

Nachweis von Fum1/Fum8-Genen in phytopathogenen *Fusarium*-Arten unterschiedlicher Wirtspflanzenherkünfte und Differenzierung durch PCR-RFLP



Anne-Mareen Eisold, Ines Schadock, Susanne von Bargen, Monika Goßmann, Carmen Büttner
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin
Phytomedizin@agr.ar.hu-berlin.de

1. Einführung

Die Gattung *Fusarium* umfasst Arten, die wirtschaftlich bedeutsame Krankheitserreger an Kulturpflanzen sind, zudem aber auch noch als potentielle Mykotoxinbildner, v. a. des als kanzerogen eingestuftes Toxins Fumonisin B₁, gelten. Von den pathogenrelevanten *Fusarium*-Arten *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* (Abb. 1), *F. redolens* und *F. subglutinans* wurden Isolate verwendet, die aus ober- und unterirdischen Pflanzenteilen von Spargel, Mais, Raps, Lupine, Miscanthus, Kartoffel, Erbse, Sorghum und Rübe gewonnen wurden. Ziel der Arbeit war der Nachweis essentieller Gene des Fumonisin-Stoffwechsels mit Hilfe der PCR und somit die Bewertung der getesteten Pilz-Isolate als potentielle Fumonisin-Bildner. Weiterhin sollten die amplifizierten Genfragmente auf genetische Heterogenität durch eine anschließende RFLP-Analyse analysiert werden. Untersucht wurden die beiden initialen Gene der Fumonisin-Biosynthese, eine Polyketid-Synthase (*fum1*) und eine Aminoacyl-Transferase (*fum8*).



Abb. 1: Makrokonidien von *Fusarium oxysporum*

2. Nachweis des *fum1*- und *fum8*-Gens in *Fusarium* spp.

Aus Reinkulturen wurde von 44 verschiedenen *Fusarium*-Isolaten DNA isoliert. Mit Hilfe der PCR wurde von *fum1* bzw. *fum8* jeweils ein spezifischer Genabschnitt (525 bp bzw. 801 bp groß) amplifiziert (Abb. 2). Hierbei wurden *F. proliferatum* sequenzbasierte Primer für alle untersuchten *Fusarium*-Arten eingesetzt.

Beide Gene waren in allen untersuchten *F. proliferatum* Isolaten detektierbar (Tab. 1). Unter Standard-PCR-Bedingungen war der *fum1*- und *fum8*-Nachweis für *F. proliferatum* spezifisch. Durch Modifikation der PCR-Bedingungen (Absenken der Annealing-Temperatur um 2°C, Verdoppelung der Primer-Konzentration [1 µM final] bzw. Erhöhung der DNA-Menge [bis 2,4-fach]) konnten sowohl *fum1*- als auch *fum8*-Fragmente aus DNA-Präparationen von *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. subglutinans* und *F. verticillioides* amplifiziert werden, wobei neben den spezifischen PCR-Produkten noch zusätzliche Fragmente generiert wurden (Abb. 3).

Das *fum1*-Gen war in insgesamt 30 Isolaten, das *fum8*-Gen in 27 Isolaten nachweisbar (Tab. 1). In Pilz-Isolaten, die aus allen neun unterschiedlichen Wirtspflanzen-Species isoliert wurden, waren die initialen Gene der Fumonisin-Biosynthese detektierbar.

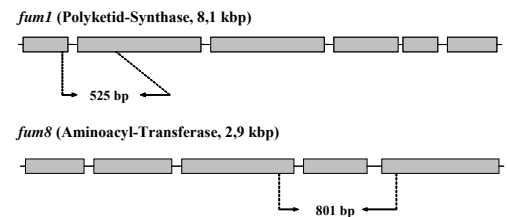


Abb. 2: Genomorganisation von *fum1* und *fum8* und Lage der durch PCR amplifizierten Fragmente.

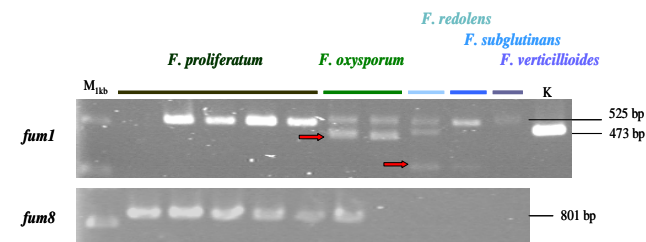


Abb. 3: PCR von *fum1* (525 bp) und *fum8* (801 bp) aus Isolaten verschiedener *Fusarium*-Arten. Die Amplifikation von *fum1* erfolgte bei *F. proliferatum* ohne zusätzliche Fragmentbildung wie bei *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. subglutinans* und *F. verticillioides* (rote Pfeile). *fum8* konnte aus *F. proliferatum*-Isolaten und wenigen Proben der anderen *Fusarium*-Arten (wie *F. oxysporum*) erfolgreich amplifiziert werden. K = Kontrolle mit 473 bp (cDNA-Fragment von *fum1*)
M1kb = Marker 1kb Ladder

Fusarium-Art	Wirtspflanze	untersuchte Isolate [n]	Nachweis Fumonisin-Biosynthese Gen [n]	
			Fum1	Fum8
<i>F. proliferatum</i>	Spargel	16	16	16
	Mais	2	2	2
	Σ	18	18	18
<i>F. oxysporum</i>	Spargel	4	0	0
	Raps	2	1	1
	Lupine	1	1	0
	Miscanthus	1	1	1
Σ	8	3	2	
<i>F. redolens</i>	Spargel	2	1	0
	Kartoffel	3	1	1
	Erbse	2	1	1
Σ	7	3	2	
<i>F. subglutinans</i>	Spargel	1	1	1
	Sorghum	1	0	0
	Rübe	1	1	0
	Mais	2	1	1
	Miscanthus	1	1	1
Σ	6	4	3	
<i>F. verticillioides</i>	Sorghum	3	2	0
	Mais	2	1	2
Σ	5	3	2	
Gesamtsumme		44	30	27

Tab. 1: Nachweis von *fum1* bzw. *fum8* in Isolaten unterschiedlicher *Fusarium*-Species aus verschiedenen Wirtspflanzen. In 26 von 44 untersuchten Proben war sowohl *fum1* als auch *fum8* nachweisbar.

3. Ergebnisse der Restriktionsanalyse

Spezifisch amplifizierte *fum1*- und *fum8*-PCR-Produkte der *Fusarium proliferatum*-Isolate wurden mit den Restriktionsendonucleasen AluI, RsaI, Bsp143I und BamHI analysiert, die nach Datenbank-Analyse in verschiedenen *Fusarium*-Arten unterschiedliche Schnittstellen in den amplifizierten *fum1*- und *fum8*-Genabschnitten aufweisen.

Das 525 bp lange *fum1*-Genfragment zeigte in 13 von 14 untersuchten Isolaten ein einheitliches Bandenmuster (Abb. 4). Ein aus Mais stammendes Isolat wies lediglich eine AluI-Schnittstelle auf im Gegensatz zu allen anderen *F. proliferatum* Proben, die zweimal geschnitten wurden (Abb. 4, roter Pfeil).

Alle neun untersuchten 801 bp langen *fum8*-Fragmente von *F. proliferatum*-Isolaten aus Spargel wiesen keine durch die verwendeten Restriktionsenzyme detektierbare genetische Heterogenität auf (Abb. 5).

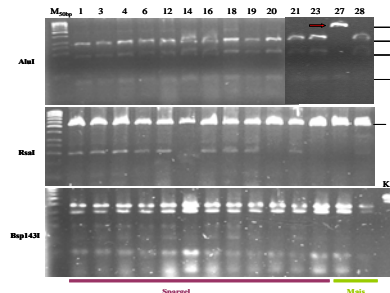


Abb. 4: RFLP-Analyse des *fum1* PCR-Fragmentes (525 bp) mit AluI, RsaI und Bsp143I. Untersucht wurden 14 *F. proliferatum*-Isolate (1, 3, 4, 6, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 27, 28). AluI-Restriktion: Ein aus Mais gewonnenes Isolat zeigte eine Bande mit 450 bp (roter Pfeil), während die restlichen Isolate je zwei Fragmente mit 277 bp und 173 bp aufwiesen.
M50bp = Marker 50 bp Ladder (Banden von oben nach unten: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp, Fermentas)

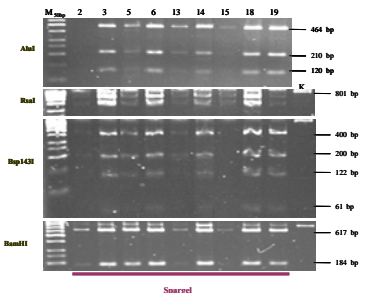


Abb. 5: RFLP-Analyse des *fum8* PCR-Fragmentes (801 bp) mit AluI, RsaI, Bsp143I und BamHI. Untersucht wurden neun *F. proliferatum* Isolate (2, 3, 5, 6, 13, 14, 15, 18, 19).
M50bp = Marker 50 bp Ladder (Banden von oben nach unten: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp, Fermentas)

4. Fazit

Der Nachweis der *fum*-Gene gelang in Isolaten aller untersuchten *Fusarium*-Arten. Die Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein, wo alle untersuchten *Fusarium*-Arten als potentielle Fumonisin-Bildner beschrieben sind. Innerhalb der Species *F. proliferatum* und *F. verticillioides*, sind offenbar fast alle Wild-Isolate zur Fumonisin-Bildung fähig (Rheeder et al., 2002, Proctor et al. 2002), während in den anderen untersuchten Arten lediglich einzelne Isolate diese Eigenschaften aufweisen (Desjardins 2003, 2006). In mehr als 50 % der untersuchten Isolate waren sowohl *fum1* als auch *fum8* nachweisbar. Damit gehören diese *Fusarium*-Isolate alle in den Kreis der potentiellen Fumonisin-Bildner.

Eine genetische Heterogenität des *fum8* Fragmentes konnte nicht nachgewiesen werden. Die genetische Heterogenität des *fum1*-Fragmentes konnte in einem Fall gezeigt werden. Ob eine Variabilität innerhalb der initialen *fum*-Gene von *F. proliferatum*-Isolaten vorliegt, könnte beispielsweise durch Sequenzierung ermittelt werden.

Literatur:

- Desjardins (2006) *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology, APS Press, Minnesota, USA
Desjardins AE (2003) *Giberella* from *Avenaceae* to *Zea*. Ann. Rev. Phytopathol. 41: 177-198
Proctor RH, Desjardins AE, McCormick SP, Plattner RD, Alexander NJ, Brown DW (2002) Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin analogs in the virulence of *Fusarium*. Europ. J. Plant Pathol. 108, 691-698
Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF (2002) Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2101-2105