

## GENY BIOSYNTÉZY TRICHOHECENŮ U RODU *Fusarium*

HANA HAVRÁNKOVÁ<sup>a,b</sup>  
a JAROSLAVA OVESNÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně, <sup>b</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6 - Dejvice  
ovesna@vurv.cz, havrankova@vurv.cz

Došlo 17.10.11, přijato 24.1.12.

Klíčová slova: *Fusarium*, mykotoxiny, trichotheceny, genový klastř

### Obsah

1. Úvod
2. Taxonomie
3. Patogenita
4. Výskyt
5. Fusariové mykotoxiny
  - 5.1. Trichotheceny
    - 5.1.1. T-2 a HT-2 toxin
    - 5.1.2. Deoxynivalenol
  - 5.2. Zearalenony
  - 5.3. Fumonisin
6. Biosyntéza mykotoxinů – trichothecenů
  - 6.1. Klastř *Tri5*
  - 6.2. Regulace genové exprese
  - 6.3. Klastř *Tri1-Tri16*
  - 6.4. Geny vyskytující se mimo klastř
7. Závěr

### 1. Úvod

Plísně rodu *Fusarium* jsou celosvětově rozšířenými patogeny obilovin a původci především kořenové, stonkové a klasové hniloby. Jimi způsobené infekce snižují výnosy a kvalitu zrna a mají za následek podstatnou redukci úrody a tím celosvětové ekonomické ztráty. Přítomnost plísní rodu *Fusarium* kromě toho negativně ovlivňuje zdraví člověka, a to především působením jejich metabolických derivátů, mykotoxinů. Z tohoto důvodu je výzkum produkce mykotoxinů velmi rozsáhlý<sup>1,2</sup>. Ztráty způsobené fusariosami jsou značné i v České republice<sup>3</sup>.

### 2. Taxonomie

Z taxonomického hlediska je rod *Fusarium* zařazen v doméně *Eukaryota*, říši *Fungi*, oddělení *Ascomycota*, třídě *Sordariomycetes*, podtřídě *Hypocreomycetidae* a řádu *Hypocreales*<sup>4,5</sup>. *Fusaria* produkují dlouhé, mnohobuněčné makrokonidie podlouhle srpkovitého nebo banánovitého tvaru. Tyto velké nepohlavní konidie jsou charakteristickým morfoloogickým znakem rodu. Morfologie spor byla dříve hlavním kritériem taxonomického členění rodu *Fusarium*. Za poslední desetiletí však taxonomie zaznamenala řadu změn a byla zpřesněna identifikací pomocí molekulárně biologických metod<sup>2,6</sup>.

### 3. Patogenita

Vstupní branou pro infekci rostlin jsou poškozená pletiva. Patogen napadá rostliny ve všech fázích jejich vývoje, nicméně nejkritičtější období je doba kvetení. Napadené klasy hnědnou a zasychají. Tvoří se sporodochia s bělorůžovými až rumělkovými konidiami. Po dozrání sporodochií dojde k uvolnění konidií, a ty jsou roznášeny větrem do okolí. Bílé obilky, zcela prorostlé myceliem, jsou charakteristické vysokým obsahem mykotoxinů. Hlavní klimatické faktory ovlivňující rozvoj fusariosy jsou teplota a vzdušná vlhkost<sup>3,7</sup>.

### 4. Výskyt

Geografické rozšíření je proto spojeno především s klimatickými podmínkami. Zatímco v teplých a mírných oblastech Ameriky, Austrálie, Afriky, Asie a Evropy se vyskytuje nejvíce *F. graminearum*, které je také pokládáno za nejvýznamnějšího původce fusariosy klasů, ve studenějších oblastech severní Evropy převládá *F. culmorum*. V těchto oblastech však jsou důležitými kontaminanty obilí i *F. poae* a *F. avenaceum*<sup>1,2</sup>. Na území České republiky se jako nejčastější patogen vyskytuje *F. graminearum*, dále převládají druhy *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* a *F. equiseti*. K produkci toxických metabolitů dochází především při napadení druhy *F. graminearum* a *F. culmorum*<sup>3</sup>.

*F. graminearum* napadá primárně obiloviny, a to především kukuřici, pšenici a ječmen, ale nalezneme ho např. i na kávovníku, luštěninách nebo bramborách. Je znám produkci řady mykotoxinů, především deoxynivalenolu, nivalenolu a zearalenonu, které způsobují onemocnění zvířat i lidí<sup>1,2</sup>.

*F. culmorum* je typickým půdním patogenem. Napadá především rostlinné zbytky v půdě, ale šíří se i na klasy

některých obilovin, například pšenice a ječmene. *F. culmorum* produkuje široké spektrum mykotoxinů, které způsobují choroby především hospodářských a laboratorních zvířat<sup>1,2</sup>.

## 5. Fusariové mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované vláknitými houbami. Plísně produkující mykotoxiny, které zasahují do potravního řetězce, náleží hlavně ke třem rodům: *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Zatímco rod *Fusarium* je rostlinný patogen produkující mykotoxiny před sklizní nebo bezprostředně po ní, rody *Penicillium* a *Aspergillus* jsou obvykle popisovány jako kontaminanty surovin a potravin během sušení a následného skladování<sup>8</sup>. Mezi nejvýznamnější toxiny rodu *Fusarium* patří trichotheceny, fumonisiny a zearalenony<sup>9</sup>.

Vzhledem k jejich negativnímu vlivu na zdraví člověka platí v rámci EU Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 (cit.<sup>10</sup>), které stanovuje maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, včetně limitů fusariových toxinů v obilninách. Maximální limit obsahu významného mykotoxinu deoxyvalenolu pro nezpracované obiloviny, kromě pšenice tvrdé, ovsu a kukuřice, je 1,25 mg kg<sup>-1</sup>.

### 5.1. Trichotheceny

Trichotheceny jsou skupinou mykotoxinů produkovaných nejméně 24 odlišnými druhy rodu *Fusarium*. Ze všech mykotoxinů jsou právě trichotheceny chemicky nejrozmanitější. Jsou to tricyklické seskviterpeny s bazickým 12,13-epoxy-9- trichothecenem<sup>11</sup> (obr. 1).

Byly identifikovány čtyři typy trichothecenů – typ A má funkční skupinu na C-8 jinou než ketonickou, typ B má na C-8 karbonylovou skupinu (obr. 1), typ C má sekundární epoxy skupinu na C-7,8 nebo C-9,10, typ D obsahuje makrocyclický kruh mezi C-4 a C-15 s dvěma esterovými vazbami<sup>12</sup>.

Nejvýznamnějšími toxiny typu A jsou T-2 toxin a HT-2 toxin; u typu B je to deoxynivalenol (DON). U jednotlivých druhů rodu *Fusarium* rozlišujeme různé chemotypy. Druh *F. graminearum* například zahrnuje dva

chemotypy. Jeden produkuje nivalenol (NIV) a druhý DON a jeho acetylované deriváty<sup>13</sup>.

#### 5.1.1. T-2 a HT-2 toxin

T-2 a HT-2 toxiny jsou úzce příbuzné s epoxy, seskviterpenoidy. Nacházejí se v zrnech pšenice, kukuřice, ovsu, ječmene, rýže, sojových bobů a v cereálních produktech. T-2 a HT-2 toxiny jsou produkovány druhy *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* a *Fusarium acuminatum*. Pokud se T-2 toxin stanou součástí potravního řetězce, je jejich primárním cílem imunitní systém – působí změny v počtu leukocytů, opožděnou hypersenzitivitu, dochází k poklesu protilátek<sup>14</sup>.

#### 5.1.2. Deoxynivalenol

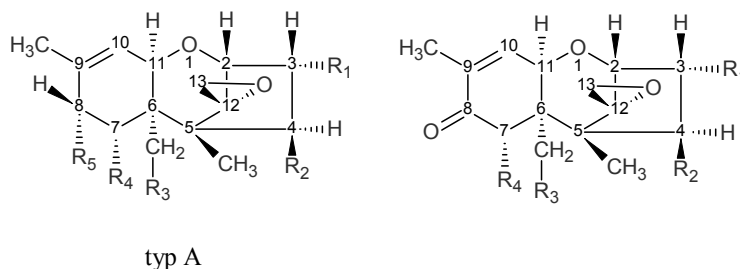
DON, nejběžněji se vyskytující trichothecen, má molární hmotnost 296,3 g mol<sup>-1</sup>, což koresponduje s molekulovým vzorcem C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> (cit.<sup>12</sup>). Deoxynivalenol se vyskytuje převážně v zrnech pšenice, ječmene a kukuřice, méně u ovsu, rýže, čiroku a žitovce. Výskyt deoxynivalenolu je primárně spojen s druhy *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum*<sup>14</sup>. Vzhledem k tomu, že se jedná o nejrozšířenější druhy rodu *Fusarium* v ČR, je také DON nejrozšířenějším mykotoxinem<sup>3</sup>. Účinek deoxynivalenolu na zdraví zvířat a člověka závisí na formě jeho přijetí. Akutní mykotoxikosa (požití vyšší dávky) má za následek charakteristický, klinicky zjevný syndrom – nechutenství (anorexie) a zvracení (emeze) – nebo smrt<sup>11,14</sup>.

### 5.2. Zearalenony

Mykotoxin zearalenon (ZEA) je β-resorcycký laktón<sup>12</sup>, který kontaminuje především kukuřici, ale nalezneme ho i u ovsu, ječmene, pšenice a čiroku<sup>9</sup>. Výskyt zearalenonů je téměř vždy spojen s ostatními fusariovými mykotoxiny včetně trichothecenů<sup>15</sup>. Zearalenony se mohou kompetitivně vázat na estrogení receptory (namísto estradiolu) a ovlivňovat tak reprodukční schopnost živočichů<sup>9,14</sup>.

### 5.3. Fumonisininy

Název fumonisínů byl odvozen od druhu *F. moniliforme* (dnes *F. verticillioides*), ze kterého byl izolován



Obr. 1. Strukturální vzorce trichothecenů typu A a B (cit.<sup>11</sup>)

první zástupce této skupiny mykotoxinů – fumonisin B1 (diester propan-1,2,3-trikarboxylové kyseliny; FB1). *F. verticillioides* je také jediným ze dvou druhů rodu *Fusarium* (*F. proliferatum*), které konstantně produkují výrazné množství těchto toxinů<sup>1,14</sup>. Výskyt fumonisinů v potravinách je velice ojedinělý, výjimečně se vykytují v čiroku, chřestu, rýži, pivu nebo fazolích mungo<sup>14</sup>. Fumonisin B1 je hepatotoxický, hepatokarcinogenní, inhibuje biosyntézu sfingolipidů a také zvyšuje riziko rakoviny jícnu u člověka<sup>8</sup>.

## 6. Biosyntéza mykotoxinů – trichothecenů

Většina genů, související s biosyntézou sekundárních metabolitů, je v genomu plísní uspořádána do tzv. klastrů – vazbových skupin. Důvod tohoto jevu zatím není znám<sup>16</sup>. Jedna z hypotéz předpokládá nutnost takového uspořádání pro koregulaci genů specifických pro danou biosyntézu<sup>17</sup>. Bylo ale zjištěno, že některé geny, vyskytující se mimo klastr, jsou koregulovány s geny uvnitř klastru. Pozice genu tedy nemusí být zásadní pro odpovídající aktivitu<sup>16</sup>.

*F. graminearum* a *F. sporotrichioides* mají geny biosyntetické dráhy trichothecenů (tzv. *Tri* geny) lokalizovány ve 3 lokusech. Tyto *Tri* lokusy mají komplexní evoluční historii, během které docházelo ke ztrátám funkce a přeuspořádání jednotlivých genů. Většina plísní rodu *Fusarium* má obdobné uspořádání genů jako *F. graminearum* a *F. sporotrichioides*, u jiných je pak lokusů méně<sup>18</sup>.

U druhu *F. graminearum* je většina genů spojených s biosyntézou trichothecenů součástí klastru *Tri5*. Dva

další *Tri* geny se nacházejí v miniklastru *Tri1-Tri16*. Mimo tyto genové klastry, v samostatných lokusech, nalezneme geny *Tri15* a *Tri101* (cit.<sup>16</sup>, tab. 1). Obdobné výsledky základního rozdělení genů biosyntetické dráhy mykotoxinů byly získány i pro rody *Fusarium culmorum* a *Fusarium sporotrichioides*<sup>1,18,19</sup>.

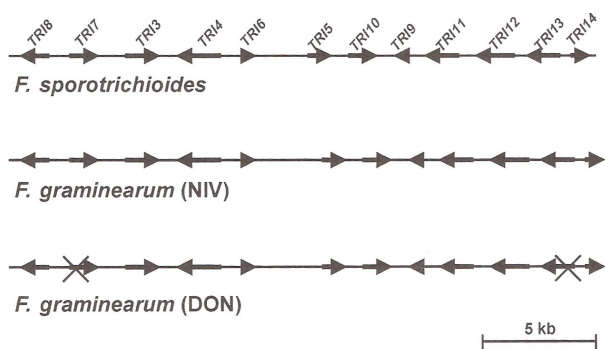
### 6.1. Klastr *Tri5*

Klastr *Tri5* je velký 25 kb a je na genetické mapě druhu *F. graminearum* lokalizován uvnitř vazbové skupiny 1 (cit.<sup>1</sup>). Struktura klastru *Tri5* a funkce obsažených *Tri* genů jsou v rámci většiny druhů rodu *Fusarium* konzervativní<sup>19</sup> (obr. 2). Za klíčové jsou pro biosyntézu trichothecenů považovány geny *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* a *Tri13*. Jejich exprese závisí na environmentálních podmínkách<sup>20</sup>. Ke klíčovým faktorům, které ovlivňují genovou expresi klastru *Tri5* shodně u všech druhů rodu *Fusarium*, patří především hodnota pH (cit.<sup>21</sup>).

Gen *Tri5* je topografickým centrem klastru *Tri5* a také prvním klonovaným genem biosyntetické dráhy trichothecenů<sup>1</sup>. Kóduje enzym trichodien syntasu, která katalyzuje izomerizaci a cyklizaci farnesyl pyrofosfátu (FFP) na trichodien<sup>19</sup>. FFP je společným meziproduktem izoprenilace proteinů a biosyntézy sterolů, ubichinonů, dolicholů a řady sekundárních metabolitů<sup>1</sup>. Biosyntéza trichothecenů se od obecného metabolismu isoprenů odlišuje právě vznikem intermediátu trichodienu cyklizací z FFP (cit.<sup>13,22</sup>). Klíčovou roli toho enzymu dokumentuje i snížení produkce trichothecenů, jako následek mutace v *Tri5* genu<sup>1</sup>.

Tabulka I  
Charakteristika *Tri* genů<sup>1</sup>

Klastr	Gen	Protein	Funkce
<i>Tri5</i>	<i>Tri5</i>	trichodien syntasa	seskviterpen cyklasa
	<i>Tri4</i>	trichodien oxygenasa	cytochrom P450
	<i>Tri11</i>	isotrichodermin 15-oxygenasa	
	<i>Tri13</i>	kalonektrin 4-oxygenasa	
	<i>Tri3</i>	trichothecen 15- <i>O</i> -acetyltransferasa	acetylce/deacetylce
	<i>Tri7</i>	trichothecen 4- <i>O</i> -acetyltransferasa	
	<i>Tri8</i>	trichothecen 3- <i>O</i> -esterasa	
	<i>Tri6</i>	transkripční faktor	regulace a transport
	<i>Tri10</i>	regulační protein	
	<i>Tri12</i>	přenašeč rodiny MFS	
	<i>Tri9</i>	neobjasněno	ko-regulace
	<i>Tri14</i>	neobjasněno	
	<i>Tri1-Tri16</i>	<i>Tri1</i>	kalonektrin 8-oxygenasa triacetoxyscirpenol 8-oxygenasa
<i>Tri16</i>		trichothecen 15- <i>O</i> -acyltransferasa	acetylce/deacetylce
Žádný	<i>Tri15</i>	transkripční faktor	regulace a transport
	<i>Tri101</i>	trichothecen 3- <i>O</i> -acetyltransferasa	acetylce/deacetylce



Obr. 2. Klastri *Tri5* (cit.<sup>1</sup>); porovnání klastru *Tri5* druhu *F. sporotrichioides* a NIV/DON chemotypu druhu *F. graminearum*. Šipky značí velikost genů a směr transkripce; křížky značí nefunkční pseudogeny DON chemotypu

Multifunkční cytochrom P450 monooxygenasa, TRI4, katalyzuje další čtyři biosyntetické kroky: C-2 hydroxylaci, 12,13 epoxidaci a dvě následné hydroxylace. Konečným produktem katalýzy je isotrichotriol, který dále podstupuje dvě neenzymové izomerace za vzniku isotrichodermolu. Isotrichodermol již obsahuje trichothecenovou kostru<sup>13</sup>. Bylo prokázáno, že mutantní linie  $\Delta$ *Tri4* vykazují sníženou produkci trichothecenů a akumulují trichodien<sup>1</sup>. Podobný efekt jako delece v genu má xanthotoxin a jiné furanokumariny a flavony, které inhibují aktivitu uvedeného enzymu<sup>23,24</sup>.

Isotrichodermol je dále acetylován enzymem TRI101 (jehož gen *Tri101* sám není součástí klastru *Tri5*) na C-3 a hydroxylován enzymem TRI11 na C-15 za vzniku 15-deacetylkalonektrinu<sup>13</sup>. TRI11 byla druhou identifikovanou cytochrom P450 monooxygenasou v biosyntéze trichothecenů. Katalyzuje tedy C-15 hydroxylaci isotrichodermínu. Delece genu *Tri11* má proto za následek blokáci produkce T-2 toxinu a akumulaci isotrichodermínu<sup>25</sup>.

15-Deacetylkalonektrin, centrální molekula, může být použit jako substrát pro syntézu DON; alternativní cestou je acetylace na C-15 za katalýzy enzymu TRI3, která vede ke vzniku kalonektrinu. Kalonektrin je prekurzorem pro biosyntézu acetylovaných derivátů DON a NIV, zahrnujících 3,15-diacetyldeoxynivalenol (3,15-diADON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) a 4-acetyl-nivalenol (4-ANIV) (cit.<sup>13</sup>). Acetylace prostřednictvím TRI3 je také nezbytným krokem syntézy T-2 toxinu. Vyřazení genu *Tri3* má za následek akumulaci deacetylovaného kalonektrinu<sup>26</sup>.

Dalším významným genem biosyntézy je *Tri13*, který kóduje 3-acetyltrichothecen C-4 hydroxylasu<sup>19</sup>. *Tri13* je, spolu s genem *Tri7*, prvkem určujícím chemotyp druhu *Fusarium graminearum* – u určitých kmenů je zodpovědný za tvorbu NIV (NIV chemotypy), u DON chemotypů je z důvodu tří delecí nefunkční. U druhu *F. sporotrichioides* se *Tri13* podílí na oxygenaci kalonektrinu, tento krok ale není nezbytný pro produkci T-2 toxinu<sup>27</sup>.

Gen *Tri7* kóduje 3-acetyltrichothecen 4-*O*-acetyltransferasu<sup>19</sup>. U druhu *F. sporotrichioides* se *Tri7* podílí na

tvorbě T-2 toxinu. U DON chemotypů druhu *F. graminearum* je *Tri7* nefunkční, u NIV chemotypu napomáhá vzniku acetylovaných derivátů NIV (cit.<sup>27</sup>). Na základě struktury genů *Tri3*, *Tri5*, *Tri7* (cit.<sup>28–30</sup>) a *Tri13* (cit.<sup>28</sup>) byly pro identifikaci chemotypu druhů *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* navrženy molekulární markery.

Funkční exprese genů *Tri7* a *Tri13* je tedy u druhu *Fusarium graminearum* nezbytná pro produkci NIV a jeho acetylovaných derivátů. NIV může být syntetizován přímo z DON (TRI3) nebo konverzí kalonektrinu na 3,15-diacetoxyscirpenol (3,15-DAS) (TRI13) a následným připojením ketonové skupiny k C-8 (cit.<sup>13</sup>).

U druhu *Fusarium sporotrichioides* je biosyntéza T-2 toxinu podmíněna expresí genů *Tri7* a *Tri8*. Acetylaci 3,15-DAS na C-4 vzniká 3,4,15-triacetoxyscirpenol (3,4,15-TAS) (TRI7). 3,4,15-TAS může být přeměněn enzymem TRI8 na 4,15-DAS nebo využit jako substrát pro syntézu T-2 toxinu, katalyzovanou TRI1 (cit.<sup>13</sup>). Esterasa TRI8 odnímá acetylovou skupinu z pozice C-3 i u druhu *F. graminearum*, čímž vzniká 4,15-DON. Jelikož jsou acetylované deriváty trichothecenů méně toxické, je gen *Tri8* označován za faktor toxicity<sup>31</sup>.

Ostatní geny klastru *Tri5* souvisí s regulací (*Tri6*, *Tri10*) nebo transportem (*Tri12*), popřípadě nebyla jejich úloha dosud plně objasněna (*Tri9*, *Tri14*).

Gen *Tri12* kóduje přenašeč se sekvenční homologií s rodinou MFS (mononukleární fagocytární systém). Vyřazení *Tri12* má za následek sníženou produkci trichothecenů a redukci růstu plísňě na komplexním médiu<sup>32</sup>. TRI12 napomáhá přenosu trichothecenů, a tím zřejmě i eliminaci inhibičního efektu způsobeného toxinem<sup>16</sup>.

## 6.2. Regulace genové exprese

Expresí genů zahrnutých v biosyntetické dráze trichothecenů je ovlivňována jak environmentálními faktory<sup>21,33,34</sup>, tak i samotnými geny klastru *Tri5*, které plní regulační funkci. Jedná se o geny *Tri6* a *Tri10*. Mechanismus jejich regulace se stal v posledních letech předmětem důkladného zkoumání. TRI6 byl identifikován jako DNA-vazebný protein s motivem zinkových prstů (transkripční faktor), TRI10 jako nový typ regulačního proteinu<sup>16</sup>.

První model regulace byl popsán u druhu *F. sporotrichioides*. Ten předpokládá přítomnost regulační smyčky, ve které aktivace *Tri10* pozitivně reguluje transkripci *Tri6*, a aktivace *Tri6* vede k negativní regulaci exprese *Tri10*. Tato negativní regulace se děje prostřednictvím zpětné vazby transkripčního faktoru TRI6 na specifickou vazebnou sekvenci uvnitř kódující sekvence genu *Tri10*<sup>35,36</sup>. Tag a spol.<sup>35</sup> prokázal, že *Tri10* koordinovaně reguluje geny *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri101* a gen farnesyl pyrofosfát syntasy (FPPS); Peplow a spol.<sup>36</sup> potvrdil regulaci i u dalších 21 genů, z toho u všech deseti dosud známých *Tri* genů. Jelikož byla dále prokázána regulace všech zmíněných *Tri* genů prostřednictvím *Tri6*, byl učiněn závěr, že *Tri10* řídí geny biosyntézy trichothecenů prostřednictvím pozitivní regulace *Tri6* (cit.<sup>35,36</sup>).

Společná regulace FPPS genem *Tri10* a *Tri6* demon-

struje regulační propojení mezi biosyntézou isoprenoidů a trichothecenů. Koordinovaná exprese čtyř genů biosyntézy isoprenoidů geny *Tri10* a *Tri6* znázorňuje regulační síť, která propojuje tyto primární a sekundární metabolické dráhy<sup>35,36</sup>.

Za určitých podmínek hrají geny *Tri6* a *Tri10* významnou roli v sebeobraně plísně proti T-2 toxinu; mohou totiž regulovat i expresi genů zvyšujících toxicitu plísně proti vlastním toxinům (např. genu *Tri101*)<sup>35,36</sup>.

Při studiu regulačního modelu genů *Tri6*, *Tri10* u druhu *F. graminearum* byl zjištěn odlišný vztah, ve kterém není *Tri10* řídícím regulačním faktorem, ale zastává spíše funkci pomocníka genu *Tri6*, pravděpodobně jako součást TRI6 transkripčního komplexu<sup>16</sup>.

V tomto modelu reguluje gen *Tri6* expresi ještě širšího spektra genů. Kromě genů souvisejících biosyntézou trichothecenů a isoprenoidů, to jsou např. geny související s nákazou, virulencí a sebeobranou, geny sekundárního metabolismu (toxiny, siderofory atd.) nebo geny kódující nejruznější přenašeče<sup>16</sup>. Podrobný model je patrný z obr. 3.

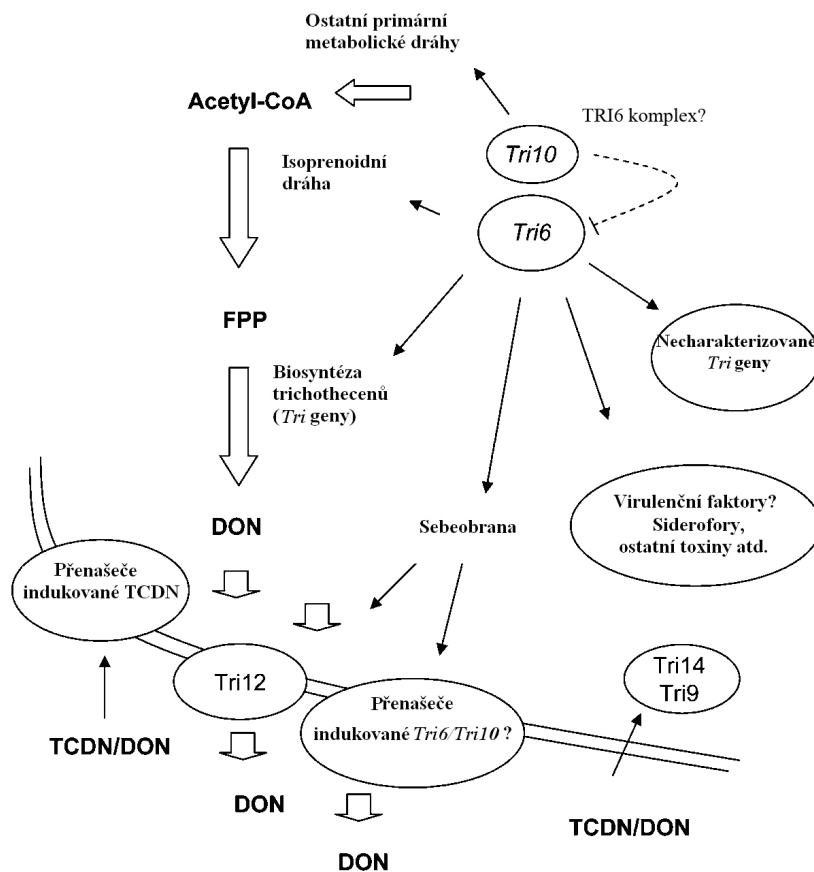
### 6.3. Klastř *Tri1-Tri16*

Klastř *Tri1-Tri16* je na genetické mapě druhu *F. graminearum* lokalizován uvnitř vazbové skupiny 1 (cit.<sup>1</sup>).

U druhu *F. sporotrichioides* kóduje gen *Tri1* 3-acetyltrichothecen C-8 hydroxylasu<sup>19</sup>. Vyřazení genu má za následek akumulaci 3,4,15-TAS (cit.<sup>37</sup>). U druhu *F. graminearum* byl objeven gen, jehož vyřazení zablokovalo produkci 15-ADON (oxygenovaného v pozicích C-7 a C-8) a vedlo k akumulaci kalonektrinu (není oxygenovaný ani v jedné ze zmíněných pozic). Popsaný gen byl označen *LH1* a kóduje tedy cytochrom P450 oxygenasu, zodpovědnou za oxygenaci v jedné nebo v obou zmíněných pozicích C-7, C-8 (cit.<sup>38</sup>).

U druhu *F. sporotrichioides* *Tri16* kóduje acyltransferasu, která katalyzuje formaci vedlejší esterové skupiny na uhlíku C-8. Enzym TRI6 je nezbytný pro produkci T-2 toxinu. U druhu *F. graminearum* byl nalezen pseudogen *Tri16* přiléhající k *Tri1* (cit.<sup>19,38,39</sup>).

*Tri16* i *Tri1* jsou zodpovědné za adici substituentů na uhlík C-8; substituentů, které jsou nutné k produkci nejtoxičtějších trichothecenů druhu *F. sporotrichioides*<sup>39</sup>.



Obr. 3. Model globální regulace geny *Tri6*, *Tri10* u druhu *F. graminearum*<sup>16</sup>; *Tri6* a *Tri10*, pravděpodobně formou TRI6 transkripčního komplexu, regulují množství genů zapojených do biosyntézy trichothecenů a isoprenoidů, genů spojených s virulencí a sekundárním metabolismem (toxiny, siderofory atd.), genů kódující nejruznější přenašeče. Extracelulární trichodien (TCDN) indukuje některé přenašeče a geny související s vnitřním prostředím, které nejsou regulovány *Tri6*, *Tri10*

Porovnání biosyntetické dráhy u druhu *F. sporotrichioides* a *F. graminearum* je patrné z obr. 4.

#### 6.4. geny vyskytující se mimo klastry

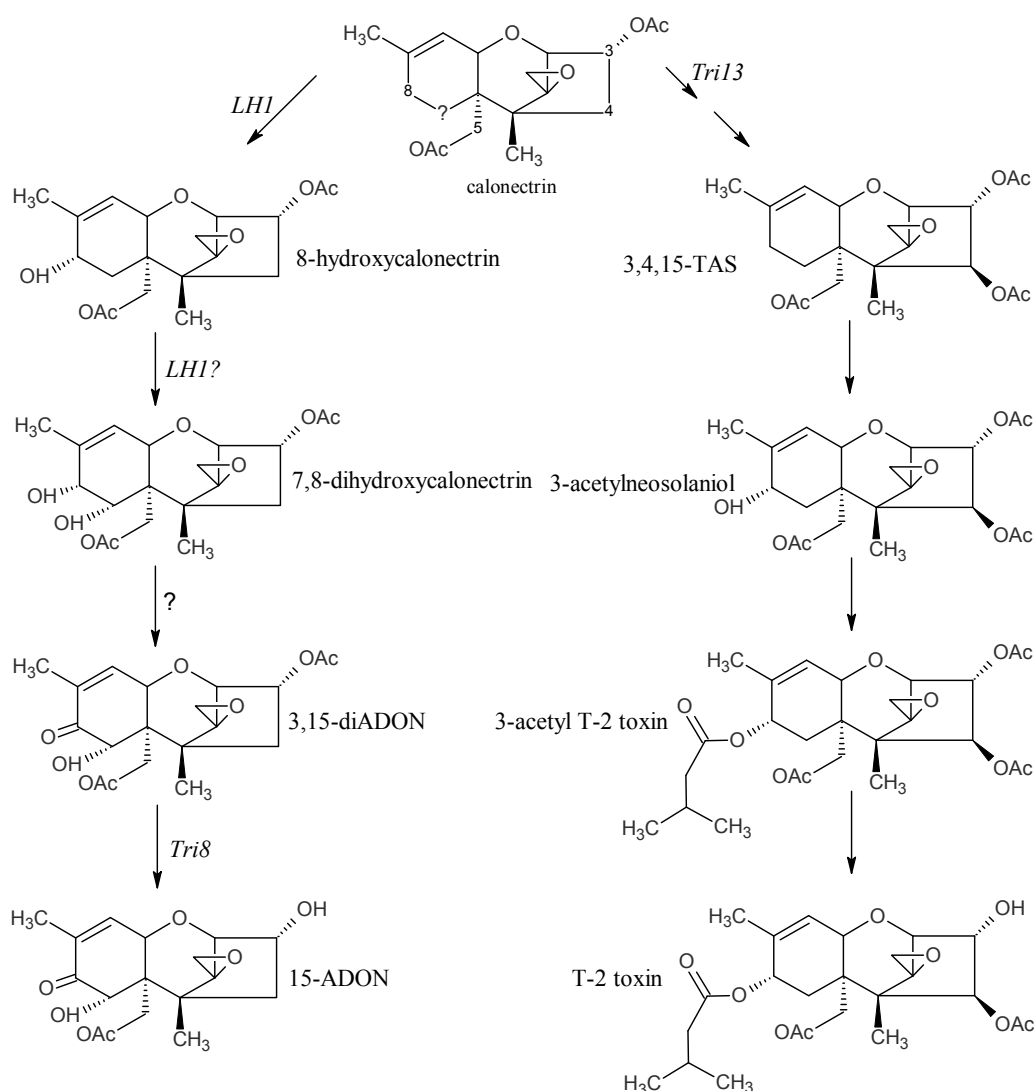
Gen *Tri15* kóduje DNA-vazebný protein s dvěma doménami zinkových prstů. Tento gen je indukován v pozdním stádiu růstu plísně nebo v přítomnosti T-2 toxinu a může negativně regulovat ostatní *Tri* geny<sup>40</sup>. *Tri15* je lokalizován uvnitř vazbové skupiny 2 na genetické mapě druhu *F. graminearum*<sup>1</sup>.

Gen *Tri101* je na genetické mapě druhu *F. graminearum* lokalizován uvnitř vazbové skupiny 3 (cit.<sup>1</sup>). *Tri101* je hlavním genem spojeným se sebeobranou plísně proti vlastním toxinům. *Tri101* kóduje 3-acetylacetylazu, která převádí isotrichodermol na méně toxický isotrichodermin.

Teprve v závěru biosyntézy dochází k deacetylaci produktu a buňka opouští toxická hydroxylovaná forma. *Tri101* tedy dokáže detoxifikovat vlastní trichotheceeny. V rámci různých druhů vykazuje *Tri101* různou specifitu k jednotlivým trichotheceenům; např. *Tri101* druhu *F. sporotrichioides* hůře odbourává toxin produkovaný druhem *F. graminearum* a naopak<sup>22</sup>.

#### 7. Závěr

Je zřejmé, že biosyntéza trichotheceenů je komplexní proces, který vyžaduje spolupráci řady enzymů. Genetická podmíněnost této biosyntetické dráhy je u rodu *Fusarium* předmětem celosvětového zkoumání. Významným faktorem ovlivňujícím expresi *Tri* genů může být například



Obr. 4. Zapojení genů *Tri1* (*LHI*) a *Tri16* do biosyntézy trichotheceenů<sup>38</sup>; biosyntetická dráha u druhu *F. graminearum* (vlevo) a *F. sporotrichioides* (vpravo). AcO/Oac – acéat; 3,15-diADON – 3,15-diacetyl-DON; 3,4,15-TAS – 3,4,15-triacetoxyscirpenol

vztah patogen–hostitel, odlišnost v genotypu jednotlivých hostitelů nebo konkurence mezi patogenními plísněmi. Důraz by měl být kladen i na studium vnitrodruhové variability zástupců rodu *Fusarium*. V další vědecké práci je tedy třeba sledovat regulaci *Tri* genů a jejich odpověď na environmentální faktory nejen *in vitro*, ale i za reálných podmínek.

## Seznam použitých zkratk

15-ADON	15-acetyl-deoxynivalenol
3,15-(di)ADON	3,15-diacetyl-DON
3,15-DAS	3,15-diacetoxyscirpenol
3,4,15-TAS	3,4,15-triacetoxyscirpenol
3-ADON	3-acetyl-deoxynivalenol
4,15-DAS	4,15-diacetoxyscirpenol
4-ANIV	4-acetylnivalenol
AcO/Oac	acetát
DAS	diacetoxyscirpenol
diADON	diacetyl-DON
DON	deoxynivalenol
FB1	fumonisin B1
FFP	farnesyl pyrofosfát
FPPS	farnesyl pyrofosfát syntasa
FUS-X	fusarenon-X
HT-2 tetr.	HT-2 tetraol
HT-2 tox.	HT-2 toxin
kb	kilo báze
MAS	monoacetoxyscirpenol
MFS	mononukleární fagocytární systém
NEO	neosolaniol
NIV	nivalenol
T-2 tetr.	T-2 tetraol
T-2 tox.	T-2 toxin
TCDN	trichodien
ZEA	zearalenon

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT COST OC 09031 a výzkumného záměru MZE 0002700604.

## LITERATURA

- Desjardins A. E.: *Fusarium Mycotoxins, Chemistry, Genetics, and Biology*. The American Phytopathological Society, Minnesota 2006.
- Leslie J. F., Summerell B. A., Bullock S.: *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford 2006.
- Metodika pro praxi*. VÚRV, v.v.i., Praha 2007.
- [www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=8284](http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=8284), staženo 20. 1. 2011.
- [www.biolib.cz/cz/taxonposition/id224563](http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id224563), staženo 20. 1. 2011.
- Glenn A. E.: Anim. Feed Sci. Technol. 137, 213 (2007).
- Doohan F. M., Brennan J., Cooke B. M.: Eur. J. Plant Pathol. 109, 755 (2003).
- Sweeney M. J., Dobson A. D. W.: Int. J. Food Microbiol. 43, 141 (1998).
- Yazar S., Omurtag G. Z.: Int. J. Mol. Sci. 9, 2062 (2008).
- Commission Regulation (EC) (2006) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official J. Eur. Commun. L 364:5-24.
- Radová-Sypecká Z., Hajšlová J.: Zpráva z projektu VVF: PROJ/2003/13/deklas, VŠCHT, VÚRV, v.v.i., Praha (2004).
- Krska R., Welzig E., Boudra H.: 137, 241 (2007).
- Foroud N. A., Eudes F.: Int. J. Mol. Sci. 10, 147 (2009).
- Creppy E. E.: Toxicol. Lett. 127, 19 (2002).
- Placinta C. M., D'Mello J. P. F., Macdonald A. M. C.: Anim. Feed Sci. Technol. 78, 21 (1999).
- Seong K. Y., Pasquali M., Zhou X., Song J., Hilburn K., McCormick S., Dong Y., Xu J. R., Kistler H. C.: Mol. Microbiol. 72, 354 (2009).
- Zhang Y., Wilkinson H., Keller N. P., Tsitsigiannis D. I.: *Secondary Metabolite Gene Clusters*, Handbook of Industrial Microbiology, New York 2004.
- Proctor R. H., McCormick S. P., Alexander N. J.: Mol. Microbiol. 74, 1128 (2009).
- Kimura M., Tokai T., Takahashi-Ando N., Ohsato S., Fujimura M.: Biosci., Biotechnol., Biochem. 71, 2105 (2007).
- Schmidt-Heydt M., Parra R., Geisen R., Magan N.: J. R. Soc., Interface 8, 117 (2011).
- Merhej J., Boutigny A. L., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F., Barreau C.: Food Addit. Contam., Part A 27, 710 (2010).
- Alexander N. J.: World Mycotoxin J. 1, 31 (2008).
- Alexander N. J., McCormick S. P., Blackburn J. A.: Can. J. Microbiol. 54, 1023 (2008).
- Takahashi-Ando N., Ochiai N., Tokai T., Ohsato S., Nishiuchi T., Yoshida M., Fujimura M., Kimura M.: Biotechnol. Lett. 30, 1055 (2008).
- Alexander N. J., Hohn T. M., McCormick S. P.: Appl. Environ. Microbiol. 64, 221 (1998).
- McCormick S. P., Hohn T. M., Desjardins A. E.: Appl. Environ. Microbiol. 62, 353 (1996).
- Lee T., Han Y. K., Kim K. H., Yun S. H., Lee Y. W.: Appl. Environ. Microbiol. 68, 2148 (2002).
- Chandler E. A., Simpson D. R., Thomsett M. A., Nicholson P.: Physiol. Mol. Plant Pathol. 62, 355 (2003).
- Quarta A., Mita G., Haidukowski M., Logrieco A., Mulè G., Visconti A.: FEMS Microbiol. Lett. 259, 7 (2006).
- Quarta A., Mita G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti A.: Food Addit. Contam., Part A 22, 309 (2005).
- McCormick S. P., Alexander N. J.: Appl. Environ. Microbiol. 68, 2959 (2002).
- Alexander N. J., McCormick S. P., Hohn T. M.: Mol. Gen. Genet. 261, 977 (1999).
- Merhej J., Richard-Forget F., Barreau C.: Fungal Genet. Biol. 48, 275 (2011).

34. Yaguchi A., Yoshinari T., Tsuyuki R., Takahashi H., Nakajima T., Sugita-Konishi Y., Nagasawa H., Sakuda S.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 846 (2009).
35. Tag A. G., Garifullina G. F., Peplow A. W., Ake C., Phillips T. D., Hohn T. M., Beremand M. N.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5294 (2001).
36. Peplow A. W., Tag A. G., Garifullina G. F., Beremand M. N.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2731 (2003).
37. Meek I. B., Peplow A. W., Ake C., Phillips T. D., Beremand M. N.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1607 (2003).
38. McCormick S. P., Harris L. J., Alexander N. J., Ouellet T., Saparno A., Allard S., Desjardins A. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2044 (2004).
39. Peplow A. W., Meek I. B., Wiles M. C., Phillips T. D., Beremand M. N.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5935 (2003).
40. Alexander N. J., McCormick S. P., Larson T. M., Jurgenson J. E.: *Curr. Genet.* 45, 157 (2004).

**H. Havránková<sup>a,b</sup> and J. Ovesná<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Crop Research Institute, Prague*, <sup>b</sup> *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*):  
**Genes of Trichothecene Biosynthesis in the *Fusarium* Genus**

The infections caused by fungi of the *Fusarium* genus reduce crop yields and grain quality and result in economic losses worldwide. In addition, the fungi negatively affect human and animal health, mainly through their metabolites, mycotoxins. An extensive research of *Fusarium* mycotoxins, biosynthetic pathways and genetic determinants is pursued in Czech Republic. This review is an introduction to the world of the *Fusarium* genus and genes that are involved in trichothecene biosynthesis.