

Detektion unterschiedlicher Fusarium Spezies der Sektionen Discolor and Sporotrichiella mittels DGGE (Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese) und ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System)

R.L. MACH, C.M. KULLNIG, A. FARNLEITNER, G. REISCHER, A. ADLER und C.P. KUBICEK

Fusarien als Schadpilze

Fusarien zählen zu den wichtigsten pflanzenpathogenen Pilzen weltweit und verursachen jährlich nicht unbeträchtliche Ernteeinbußen bei Kulturpflanzen wie z.B. Getreide, Mais, Reis, Zuckerrohr, Hirse, Baumwolle, Datteln, Leguminosen und Kartoffeln.

In Österreich liegt die Hauptschadwirkung bei Mais und verschiedenen Getreidesorten aber auch Leguminosen, Kartoffel und einige Zierpflanzen sind oft massiv betroffen (RUEGG *et al.* 1992, ADLER 1993).

Der gravierendste Schaden entsteht bei Befall von Pflanzenmaterial durch Fusarien nicht durch eine Ertragsminderung, sondern durch eine oft starke Kontamination der Ernte mit Fusarium Toxinen.

Diese Toxine werden häufig nur von bestimmten Spezies oder klonalen Populationen gebildet (e.g. THRANE, 1989; LEW, 1995, TALBOT *et al.*, 1996) und daher lässt sich durch eine genaue Bestimmung der Art oftmals eine Vorhersage des zu erwartenden Mycotoxinspektrums treffen.

Auf morphologischem Weg ist dies sowohl ein zeitraubendes wie auch oftmals fehlerbehaftetes Unterfangen, da einerseits ein Kultivierungsschritt notwendig ist und andererseits die so angezüchteten Stämme oft sehr rasch degenerieren.

Die zwei von uns entwickelten und hier vorgestellten molekular-taxonomischen Schnellnachweismethoden erweisen sich als vielversprechende Alternativen mit großem Potential für einen Einsatz in der Routineanalytik. Deren erfolgreiche Anwendung wird an entsprechenden Beispielen demonstriert.

DGGE Analyse von verschiedensten Fusarium Spezies

Mit dem Verfahren der DGGE (Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese) ist es möglich, kleinste Sequenzunterschiede innerhalb von exakt gleich langen DNA-Fragmenten beruhend auf deren unterschiedlichen Schmelzverhalten während einer Elektrophorese innerhalb eines chemischen Gradienten nachzuweisen. Besonders leistungsfähig erscheint diese Methode, da selbst einzelne konservierte Basenaustausche nachgewiesen werden können (e.g. FARNLEITNER *et al.* 2000 A, B). In der präsentierten Studie wurde diese Methode angewendet, um unabhängig von morphologischen Merkmalen ein Unterscheidungssystem aller wesentlichen Vertreter der beiden Fusarium Sektionen Sporotrichiella und Discolor zu entwickeln.

Zu diesem Zweck wurde auf eine für die Diskriminierung von Fusarium auf Spe-

zies Niveau geeignete DNA Sequenz, das β -Tubulingen, zurückgegriffen. Um ein für eine DGGE Analyse geeignetes Fragment zu erhalten, wurden die beiden Primer innerhalb des β -Tubulinstrukturgens so gesetzt, daß der hoch variable Bereich eines Introns in der PCR (Polymerase Ketten Reaktion) mitamplifiziert wird. Die Auswahl wurde basierend auf den DNA-Sequenzen der Sequenzdatenbank (GeneBank; Typenstämme: *F. venenatum*, 25413, IMI 1542212; *F. robustum*, 13392, FRC R-5821; *F. tumidum*, 13394, FRC R5823; *F. sambucinum*, 22187, BBA64226; *F. poae*, 13714, FRC T-503; *F. sporotrichioides*, 13440, FRC T-521 [O'DONNELL *et al.* 1997]) und 105 Sequenzen aus eigenen Isolaten (*F. poae*, *F. kyushuense*, *F. sporotrichioides* and *F. pulverosum*) getroffen. In der DGGE-Analyse konnte deutlich gezeigt werden, daß eine klare Unterscheidung aller in die Studie miteinbezogenen Fusarium Stämme auf Artenniveau getroffen werden kann (vgl. *Abbildung 1*) und daß dies

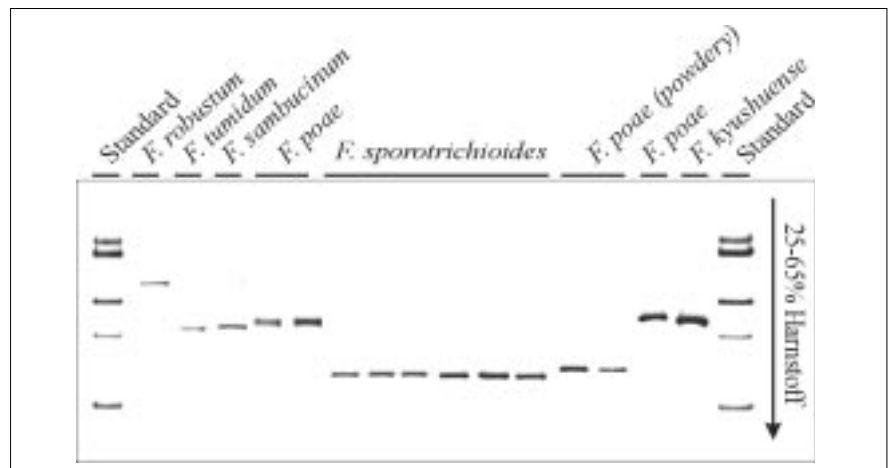


Abbildung 1: Beispiel einer DGGE mit unterschiedlichen Fusarium Spezies. Eine klare Entscheidung aller untersuchten Stämme konnte deutlich gezeigt werden

Autoren: ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Robert L. MACH, Inst. für Biochemische Technologie und Mikrobiologie, Bereich für Mikrobielle Biochemie und Gentechnik, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9/172/5, A-1060 WIEN

auch bei Mischproben (sowohl unterschiedlicher Fusarien Stämme als auch mit Pflanzen-DNA) möglich ist.

System des amplifizierungsresistenten Basenaustausches (ARMS PCR)

Die Methode der ARMS PCR (**A**mplification **R**efractory **M**utation **S**ystem) ermöglicht es in einem Multiplexansatz mehrere Fusarium-Spezies gleichzeitig zu detektieren. Auch für diese Nachweismethode werden kurze Abschnitte des β -Tubulingens als Templat DNA herangezogen und die PCR wird in ein und dem selben Ansatz mit mehreren Primern gleichzeitig gestartet.

Ein verwendetes Primerpaar ist dabei generell für Fusarien spezifisch und stellt somit eine reaktionsinterne Positivkontrolle für das generelle Vorhandensein von Fusarien dar. Alle weiteren

Primer sind so gesetzt, daß sie jeweils nur für eine bestimmte Spezies zu einer positiven Reaktion führen. Dies wird dadurch erreicht, daß die letzte Base am 3' Ende der jeweiligen Primer typisch und damit einzigartig in der Basenabfolge des gewählten Templates ist. Mit dieser Methode ließen sich derzeit bis zu 5 Fusarium Spezies innerhalb einer Reaktion gleichzeitig detektieren.

Literatur

- ADLER, A.: *Fusarien* auf heimischen Feldfrüchten. Veröff. Bundesanstalt für Agrarbiologie Linz **21**: 43-51 (1993).
- FARNLEITNER, A.H., KREUZINGER, N., KAVKA, G.G., GRILLENBERGER, S., RATH, J. and MACH, R.L. Simultaneous Detection and Differentiation of *Escherichia coli* Populations from Environmental Freshwaters by Means of Sequence Variations in a Fragment of the β -D-Glucuronidase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1340-46 (2000 A)
- FARNLEITNER, A.H., KREUZINGER, N., KAVKA, G.G., GRILLENBERGER, S., RATH, J. and MACH, R.L. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) proved superior in comparison to temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) in separating of *Escherichia coli uidA* sequence types. *Let. Appl. Microbiol.*, **30**: 427-31 (2000 B)
- LEW, H. Mykotoxinbelastung von Getreide und Konsequenzen für seine Verarbeitung. Getreide Mehl und Brot **49**: 16-19 (1995).
- O'DONNELL, K., CIGELNIK, E. and CASPER H.H. Molecular phylogenetic, morphological and mycotoxin data support reidentification of the quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genet. Biol.* **23**: 57-67 (1998)
- RUEGG, J., FRANK, M., LAUBER, H.: *Fusariumwelke* an Cyclamen Biologische Bekämpfung mit Mycostop. *Der Gartenbau* **10**: 362-364 (1992).
- TALBOT, N.J., VINCENT, P., and WILDMAN, H.G.: The influence of genotype and environment on the physiological and metabolic diversity of *Fusarium compactum*. *Fungal Genet. Biol.* **2**: 254 - 267 (1996)
- THRANE, U.: Fusarium species and their specific profiles of secondary metabolites. In: *Fusarium - mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Ed. J. Chelkowski. Elsevier, Amsterdam, pp. 199-225, (1989)