TCTCCTGTTGTCTGCTTTCCAGTAGGAACAATCCAGCAAGCGTCTAGATTCCATGAGGAG
S P V V C F P V G T I Q Q A S R F H E E

Nachweis von Fumonisin-Biosynthesegenen in *Fusarium proliferatum*-Isolaten aus Spargel (*Asparagus officinalis* L.)

O. Martinez, I. Schadock, S. von Bargen, M. Goßmann, C. Büttner
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55 – 57, D- 14195 Berlin
phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Einleitung

Fusarium proliferatum (Abb.1) ist ein bodenbürtiger Pilz, der weltweit an Spargel als Mitverursacher der Wurzel- und Kronenfäule gilt (Abb.2). *F. proliferatum* zählt zu den potentiellen Mykotoxinbildnern und synthetisiert u.a. das Toxin Fumonisin B_1. 2001 konnte in Deutschland erstmals eine natürliche Kontamination von Spargelstangen nach der Stechperiode mit diesem als kanzerogen geltenden Mykotoxin festgestellt werden [1]. Im Jahr 2003/04 wurde eine natürliche Kontamination an Spargelstangen österreichischer Anbaugebiete während der Ernteperiode von Mai bis Juni nachgewiesen [2]. Aus diesen Erntestangen wurden *F. proliferatum*-Isolate gewonnen, welche mit Hilfe molekularer Fingerprint-Techniken auf genetische Heterogenität untersucht wurden. Genetisch unterschiedliche *F. proliferatum*-Isolate wurden dann mittels molekularbiologischer Methoden auf eine mögliche Fumonisin-Bildung untersucht.

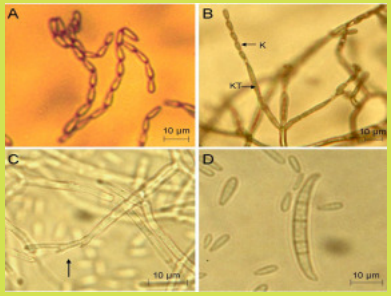

Abb.1: Morphologische Merkmale von *Fusarium proliferatum* auf SNA, lichtmikroskopische Aufnahme (400x)
A: Mikrokonidien in Ketten, **B:** Mikrokonidien in Ketten [K] an primären Konidienträger [KT], **C:** Polyphialide, **D:** Mikro- und Makrokonidien

Art der Inokulation mit *F. proliferatum*	Inokulum-Menge je Spargelpflanze	Spargelsorte	FB1-Gehalt [mg/kg TM]
Kontrolle	0	RAMOS	0,038
Weizenkorn	2g	RAVEL	1,2
Weizenkorn	5g	RAVEL	2,5
Sporensuspension	10^5 *	RAMOS	4,3
Sporensuspension	10^8 *	RAMOS	0,8

***Anzahl Mikrokonidien pro ml Sporensuspension**

Tab.1: Mittels HPLC ermittelte Fumonisin-B_1-Gehalte in den Wurzelextrakten von vier Versuchsvarianten *F. proliferatum*-infizierter Spargelpflanzen (50 dp) und einer unbehandelten Kontrolle
Sporensuspension: Inokulation durch Eintauchen der verletzten Wurzeln in Sporensuspension
Weizenkorn: Substratinokulation mittels infiziertem Weizenkornsubstrat, bezogen auf 500 ml Erdsubstrat

Abb.2: Symptome der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule
[1] durch *Fusarium proliferatum* infizierter Wurzel- und Kronenbereich einer 1-jährigen Spargelpflanze
[2] Stängelfäule verursacht durch *Fusarium* sp.
[3] *Fusarium* sp. infizierte Spargelstange

Methoden und Ergebnisse

Nach einer Nukleinsäure-Isolierung und cDNA-Synthese aus *Fusarium proliferatum*–Reinkulturen erfolgte mit Hilfe spezifischer Primer (Abb.3) eine PCR-Amplifizierung von *fum1*- und *fum8*-Genabschnitten. Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden sequenziert (Abb.4). In allen untersuchten *F. proliferatum*-Isolaten, die unterschiedlichen genetischen Gruppen zugeordnet worden waren, ließen sich diese initialen Gene des Fumonisin-Biosyntheseweges auf DNA-Ebene nachweisen (Tab.2). Ein Zusammenhang der Expression dieser essentiellen Enzyme der Fumonisin-Biosynthese und der Bildung von Fumonisin B_1 in infizierten Spargeljungpflanzen konnte für die *F. proliferatum*-Isolate 4 und 18 gezeigt werden. In diesem Pathogenitätstest waren die untersuchten *F. proliferatum*-Isolate zur Bildung von Fumonisin B_1 in z.T. hohen Konzentrationen bereits in Wurzeln von infizierten Spargeljungpflanzen fähig (Tab.1). Die Detektion der aktivierten *fum*-Gene könnte somit auf eine Kontamination des untersuchten Pflanzengewebes mit Fumonisin B_1 hinweisen.

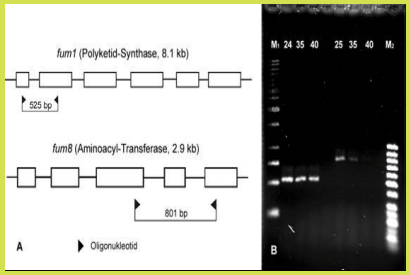

Abb.3: A Position der genspezifischen Oligonukleotide innerhalb der Gene *fum1* und *fum8* (nach Sequenzinformationen aus *F. verticillioides*, AF155773), **B** *Fum1*- (ca. 525 bp) und *fum8*-DNA-Fragment (800 bp) von jeweils drei *F. proliferatum*-Isolaten

M1 = Marker 1kb Ladder
M2 = Marker 50 bp Ladder

Isolat-Nr.	Fingerprint-Gruppe	Nachweis *fum1*		Nachweis *fum8*	
		DNA	RNA	DNA	RNA
4	C	x	x	x	x
6	A	x	x	x	*
11	M	x	x	x	*
17	I	x	x	x	*
18	A	x	x	x	x
23	J	x	x	x	*
42	C	x	x	x	*

*** nicht getestet**

Tab.2: Nachweis von *fum1* und *fum8* auf DNA- und RNA-Ebene in *Fusarium proliferatum*-Isolaten aus unterschiedlichen genetischen Fingerprint-Gruppen (RAPD-/DAF-PCR)

Abb.4: Nukleotidsequenz (oben) und Aminosäuresequenz (unten) der *fum8*-cDNA aus *F. proliferatum* (rotmarkierte Bereiche stellen die Sequnenzen der spezifischen Primer *fum8revers* und *fum8forward* dar)

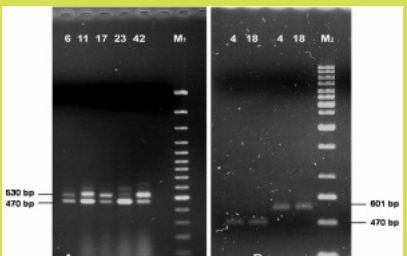

Abb.5: A PCR-Produkte von fünf *F. proliferatum*-Isolaten nach RT-PCR mit *fum1*-spezifischen Oligonukleotiden (DNA-Amplikon 530 bp, cDNA 470 bp), **B** *Fum1*- (470 bp) und *fum8*-cDNA-Fragmente (601 bp) der *F. proliferatum*-Isolate 4 und 18

M1 = Marker 50 bp Ladder
M2 = Marker 1kb Ladder

Ausblick

Ziele zukünftiger Untersuchungen sind die Sequenzierung weiterer Bereiche der *fum1*- und *fum8*-Gene, um ein spezifisches Verfahren auf PCR-Basis zum direkten Nachweis dieser essentiellen Gene der Fumonisin-Biosynthese *in vivo* an infizierten Spargelpflanzen zu etablieren. Dieses könnte helfen, Risken einer möglichen toxischen Kontamination mit Fumonisin B_1 im Ernteprodukt Spargel zu erkennen.

Literatur
[1] Seefelder, W.; Goßmann, M.; Humpf, H.-U.: Analysis of Fumonisin FB_1 in *Fusarium proliferatum* infected asparagus spears and garlic tubers from germany by liquid chromatography /electrospray ionization-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 2778 - 2781.
[2] Beran, F.; Goßmann, M.; Plenk, A.; Öhlinger, R.; Humpf, H.-U.; Büttner, C.: Nachweis von *Fusarium*-Arten und Fumonisin B_1 in Erntestangen von Spargel aus österreichischen Ertragsanlagen. 5. Symposium Phytomedizin und Pflanzenschutz, 19.-22.09.05 in Wien, Tagungsband S.37.

TCTCCTGTTGTCTGCTTTCCAGTAGGAACAATCCAGCAAGCGTCTAGATTCCATGAGGAG
S P V V C F P V G T I Q Q A S R F H E E