

Genetische Differenzierung von *Fusarium* spp. an Spargel (*Asparagus officinalis*) und anderen Wirtspflanzen

Genetic differentiation of Fusarium spp. infecting asparagus (Asparagus officinalis) and other host plants

Susanne von Bargaen, Ines Schadock, O. Martinez, Anne-Mareen Eisold, Monika Goßmann, Carmen Büttner

Zusammenfassung

Die *Fingerprint*-Analyse von fünfundvierzig *Fusarium proliferatum* Reinkulturen aus Spargelstangen österreichischer Herkunft zeigte eine Heterogenität innerhalb des Genoms dieser Isolate, die sich in vierzehn genetische Gruppen differenzieren ließen. Eine Korrelation zwischen *Fingerprint*-Gruppierung und geographischer Herkunft bzw. Spargelsorte bestand nicht. Essentielle Gene der Fumonisin-Biosynthese (*fum1* und *fum8*) waren in allen untersuchten *F. proliferatum* Isolaten nachweisbar sowie in einzelnen Isolaten von *F. oxysporum*, *F. redolens* und *F. subglutinans* aus Spargel sowie aus weiteren Wirtspflanzen wie Mais, Kartoffel, Miscanthus, Raps und anderen stammten. Diese Isolate gelten somit als potentielle Fumonisin-Bildner. DNA-Polymorphismen innerhalb der amplifizierten *fum1*- bzw. *fum8*-Fragmente von *F. proliferatum* Isolaten aus Spargel konnten durch RFLP-Analyse jedoch nicht gezeigt werden.

Schlüsselwörter

Fumonisin-Bildner, DNA-Polymorphismus, Polyketidsynthase, Aminoacyl-Transferase

Summary

Fingerprint analysis of 45 cultured *Fusarium proliferatum* isolated from asparagus spears in Austria revealed genetic diversity of genomes within this species. Isolates were differentiated into fourteen genetic clusters, but a correlation between geographic origin or asparagus cultivar was not detectable. In all investigated *F. proliferatum* isolates originating from asparagus or corn, essential genes of the fumonisin-biosynthesis cluster were detectable. Furthermore, several isolates identified as *F. oxysporum*, *F. redolens* and *F. subglutinans*, which were also isolated from potato plants, Miscanthus, rape and other plants, are also putative fumonisin-producers, due to the presence of *fum1* and *fum8* respectively. However, DNA-polymorphisms within the amplified *fum*-fragments from *F. proliferatum* originating from asparagus plants were not detected by RFLP.

Keywords

Fumonisin-producer, DNA-polymorphism, Polyketide-synthase, Aminacyl-transferase

Einführung

Fusarium oxysporum Schlecht., *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg sowie *F. redolens* Wollenw., sind Hauptverursacher der Wurzel-, Stängel-, und Kronenfäule des Spargels (*Asparagus officinalis* L.), die als potentielle Fumonisin-Bildner gelten. Untersuchungen zum Vorkommen von Fumonisin-Biosynthese-Genen und Bildungspotential von Fumonisin in verschiedenen Isolaten von *F. subglutinans* (Wollenw. & Reink.) Nelson et al. ergaben widersprüchliche Ergebnisse (in Desjardins 2006). Insofern ist es von Interesse, auch die Bedeutung dieser Art bei der Fumonisin-Bildung an Spargel zu untersuchen. *F. proliferatum* zählt neben *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, der im Spargelanbau jedoch keine Rolle spielt, zu den bedeutendsten Fumonisin-Produzenten, da er nicht nur hohe Mengen dieser Mykotoxine bildet (Rheeder et al. 2002), sondern eine weite geographische Verbreitung besitzt (Leslie et al. 1992), in zunehmendem Maße in mitteleuropäischen Anbaugebieten von Spargel auftritt (Wong and Jeffries, 2006, Weber et al. 2006, Gossmann et al. 2001) und auch häufig aus latent infizierten Spargelrhizomen isoliert werden kann (Xu et al. 2006). Die Menge der produzierten Fumonisine ist jedoch innerhalb der *F. proliferatum* Isolate unterschiedlich und kann sowohl von geographischer Herkunft, Wirtspflanze bzw. Umweltbedingungen (Leslie et al. 1992, Moretti et al. 1997) als auch von der genetischen Variabilität der Fum-Gene abhängig sein.

Zur Ermittlung der genetischen Grundlagen wurden fünfundvierzig *F. proliferatum* Isolate mittels RAPD- und DAF-PCR (random amplification of polymorphic DNA- bzw. DNA amplification fingerprinting-polymerase-chain-reaction) auf DNA-Polymorphismen untersucht. Die Isolate stammten aus Spargelstangen unterschiedlicher Sorten, die in mehrjährigen Ertragsanlagen an fünf unterschiedlichen Standorten in Österreich kultiviert wurden (vergleiche Goßmann et al. in dieser Ausgabe). Weiterhin wurden die initialen Gene der Fumonisin-Biosynthese (*fum1* = Polyketid-Synthase und *fum8* = Aminoacyl-Transferase) in Isolaten unterschiedlicher an Spargel relevanter *Fusarium*-Arten (*F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. subglutinans*) mittels Gen-spezifischer PCR nachgewiesen und mit Referenz-Amplikons aus *F. verticillioides* verglichen. Von Waalwijk et al. (2004) bzw. Proctor et al. (2003) ist bekannt, dass Fum1 (2607 aa) bzw. Fum8 (839 aa) von *F. verticillioides* und *F. proliferatum* eine vergleichsweise geringe Identität von 85% bzw. 77% auf Protein-Ebene aufweisen. Die genetische Heterogenität der amplifizierten Genabschnitte wurde mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (PCR-RFLP) untersucht.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Aus Reinkulturen von fünfundvierzig *F. proliferatum* Isolaten wurde Gesamt-DNA isoliert. Durch RAPD-PCR mit zwei unterschiedlichen Primern (Q1, Q6 Firma Roth) sowie durch DAF-PCR mit drei verschiedenen Primer-Kombinationen (Q11+Q20, Q2+Q6, Q2+Q20, Firma Roth) ließen sich insgesamt vierzehn genetische Gruppen differenzieren. Eine Korrelation zwischen *Fingerprint*-Gruppierung und geographischer Herkunft bzw. Spargelsorte bestand jedoch nicht. Die Mehrheit

der Isolate war drei Hauptgruppen zuzuordnen (Gruppe A n=10; B n=8; C n=8), so dass eine Prävalenz von Genotypen innerhalb der *F. proliferatum* Isolate, die Spargelpflanzen infizieren, zu vermuten ist.

Zehn ausgewählte *F. proliferatum* Isolate aus unterschiedlichen *Fingerprint*-Gruppen wurden ebenso wie 41 weitere Isolate unterschiedlicher *Fusarium*-Arten, die aus verschiedenen Wirtspflanzen isoliert worden waren, auf Nachweisbarkeit essentieller Gene des Fumonisin-Stoffwechsels (*fum1* bzw. *fum8*) untersucht.

Tabelle 1: Nachweis essentieller Fumonisin-Biosynthesegene (*fum1*, Polyketidsynthase und *fum8*, Aminoacyl-Transferase) in Isolaten unterschiedlicher *Fusarium*-Arten aus Spargel und anderen Wirtspflanzen

Fusarium-Art	Wirtspflanze	untersuchte Isolate [n]	Nachweis Fumonisin- Biosynthese Gen [n]	
			fum1	fum8
<i>F. proliferatum</i>	Spargel	23	23	23
	Mais	2	2	2
	Σ	25	25	25
<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
	Kartoffeln	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	1	0
	Mais	2	1	2
	Σ	5	2	2
Gesamtsumme		51	37	34

Mit spezifischen Primern (*fum1*for 5' GAGCAATATAGGCTGTTACG , *fum1*rev 5' TCCATCCGAATTTGAAGATGT; *fum8*for 5' TCTCCTGTTGTCTGCTTTCCA, *fum8*rev 5' GTAGTGAGAGCATCATAGTATG) wurden Gen-Fragmente (*fum1* = 525 bp; *fum8* = 801 bp) aus Gesamt-DNA Präparationen durch PCR amplifiziert. Der Nachweis der *fum*-Gene gelang in Isolaten aller untersuchten *Fusarium*-Arten (siehe Tabelle 1).

Gene, die in die Biosynthese von Mykotoxinen involviert sind, gelten als Basis für einen genauen, empfindlichen und spezifischen Nachweis von Stämmen mit Mykotoxin-Bildungspotential (Konietzny & Greiner, 2003). In mehr als 50 % der untersuchten Isolate war sowohl *fum1* als auch *fum8* nachweisbar. In Übereinstimmung mit Literatur-Befunden sind innerhalb der Species *F. proliferatum* offenbar alle Isolate zur Fumonisin-Bildung fähig (Rheeder et al. 2002, Proctor et al. 2002). In den anderen untersuchten Arten, darunter auch *F. subglutinans*, weisen dagegen lediglich einzelne Isolate diese Eigenschaft auf (Desjardins 2003, 2006). Damit gehören diese *Fusarium*-Isolate alle zu den potentiellen Fumonisin-Bildnern.

Ob eine genetische Variabilität auch innerhalb dieser essentiellen Fumonisin-Biosynthesegene vorliegt, wurde durch PCR-RFLP untersucht. Es wurden Restriktionsenzyme verwendet, die unterschiedliche Bandenmuster von Referenzsequenzen der Datenbanken erzeugten (*fum1*: *F. verticillioides* Acc. AY495601, *F. proliferatum* Acc. AY577458, *F. oxysporum* Acc. AY577457; *fum8*: *F. verticillioides* Acc. AF155773, *F. proliferatum* Acc. AY577451, *F. oxysporum* Acc. AY577450). Die Restriktionsanalyse von Isolaten unterschiedlicher *Fusarium* spp. ergab erwartungsgemäß verschiedene Bandenmuster, jedoch waren diese nicht artspezifisch.

Die Restriktion des *fum1*-Fragmentes von vierzehn *F. proliferatum* Isolaten aus Spargel und Mais mit Bsp143I, und RsaI generierte einheitliche Restriktionsmuster, durch den Verdau mit AluI wurde ein Mais-Isolat als genetisch heterogen identifiziert. Durch Behandlung der *fum8* PCR-Fragmente von neun *F. proliferatum* Isolaten aus Spargel mit AluI, Bsp143I, BamHI bzw. RsaI konnte keine genetische Variabilität detektiert werden, so dass eventuell vorhandene Polymorphismen der *Fum*-Gene innerhalb dieser *Fusarium*-Art nachfolgend durch Sequenzierung untersucht werden sollen.

Literatur

Desjardins AE (2003) *Giberella* from *A(venaceae)* to *Z(eae)*. Ann. Rev. Phytopathol. **41**, 177-198

Desjardins (2006) *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology. APS Press, Minnesota, USA

Gossmann M, Büttner C, Bedlan G (2001) Untersuchungen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.) aus Jung- und Ertragsanlagen in Deutschland und Österreich auf Infektion mit *Fusarium*-Arten. Pflanzenschutzberichte **59**, 45-54

Konietzny U, Greiner R (2003) The Application Of PCR In The Detection Of Mycotoxigenic Fungi In Foods. Brazilian Journal of Microbiology **34**, 283-300

Leslie JF, Plattner RD, Desjardins AE, Klittich CJR (1992) Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). Phytopathology **82**, 341-345

Moretti A, Logrieco A, Doko B, Frisullo S, Visconti A, Bottalico A (19997) *Fusarium proliferatum* from asparagus in Italy: Occurrence, fertility and toxigenicity. Cereal Research Communications **25**, 785-786

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

Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins A (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. Fungal Genetics and Biology **38**, 237-249

Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF (2002) Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. Appl. Environ. Microbiol. **68**, 2101-2105

Waalwijk C, van der Lee T, de Vries I, Hesselink T, Arts J, Kema GHJ (2004) Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. Europ. J Plant Pathol. **110**, 533-544

Weber Z., Kostecki M, von Barga S, Gossmann M, Waskiewicz A, Knaflewski M, Büttner C, Golinski P (2006): *Fusarium* Species Colonizing Spears and Forming Mykotoxins in Field Samples of Asparagus from Germany and Poland. Journal of Phytopathology **154**, 209-216

Wong JY, Jeffries P (2006) Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. Plant Pathology **55**, 331-342

Xu W, Gossmann M, He XF, Liu XL, Kofoet A. (2006) Systemic infection of asparagus crowns by *Fusarium* spp. in symptomless plants in China. Australasian Plant Pathology *submitted*

Autoren

Dr. Susanne VON BARGEN*, Ines SCHADOCK, Oliver MARTINEZ, Anne-Mareen EISOLD, Dr. Monika GOßMANN, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER. Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin

* korrespondierender Autor: susanne.von.bargen@agrar.hu-berlin.de