

Nachweis von Fumonisin-Genen in Isolaten unterschiedlicher *Fusarium*-Arten



Susanne VON BARGEN, Anne-Mareen EISOLD, Oliver MARTINEZ, Monika GOßMANN, Carmen BÜTTNER

Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin
Phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

1. Einführung

Die Gattung *Fusarium* umfasst Arten, die wirtschaftlich bedeutsame Krankheitserreger an Kulturpflanzen sind und als potentielle Mykotoxinbildner insbesondere auch das kanzerogene Fumonisin B₁ bilden. Von den pathogenrelevanten *Fusarium*-Arten *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* (Abb. 1), *F. redolens* und *F. subglutinans* wurden Isolate verwendet, die aus Spargel, Mais, Raps, Lupine, Miscanthus, Kartoffel, Erbse, Sorghum und Rübe gewonnen wurden. Untersucht wurden die beiden initialen Gene der Fumonisin-Biosynthese, eine Polyketid-Synthase (*FUM1*) und eine Aminoacyl-Transferase (*FUM8*). **Durch PCR wurden diese essentiellen Gene des Fumonisin-Stoffwechsels detektiert und somit das Risikopotential der Isolate als Fumonisin-Bildner untersucht.** Zudem wurden die amplifizierten Fragmente auf genetische Heterogenität durch eine RFLP analysiert.



Abb. 1: Makrokonidien von *Fusarium oxysporum*

2. Nachweis des *FUM1*- und *FUM8*-Gens in *Fusarium* spp.

DNA wurde aus 44 verschiedenen *Fusarium*-Isolaten isoliert. Mit Hilfe *F. proliferatum* spezifischer Primer wurde von *FUM1* bzw. *FUM8* jeweils ein Genabschnitt (525 bp bzw. 801 bp groß) durch PCR amplifiziert (Abb. 2).

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 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.

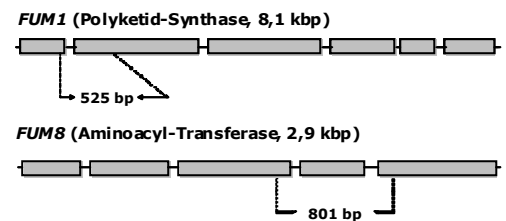


Abb. 2: Genomorganisation von *FUM1* und *FUM8* und Lage der durch PCR amplifizierten Fragmente.

Fusarium-Art	Wirtspflanze	untersuchte Isolate [n]	Nachweis Fumonisin-Biosynthese-Gen [n]	
			<i>FUM1</i>	<i>FUM8</i>
<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	1
	Mais	2	1	1
	Miscanthus	1	1	1
Σ	6	4	3	
<i>F. verticillioides</i>	Sorghum	3	1	0
	Mais	2	1	2
Σ	5	2	2	

Tab. 1: Nachweis von *Fum1* bzw. *Fum8* in Isolaten unterschiedlicher *Fusarium*-Species aus verschiedenen Wirtspflanzen.

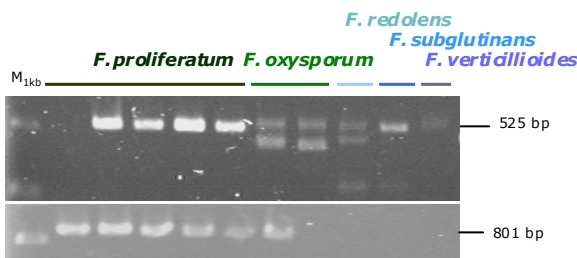


Abb. 3: PCR von *Fum1* (525 bp) und *Fum8* (801 bp) aus Isolaten verschiedener *Fusarium*-Arten. M_{1kb} = Marker 1kb Ladder

3. Genetische Heterogenität

Spezifische *FUM1*- und *FUM8*-PCR-Produkte von *F. proliferatum* wurden mit den Restriktionsendonukleasen *AluI*, *RsaI*, *Bsp143I* und *BamHI* analysiert, die nach Datenbank-Analyse in verschiedenen *Fusarium*-Arten unterschiedliche Schnittstellen in diesen 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, Pfeil).

Alle 9 untersuchten 801 bp langen *FUM8*-Fragmente von *F. proliferatum*-Isolaten aus Spargel wiesen keine durch die verwendeten Restriktionsenzyme detektierbare genetische Heterogenität auf (Abb. 5).

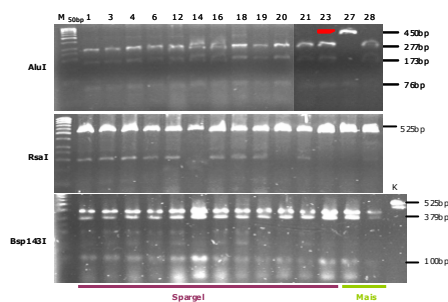


Abb. 4: RFLP-Analyse des *FUM1* PCR-Fragmentes (525 bp) mit *AluI*, *RsaI* und *Bsp143I*. Untersucht wurden 14 *F. proliferatum*-Isolate. *AluI*-Restriktion: Ein aus Mais gewonnenes Isolat (27) zeigte eine Bande mit 450 bp (Pfeil), während die restlichen Isolate je zwei Fragmente mit 277 bp und 173 bp aufwiesen. M_{50bp} = Marker 50 bp Ladder, Fermentas

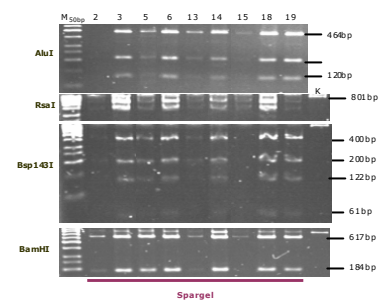


Abb. 5: RFLP-Analyse des *FUM8* PCR-Fragmentes (801 bp) mit *AluI*, *RsaI*, *Bsp143I* und *BamHI*. Untersucht wurden 9 *F. proliferatum* Isolate. M_{50bp} = Marker 50 bp Ladder, Fermentas

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 Isolate zur Fumonisin-Bildung fähig sind (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.

Literatur:

- Desjardins AE (2006) *Fusarium Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology*. APS Press, Minnesota, USA
Desjardins AE (2003) Gibberella from A(venaceae) to Z(eae). 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 mycotoxins 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