

# **Biosynthèse des mycotoxines par *Fusarium graminearum***

Effet du pH sur l'induction de voie de biosynthèse des trichothécènes

*Mycotoxines biosynthesis in Fusarium graminearum*

*Effect of pH change on the induction of trichothecenes biosynthesis*

**Barreau, Christian (1) ; Boutigny, Anne-Laure (2) ; Merhej Jawad (1) ; Bernarde, Cédric (1) ; Pinson-Gadais, Laetitia (1); Forget-Richard, Florence (1)**

**(1) INRA – U.R. INRA 1264 - Mycologie et Sécurité des Aliments (MycSA) Pôle Qualis, 71 avenue Edouard Bourleaux, B.P. n° 81, F-33883, Villenave d'Ornon Cedex – mël : cbarreau@bordeaux.inra.fr**

**(2) IRTAC, 67 boulevard Richard Lenoir, 75011 Paris**

## Résumé

Les champignons pathogènes du genre *Fusarium* sont des agents responsables de graves épidémies de fusariose de l'épi sur les céréales. Outre les dégâts et pertes de rendements provoqués, certaines des espèces responsables de la fusariose sont capables de produire des mycotoxines qui peuvent rendre les récoltes impropres à la consommation humaine. La réglementation européenne impose maintenant des seuils de contamination pour les différents produits céréaliers. Le contrôle des épidémies de fusariose par lutte chimique est coûteux et ne peut garantir actuellement la production de céréales ne présentant pas de contamination dépassant ces seuils. En l'absence de procédés de décontamination applicables, il est nécessaire d'agir en amont, c'est-à-dire de pouvoir limiter la production de fusariotoxine au champ. Les connaissances sur la biosynthèse des mycotoxines et sur les facteurs capables de réduire la production de toxines au champ sont limitantes. Une approche *in vitro* doit permettre de déterminer quels sont les facteurs décisifs dans l'induction de la biosynthèse des toxines chez *Fusarium*. *Fusarium graminearum*, l'espèce la plus fréquemment retrouvée sur céréales, est responsable de la contamination par des trichothécènes de type B (TCT B). La voie de biosynthèse de ces métabolites secondaires est connue maintenant et

Mycotoxines fusariennes des céréales – Arcachon - 11-13 septembre 2007  
www.symposcience.org

l'accès aux gènes « *Tri* » impliqués permet d'étudier les mécanismes régulant leur biosynthèse. Des fluctuations dans l'induction du niveau de biosynthèse des TCT B peuvent être dues aux variations du milieu de culture du champignon. Dans ce travail, l'effet de l'évolution du pH du milieu sur la production de toxine et sur l'induction du gène *Tri5*, premier gène de la voie de biosynthèse des TCT B chez *F. graminearum* a été étudié. Les résultats obtenus suggèrent qu'une chute brusque du pH serait capable d'induire l'expression du gène *Tri5* et la biosynthèse des TCT B. Des boîtes correspondant à la séquence consensus 5'GCCARG3' de fixation du facteur PacC contrôlant l'homéostasie du pH chez *Aspergillus* sont présentes dans les promoteurs de plusieurs gènes « *Tri* » et en particulier des gènes régulateurs *Tri6* et *Tri10*. Ceci pointe du doigt un rôle possible du facteur de contrôle du pH dans la régulation de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes.

Mots clés : Céréale, fusariose, *Fusarium graminearum*, toxinogénèse, trichothécènes, voie de biosynthèse, régulation, effet du pH.

#### Abstract

*Pathogenous fungi of the genus Fusarium are responsible for devastating diseases known as the Fusarium Head Blight (FBH) on cereal. In addition to the losses due to the disease, many species produce mycotoxins that pollute harvested seeds and are harmful for human consumption. The UE recently established regulations limiting the acceptable contaminating toxin threshold for the different cereal products. Chemical control of FBH is expensive and not sufficient to avoid mycotoxins contamination of harvested cereal. Taking into account that no efficient detoxification process exists yet, upstream action to prevent mycotoxin accumulation in the field is a prerequisite. However, knowledge of factors reducing toxin biosynthesis in the field are limiting today. More studies aiming at identifying key steps for the induction of toxin synthesis in vitro are necessary. Fusarium graminearum, the more frequently isolated specie on cereal, is responsible for contamination by B type trichothecenes (TCT B). The biosynthetic pathway for these secondary metabolites is known and "Tri" genes are available for molecular and regulation studies. In this work, we focused on fluctuations in the level of induction in response to modification in the culture medium. Effect of pH changes on toxin production and Tri5 gene expression has been analysed. Results suggest that a drastic drop in pH value is able to induce the expression of Tri 5 gene and synthesis of TCT B. Boxes of the sequence 5'GCCARG3', consensus for the PacC fixation factor of Aspergillus responsible for pH homeostasis, are detected in the promoters of the two transcription factors Tri6 and Tri10.*

Mycotoxines fusariennes des céréales – Arcachon - 11-13 septembre 2007  
www.symposcience.org

*This observation points towards a possible transcriptional regulation of Tri genes in F. graminearum by a transcription factor homologous to PacC.*

*Keywords: Cereal, FHB disease, Fusarium graminearum, toxinogenesis, trichothecenes, biosynthesis pathway, regulation, effect of pH.*

## Introduction

La fusariose du blé est un fléau conduisant à des pertes importantes sur les récoltes de céréales à travers le monde (Parry et al., 1995). De plus, les espèces fongiques responsables de cette maladie sont généralement productrices de mycotoxines qui contaminent les grains récoltés. En Europe, les mycotoxines les plus souvent observées sur blés et orges sont des trichothécènes de type B (TCT B) et la zéaralénone produites toutes les deux le plus souvent par *Fusarium graminearum* et moins fréquemment par *F. culmorum* (Bakan et al., 2002; Bottalico and Perrone, 2002; Waalwijk et al., 2003). Ces toxines sont aussi observées sur maïs. Du fait de la menace que représente leur toxicité vis-à-vis de l'homme et des animaux (Pestka, 2007; Pestka and Smolinski, 2005), les niveaux de contamination des céréales par ces toxines sont maintenant réglementés au niveau Européen (Règlements (CE) N°856/2005 du 6 juin 2005 et N°1126/2007 du 20 septembre 2007). Il est donc essentiel de pouvoir maîtriser l'accumulation de ces toxines dans les céréales. Les voies de biosynthèse des trichothécènes commencent à être connues et les principaux gènes impliqués ont été localisés dans le cluster « Tri » (Kimura et al., 2003). Deux facteurs de transcription importants pour l'expression des gènes du cluster ont été identifiés (Kimura et al., 2007; Peplow et al., 2003; Proctor et al., 1995; Tag et al., 2001). Cependant, les différentes étapes à la base de l'induction de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse restent encore méconnus aujourd'hui. L'induction de cette voie semble être sensible à de très nombreux facteurs environnementaux (Boutigny et al., 2008). Le milieu sur lequel se développe le champignon peut conditionner ou non l'induction de la biosynthèse de TCT. Pour la production de toxine en milieu liquide, le milieu GYEP (Miller et al., 1983) a généralement été utilisé par la plupart des auteurs. Nous avons récemment mis au point au laboratoire un milieu synthétique permettant d'obtenir une induction rapide de la production de toxine à un niveau très élevé en comparaison avec ce qui est obtenu avec le milieu GYEP (Boutigny, 2007).

Au cours de ce travail, nous avons observé que, dans nos conditions de culture, l'évolution du pH du milieu de culture pouvait fortement conditionner l'induction de la voie de biosynthèse. Nous avons alors étudié le rôle éventuel de la variation de pH dans l'induction de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des TCT B.

# Matériels et Méthodes

## 1. Matériel biologique

La souche de *Fusarium graminearum* CBS 185.32 (Centraal Bureau voor Schimmelcultures, The Netherlands) répertoriée dans notre collection sous la référence INRA 349 a été utilisée pour la culture *in vitro* comme décrit précédemment (Ponts et al., 2006). Le milieu de culture GYEP est un milieu standard utilisé pour la culture *in vitro* de *F. graminearum* et la production de toxine (Miller et al., 1983). Le milieu de culture SM utilisé a été mis au point par A.L. Boutigny (Boutigny, 2007). Ce milieu contient 0,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,6 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,017 g/L de  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 mg/L de biotine, 20g/L de glucose, et 0,1 mL/L de la solution de sels minéraux 50X décrite par Vogel (Vogel, 1956). Ce milieu de culture synthétique pauvre est très faiblement tamponné et permet l'induction rapide de la toxinogénèse lors de culture *in vitro* de souches de *Fusarium*. Ce milieu représente la condition A. Pour la condition B fortement tamponnée à pH 6,5, la concentration en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a été ajustée à 7g/L et celle de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , à 8,4 g/L. Pour la condition C tamponné à pH 3, le phosphate de potassium a été remplacé par le couple  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (5,5g/L) – acide citrique (0,4g/L).

Toutes les cultures ont été réalisées dans huit millilitres de milieu dans des boîtes de Petri de cinq centimètres de diamètre à 25 °C à l'obscurité sans agitation. Les cultures ont été inoculées avec une suspension de spores de façon à obtenir une concentration finale de  $4 \times 10^6$  spores/ml. Le mycélium a été récupéré par centrifugation et lyophilisé pour déterminer la biomasse sèche et les surnageants de culture utilisés pour la mesure du pH et le dosage de toxine.

## 2. Méthodes

### 2.1. Méthodes analytiques

Les TCT B ont été extraits du milieu de culture selon la méthode décrite précédemment (Ponts et al., 2006) sauf que tous les volumes des ont été adaptés pour réaliser l'extraction sur cinq millilitres de milieu de culture.

### 2.2. Méthodes moléculaires

Pour les extractions d'ARN, les cultures ont été filtrées sous vide à l'aide d'un système VISIPREP™ DL (Supelco) sur des filtres en polyéthylène stériles (Supelco). Les mycéliums ont été rincés deux fois avec de l'eau MilliQ stérile et congelés dans de l'azote liquide puis placés à -80°C. Les ARN ont été extraits et convertis par transcription inverse en ADNc comme décrit précédemment (Ponts et al., 2007) à l'aide du kit « SuperScript®First-Strand Synthesis System for RT-PCR » fourni par Invitrogen. Les

PCR ont été réalisées dans des mélanges réactionnels de 25 µL contenant 1 µL de chaque échantillons d'ADNc (correspondant à 8 ou 10 ng d'ARN), 2,5 U de GoTaq® DNA polymerase (Promega), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de chaque dNTP et 0,5 µM de chaque amorce. Les amorces utilisées sont: gène de la *beta-tubuline*: beta-tub F (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT-3') et beta-tub R (5'-GATGACCGAAAACGAAGTTG-3'); gène *Tri5*: Tri5-4 F (5'-GTCCTGGGCCATAGAGAAGCCCC-3') et Tri 5-5 R (5'-GCAAAGGTCTCCAAAGAGTGCATGG-3') et gène *FgPac1*: FgPac1-1 F (5'-GCAGCTGGGTTAGTTCGCATCTG-3') et FgPac1-3 R (5'-GGTGCTGCATCAACATCAAACG-3'). Les conditions de PCR suivantes ont été utilisées: 94°C pendant 2 min, 28 x (95°C pendant 15 s, 57°C pendant 30 s, 72°C pendant 30 s), puis conservation à 4°C. Les produits d'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (w/v).

## Résultats

### 1. Cinétique de la production de trichothécènes dans des cultures statiques en milieu liquide

La souche de *Fusarium graminearum* utilisée produit du déoxynivalénol (DON) et sa forme acétylée (15ADON) qui est largement majoritaire dans ces conditions de culture. Les valeurs de production de TCT B présentées ci-après correspondent à la somme des deux formes (DON + 15ADON) de la toxine exprimé par rapport à la biomasse sèche produite dans le milieu. Les cinétiques de croissance et de production de TCT B de cette souche dans le milieu GYEP généralement utilisé pour la culture en milieu liquide ou dans le milieu synthétique SM (condition A) mis au point au laboratoire ont été comparées.

#### 1.1. Cinétique de la production de trichothécènes en milieu GYEP

Lors d'une culture en milieu GYEP, la biomasse fongique s'accumule rapidement dans les quatre premiers jours de culture. La production de trichothécènes est détectée dès le deuxième jour de culture et augmente rapidement à partir du sixième jour (Figure 1). Bien que la quantité de biomasse fongique n'augmente plus après le sixième jour, l'accumulation de TCT B se poursuit jusqu'au seizième jour. Le pH du milieu de culture est à 6 au début de la culture et chute brusquement à partir du deuxième jour pour se stabiliser à environ 4,5.

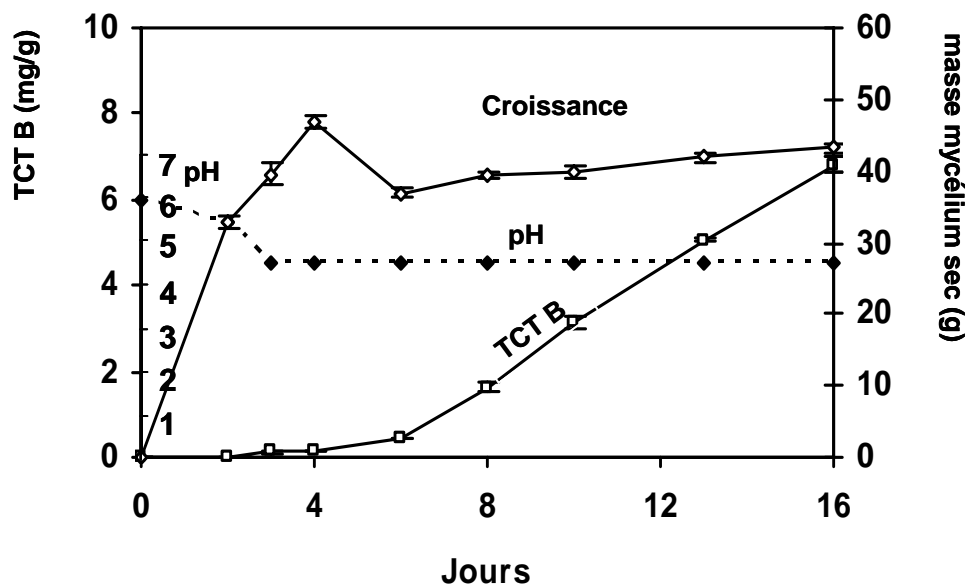


Figure 1 : Cinétique d'accumulation des TCT B dans une culture de la souche INRA 349 de *F. graminearum* en milieu GYEP

## 1.2. Cinétique de la production de trichothécènes en milieu synthétique SM

Lors de la culture en milieu synthétique, la biomasse commence à s'accumuler à partir du deuxième jour et augmente jusqu'au quatrième jour pour se stabiliser ensuite (Fig.2). La biomasse obtenue en milieu SM est sensiblement inférieure à celle obtenue en milieu GYEP. La toxine commence à être détectée au troisième jour, augmente fortement jusqu'au sixième jour et continue ensuite à s'accumuler pendant toute la culture. La quantité de toxine obtenue dans le milieu synthétique est plus de 50 fois supérieure à celle obtenue en milieu GYEP. La mesure du pH du milieu de culture permet de constater une acidification très rapide et très abrupte après deux jours de culture. Le pH, qui initialement était de 6,5, descend à une valeur proche de 2 dès le quatrième jour de culture. Le milieu SM est très faiblement tamponné et l'utilisation de l'ammonium par le champignon conduit à une acidification très importante au cours du développement. Cette acidification pourrait expliquer l'arrêt de la croissance observée à ce stade. Cependant il faut remarquer que, lors de la culture de cette même souche dans du milieu GYEP, on observe aussi un arrêt de la croissance au quatrième jour alors que dans ces conditions de culture, le pH ne descend pas en dessous de 4,5. S'il y a un effet du pH sur la croissance, la valeur critique doit se situer entre 6,5 et 4,5.

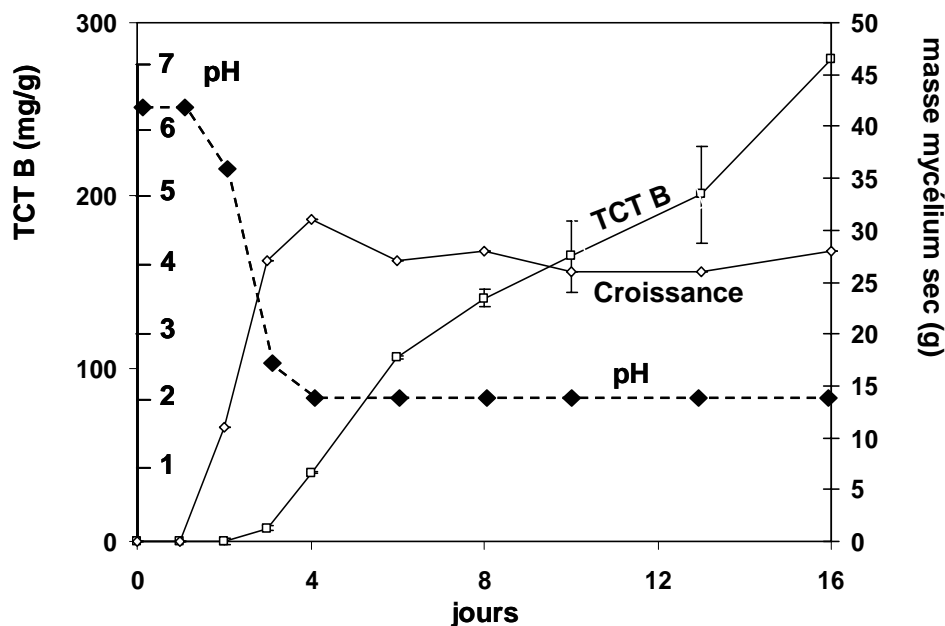


Figure 2 : Cinétique d'accumulation des TCT B dans une culture de la souche INRA 349 de *F. graminearum* en milieu synthétique MS

La production de toxine semble s'initier de façon concomitante avec la chute du pH, quelque soit le milieu de culture. Cependant en milieu MS où l'amplitude du changement de pH est plus grande, le niveau de production de la toxine est très supérieur à celui obtenu en milieu GYEP. Ces résultats pourraient suggérer que l'acidification du milieu de culture joue éventuellement un rôle important dans l'induction de la production de toxine. Un rôle potentiel d'une acidification brusque du milieu dans l'induction de la production des trichothécènes chez *F. graminearum* avait déjà été suggéré (Bily, 2003). Par ailleurs, il a été montré que la synthèse de stérigmatocystine et d'aflatoxine étaient régulées par le pH chez *Aspergillus spp.* (Keller et al., 1997; O'Callaghan et al., 2006) et que la biosynthèse de fumonisine était modulée par le facteur *PAC1* de contrôle du pH (Flaherty et al., 2003). Nous nous sommes donc intéressés de façon plus approfondie à l'effet du pH sur l'induction de la biosynthèse de trichothécènes.

## 2. Analyse de l'effet d'un changement du pH sur la production de TCT B et l'expression du gène *Tri5*

Afin de préciser l'effet d'un changement de pH sur la production *in vitro* de trichothécènes par *F. graminearum*, nous avons analysé celle-ci dans différentes conditions de milieu synthétique mimant des changements de pH. Parallèlement, l'expression du gène *Tri5*, premier gène de la voie de biosynthèse des trichothécènes, a été suivie par RT-PCR.

## 2.1. Principe de l'expérience

Trois conditions différentes de culture ont été utilisées et la production de toxine ainsi que l'expression du gène *Tri5* ont été suivis entre trois et sept jours de culture. La première condition (Condition A) est la condition contrôle. Elle a été réalisée dans le milieu MS en laissant le pH s'acidifier au cours de la culture comme observé dans la figure 1. La deuxième condition (Condition B), le pH du milieu de culture a été maintenu artificiellement à 6,5 en augmentant la concentration du tampon phosphate à 100 mM dans le milieu MS. Après trois jours de culture dans cette condition, le mycélium a été récupéré par centrifugation, lavé dans le même milieu, puis remis à incuber dans ce même milieu jusqu'à sept jours. Enfin, pour la troisième condition (Condition C), la culture a été réalisée dans le même milieu que la condition B pendant les trois premiers jours de culture, puis le mycélium a été lavé dans du milieu MS tamponné à pH 3 par un tampon citrate/phosphate de sodium et incubé jusqu'à sept jours dans ce même milieu. Dans les conditions B et C, le pH reste constant jusqu'à l'arrêt de la culture. Les résultats sont montrés Figure 3.

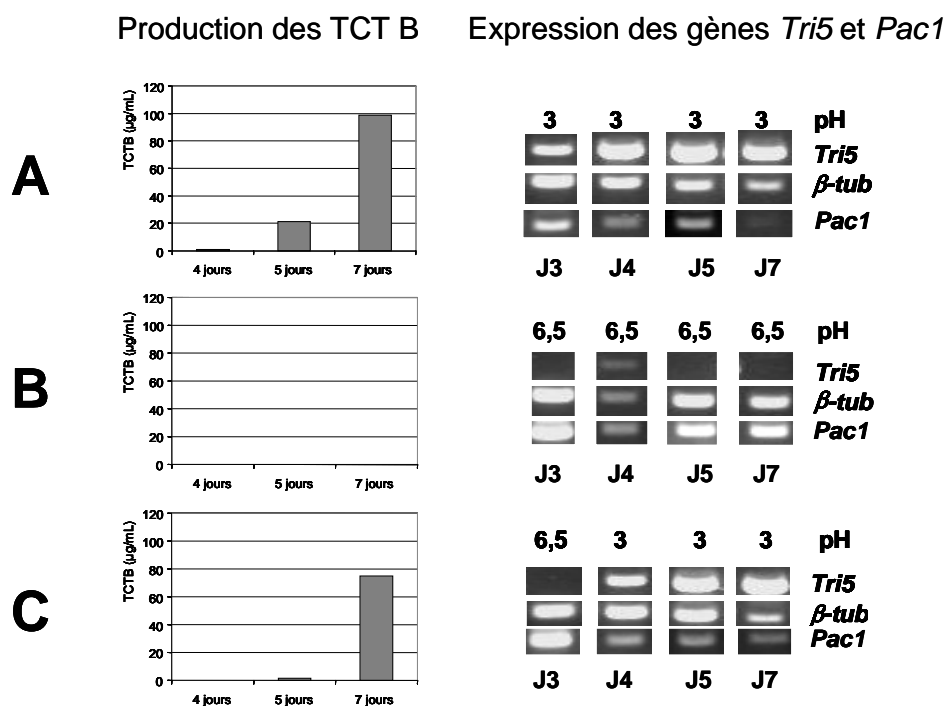


Figure 3 : Effet du changement de pH sur la production de trichothécènes B et sur l'expression des gènes *Tri 5* et *Pac1*.



## 2.2. Changement de pH et production de TCT B

Dans les cultures contrôles en condition A, la production de trichothécènes commence à être détectable dès le quatrième jour et augmente fortement au 5<sup>ème</sup> et au 7<sup>ème</sup> jours (Fig. 3A). Par contre, aucune production de toxine n'est détectée dans les cultures de la condition B, même après 7 jours de culture (Fig.3B). Pour les cultures en condition C, la production de trichothécènes devient détectable au 5<sup>ème</sup> jour, c'est à dire 48 heures après le transfert dans le milieu à pH 3 (Fig. 3C). Bien que des effets du phosphate ou du citrate sur l'induction de la production de toxine ne soient pas à exclure, les résultats obtenus suggèrent que la toxinogénèse est réprimée en milieu neutre et est induite dans un milieu acide. Cette induction observée en milieu acide pourrait soit être la résultante d'un stress provoqué par l'acidification brutale du milieu, soit résulter d'un effet direct du pH sur le métabolisme secondaire. Afin de préciser l'effet du pH sur la biosynthèse de trichothécènes, nous avons analysé l'effet du changement de pH sur l'expression du gène *Tri5*, le premier gène de la voie de biosynthèse des trichothécènes.

## 2.3. Changement de pH et expression du gène *Tri5*

Chez les champignons filamenteux, l'homéostasie du pH est régulée par un facteur de transcription à doigt de zinc appelé facteur PacC (Tilburn et al., 1995) qui contrôle directement l'activation de gènes dit « basiques » (gènes exprimés dans des conditions neutre et basique) et la répression de gènes dit « acides » (exprimés uniquement lorsque les conditions environnantes sont très acides). Cela permet au champignon de s'adapter à des changements extrêmes de pH du milieu environnant (Arst and Penalva, 2003). Afin de déterminer dans quelle mesure le changement de pH influe sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de trichothécènes, nous avons analysé l'expression de *Tri5* dans les différentes conditions de culture entre 3 et 7 jours de culture en comparaison avec l'expression du gène de la  *$\beta$ -tubuline*. Les résultats (Figure 3) montrent que dans les trois conditions A, B et C, l'expression du gène de la  *$\beta$ -tubuline* est observée dans tous les échantillons et semble diminuer avec le temps. L'expression du gène *Tri5* est détectée à 3 jours de culture et semble très abondante à J4, J5 et J7 dans la condition A. Dans la condition B où le milieu est tamponné à pH 6,5, l'expression de *Tri5* n'est pas observée (ou seulement très faiblement pour l'échantillon à J4) alors que le gène contrôle de la  *$\beta$ -tubuline* est exprimé dans tous les échantillons. En condition C, l'expression de *Tri5* qui n'est pas détectée dans le milieu à pH 6,5 est observée à J4 c'est-à-dire un jour après le transfert dans le milieu acide à pH3. Ce gène est fortement exprimé les jours suivants. Le gène *Tri5* est fortement exprimé chaque fois que le milieu du pH est acide. Il semble donc se comporter comme un gène « acide ».

## Conclusion

L'expression du gène *Tri5* semble répondre aux variations du pH dans le milieu de culture. En condition culture neutre, ni la synthèse de toxine, ni l'expression du gène *Tri5* n'ont pu être observés. Nous pouvons émettre l'hypothèse que, soit l'expression du gène *Tri5* est contrôlée directement par un facteur de transcription équivalent au facteur PacC d'A.

*nidulans*, soit elle est contrôlée par les facteurs de transcription *Tri10* ou *Tri6* dont l'expression est elle même sous le contrôle de ce facteur. Ce facteur de transcription agirait comme un répresseur des gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes qui se comporteraient alors comme des gènes « acides ».

Nous avons donc dans un premier temps confirmé qu'il existait bien dans la base de données FGSG ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium\\_graminearum/](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_graminearum/)) du génome de *F. graminearum* une séquence sur le chromosome 4 référencée FGSG\_12970.3 codant une protéine potentielle désignée comme un facteur de transcription de réponse au pH, que nous appellerons FgPac1. Le gène *Pac1* est fortement exprimé en milieu neutre, son expression semblant décroître en milieu acide. De plus cette séquence présente une très forte similitude avec le facteur de transcription de réponse au pH d'*A. nidulans* et est donc l'orthologue vraisemblable de PacC.

Nous avons recherché dans les régions promotrices des gènes du cluster « *Tri* » impliqués dans la biosynthèse de trichothécènes la présence de boîtes 5'-GCCARG-3' correspondant à la séquence consensus décrite chez *A. nidulans* pour la fixation du facteur PacC (Tilburn et al., 1995). Plusieurs de ces boîtes ont été identifiées en amont des gènes du cluster *Tri* dans une région compatible avec un rôle possible de régulateur transcriptionnel du facteur potentiel FgPac1. En particulier une boîte a été observée dans la région en amont du gène *Tri 10* et deux autres dans la région intergénique *Tri4-Tri6*. Ces observations ouvrent la possibilité que l'expression des régulateurs transcriptionnels du cluster « *Tri* » et/ou que certains gènes *Tri* eux mêmes, soient sous la dépendance d'un contrôle négatif en milieu neutre ou basique par le facteur FgPac1. Ceci signifierait alors que l'acidification du milieu environnant le champignon pourrait être un facteur important dans l'induction de la biosynthèse de toxine. Des recherches pour explorer cette hypothèse sont en cours actuellement au laboratoire.

## Remerciements

Cette étude a été réalisée avec le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation.

## Références

- Arst, H.N., and M.A. Penalva. 2003. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends in Genetics*. 19:224-231.
- Bakan, B., C. Giraud-Delville, L. Pinson, D. Richard-Molard, E. Fournier, and Y. Brygoo. 2002. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:5472-5479.
- Bily, A. 2003. Rôle et importance des déhydrodimères d'acide férulique et autres phénylpropanoïdes dans les mécanismes de résistance de *Zea mays* L. à *Fusarium graminearum* Schwabe. Université de Pau et des Pays de l'Adour, France. 172 p.

- Bottalico, A., and G. Perrone. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 108:611-624.
- Boutigny, A. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. Thèse de doctorat en Biologie, Université de Bordeaux 1. 202 pages.
- Boutigny, A., F. Richard-Forget, and C. Barreau. 2008. Natural mechanisms for plant resistance to *Fusarium* mycotoxins accumulation. *Journal of European Plant Pathology*. 121:411-423.
- Flaherty, J., A. Pirttila, B. Bluhm, and C. Woloshuk. 2003. PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol*. 69:5222-5227.
- Keller, N.P., C. Nesbitt, B. Sarr, T.D. Phillips, and G.B. Burow. 1997. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology*. 87:643-648.
- Kimura, M., T. Tokai, K. O'Donnell, T.J. Ward, M. Fujimura, H. Hamamoto, T. Shibata, and I. Yamaguchi. 2003. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *Febs Letters*. 539:105-110.
- Kimura, M., T. Tokai, N. Takahashi-Ando, S. Ohsato, and M. Fujimura. 2007. Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71:2105-23.
- Miller, J., A. Taylor, and R. Greenhalgh. 1983. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Microbiol*. 29:1171 - 1178.
- O'Callaghan, J., P.C. Stapleton, and A.D.W. Dobson. 2006. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*. 43:213-221.
- Parry, D.W., P. Jenkinson, and L. McLeod. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*. 44:207-238.
- Peplow, A., A. Tag, G. Garifullina, and M. Beremand. 2003. Identification of new genes positively regulated by tri10 and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Appl Environ Microbiol*. 69:2731-6.
- Pestka. 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal risks. *Animal Feed Science and Technology*. 137:283-298.
- Pestka, J.J., and A.T. Smolinski. 2005. Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*. 8:39-69.
- Ponts, N., L. Pinson-Gadais, C. Barreau, F. Richard-Forget, and T. Ouellet. 2007. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *Febs Letters*. 581:443-447.

- Ponts, N., L. Pinson-Gadais, M.N. Verdal-Bonnin, C. Barreau, and F. Richard-Forget. 2006. Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*. 258:102-107.
- Proctor, R.H., T.M. Hohn, S.P. McCormick, and A.E. Desjardins. 1995. Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol*. 61:1923-30.
- Tag, A.G., G.F. Garifullina, A.W. Peplow, C. Ake, T.D. Phillips, T.M. Hohn, and M.N. Beremand. 2001. A novel regulatory gene, Tri10, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:5294-5302.
- Tilburn, J., S. Sarkar, D.A. Widdick, E.A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M.A. Penalva, and H.N. Arst 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.
- Vogel, H.J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*. 13:42-43.
- Waalwijk, C., P. Kastelein, I.d. Vries, Z. Kerényi, T.v.d. Lee, T. Hesselink, J. Kohl, and G. Kema. 2003. Major changes in *Fusarium spp.* in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*. 109:743-754.