

GOMBAPARAZITA *TRICHODERMA* TÖRZSEK NEMESÍTÉSEMANCZINGER L.¹, ANTAL ZSUZSANNA², KREDICS L.¹, FERENCZY L.²¹Mikrobiológiai Tanszék, TTK, Szegedi Tudományegyetem H-6701 Szeged, Pf. 533,²MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport, H-6701 Szeged, Pf. 533**BREEDING OF MYCOPARASITIC *TRICHODERMA* STRAINS****Keywords:** *Trichoderma*, mycoparasitism, mutagenesis, protoplast fusion, transformation

Between 1990 and 1998 a broad spectrum breeding project based on biofungicide *Trichoderma* strains was performed by our working group. In this project *T. aureoviride*, *T. harzianum* and *T. viride* strains were isolated with excellent antagonistic properties against plant pathogenic fungi. The culturing parameters, abilities for secretion of extracellular enzymes and the *in vitro* antagonistic abilities of the strains against *Fusarium*, *Pythium* and *Rhizoctonia* species were determined. Strains with outstanding properties were bred by mutagenesis, protoplast fusion and genetic transformation. During breeding by mutagenic treatment, fungicide resistant, derepressed, and constitutive chitinase- and protease-producing strains were selected. After protoplast fusion based on parasexual processes, recombinants were isolated from crosses between promising strains.

In the case of two *T. harzianum* and a *T. viride* strain, transformation systems were worked out based on dominant selectable, and auxotrophy-complementing markers. In the case of transformation systems with high transformation frequencies, cotransformation experiments were carried out, and interspecific transgenic progenies were isolated. Strains with improved antagonistic properties were constructed with all the three breeding methods. Based on these strains, field experiments are carried out in the BioGen Ltd. (Tapolca) for the development of products to be applied in agriculture.

Tanszékünkön az 1990-1998 közötti időszakban széleskörű, *Trichoderma* törzsekre alapozott biofungicid törzsnemesítési munka folyt. A munkálatok során kiváló, növénypatogén gombákat antagonizáló *T. aureoviride*, *T. harzianum* és *T. viride* törzseket izoláltunk. Meghatároztuk a törzsek tenyésztési paramétereit, extracelluláris enzimszekretáló képességét, valamint *in vitro* antagonizmusuk mértékét növénypatogén *Fusarium*, *Pythium* és *Rhizoctonia* törzsekkel szemben. A kiemelkedő képességű törzseket mutagenezissel, protoplasztfúzióval és genetikai transzformációs módszerekkel nemesítettük. A mutagénkezeléssel történő törzsnemesítés során fungicidrezisztens és derepresszált, illetve konstitutív kitináz- és proteáztermelő vonalakat állítottunk elő. A protoplasztfúziós törzsnemesítés során a paraszexuális folyamatok felhasználásával az igéretes törzsek keresztezéséből származó rekombinánsokat izoláltunk.

Két *T. harzianum* és egy *T. viride* törzs esetében domináns szelekciós markeren, valamint auxotrófia-komplementáción alapuló transzformációs rendszereket dolgoztunk ki. A nagy transzformációs gyakoriságot mutató transzformációs rendszernek esetében kotranszformációs kísérleteket hajtottunk végre és ezek során fajok közötti transzgénikus utódokat izoláltunk. Mindhárom nemesítési program keretében fokozott antagonista

képességű törzseket állítottunk elő, melyekre alapozva jelenleg a BioGen Kft.-ben (Tapolca) szántóföldi kísérletek folynak kereskedelmi termékek kialakítása céljából.

MIKOPARAZITA KÉPESSÉGŰ *TRICHODERMA* TÖRZSEK IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE

Célunk a fejlesztő munka első fázisában minél többféle *Trichoderma* gombatörzs izolálása volt: minél nagyobb a változatosság a vizsgált törzsek katabolitikus képességében, annál nagyobb eséllyel találhatunk olyan extracelluláris enzimspektrumú törzseket, melyek a nemesítési program alanyául szolgálhatnak. Törzseinket avar- és talajmintákból izoláltuk. Egyes törzsek izolálása speciális táptalajon történt, melyen detektálni lehetett, hogy a gombasejtfal bontásában fontos kulcsenzimeket (β -1,3-glukanáz, kitináz, proteáz) szekretálja-e az adott izolátum. Rifai 1969-es határozókulcsa alapján 341 izolátumot azonosítottunk, 24 a *T. aureoviride*, 84 a *T. hamatum*, 137 a *T. harzianum*, 21 a *T. koningii*, 75 pedig a *T. viride* fajcsoportba tartozott. A törzsek enyhén acidofil mezoterm, illetve hidegtűrő sajátosságokat mutattak. Hőmérsékleti minimumuk 0-4°C, optimumuk 20-27°C, maximumuk 28-40°C között változott. A törzsek jól növekedtek és intenzív konídium-termelést mutattak vitaminmentes minimál táptalajon. Megvizsgáltuk a törzsek szénforrás-hasznosító képességét 127 szénforráson, a legnagyobb változatosságot a *T. harzianum* és a *T. viride* törzsek mutatták.

A legtöbb növénypatogén fonalgomba sejtfalát β -1,3-glukan, kitin és jelentős mennyiségű fehérje alkotja. A jó biopeszticid törzsek mikoparazitizmusának alapfeltétele a sejtfalbontó enzimek termelésének képessége, mely elengedhetetlen a szívóhifák növényparazita gomba hifasejtjébe történő juttatásához [1]. A nemesítés szempontjából a β -1,3-glukanáz, a kitináz és proteáz enzimmrendszerek a legfontosabbak, törzseinknél elsősorban ezek termelési képességét vizsgáltuk.

Az extracelluláris celluláz, pektináz, xilanáz és amiláz enzimek termelési képességét szintén tanulmányoztuk. Ezen enzimek szubsztrátja, mint növényi hulladékanyag, jelentős mennyiségben van jelen a talajban. Az olyan biopeszticid törzsek, melyek ezt szénforrásként fel tudják használni, hosszabb ideig fennmaradhatnak a talajban, és folyamatosan fertőtleníthetik azt. Törzseink nagy többsége termelte a talajban való hosszabb túléléshez szükséges enzimeket, és képes volt hasznosítani az általuk felszabadított glükózt, galakturonsavat illetve xilózt.

A kulcsenzimek (β -1,3-glukanáz, kitináz, proteáz) termelését rázatott és felületi tenyészetekben tanulmányoztuk. A külső környezeti tényezők közül a pH megváltozása bizonyos enzimaktivitások teljes eltűnéséhez vezethet. Vizsgálatainkat enyhén savas (pH 5,0), és közel neutrális (pH 6,6) értéknél végeztük. Néhány jó tulajdonságú törzs esetében az alacsony vízpotenciál, bizonyos nehézfémek és az alacsony hőmérséklet *in vitro* enzimaktivitásokra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk, ezen környezeti tényezők nem gátolták az enzimaktivitásokat olyan mértékben, mint a növekedést [2, 3, 4].

A nemesítési programot kétféle törzstípussal indítottuk, egyrészt két kulcsenzimet legalább közepesen termelő törzsekkel, másrészt olyanokkal, melyek mindháromat még megfelelőnek tűnő szinten voltak képesek termelni. Az enzimtermelési kísérletekben biztatónak bizonyult törzseket növénypatogén *Fusarium*, *Pythium* illetve *Rhizoctonia* gombatörzsekkel növesztettük össze. Az összenövési zónákból vett minták mikroszkópos vizsgálata során több törzsnél észleltük szívóhifák kialakulását. A jó enzimtermelő törzsek egyben jó *in vitro* antagonistáknak is bizonyultak.

A TÖRZSEK NEMESÍTÉSE MUTAGENEZISSSEL

A fenti vizsgálatok alapján 11 *Trichoderma* törzset választottunk további nemesítés céljára. A megfelelő UV-érzékenységű *Trichoderma* törzsekből UV-mutagenézissel nagy

gyakorisággal lehet auxotróf és morfológiai mutánsokat nyerni. Szűréses dustással stabil auxotróf mutánsokat állítottunk elő a protoplasztfúziós továbbnemesítés céljára.

A kifejlesztett biopeszticid készítmény hatékonysága azon múlik, hogy a törzs képes-e a növénypatogén gomba sejtfalában lévő β -1,3-glukán, kitin, fehérje, illetve *Pythium* fajok esetében cellulóz bontására. A sejtfal bontásában fontos enzimrendszerek szabályozásában az indukció és a represszió egyaránt szerepet játszik, ezért konstitutív, illetve derepresszált mutánsok előállítására törekedtünk. Valamennyi törzsből sikerült ígéretes mutánsokat izolálnunk.

Az összes törzs képes volt exo- és endo- β -1,3-glukanázt indukció nélkül is szekretálni, így ezen enzimrendszer esetében olyan mutánsokat állítottunk elő, melyek a β -1,3-glukanázokat intenzívebben szekretálják.

Kimutattuk a *Trichoderma* törzsek kitináz rendszerében fontos endokitináz, exokitináz, és β -1,4-N-acetilglükózaminidáz (NAGáz) enzimeket. A kitinázszintézis represszorai a talajban nincsenek jelen hatásos koncentrációban, a nemesítés ezért a konstitutív enzimszint emelésére irányult. Az endokitináz-mutánsok kompakt növekedésük, csökkent konídiumtermelésük és szívóhifáik hiánya miatt biopeszticidként nem alkalmazhatók, az emelkedett exokitináz- illetve NAGáz-szintű törzsek között azonban akadtak ígéretesek.

A *Fusarium* fajok sejtfa 20-30%-ban fehérjét tartalmaz, melyen a *Trichoderma* proteázrendszer nem tud áthatolni. Törzseink extracelluláris proteázszintje indukcióval és represszióval egyaránt szabályozottnak bizonyult. A talajban nagy koncentrációt elérő NH_4^+ ion erős represszor volt, míg egyes monoszacharidok egyáltalán nem represszáltak.

Az összes törzs esetében erős, gyakran enyhén konstitutív tripszin-típusú aktivitást, a 4/8, 2/2 és 1/24 számú törzsek esetében pedig kimotripszin- és kimoelasztáz-típusú aktivitásokat is észleltünk. Az NH_4^+ ion repressziós hatásával szemben derepresszált mutánsokat minden törzsből sikerült előállítani a metilamin *Trichoderma* törzsekre kifejtett gátló hatásán alapuló direkt szelekciós eljárással. A metilamin-rezisztensek között 10-20%-ban derepresszált, enyhén konstitutív proteáztermelőket találtunk. Másik direkt szelekciós módszerünk azon alapul, hogy a fehérjealkotó fenilalanin mérgező aminosav-analógjával, a p-fluorfenilalaninnal szemben glutamin jelenlétében izolált rezisztensek egy része az extracelluláris aminosav-deaminázszint emelkedése miatt válik rezisztenssé. A mutáció ezekben a mutánsokban egy központi represszor-molekulát hatástalanít, mely a glutaminnal együtt fejt ki hatását. A derepresszált mutáns glutamin jelenlétében is termel deaminázt, így p-fluorfenilalanin-rezisztens. E központi represszor-molekula az extracelluláris proteázok repressziójával is kapcsolatos, így ezek is derepresszálttá válhatnak. Közel 200 derepresszált proteáztermelőt izoláltunk törzseinkből, egy részüknél konstitutív NAGáz- illetve proteáz-szekréció volt észlelhető.

TÖRZSNEMESÍTÉS PROTOPLASZTFÚZIÓVAL

Ezen törzsnemesítési módszer lényege, hogy megfelelően jelölt törzsek protoplasztjainak indukált fúziójával heterokarionokat állítunk elő. A heterokarionok sejtjeiben kis gyakorisággal kariogámia történik, és heterozigóta diploid sejtmagok jönnek létre. Ez a szomatikus diploid állapot a fonalgombák egy részében viszonylag stabil, másokban átmeneti. Az első esetben haploidizáló szerek hatására, a második esetben spontán, haploidizáció jászdódik le, és aneuploid származékokon keresztül haploid neokombinánsokhoz juthatunk, melyek tulajdonságai a szülői törzsekétől már eltérőek lehetnek. A protoplasztfúziós törzsnemesítésbe az antagonizmus-vizsgálatokban legjobbnak bizonyuló *T. harzianum* és *T. viride* izolátumokat vontuk be. A heterokarionok előállításához auxotrófia- és rezisztencia-markereket hordozó törzseket használtunk. A

viszonylagosan stabil auxotrófia-markerek elegendőek heterokarionok előállításához, ám biztonságos rekombináns-izoláláshoz gyakran nem elegendő egy-egy auxotrófia-markert hordozó törzs használata.

Valamennyi vizsgált *Trichoderma* törzsből 10^7 - 5×10^7 db protoplasztot tudtunk előállítani liofilizált éticsiga (*Helix pomatia*) gyomornedv segítségével. A protoplasztok regenerációjához 0,8 M szacharózt alkalmaztunk. A klasszikus PEG- Ca^{2+} -os módszerrel 12 heterokariont állítottunk elő és belőlük számos rekombinánst izoláltunk. Felismerésüket segítette, hogy minden keresztezésnél recesszív rezisztencia-markert (metilamin-rezisztencia illetve 8-azaguanin-rezisztencia) is ráépítettünk UV-mutagenézissel az auxotrófia-marker mellé az egyik partnerre. A gyakoriság igen alacsony volt ($0,4$ - $2,4/10^8$ konídium), és nem minden heterokarion esetében jöttek létre rekombinánsok. A negatív esetek magyarázata a rezisztencia- és auxotrófia-markerek közötti esetenkénti erős transzkapcsoltság lehet.

Protoplasztfúzióval sikerrel kereszteztük az USA-ban izolált, benomil-rezisztens *T. harzianum* T95 jelű törzset hidegtűrő *T. harzianum* és *T. viride* törzseinkkel. Az intraspecifikus és interspecifikus fúziókat követően létrejött benomil-rezisztens törzsek fenotípusukat illetve hőmérsékleti optimumukat tekintve a hidegtűrő szülőkre hasonlítottak, konídiumaik szelektív táptalajon történő csírázása pedig nem-heterokarionikus hifára utalt [5].

TÖRZSNEMESÍTÉS TRANSZFORMÁCIÓVAL

A transzformációs nemesítés lényege, hogy izolált DNS-molekulákat juttatunk be a nemesítendő törzsbé, ahol azok a sejtmagba jutva gyakran integrálódnak a kromoszómákba, megváltoztatva ezáltal a törzs tulajdonságait. A transzformáló DNS-en olyan genetikai markernek kell lennie, mely az adott gombatörzs esetében az idegen DNS-t beépített utódok megtalálását lehetővé teszi, azaz szelekciós lehetőséget biztosít. Leggyakrabban auxotrófia-mutációt komplementáló vagy rezisztenciát hordozó plazmidmolekulákat használnak erre a célra. Nemesítési kísérleteink során a pSV50, pCSN43, pKIM7, pPAura-510, pTRura5-3 és a pSal23 plazmidokat alkalmaztuk.

A transzformációs kísérletekbe a *T. harzianum* 4/8 és 3/56-MKV2 valamint a *T. viride* 1/24-MKV7 törzseket vontuk be. Mivel hygromycinnel szemben csak a *T. viride* 1/24-MKV7 törzs volt elég érzékeny, a *T. harzianum* 4/8 és 3/56-MKV2 törzsek transzformációjához auxotrófia-komplementációra alkalmas vektorokat választottunk ki, melyekhez UV mutagenézissel állítottuk elő a megfelelő befogadó törzseket. Szűrőes mutáns-dúsítási módszerrel a *T. harzianum* 4/8 törzsből 16 arginin-auxotróf mutánst [6], direkt szelekciós módszerrel a *T. harzianum* 3/56-MKV2 törzsből kilenc uracil-auxotróf mutánst [7] hoztunk létre. Törzseink igen érzékenyek voltak élesztőkivonatos táptalajon MBC-re, a benomyl hatóanyagára. A MIC érték $0,5$ - $1 \mu\text{g/ml}$ között variált, így a pSV50 vektor használata mindegyik esetben lehetséges volt.

A protoplasztok PEG- Ca^{2+} kezelésén alapuló módszerrel valamennyi törzs esetében számos transzformánst izoláltunk. A *T. viride* 1/24-MKV7 esetében a pCSN43 [8], a *T. harzianum* 3/56-MKV2 esetében pedig a pTRura5-3 [7] bizonyult a leghatékonyabb transzformációs vektornak. A pSV50 vektor esetében nem sikerült eredményt elérnünk.

A kísérleteinkben alkalmazott nukleázgátló szerek közül 10 mM koncentrációban a putreszcin háromszorosára, az alumion tízszeresére, a spermidin harmincszorosára, a spermin viszont ötvenszeresére emelte a transzformáció gyakoriságát 1/24-MKV7/pCSN43 rendszerben [8].

A kotranszformáció lényege, hogy ha a szelekciós markert hordozó plazmid DNS-en kívül más, esetleg szelekciós markert nem hordozó DNS-molekulák is jelen vannak a transzformáció során, ezek 30-70%-os gyakorisággal beépülnek a transzformánsokba. Az 1/24-MKV7/pCSN43 rendszerrel végzett kotranszformációs kísérletekben a *T. harzianum* 4/8 törzsből származó összDNS-sel kotranszformáltunk. Az így átjuttatott genomdarabok lényegesen befolyásolhatják a befogadó törzs antagonista képességét. A kotranszformációs metodikával valóban sikerült kiemelkedő képességű törzseket izolálnunk.

A VAD ÉS NEMESÍTETT *TRICHODERMA* TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM- ÉS TOXINTERMELŐ KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Munkánk során a *Trichoderma* törzsek antimikrobiális hatású vegyületek szekréciójára való képességét is vizsgáltuk. Az antibiotikum-termelési képességet lyukteszt-módszerrel vizsgáltuk egyszerű összetételű minimál tápoldatban, valamint *Fusarium* sejtek jelenlétében megtermelt fermentlevekben. Teszt-mikroorganizmusként baktérium-, élesztő- és fonalgombafajokat választottunk, köztük *Fusarium culmorum*-ot is. Mind a vad, mind a nemesített törzsek esetében a veszélyes immunszuppresszív tulajdonságú, baktériumokat is gátló gliotoxin termelése kizárható, a fermentlevek csak fonalgomba-ellenes aktivitást mutattak.

A tényleges nemesítési munkába bevont törzsek közül a *T. hamatum* 2/2 és *T. viride* 1/24 vad törzseknek nem volt antibiotikus hatása. Az antibiotikum-termelési képesség és a mikoparazita képesség között nem tapasztaltunk összefüggést, ugyanis épp a legjobb antibiotikum-termelő *T. hamatum* 3/10 törzs bizonyult a legrosszabb mikoparazitának mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között, míg az antibiotikum-termelésre képtelen *T. viride* 1/24 kiemelkedően jó antagonista tulajdonsággal rendelkezett.

A nemesített törzsek esetében az antibiotikum-termelő képesség nagy változatosságot mutatott, a derepresszált enzintermelők esetében gyakran jelentősen emelkedett. Érdekesség, hogy míg a *T. viride* 1/24 törzs képtelen volt antibiotikum-termelésre, nitrogén-anyagcserében derepresszált mutánsai között azonban találtunk fonalgomba-ellenes antibiotikus aktivitásúakat, bár ezek közül sem a legjobb antibiotikum-termelők voltak a legjobb antagonisták. Gliotoxin-termelésre utaló jeleket a mutáns vonalak esetében sem tapasztaltunk. A hasznosításra kiemelt törzsek közül a *T. harzianum* 4/8 és 3/56 izolátumokból nemesített törzsek mutattak fonalgomba-ellenes antibiotikum-aktivitást, a *T. viride* 1/24 származékai közül pedig csak a MEA7 törzsnek volt *Aspergillus niger*-ellenes hatása.

Trichoderma törzseink *in vitro* antagonizmusában az antibiotikum-termelő képességnek tehát elhanyagolható a jelentősége, inkább a törzsek gombasejtfaloldó enzintermelő képessége a döntő. Hasznosításra javasolt törzseink toxint nem termelnek, így gyakorlati alkalmazásuknak nincs akadálya.

A NEMESÍTETT TÖRZSEK *IN VITRO* ÉS *IN VIVO* ANTAGONIZÁLÓ KÉPESSÉGE

A mutagenezissel előállított, megváltozott enzintermelésű törzsek közül 72 mutánt választottunk ki, így az öt szülői törzsszel együtt a vizsgálatba bevont törzsek száma 77 volt. Az antagonizmus-vizsgálatot nitrogén-anyagcserére represszív táptalajon végeztük a talajban uralkodó viszonyok jobb modellezése céljából. A legjobb törzsek képesek voltak a *Fusarium*-, *Pythium*- és *Rhizoctonia*-tenyészetekre rákötni, és dezorganizálni azokat. Az olyan mutáns típusok közül kerültek ki a legjobb biopeszticid-jelöltek, melyekben a sejtfalbontáshoz szükséges három enzim aránya összehangoltan emelkedett meg, de nem olyan szintig, hogy az már az antagonizmusához szükséges szívóhifák kialakulását zavarja.

Protoplasztfüziót követő rekombinációval 49 nemesített törzset sikerült előállítanunk. Ezeket *F. culmorum*-mal szemben vizsgáltuk *in vitro* antagonizmus-tesztben, és 17, a szülői törzs antagonizáló képességét meghaladó tulajdonságú törzset találtunk. Ezek között kiemelkedő képességűnek az 1/24-R9 és az 1/24-R14, valamint a 4/8-R5 és a 4/8-R7 törzsek bizonyultak.

A transzformációval előállított 177 új törzs között 30 igen jó antagonizáló törzset találtunk *in vitro* antagonizmus-tesztben *F. culmorum*-mal szemben. Különösen jónak bizonyultak az 1/24-MKV7 törzsből készült TR14 és TR43, a 3/56-MKV2 törzsből készült K11, K33, PA24 valamint TR2 és TR37 törzsnek. A kotranszformációval nemesített törzsek közül a KTR23 és a KTR37 bizonyult a legjobbnak.

A szegeói Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság által végzett *in vivo* vizsgálatokból megállapítható volt, hogy sem a kiválasztott vad, sem pedig a nemesített törzsek nem viselkedtek fakultatív parazitaként a csirázó kukoricaszemeken, sőt csirázáserkentő hatásuk volt. Számos törzs képes volt megvédeni a csirázó kukoricát *F. culmorum* támadásával szemben. Az *in vitro* körülmények között kiemelkedő képességű törzsek nem bizonyultak minden esetben *in vivo* is a leghatékonyabbnak, viszont a legjobb *in vivo* hatást mutató törzsek *in vitro* körülmények között is hatékonyabbak voltak a szülői törzsnél. A gyakorlati alkalmazhatóság szempontjából az *in vivo* eredmények a döntőek, ezért az *in vivo* körülmények között hatékony törzsek gyakorlati hasznosítása céljából hasznosítási szerződést kötöttünk a tapolcai székhelyű BioGen Kft-vel.

Köszönetnyilvánítás: Munkánk az OMFB 91-97-07-0304-es és a TÉT MAKKA 95a-496-os számú szerződések támogatásával készült.

IRODALOM

1. Manczinger, L.: Biological control of agricultural pests by filamentous fungi. *Acta Microbiol Immunol Hung* **46**, 259-267 (1999).
2. Kredics, L., Antal, Zs., Manczinger, L.: Influence of water potential on growth, enzyme secretion and *in vitro* enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Curr Microbiol* **40**, 310-314 (2000).
3. Kredics, L., Dóczy, I., Antal, Zs., Manczinger, L.: Effect of heavy metals on growth, and extracellular enzyme activities of mycoparasitic *Trichoderma* strains. Accepted in *Bull Environ Contam Toxicol* (2000).
4. Antal, Zs., Manczinger, L., Szakács, Gy., Tengerdy, R.P., Ferenczy, L.: Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycol Res* **104** (5), 545-549 (2000).
5. Antal, Zs., Manczinger, L., Kredics, L., Szakács, Gy., Tengerdy, R.P., Ferenczy, L.: Breeding of *Trichoderma* strains by protoplast fusion. *Acta Microbiol Immunol Hung* **46**, 136-137 (1999).
6. Antal, Zs., Manczinger, L., Ferenczy, L.: Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol Lett* **11**(3), 205-208 (1997).
7. Manczinger, L., Antal, Zs., Ferenczy, L.: Isolation of uracil auxotrophic mutants of *Trichoderma harzianum* and their transformation with heterologous vectors. *FEMS Microbiol Lett* **130**, 59-62 (1995).
8. Manczinger, L., Komonyi, O., Antal, Zs., Ferenczy, L.: A method for high-frequency transformation of *Trichoderma viride*. *J Microbiol Methods* **29**, 207-210 (1997).