reprezintă una dintre cele mai bune dovezi a faptului că enzimele chitinolitice sunt implicate în micoparazitismul speciilor de *Trichoderma*.

4.2.1.5. Interacțiile sinergice

Relațiile sinergice sunt adesea prezente între moleculele biologice active, care acționează împreună pentru a îndeplini o sarcină specifică (de exemplu, în antibioză). Enzimele chitinolitice nu fac excepție, sinergismul lor fiind observat în procese biologice (în apărarea plantelor față de atacul fungilor) și utilizat în aplicații biotehnologice (în îmbunătățirea rezistenței plantelor la boli sau biocontrolul cu microorganisme) (Brogie și colab., 1991).

Enzimele chitinolitice de la *Trichoderma* au capacitatea de-a mări efectul antifungic și al altor compuși sau microorganisme, ceea ce le face să fie foarte importante pentru aplicațiile în biocontrol. De exemplu, chitinazele din grupa I sunt sinergice cu compuși de tipul osmotinei (proteine PR din plante), care afectează membrana celulară în inhibarea fungilor. Antibioticele produse de *Trichoderma* și *Gliocladium*, trichorzianina A, trichorzianina B, respectiv gliotoxina, care afectează membrana celulară pot fi induse cu ajutorul enzimelor. Metaboliții și antibioticele de la alte microorganisme precum gramicidina, valinomicina și fosfolipaza, care alterează permeabilitatea și structura membranei interacționează sinergic cu sistemul enzimatic de la *Trichoderma*. Fungicidele chimice, flusilazol și miconazol, care acționează tot asupra funcțiilor și structurii membranei, sunt sinergice cu aceste enzime, astfel că prin adăugarea a 10μg /ml de CHIT 42 activitatea fungicidă este crescută cu aproape 50% (Lorito și colab., 1994). Bacteria

Enterobacter cloacae folosită ca agent de biocontrol mărește activitatea enzimelor CHIT 42 și CHIT 40 atunci când se leagă la hifele patogenului.

Se pot trage două concluzii principale:

- sistemul chitinolitic de la *Trichoderma* este eficient în degradarea pereților celulari sau a altor substraturi care conțin chitină. Acest sistem este asociat cu producerea diferiților metaboliți, inclusiv alte enzime care degradează pereții celulari, antibiotice și compuși de autoapărare (Qid 3 proteină legată de peretele celular, care este co-indusă cu enzimele chitinolitice, și care acționează ca inhibitor al activității chitinazei față de pereții celulari ai ciupercii *Trichoderma*). Atunci când aceste molecule acționează sinergic, ele pot constitui o "unealtă" puternică pentru antagonism și saprofitism și pot oferi o explicație pentru paradoxul dintre concentrațiile scăzute ale compușilor și activitatea antifungică mare care are loc *in vivo*;

- aceste studii au un mare număr de aplicații: îmbunătățirea rezistenței plantelor la boli și a abilității microorganismelor în biocontrol; formularea unor fungicide noi care să conțină chimicale (într-o concentrație mică) și enzime utilizate ca aditivi.

4.2.2. Genele ce codifică enzimele chitinolitice

Prima genă ce codifică o enzimă chitinolitică de la *Trichoderma* a fost clonată și secvențializată în 1994 (Garcia și colab., 1994, Hayes și colab., 1994) după care cercetările s-au intensificat din următoarele motive:

- clonarea acestor gene este relativ simplă deoarece enzima clonată a fost purificată și caracterizată;

- secvențele codificatoare sunt mici și deci mai ușor de manipulat;

- transcrierea poate fi indusă la un nivel ridicat prin utilizarea unui substrat adecvat;

- se pare că genele sunt localizate la nivelul unui singur locus, într-un singur exemplar și prezintă un anumit grad de omologie cu gene similare de la alte organisme;

- secvențele clonate pot fi exprimate și în alte specii de fungi, în drojdii, bacterii sau plante în scopul obținerii de enzime utile în cantități mari.

O parte dintre genele ce codifică enzime endochitinolitice au fost izolate de la diferite tulpini de *T. harzianum*, ele fiind notate *ThEn-42*, *chit 42*, *ech-42*, *chit 33* sau *chi 1*. Intre genele ce codifică exochitinaze, gena *nag 1* este implicată în sinteza enzimei CHIT72, enzimă care are efect antifungic (Peterbauer și colab., 1996). De asemenea, au fost izolate și clonate mai multe gene ce codifică β -N-acetilhexozaminidaze: *exc2* și *exc1*. Gene similare care codifică fie endochitinaze fie exochitinaze au fost izolate și de la alte specii de *Trichoderma*, cum ar fi *T. hamatum* (Fekete și col., 1996).

Cercetările asupra genelor clonate au evidențiat faptul că acestea codifică proteine formate din aproximativ 320-600 aminoacizi. Aceste proteine sunt de fapt precursori ai proteinelor funcționale (sunt pre-pro-proteine), ele suferind o serie de prelucrări

posttraducere în urma cărora sunt eliminate anumite porțiuni ale catenelor polipeptidice inițiale. Aceste prelucrări asigură activarea sau secreția proteinelor respective. Astfel, chitinazele conțin la extremitatea amino-terminală o secvență hidrofobă alcătuită din 20 aminoacizi care corespunde, se pare, unei secvențe semnal (așa numita secvență „pre”) necesară eliminării în mediul extracelular ce este îndepărtată în cursul secreției proteinei. De asemenea, este interesant faptul că enzimele codificate de genele *ThEn-42*, *ech-42*, *chit42* și *tham-ch* conțin fiecare câte o secvență suplimentară formată din 12 aminoacizi, localizată tot la extremitatea NH₂, cu puternic caracter hidrofob (secvența „pro”). Această secvență este probabil clivată în urma acțiunii unei proteaze, proces corelat cu reglarea activității enzimatică.

De asemenea, la nivelul genelor ce codifică endochitinaze sau β -N-acetil-hexozaminidaze se află doi sau trei introni (Peterbauer și colab., 1996).

Cu toate progresele înregistrate în izolarea, clonarea și caracterizarea genelor codificatoare, până în prezent se cunosc puține lucruri despre mecanismul de reglare al exprimării genelor respective. Cele mai multe rezultate au fost obținute în urma cercetărilor efectuate asupra genelor ce codifică endochitinaza CHIT42: de exemplu, gena *ech-42* este puternic indusă de chitină, lumină sau de interacțiunea cu gazda parazitată (în cazul tulpinilor micoparazite) și represată de glucoză, fenomen evidențiat și în cazul altor gene similare. Din acest punct de vedere, se poate spune că genele ce codifică enzimele chitinolitice prezintă un reglaj de tip represie prin catabolit.

Aplicarea sistemelor de transformare descrise într-un capitol anterior a permis obținerea unor tulpini recombinante genetic capabile de a produce cantități sporite de enzime chitinolitice (Draborg și col., 1996, Margolles-Clark, 1996).

4.2.3. Rolul enzimelor chitinolitice și al genelor codificatoare

Rolul sistemului enzimatic chitinolitic în biologia fungilor filamentoși din genul *Trichoderma* este intens studiat de multe grupuri de cercetători din lume, stabilindu-se că aceste enzime sunt implicate în morfogeneză, în antagonism, în micoparazitism precum și în creșterea saprofită.

Cercetările efectuate asupra implicării chitinazelor fungice în procesele morfogenetice au condus la observația că ele participă la procesul de alungire al hifelor, la separarea celulelor, ramificare, plasmogamie, germinare, formarea sporangiului ca și în răspunsul celular la leziunile mecanice și autoliză. O parte dintre enzimele sistemului chitinolitic, atât cele de tip exochitinaze cât și endochitinazele sunt localizate intracelular, în spațiul periplasmic sau în membrana plasmatică și asigură echilibrul față de activitatea chitin-sintetazică.

În ceea ce privește rolul chitinazelor secretate în mediul extracelular, acestea asigură degradarea substraturilor de tip chitină (de exemplu, miceliul fungic), fiind induse în cursul

„înfometării” celulelor fungice, repesate de nutrienți simpli și sintetizate simultan cu alți produși cu care acționează sinergic în cursul proceselor de nutriție sau antagonism. Cercetări relativ recente au adus o serie de dovezi experimentale referitoare la implicarea sistemului chitinolitic produs de tulpinile de *Trichoderma* în procesele de micoparazitism, antagonism și biocontrol. Astfel, interacțiile de tip micoparazitism realizate „in vitro” induc puternic exprimarea genelor ce codifică enzimele chitinolitice în primele ore de la contactul intercelular și, se pare că ele sunt implicate în infectarea și apoi omorârea gazdei. Mai mult, miceliul sterilizat prin autoclavare determină inducerea puternică a transcrierii genei *chit42* în cazul tulpinilor de *Trichoderma* micoparazite dar nu și în cazul celor care nu au această caracteristică (Garcia și col., 1994). De asemenea, activitatea chitinolitică crescută a unor tulpini de *T. harzianum* determină o sporire și a acțiunii antagonice a acestor tulpini „in vitro” (Limon și col., 1996).

Cercetările efectuate de Chet și col.(1993) au evidențiat faptul că prin clonarea genei care codifică sinteza chitinazei CHIT42 în *Escherichia coli* s-au obținut o serie de bacterii recombinante în care gena respectivă se exprimă conferind bacteriilor capacități de biocontrol. În plus, purificarea enzimelor chitinolitice nu numai că nu elimină activitatea inhibitorie ci asigură inhibarea unei game foarte variate de fungi.

Cu toate informațiile existente în prezent asupra rolului sistemului chitinolitic în activitatea tulpinilor de *Trichoderma*, există încă multe necunoscute legate mai ales de aspectele moleculare ale reglării biosintezei acestor enzime, de mecanismul de acțiune al componentelor sistemului în procesul de biocontrol în vederea depășirii limitelor de până acum și a exploatării întregului potențial genetic al acestui gen de fungi filamentoși. De aceea, optimizarea sistemelor de transformare genetică, izolarea și clonarea unor gene fungice sau doar a unor promotori va permite pe viitor determinarea rolului enzimelor ce alcătuiesc sistemul chitinolitic prin utilizarea unor tulpini marcate obținute prin mutagenză. În plus, regiunile promotor ce conțin secvențe reglatoare pot fi fuzionate cu gene de referință (gene marker) ce codifică compuși ușor detectabili *in situ* (Spelligt și col., 1996) ceea ce va conduce la identificarea și caracterizarea factorilor reglatori ai exprimării genelor respective.

4.2.4. Aplicații biotehnologice ale enzimelor chitinolitice

Fungii și insectele, spre deosebire de plante și vertebratele superioare, conțin în structura lor o proporție însemnată de chitină. În plus, anual sunt produse peste un milion de tone de deșeuri de chitină care se adaugă surselor naturale. Astfel, enzimele chitinolitice și genele care le codifică prezintă o serie de aplicații în domeniul controlului bolilor la insecte și la plante, pentru degradarea biomasei și producerea unor biopolimeri. Enzimele chitinolitice produse de tulpinile de *Trichoderma* sunt stabile, ușor de manipulat, netoxice, active asupra unei game variate de substraturi și de fungi fitopatogeni, acționând sinergic cu

alte enzime sau compuși neenzimatici, sunt codificate de câte o singură genă (monogenice) de dimensiuni reduse, exprimabile în gazde variate.

O direcție importantă a utilizării a enzimelor chitinolitice este reprezentată de industrie și medicină. Astfel, chitinazele produse de *Trichoderma* pot fi folosite pentru degradarea deșeurilor ce conțin chitină rezultate din prelucrarea moluștelor în vederea obținerii unor aditivi alimentari, a unor substraturi de creștere și a unor medicamente utilizabile în tratarea unor tulburări gastrointestinale la oameni sau la animale (Aloise și col., 1996). De asemenea, enzimele chitinolitice pot fi folosite pentru producerea unor detergenți, iar datorită activității antifungice ele pot fi incluse în soluții de sterilizare. În plus, endochitinazele de *Trichoderma* catalizează extrem de eficient sinteza chitooligomerilor de tip (GlcNAc)₆ și (GlcNAc)₇ care sunt utilizați ca agenți antitumorali sau ca inductori ai rezistenței plantelor la diferiți patogeni (Usui și col., 1990; Vander și Moerschbacher, 1993).

Descoperirea recentă a faptului că activitatea enzimelor chitinolitice din serul uman sau de la nivelul macrofagelor este declanșată de infecția cu fungi sau de alte boli (de exemplu, boala Gaucher) a deschis perspectiva aplicării enzimelor chitinolitice și a genelor care le codifică în terapia enzimatică sau genetică (Muzzarelli, 1993; Aerts și col., 1996). Pornind de la aceste date, chitinazele produse de tulpinile de *Trichoderma* pot fi mai eficiente decât enzime similare produse de alte microorganisme deoarece ele au efect antifungic puternic și larg și acționează sinergic cu diferiți alți agenți antifungici.

Un alt domeniu de folosire al enzimelor chitinolitice îl reprezintă controlul bolilor plantelor. Astfel, deoarece unele dintre chitinazele produse de tulpini de *Trichoderma* au o rezistență crescută la condițiile de mediu ele pot fi combinate cu fungicide chimice pentru protejarea fructelor față de putregaiul de depozit. Aplicarea directă în câmp sau în seră a preparatelor enzimatiche combinate cu fungicide poate asigura rezultate bune în protecția plantelor față de infecția cu diferite bacterii patogene. O direcție relativ nouă de cercetare în domeniul protecției plantelor este transferul genelor fungice ce codifică chitinazele în diferite specii de plante, fungi sau bacterii. De exemplu, gena *ThEn-42* ce codifică chitinaza CHIT42 a fost clonată în tutun, tomate, cartof, petunie, măr și alte specii vegetale reușindu-se exprimarea sa constitutivă în plantele transgenice regenerate. Mai mult, în cazul plantelor de tutun transgenice, chitinaza CHIT42 și-a menținut activitatea antifungică, s-a acumulat în spațiul extracelular la nivelul frunzelor, rădăcinilor, tulpinilor și florilor și nu a afectat relația plantei respective cu fungii micorizali (Lorito, 1995; 1998; Rousseau și col., 1996). În plus, chitinaza respectivă poate acționa sinergic cu anumite proteine produse de planta transgenică (de exemplu, cu osmotina sau cu glucanazele) ceea ce asigură protecție împotriva pătrunderii anumitor fungi patogeni, iar oligomerii eliberați în cursul reacțiilor pe care le catalizează declanșează mecanismele proprii de apărare ale plantei. Plantele transgenice de tutun, cartof sau măr ce conțin gena menționată manifestă rezistență la

acțiunea unor fungi patogeni cum ar fi *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani* și *Venturia inaequalis*.

Rezultatele obținute cu gena *ThEn-42* de la *Trichoderma* au determinat și alte abordări, cum ar fi transferul ei la bacterii sau la alte specii de *Trichoderma* în vederea selectării de tulpini recombinante capabile de a produce cantități sporite de chitinaze, de nivel industrial. Astfel, respectiva genă a fost introdusă în genomul bacteriei *Enterobacter cloacae*, specie cunoscută ca având utilizare în biocontrol, obținându-se bacterii recombinante cu capacități crescute de degradare a fitopatogenilor comparativ cu tulpina bacteriană parentală. Rezultate spectaculoase au fost înregistrate atunci când gena *ThEn-42* a fost clonată în *T. reesei* sub controlul promotorului genei pentru celulază: gena a fost supraexprimată în mod constitutiv ceea ce a permis producerea și eliminarea în mediul extracelular a unor cantități foarte mari de enzime chitinolitice (Margolles-Clarck și col., 1996).

Toate aceste rezultate confirmă faptul că genele de la *Trichoderma* ce codifică enzimele chitinolitice pot fi folosite în scopul protejării plantelor de cultură. Mai mult, spectrul și nivelul activității inhibitorii ar putea fi îmbunătățite prin clonarea și exprimarea în aceeași plantă transgenică a mai multor gene, cum ar fi cele pentru endochitinază, pentru β -1,3-glucanază și pentru osmotina de la tutun, ai căror produși acționează sinergic protejând mai eficient planta respectivă.

4.3. Enzime glucanolitice

β -glucanazele sunt deosebite în funcție de tipul hidrolizei (exo și endo) și prin tipul legăturilor hidrolizate (α - sau β -; 1,2-, 1,3-, 1,4-, sau 1,6-). Activitatea exoglucanazică este definită prin abilitatea de-a hidroliza β -glucanii de la capătul nereducător având ca produși finali monomeri sau dimeri. Activitatea endoglucanazică este caracterizată prin producerea de oligoglucide.

4.3.1. Particularitățile enzimelor β -glucanazice produse de speciile de *Trichoderma*

Enzimele glucanolitice sunt larg răspândite la plantele superioare, fungi și bacterii având diferite roluri fiziologice (Tabelul 3). În plante, acestea iau parte la sistemul defensiv față de fungii fitopatogeni. La bacterii au rol în nutriție. La fungi β -glucanazele au diferite roluri: mobilizarea glucanilor pereților celulari și depozitarea carbohidraților în condiții de "înfometare", degradarea calozei din plante (fungi fitopatogeni), nutriția saprofitilor, sunt implicate în mecanismul de atac și de nutriție al micoparaziților.

Glucanazele implicate în morfogeneza pot fi intracelulare sau legate de peretele celular, fiind de obicei caracterizate de o constantă K_m mare (Michaelis-Menten). Acestea sunt fie constitutive, fie produse regulat. Hidrolazele care catalizează reacții în procesele

metabolice sunt în general extracelulare, au o valoare mică a constantei Michaelis-Menten, sinteza lor este reglată prin parametrii nutrienților și de obicei nu se acumulează în miceliu.

Tabelul 3. Rolul β -1,3-glucaazelor fungice (după T. Benitez, 1998).

Tipul	Originea	Rolul	Exemple
β -1,3- glucanaze	<i>Oomycetes</i>	- nutriție - morfogeneză	- mobilizarea β -1,3-glucaanilor de rezervă (Griffin, 1994); - degradarea β -1,3-glucaanilor componenți ai pereților celulari (Bartnicki-Garcia, 1968);
	<i>Ascomycetes</i>	- morfogeneză	- sinteza pereților celulari la <i>Neurospora crassa</i> (Chiba, 1988); - sporularea la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (San Segundo, 1993);
	<i>Basidiomycetes</i>	- morfogeneză	- diferențierea corpiilor de fructificare la <i>Agaricus bisporus</i> (Griffin, 1994); - sinteza pereților celulari la <i>S. commune</i> (Kuhn, 1990);
	<i>Deuteromycetes</i>	- antifungic - morfogeneză	- liza pereților celulari ai gazdei în micoparazitism: <i>Trichoderma</i> , <i>Stachybotrys</i> (De la Cruz, 1993; Tweddell, 1994); - degradarea β -1,3-glucaanilor din pereții celulari la <i>Trichoderma</i> (Benitez, 1976)

4.3.1.1. Purificarea și proprietățile β -glucaazelor

Sistemul β -glucanolitic de la *Trichoderma* este constituit din endo- și exoglucaaze, care acționează sinergic în catalizarea degradării β -glucaanilor la oligomeri. Hidroliza finală este realizată de β -glucozidaze. Cunoașterea sinergismului și a reglării acestor enzime este împiedicată de faptul că există mai multe componente ale fiecărei enzime care diferă prin mai multe proprietăți, inclusiv masa moleculară - M_r (tabelul 4).

Tabelul 4. Proprietățile glucanazelor purificate de la *Trichoderma* sp. (după T. Benitez, 1998) .

Enzima	Originea	M ₂	pI	K _m ^a	V _{max} ^b	Tipul enzimei	Hidroliza
β-1,3-glucanaza	<i>T. harzianum</i>	78	8	3,3	75	Endo β-1,3	G ₄ +G ₂ +G
	<i>T. harzianum</i>	78	6.2	-	-	Exo β-1,3	G ₁
	<i>T. harzianum</i>	36	-	1,18	1,26	Endo β-1,3	-
	<i>T. harzianum</i>	40	7,8	0,015	0,3	Exo β-1,3	G ₁
	<i>T. reesei</i>	70	4,2	0,28	-	Exo β-1,3; β-1,6	G ₁
β-1,6-glucanaza	<i>T. harzianum</i>	43	5,8	2,4	224	Endo β-1,6	G ₂
	<i>T. harzianum</i>	51	-	0,8	3,2	Endo β-1,6	G ₂ +G
β-1,3-glucanaza	<i>T. viride</i>	47	-	0,046 M	0,16	Endo β-1,3	G ₂ +G ₁
	<i>T. viride</i>	47	-	7,1 mM	-	Exo β-1,3	G ₁
	<i>T. harzianum</i>	15	-	-	-	Endo β-1,3	G ₁
Glucosamilaza	<i>T. reesei</i>	66	4,0	0,11	-	Exo β-1,4; β-1,6	G ₁

^a mg substrat /ml unde nu este indicată molaritatea

^b μmol glucoză /min /mg proteină

Purificarea acestor enzime se realizează prin tehnici cromatografice care au permis stabilirea anumitor proprietăți ale acestor enzime și separarea componentelor sistemului celulozolic de la aceste specii de fungi filamentoși.

Relativ recent sistemul enzimatic β-glucanolitic de la *Trichoderma harzianum* a fost studiat mai în detaliu, astfel s-a constatat că acesta este format dintr-o izoenzimă cu caracter bazic și cel puțin trei izoenzime acide, care pot fi separate prin focusare izoelectrică. β-1,3-glucanaza cu caracter bazic (β-1,3-glucanaza I) BGN13.1 a fost purificată prin adsorbție pe pustulan (β-1,6- / β-1,3-glucan). Masa moleculară a acesteia este de 78 kDa și nu este glicozilată. β-1,3-glucanaza a prezentat o activitate enzimatică maximă în prezența pereților celulari de la *Saccharomyces cerevisiae* și laminarină (K_m=3,3 mg /ml). Enzima specifică pentru legăturile β-1,3- și prezintă activitate exoglucanazică.

T. harzianum produce și cel puțin două endo-β-1,6-glucanaze extracelulare cu mase moleculare de 51 și 43 kDa. β-1,6-glucanaza de 43 kDa numită și BGN16.2 este specifică pentru legăturile β-1,6- și prezintă activitate endonucleazică. Prezența enzimei BGN16.2 a fost observată la mai multe specii de *Trichoderma* (*T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. virens*).

4.3.1.2. Genele care codifică enzimele β-glucanazice

Au fost clonate două gene de la *T. harzianum* care codifică enzime glucanolitice: una care codifică pentru endo-β-1,3-glucanaza de 78 kDa (β-1,3-glucanaza I) și alta care codifică pentru endo-β-1,6-glucanaza de 43 kDa (β-1,6-glucanaza II). Clonarea genei

bgn13.1 s-a realizat cu ajutorul informațiilor despre secvența de aminoacizi a proteinelor purificate. În genomul *T. harzianum* există o singură copie a genei *bgn13.1*. Proteina matură conține 728 aminoacizi, care sunt precedați de o pre-pro-secvență N-terminală de 34 aminoacizi. Această pre-pro-secvență a fost corect procesată și secretată atunci când s-a exprimat în drojdii. Prin compararea omologiei aminoacizilor cu alte glucanaze Chen și colab. (1993) au identificat un rest glutamic la situsul presupus activ. Nu există dovezi însă despre prezența unui situs de legare la substrat. La clasa chitinaza I tutun, domeniul N-terminal bogat în cisteină, care este esențial pentru legarea chitinei, este flancat de IDR lungi de 9-10 pb. Se presupune că aceste situsuri provin de la o genă ancestrală comună și au fost introduse prin transpoziție (Shinshi și colab., 1990). La *Myxococcus xanthus* situsurile catalitice și de legare provin de la gena *celA* (care codifică o β -1,4-endoglucanază) prin transfer orizontal de la actinomicete (Quillet, 1995). Această origine transpozițională a situsului de legare în unele glucanaze ar putea explica absența lor în altele precum β -glucanazele de la *Trichoderma*.

Gena care codifică β -1,6-glucanază (*bgn16.2*) de la *T. harzianum* a fost izolată cu ajutorul oligonucleotidelor derivate de la secvențele de aminoacizi ale proteinei purificate. În urma analizei electroforetice (Southern analysis) s-a constatat că această genă este prezentă în *T. harzianum* în trei copii cu secvențe aproape identice (Lora și colab., 1995). Proteina secretată este de asemenea precedată la capătul N-terminal de 17 aminoacizi. Ea prezintă omologie parțială cu proteinele EXG1 și SPR1 (exo- β -1,3-glucanaze specifice sporulării care contribuie la termorezistența ascosporilor) de la *S. cerevisiae* (Muthukumar și colab., 1993) și cu o exo- β -1,3-glucanază de la *Candida albicans* (Chambers și colab., 1993).

4.3.1.3. Reglarea și funcționarea β -glucanazelor

Ca la mulți alți fungi filamentoși, β -glucanazele sunt în principal controlate prin inducția și represia prin catabolit. La unii fungi mecanismul inactivării proteice depinde de sinteza *de novo* a proteinelor și este limitat de proteoliză și parțial inhibat de componenții glucidici. Inducția diferențiată a enzimelor de către pereții celulari de la diferiți fungi a fost corelată cu proprietățile micoparazite ale speciilor de *Trichoderma*. Totuși, profilul proteinelor secretate de *Trichoderma* în timpul creșterii pe fragmente de pereți celulari diferă de profilul proteic din timpul antagonismului direct cu fungi fitopatogeni.

De la Cruz și colab., (1993) au observat că producerea glucanazelor extracelulare β -1,3 și β -1,6 pe substraturi ce conțin diferite surse ce carbon la *Trichoderma* a fost indusă de chitină, nigeran (β -1,3 / β -1,4-glucan), pustulan (β -1,6-glucan) și pereți celulari fungici și a fost represată de glucoză. Compușii care interferează fie cu sinteza ARN, fie cu sinteza proteică inhibă inducerea enzimelor, ceea ce sugerează că sinteza enzimelor este reglată pretranscripțional. Transcrierea genei *bgn13.1* care codifică pentru endo- β -1,3-glucanaza nu

a fost repressată de către glucoză și activitatea sa a fost detectată în timpul creșterii pe mediul cu glucoză 2%.

Endo- β -1,3-glucoanaza nu poate să formeze singură un halou clar atunci când este incubată cu pereți celulari fungici, ea inhibând creșterea fungilor fitopatogeni în combinație cu alte hidrolaze datorită inducției sale specifice și activității litice. Se presupune că ea contribuie la procesul de antagonism al apiciilor de *Trichoderma* față de alți fungi.

Gena *bgn16.2* care codifică endo- β -1,6-glucoanaza de la *T. harzianum* a fost repressată de glucoză și indusă de polimeri din pereții celulari fungici. Doar o singură clonă a ADNc a fost obținută pentru endo- β -1,6-glucoanază și un nivel foarte scăzut al ARNm care indică faptul că gena corespunzătoare este slab exprimată. Endo- β -1,3-glucoanaza II produce un halou clar atunci când este incubată cu pereți celulari de drojzii și inhibă creșterea altor fungi în combinație cu alte enzime hidrolitice în concentrație foarte mare (25 mg /ml pentru inhibarea de 70-80%)(De la Cruz, 1995).

β -glucoanazele sunt implicate în morfogenează fiind secretate constitutiv de speciile de *Trichoderma*. Activitatea β -1,3-glucoanazei corelată cu eliberarea unei β -glucozidaze legate la peretele celular în mediu sugerează că aceasta este implicată în mecanismul eliberării β -glucozidazei din pereții celulari în timpul eliberării în exterior a unui β -glucan (Kubicek, 1992). La *Penicillium italicum* se presupune că β -1,3-glucoanazele II și III legate la pereții celulari pot fi implicate în creșterea și extensia pereților celulari, în timp ce β -1,3-glucoanaza I poate fi implicată în mobilizarea glucanilor de rezervă, sau în formarea conidiilor (Santos, 1978). β -glucoanazelor fungice li s-au atribuit diferite funcții inclusiv în nutriție și /sau procese antagonice: β -1,3-glucoanază (78 kDa) de la *T. harzianum* prezintă activitate antifungică, care este sinergică cu endochitinaza și β -1,4-chitobiază în inhibarea germinării sporilor și în alungirea tubului germinativ la *Botrytis cinerea* (10-20 μ g /ml proteină totală) (Lorito, 1994).

Deși β -glucanii reprezintă o componentă substanțială a pereților celulari ai speciilor de *Trichoderma*, totuși aceștia nu sunt supuși acțiunii enzimelor glucoanolitice. Se presupune că acest fapt se datorează transportului în exterior sub formă zimogenică inactivă (Adams, 1993).

4.3.2. Particularitățile enzimelor β -glucoanazice produse de speciile de *Trichoderma*

Preparatele enzimatică litice de la tulpini de *Trichoderma* crescute pe hife de la unii fungi sunt îmbogățite cu β -1,3-glucoanaza, care în combinație cu alte hidrolaze eliberează protoplaști fungici (De Vries și Wessels, 1973). A fost descrisă purificarea unei endo- β -1,3-glucoanaze de la *T. viride* crescute pe pereți celulari de *S. commune* prin cromatografie pe coloană de CM-celuloză la un pH și o forță ionică scăzută.

Tsunoda (1977) a descris purificarea unei exo- β -1,3-glucoanaze de la un preparat comercial de la *T. viride*. Enzima cu masa moleculară de 47 kDa are un pH optim la 4,5 și

$K_m = 7,1$ mM și eliberează doar glucoză de la pseudonigeran (α -1,3-glucoză de la *Aspergillus niger*). Activitatea acestei enzime nu a fost testată și pe alte substraturi cum ar fi nigeran (α -1,3 și α -1,4-glucoză) sau amidon.

T. reesei produce de asemenea, cel puțin o α -1,3- glucoază extracelulară cu masa moleculară de 47 kDa atunci este crescută pe un mediu ce conține pseudonigeran.

4.4. Amilazele

α -, β - amilazele și glucoamilazele catalizează hidroliza legăturilor α -1,4 din amidon și glicogen. A fost izolată și purificată o glucoamilază de la *T. reesei* care avea masa moleculară de 66 kDa, pH optim de 5,5 și temperatura de 70 °C și conținea mai puțin de un procent legături covalente carbohidrate. Enzima a prezentat o activitate semnificativă în prezența unui substrat α -1,6-glucozidic în timp ce β -ciclodextrin inhibă puțin enzima. Secvența de aminoacizi a mai multor peptide obținute de la glucoamilaze purificate prezintă o asemănare în proporție de 60% cu glucoamilazele de la *Aspergillus*.

4.5. Alte hidrolaze produse de fungii din genul *Trichoderma*

4.5.1. Proteaze

Utilizarea de către tulpinile de *Trichoderma* a proteinelor sau peptidelor ca surse de azot sau sulf necesită degradarea extracelulară a acestor compuși prin eliminarea de către fungii respectivi a anumitor cantități de enzime proteolitice. Acestea sunt puternic afectate, prin represie prin catabolit, de diferitele surse de carbon, azot și /sau sulf existente în mediu. În plus față de proteazele extracelulare, fungii filamentoși din genul *Trichoderma* mai produc și proteaze intracelulare care au alte funcții decât cele de asigurare a surselor nutritive.

Până în prezent au fost purificate mai multe tipuri de proteaze de la diferite specii de *Trichoderma*: de exemplu, o aspartat protează a fost izolată de la *T.reesei*, iar o serin protează a fost purificată de la *T.harzianum*. De asemenea, au fost izolate și genele ce codifică respectivele enzime și chiar au fost obținute tulpini modificate capabile fie să nu mai producă proteaze (prin mutageneză clasică) (Mantyla și col., 1994) fie să producă cantități superioare din aceste enzime (prin transformare genetică) (Flores și col., 1997).

Cercetările efectuate asupra genelor ce codifică proteazele la *Trichoderma* au permis izolarea genei *prb1* ce codifică o serin protează. Această genă conține doi introni și se găsește într-o singură copie în genomul de la *T.harzianum*, ea fiind reglată la nivel transcripțional, supusă represiei prin catabolit și fiind exprimată în mod specific în cursul procesului de parazitare a altor specii de fungi. Din acest motiv s-a sugerat faptul că secreția proteazei de către tulpinile de *T.harzianum* este activată de un semnal prezent la nivelul peretelui celular al celulelor parazitare (Geremia și col., 1993). De exemplu, în cazul interacției *T.harzianum-R.solani* s-a evidențiat o exprimare crescută a genei *prb1* ca de altfel

și în cazul în care *Trichoderma* a fost cultivată în mediu ce conține pereți celulari fungici (Flores și col., 1997).

Activitatea antifungică a proteazelor este neclară dar se pare că biosinteza de hidrolaze, deci și de proteaze, se realizează în același timp cu cea a compușilor cu efect antimicrobian evident. Cu toate acestea, în cazul transformanților de *T. harzianum* ce poartă mai multe copii ale genei *prb1* s-a dovedit o sporire a capacității de biocontrol.

4.5.2. Nucleaze

Nucleazele sunt sintetizate de numeroase microorganisme, între care fungii sunt cei mai importanți producători. Intre aceste enzime, RN-azele ocupă un loc important deoarece sunt utilizate în industria alimentară ca și pentru sinteza oligonucleotidelor sau pentru investigarea structurii și funcțiilor ARN. De asemenea, RN-azele au proprietăți antitumorale, neurotoxice și imunosupresive.

Tulpinile de *Trichoderma* produc cantități însemnate de RN-aze atunci când sunt cultivate pe medii care au un nivel scăzut de fosfat. De asemenea, de la *T. viride* a fost purificată o proteină extracelulară, cu caracter acid, care determină inhibarea biosintezei proteice în sistem acelular („cell-free”) datorită clivării ARN ribozomal 28S. Această proteină ar putea fi utilizată ca inhibitor al fungilor fitopatogeni dar până în prezent nu au fost obținute date semnificative legate de codificarea genetică, de particularitățile sale biochimice sau de reglarea biosintezei sale.

4.5.3. Alte enzime

Enzimele pectinolitice degradează pectina existentă în peretele celular vegetal eliberând poligalaturonați și galacturonați care pot fi utilizați drept surse nutritive. Bacteriile produc o serie de pectin-liaze, endo-poligalacturonid-liaze (endo-PL sau PGL) și pectin metilesteraze (pectin esteraze; PE sau PME), în timp ce endo-poligalacturonazele (endo-PG) și pectin-liazele sunt sintetizate mai ales de fungi. Tulpinile de *Trichoderma* sintetizează cantități însemnate de pectinaze extracelulare dar enzimele respective au fost puțin caracterizate, iar implicarea lor în activitatea de biocontrol nu a fost încă dovedită.

De asemenea, tulpinile de *Trichoderma* pot produce și alte tipuri de enzime hidrolitice cum ar fi mananazele sau lipazele dar până în prezent nu au fost realizate studii semnificative asupra lor.

4.5.4. Aplicații biotehnologice ale enzimelor hidrolitice

Enzimele hidrolitice sintetizate pot fi sau sunt deja utilizate în diferite domenii, cum ar fi: medicina, agricultura sau industria alimentară

În domeniul medical, de exemplu, α -1,3-glucozidaza produsă de *T. harzianum* este capabilă de a degrada formele insolubile de glucoză, inclusiv a polimerilor de tipul celor ce

se formează pe dinți în cursul formării cariilor dentare. De aceea, adăugarea acestei enzime în chewing gum ar avea acțiune de prevenire a formării cariilor și a gingivitelor.

În agricultură, enzimele produse de *Trichoderma* au aplicații variate. Astfel, tulpinile de *Trichoderma* care produc liaze, proteaze, lipaze etc. pot fi folosite pentru degradarea peretelui celular al diferiților fungi fitopatogeni. Astfel, α -1,3-glucanaza de 78 kDa și N-acetil-glucozaminidaza de 72 kDa izolate de la *T. harzianum* acționează sinergic determinând inhibarea germinării sporilor de *Botrytis cinerea* (Lorito și col., 1994), în timp ce enzime similare produse de alte tulpini determină modificări morfologice ale hifelor de *Rhizoctonia solani* și *Fusarium sp.*, blocându-le dezvoltarea.

Unele cercetări au avut drept scop îmbunătățirea caracteristicilor antagonice ale unor tulpini care să poată asigura un biocontrol mai eficient. De exemplu, Haran și col.(1993) au examinat modalitățile de a utiliza tehnicile de inginerie genetică pentru a spori sinteza constitutivă a enzimelor hidrolitice la unele tulpini de *Trichoderma*. Astfel, transformanții de *T. harzianum* care conțin mai multe copii ale genei ce codifică α -1.6-glucanaza II produc cantități sporite din această enzimă care, acționând sinergic cu alte hidrolaze, determină liza celulară sau doar inhibarea dezvoltării tulpinilor de *R. solani* testate (Lorito, 1998).

4.6. Biosinteza de proteine heterologe în fungii filamentoși din genul *Trichoderma*

Trichoderma reesei este utilizată de multă vreme pentru sinteza unor enzime cu aplicații industriale, dintre care unele au fost deja prezentate. Multe dintre particularitățile acestor fungi filamentoși le conferă calități importante pentru a fi utilizați drept producători ai unor proteine străine, heterologe. Dintre calitățile tulpinilor de *T. reesei* trebuie menționat faptul că acestea nu produc toxine, astfel că, în prezent, multe dintre enzimele sintetizate de aceste tulpini au aplicații importante în industria alimentară sau în cea a nutrețurilor.

Fiind microorganisme, tulpinile de *T. reesei* sunt ușor de cultivat, pe medii puțin costisitoare (inclusiv pe anumite categorii de deșeuri), fără adausuri de factori speciali de creștere, existând în prezent o bună experiență în cultivarea lor în fermentatoare. Fiind organisme eucariote, fungii filamentoși prezintă avantajul că au echipamentele enzimatic necesare realizării prelucrărilor posttraducere ale proteinelor sintetizate.

Spre deosebire de *Saccharomyces cerevisiae*, fungii filamentoși secretă cantități superioare de proteine, dintre care multe sunt N-glicozilate (Maras și col., 1997). De asemenea, există o serie de diferențe între proteinele străine produse de tulpinile de *S. cerevisiae* recombinat genetic: din cauza glicozilării și a altor modificări posttraducere, levurile produc enzime heterologe cu masă moleculară mai mare decât cele din gazda de origine și cu un grad mai mare de heterogenitate.

Principalul dezavantaj pe care îl prezintă însă fungii filamentoși este rata scăzută de creștere și faptul că tehnicile moleculare necesită mai mult timp pentru a putea fi aplicate iar rezultatele evidențiate. Cu toate acestea, avantajele utilizării tulpinilor de *Trichoderma* drept

gazde pentru clonarea de gene străine sunt foarte mari, rezultatele obținute până în prezent fiind extrem de promițătoare. Pentru ca transferul de gene de interes să fie posibil în tulpinile de *Trichoderma*, a fost necesar să fie puse la punct toate instrumentele de lucru cu aceste microorganisme. Astfel, au fost obținute mai multe categorii de tulpini modificate genetic, fie capabile de hipersecreție de enzime (de exemplu, supraproducătoare de celuloze) fie neproducătoare, inclusiv tulpini deficiente în sinteza de proteaze, obținute fie prin mutagenză clasică fie prin transformare genetică. Spre exemplu, prelucrarea genetică a unor tulpini de *T. reesei* a permis obținerea unor recombinanți capabili să producă și să secrete cantități foarte mari de enzime celulozolitice: 40 g celuloze per litru mediu de cultură. S-a dovedit că asemenea tulpini hipersecretoare pot fi transformate cu o serie de gene marker, inclusiv cu unele dominante, exemple fiind utilizarea acetamidazei sau a invertazei ca sursă de carbon sau rezistența la higromicină, fleomicină sau benomil. În principiu, o tulpină care fost o dată transformată poate fi retransformată de mai multe ori. Deoarece transformarea se realizează prin integrarea genei de interes în genomul gazdei (la situsuri variate și într-un număr mai mare de copii), transformanții obținuți diferă în privința nivelului de biosinteză a produsului dorit. Beneficiul principal al transformării integrative este acela al stabilității caracteristicilor transformanților obținuți, chiar în absența presiunii selective. De asemenea, există anumiți loci cromosomali care par a fi mai potriviți pentru exprimarea genelor străine integrate, dintre aceștia cel mai cunoscut este locusul *cbh1* ce codifică una dintre celulozele complexului celulozolic (Suominen și col., 1993).

4.6.1. Metode și strategii pentru producerea proteinelor heterologe în *Trichoderma* sp.

Experimentele realizate cu tulpinile de *T. reesei* au evidențiat faptul că celuloza CBH1 reprezintă aproximativ 80% din totalul de proteine secretate de respectivele tulpini. Ținând cont de faptul că această cantitate mare de enzimă se sintetizează pornind de la o singură copie a genei codificatoare, iar promotorul genei *cbh1* este extrem de puternic, acesta a fost izolat și a fost folosit pentru producerea unor cantități mari de alte proteine ale căror gene au fost clonate sub controlul lui. Acest promotor este puternic indus de celuloză, de material vegetal sau de oligoglucide mici, cum ar fi celobioza sau soforoza și este represat de prezența glucozei prin intermediul genei reglatoare *cre1* (Ilmen și col., 1996). Modificarea prin mutagenză a situsurilor de legare pentru represorul CRE1 de la nivelul regiunii promotor al genei *cbh1* asigură funcționarea acestei genei chiar și în prezența glucozei.

Deși promotorul genei *cbh1* asigură obținerea unor cantități mari de enzime, exprimarea majorității hidrolazelor produse de fungii filamentoși din genul *Trichoderma* este reglată la fel ca și celuloza CBH1, astfel că în anumite situații aceste enzime pot interfera cu purificarea produsului dorit. Nivelul ridicat de CBH1 sugerează că proprietățile acestei proteine sunt optime pentru traducere, translocare în reticulul endoplasmic, împachetare, glicozilare și apoi secreția în mediu. Strategiile ce vizează obținerea de

proteine de fuziune s-au dovedit a fi extrem de utile pentru producerea proteinelor străine în numeroase gazde, permițând obținerea unor cantități mari. Din acest punct de vedere celuloza CBH1 reprezintă un candidat important pentru obținerea de proteine de fuziune. Ca multe alte celuloze, CBH1 este formată dintr-un domeniu catalitic (miezul enzimei) și a unui domeniu de legare la celuloză (CBD) separat de celălalt domeniu printr-o porțiune linker flexibilă, O-glicozilată. Pentru producerea de proteine străine fuzionate cu domeniul catalitic și regiunea linker se realizează înlocuirea extremității carboxil a domeniului de legare la celuloză cu proteina de interes. Linkerul asigură o regiune naturală de separare a celor două domenii ale proteinei care se pot împacheta separat și, de asemenea, conferă o zonă pentru adăugarea unui situs de clivare care permite separarea *in vitro* sau *in vivo* a produsului dorit de restul proteinei de fuziune. În acest tip de strategie de fuziune, situsul de inițiere a traducerii, secvența semnal și regiunea necesară pentru secreție sunt asigurate de partenerul endogen de fuziune (fig. 7).

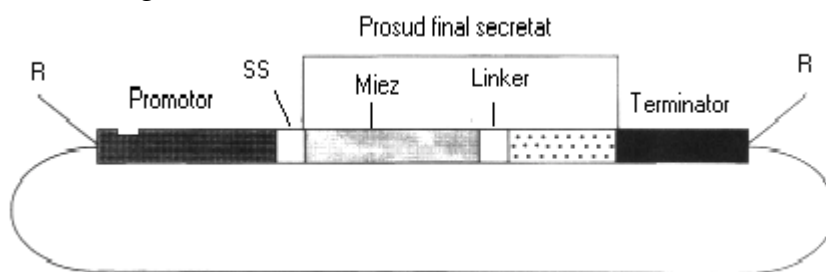


Figura 7. Reprezentarea schematică a unei „casete de exprimare” („*expression cassette*”) pentru producerea de proteine străine prin fuziunea cu domeniul catalitic și regiunea linker a CBH1 de la *Trichoderma*. Regiunea punctată reprezintă secvența ce codifică proteina străină de interes, în timp ce restul regiunilor provin de la gena *cbh1*, inclusiv secvența semnal (SS). Caseta de exprimare poate fi eliminată din plasmidă prin clivare la nivelul situsurilor de restricție, marcate cu R, de exemplu pentru integrarea la situs specific în genomul fungic.

Glucoamilaza de la *A. niger* are o structură similară celei descrise la CBH1 de la *Trichoderma*, ea putând fi utilizată ca partener de fuziune în *T. reesei* (Parriche și col., 1996). Aceiași autori au demonstrat că pot fi obținute bune rezultate în ceea ce privește cantitatea de produs de fuziune, utilizându-se ca partener de fuziune proteina de rezistență la fleomicin.

4.6.2. Exemple de proteine străine produse de tulpini de *T. reesei* modificate genetic

Ca și în cazul altor fungi filamentoși (cum ar fi *Aspergillus*) exemplele de gene străine clonate în *Trichoderma* și, deci de proteine heterologe sintetizate, sunt destul de puține (tabelul 5).

Tabelul 5. Proteine străine (heterologe) sintetizate de tulpini recombinat de *T.reesei* (după Penttila, 1998).

Proteina	Originea	Fuziunea cu linkerul CBH1	Proteina secretată
Lignin-peroxidaza	<i>Phlebia radiata</i>	-	nedetectabilă
Lacaza	<i>Phlebia radiata</i>	-	3-20 mg
Glucoamilaza P	<i>Hormoconis resiniae</i>	-	0,7g
Fitaza	<i>Aspergillus niger</i>	-	2g
Fosfataza acidă	<i>Aspergillus niger</i>	-	0,5g
Endochitinaza	<i>T.harzianum</i>	-	150 mg
Chimozina	Vițel	- +	20-40 mg > 100mg
Fragmente Fab de anticorpi	Șoarece	- +	1 mg 40-150 mg
Anticorpi monocatenari	Șoarece	-	1mg
Interleukina-6	Mamifere	+	5 mg

Dintre exemplele de proteine străine obținute prin clonarea genelor corespunzătoare în *Trichoderma*, cele mai studiate sunt sinteza chimozinei de vițel și cea a fragmentelor de anticorpi (Fab), rezultatele obținute dovedind că fungii filamentoși aparținând acestui gen sunt gazde potrivite pentru scopul urmărit. Așa cum era de așteptat, în cazul proteinelor străine dar de origine fungică s-au obținut cantități mai mari (de ordinul gramelor la litru de cultură) ceea ce dovedește puterea promotorului *cbh1*; în schimb, în cazul proteinelor străine originare din specii neînrudite, cantitățile obținute au fost mult mai mici (Penttila, 1998).

Chimozina de vițel a fost prima proteină străină exprimată în *T. reesei* fiind, în același timp, prima proteină de origine mamaliană comercializată după producerea ei de către fungii filamentoși (de către *Aspergillus*).

Chimozina este produsă ca o propeptidă care este autoclivată la pH scăzut, iar proteina matură poate fi recuperată direct din mediul de cultură în care a fost cultivat miceliul fungic. În consecință este necesar să se producă o anumită cantitate din proteina respectivă (ca proteină de fuziune) pentru ca autoprelucrarea sa să poată fi posibilă în absența adăugării de proteaze exogene.

O primă variantă de clonare a genei ce codifică pentru chimozina de vițel a fost aceea a obținerii unor casete de exprimare alcătuite din părți variate ale genei pentru CBH1 fuzionate cu regiunea ce codifică pre-chimozina care au fost comparate cu preprochimozina (ce conține secvența semnal specifică) produsă sub controlul promotorului *cbh1* de la tulpina *T. reesei* RutC-30. Deoarece transformarea se realizează prin integrarea în genomul fungic a unui număr variat de copii ale casetei de exprimare, compararea nivelului de exprimare se realizează prin analizarea mai multor transformanți. Cele mai ridicate valori ale nivelului proteinelor străine produse s-a obținut atunci când s-a folosit secvența semnal a proteinei

CBH1, iar gena pentru prochimozină a fost fuzionată cu o secvență din gena pentru CBH1 codificatoare pentru o regiune formată din 20 aminoacizi. Ulterior s-au obținut cantități și mai mari din produsul dorit (peste 100 mg de proteină activă /l cultură fungică agitată) prin fuziunea genei pentru prochimozină cu secvența ce codifică domeniul catalitic al CBH1. Analiza chimozinei intra- și extracelulare a indicat faptul că secvența semnal a CBH1 și chimozina sunt corect prelucrate iar procesul de clivare autocatalitică se realizează intracelular.

Cu toate acestea, nivelul chimozinei produse în celule de *Trichoderma* este mai mic decât cel al celulei sintetizată în mod natural de fungii respectivi. Analiza nivelului ARNm din celulele recombinante a evidențiat cantități mai mici de ARNm pentru chimozină sintetizate sub controlul promotorului genei *cbh1* decât cantitățile de ARNm pentru celula endogenă. Nu se cunoaște încă motivul pentru care apar aceste diferențe. De remarcat că nici în gazda de origine și nici în celulele de *Trichoderma* chimozina nu este glicozilată.

Un alt tip de molecule străine sintetizate de fungii filamentoși modificate genetic este reprezentat de **anticorpi**. Interesul major în această direcție este direcționat spre obținerea unor molecule de anticorpi ce poartă regiunile de legare la antigen dar lipsite de alte porțiuni ale catenelor polipeptidice ce îi alcătuiesc în mod normal. Așa cum se cunoaște, anticorpii au o structură multicatenară, iar prin tratarea cu enzime proteolitice (pepsină, papaină) se produce scindarea moleculelor în trei fragmente dintre care două sunt identice și poartă, fiecare, câte un situs de combinare cu antigenul. Ele corespund fragmentelor Fab („antigen-binding fragment”), deoarece ele au capacitatea de a lega antigenul (Zarnea, 1990). Cel de-al treilea fragment, mai mare, denumit Fd corespunde extremității COOH terminale a celor două lanțuri H, unite de una sau multe punți disulfidice (fig. 8). În acest fel, prin clonarea în *Trichoderma* a genelor corespunzătoare (incluse în vectori de exprimare specifici) au fost obținute separat fragmente Fab și fragmente Fd. Ambele fragmente au fost exprimate sub controlul promotorului *cbh1* iar secvența semnal a aceleiași gene a permis secreția proteinelor de interes

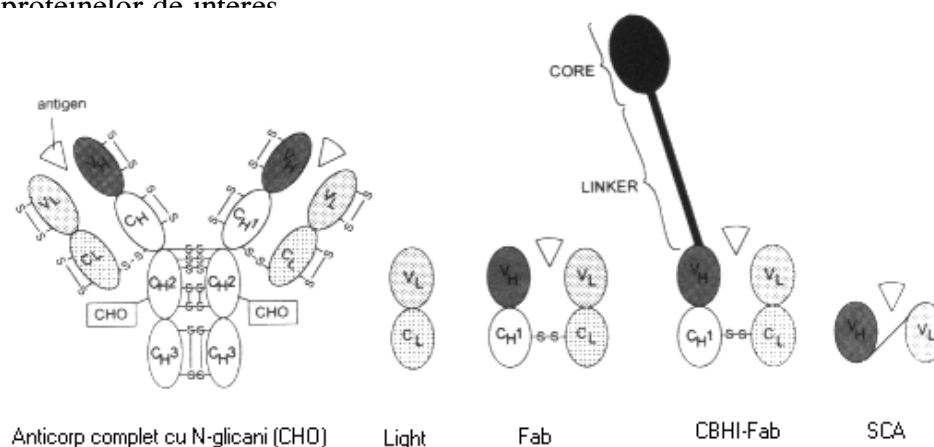


Figura 8. Reprezentarea schematică a unui anticorp complet și a diferitelor fragmente, inclusiv a formei produse în *T. reesei* (după Penttila, 1998).

Pentru obținerea de molecule de anticorpi funcționale și în cantități mai mari, a fost folosită o strategie interesantă de clonare:

➤ mai întâi în celulele gazdă de *T. reesei* a fost introdus un vector de exprimare ce conține gena pentru catena L a anticorpului care s-a integrat la nivelul locusului *cbh1*, inactivând gena endogenă corespunzătoare. Transformanții obținuți au fost capabili să producă aproximativ 0,2 mg/l catene L de anticorpi;

➤ transformanții respectivi au fost apoi utilizați drept gazde pentru introducerea unui alt vector în care domeniul de legare la celuloză din proteina CBH1 a fost înlocuit cu gena ce codifică fragmentul Fd din anticorp. Recombinanții selectați și care conțineau ambele gene pentru anticorpi clonate au produs cantități superioare de molecule imunologic active (aproximativ 40 mg /l). Cultivarea lor în bioreactor a permis o sporire de aproape 4 ori a nivelului moleculelor active.

Analiza moleculelor de anticorpi produse de *T. reesei* au arătat că secvențele semnal au fost clivate corect atât de la nivelul catenei L cât și a fragmentului Fd. În cazul fuzionatului CBH1-Fab s-a observat că separarea fragmentului Fab de restul proteinei de fuziune este produsă de o protează fungică necunoscută care taie foarte specific cu doi aminoacizi înainte de extremitatea amino a catenei H (Nyssonen și col., 1993).

Diferențele cantitative ale fragmentelor Fab nu se datorează variațiilor de stabilitate a moleculelor în mediul de cultură ci evenimentelor intracelulare care conduc la exprimarea genelor și la secreția eficientă în funcție de particularitățile tipurilor de molecule de anticorpi sintetizați. De remarcat că moleculele Fab nu conțin situsuri de N-glicozilare și nu sunt glicozilate în *T. reesei*.

În plus față de exemplele de mai sus, prin clonare în *Trichoderma* au mai fost obținute și alte tipuri de proteine străine, cum ar fi interleukina-6 (Demolder și col., 1994), cistein-endopeptidaza B de la orz (Nylanen și col., 1997) sau glucoamilaza de la *Homoconis resiniae* (Joutsjoki și col., 1993). În cazul acestor proteine străine sintetizate în *T. reesei* s-a observat că are loc un proces de N-glicozilare.

Rezultate bune au fost obținute și în cazul fitazei de *A. niger* a cărei genă a fost clonată în *T. reesei* sub controlul promotorului glucoamilazei de la *A. niger*: cantitatea de proteină de interes a fost similară celei produse de gazda de origine. Cu toate acestea, preparatele enzimatiche produse de tulpina de *Trichoderma* prezintă avantajul că pot fi folosite pentru obținerea de nutrețuri deoarece pe lângă fitază conțin mari cantități de β -glucanaza dar o activitate glucoamilazică scăzută.

Probleme au apărut în cazul exprimării în *Trichoderma* a genelor străine pentru enzimele ligninolitice provenite de la alte specii de fungi, nivelul acestora fiind foarte redus, cum este lacaza sau chiar nu au putut fi detectate, ca în situația ligninperoxidazei (Saloheimo și col., 1989)

Surprinzător a fost faptul că endochitinaza originală din *T. harzianum*, despre care se știa că are efect toxic asupra celulelor de *T. reesei*, a fost totuși produsă în cantități mari.

Cu toate acestea, în cazul enzimelor chitinolitice nivelul proteinelor sintetizate a fost relativ scăzut datorită acțiunii unor proteaze extracelulare acide care degradează endochitinaza în ultimele faze ale cultivării.

Concluzii și perspective

În ciuda rezultatelor promițătoare obținute până acum, există încă multe de făcut pentru stabilirea condițiilor optime de producere a unor proteine străine, nefungice. Strategia fuziunii proteinelor de interes cu alte proteine de referință s-a dovedit utilă dar necesită cercetări pentru optimizarea procesului de fuziune și a metodelor de clivare a produșilor de fuziune în *Trichoderma*.

T. reesei produce în mod natural mici cantități de proteine extracelulare în mediile cu cultură ce conțin glucoză deoarece majoritatea sistemelor de exprimare a genelor sunt supuse unui control de tip represibil. Astfel, deși exprimarea genei *cbh1* este printre cele mai crescute, este necesar să se realizeze o moleculă recombinant care să permită exprimarea chiar și în prezența glucozei în mediul de cultură. Posibilitățile de prelucrare posttraducere, inclusiv de glicozilare, a proteinelor sintetizate de fungii din genul *Trichoderma* fac din acești fungii filamentoși organisme gazdă utile pentru clonarea și exprimarea genelor străine de origine eucariotă.

Mai mult, fungii din genul *Trichoderma* pot fi considerați ca nepatogeni pentru sănătatea omului. În cursul producerii enzimelor sau a produselor utilizate în biocontrol în mediu lichid, numărul de spori eliberat în mediu este în general nesemnificativ, astfel că producerea de alergii este puțin probabilă. Din acest motiv, folosirea acestor fungii, și mai ales a tulpinilor de *T. reesei* pentru obținerea unor preparate enzimatiche comercializabile sau pentru adăugarea acestora în nutrețuri sau în produse alimentare nu ridică probleme importante. Mai mult, tulpinile de *Trichoderma* reprezintă o sursă potențială de noi metaboliți. Descoperirea de noi compuși sau obținerea unor tulpini hibride sau recombinate genetic necesită însă o monitorizare continuă și o revizuire a metodelor de aplicare în siguranță a produselor sintetizate de fungii filamentoși (Nevalainen și Neethling, 1998)

Bibliografie selectivă

1. Aerts, J.M.F.G., Boot, R.G., Renkeme, G.H., van Weely, S., Hollak, C.E.M., Donker-Koopman, W.E., 1996. Chitotriosidase: a human macrophage chitinase that is a marker for Gaucher disease manifestation. In R.A.A. Muzzarelli (ed.), *Chitin Enzymology II*. Atec, Grottammare (AP), Italy, pp. 3-10.
2. Aloise, P.A., Lumme, M., Haynes, C.A., 1996. N-acetyl-D-glucosamine production from chitin-waste using chitinases from *Serratia marcescens*. In R.A.A. Muzzarelli (ed.), *Chitin Enzymology II*. Atec. Grottammare (AP), Italy, pp. 581-594.
3. Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J., Broglie, R., 1991, Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*, *Science*, **254**: 1194-1197.
4. Carlile, M.J., Warkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001, *The fungi*, Academic Press, U.K.
5. Chet, I., Barak, Z., Oppenheim, A., 1993. Genetic engineering of micro-organisms for improved biocotrol activity. In I Chet (ed.), *Biotechnology in Plant Disease Control*. Wiley-Liss, New York, pp.211-255.
6. Demolder, J., Saelens, X., Penttila, M., Fiers, W., Contreras, R., 1994. KEX2-like processing of glucoamylase-interleukin 6 and cellobiohydrolase-interleukin 6 fusion proteins by *Trichoderma reesei*. 2nd European Conference on fungal genetics, Lunteren, The Netherlands. Abstract **B 38**.
7. De La Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A., Llobell, A., 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*, *Eur. J. Biochem.*, **206**: 859-867, 1992;
8. Draborg, H., Christgau, S., Halkier, T., Rasmussen, G., Dalboge, H., Kauppinen, S., 1996. Secretion of an enzymatically active *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**: 404-409.
9. Dubordieu, D., Desplanques, C., Villetaz, J.C., Ribereau-Gayon, P., 1985. Investigation of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*, *Carbohydr. Res.*, **144**: 277-287.
10. Fekete, C., Weszely, T., Hornok, L., 1996. Assignment of a PCR-amplified chitinase squence cloned from *Trichoderma hamatum* to resolved chromosomes of potential biocontrol species of *Trichoderma*. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**: 385-391.
11. Fincham, J.R.S., 1989. Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* **53**: 148-170.
12. Flores, A., Chet, I., Herrera-Estrella, A., 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr. Genet.* **31**: 30-37.

13. Garzia, I., Lora, J.M., de la Cruz, J., Benitez, T., Llobell, A., Pintor-Toro, J.A., 1994. Cloning and characterisation of a chitinase (CHIT 42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* **27**: 83-89.
14. Geremia, R.A., Goldman, G.H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S.B., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, A., 1993. Molecular characterization of the proteinase – encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* **8**: 603-613.
15. Goldman, G.H., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, A., 1990. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr. Genet.* **17**: 169-174.
16. Goldman, G.H., 1993. Molecular genetic studies of mycoparasitism by *Trichoderma* spp. Ph.D. Thesis, Universiten Gent, Belgium, pp. 107.
17. Goller, S.K., 1997. The role of proteolytic protein processing in protein secretion by *Trichoderma reesei*. Ph. D. Thesis, TUM-Wien, Vienna, Austria.
18. Haran, S., Schickler, H., Pe`er, S., Logemann, S., Oppenheim, A., Chet, I., 1993. Increased constitutive chitinase activitz in transformed *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control.* **3**: 101-108.
19. Harman, G.E., Hays, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Tronsmo, A., 1993b. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase, *Phytophatology*, **83**: 313-318.
20. Hayes, C.K., Klemsdal, S., Lorito, M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Nakas, J.P., Tronsmo, A., Harman, G.E., 1994. Isolation and sequence of an endochitinase encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene* **138**: 143-148.
21. Herrera-Estrella, A., Goldman, G.H., Van Montagu, M., Geremia, R.A., 1993. Electrophoretic karyotype and gene assignment to resolved chromosomes of *Trichoderma* spp. *Mol. Microbiol.* **7**: 515-521.
22. Ilmen, M., Thrane, C., Penttila, M., 1996. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol. Gen. Genet.* **4**: 451-460.
23. Inbar, J., Chet, I., 1992. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers, *J. Bacteriol.*, **174**: 1055-1059.
24. Inbar, J., Chet, I., 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*, *Microbiology*, **141**:2823-2829.
25. Kubicek, C.P., Bolzlbauer, U.M., Kovacs, W., Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Borner, T., Samuels, G.J., 1996. Cellulase formation by species of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and of *Hypocrea* spp. with anamorphs referable to *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Fungal Gen. Biol.* **20**: 105-114.
26. Kubicek-Pranz, E.M., Gruber, F., Kubicek, C.P., 1991. Transformation of *Trichoderma reesei* with cellobiohydrolase II gene as a means for obtaining trains with increased cellulase production and specific activity. *J. Biotechnol.* **20**: 83-94.

27. Kurzatkowski, W., Torronen, A., Filipek, J., Mach, R., Herzog, P., Sovca, S., Kubicek, C.P., 1996. Glucose induced secretion of *Trichoderma reesei* xylanases. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2859-2865.
28. Lieckfedt, E., Samuels G.J., Gams, W., Boerner, T., 1998. Neotypification of *Trichoderma koningii* and its *Hypocrea muroicinia* teleomorph. *Can. J. Bot.*, in press.
29. Limon, M.C., Llobell, A., Pintor-Toro, J.A., Benitez, T., 1996. Over expression of chitinase by *Trichoderma harzianum* strains used as biocontrol fungi. In R.A.A. Muzzarelli (ed.), *Chitin Enzymology II*. Atec, Grottammare (AP), Italy, pp. 245-252.
30. Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L., Di Petro, A., 1993b. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase, *Phytopathology*, **83**: 302-307.
31. Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C.K., Harman, G.E., 1994b. Synergistic interaction between fungal cell wall-degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination, *Microbiology*, **140**: 623-629.
32. Lorito, M., 1995. Expression of genes from *Trichoderma harzianum* in transgenic plants. Fifth International *Trichoderma* and *Gliocladium* Workshop, April 1995, Beltsville, MD, Abstract.
33. 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.
34. Mantyla, A., Saarelainen, R., Fagerstrom, R., Suominen, P., Nevalainen, H., 1994. Cloning of the aspartic protease gene from *Trichoderma reesei*. 2nd European conference on fungal genetics, Lunteren, The Netherlands. Abstract **B 52**.
35. Maras, M., de Bruyn, A., Schraml, J., Herdewijn, P., Claeysens, M., Fiers, W., Contreras, R., 1997. Structural characterisation of N-linked oligosaccharides from cellobiohydrolase I secreted by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* RUTC 30. *Eur. J. Biochem.* **245**: 617-625.
36. Margolles-Clarck, E., Tenkanen, M., Luonteri, E., Penttila, M., 1996a. Three β -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **240**: 104-111.
37. Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Soderlund, H., Penttila, M., 1996b. Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active-site serine residue and a cellulose-binding domain. *Eur. J. Biochem.* **237**: 553-560.
38. Margolles-Clarck, E., Harman, G.E., Penttila, M., 1996b. Enhanced expression endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2152-2155.
39. Merivouri, H., Tornkvist, M., Sands, J.A., 1990. Different temperature profiles of enzymes secretion by two common strains of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Lett.* **12**: 117-120.

40. Meyer, R., 1991. Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2269-2276.
41. Muzzarelli, R.A.A., 1993. Advances in N-acetyl- β -D-glucosaminidase. In R.A.A. Muzzarelli (ed.), *Chitin Enzymology*. European Chitin Society, Lyon and Ancona, pp. 357-374.
42. Muthukumar, G., Suhng, S., Magee, P.T., Jewell, R.D., Primerano, D.A., 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* SPR1 gene encodes a sporulation-specific exo-1,3- β -glucanase which contributes to ascospore thermoresistence. *J. Bacteriol.* **175**: 386-394.
43. Nyssonen, E., Penttila, M.E., Harkki, A., Saloheimo, A., Knowles, J.K.C., Keranen, S., 1993. Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Bio/Technology* **11**: 591-595.
44. Parriche, M., Bousson, J.-C., Baron, M., Tiraby, G., 1996. Development of heterologous protein secretion systems in filamentous fungi. 3rd European Conference on Fungal Genetics, Munster, Germany, Abstracts, p. 52.
45. Penttila, M.E., Andre, L., Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Knowles, J.K.C., 1987. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **3**: 175-185.
46. Penttila, M.E., Andre, L., Lehtovaara, P., Bailey, M., Teeri, T.T., Knowles, J.K., 1998. Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene* **63**: 103-112.
47. Peterbauer, C., Lorito, M., Hayes, C.K., Harman, G.E., Kubicek, C.P., 1996. Molecular cloning and expression of the *nagI* (N-acetyl- β -D-glucosaminidase-encoding) gene from *Trichoderma harzianum* P₁, *Curr. Genet.*, **30**: 325-331.
48. Punt, P.J., Veldhuisen, G., Kuijvenhoven, A., van den Hondel, C.A.M.J.J., 1996. Towards an analysis system of the secretion pathway of *Aspergillus niger*. Third European Conference on Fungal Genetics, Munster, Germany, May 27-30 Abstracts, p.70.
49. Rousseau, A., Benhamou, N., Chet, I., Piche, Y., 1996. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*, *Phytopathology*, **86**: 434-443.
50. Saloheimo, M., Bajaras, V., Niku-Paavola, M.L., Knowles, J.K.C., 1989. A lignin peroxidase-encoding cDNA from the white-rot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*, *Gene* **85**: 343-351.
51. Saloheimo, M., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Penttila, M., 1996. Third European Conference on Fungal Genetics, Munster, Germany, May 27-30 Abstracts, p.72.
52. Samac Leong, 1989.

53. Samuels, G.J., Petrini, O., Manguin, S., 1994. Morphological and macromolecular characterisation of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* **86**: 421-435.
54. Schaffrath, Meacock, 1996.
55. Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y.-L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., Kubicek, C.P., 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 4364-4370.
56. Spelligt, T., Bottin, A., Kahmann, R., 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, *Molec. Gen. Genet.*, **252**: 503-509.
57. Shinshi, H., Neuhaus, J.M., Ryals, J., Meins, F., jr., 1990. Structure of a tobacco andochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant. Mol. Biol.* **14**: 357-368.
58. Stasz, T.E., Nixon, K., Harman, G.E., Weeden, N.F., Kuter, G.A., 1989. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozyme polymorphism. *Mycologia*, **81**: 391-403.
59. Suominen, P.L., Mantyla, A.L., Karhunen, T., Hakola, S., Nevalinene, H., 1993. High-frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei* II: Effects of deletions of individual cellulase genes. *Mol. Gen. Genet.*, **241**: 523-530.
60. Ulhoa, C.L., Peberdy, J.F., Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *J. Gen., Microbiol.*, **137**: 2163-2169
61. Usui, T., Matsui, H., Isobe, K., 1990. Enzymic synthesis of useful chitooligosaccharides utilising transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate, *Carbohydr. Res.*, **203**: 65-77.
62. Vander, P., Moerschbacher, M., 1993. Chitin oligomers produced by HF-solvolysis induce resistance reactions in higher plants. In R.A.A. Muzzarelli (ed.), *Chitin Enzymology*. European Chitin Society, Lyon and Ancona, pp. 437-440.
63. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6531-6535.
64. Zamir, D., Chet, I., 1985. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Bot.* **31**: 578-580.