

SLOVENSKÁ TECHNICKÁ UNIVERZITA V BRATISLAVE
FAKULTA CHEMICKEJ A POTRAVINÁRSKEJ
TECHNOLÓGIE

ÚLOHA SEKUNDÁRNYCH METABOLITOV
V INTERAKCIÁCH VLÁKNITÝCH HÚB

Písomná práca k dizertačnej skúške

Študijný program: Biotechnológia

Číslo študijného odboru: 1410

Názov študijného odboru: 4.1.22 biochémia

Školiace pracovisko: Oddelenie biochémie a mikrobiológie

Vedúca záverečnej práce: Ing. Svetlana Kryštofová, PhD.

Bratislava 2014

Ing. Veronika Palušková

Zoznam skratiek

ABC- ATP-binding cassette

ATP- adenzíntrifosfát

CoA- koenzým A

GPCR- receptory spriahnuté s G-proteínmi

HIV-1 - human immunodeficiency virus - 1

MAPK- mitogénom aktivované proteínové kinázy

MFS- major facilitator superfamily

DNA- deoxyribonukleová kyselina

ROS- reaktívne formy kyslíka

Obsah

1	Úvod.....	4
2	Stav súčasnej problematiky.....	5
2.1	Sekundárny metabolizmus vláknitých húb.....	5
2.1.1	Polyketidy.....	6
2.1.2	Neribozomálne peptidy.....	8
2.1.3	Indolové alkaloidy.....	9
2.1.4	Terpény.....	10
2.1.5	SM produkované pomocou hybridných PKS-NRPS systémov.....	11
2.2	Regulácia fungálneho sekundárneho metabolizmu.....	11
2.2.1	Regulácia na úrovni transkripcie.....	12
2.2.2	Regulácia sprostredkovaná modifikáciou chromatínu.....	15
2.2.3	Koordinácia sekundárneho metabolizmu a vývoja.....	16
2.3	Vláknité huby rodu <i>Trichoderma</i>	16
2.4	Génový aspekt sekundárneho metabolizmu <i>Trichoderma</i> spp.....	17
2.4.1	Gény kódujúce NRPS.....	18
2.4.2	Gény pre PKS.....	20
2.4.3	Gény kódujúce hybridné PKS-NRPS systémy.....	20
2.4.4	Gény pre terpenoidy/steroidy a pyróny.....	21
2.5	Interakcie medzi <i>Trichoderma</i> spp. a rastlinnými patogénmi.....	22
2.5.1	Mykoparazitizmus a proteolytické enzýmy.....	23
2.5.2	SM v interakciách <i>Trichoderma</i> spp. s fytopatogénmi.....	26
2.5.3	Súperenie o živiny medzi <i>Trichoderma</i> spp. a ostatnými organizmami.....	28
2.5.4	Interakcie <i>Trichoderma</i> spp. s rastlinami.....	29
3	Použitá literatúra.....	31

1 Úvod

Vláknité huby produkujú širokú škálu nízkomolekulových biologicky aktívnych zlúčenín, ktoré sa nazývajú sekundárne metabolity (SM). Tieto látky nie sú, na rozdiel od primárnych metabolitov, esenciálne pre rast a rozmnožovanie ich producentov, avšak zohrávajú dôležitú úlohu v signalizácii, vývoji a interakcii s inými organizmami (Keller a kol., 2005, Hoffmeister a Keller, 2007). V nepriaznivých environmentálnych podmienkach, však môže byť produkcia SM nevyhnutná pre prežitie produkujúceho mikroorganizmu. Príkladom môže byť produkcia siderofórov (sekundárne metabolity chelatujúce železo) v prostredí s nízkym obsahom železa. Medzi najznámejšie SM však patria antibiotiká, ktoré značne zvyhodňujú ich producentov v prirodzenom kompetitívnom prostredí.

Gény zodpovedné za biosyntézu SM sú väčšinou sústredené v génových klastroch, ktorých expresia je prísne kontrolovaná zložitou sieťou regulačných proteínov, reagujúcich na veľké množstvo environmentálnych stimulov. Medzi tieto stimuly patria zdroje uhlíka a dusíka, teplota, pH, svetlo, reaktívne formy kyslíka, hypoxické podmienky, ale aj signály pochádzajúce od iných organizmov (Brakhage a kol., 2009, Vödisch a kol., 2011, Yin a Keller, 2011).

Huby rodu *Trichoderma* obsahujú vo svojom genóme pomerne rozmanitý repertoár génových klastrov pre produkciu SM, predovšetkým druhy *Trichoderma atroviride* a *Trichoderma virens*. Tieto druhy sú známe agresívne mykoparazity, a SM využívajú pri útoku na svoju korisť. Medzi najznámejšie patria peptaiboly, antrachinóny a siderofóry (Kubicek a kol., 2011).

Zástupcovia húb rodu *Trichoderma* sú aktívni producenti obrovského množstva rôznych SM, avšak biologické účinky, biosyntetické dráhy a mechanizmy regulácie väčšiny z nich nie sú známe.

2 Stav súčasnej problematiky

2.1 Sekundárny metabolizmus vláknitých húb

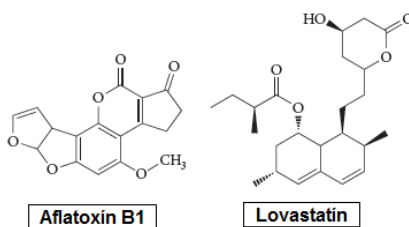
Sekundárne metabolity sú štrukturálne rozmanité látky s malou mólovou hmotnosťou, ktoré na rozdiel od primárnych metabolitov, nie sú nevyhnutné pre rast a život produkujúcich organizmov. Mnoho mikroorganizmov je schopných syntézy širokej škály biologicky aktívnych nízkomolekulových zlúčenín, predovšetkým vláknité huby a baktérie kolonizujúce koreňovú sústavu (Berdy, 2005, Brakhage a kol., 2009). Predpokladá sa, že sekundárny metabolizmus sa počas evolúcie vyvinul hlavne vďaka samotnému charakteru ekosystému, v ktorom sa mikroorganizmy prirodzene vyskytujú, a kde využívajú SM ako prostriedky vo vzájomnej komunikácii, symbióze, súperení o živiny a inhibovaní rastu konkurenčných organizmov (Losada a kol., 2009, Schroeckh a kol., 2009).

Od začiatku systematického štúdia sekundárneho metabolizmu v roku 1922, boli identifikované tisíce látok inhibujúce rast baktérii, húb, prvokov, parazitov, hmyzu, vírusov a taktiež ľudských nádorových buniek. Objavené boli takisto molekuly s cytotoxickou, mutagénnou, karcinogénnou, teratogénnou a imunomodulačnou aktivitou (Keller a kol., 2005), avšak účinok SM na samotných producentov zostáva z väčšej časti neobjasnený.

Klasifikácia SM je založená na skutočnosti, že napriek enormnej chemickej rôznorodosti, sú všetky SM syntetizované z limitovaného počtu prekursorov pochádzajúcich z primárneho metabolizmu. Acetyl-CoA je stavebným blokom polyketidov a terpénov, zatiaľ čo z aminokyselín sú syntetizované neribozomálne peptidy a alkaloidy. Známe sú však aj SM syntetizované pomocou tzv. hybridných systémov, ktoré ako základné stavebné jednotky využívajú acetyl-CoA aj aminokyseliny, čím sa variabilita fungálnych SM značne rozširuje (Boettger a Hertweck, 2013).

2.1.1 Polyketidy

Polyketidy patria medzi najrozšírenejšie fungálne SM. Naftopyrón (žltý konidiálny pigment v *Aspergillus nidulans*), aflatoxín (najúčinnější známy karcinogén produkovaný *Aspergillus flavus*) a lovastatín (komerčne významná látka znižujúca hladinu cholesterolu) sú z genetického hľadiska najpodrobnejšie preštudované (Obr. 1.) (Fujii a kol., 2001, Kennedy a kol., 1999).



Obr. 1. Najznámejšie polyketidy.

Biosyntézu polyketidových metabolitov u vláknitých húb zabezpečujú syntázy polyketidov typu I (PKS typ I). Mechanizmus účinku a doménovú štruktúru majú tieto multienzymové komplexy podobnú eukaryotickým syntázam mastných kyselín. Oba enzýmové komplexy využívajú ako stavebné jednotky krátke mastné kyseliny (najčastejšie acetyl-CoA a/alebo malonyl-CoA), ktoré polykondenzačnými reakciami vytvárajú uhlíkovodíkový reťazec rôznych dĺžok. Hlavný rozdiel medzi týmito procesmi je úplná redukcia β -karbonylovej skupiny pri syntéze mastných kyselín, pričom v syntéze polyketidov je tento krok fakultatívny (Bedford a kol., 1996).

Fungálna PKS typu I musí nevyhnutne obsahovať nasledovné domény: ketosyntázová (KS), acyltransferázová (AT) a doména viažuca acylovú skupinu (AVP). Tieto domény sú esenciálne pre syntézu polyketidov. PKS typu I s minimálnym počtom domén sa nazýva neredukujúca, a tvorí produkty aromatickej štruktúry s nemodifikovanými ketónovými skupinami (Gaffor a kol., 2005).

Fungálna PKS typu I môže ďalej obsahovať domény, ktoré nie sú nevyhnutné pre syntézu polyketidov: ketoreduktázová (KR), dehydratázová (DH), enoylreduktázová (ER) a metyltransferázová (MT). Tieto doplnkové domény sú schopné redukovať ketónové skupiny reťazca v rôznej miere. Multienzymový komplex sa potom nazýva redukujúci, a konečný produkt má lineárnu formu. Podľa zloženia domén môžeme preto PKS typu I rozdeliť na redukujúce a neredukujúce (Tabuľka 1.) (Kroken a kol., 2003).

Tabuľka 1. Rozdelenie PKS na základe ich štruktúry (Gaffor a kol., 2005).

Názov PKS	Štruktúra PKS	Typ produktu
neredukujúca	<p><u>Základné domény:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ketosyntázová doména acyltransferázová doména doména viažuca acylovú skupinu 	<ul style="list-style-type: none"> aromatická forma s nemodifikovanými ketónovými skupinami
redukujúca	<p><u>Základné domény:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ketoreduktázová doména dehydratázová doména enoylreduktázová doména metyltransferázová doména 	<ul style="list-style-type: none"> lineárna forma

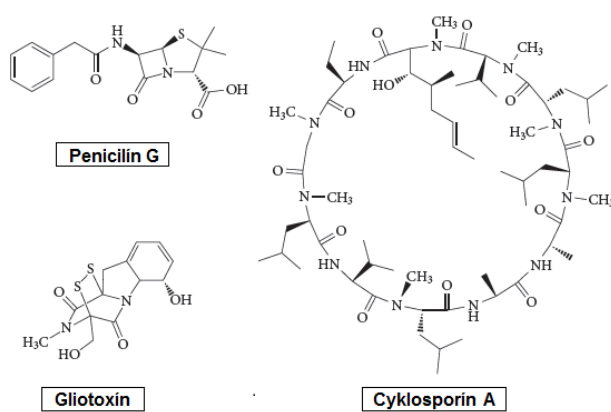
PKS typu I využívajú svoje aktívne miesta opakovane, v cyklickom procese biosyntézy polyketidového reťazca, a preto sa zvyknú nazývať aj „iteratívne“ PKS (Obr. 3.). Tioesterázová doména (TE) je lokalizovaná na C-konci enzýmového komplexu. Táto terminálna doména je prostredníctvom reakcie zvanej Cleisenova cyklizácia, zodpovedná za uvoľnenie syntetizovaného produktu (Cane a Walsh, 1999). Akým spôsobom je regulovaný počet kondenzačných cyklov však stále nie je známe.

Obrovská rozmanitosť polyketidov je výsledkom súhry rôznych východiskových stavebných blokov, prítomnosti jednotlivých domén a počtu

iteračných reakcií. Modifikácia nasyntetizovaného polyketidu (oxygenácia, glykozylnátrferácia, atď.) značne prispieva k ďalšej diverzite polyketidov.

2.1.2 Neribozomálne peptidy

Medzi najznámejšie neribozomálne peptidy patria penicilín (antibiotikum), cyklosporín (imunosupresant) a gliotoxín (vykazujúci antivirálnu, antibakteriálnu a imunosupresívnu účinky) (Obr. 2). Do tejto skupiny SM patria aj siderofóry, ktoré majú významnú úlohu v prijímaní železa.



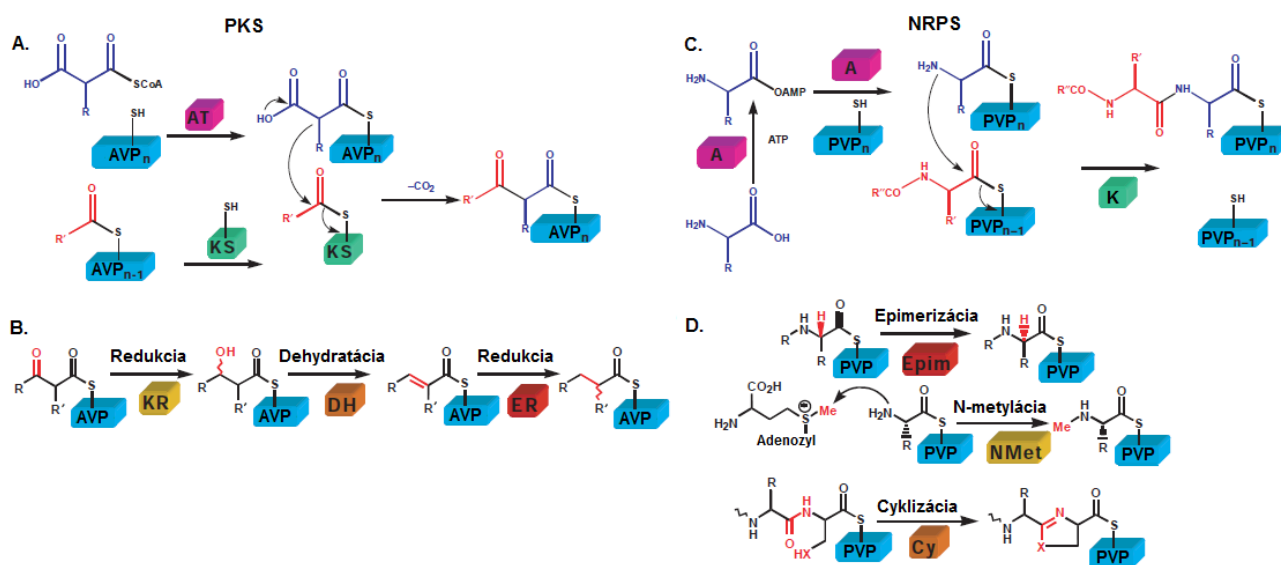
Obr. 2. Zástupcovia neribozomálnych peptidov.

Syntézu neribozomálnych peptidov zabezpečujú multienzymové komplexy nazvané syntetázy neribozomálnych peptidov (NRPS). Tieto multidoménné enzýmy využívajú ako stavebné prvky nielen proteínogénne ale aj neštandardné aminokyseliny (Finking a Marahiel, 2004).

Tak ako PKS, aj NRPS obsahujú domény nevyhnutné pre syntézu neribozomálneho peptidu. Adenylačná doména (A) aktivuje konkrétnu aminokyselinu a katalyzuje jej naviacanie na kofaktor (4-fosfopanteteín) nachádzajúci sa na doméne viažucej peptid (PVP). Prostredníctvom kondenzačnej domény (K) je utvorená peptidová väzba medzi aminokyselinami naviazanými na PVP doménach. Tioesterázová doména (TE), zväčša lokalizovaná na C-konci finálneho modulu NRPS, je nevyhnutná pre uvoľnenie nasyntetizovaného peptidu.

NRPS ďalej môžu obsahovať neesenciálne domény, modifikujúce nasyntetizovaný peptid (metyltransferázová (NMet), epimerizačná (Epim) a cyklizačná (Cy) doména) (Cane a Walsh, 1999). Dĺžka syntetizovaného peptidu, potenciálna cyklizácia peptidu, prítomnosť neesenciálnych domén a variácie vo funkciách domén, sú faktory zodpovedné za značnú variabilitu v štruktúrach neribozomálnych peptidov.

Ako prvá fungálna NRPS bola charakterizovaná δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valín syntetáza (ACVS), ktorá sprostredkuje prvé kroky biosyntézy β -laktamových antibiotík (penicilínu a cefalosporínu) (Smith a kol., 1990).



Obr. 3. Funkcie a mechanizmus účinku PKS a NRPS.

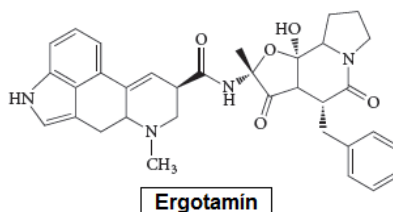
A. Domény esenciálne pre syntézu polyketidov, B. doplnkové domény PKS, C. Domény nevyhnutné pre syntézu neribozomálnych peptidov, D. doplnkové domény NRPS
 KS - ketosyntázová doména, AT - acyltransferázová doména, AVP - doména viažuca acylovú skupinu, DH - dehydratázová doména, ER - enoylreduktázová doména, KR - ketoreduktázová doména, A - Adenylačná doména, K - kondenzačná doména, TE - tioesterázová doména, PVP - doména viažuca peptid, NMet - metyltransferázová doména, Epim - epimerizačná doména, Cy - cyklizačná doména (Cane a Walsh, 1999).

2.1.3 Indolové alkaloidy

Indolové alkaloidy sú väčšinou syntetizované z tryptofánu a dimetylalyl pyrofosfátu (izoprenoidný derivát), no aj iné aminokyseliny ako tryptofán, môžu

ojedinele vystupovať ako prekursor. Syntéza alkaloidov vyžaduje okrem multienzymového komplexu NRPS aj enzým dimetylalyl-tryptofán syntázu (DMATS).

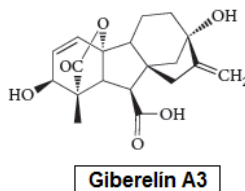
Najlepšie je preštudovaná dráha biosyntézy ergotamínu (Obr. 4.) v *Claviceps purpurea*, kde počiatočný krok predstavuje prenylácia tryptofánu prostredníctvom DMATS (Haarmann a kol., 2005). Nasleduje metylácia dimetylalyl-tryptofánu a séria oxidačných reakcií, ktorých výsledným produktom je kyselina lyzergová. Kyselina lyzergová je potom aktivovaná prostredníctvom NRPS, kondenzovaná s tripeptidom spriahnutej NRPS a uvoľnená už ako ergotamín (Keller a kol., 2005).



Obr. 4. Predstaviteľ indolových alkaloidov.

2.1.4 Terpény

Terpény sú známe hlavne ako rastlinné metabolity (terpentín a kamfor), avšak vlákňité huby sú producenti množstva významných terpenov, ako napr. karotenoidy (pigmenty), gibberelíny (rastlinné hormóny, Obr. 5.) a trichotecény (mykotoxíny) (Keller a kol., 2005).



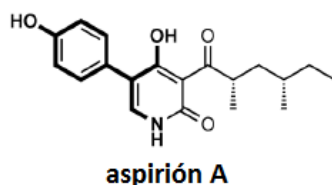
Obr. 5. Zástupca terpenových SM.

Terpény sa skladajú z rozličného počtu izoprenových jednotiek (syntetizovaných z Acetyl-CoA), sú lineárne alebo cyklické a môžu byť upravené rôznymi modifikáciami. Medzi najznámejšie skupiny terpenov patria

monoterpény (syntetizované z geranyl pyrofosfátu), seskviterpény (syntetizované z farnezylypyrofosfátu) a diterpény a karotenoidy (syntetizované z geranylgeranylpyrofosfátu). Cykláza terpénov je esenciálna pre produkciu terpénov z rôznych difosfátových prekursorov. Medzi najlepšie charakterizované fungálne cyklázy terpénov patria bifunkčná cykláza terpénov (zodpovedná za syntézu gibberelínov) v *Fusarium fujikuroi* (Keller a kol., 2005).

2.1.5 SM produkované pomocou hybridných PKS-NRPS systémov

Najznámejšie SM tejto skupiny sú aspiridón (vykazujúci cytotoxické vlastnosti, Obr. 6.), equizetín (inhibítor HIV-1 integrázy) a fuzarín C (mykotoxín). Tieto SM sú syntetizované pomocou hybridných enzýmových systémov vzniknutých fúziou PKS s NRPS a na syntézu SM využívajú acetyl-CoA aj aminokyseliny. Mechanizmus biosyntézy SM prostredníctvom hybridných PKS-NRPS systémov, zatiaľ však nie je veľmi preštudovaný (Boettger a Hertweck, 2013).



Obr. 6. Najznámejší SM produkovaný hybridným PKS-NRPS systémom.

2.2 Regulácia fungálneho sekundárneho metabolizmu

Gény zapojené do biosyntézy SM vlákňitých húb, sú v prevažnej väčšine sústredené v génových klastroch, ktoré môžu pokrývať úseky dlhé aj viac ako 10 000 bázových párov. Tieto klastre sú zvyčajne lokalizované v subtelomérnych oblastiach (Palmer a Keller, 2010, Perrin a kol., 2007). Prevláda hypotéza, že jeden klastre je zodpovedný za syntézu jedného metabolitu. Výnimku tvoria napríklad dva génové klastre nachádzajúce sa na odlišných chromozómoch, ktoré sú

nevyhnutné pre biosyntézu monoterpénov austinolu a dehydroalustinolu v *A. nidulans* (Lo a kol., 2012).

Typické fungálne génové klastre obsahujú gény pre enzýmy biosyntetických dráh SM (najčastejšie sú to PKS a NRPS), ďalej gény enzýmov modifikujúcich intermediárny produkt (oxidázy, glykozyltransferázy, metyltransferázy) a v neposlednom rade gény kódujúce transportéry a regulačné proteíny (Hertweck, 2009, Cane a Walsh, 1999).

Známe sekvencie genómov čoraz väčšieho počtu vláknitých húb viedli k identifikácii hypotetických génových klastrov zodpovedných za biosyntézu SM. Huby rodu *Aspergillus* (ktoré majú genóm veľký 28 - 40 Mb) obsahujú vo svojom genóme okolo 40 génových klastrov sekundárneho metabolizmu, pričom huby s menším genómom majú obvykle takýchto klastrov menej (27 v prípade *Arthroderma benhamiae*, ktorej genóm je veľký 22 Mb) (Burmester a kol., 2011, von Dohren, 2009). Identita, štruktúra a funkcia SM kódovaných prostredníctvom väčšiny fungálnych génových klastrov však zostáva neznáma, čo je dôsledkom prísnej regulácie sekundárneho metabolizmu vláknitých húb.

Fungálny sekundárny metabolizmus je regulovaný zložitou sieťou proteínov a komplexov, ktoré reagujú na širokú škálu environmentálnych stimulov. Medzi tieto stimuly patria zdroje uhlíka a dusíka, teplota, pH, svetlo, aminokyseliny, reaktívne formy kyslíka (ROS), hypoxické podmienky, prítomnosť železa, ale aj signály pochádzajúce od iných organizmov (Brakhage a kol., 2009, Vödish a kol., 2011, Yin a Keller 2011).

2.2.1 Regulácia na úrovni transkripcie

Sieť regulujúca sekundárny metabolizmus vláknitých húb je zložitá, pričom niektoré regulačné mechanizmy sú špecifické pre konkrétne génové klastre (špecifické transkripčné faktory) a naopak iné regulujú expresiu viacerých klastrov (globálne transkripčné faktory), a sú konzervované vo väčšine doteraz

študovaných vlákniťých húb (Brakhage a kol., 2009, Brakhage a Schroeckh, 2011, Yin a Keller, 2011). Regulácia na úrovni transkripcie prebieha prostredníctvom naviazania transkripčného faktora (TF) na špecifické sekvencie v promótorových oblastiach génov.

Gény pre **špecifické transkripčné faktory** sa zvyčajne nachádzajú v génových klastroch, ktorých aktivitu regulujú, pričom bolo zistené, že 60% fungálnych génových klastrov obsahuje gén pre hypotetické TF. Príkladom môžu byť gény pre biosyntézu gliotoxínu, ktoré sú organizované v klastrí obsahujúcom 13 génov, kde jedným z nich je gén kódujúci špecifický TF GliZ. Delícia génu *GliZ* viedla k strate schopnosti produkovať gliotoxín, a naopak jeho nadexpresia spôsobila zvýšenú hladinu tohto metabolitu (Bok a kol., 2006).

Fungálne génové klastre však môžu obsahovať gény pre viac TF. Génové klastre pre produkciu aflatoxínu v *A. flavus*, a sterigmatocystínu v *A. nidulans*, sa skladajú z približne 25 génov, vrátane dvoch susedných génov (menovite *aflR* a *aflS*) kódujúcich TF. AflR (produkt génu *aflR*) aktivuje transkripciu pravdepodobne všetkých génov v klastrí (Yin a Keller, 2011, Georgianna a Payne 2009). Funkcia AflS nie je úplne objasnená, no predpokladá sa, že prostredníctvom interakcie s AflR moduluje jeho aktivitu (Georgianna a Payne 2009, Chang, 2003).

Expresia špecifických TF môže byť kontrolovaná prostredníctvom globálnych TF, pričom translokácia génov kódujúcich tieto TF na miesto mimo génového klastra môže viesť k strate regulačného vplyvu globálneho TF (Chiou a kol., 2002). Nedávne výskumy objavili vplyv niektorých špecifických TF na mieru expresie génov lokalizovaných v iných klastroch (Bergmann a kol., 2010). Vo väčšine prípadoch, signál spúšťajúci aktiváciu expresie špecifických TF, však zostáva neznámy (Brakhage, 2013).

Gény kódujúce **globálne transkripčné faktory** sú lokalizované mimo génových klastrov pre syntézu SM, a regulujú expresiu aj tých génov, ktoré nie sú zapojené do sekundárneho metabolizmu. Globálne TF sú nevyhnutné pre

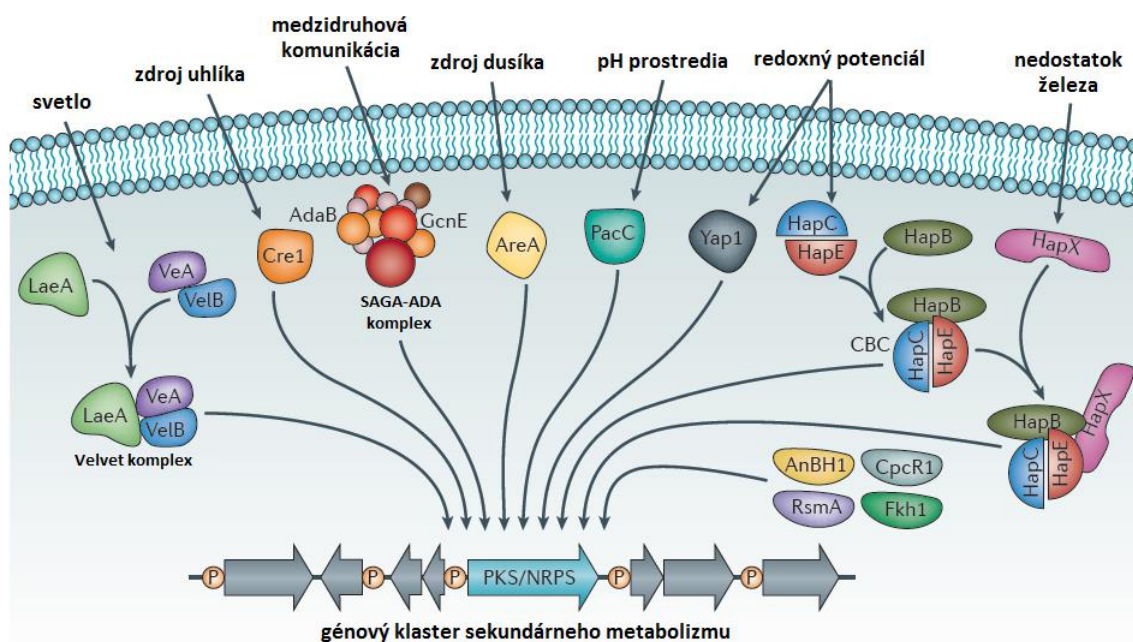
reguláciu expresie génových klastrov, ktoré neobsahujú gény pre špecifické TF. Globálne TF však kontrolujú expresiu aj väčšiny klastrov obsahujúcich gény pre TF. Zatiaľ zostáva neobjasnené, či sa to deje prostredníctvom regulácie expresie špecifických TF, alebo všetkých génov nachádzajúcich sa v klastru (Brakhage, 2013).

Environmentálne stimuly spúšťajúce reguláciu prostredníctvom globálnych TF boli do určitej miery charakterizované (Obr. 7.). Ako príklad slúži globálny TF PacC, ktorý predstavuje kľúčový faktor fungálnej pH regulácie (Tilburn a kol., 1995). Pri alkalickom pH prostredia, PacC *A. nidulans* aktivuje transkripciu génov biosyntetickej dráhy penicilínu (Bergh a Brakhege, 1998), ale zároveň reprimuje expresiu génov zapojených do biosyntézy sterigmatocystínu (Keller a kol., 1997).

CBC komplex, skladajúci sa z troch zložiek (HapB, HapC a HapE), integruje niekoľko fyziologických signálov zahŕňajúcich informácie o redoxnom statuse a obsahu železa (Hortschansky a kol., 2007, Thön a kol., 2010). CBC komplex pozitívne reguluje produkciu penicilínu v *A. nidulans* (Brakhage a kol., 2009). Nedostatok železa spôsobí naviazanie proteínu HapX na CBC komplex, ktorý následne indukuje transkripciu génov zapojených do príjmu železa, ako napríklad gény syntetickej dráhy siderofórov, obsahujúcej centrálny gén kódujúci NRPS (Hortschansky a kol., 2007). Ďalšia dráha regulovaná redoxným statusom zahŕňa proteín Yap1 *Aspergillus parasiticus*, ktorý pozitívne reguluje produkciu aflatoxínu, ako priamu odpoveď na oxidačný stres (Reverberi a kol., 2008).

Regulácia niektorých génových klastrov sekundárneho metabolizmu, je ovplyvnená rôznymi zdrojmi uhlíka a dusíka. Globálny TF AreA, reprimuje vplyvom dusíka expresiu génov biosyntetickej dráhy giberelínu v *F. fujikuroi* (Tudzynski a kol., 1999), a zároveň aktivuje gény nevyhnutné pre produkciu fumonizínu B1 v *Fusarium verticillioides* (Kim a Woloshuk., 2008). Huby rastú vo všeobecnosti lepšie v prítomnosti glukózy, ako iných ťažko metabolizovateľných sacharidov (laktóza). Avšak k produkcii SM dochádza predovšetkým

v nehostinných podmienkach, ktoré bližšie reflektujú prirodzené prostredie húb (Brakhage, 1998).



Obr. 7. Globálne TF zapojené do regulácie sekundárneho metabolizmu.

2.2.2 Regulácia sprostredkovaná modifikáciou chromatinu

Najvýznamnejšie proteíny, ktoré sa prostredníctvom interakcie s DNA podieľajú na tvorbe chromatinového vlákna, sa nazývajú históny. Tieto proteíny podliehajú rôznym modifikáciám, ako napr. metylácia, acetylácie, fosforylácia, ubikvitinácia a sumoylácia (Shilatifard, 2006), pričom viaceré z týchto modifikácií, sú spojené s reguláciou sekundárneho metabolizmu (Bok a Keller, 2004, Strauss Reyes-Dominguez, 2011). Výhodou tejto formy regulácie je skutočnosť, že sa môže vzťahovať na špecifické úseky chromozómov pokrývajúce len niekoľko génov.

Nukleárny proteín LaeA, vykazujúci podobnosť histónovým a arginínovým metyltransferázam (Yin a Keller, 2011, Bok a Keller, 2004), môže vystupovať ako globálny regulátor modifikujúci štruktúru chromatinu. Histónacetyltransferáza GcnE v *A. nidulans* je pravdepodobne súčasťou SAGA-ADA komplexu, ktorý

reguluje expresiu génov biosyntetickej dráhy kyseliny orselinovej, indukovanej počas konfrontácie so *Streptomyces rapamycinicus* (Nutzmann a kol., 2011).

2.2.3 Koordinácia sekundárneho metabolizmu a vývoja

Vláknité huby sú schopné vytvárať rôzne morfológické štruktúry v závislosti od vývojového štádia a/alebo vonkajších podmienok. Medzi tieto štruktúry patria vegetatívne hýfy, asexuálne a sexuálne rozmnožovacie štruktúry (konídiofóry a kleistotéciá), asexuálne a sexuálne spóry a dormantné štruktúry (skleróciá).

Regulácia sekundárneho metabolizmu je úzko prepojená s rastom a vývojom vláknitých húb (Calvo a kol., 2002; Calvo, 2008). Globálny regulátor LaeA vplyvom svetla koordinuje vývoj a sekundárny metabolizmus. LaeA vytvára komplex s velvet proteínmi VeA a VelB, o ktorých sa predpokladá, že sa viažu na DNA, ale ich molekulová funkcia však zostáva nejasná. Velvet komplex je prítomný vo väčšine húb okrem kvasiniek (Bayram a Braus, 2012).

LaeA je nevyhnutný pre svetlom indukovaný asexuálny vývoj, pričom mutanti *A. nidulans* s vydeletovaným génom pre LaeA neboli schopné potlačiť sexuálnu difenrenciáciu na svetle. Delécia génu pre LaeA v *A. nidulans*, však zapríčinila aj zníženú produkciu SM (penicilín, sterigmatocystín a lovastátin) (Bayram a kol., 2008). V *A. flavus* delécia génu kódujúceho LaeA regulátor, viedla s zníženej tvorbe konídií a strate schopnosti produkovať aflatoxíny a siderofóry (Chang a kol., 2012, Kale a kol., 2008). V *Aspergillus fumigatus* LaeA reguluje 13 z celkovo 22 génových klastrov pre biosyntézu SM (Bayram a Braus, 2012).

2.3 Vlákňité huby rodu *Trichoderma*

Mikroskopické huby rodu *Trichoderma* patria medzi celosvetovo najrozšírenejšie saprotrofické vláknité huby, ktoré sa najčastejšie nachádzajú

v pôde, kde kolonizujú koreňový systém rastlín. Tento rozmanitý ekosystém okrem samotnej koreňovej sústavy rastlín často obsahuje symbiotické rizobaktérie, patogénne baktérie a vlákňité huby (fytopatogény), ale tiež huby parazitujúce na fytopatogénoch, ako napr. *Trichoderma* spp..

Huby kolonizujúce takto zložené prostredie, ktoré obsahuje toxické látky produkované fytopatogénmi, rastlinami (obranné látky voči patogénom) ale aj hubami samotnými (antifungálne látky), si museli vyvinúť efektívne mechanizmy obrany a útoku, ktoré im umožňujú v danom prostredí prežiť.

Huby rodu *Trichoderma* sú známe rezistenciou voči širokej škále toxických látok, spôsobenou účinným detoxikačným systémom, zahŕňajúcim enzýmy degradujúce toxíny a sieť membránových prenášačov (ABC a MFS), zodpovedných za vylučovanie týchto toxínov (Ruocco a kol., 2009).

Trichoderma spp. sú schopné produkcie veľkého množstva hydrolytických enzýmov a SM, čo značne prispieva ich mykoparazitickým vlastnostiam a poskytuje im výhodu v prirodzenom kompetitívnom prostredí (Harman a kol., 2004).

Huby patriace do rodu *Trichoderma* sú však schopné podporiť rast rastlín a stimulovať ich obranné mechanizmy voči fytopatogénom, čo v neposledom rade prispieva k ich úspechu v mykoparazitizme a rastlinnej symbióze. Mnohé kmene *Trichoderma* spp. sú tiež schopné degradovať uhľovodíky, chlorofenoly a xenobiotické pesticídy (Harman a Kubicek, 1998, Harman a kol., 2004).

2.4 Génový aspekt sekundárneho metabolizmu *Trichoderma* spp.

Huby rodu *Trichoderma* obsahujú vo svojom genóme nezvyčajne rozmanitý repertoár génových klastrov sekundárneho metabolizmu, predovšetkým druhy *Trichoderma atroviride* a *Trichoderma virens*. Tieto kmene sú agresívne mykoparazity a veľké množstvo SM využívajú pri útoku na svoju korisť. *Trichoderma reesei*

(významný producent celulózy) nevykazuje silné mykoparazitické vlastnosti, čoho príčinou môže byť menší počet génových klastrov sekundárneho metabolizmu v jej genóme (Kubicek a kol., 2011).

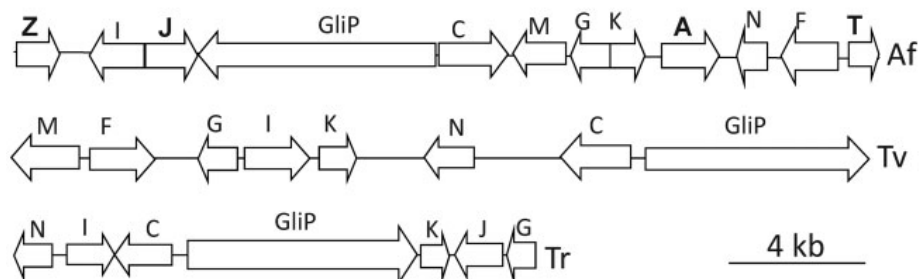
Zástupcovia húb rodu *Trichoderma* sú aktívni producenti obrovského množstva rôznych SM, pričom štruktúra viac ako 100 z nich už bola identifikovaná (Reino a kol., 2008). Medzi hlavné skupiny SM syntetizované *Trichoderma* spp. patria pyróny, terpenoidy, steroidy a polyketidy. Peptaiboly predstavujú významnú skupinu neribozomálnych peptidov, pričom *Trichoderma* spp. sú hlavnými producentmi týchto SM.

V genómoch zástupcov *Trichoderma* spp. sa nachádza veľké množstvo génov zapojených do syntézy, transportu a katabolizmu SM. Genóm *T. virens* obsahuje 440 takýchto génov, *T. atroviride* 349 a *T. reesei* 262. Väčšina génov sekundárneho metabolizmu identifikovaných v *T. reesei* sa nachádza aj v genómoch *T. virens* a *T. atroviride* (Kubicek a kol., 2011).

2.4.1 Gény kódujúce NRPS

Niekoľko tried neribozomálnych peptidov je syntetizovaných pomocou NRPS v *Trichoderma* spp. Genóm *T. virens* obsahuje 28 génov kódujúcich NRPS, pričom *T. atroviride* a *T. reesei* majú týchto génov podstatne menej, a to 16 a 10 (Kubicek a kol., 2011).

Génový klaster zodpovedný za biosyntézu gliotoxínu bol charakterizovaný v potenciálnom ľudskom patogéne *A. fumigatus*, v ktorom gliotoxín vystupuje ako faktor patogenity. V genómoch *T. reesei* a *T. virens* boli identifikované génové klastre obsahujúce gény pre hypotetické proteíny biosyntetickej dráhy gliotoxínu (Obr. 8.).



Obr. 8. Hypotetické génové klastre pre produkciu gliotoxínu v *T. viride* (Tv) a *T. reesei* (Tr) v porovnaní s génovým klastrom pre syntézu gliotoxínu v *A. fumigatus* (Af) (Mukherjee a kol., 2012).

Delécia génu *GliP*, potvrdila jeho funkciu ako NRPS zodpovednej za produkciu gliotoxínu v *A. fumigatus* (Gardiner a Howlett, 2005). Aj napriek tomu, že génový klaster obsahujúci *GliP* je prítomný aj v genóme *T. reesei*, nebola pre tento kmeň produkcia gliotoxínu potvrdená. Absencia syntézy gliotoxínu v *T. reesei* môže byť spôsobená nižším počtom génov v klasteri, k čomu mohlo dôjsť prostredníctvom strate génov v priebehu evolúcie (Kubicek a kol., 2011).

Peptaiboly predstavujú početnú skupinu neribozomálnych peptidov, významných pre ich antimikróbne a protirakovinové účinky, ale taktiež pre ich schopnosť indukovať systémovú rezistenciu rastlín voči mikroorganizmom. Tieto peptidy sa skladajú zo 7-20 z väčšej časti neobvyklých aminokyselín, ako sú napríklad kyselina 2-amino-izobutyrová, izovalín, β -alanín a hydroxyprolín. N-koniec peptaibolov je zvyčajne acetylovaný a na C-konci je naviazaný aminoalkohol, čo spôsobuje ich amfipatický charakter (Reino a kol., 2008).

Dnes je známych viac ako 300 peptaibolov, z ktorých väčšina je syntetizovaná hubami rodu *Trichoderma*. Aj napriek značnej diverzite produkovaných peptaibolov, boli v genóme *Trichoderma* spp. identifikované iba dva gény kódujúce syntetázy peptaibolov (NRPS skladajúce sa z 18 a 14 modulov) (Degenkolb a ko., 2008). NRPS obsahujúca 14 modulov identifikovaná v *T. virens* je

zodpovedná za syntézu prinajmenšom 88 peptaibolových metabolitov (Mukherjee a kol., 2011).

Siderofóry predstavujú ďalšiu významnú skupinu neribozomálnych peptidov. Intracelulárny siderofór ferrikrocín má významnú úlohu v uskladňovaní železa a v ochrane buniek pred oxidačným stresom (Wallner a kol., 2009). Extracelulárny siderofór syntetizovaný enzýmom NPS6 v *Cochliobus heterostrophus* je zapojený do ochrany voči oxidačnému stresu a tiež vystupuje ako faktor virulencie tohto mikroorganizmu (Oide a kol., 2007).

T. virens a *T. reesei* obsahujú vo svojom genóme dva hypotetické génové klastre obsahujúce gény pre neribozomálne syntetázy NPS6 a SidD, potenciálne zodpovedné za syntézu siderofórov (Kubicek a kol., 2011). V genóme *T. atroviride* sa však vyskytuje iba génový klaster zahŕňajúci gén pre NPS6.

2.4.2 Gény pre PKS

V genómoch húb rodu *Trichoderma* sa nachádza pomerne veľké množstvo génov kódujúcich PKS (18 v *T. virens* a *T. atroviride* a 11 v *T. reesei*) (Baker a kol., 2012). Dva z týchto génov nachádzajúcich sa v *T. atroviride* sú exprimované počas kontaktu s *Rhizoctonia solani*, čo naznačuje ich možnú úlohu v mykoaprazitizme (Kubicek a kol., 2011). Gén kódujúci PKS potenciálne zodpovednú za syntézu konídiálneho pigmentu bol identifikovaný v genóme všetkých troch analyzovaných druhov (Baker a kol., 2012).

2.4.3 Gény kódujúce hybridné PKS-NRPS systémy

V genóme *T. virens* boli identifikované štyri gény pre hypotetické PKS-NRPS systémy. V genóme *T. reesei* sa nachádzajú takéto gény dva a v *T. atroviride* jeden (Mukherjee a kol., 2012). Expresia génu pre Tex13 (hypotetický PKS-NRPS systém) v *T. atroviride* bola indukovaná interakciou s *Magnaporthe grisea*, čo

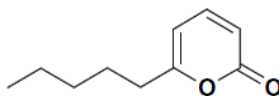
naznačuje jeho úlohu v mykoparazitizme. Štruktúra produktu tohto hybridného systému, však zatiaľ nie je známa (Boettger a Hertweck, 2013).

2.4.4 Gény pre terpenoidy/steroidy a pyróny

Okrem klastra obsahujúceho gén pre oxidoskvalén-lanosterol cyklázu bolo v genóme *T. virens* identifikovaných ďalších šesť klastrov obsahujúcich gén pre hypotetické terpencyklázy. V genómoch *T. atroviride* a *T. reesei* sa nachádza polovičný počet podobných génových klastrov (tri v každom genóme).

T. viride je producentom antifungálnej a protirakovinovej steroidnej látky viridín (Howell a kol., 1993) a herbicídnej zlúčeniny s názvom viridol (Jones a kol., 1987). Génové klastre zodpovedné za biosyntézu týchto terpenoidov však zatiaľ neboli identifikované.

6-pentyl-pyrón je SM zodpovedný za charakteristickú „kokosovú“ vôňu *Trichoderma* spp. (Bonnarme a kol., 1997), avšak génový klaster, potenciálne zodpovedný za biosyntézu tohto SM, nebol doteraz charakterizovaný.



6-pentyl-pyrón

Obr. 9. Prchavá látka produkovaná *Trichoderma* spp..

Tabuľka 2. Počet PKS, NRPS a hybridných PKS-NRPS systémov v *Trichoderma* spp. v porovnaní s vybranými vláknitými hubami (Kubicek a kol., 2011).

Vláknitá huba	PKS	NRPS	PKS-NRPS	Spolu
<i>Trichoderma virens</i>	18	28	4	50
<i>Aspergillus oryzae</i>	26	14	4	44
<i>Aspergillus nidulans</i>	26	13	1	40
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	23	11	2	36
<i>Trichoderma atroviride</i>	18	16	1	35
<i>Magnaporthe oryzae</i>	20	6	8	34
<i>Fusarium graminearum</i>	14	19	1	34
<i>Gibberella moniliformis</i>	12	16	3	31
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	17	10	2	29
<i>Aspergillus fumigatus</i>	13	13	1	27
<i>Nectria haematococca</i>	12	12	1	25
<i>Trichoderma reesei</i>	11	10	2	23
<i>Neurospora crassa</i>	7	3	0	10

2.5 Interakcie medzi *Trichoderma* spp. a rastlinnými patogénmi

Priame interakcie húb rodu *Trichoderma* a ostatných vláknitých húb sú konvenčne označované ako nekrotrofný hyperparazitizmus alebo mykoparazitizmus, avšak *Trichoderma* spp. dokážu utilizovať ako substrát aj uhynutú fungálnu biomasu. Práve preto by bolo lepšie popisovať tieto vláknité huby nie ako mykoprazitické, ale skôr mykotrofné, aby boli obsiahnuté nielen biotrofné ale aj saprofytické nutričné stratégie (Harman, 2011).

2.5.1 Mykoparazitizmus a proteolytické enzýmy

Komplexné procesy mykoparazitizmu pozostávajú z viacerých krokov, počínajúc rozpoznáním potenciálnej obeť, následnom útoku a penetrácii a konečnom usmrtení patogénnej vláknitej huby.

Trichoderma spp. vylučujú hydrolytické enzýmy, ktoré degradujú bunkovú stenu fytopatogénov, pričom sú schopné rozpoznať oligoméry uvoľnené do prostredia z rozrušenej bunkovej steny potenciálnej obeť. Predpokladá sa, že u húb rodu *Trichoderma* dochádza ku konštitutívnej sekrécii týchto enzýmov, a to konkrétne celuláz, chitináz, glukánáz a proteáz (Harman a kol., 2004, Woo a Lorito-2007).

Mnoho génov kódujúcich proteázy a transportéry oligopeptidov je exprimovaných pred ale aj po kontakte *Trichoderma* spp. s ich obeťami (Seidl a kol., 2009). Väčšina týchto proteáz patrí do skupiny serínových proteáz podobných subtilyzínu, pričom v *Trichoderma harzianum* kultivovanej v prítomnosti fytopatogénov, bola pozorovaná značne zvýšená expresia génov kódujúcich vyššie spomínané proteázy (Suárez a kol., 2007). Zvýšená transkripcia génov kódujúcich serínové proteázy, bola detegovaná aj v *T. atroviride* po kontakte s *R. solani* a *Sclerotinia sclerotiorum*. Izoláty *T. atroviride*, u ktorých bola pozorovaná vysoká expresia týchto génov, vykazovali zvýšenú mykoparazitickú aktivitu (Flores a kol., 1997).

Bunková stena tvorí približne 30% sušiny vláknitých húb a je zložená prevažne z chitínu, β -1,3-glukánu, α -1,3-glukánu a α -1,4-glukánu. Huby rodu *Trichoderma* disponujú zvýšeným počtom glukánáz a chitináz v porovnaní s inými vláknitými hubami, obzvlášť je to pozorovateľné u chitináz. V *T. atroviride* bolo zistených 29 a u *T. virens* až 36 (Kubicek a kol., 2011).

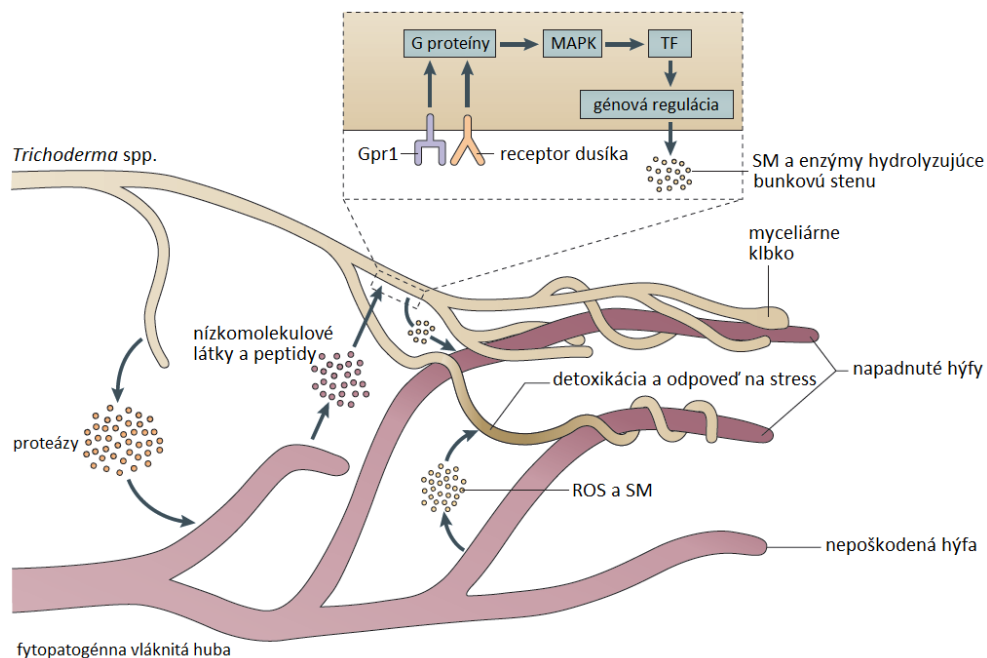
Oligopeptidy uvoľnené z bunkových stien fytopatogénov sa následne viažu na GPCR receptory, alebo na receptory *T. atroviride*, ktoré slúžia tiež ako senzory

dusíka (Seidl a kol., 2009). Následná transdukcia signálu postupuje konzervovanou dráhou zahŕňajúcou G-proteíny, ktoré sa skladajú z troch $G\alpha$ podjednotiek, jednej $G\beta$ a jednej $G\gamma$ podjednotky. Zistilo sa, že mutanti *T. atroviride* s deletovaným génom pre $G\alpha$ podjednotku úplne stratili schopnosť kolonizovať rastlinné patogény, vykazovali nižšiu chitinázovú aktivitu a taktiež zníženú produkciu SM 6-pentyl-pyrónu (Rocha-Ramirez a kol., 2002; Reithner a kol., 2004).

Mykoparazitickému útoku *Trichoderma* spp. väčšinou predchádza rast pozdĺž hýfy hostiteľa, až pokým sa neutvoria myceliárne klobká (Chacón a kol., 2007). Degradácia bunkovej steny a penetrácia do bunky hostiteľa nastáva po utvorení týchto štruktúr a je nezávislá od druhu hostiteľa (Harman a kol., 2004; Harman, 2011). Predpokladá sa, že v týchto štruktúrach dochádza k nahromadeniu glycerolu, ktorý je nevyhnutný na utvorenie turgoru - tlaku potrebného na mechanické porušenie bunkovej steny hostiteľa. Tento predpoklad podporuje zistenie zvýšenej expresie génov lipidového metabolizmu a osmoregulácie v *T. atroviride* počas kontaktnej fázy mykoparazitizmu (Seidl a kol., 2009). Peptaiboly sú pravdepodobne zapojené do procesu penetrácie do hýfy hostiteľa, pretože vďaka svojmu amfipatickému charakteru sú schopné utvárať kanály v biologických membránach.

Odpoveď *Trichoderma* spp. na obranný mechanizmus hosťujúcich fytopatogénov zahŕňa indukciu génov pre ochranu voči tepelnému šoku, oxidačnému stresu a génov zodpovedných za detoxikačné procesy (Lorito a kol., 2010; Seidl a kol., 2009). Fytopatogéna vlákniť huba *R. solani* využíva reaktívne formy kyslíka (ROS) ako signálne molekuly pri formovaní sklerócii a je schopná produkovať SM. Tieto faktory môžu vyvolať odpoveď na stres pozorovanú v *Trichoderma* spp. (Papapostolou a Georgiou, 2010, Aliferis a Jabaji, 2010). Huby rodu *Trichoderma* využívajú ako hlavný spôsob detoxikácie vysokoúčinný systém membránových ABC transportérov, zabezpečujúci rezistenciu voči veľkému

množstvu látok, vrátane fungicídov produkovaných fytopatogénmi (Ruocco a kol., 2009).



Obr. 10. Mykoparazitické interakcie medzi *Trichoderma* spp. a fytopatogénnymi hubami (Druzhinina 2011).

Samotné usmrtenie hosťujúceho fytopatogénu je výsledkom spolupôsobenia hydrolytických enzýmov štiepiacich bunkovú stenu, antifungálnych SM a rastlinných obranných mechanizmov vyvolaných vplyvom *Trichoderma* spp. (Druzhinina a kol., 2011).

2.5.2 SM v interakciách *Trichoderma* spp. s fytopatogénmi

Huby rodu *Trichoderma* produkujú veľké množstvo SM s antimikrobiálnymi vlastnosťami. Produkcia antibiotík väčšinou koreluje s mykoparazitickými schopnosťami, pričom inhibičný efekt purifikovaných antibiotík (ATB), je podobný inhibícii spôsobenej korešpondujúcim producentom ATB.

Trichoderma spp. syntetizujú širokú škálu SM, pričom produkcia konkrétnych SM varíruje v rámci jednotlivých zástupcov tohto rodu vláknitých húb. Podľa charakteru chemických štruktúr, boli navrhnuté dva spôsoby účinku SM vylučovaných *Trichoderma* spp.. Nízkomolekulové, nepolárne a prchavé SM (6-PP) majú ďalekosiahlejší dosah na pôdnu biosféru, zatiaľ čo polárne SM a peptaiboly (alameticín) ovplyvňujú predovšetkým prostredie v bezprostrednej blízkosti produkčného organizmu (Vienale a kol., 2008).

6-pentyl-pyrón (6-PP) je reprezentatívny antifungálny SM produkovaný *Trichoderma* spp.. Táto prchavá zlúčenina je zodpovedná za „kokosovú“ arómu charakteristickú pre huby rodu *Trichoderma*. 6-PP vykazuje inhibičný vplyv na rast mnohých vláknitých húb, ako napr. *Botrytis cinerea*, *R. solani* a *Fusarium oxysporum*. Pozorovaná bola silná korelácia medzi produkciou tohto SM a mykoparazitickými schopnosťami *T. harzianum* (Scarselletti a Faull, 1994). Biologická aktivita mnohých **peptaibolov** spočíva v ich schopnosti utvárať póry v biologických membránach, ako bolo preukázané pre alameticín produkovaný *T. viride* (Molle a kol., 1996).

Peptaibol trichorzianín je schopný inhibovať β -glukánsyntázu, čím v spolupráci z β -glukanázami *T. harzianum* potláča rast hosťujúceho fytopatogénu. Inhibícia β -glukánsyntázy zabraňuje rekonštrukcii bunkovej steny naštiepenej účinkom β -glukanáz (Lorito a kol., 1996).

Trichoderma pseudokoningii produkuje tri významné peptaiboly, menovite trichokonín VI, VII a VIII, ktoré vykazujú širokospektrálnu antimikróbnu aktivitu

voči grampozitívnym bakériám a vláknitým hubám. Mechanizmus účinku trichokonínu VI spočíva v indukovaní apoptickej smrti buniek (Shi a kol., 2012).

Medzi ďalšie **neribozomálne peptidy** syntetizované *Trichoderma* spp., patrí gliotoxín, ktorý bol extrahovaný z *T. virens* už v roku 1944 (Brian, 1944). *T. virens* je schopná produkovať ďalší neribozomálny peptid nazvaný gliovirín, ktorý syntetizujú aj *T. harzianum*, *Trichoderma hamatum* a *Trichoderma koningii*. Izoláty produkujúce gliotoxín sú antagonistické voči *R. solani*, pričom druhy syntetizujúce gliovirín sú antagonisti *Pythium ultimum* (Jones a Pettit, 1987, Howell a Stipanovic, 1983). Biochemická podstata inhibičných vlastností týchto SM však dosiaľ nie je známa.

Antrachinóny tvoria významnú skupinu polyketidových pigmentov syntetizovaných *Trichoderma* spp.. Ako prvé boli identifikované pachybazín, chryzofanol a emodín, izolované z *T. viride* v roku 1967 (Slater a kol., 1967). Emodín je najrozšírenejší antrachinón, produkovaný okrem vláknitých húb aj rastlinami, lišajníkmi a hmyzom (Gessler a kol., 2013). Tento SM účinne inhibuje rast mnohých fytopatogénov, ako napr. *R. solani* a *B. cinerea*.

Fungálne antrachinóny (pachybazín a emodín) majú významnú úlohu v mykoparazitizme, pretože sú potrebné pre správne ovnutie hýf *Trichoderma* spp. okolo svojej fungálnej obeť. Interakciu s hýfami *R. solani* (ale aj zvýšená hladina endogénneho emodínu, príp. pachybazínu) viedla k zvýšenej koncentrácii cAMP v mycéliu *T. harzianum*, čo naznačuje regulačnú funkciu antrachinónov v tomto mykoparazitickom procese (Lin a kol., 2012). Emodín účinne inhibuje aktivitu proteínkináz, ktoré majú dôležitú úlohu v regulácii bunkovej proliferácie (Srinivas a kol., 2007).

Trichodermaol je antrachinón produkovaný *T. viride* pri styku s *F. oxysporum* a vykazuje fungicídne účinky voči viacerým fytopatogénom rodov *Alternaria*, *Fusarium* a *Cladosporium* (Venkatachalam a kol., 2012). Ďalší

antrachinón, syntetizovaný *Trichoderma* spp., sa nazýva chryzofanol a má výrazný inhibičný vplyv na rast *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a *A. fumigatus* (Agarwal a kol., 2000).

Produkcia SM so štruktúrou hydroxyantrachinónov bola pozorovaná aj u mutantného kmeňa získaného UV mutagenézou *T. viride*. Tieto mutantné kmene produkovali pigmentované SM 1,3,6,8-tetrahydroxyantrachinón a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinón (Betina a kol., 1986). Ide o biologicky aktívne látky, ktoré pôsobia ako rozprahače oxidačnej fosforylácie (Gottasová, 1998).

Medzi antifungálne **steroidné SM** produkované *Trichoderma* spp. patrí viridín, ktorý účinne zabraňuje klíčeniu spór viacerých fytopatogénov, ako sú napr. *Colletotrichum* spp., *Botrytis allii*, a *Fusarium caeruleum* (Ghisalberti, 2002).

2.5.3 Súperenie o živiny medzi *Trichoderma* spp. a ostatnými organizmami

Hladovanie je najčastejšia príčina hynutia mikroorganizmov v prirodzenom prostredí, preto súperenie o zdroje živín a priestor predstavuje dôležitý nástroj na prežitie. U väčšiny vláknitých húb je príjem železa esenciálny pre viabilitu a pri nízkych exogénnych koncentráciách železa vylučujú SM schopné železo chelatovať. Tieto neribozomálne peptidy sa nazývajú siderofóry. *Trichoderma* spp. vylučujú vysokoúčinné siderofóry (ktoré vystupujú ako faktory patogenity), čo im zabezpečuje výhodu v kompetitívnom prostredí (Haas a kol., 2008).

Okrem toho majú huby rodu *Trichoderma* schopnosť metabolizovať široké spektrum sacharidových substrátov, vrátane celulózy, chitínu a β -glukánov. Ich štiepením vzniká glukóza, ktorej efektívny transport do bunky môže byť dôležitým faktorom v súperení s konkurenčnými mikroorganizmami (Delgado-Jarana a kol., 2003).

2.5.4 Interakcie *Trichoderma* spp. s rastlinami

Rastliny na prítomnosť patogénov reagujú **aktiváciou obranných mechanizmov**. Väčšina rastlinných patogénov vyvoláva dvojfázovú imunitnú odpoveď, pričom prvá fáza predstavuje rozpoznanie a reakciu na molekuly špecifické pre mikroorganizmy (MAMP) a/alebo patogény (PAMP). Túto fázu poznáme pod názvom imunitná odpoveď spúšťaná PAMP. Druhá fáza sa nazýva imunitná odpoveď spúšťaná efektormi (ETI), a vzniká po interakcii rastlín s faktormi virulencie fytopatogénov.

Keďže *Trichoderma* spp. nie sú rastlinné patogény, nepredpokladá sa, že by vyvolávali druhú fázu imunitnej odpovede. Niektoré typy molekúl produkované *Trichoderma* spp., ako napr. xylanázy, peptaiboly, svolenín (proteín podobný expanzínom schopný viazať celulózu) a keratoplataníny (proteíny podobné hydrofobínom), však môžu pôsobiť ako MAMP (Jones a Dangl, 2006). Rastliny na prítomnosť MAMP reagujú zvýšeným obsahom celulózy a β -glukánov v bunkovej stene, ale tiež vylučovaním fenolových zlúčenín, čo zabraňuje ďalšiemu postupu patogénu v počiatočných štádiách kolonizácie (Yedida a kol., 1999).

Trichoderma spp. vyvolávajú indukovanú systémovú rezistenciu (ISR), pri ktorej dochádza k akumulácii komponentov etylénovej signálnej dráhy a signálnej dráhy kyseliny jasmonovej u rastlín. ISR zahŕňa enzýmy ako antifungálne chitinázy, glukanázy, polyfenoloxidázy, peroxidázy, lipooxygenázy, a nízkomolekulové antimikróbne látky ako fytoalexíny, flavonoidy a terpenoidy (Shoresh a kol., 2010). ISR vedie k zvýšeniu obranyschopnosti rastlín voči patogénom, ktorá môže pretrvať určitú dobu aj po prerušení kontaktu rastliny s *Trichoderma* spp. (Harman a kol., 2004). ISR rastlín nebola vyvolaná interakciou s *T. virens* defektnou v syntéze peptaibolov, čo naznačuje zapojenie týchto SM do procesu stimulácie ISR (Druzhinina a kol., 2011).

Vláknité huby rodu *Trichoderma* prostredníctvom stimulácie obranných mechanizmov rastlín vlastne nepriamo interagujú s fytopatogénnymi hubami. Niektoré kmene *Trichoderma* spp. dokážu **stimulovať rast a vývoj rastlín**. Rastlinný hormón auxín (kyselina indoloctová) reguluje rast koreňovej sústavy, pričom produkcia tohto hormónu bola zaznamenaná okrem symbiotických rizobaktérii aj u húb rodu *Trichoderma* (Contreras-Cornejo a kol., 2009).

Posilnený rast rastlín môže byť tiež spôsobený znížením hladiny rastlinného hormónu etylénu (Wang a kol., 2002). *T. asperellum* obsahuje gén *acc1*, ktorý kóduje deaminázu kľúčového medzi produktu syntézy etylénu - kyselinu 1-aminocyklopropán-1-karboxylovú (ACC) (Viterbo a kol., 2010). Pretože zvýšená hladina etylénu inhibuje predlžovanie koreňov, zníženie hladiny Acc1 enzýmu naopak podporuje rast koreňovej sústavy (Druzhinina a kol., 2011).

Táto práca bola podporená APVV-0282-10.

3 Použitá literatura

Agarwal, S. K., Singh, S. S., Verma, S. a Kumar, S. (2000) Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi* *Journal of Ethnopharmacology* 72: 43–46

Aliferis, K. A. a Jabaji, S. (2010) Metabolite composition and bioactivity of *Rhizoctonia solani* sclerotial exudates. *J. Agric. Food Chem.* 58: 7604–7615

Baker, S. E., Perrone, G., Richardson, N. M., Gallo, A. a Kubicek, C. P. (2012) Phylogenomic analysis of polyketide synthase-encoding genes in *Trichoderma*. *Microbiology* 158: 147–154

Bayram, Ö. a Braus, G. H. (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 1–24

Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N. J., Keller, N. P., Yu, J. H. a Braus, G. H. (2008) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320: 1504–1506

Bedford, D., Jacobsen, J. R., Luo, G., Cane, D. E. a Khosla, C. H. (1996) A functional chimeric modular polyketide synthase generated via domain replacement. *Chemistry & Biology* 10: 82–83.

Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* 58: 1–26

Bergh, K. T. a Brakhage, A. A. (1998) Regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *acvA* (*pcbAB*) by amino acids: implication for involvement of transcription factor PACC. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 843–849

Bergmann, S., Funk, A. N., Scherlach, K., Schroeckh, V., Shelest, E., Horn, U., Hertweck, C. a Brakhage, A. A. (2010) Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 8143–8149

Betina, V., Sedmera, P., Vokoun, J. a Podojil, M. (1986) Anthraquinone pigments from a conidiating mutant of *Trichoderma viride*. *Experientia* 42:196–197

Boettger, D. a Hertweck, C. (2013) Molecular Diversity Sculpted by Fungal PKS–NRPS Hybrids, *ChemBioChem*, 14: 28–42

Bok, J. W. a Keller, N. P. (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* 3: 527–535

- Bok, J. W.,** Chung, D., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Kirby, K. A. a Keller, N. P. (2006) GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect. Immun.* 74: 6761–6768
- Bonnarme, P.,** Djian, A., Latrasse, A., Féron, G., Giniès, C., Durand, A. a Le Quéré, J.-L. (1997) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J Biotechnol* 56: 143–150
- Brakhage, A. A.** (1998) Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 547–585
- Brakhage, A. A.,** Thön, M., Spröte, P., Scharf, D. H., Al-Abdallah, Q., Wolke, S. M. a Hortschansky, P. (2009) Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of *trans*-acting factors. *Phytochemistry* 70: 1801–1811
- Brakhage, A. A.** (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* 11: 21–32
- Brakhage, A. A. a Schroeckh, V.** (2011) Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet. Biol.* 48: 15–22
- Brian, P. W.** (1944) Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Nature* 154:667–668
- Burmester, A.,** Shelest, E., Glöckner, G., Heddergott, C., Schindler, S., Staib, P., Heidel, A., Felder, M., Petzold, A., Szafranski, K., Feuermann, M., Pedruzzi, I., Priebe, S., Groth, M., Winkler, R., Li, W., Knemeyer, O., Schroeckh, V., Hertweck, C., Hube, B., White, T. C., Platzer, M., Guthke, R., Heitman, J., Wöstemeyer, J., Zipfel, P. F., Monod, M. a Brakhage, A. A. (2011) Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biol.* 12: R7
- Calvo, A. M.,** Wilson, R. A., Bok, J. W. a Keller, N. P. (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol R* 66: 447–459
- Calvo, A. M.** (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* 45: 1053–1061
- Cane, D. E. a Walsh, C. T.** (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6: R319–R325
- Contreras-Cornejo, H. A.,** Macias-Rodriguez, L., Cortes-Penagos, C. a Lopez-Bucio, J. (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 1579–1592
- Delgado-Jarana, J.,** Moreno-Mateos, M. A. a Benítez, T. (2003) Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of gtt1. *Euk Cell* 2:708–717

- Degenkolb, T.,** von Döhren, H., Nielsen, K. F., Samuels, G. J. a Brückner, H. (2008) Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem Biodivers* 5: 671–680
- von Dohren, H.** (2009) A survey of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 46 (Suppl. 1): S45–S52
- Druzhinina, I. S.,** Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, Ch. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., Kubicek, Ch. P. (2011) *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Microbiology* 9: 749–759
- Finking, R. a Marahiel, M.** (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 453–488
- Flores, A.,** Chet, I. a Herrera-Estrella, A. (1997) Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Curr. Genet.* 31: 30–37
- Fujii, I.,** Watanabe, A., Sankawa, U. a Ebizuka, Y. (2001) Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chem. Biol.* 8: 189–197
- Gaffoor, I.,** Brown, D. W., Plattner, R., Proctor, R. H., Qi, W. a Trail, F. (2005). Functional Analysis of the Polyketide Synthase Genes In The Filamentous Fungus *Gibberella zeae* (Anamorph *Fusarium graminearum*). *Eukaryot.Cell.* 4: 1926–1933
- Gardiner, D. M. a Howlett, B. J.** (2005) Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus* *FEMS Microbiology Letters* 248: 241–248
- Georgianna, D. R. a Payne, G. A.** (2009) Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genet. Biol.* 46: 113–125
- Gessler N. N.,** Egorova, A. S. a Belozerskaya, T.A. (2013) Fungal anthraquinones *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* 49: 109–123
- Ghisalberti, E. L.** (2002) Anti-infective agents produced by the hyphomycetes general *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Curr Med Cem* 1: 343–374
- Gottasová, R.,** (1998) Produkcia a charakterizácia sekundárných metabolitov mutanta *Trichoderma viride* M-108 Dizertačná práca : 12
- Haarmann, T.,** Machado, C., Lübbe, Y., Correia, T., Schardl, C. L., Panaccione, D. G. a Tudzynski, P. (2005) The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry* 66: 1312–1320

- Haas, H.,** Eisendle, M. a Turgeon, B. G. (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* 46: 149–187
- Harman, G. E. a Kubicek, C. P.,** (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London, 278pages
- Harman, G. E.,** Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. a Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2: 43–56
- Harman, G. E.** (2011) Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol.* 189: 647–649
- Hertweck, C.** (2009) The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48: 4688–4716
- Hoffmeister, D. a Keller, N. P.** (2007) Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep* 24: 393–416
- Hortschansky, P.,** Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann, S., Thön, M., Kniemeyer, O., Abt, B., Seeber, B., Werner, E. R., Kato, M., Brakhage, A. A. a Haas, H. (2007) Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex – a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* 26: 3157–3168
- Howell, C. R. a Stipanovic, R. D.** (1983) Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Can J Microbiol* 29: 321–324
- Howell, C. R.,** Stipanovic, R. a Lumsden, R. (1993) Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Sci Technol* 3: 435– 441
- Chacón, M. R.,** Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A. a Delgado-Jarana, J. (2007) Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int. Microbiol.* 10: 19–27
- Chang, P. K.** (2003) The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. *Mol. Genet. Genom.* 268: 711–719
- Chang, P. K.,** Scharfenstein, L. L., Ehrlich, K. C., Wei, Q., Bhatnagar, D. a Ingber, B. F. (2012). Effects of *laeA* deletion on *Aspergillus flavus* conidial development and hydrophobicity may contribute to loss of aflatoxin production. *Fungal Biol* 116: 298–307
- Chiou, C. H.,** Miller, M., Wilson, D. L., Trail, F. a Linz, J. E. (2002) Chromosomal location plays a role in regulation of aflatoxin gene expression in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 306–315
- Jones, J. D. a Dangl, J. L.** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329

- Jones, R. W. a Hancock, J. G.** (1987) Conversion of viridin to viridiol by viridin-producing fungi. *Can J Microbiol* 33: 963–966
- Jones, R. W. a Pettit, R. E.** (1987) Variation in sensitivity among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* to the antibiotic gliotoxin. *Plant Dis* 71:34–36
- Kale, S. P.,** Milde, L., Trapp, M. K., Frisvad, J. C., Keller, N. P. a Bok, J. W. (2008). Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1422-1429
- Keller, N. P.,** Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T. D. & Burow, G. B. (1997) pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87: 643–648
- Keller, N. P.,** Turner, G. a Bennett, J. W. (2005) Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:937–947
- Kennedy, J.,** Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C. a Hutchinson, C. R. (1999) Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* 284: 1368–1372
- Kim, H. a Woloshuk, C. P.** (2008) Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 45: 947–953
- Kroken, S.,** Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C. a Turgeon, B. G. (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100: 15670–15675
- Kubicek, C. P.,** Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A. , Mukherjee P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Coulpier, F., Deshpande, N., von Döhren, H., Ebbole, D. J., Esquivel-Naranjo, E. U., Fekete, E., Flipphi, M., Glaser, F., Gómez-Rodríguez, E. Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández-Oñate, M., Karaffa, L., Kostı, I., Le Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, P. S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E. E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, M., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo-Ramos, J. A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H. H., Zhang, M., Coutinho, P. M., Kenerley, C. M., Monte, E., Baker, S. E. a Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol* 12: R40
- Lin, Y. R.,** Lo, C. T., Liu, S. Y. a Peng, K. C. (2012) Involvement of Pachybasin and Emodin in Self-Regulation of *Trichoderma harzianum* Mycoparasitic Coiling *J. Agric. Food Chem.* 60: 2123–2128

Lo, H. C., Entwistle, R., Guo, C. J., Ahuja, M., Szewczyk, E., Hung, J. H., Chiang, Y. M., Oakley, B. R. a Wang, C. C..(2012)Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* 134: 4709–4720

Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. a Kubicek, C. P. (1996) Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 178: 6382-6385

Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. a Monte, E. (2010) Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 395–417

Losada, L., Ajayi, O., Frisvad, J. C., Yu, J. a Nierman, W. C. (2009) Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. *Med. Mycol.* 47: 88–96

Molle, G., Dugast, J. Y., Spach, G. a Duclouhier, H. (1996) Ion Channel Stabilization of Synthetic Alamethicin Analogs by Rings of Inter-Helix H-Bonds,*Biophysical Journal* 70: 1669-1675

Mukherjee, P. K., Wiest, A., Ruiz, N., Keightley, A., Moran-Diez, M. E., McCluskey, K., Pouchus, Y. F. a Kenerley, C. M. (2011) Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *J Biol Chem* 286: 4544–4554

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A. a Kenerley, C. M. (2012) Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology* 158: 35–45

Nützmann, H. W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schümann, J., Hertweck, C., Strauss, J. a Brakhage, A. A. (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108: 14282–14287

Oide, S., Krasnoff, S. B., Gibson, D. M. a Turgeon, B. G. (2007) Intracellular siderophores are essential for ascomycete sexual development in heterothallic *Cochliobolus heterostrophus* and homothallic *Gibberella zeae*. *Eukaryot Cell* 6: 1339–1353

Palmer, J. M. a Keller, N. P. (2010) Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr. Opin. Microbiol.* 13:431–436

Papapostolou, I. a Georgiou, C. D. (2010) Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. *Microbiology* 156: 960–966

Perrin, R. M., Fedorova, N. D., Bok, J. W., Cramer, R. A., Wortman, J. R., Kim, H. S., Nierman, W. C. a Keller, N.P. (2007) Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog.* 3:e50

- Reino, J. L.,** Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R. a Collado, I. G. (2008) Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev* 7: 89–123
- Reithner, B.,** Brunner, K., Schuhmacher, R., Peissl, I., Seidl, V., Krska, R. a Zeilinger, S. (2004) The G protein α subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet. Biol.* 42: 749–760
- Reverberi, M.,** Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., Picardo, M., Fanelli, C. a Fabbri, A. A. (2008) Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene. *Eukaryot. Cell* 7: 988–1000
- Rocha-Ramirez, V.,** Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. A. a Herrera-Estrella, A. (2002) *Trichoderma atroviride* G-protein α -subunit gene tga1 is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot. Cell* 1: 594–605
- Ruocco, M.,** Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L. a Lorito, M. (2009) Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 291-301
- Scarselletti, R. a Faull, J. L.** (1994) In vitro activity of 6-pentyl-a-pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Mycol Res* 98:1207–1209
- Seidl, V.,** Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S. E. a Kubicek, C. P. (2009) Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics* 10: 567-580
- Shi, M.,** Chen, L., Wang, X. W., Zhang, T., Zhao, P. B., Song, X. Y., Sun, C. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C. a Zhang, Y. Z. (2012) Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology* 158: 166–175
- Shilatifard, A.** (2006) Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 243–269
- Shoresh, M.,** Harman, G. E. a Mastouri, F. (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 21–43
- Schroeckh, V.,** Scherlach, K., Nützmann, H.W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C. a Brakhage, A.A. (1999) Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* 284: 1368–1372
- Schroeckh, V.,** Scherlach, K., Nützmann, H. W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C. a Brakhage, A.A. (2009) Intimate bacterial–fungal

interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106: 14558–14563

Slater, G. P., Haskins, R. H., Hogge, L. R. a Nesbitt, L. R. (1967) Metabolic products from a *Trichoderma viride*. *Can J Chem* 45: 92–96

Smith, D. J., Burnham, M. K., Bull, J. H., Hodgson, J. E., Ward, J. M., Browne, P., Brown, J., Barton, B., Earl, A. J. a Turner, G. (1990) β -lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. *EMBO J.* 9: 741–747

Srinivas, G., Babykutty, S., Sathiadevan, P. P. a Srinivas, P. (2007) Molecular mechanism of emodin action: Transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Medicinal Research Reviews* 27: 591–608

Strauss, J. a Reyes-Dominguez, Y. (2011) Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet. Biol.* 48: 62–69

Suárez, M. B., Vizcaíno, J. A., Llobell, A. a Monte, E. (2007) Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Curr. Genet.* 51: 331–342

Thön, M., Al Abdallah, Q., Hortschansky, P., Scharf, D. H., Eisendle, M., Haas, H. a Brakhage, A. A. (2010) The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 38: 1098–1113

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. a Arst, H. N. Jr. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14: 779–790

Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B. a Marzluf, G. A. (1999) Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 106–114

Venkatachalam, P., Anbumalar, S. a Sivakumar, T. (2012) Antimicrobial Activity of Trichodermaol against Phytopathogens. *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences* Vol. 1 (3): 599-603

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. a Lorito, M. (2008) *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1-10

Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. a Chet, I. (2010) Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol. Lett.* 305: 42–48

Vödtsch, M., Scherlach, K., Winkler, R., Hertweck, C., Braun, H. P., Roth, M., Haas, H., Werner, E. R., Brakhage, A. A. a Kniemeyer, O. (2011) Analysis of the *Aspergillus fumigatus*

proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. *J. Proteome Res.* 10: 2508–2524

Wallner, A., Blatzer, M., Schrettl, M., Sarg, B., Lindner, H. & Haas, H. (2009) Ferricrocin, a siderophore involved in intra- and transcellular iron distribution in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 75: 4194–4196

Wang, K., Li, H. & Ecker, J. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: 131–151

Woo, S.L. & Lorito, M. (2007) Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, 107–130

Yedidia, I. I., Benhamou, N. & Chet, I. (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061–1070

Yin, W. & Keller, N. P. (2011) Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J. Microbiol.* 49: 329–339