

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

Detection of fumonisin genes in strains of different Fusarium species

SUSANNE VON BARGEN, ANNE-MAREEN EISOLD, OLIVER MARTINEZ, MONIKA GOßMANN, CARMEN BÜTTNER

Einleitung

Neben ihren wirtschaftlich bedeutenden phytopathogenen Eigenschaften sind zahlreiche Arten der Gattung *Fusarium* als potentielle Toxinkontaminanten an Kulturpflanzen bekannt. Eine wichtige Rolle wird in diesem Zusammenhang insbesondere dem als kanzerogen eingestuftem Fumonisin B₁ zugesprochen. Vorliegende Untersuchungen stützen sich auf die als potentielle Fumonisinproduzenten und Pflanzenpathogene beschriebenen *Fusarium*-Arten *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. redolens* und *F. subglutinans*. Die Isolate wurden in vorgelagerten Wirtspflanzenuntersuchungen isoliert und stammen aus ober- und unterirdischen Pflanzenteilen von Erbse, Kartoffel, Lupine, Mais, Miscanthus, Raps, Rübe, Sorghum und Spargel. Gegenstand von molekularbiologischen Untersuchungen waren die initialen Gene der Fumonisin-Biosynthese *FUM1* (Polyketid-Synthase) und *FUM8* (Aminoacyl-Transferase). Ziel der Untersuchungen war es, diese essentiellen Gene der Fumonisin-Biosynthese artübergreifend nachzuweisen und somit Rückschlüsse ein potentielles Risikopotential der Isolate als Fumonisin-Bildner zu evaluieren.

Material und Methoden

Die Pilzisolat wurden aus Erdkulturen der Stammsammlung auf künstlichem Nährsubstrat reaktiviert. Nach DNA-Isolierung aus Reinkulturen wurden Isolate der aufgeführten *Fusarium* spp. mit Hilfe einer PCR auf die Nachweisbarkeit der *FUM1*- und *FUM8*-Gene untersucht. Verwendet wurden Oligonukleotidsequenzen, die auf Grundlage veröffentlichter Sequenzen von *F. proliferatum* abgeleitet worden waren. Durch eine 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 auch entsprechende *FUM*-Genfragmente anderer *Fusarium*-Arten amplifiziert werden. *FUM*-Gen-spezifische Amplifikate wurden im Anschluss mit den Restriktionsendonukleasen AluI, BamHI, Bsp143I und RsaI auf Sequenzheterogenität geprüft.

Ergebnisse und Diskussion

Das *FUM1*-Gen war in insgesamt 30 Isolaten, das *FUM8*-Gen in 27 Isolaten nachweisbar. Insgesamt waren die initialen Gene der Fumonisin-Biosynthese in *Fusarium* spp.-Isolaten aus allen neun unterschiedlichen Wirtspflanzen-Species detektierbar. In sechzehn *F. proliferatum*-Isolaten aus Spargel und zwei Pilzproben aus Mais war sowohl *FUM1* als auch *FUM8* nachweisbar. Ebenso konnten beide Gene in je einem Isolat von *F. oxysporum* aus Miscanthus, *F. redolens* aus Erbse, *F. subglutinans* aus Miscanthus und *F. verticillioides* aus Mais amplifiziert werden. Darüber hinaus war im Rahmen der gewählten PCR-Bedingungen entweder das Polyketid-Synthase- oder das Aminoacyl-Transferase-Gen in *F. oxysporum*-Proben (aus Raps und Lupine) nachweisbar sowie in anderen Isolaten der vorher genannten *Fusarium*-Arten, die aus weiteren Wirtspflanzen wie beispielsweise Kartoffel, Rübe und Sorghum stammten. Der Nachweis von *FUM1* bzw. *FUM8* in den untersuchten *Fusarium* spp.-Isolaten weist diese als potentielle Fumonisinbildner aus. Die Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein, die alle untersuchten *Fusarium*-Arten als potentielle Fumonisin-Bildner beschreiben. Innerhalb der Species *F. proliferatum* und *F. verticillioides* sind offenbar fast alle Isolate zur Fumonisin-Bildung fähig (Proctor et al. 2002, Rheeder et al. 2002), während in den anderen untersuchten Arten lediglich einzelne Isolate diese Eigenschaften aufweisen (Desjardins 2003, 2006). Die Analyse der *FUM1* und *FUM8*-Genfragmente von *F. proliferatum*-Isolaten aus unterschiedlichen Wirtspflanzen mittels Restriktionsverdau lies keine wirtspflanzenabhängige Heterogenität der untersuchten Abschnitte der Fumonisin-Biosynthesegene erkennen. Lediglich ein *F. proliferatum*

Isolat aus Mais zeigte ein verändertes Restriktionsmuster des *FUM1*-Fragmentes durch eine fehlende RsaI-Schnittstelle in Exon 2.

Zusammenfassung

Durch PCR wurden zwei essentielle Gene der Fumonisin-Biosynthese (*FUM1* bzw. *FUM8*) detektiert und somit das Risikopotential verschiedener *Fusarium* spp.-Isolate als Fumonisin-Bildner determiniert. *Fusarium proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. redolens* und *F. subglutinans* wurden aufgrund ihrer wirtschaftlich bedeutenden Eigenschaften als Pflanzenpathogene an verschiedenen Kulturpflanzen untersucht. Die Isolate wurden in vorgelagerten Wirtspflanzenuntersuchungen isoliert und stammen aus ober- und unterirdischen Pflanzenteilen von Erbse, Kartoffel, Lupine, Mais, Miscanthus, Raps, Rübe, Sorghum und Spargel. Der Nachweis der *FUM*-Gene gelang in Isolaten aller untersuchten *Fusarium*-Arten und Wirtspflanzenherkünfte. In mehr als 50% der untersuchten Isolate, darunter alle untersuchten *F. proliferatum* Isolate, waren sowohl *FUM1* als auch *FUM8* nachweisbar. Damit gehören diese *Fusarium*-Isolate alle zu den potentiellen Fumonisin-Bildnern. Eine genetische Heterogenität des *FUM8*-Fragmentes konnte durch RFLP-Analyse nicht nachgewiesen werden. Die genetische Heterogenität des *FUM1*-Fragmentes war in einem *F. proliferatum* Isolat aus Mais feststellbar.

Summary

The presence of two essential genes required for fumonisin biosynthesis (*FUM1* and *FUM8* respectively) was probed by PCR in order to evaluate the fumonisin producing capability of several strains belonging to the genus *Fusarium*. Fungal isolates of the species *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. redolens* and *F. subglutinans* with phytopathogenic potential were isolated from different organs of asparagus, beet, canola, lupine, maize, Miscanthus, pea, potato and Sorghum plants. The presence of *FUM* genes could be demonstrated in strains of all *Fusarium* spp. under investigation. In more than 50% of isolates comprising all *F. proliferatum* strains *FUM1* as well as *FUM8* was detectable substantiating the potential of these fungi to produce fumonisins. Genetic heterogeneity of the amplified *FUM8* gene fragments was not observed by RFLP analysis, while sequence diversity of the *FUM1* fragment was detected in a single *F. proliferatum* obtained from maize.

Literatur

- DESJARDINS, A.E. (2003). Gibberella from A(venaceae) to Z(eae). Annual Review of Phytopathology 41: 177-198
- DESJARDINS, A.E. (2006). Fusarium Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology. APS Press, Minnesota, USA
- PROCTOR, R.H., DESJARDINS, A.E., MCCORMICK, S.P., PLATTNER, R.D., ALEXANDER, N.J. and BROWN, D.W. (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of Fusarium. European Journal of Plant Pathology 108: 691-698
- RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., and VISMER, H.F. (2002). Production of Fumonisin Analogs by Fusarium Species. Applied and Environmental Microbiology 68: 2101-2105

Autoren

Dr. Susanne VON BARGEN, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin; E-mail: susanne.von.bargen@agr.ar.hu-berlin.de

Anne-Mareen EISOLD, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin

Dipl.- Ing. (Univ.) agr. Oliver MARTINEZ, Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Obstbau, Von Lade Str. 1, 65366 Geisenheim

Dr. Monika GOBMANN, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften,
Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin
Prof. Dr. Carmen BÜTTNER, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften,
Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin