

**Eine kritische Beurteilung der biologischen  
Aktivität heimischer *Fusarium spp.* auf  
natürlichen Substraten**

**Endbericht Forschungsprojekt FP1264**

**Dezember 2004**

**Prof. Dr. Robert Mach**

**DI Georg Reischer**

**Prof. Dr. Christian P. Kubicek**

**Dr. Irina Druzhinina**

**Durchgeführt am:**

**Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische**

**Biowissenschaften**

**Technische Universität Wien**

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>2. DURCHGEFÜHRTE ARBEITEN UND RESULTATE:.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Extraktion von RNA bzw. DNA aus infizierten Weizenähren .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Quantitative Bestimmung von <i>Fusarium graminearum</i> in infiziertem Pflanzenmaterial während aller Stadien des Befalls .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Differenzierung zwischen Nivalenol bzw. Deoxynivalenol produzierenden Stämmen .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Reverse Transkription der mRNA des <i>tri5</i> Gens und anschließende „real-time“ PCR .....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. Arbeiten zur Erfassung der lokalen Populationsstruktur von <i>F.cf. subglutinans</i> in einem Freiland-Experiment.....</b>	<b>14</b>
<b>2.6. Zukünftige Arbeiten und Anwendungsperspektiven .....</b>	<b>15</b>
<b>2.7. Danksagung .....</b>	<b>15</b>
<b>3. ANHANG .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Tabellen und Abbildungen: .....</b>	<b>16</b>
3.1.1. Liste der in Evaluierung des $\beta$ -Tubulin Ansatzes getesteten Stämme .....	17
3.1.2. Alignment des <i>Tri7</i> Gens der untersuchten <i>F. graminearum</i> Stämme: .....	18
<b>3.2. Ausgewählte Methoden: .....</b>	<b>19</b>
3.2.1. RNA Extraktion aus Ähren mit peqGOLD TriFast .....	20
3.2.2. DNA Extraktion aus Ähren mit peqGOLD TriFast.....	21
3.2.3. <i><math>\beta</math>tub</i> realtime PCR.....	22
3.2.4. <i>Tri7</i> PCR.....	24

---

3.2.5. <i>Tri5</i> PCR.....	26
3.2.6. <i>Tri5</i> RT SYBR PCR.....	28
<b>3.3. Artikel und Präsentationen:.....</b>	<b>30</b>
3.3.1. Kurzfassung des Beitrages zum ECFG 7.....	31
3.3.2. Artikel „Quantification of <i>Fusarium graminearum</i> in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe” im Journal of Microciological Methods.....	32
3.3.3. Buchkapitel „Quantitative Bestimmung von <i>Fusarium graminearum</i> in infizierten Pflanzenmaterial während aller Stadien des Befalls“ in „Aktuelle Probleme der Mykologie und Mykotoxinforschung“ .....	40
3.3.4. Artikel “Emergence of a new moniliformin-prodicing <i>Fusarium sp.</i> as a causal agent of maize ear rot in Austria” .....	45
<b>4. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>64</b>

# 1. Einleitung

Pilze der Gattung *Fusarium* sind weltweit in praktisch allen Natur- und Kulturböden verbreitet; sie wachsen saprophytisch oder dringen parasitisch in lebende Pflanzen ein und zerstören deren Gewebe. 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 (Lew, 1995; Talbot et al., 1996) und daher läßt sich durch eine genaue Bestimmung der Art oftmals eine Vorhersage des zu erwartenden Mykotoxinspektrums treffen.

Strategien zur Schadensvermeidung beruhen ggw. vor allem auf der (morphologisch und ggf. molekularbiologischen) Identifikation der Fusarien und dem Nachweis der gebildeten Toxine. Die Problematik dieser Vorgangsweise liegt in der mangelnden Korrelation zwischen Spezies-Identifizierung und Toxinbildung, da die in der Pflanze gebildete Menge an Toxin stark Isolat-abhängig ist. Ursache dafür ist die hohe genetische Variabilität imperfekter Pilzspezies. Eine besonders bedeutende Rolle kommt in Österreich, aber auch weltweit der Spezies *Fusarium graminearum* (teleomorph: *Gibberella zeae*) zu. Dieser pflanzenpathogene Pilz ist ubiquitär verbreitet und Produzent verschiedener Toxine, unter denen die Trichothecene Nivalenol und Deoxynivalenol, und Zeralenon die relevantesten sind.

Ziel unserer Arbeit war es, ein molekularbiologisches Nachweisverfahren für *F. graminearum* zu entwickeln. Wichtige Anforderungen an dieses Verfahren waren hohe Spezifität, möglichst hohe Sensitivität und ein geringer Zeit- und Materialaufwand. Des weiteren sollte es möglich sein *F. graminearum* direkt in infiziertem Pflanzenmaterial nachzuweisen und zu quantifizieren. Dadurch erübrigen sich bisher nötige Kultivierungsschritte, die zu einer morphologischen Identifizierung des Pilzes notwendig wären, und mit denen eine quantitative Abschätzung der Pilzbiomasse nicht möglich ist.

Die hier entwickelte Methode wurde im Journal of Microbiological Methods veröffentlicht (Reischer et al., 2004) und sowohl am Mold-Meeting der Fachgruppe Mikrobiologie und Molekularbiologie der Arbeitsgemeinschaft Landwirtschaftlicher Versuchsanstalten in Österreich (ALVA) als auch auf der siebten Europäischen Konferenz für Pilzgenetik präsentiert (Kurzfassung im Anhang).

Parallel dazu war es unsere Absicht eine Methode zum quantitativen Nachweis der Toxinbildungsaktivität (Trichothecene) zu etablieren. Einerseits erlaubt eine molekularbiologische Analyse Toxinbildender Gene eine Differenzierung verschiedener *Fusarium* Stämme in Hinblick auf die von ihnen gebildeten Toxine (Bsp.: Differenzierung zwischen Nivalenol bzw. Deoxynivalenol Bildung). Auf der anderen Seite erlaubt eine quantitative Bestimmung der Transkription Rate von Toxinbildenden Genen in Verbindung mit dem Biomasse-Nachweis eine Abschätzung der Toxinbildungsrate bzw. der biologischen Aktivität des jeweiligen Stammes direkt in der Pflanze.

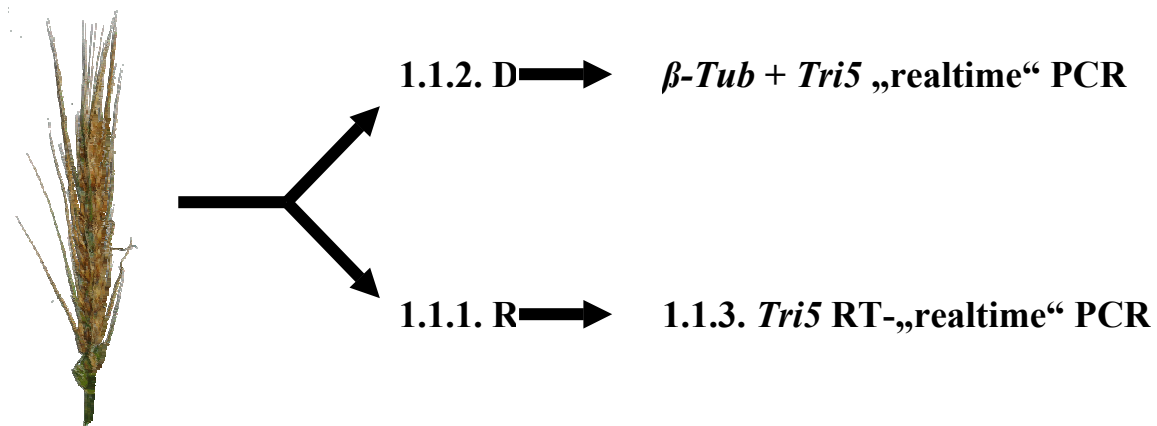


Abb.1: Schematische Darstellung des Ansatzes zur Beurteilung der Trichothecen-Bildungsrate in durch *F. graminearum* befallenem Weizen.

## **2. Durchgeführte Arbeiten und Resultate:**

### **2.1. Extraktion von RNA bzw. DNA aus infizierten Weizenähren**

In einem Freilandversuch durchgeführt von unserem Kooperationspartner Dr Lemmens (IFA, Tulln) wurde Weizen mit *Fusarium graminearum* infiziert. Ähren aus verschiedenen Krankheitsstadien (uninfiziert bis 16 Tage nach Infektion, siehe Abb.3) wurden eingefroren (-80°C). Aus diesen wurde in unserem Labor sowohl RNA wie auch DNA isoliert (siehe Anhang) und in Folge als Templat für spezifische qualitative und quantitative PCR Nachweise verwendet.

### **2.2. Quantitative Bestimmung von *Fusarium graminearum* in infiziertem Pflanzenmaterial während aller Stadien des Befalls**

Durch die hohe Konserviertheit der Sequenz des  $\beta$ -Tubulin Gens und die große Menge an verfügbarer Sequenzinformation, bietet sich dieses Gen als Ziel eines quantitativen PCR Nachweises an. Zu diesem Zweck wurden alle bereits veröffentlichten  $\beta$ -Tubulin Sequenzen von *F. graminearum* Stämmen und verwandten Arten (z.B.: *F. sporotrichoides*, *F. lunulosporum*, *F. culmorum* oder *F. cerealis*; insgesamt 193 Sequenzen; NCBI Genbank Sequenzdatenbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gesammelt und gemeinsam mit selbst ermittelten Sequenzen von 10 österreichischen *Fusarium* Stämmen analysiert. Der Vergleich der Sequenzen und die Suche nach geeigneten Sequenzbereichen führte zum Design von PCR Primern und einer TaqMan Sonde mit hoher Spezifität für *F. graminearum*.

Durchgeführt wurden die „real-time“ PCR Reaktionen in einem iQ Thermocycler System der Firma Biorad. Dieses erlaubt eine direkte, quantitative Verfolgung der PCR-Produktbildung anhand der Freisetzung des Fluorophors FAM aus der TaqMan Sonde bei jeder einzelnen Vervielfältigung der Zielsequenz. Dadurch wird es möglich die ursprünglich in der Probe vorhandenen Anzahl an Kopien des  $\beta$ -Tubulin Gens zu

errechnen, die ein direktes Maß für die vorhandenen Pilz-Genome von *F. graminearum* ist.

Dieser „real-time“ PCR Ansatz wurde unter Verwendung von *F. graminearum* Reinstämmen ausführlichen getestet. Als Bezugsgröße diente ein selbstentwickelter  $\beta$ -Tubulin Plasmid-Standard. Unter anderem umfassten diese Untersuchungen die Ermittlung der Bestimmungsgrenze der Methode. Wir konnten zeigen, dass es möglich ist das  $\beta$ -Tubulin Gen in Pflanzenmaterial ab einer Anzahl von nur 5-10 Kopien positiv nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Ergebnisse waren in hohem Maß reproduzierbar und über einen Bereich von 10 bis  $10^5$  Templaten linear ( $R^2 > 0,97$ ) (siehe Abb.2).

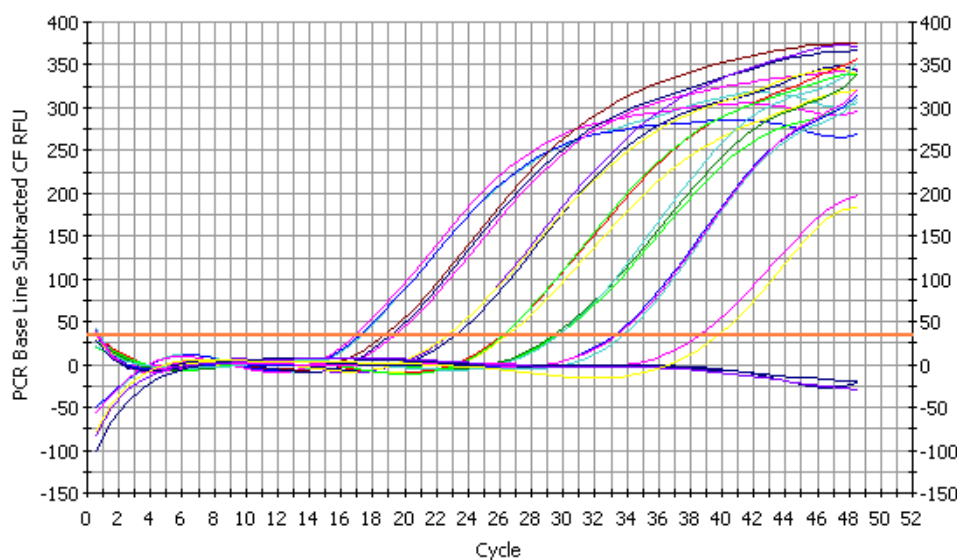


Abb.2: „Real-Time“ PCR Amplifikationskurven des Plasmid Standards mit den Kopienzahlen 1 bis  $10^7$  als Triplikate

In Versuchen konnte die hohe Spezifität für *F. graminearum* gegenüber anderen wichtigen Ähren-Fusariose Erregern (z.B.: *F. culmorum*, *F. poae*) (Edwards et al., 2001), dem T-2 Toxin Bildner *F. sporotrichoides* sowie gegenüber Stämmen, die eine hohe Sequenzähnlichkeit mit *F. graminearum* aufweisen (z.B.: *F. cerealis*), bestätigt werden. Keine der getesteten verwandten *Fusarium* Arten ergab im hier entwickelten Nachweis ein positives Ergebnis, wohingegen alle 9 von uns getesteten österreichischen *F. graminearum* Stämme detektier- und quantifizierbar waren.

Die Untersuchung der Proben aus oben erwähntem Freilandversuch ergab einen stetigen Anstieg der Pilzbiomasse im Verlauf des gesamten Infektionsverlaufes.

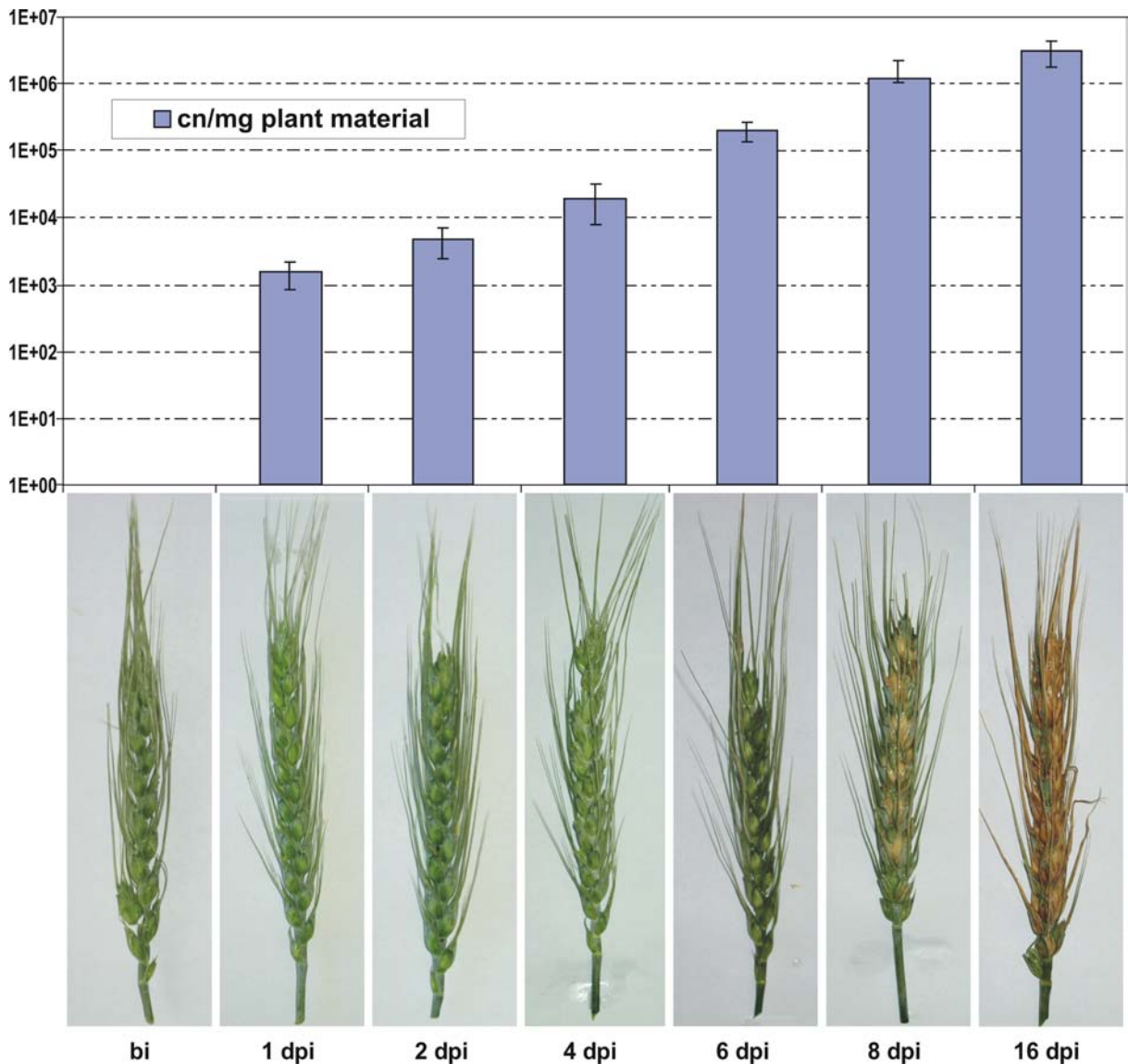


Abb.3:  $\beta$ -Tubulin Gen Kopien pro mg (cn/mg) Pflanzenmaterial (Nassgewicht) nachgewiesen mit dem real-time PCR Ansatz in Proben aus dem Freilandversuch vor der Infektion (bi) und während aller Stadien der Infektion 1, 2, 4, 6, 8 und 16 Tage nach Inokulation (dpi). Balken repräsentieren den Median von 27 unabhängigen Messungen für jeden Zeitpunkt, Fehlerbalken stellen die maximalen beziehungsweise minimalen Werte dar. Darunter sind Bilder der untersuchten Weizenähren zu sehen.

Das entwickelte Verfahren erlaubt eine schnelle, auf Spezies-Ebene spezifische Identifikation und Quantifizierung einer Infektion von Pflanzen durch *F. graminearum* schon in den frühesten Stadien, also schon zu einem Zeitpunkt, wo traditionelle mikrobiologische oder Toxin Analyse Verfahren keinen Nachweis erlauben (McCartney et al., 2003). Es kann auf DNA angewendet werden die direkt aus Pflanzenmaterial



extrahiert wurde, das in Verdacht steht durch *F. graminearum* infiziert zu sein. Der Nachweis wird weder durch die Gegenwart von genomischer DNA der Pflanze noch durch Vorhandensein von DNA aus anderen Fusariose Erregern gestört. Der Ansatz ist billiger und wesentlich zeitsparender als mikrobiologische Identifikationsmethoden. Der Verwendung einer Taq-Man Sonde wurde gegenüber einem quantitativen PCR-Nachweis mittels fluoreszierender, DNA-interkallierender Farbstoffe (z.B.: SYBR-Green) der Vorzug gegeben. Taq-Man Sonden sind einfach zu entwickeln und zu handhaben, sind sensitiver, selektiver und geben weniger leicht falsch positive Ergebnisse, was bei SYBR-Green in Folge der Bildung von Primer-Dimeren oft der Fall ist (McCartney et al., 2003). Vergleicht man die erzielten Ergebnisse mit der Fachliteratur, stellt man außerdem fest, dass der hier entwickelte Nachweis einen größeren Bereich der Linearität (zw.  $10^1$  und  $10^6$  Kopien des Gens) aufweist als andere, schon publizierte quantitative Nachweismethoden für andere Pilze (Cullen et al., 2001; Winton et al., 2002; Filion et al., 2003).

### 2.3. Differenzierung zwischen Nivalenol bzw. Deoxynivalenol produzierenden Stämmen

Die Analyse der genetischen Struktur des an der Trichothecensynthese beteiligten Gens *Tri7* erlaubt eine Differenzierung zwischen *Fusarium* Stämmen die Nivalenol (NIV) beziehungsweise Deoxynivalenol (DON) produzieren (Lee et al., 2001). Die Unterscheidung dieser beiden Chemotypen basiert auf genetischen Unterschieden, genauer gesagt einer Insertionsmutation durch ein 11 Basenpaare langes, oft mehrmals wiederkehrendes DNA Motiv. Das Produkt des *Tri7* Gens, eine Acetyltransferase, ist für die Umsetzung von DON zu NIV in *F. graminearum* mitverantwortlich. Durch die erwähnte Mutation wird die Funktion des durch das Gen codierten Enzyms gestört und der Organismus erzeugt DON, aber kein NIV. Da NIV das wesentlich gefährlichere Toxin darstellt (Marasas et al., 1984; Sweeney and Dobson, 1999; Lee et al., 2002), ist dieser Unterschied eine entscheidende Information in der Einschätzung der Gefährlichkeit eines auftretenden *F. graminearum* Stammes.

Die Analyse der getesteten Stämme auf diesen genetischen Marker erfolgte durch Analyse der extrahierten DNA mittels eines spezifischen *Tri7* PCR Nachweises (Lee et al., 2001) (siehe Anhang) und anschließender Analyse auf einem Polyacrylamidgel. Diese Gelelektrophorese Methode erlaubt die Unterscheidung auch kleinster Unterschiede in der Länge von DNA Fragmenten. Da die verschiedenen Produkte der hier angewandten Methode teilweise nur Längendifferenzen von 11 Basenpaaren haben, war das Auflösungsvermögen einer konventionellen Agarosegel Elektrophorese nicht ausreichend. Zusätzlich wurden die *Tri7*-PCR Produkte der zur Evaluierung der Methode herangezogenen Stämme auch noch einer Sequenzierung unterworfen um sicher zu gehen, dass die in der Untersuchung von (Lee et al., 2001) gefundenen Unterschiede auch auf die Österreichische Stämme zutreffen.

Mit der etablierten Methode ist es möglich österreichische *F. graminearum* Stämme in Bezug auf ihr Toxinbildungsmuster insoweit zu charakterisieren, dass eine Aussage über die Möglichkeit der Bildung des Toxins Nivalenol getroffen werden kann. Dieses schnelle und relativ preisgünstig in jedem molekular-biologischen Laboratorium durchführbare Untersuchung stellt eine wesentliche Verbesserung der Methodik zur

Risikoabschätzung dar und ist eine wertvolle Ergänzung zur mikrobiologischen Charakterisierung von auftretenden Fusarien.

## 2.4. Reverse Transkription der mRNA des *tri5* Gens und anschließende „real-time“ PCR

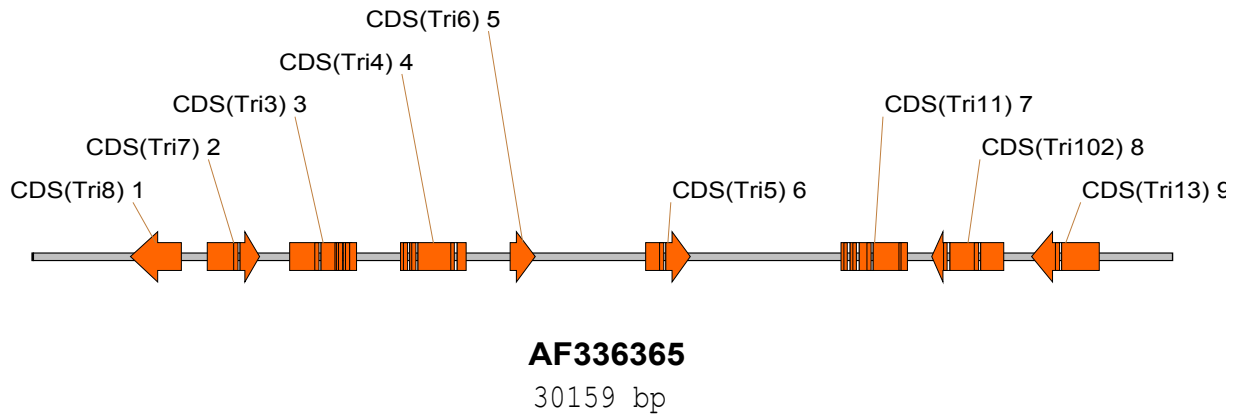


Abb.4: Gencluster der in *Fusarium graminearum* an der Trichothecen-Bildung beteiligten Gene

Das *tri5* Gen in Trichothecen produzierenden Pilzen codiert für das Enzym Trichodiensynthase. Dieses katalysiert den ersten Schritt in der Trichodien-Biosynthese und ist damit das Schlüsselenzym in der Entstehung aller Trichothecene (Sweeney and Dobson, 1999). Da seine Expression direkte Rückschlüsse auf die Trichothecen-Bildung zulässt, wurde es als zweites Ziel unserer Studie gewählt.

Die aus den infizierten Ähren extrahierte RNA wurde nach DNase Verdau einer Reversen Transcriptase (RT) Reaktion unterzogen. Dabei fand der für das *tri5* Gen von *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichoides* und *F. sambucinum* spezifische Primer Tri5\_RT\_r Verwendung (5'-AAACCATCCAGTTCTCCATCTG-3') (Doohan et al., 1999). Die so gewonnene cDNA wurde in einer anschließenden „real-time“ PCR quantifiziert. Dabei fand neben dem oben angeführten Primer Tri5\_RT\_r der Primer Tri5\_RT\_f (5'-AGCGACTACAGGCTTCCCTC-3') Verwendung. Die direkte on-line Verfolgung der PCR Produktbildung, die eine Quantifizierung der ursprünglich vorhandenen mRNA erlaubt, geschah unter Verwendung des fluoreszierenden und an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoffes SYBRGreen I. Das verwendete PCR Protokoll lautet wie folgt: 5 min 95°C, 45 mal 95°C 30 sec, 69°C 20 sec, 72°C 45 sec.

Parallel wurde auch die extrahierte genomische DNA aus den Ähren dieser PCR Analyse unterzogen. Da in jedem *F. graminearum* Genom sowohl das  $\beta$ -Tubulin Gen als auch das *tri5* Gen in nur einer einzigen Kopie vorliegen, kann man über diese Analyse direkt die Expressionrate des für die Toxinbildung verantwortlichen Gens *tri5* mit der Pilzbiomasse in Beziehung setzen.

Es war möglich im untersuchten Pflanzenmaterial die Expression von *tri5* schon am vierten Tag nach Inokulation nachzuweisen.

## 2.5. Arbeiten zur Erfassung der lokalen Populationsstruktur von *F.cf. subglutinans* in einem Freiland-Experiment.

Diese Fragestellung innerhalb des Projekts sollte ursprünglich mit auf RFLP multipler single-gene loci basierender Analytik untersucht werden. Während diese Methode zum Zeitpunkt der Projekteinreichung laut Literatur die Methode der Wahl darstellte, sind in den vergangenen drei Jahren hier Zweifel an der Leistungsfähigkeit und Sensitivität, insbesondere bei klonalen Populationen aufgetreten. Wir haben uns daher in den Untersuchungen an den zur Verfügung gestellten Isolaten zuerst auf die Sequenzierung von 2 Genloci (*tub1*, *tefl*) beschränkt, um damit die Anzahl von Haplotypen zu erfassen. Eine Auswertung mittels Parsimony Analyse in PAUP (heuristic search, 1000 replicates) lieferte 3 MP-Bäume, welche eindeutig die überwiegende Anzahl der Isolate als nicht cospezifisch mit *F. subglutinans* auswiesen, sondern einen mit 93 % (bootstrap coefficient) unterstützten Zweig einer noch nicht beschriebenen Spezies darstellten. Der ebenfalls noch nicht als Taxon beschriebene Stamm NRRL 25622 (K. O'Donnell, Peoria, USA; persönliche Mitteilung) clustert gemeinsam mit diesen Stämmen. Nächste phylogenetische Nachbarn sind *F. subglutinans* MP E, *F. bactridioides*, *F. succisae*, *F. circinatum*, *F. anthophilum*, *F. bulbicola*. Die übrige durch Typenstämmen unterstützte Topologie des Baumes stimmt mit von K. O' Donnell publizierten Daten überein, sodass das Ergebnis der Analyse als sicher anzusehen ist. Dies bedeutet dass ein erheblicher Teil der Infektionen im Untersuchungsbereich von einer unbekanntem Spezies stammt. Anwendung des Partition Homogeneity Tests auf die *tub1* und *tefl* Sequenzen weist auf eine ausschließlich klonale Struktur dieser Population hin, wie sie bei pflanzenpathogenen Pilzen nicht ungewöhnlich ist.

Als besonders erwähnenswert erscheint die Tatsache dass sich im Untersuchungszeitraum (1994-2001) allmählich die neue noch nicht beschriebene Spezies im gesamten österreichischen Bundesgebiet durchzusetzen begann. So wurden letztendlich in den Isolaten aus 2001 keine *F. subglutinans* Stämme mehr gefunden.

Die Resultate dieses Teils der Studie sind im Anhang als Wissenschaftliche Publikation für ein internationales Peer Reviewed Journal aufbereitet und werden derzeit zur Veröffentlichung eingereicht.

## 2.6. Zukünftige Arbeiten und Anwendungsperspektiven

Als nächste Schritte in der Ausweitung der hier beschriebenen Untersuchungsmethoden bieten sich die Erweiterung des „real-time“ Detektionssystems auf weitere relevante Fusarien Arten (z.B.: *F. culmorum* oder *F. sporotrichoides*) und die Einbeziehung weiterer für die Toxin-Biosynthese wichtiger Gene (z.B.: *tri7* Gen zur Differenzierung zwischen DON bzw. NIV produzierenden Stämmen, Polyketidsynthasen in der ZON Bildung sowie neue Virulenzfaktoren) an.

Die entwickelten Verfahren könnten zur Etablierung eines Frühwarnsystems zur frühzeitigen Erkennung, Identifikation und Quantifizierung des Befalls durch Fusarien dienen. Auch Bekämpfungsmaßnahmen könnten so präzise bewertet werden. Durch den geringen Zeit- und Materialaufwand bietet sich die Methode auch als Routineanalyseverfahren an.

## 2.7. Danksagung

Unser Dank gilt dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft für die Finanzierung dieses Forschungsprojekts 1264, Dr. Marc Lemmens für die zur Verfügung gestellten Stämme und Ähren und Dr. Andreas Adler für zahlreiche wissenschaftliche Anregungen und die konstruktive Diskussion der Problematik.

## **3. Anhang**

### **3.1. Tabellen und Abbildungen:**



### 3.1.1. Liste der in Evaluierung des $\beta$ -Tubulin Ansatzes getesteten Stämme

Isolate	Origin <sup>a</sup>	Host	GenBank accession number	Detected in general beta-tubulin assay	Detected in TaqMan assay
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 66	IFA	durum wheat kernel	AY635186 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 75	IFA	maize kernel	AY629348 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 77.1	IFA	durum wheat kernel	AY629350 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 103	IFA	maize kernel	AY629342 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 110	IFA	maize kernel	AY629343 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 126	IFA	winter wheat kernel	AY629344 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 141	IFA	soil	AY629345 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 165	IFA	winter wheat kernel	AY629346 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 191	IFA	maize kernel	AY629347 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium sp.</i> IFA 76	IFA	phragmites	AY629349 <sup>b</sup>	+	-
<i>Fusarium cerealis</i> MA 1888	ICE	maize kernel	AY635180 <sup>b</sup>	+	-
<i>Fusarium cerealis</i> MA 1891	ICE	maize kernel	AY635181 <sup>b</sup>	+	-
<i>Fusarium culmorum</i> MA 1900	ICE	maize kernel	AY635182 <sup>b</sup>	+	-
<i>Fusarium culmorum</i> MA 1901	ICE	maize kernel	AY635183 <sup>b</sup>	+	-
<i>Fusarium culmorum</i> MA 1902	ICE	maize kernel	AY635184 <sup>b</sup>	+	-
<i>Fusarium culmorum</i> MA 1903	ICE	maize kernel	AY635185 <sup>b</sup>	+	-
<i>Fusarium poae</i> IBT 9988	ICE	oat	AF404192 <sup>c</sup>	+	-
<i>Fusarium poae</i> IBT 9991	ICE	oat	AF404208 <sup>c</sup>	+	-
<i>Fusarium sporotrichoides</i> IBT 40004	ICE	wheat glume	AF404149 <sup>c</sup>	+	-

<sup>a</sup> ICE, *Fusarium* Stamm Sammlung Institut für Verfahrenstechnik, TU Wien;

IFA Stammsammlung IFA, Tulln

### 3.1.2. Alignment des Tri7 Gens der untersuchten *F. graminearum* Stämme:

		716		805
tri7 AF336366	(716)	TTACGACTCCTCAACAATGG	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
tri7 AF359361	(716)	TTACGACTCCTCAACAATGG	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-141-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-103-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-110-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-126-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-165-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-191-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-66-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-75-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-76-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
T7-77.1-T3	(1)	-----	CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
Consensus	(716)		CCGCCGCTGTTTGGGAAGCATTTTAGATGCATACACCATCACAGGTTTCTGGGGGTAAGTTCCGGTACTCT	
		806		895
tri7 AF336366	(806)	TCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	GCACAATATTAGCACAATATTA
tri7 AF359361	(806)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	GCACAATATTA-----
T7-141-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	GCACAATATTA-----
T7-103-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
T7-110-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
T7-126-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
T7-165-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
T7-191-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
T7-66-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
T7-75-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
T7-76-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
T7-77.1-T3	(71)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTA	-----
Consensus	(806)	CCT	CATCCACACACGTTTTCTGGCACAATATTAGCACAATATTAGCACAATATTA	
		896		972
tri7 AF336366	(896)	CACAATATTAGCACAATATTAGCACAATATTAGCACAATATTA	GCACATTCTG	GCACCAGTACTTTCGAGGGCTCT
tri7 AF359361	(883)	-----	GCACATTCTG	GCACCAGTACTTTCGAGGGCTCT
T7-141-T3	(148)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-103-T3	(137)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-110-T3	(137)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-126-T3	(137)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-165-T3	(137)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-191-T3	(115)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-66-T3	(115)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-75-T3	(115)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-76-T3	(115)	-----	GCACATTCTG	-----
T7-77.1-T3	(115)	-----	GCACATTCTG	-----
Consensus	(896)		GCACATTCTG	

### **3.2. Ausgewählte Methoden:**

### 3.2.1. RNA Extraktion aus Ähren mit peqGOLD TriFast

1. Ähre wägen
2. In Mörser mit flüssigen Stickstoff verreiben (Mörser und Pistil vorkühlen!)
3. 50 mg Homogenisat in Schraubepi mit Glasskugeln einwiegen.
4. **Sofort** 1 ml peqGoldTriFast zugeben.
5. Fast Prepen (Stufe 6, 30 sec)
6. 5 min RT
7. 0,2 ml Chloroform zugeben, 15 sec schütteln, 5 min RT
8. Zentrifugieren (5 min, 12.000g)
9. Wäßrige Phase in frisches Eppi überführen, Rest auf 4°C
10. RNA fällen mit 0,5 ml Isopropanol, mischen, 10 min RT
11. Zentrifugieren (10 min, 12.000g, 4°C)
12. Absaugen, waschen mit 75% DEPC-Ethanol
13. Zentrifugieren (10 min, 12.000g, 4°C)
14. WH von 12 und 13
15. Absaugen, Pellet trocknen lassen
16. Lösen in 50 µl DEPC Merck Wasser
17. Konzentrationsmessung am Photometer und Kontrolle der DNA auf RNA Gel

### 3.2.2. DNA Extraktion aus Ähren mit peqGOLD TriFast

18. 0,3 ml Ethanol zu Phenol/Chloroform-phase aus RNA Extraktion
19. Mischen, 3 min RT
20. Zentrifugieren (5 min, 2000g, 4°C)
21. Überstand für Proteinextraktion auf 4°C oder verwerfen
22. Pellet mit 1 ml 0,1M Natriumcitrat in 10% Ethanol waschen, 30 min RT
23. Zentrifugieren (5 min, 2000g, 4°C)
24. WH von 5 und 6
25. Pellet mit 1 ml 75% Ethanol waschen, 15 min RT, dabei wiederholt schütteln
26. Zentrifugieren (5 min, 2000g, 4°C)
27. Überstand absaugen, Pellet trocknen (SpeedVac, 10 min)
28. DNA in 500 µl 8mM NaOH lösen
29. Neutralisieren mit 50 µl 100nM HEPES Puffer

### 3.2.3. *βtub* realtime PCR

The following table shows the composition of the PCR mixture (Everything was kept on ice at all times!):

Reagent (stock conc.)	Volume added	Final conc.	Supplier
iQ Supermix 2x	12,5µl	1x	Biorad, Hercules, CA
Probe Tub_Taqman (10 µM)	0,625µl	0,25µM	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
Primer Tub_rt_f (10 µM)	0,75µl	0,3µM	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
Primer Tub_rt_r (10 µM)	0,75µl	0,3µM	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
Sample	2,5µl		
Water	7,875µl		Merck, Darmstadt, Germany (cat.no.: 1.16754.9010)
<b>Total reaction volume</b>	25µl		

Primers Tub\_rt\_f (5'-GGTCTCGACAGCAATGGTGTT-3') and Tub\_rt\_r (5'-GCTTGTGTTTTTCGTGGCAGT-3') amplify a 111 bp fragment of the  $\beta$ -tubulin (chain1) gene of all members of the species *Fusarium graminearum*. The probe Tub\_Taqman has the following sequence: 5'-ACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGC-3'.

A iCycler iQ system (Biorad, Hercules) was used for PCR amplification and realtime quantitation running the following program:

Initial denaturation:

95°C 03:30

50 cycles:

95°C 00:15

67°C 00:15

72°C 00:20

72°C 05:00

Non Template Controls (NTC), containing water instead of sample, Non Amplification Control, containing positive sample and 0,5 µl of 0,5% SDS, and a dilution eries of plasmid standards were routinely analyzed alongside every reaction.

### 3.2.4. *Tri7* PCR

The following table shows the composition of the PCR mixture (Everything was kept on ice at all times!):

Reagent (stock conc.)	Volume added	Final conc.	Supplier
Sample	3 $\mu$ l		
PCR reaction buffer 10x	5 $\mu$ l	1x	Promega, Madison, WI (supplied with Taq Polymerase)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 $\mu$ l	2 mM	Promega, Madison, WI (supplied with Taq Polymerase)
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l	0,2 mM	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany (cat.no.:1969064)
GzTri7/f1 (50 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ M	VBC-Genomics, Vienna, Austria
GzTri7/r1 (50 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ M	VBC-Genomics, Vienna, Austria
Water	32,4 $\mu$ l		Merck, Darmstadt, Germany (cat.no.: 1.16754.9010)
Taq DNA Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	0,6 $\mu$ l	1,25 U	Promega, Madison, WI (cat.no.: M1661)
<b>Total reaction volume</b>	50 $\mu$ l		



Primers GzTri7/f1 (5'-GGC TTT ACG ACT CCT CAA CAA TGG-3') and GzTri7/r1 (5'-AGA GCC CTG CGA AAG (CT)AC TGG TGC-3') amplify a 160-327 bp fragment of the *Tri7* gene of trichothecene producing fungi.

A Biometra UNO-Thermoblock thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) was used for PCR amplification running the following program:

Initial denaturation (hotstart):

94°C 2 min

30 cycles:

94°C 1 min

60°C 0,5 min

74°C 1 min

74°C 10 min

A hotstart was performed. Negative controls, containing water instead of sample, were routinely analyzed alongside every reaction

All PCR-products were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and the size of the bands determined by analysis on a GelDoc 2000 System (Biorad, Hercules, CA) and the Quantity One software program (Biorad).

### 3.2.5. *Tri5* PCR

The following table shows the composition of the PCR mixture (Everything was kept on ice at all times!):

Reagent (stock conc.)	Volume added	Final conc.	Supplier
Sample	3 $\mu$ l		
PCR reaction buffer 10x	2,5 $\mu$ l	1x	Promega, Madison, WI (supplied with Taq Polymerase)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 $\mu$ l	2 mM	Promega, Madison, WI (supplied with Taq Polymerase)
dNTPs (10 mM)	0,25 $\mu$ l	0,1 mM	Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany (cat.no.:1969064)
HATTri5/f (50 $\mu$ M)	0,25 $\mu$ l	0,1 $\mu$ M	VBC-Genomics, Vienna, Austria
HATTri5/r (50 $\mu$ M)	0,25 $\mu$ l	0,1 $\mu$ M	VBC-Genomics, Vienna, Austria
Water	17 $\mu$ l		Merck, Darmstadt, Germany (cat.no.: 1.16754.9010)
Taq DNA Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l	0,5 U	Promega, Madison, WI (cat.no.: M1661)
<b>Total reaction volume</b>	25 $\mu$ l		

Primers HATTri5/f (5'-CAG ATG GAG AAC TGG ATG GT-3') and HATTri5/r (5'-GCA CAA GTG CCA CGT GAC-3') amplify a 260 bp fragment of the *Tri5* gene of trichothecene producing fungi.

A Biometra UNO-Thermoblock thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) was used for PCR amplification running the following program:

Initial denaturation (hotstart):

94°C 1 min 15 s

35 cycles:

94°C 15 s

62°C 15 s

74°C 45 s

74°C 4 min 15 s

A hotstart was performed. Negative controls, containing water instead of sample, were routinely analyzed alongside every reaction

All PCR-products were analyzed by agarose gel electrophoresis and the relative intensity of the bands determined by analysis on a GelDoc 2000 System (Biorad, Hercules, CA) and the Quantity One software program (Biorad).

### 3.2.6. *Tri5* RT SYBR PCR

The following table shows the composition of the PCR mixture (Everything was kept on ice at all times!):

Reagent (stock conc.)	Volume added	Final conc.	Supplier
iQ Supermix 2x	12,5µl	1x	Biorad, Hercules, CA
Primer <i>Tri5_RT_f</i> (10 µM)	0,75µl	0,3µM	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
Primer <i>Tri5_RT_r</i> (10 µM)	0,75µl	0,3µM	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
SYBR Green (100x)	0,25	1x	
Fluorescein (10x)	2,5	1x	
Sample	2,5µl		
Water	5,75µl		Merck, Darmstadt, Germany (cat.no.: 1.16754.9010)
<b>Total reaction volume</b>	25µl		

Primers Tri5\_RT\_f (5'-AGC GAC TAC AGG CTT CCC TC-3') and Tri5\_RT\_r (5'-AAA CCA TCC AGT TCT CCA TCT G-3') amplify either a 544 bp (genomic DNA) or a 485 bp (cDNA) fragment of the *Tri5* gene of all members of *Fusarium graminearum*.

A iCycler iQ system (Biorad, Hercules) was used for PCR amplification and realtime quantitation running the following program:

Initial denaturation:

95°C 03:30

50 cycles:

95°C 00:30

65°C 00:20

72°C 00:45

72°C 03:00

Non Template Controls (NTC), containing water instead of sample, Non Amplification Control, containing positive sample and 0,5 µl of 0,5% SDS, and a dilution series of plasmid standards were routinely analyzed alongside every reaction.

### **3.3. Artikel und Präsentationen:**

### 3.3.1. Kurzfassung des Beitrages zum ECFG 7

(European Conference on Fungal Genetics, Copenhagen, 17<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> April 2004):

## QUANTIFICATION OF *FUSARIUM GRAMINEARUM* IN INFECTED PLANT MATERIAL BY REAL-TIME PCR APPLYING A SPECIES SPECIFIC TAQMAN PROBE

G. REISCHER, R. L. MACH

Institute for Chemical Engineering, Gene Technology Group, Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9/166/5, A-1060 Vienna, Austria  
phone: +43-1-5880117252; fax :+43-1-5816266  
email: reischer@mail.zserv.tuwien.ac.at

*Fusarium graminearum* (teleomorph: *Gibberella zeae*) is a major cause for cereal scab. We developed a Real-Time PCR assay to selectively quantify *F. graminearum* in infected wheat. The assay is based on the detection of a 111-bp part of the  $\beta$ -tubulin gene of *F. graminearum* using a pair of newly developed primers and a TaqMan probe with specificity on the species level. As a reference we constructed a plasmid standard for  $\beta$ -tubulin quantification. We showed that the developed assay was able to specifically detect all 9 Austrian *F. graminearum* isolates tested in our evaluation whereas applying the method on the most closely related *Fusarium* species no product formation could be observed (e.g. *F. sporotrichoides*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. cerealis*). The limit of quantification in a background of wheat DNA was determined to be 10 copies of the  $\beta$ -tubulin gene while the detection limit was even lower than that. The method led to reproducible results, which were linear ( $R^2 > 0,97$ ) over five orders of magnitude (from 10 to  $10^5$  templates).

This assay was then employed in planta using wheat samples inoculated with *F. graminearum* in a field experiment. During all phases of infection of the plant (day 1 to day 16) samples were taken, nucleic acids were extracted and then subjected to further analysis. The developed method allowed the detection of *F. graminearum* in early stages of infection before the appearance of any visible symptom of the disease. In addition we assessed the expression of *tri5* (trichodien synthase encoding) following a RT-PCR approach combined with Real-Time quantitation using SYBRgreen I as fluorescent dye. The method developed in this study allows a fast identification and quantitation of plant-infections by *F. graminearum* at very early stages where classical microbiological and toxin analysis methods fail to detect the pathogen.

**3.3.2. Artikel „Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe” im Journal of Microbiological Methods**





Note

## Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe

G.H. Reischer<sup>a</sup>, M. Lemmens<sup>b</sup>, A. Farnleitner<sup>a</sup>, A. Adler<sup>c</sup>, R.L. Mach<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute for Chemical Engineering, Gene Technology Group, Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9/166, A-1060 Vienna, Austria

<sup>b</sup>IFA-Tulln, Institute for Agrobiotechnology, Department of Plant Production, Konrad Lorenz Strasse 20, A-3430 Tulln, Austria

<sup>c</sup>Institute for Agricultural Analysis, Austrian Agency for Health and Food Safety, Wieningerstraße 8, A-4021 Linz, Austria

Received 26 May 2004; accepted 3 June 2004

Available online 23 July 2004

### Abstract

A new real-time PCR based method was developed for the species-specific detection, identification and quantification of *Fusarium graminearum* in planta. It utilizes a TaqMan hybridisation probe targeting the beta-tubulin gene and a plasmid standard. The assay is highly specific giving no product with DNA of closely related species. It is very sensitive, detecting down to five gene copies per reaction, and is able to produce reliable quantitative data over a range of six orders of magnitude. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Fusarium graminearum*; Infected wheat; Real-time PCR; TaqMan Probe

*Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorph: *Gibberella zeae* (Schw.) Petch) is an important pathogen of cereal crops, causing root rot and seedling diseases (Cook, 1968; Manka et al., 1985), head blight of wheat and barley (Stoyan et al., 2003), and stalk and ear rot of maize (Cook, 1981; Kommedahl and Windels, 1981). *Fusarium* head blight and ear rot reduce grain yield and the harvested grain is often contaminated with mycotoxins such as trichothecenes and zeralenone (Lee et al., 2002). Trichothecene contamination is associated with feed refusal, vomit-

ing, diarrhoea, dermatitis and haemorrhages (Marasas et al., 1984).

Up to date the identification of the pathogen is relying on conventional methods like the interpretation of visual symptoms or the isolation and culturing of the fungus. The drawback of those methods is that detection of the pathogen is only possible in late stages of the infection when it is already too late for any countermeasures and the spread of the disease cannot be controlled anymore. In contrast, molecular diagnostics of plant pathogenic fungi can be highly specific, very sensitive and relatively fast (McCartney et al., 2003).

We here describe for the first time a fast and reliable method for the species-specific identification and absolute quantification of *F. graminearum* in planta by a real-time PCR assay using a TaqMan hybridisation

\* Corresponding author. Tel.: +43-1-58801-17252; fax: +43-1-5816266.

E-mail address: [rmach@mail.zserv.tuwien.ac.at](mailto:rmach@mail.zserv.tuwien.ac.at) (R.L. Mach).

probe. We tested the assay on plant material from wheat artificially infected in open field experiment.

DNA of pure cultures from the strain collections of the Institute of Chemical Engineering and the IFA Tulln (see Table 1) was extracted following the method previously described by Arisan-Atac et al. (1995). DNA from wheat spikes of defined weight was obtained by grinding of whole spikes in liquid nitrogen, taking an aliquot of 50 µg from the homogenate and subsequent DNA extraction as described by Arisan-Atac et al. (1995) with the following modifications: a bead-beating step using a Fast-Prep FP 120 (Thermo Savant, Holbrook, NY) at a intensity setting of 6 for 30 s was introduced after addition of CTAB buffer, followed by a phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) extraction (Griffiths et al., 2000). The purified DNA was resuspended in 50 µl of sterile distilled water and stored at –80 °C. DNA extraction from wheat spikes was done from three different aliquots of each spike to compensate for variations in extraction efficiency.

In addition to the beta-tubulin sequences of 9 Austrian *F. graminearum* isolates (Table 1), a total number of 191 sequences of *F. graminearum* and

fungal species either closely related on the beta-tubulin sequence level (O'Donnell et al., 1998) or also associated with head blight in wheat (Edwards et al., 2001) (*F. graminearum* [47], *F. poae* [75], *F. sporotrichoides* [36], *F. pseudograminearum* [18], *F. cerealis* [6], *F. culmorum* [2], *F. lunulosporum* [1] and *G. avenacea* [6]) were extracted from the NCBI database and aligned using the Vector NTI software package (InforMax, Frederick, MD). Primers were designed from the derived consensus sequence with the Primer Express® software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primers FGtubf (5'-GGTCTCGACAGCAATGGTGTT-3') and FGtubr (5'-GCTTGTGTTTTTCGTGGCAGT-3') specifically amplified a 111 bp fragment of the beta-tubulin gene of *F. graminearum* which was quantified by the TaqMan probe FGtubTM (FAM-5'ACAACGG-AACGGCACCTCTGAGCTCCAGC3'-TAMRA). The primers and probe were analysed for specificity in-silico by blast analysis using the NCBI Blast feature (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

For the generation of a plasmid standard a 570 bp fragment of the beta-tubulin gene of *F. graminearum* isolate IFA 66 encompassing the target region of the

Table 1  
Specificity of the beta-tubulin Taq-Man assay

Isolate	Origin <sup>a</sup>	Host	GenBank accession number	Detected in general beta-tubulin assay	Detected in TaqMan assay
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 66	IFA	durum wheat kernel	AY635186 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 75	IFA	maize kernel	AY629348 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 77.1	IFA	durum wheat kernel	AY629350 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 103	IFA	maize kernel	AY629342 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 110	IFA	maize kernel	AY629343 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 126	IFA	winter wheat kernel	AY629344 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 141	IFA	soil	AY629345 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 165	IFA	winter wheat kernel	AY629346 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium graminearum</i> IFA 191	IFA	maize kernel	AY629347 <sup>b</sup>	+	+
<i>Fusarium sp.</i> IFA 76	IFA	phragmites	AY629349 <sup>b</sup>	+	–
<i>Fusarium cerealis</i> MA 1888	ICE	maize kernel	AY635180 <sup>b</sup>	+	–
<i>Fusarium cerealis</i> MA 1891	ICE	maize kernel	AY635181 <sup>b</sup>	+	–
<i>Fusarium culmorum</i> MA 1900	ICE	maize kernel	AY635182 <sup>b</sup>	+	–
<i>Fusarium culmorum</i> MA 1901	ICE	maize kernel	AY635183 <sup>b</sup>	+	–
<i>Fusarium culmorum</i> MA 1902	ICE	maize kernel	AY635184 <sup>b</sup>	+	–
<i>Fusarium culmorum</i> MA 1903	ICE	maize kernel	AY635185 <sup>b</sup>	+	–
<i>Fusarium poae</i> IBT 9988	ICE	oat	AF404192 <sup>c</sup>	+	–
<i>Fusarium poae</i> IBT 9991	ICE	oat	AF404208 <sup>c</sup>	+	–
<i>Fusarium sporotrichoides</i> IBT 40004	ICE	wheat glume	AF404149 <sup>c</sup>	+	–

<sup>a</sup> ICE, *Fusarium* strain collection Institute of Chemical Engineering, Vienna, Austria; IFA strain collection of IFA, Tulln, Austria.

<sup>b</sup> Beta-tubulin gene fragment sequenced during this study.

<sup>c</sup> Published by Yli-Mattila et al. (2004).

real-time assay was cloned into a pGEM-T Vector (Promega, Madison, WI). After transformation of *Escherichia coli* JM 109 with the plasmid and purification of the plasmid DNA with the Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany), the concentration of the plasmid standard solution was measured photometrically and the standard was diluted in 10-fold steps in a 10 ng/μl poly [d(I–C)] solution as unspecific DNA background (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

PCR was monitored on an iCycler iQ Real-Time Detection System (Biorad, Hercules, CA). Reaction mixtures (25 μl total volume) contained 2.5 μl of template DNA dilution, 7.5 pmol of FGtubf, 7.5 pmol of FGtubr, 6.25 pmol of FGtubTM, 12.5 μl of iQ Supermix (Biorad) and 10 μl of sterile bi-distilled water. The PCR program was the following: 95 °C for 3 min 30 s (denaturation, activation of polymerase, measuring of well factors), 40 cycles of 95 °C for 15 s, 67 °C for 15 s and 72 °C for 20 s. All reactions were performed in triplicates and in at least three 10-fold dilution steps of template DNA. The number of cycles in the PCR was set to 40, as the 40th cycle represents the extrapolated threshold cycle for a reaction with a theoretical single copy of the template DNA. A total of six 10-fold dilution steps of plasmid standard (10–10<sup>6</sup> gene copies) were run in triplicate on every wellplate as well as a no-template control (water instead of sample) and a no-amplification control (containing plasmid standard and 0.01% SDS). PCR efficiency was calculated from threshold cycles of these standard dilution steps. As a positive control the DNA extracts from all used isolates were also tested with a the beta-tubulin PCR assay targeting all *Fusarium* species described in Yli-Mattila et al. (2004). GenBank accession numbers for beta-tubulin sequences obtained from 16 Austrian *Fusarium* isolates used in this study are included in Table 1.

For artificial inoculation of wheat in the field experiment the IFA 191 isolate was used (*F. graminearum* isolated from a *Triticum durum* kernel in 1990 in Austria). It was stored (at 2–4 °C) in soil cultures for stable long-term storage (Smith and Onions, 1994). Inoculum was prepared with the bubble breeding method (Mesterházy, 1978). A modified Czapek-Dox medium (containing/l of bi-distilled water in g: glucose, 20; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5; NaNO<sub>3</sub>, 2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5; yeast extract, 1 and 1 ml of a 1% FeSO<sub>4</sub> solution

(w/w)) supplemented with 0.1 g streptomycin sulphate/l and 0.01 g neomycin/l after autoclaving was used for inoculum production. After 1 week the mycelium suspension was ready and 300 ml of the suspension was diluted in 1 l of bi-distilled water for inoculation.

The wheat line E2-23-T was grown in 2 m<sup>2</sup> plots at the IFA experimental field. This wheat line is a doubled haploid line originating from a cross between CM82036 and Remus and was produced with the maize-wheat pollination system. It is a very susceptible line and does not have a quantitative trait locus (QTL) for *Fusarium* head blight resistance on chromosome 5A and 3B (Buerstmayr et al., 2002, 2003).

The wheat line was inoculated at 50% anthesis by spraying 100 ml/m<sup>2</sup> of the inoculum suspension described above. To promote infection an automated mist irrigation system was used to apply moisture. Water was applied in two pulses of 10 s each at 15 min intervals during 17 h after inoculation. Before inoculation 10 flowering spikes were cut and removed from the plot. On day 1, 2, 4, 6, 8 and 16 after inoculation the sampling procedure was repeated. All spikes were immediately stored at –80 °C after sampling for further investigations.

The primers, probe and PCR protocol were evaluated by amplifying DNA from pure culture isolates of *F. graminearum* as well as the developed plasmid standard. Specificity was assessed by amplification of DNAs from various isolates which are either closely related to *F. graminearum* and/or also causing head blight in wheat. The β-tubulin gene of all non *F. graminearum* isolates failed to be amplified in the reaction while DNA from all isolates yielded products in the general *Fusarium* PCR assay (Table 1). All PCR products were of the expected size when examined by agarose gel electrophoresis (data not shown).

All Austrian *F. graminearum* isolates tested could be detected with the developed method. Interestingly one additional *Fusarium* isolate originally included in the group of Austrian *F. graminearum* isolates, was presumptively identified by sequence comparison to actually be closer related to *F. flocciferum* (O'Donnell et al., 1998). Despite only one mismatch in nucleotide sequence in the binding area of the TaqMan probe this isolate was not detected by our PCR approach. The amplification of the standard dilution series yielded linear and reliable results ( $R^2 > 0.997$ ) in the range

from  $10^1$  to  $10^6$  copies of the beta-tubulin gene per PCR reaction (range of quantitation). The qualitative detection limit for the beta-tubulin gene was as low as 5 gene copies.

In the next step we investigated the efficiency of the amplification using plasmid standard as well as known amounts of *F. graminearum* sample isolate DNA as template in the presence of unspecific DNA, such as the DNA from isolates closely related to *F. graminearum* (Table 1) and DNA extracted from uninfected wheat spikes. No change in threshold cycle values could be observed under these conditions as compared to amplification without a DNA background. In addition the overall efficiency of the PCR amplification was very high regardless of template origin or unspecific DNA background (95–98.8%).

The developed method was applied on the total DNA extracted from spikes of infected wheat plants in all states of infection. The beta-tubulin gene could not be detected in samples from uninfected wheat. However detection was possible in all samples taken after inoculation with *F. graminearum* isolate IFA 191. There was a distinct gradual increase in gene copies measured, corresponding to the fungal growth during the infection of the wheat spike (Fig. 1). Detection was possible from the first day post inoculation, while first symptoms of the infection (water soaked spots) appeared 7–10 days after inoculation (see Fig. 1). Data of all aliquots, dilution steps and replicates is included in Fig. 1.

The method developed in this study allows a fast, species-specific identification and quantitation of plant-infections by *F. graminearum* at very early

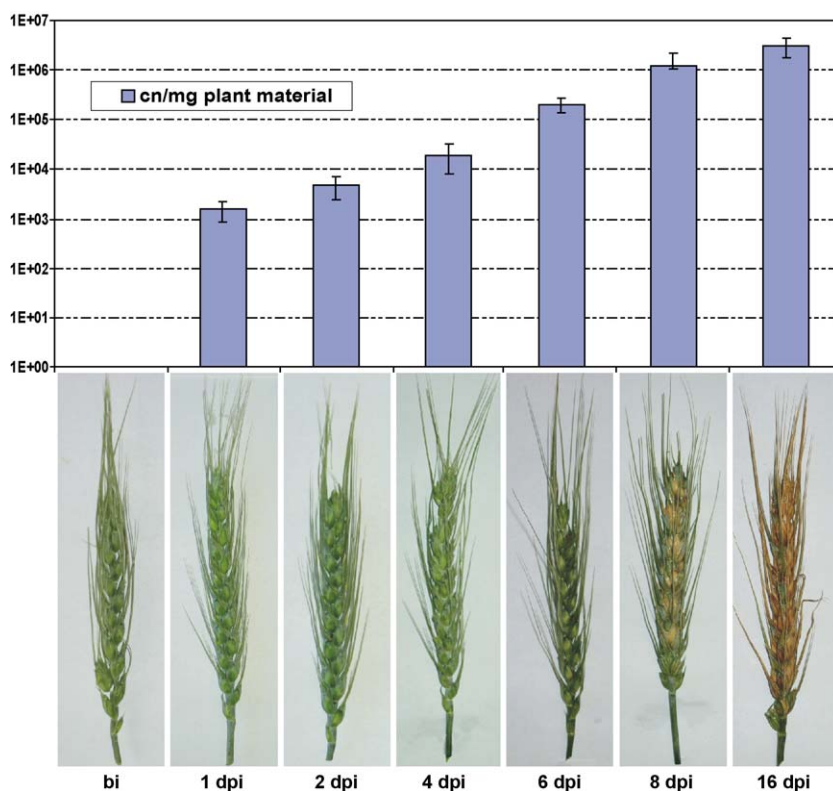


Fig. 1. Beta-tubulin gene copy numbers per mg (cn/mg) of plant material (wet weight) detected with the real-time PCR assay in samples taken from the inoculation experiment before infection (bi) and during all stages of infection 1, 2, 4, 6, 8 and 16 days post infection (dpi). Columns represent the median value of 27 separate measurements for each day, error bars indicate the maximum and minimum values, respectively. Below, pictures of the respective wheat spikes are shown.

stages where classical microbiological and toxin analysis methods fail to detect the pathogen (McCartney et al., 2003). It can be applied on DNA extracted directly from presumptively infected plant material and is not affected by an unspecific background of either plant or fungal DNA, even from other pathogens causing head blight. It allows a reliable estimation of the fungal genomes and can detect as few as five gene copies. The assay is cheaper and less time consuming than microbiological identification methods. We preferred the use of a TaqMan system over a SYBR® Green detection used in other studies (Filion et al., 2003; Schnerr et al., 2002) because of its much higher sensitivity, increased selectivity and the reduction of false signals due to primer-dimer formation (McCartney et al., 2003). The range of reliable quantification was higher than in studies published previously where the linearity was only achieved over four to five orders of magnitude (Cullen et al., 2001; Filion et al., 2003; Winton et al., 2002).

Combined with the analysis of genes contributing to the trichothecene production the presented method will be an invaluable tool for the study of *F. graminearum* infection processes. The sensitivity of the method would even allow the quantitation of fungal growth in different plant tissues during the progress of infection (Stoyan et al., 2003). Due to its simplicity it could also be used in routine analysis and the monitoring of *F. graminearum* epidemics or the monitoring of pest control measures.

This study was supported by grants from the Austrian Federal Ministry for Education, Science and Culture GEN-AU pilotproject (GZ 200.051/2-VI/1/2003) and from the Austrian Federal Ministry of Agriculture, Forestry, Environment and Water Management (FP 1264) to RLM.

## References

- Arisan-Atac, I., Heidenreich, E., Kubicek, C.P., 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma sp.* capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 249–255.
- Buerstmayr, H., Lemmens, M., Hartl, L., Doldi, L., Steiner, B., Stierschneider, M., Ruckebauer, P., 2002. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat: I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theor. Appl. Genet.* 104, 84–91.
- Buerstmayr, H. et al., 2003. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat: II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor. Appl. Genet.* 107, 503–508.
- Cook, R.J., 1968. *Fusarium* root and foot rot of cereals in the Pacific Northwest. *Phytopathology* 78, 1673–1677.
- Cook, R.J., 1981. *Fusarium* diseases of wheat and other small grains in North America. In: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (Eds.), *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park, pp. 39–52.
- Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K., Duncan, J.K., 2001. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 387–398.
- Edwards, S.G., Pirgozliev, S.R., Hare, M.C., Jenkinson, P., 2001. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1575–1580.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Jabaji-Hare, S.H., 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 53, 67–76.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J., 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5488–5491.
- Kommedahl, T., Windels, C.E., 1981. Root-, stalk- and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. In: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (Eds.), *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park, pp. 94–103.
- Lee, T., Han, Y.K., Kim, K.H., Yun, S.H., Lee, Y.W., 2002. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2148–2154.
- Manka, M., Visconti, A., Chelkoski, J., Bottalico, A., 1985. Pathogenicity of *Fusarium* isolates from wheat, rye and triticale towards seedlings and their ability to produce trichothecenes and zeralenone. *Phytopathol. Z.* 113, 24–29.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun, T.A., 1984. *Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press, University Park.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A., Ward, E., 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag. Sci.* 59, 129–142.
- Mesterházy, A., 1978. Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium spp.* on winter wheat varieties. *J. Phytopathol.* 93, 12–25.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Casper, H.H., 1998. Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genet. Biol.* 23, 57–67.
- Schnerr, H., Vogel, R.F., Niessen, L., 2002. Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 121–125.

- Smith, D., Onions, A.H.S., 1994. The preservation and maintenance of living fungi. In: Institute, I.M. (Ed.), IMI Technical Handbooks, vol. 2. Cab International, Wallingford, UK, p. 122.
- Stoyan, R.P., Edwards, S.G., Hare, M.C., Jenkinson, P., 2003. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *Plant Pathol.* 44, 207–238.
- Winton, L.M., Stone, J.K., Watrud, L.S., Hansen, E.M., 2002. Simultaneous one-tube quantification of host and pathogen DNA with real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 92, 112–116.
- Yli-Mattila, T., Mach, R.L., Alekhina, I.A., Bulat, S.A., Kullnig-Gradinger, C.M., Kubicek, C.P., Klemsdal, S.S., 2004. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *Int. J. Food Microbiol.* (In Press).



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Microbiological Methods xx (2004) xxx–xxx

---

**Journal**  
of **Microbiological**  
**Methods**


---

[www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)

Erratum

Erratum to “Quantification of *Fusarium graminearum*  
in infected wheat by species specific real-time  
PCR applying a TaqMan probe”  
[J. Microbiol. Methods 59 (2004) 141–146]

G.H. Reischer<sup>a</sup>, M. Lemmens<sup>b</sup>, A. Farnleitner<sup>a</sup>, A. Adler<sup>c</sup>, R.L. Mach<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Institute for Chemical Engineering, Gene Technology Group, Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9/166, A-1060 Vienna, Austria<sup>b</sup>IFA-Tulln, Institute for Agrobiotechnology, Department of Plant Production, Konrad Lorenz Strasse 20, A-3430 Tulln, Austria<sup>c</sup>Institute for Agricultural Analysis, Austrian Agency for Health and Food Safety, Wieningerstraße 8, A-4021 Linz, Austria

---

The publisher regrets that, in the above note, the sequence of the presented TaqMan probe is FGtubTM  
TaqMan probe nucleotide sequence in the fifth para- (FAM-5' ACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGC3' - 16  
graph was incorrectly published. The correct nucleotide TAMRA). 17  
18

DOI of original article [10.1016/j.mimet.2004.06.003](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.06.003).

\* Corresponding author. Tel.: +43 1 58801 17252; fax: +43 1 5816266.

E-mail address: [rmach@mail.zserv.tuwien.ac.at](mailto:rmach@mail.zserv.tuwien.ac.at) (R.L. Mach).

0167-7012/\$ - see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:[10.1016/j.mimet.2004.09.001](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.09.001)

**3.3.3. Buchkapitel „ Quantitative Bestimmung von *Fusarium graminearum* in infizierten Pflanzenmaterial während aller Stadien des Befalls“ in „Aktuelle Probleme der Mykologie und Mykotoxinforschung“**





ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR-  
UND AGRARWESEN

---

**MOLD-MEETING 2003**

**DER**

**ALVA-FACHGRUPPE  
MIKROBIOLOGIE & MOLEKULARBIOLOGIE**

**„AKTUELLE PROBLEME DER MYKOLOGIE UND  
MYKOTOXINFORSCHUNG“**

---

ALVA-Mitteilungen Heft1/2004

ISSN 1811-7317

# Quantitative Bestimmung von *Fusarium graminearum* in infiziertem Pflanzenmaterial während aller Stadien des Befalls

G. Reischer, A. Farnleitner und R. L. Mach

## Einleitung

Pilze der Gattung *Fusarium* sind weltweit in praktisch allen Natur- und Kulturböden verbreitet; sie wachsen saprophytisch oder dringen parasitisch in lebende Pflanzen ein und zerstören deren Gewebe. Zusätzlich scheiden etliche Spezies von *Fusarium* Mykotoxine in das Substrat aus. Strategien zur Schadensvermeidung beruhen ggw. vor allem auf der (morphologisch und ggf. molekularbiologischen) Identifikation der Fusarien, und dem Nachweis der gebildeten Toxine. Die Problematik dieser Vorgangsweise liegt in der mangelnden Korrelation zwischen Spezies-Identifizierung und Toxinbildung, da die in der Pflanze gebildete Menge an Toxin stark Isolatabhängig ist. Ursache dafür ist die hohe genetische Variabilität imperfekter Pilzspezies. Eine besonders bedeutende Rolle kommt in Österreich, aber auch weltweit der Spezies *Fusarium graminearum* (teleomorph: *Gibberella zeae*) zu. Dieser pflanzenpathogene Pilz ist ubiquitär verbreitet und Produzent verschiedener Toxine, unter denen die Trichothecene Nivalenol und Deoxynivalenol, und Zeralenon die relevantesten sind.

Ziel unserer Arbeit war es, ein molekularbiologisches Nachweisverfahren für *F. graminearum* zu entwickeln. Wichtige Anforderungen an dieses Verfahren waren hohe Spezifität, möglichst hohe Sensitivität und ein geringer Zeit- und Materialaufwand. Des Weiteren sollte es möglich sein *F. graminearum* direkt in infiziertem Pflanzenmaterial nachzuweisen und zu quantifizieren. Dadurch erübrigen sich bisher nötige Kultivierungsschritte, die zu einer morphologischen Identifizierung des Pilzes notwendig wären, und mit denen eine quantitative Abschätzung der Pilzbiomasse nicht möglich ist.

Parallel dazu war es unsere Absicht eine Methode zum quantitativen Nachweis der Toxinbildungsaktivität (Trichothecene) zu etablieren. In Verbindung mit dem Biomasse-Nachweis erlaubt dies eine Abschätzung der Toxinbildungsrate bzw. der biologischen Aktivität des jeweiligen Stammes direkt in der Pflanze.

## Methodische Entwicklung

### Extraktion von RNA bzw. DNA aus infizierten Weizenähren:

In einem Freilandversuch durchgeführt von unserem Kooperationspartner Dr Lemmens (IFA, Tulln) wurde Weizen mit *Fusarium graminearum* infiziert. Ähren aus verschiedenen Krankheitsstadien (uninfiziert bis 16 Tage nach Infektion, siehe Abb.1) wurden eingefroren (-80°C). Aus diesen wurde

in unserem Labor sowohl RNA wie auch DNA isoliert und in Folge als Templat für spezifische quantitative PCR Nachweise verwendet.

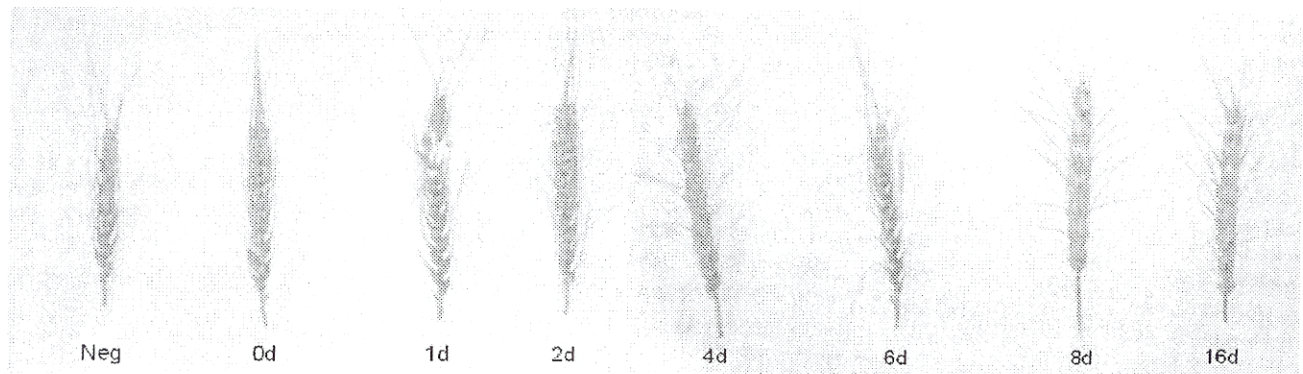


Abb.1: Mit *F. graminearum* inokulierte Weizenähren in verschiedenen Stadien der Infektion. Neg: uninfizierte Ähre; 0d, 1d, 2d, 4d, 6d, 8d, 16d: Ähren 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 16 Tage nach Inoculation

#### Spezifischer quantitativer Nachweis von *Fusarium graminearum*:

Durch die hohe Konserviertheit der Sequenz des  $\beta$ -Tubulin Gens und die große Menge an verfügbarer Sequenzinformation, bietet sich dieses Gen als Ziel eines quantitativen PCR Nachweises an. Zu diesem Zweck wurden alle bereits veröffentlichten  $\beta$ -Tubulin Sequenzen von *F. graminearum* Stämmen und verwandten Arten (z.B.: *F. sporotrichoides*, *F. lunulosporum*, *F. culmorum* oder *F. cerealis*; insgesamt 193 Sequenzen; NCBI Genbank Sequenzdatenbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gesammelt und gemeinsam mit selbst ermittelten Sequenzen von 10 österreichischen *Fusarium* Stämmen analysiert. Der Vergleich der Sequenzen und die Suche nach geeigneten Sequenzbereichen führte zum Design von PCR Primern und einer TaqMan Sonde mit hoher Spezifität für *F. graminearum*.

Durchgeführt wurden die „real-time“ PCR Reaktionen in einem iQ Thermocycler System der Firma Biorad. Dieses erlaubt eine direkte, quantitative Verfolgung der PCR-Produktbildung anhand der Freisetzung des Fluorophors FAM aus der TaqMan Sonde bei jeder einzelnen Vervielfältigung der Zielsequenz. Dadurch wird es möglich die ursprünglich in der Probe vorhandenen Anzahl an Kopien des  $\beta$ -Tubulin Gens zu errechnen, die ein direktes Maß für die vorhandenen Pilz-Genome von *F. graminearum* ist.

Dieser „real-time“ PCR Ansatz wurde unter Verwendung von *F. graminearum* Reinstämmen ausführlichen getestet. Als Bezugsgröße diente ein selbstentwickelter  $\beta$ -Tubulin Plasmid-Standard. Unter anderem umfassten diese Untersuchungen die Ermittlung der Bestimmungsgrenze der Methode. Wir konnten zeigen, dass es möglich ist das  $\beta$ -Tubulin Gen in Pflanzenmaterial ab einer Anzahl von nur 5-10 Kopien positiv nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Ergebnisse waren in hohem Maß reproduzierbar und über einen Bereich von 10 bis  $10^5$  Templaten linear ( $R^2 > 0,97$ ) (siehe Abb.2). In Ansätzen konnte die hohe Spezifität für *F. graminearum* gegenüber anderen wichtigen Ähren-Fusariose Erregern (z.B.: *F. culmorum*, *F. poae*) (Edwards, Pirgozliev et al. 2001), dem T-2 Toxin Bildner *F. sporotrichoides* sowie gegenüber Stämmen, die eine hohe

Sequenzähnlichkeit mit *F. graminearum* aufweisen (z.B.: *F. cerealis*), bestätigt werden. Keine der getesteten verwandten *Fusarium* Arten ergab im hier entwickelten Nachweis ein positives Ergebnis, wohingegen alle 9 von uns getesteten österreichischen *F. graminearum* Stämme detektier- und quantifizierbar waren.

Die Untersuchung der Proben aus oben erwähntem Freilandversuch ergab einen stetigen Anstieg der Pilzbiomasse im Verlauf des gesamten Infektionsverlaufes.

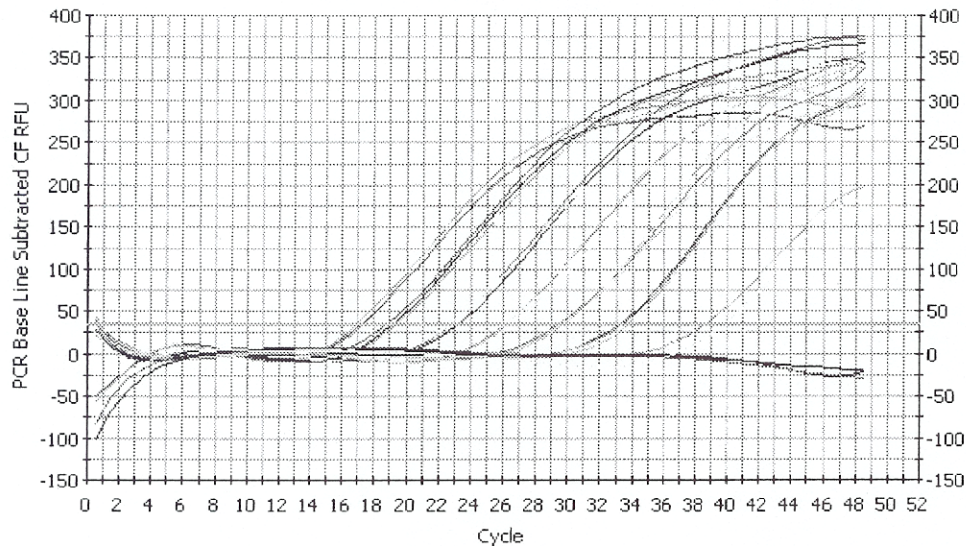


Abb.2: „Real-Time“ PCR Amplifikationskurven des Plasmid Standards mit den Kopienzahlen 1 bis 10<sup>7</sup> als Triplikate

#### Reverse Transkription der mRNA des *tri5* Gens und anschließende „real-time“ PCR:

Das *tri5* Gen in Trichothecen produzierenden Pilzen codiert für das Enzym Trichodiensynthase. Dieses katalysiert den ersten Schritt in der Trichodien-Biosynthese und ist damit das Schlüsselenzym in der Entstehung aller Trichothecene (Sweeney and Dobson 1999). Da seine Expression direkte Rückschlüsse auf die Trichothecen-Bildung zulässt, wurde es als zweites Ziel unserer Studie gewählt.

Die aus den infizierten Ähren extrahierte RNA wurde nach DNase Verdau einer Reversen Transcriptase (RT) Reaktion unterzogen. Dabei fand der für das *tri5* Gen von *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichoides* und *F. sambucinum* spezifische Primer Tri5\_RT\_r Verwendung (5'-AAACCATCCAGTTCTCCATCTG-3') (Doohan, Weston et al. 1999). Die so gewonnene cDNA wurde in einer anschließenden „real-time“ PCR quantifiziert. Dabei fand neben dem oben angeführten Primer Tri5\_RT\_r der Primer Tri5\_RT\_f (5'-AGCGACTACAGGCTTCCTC-3') Verwendung. Die direkte online Verfolgung der PCR Produktbildung, die eine Quantifizierung der ursprünglich vorhandenen mRNA erlaubt, geschah unter anhand des fluoreszierenden und an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoffes SYBRGreen I. Das verwendete PCR Protokoll lautet wie folgt: 5 min 95°C, 45 mal 95°C 30 sec, 69°C 20 sec, 72°C 45 sec.

Parallel wurde auch die extrahierte genomische DNA aus den Ähren dieser PCR Analyse unterzogen. Da in jedem *F. graminearum* Genom sowohl das  $\beta$ -Tubulin Gen als auch das *tri5* Gen

in nur einer einzigen Kopie vorliegen, kann man über diese Analyse direkt die Expressionrate des für die Toxinbildung verantwortlichen Gens *tri5* mit der Pilzbiomasse in Beziehung setzen. Es war möglich im untersuchten Pflanzenmaterial die Expression von *tri5* schon am vierten Tag nach Inokulation nachzuweisen.

### **Zukünftige Arbeiten und Anwendungsperspektiven**

Als nächste Schritte in der Ausweitung der hier beschriebenen Untersuchungsmethoden bieten sich die Erweiterung des „real-time“ Detektionssystems auf weitere relevante Fusarien Arten (z.B.: *F. culmorum* oder *F. sporotrichoides*) und die Einbeziehung weiterer für die Toxin-Biosynthese wichtiger Gene (z.B.: *tri7* Gen zur Differenzierung zwischen DON bzw. NIV produzierenden Stämmen, Polyketidsynthasen in der ZON Bildung sowie neue Virulenzfaktoren) an.

Die entwickelten Verfahren könnten zur Etablierung eines Frühwarnsystems zur frühzeitigen Erkennung, Identifikation und Quantifizierung des Befalls durch Fusarien dienen. Auch Bekämpfungsmaßnahmen könnten so präzise bewertet werden. Durch den geringen Zeit- und Materialaufwand bietet sich die Methode auch als Routineanalyseverfahren an.

### **Danksagung**

Unser Dank gilt dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft für die Finanzierung dieses Forschungsprojekts 1264, Dr. Marc Lemmens für die zur Verfügung gestellten Stämme und Ähren und Dr. Andreas Adler für zahlreiche wissenschaftliche Anregungen und die konstruktive Diskussion der Problematik.

Doohan, F. M., G. Weston, et al. (1999). "Development and Use of a Reverse Transcription-PCR Assay To Study Expression of *Tri5* by *Fusarium* Species In Vitro and In Planta." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(9): 3850-3854.

Edwards, S. G., S. R. Pirgozliev, et al. (2001). "Quantification of Trichothecene-Producing *Fusarium* Species in Harvested Grain by Competitive PCR To Determine Efficacies of Fungicides against *Fusarium* Head Blight of Winter Wheat." *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(4): 1575-1580.

Sweeney, M. J. and A. D. W. Dobson (1999). "Molecular biology of mycotoxin biosynthesis." *FEMS Microbiology Letters* **175**: 149-163.

---

**Autoren:** Dipl. Ing. Georg REISCHER, A. FARNLEITNER und Univ. Prof. Dr. Robert L. MACH, Division Applied Biochemistry and Gene Technology, Institute of Chemical Engineering, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9/172, A-1060 Wien

**3.3.4. Artikel “Emergence of a new moniliformin-producing *Fusarium sp.* as a causal agent of maize ear rot in Austria”**

# **Emergence of a new moniliformin-producing *Fusarium* sp. as a causal agent of maize ear rot in Austria**

**Irina S. Druzhinina<sup>1</sup>, Romana Hornek<sup>1</sup>, Andreas Adler<sup>3</sup>, Youssuf A.M.H.Gherbawy<sup>2</sup>, Hans-Jörg Prillinger<sup>2</sup>, Christian P. Kubicek<sup>1</sup> and Robert L. Mach<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Division Applied Biochemistry and Gene Technology, Institute for Chemical Engineering, TU Wien, Getreidemarkt 9-166.5 A-1060 Vienna, Austria.*

<sup>2</sup> *Institute of Applied Microbiology, University of Agricultural Sciences, Nußdorfer Lände 11, A-1190 Vienna, Austria.*

*Institute for Agricultural Analysis, Austrian Agency for Health and Food Safety, Winingenstraße 8, A-4021 Linz, Austria*

\* Authors for correspondence: Tel.: +43 1 5880117251

E mail: [rmach@mail.zserv.tuwien.ac.at](mailto:rmach@mail.zserv.tuwien.ac.at)

Fax No.: +43 1 5880117299

## 1. Abstract

The European corn borer is the most important Central European pest in maize, and increases its susceptibility to infection by *Fusarium* species. In order to identify the *Fusarium* spp. causing this infection, 43 strains were isolated over a period of 3 years (2001 – 2003), and analyzed by sequence analysis of parts of the  $\beta$ -tubulin (*tub1*) and elongation factor 1-alpha (*tef1*) genes. 34 of these isolates were identified by *tef1* analysis as a non yet described species, *F. sp. NRRL 25622*, which was previously known from maize in South Africa and Central America only and interpreted as a sibling species of *F. subglutinans*. The other 9 strains were *F. proliferatum* and *F. verticillioides*. Bayesian analysis of the *tub1* and *tef1* phylogeny of *F. sp. NRRL 25622* revealed that the two genes produced discordant results due to poor resolution and high homoplasy of *tub1*. The *tef1* analysis, however, clearly placed the Austrian isolates in a different, strongly supported clade than *F. subglutinans*, thereby supporting their identity as a separate taxon. The isolates cospecific with *F. sp. NRRL 25622* produced moniliformin in amounts between 1.5 and 18 mg/kg crop, but no fumosins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>.

## 2. Introduction

The European corn borer is the most important pest in maize and causes enormous problems to more and more farmers, above all in Southern Germany. The incidence of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hb.) was initially confined to the warmer regions (Mediterranean countries, Rhine Graben). In the last decades, however, it has also conquered climatically less favoured areas all over central Europe, including Austria. Earlier studies, mainly from North American ecosystems (Koehler 1959, Shurtleff 1980) suggested that



damage of maize plants or ears by the corn borer increases their susceptibility to infection by *Fusarium* species of section *Liseola* (Lew et al. 1991). In Austria *F. subglutinans* has been reported as the most prevalent *Fusarium* species on naturally infected maize ears (50% of all isolates), *F. proliferatum* or *F. verticillioides* playing a minor role (Lew et al. 1991, Lew 1995, Adler 1993). However, there are indications that the recent changes in the climatic conditions (milder winter and warmer and dryer summer months) favour the development of *F. proliferatum* and *F. verticillioides* as pathogens on Austrian maize (Lew et al. 2001).

A stringent control of fusarioses of maize is important not only for reduction of yield losses, but also to decrease the risk of mycotoxin contamination in human and animal nutrition. Five toxic fungal secondary metabolites (mycotoxins) are considered to be of world-wide economic and toxicologic importance: aflatoxin, ochratoxin, deoxynivalenol and derivatives, zearalenone and derivatives, and fumonisins. The last three of these are produced by various *Fusarium* species. FAO experts estimate that 25% of the world's food crops are affected by mycotoxins each year, which implies that the *Fusarium* species contributes substantially to food contamination (Charmley et al., 1994).

To predict mycotoxin production and contamination of crops, safe species identification is obligatory. However, previous studies in this area relied almost exclusively on morphological identification, which - due to the high degree of inter- and intraspecific variation in phenotypic, physiological, biological and ecological traits in *Fusarium* - is today no more an accepted standard for species in this fungal genus. Kerry O'Donnell and coworkers have advocated the use of nucleotide sequences of fragments from nuclear genes such as  $\beta$ -tubulin (*tub1*) and translation elongation factor 1a (EF-1a; *tefl*) as a safe means for identification of species within the *G. fujikuroi* complex (O'Donnell et al., 1998; 2000). On the basis of *tefl* sequences, Geiser et al. (2004) recently developed FUSARIUM ID vers. 1.0,

an identification tool based on sequences from vouchered strains. The objective of the present study therefore was the identification of the most prevalent *Fusarium*, section *Liseola*, species from naturally infected Austrian maize ears by molecular means and establish their toxin production profile.

### **3. Materials and methods**

#### 3. 1. Strains

*Fusarium* strains were isolated from infected maize ears from crops in the main maize growing regions of Austria in 1994, 1995, 1997, 1998 and 2001 (Table 1). They were isolated from the ears as described earlier (Lew et al. 1991), by transferring mycelia from maize ears with visible infection to potato dextrose agar (Oxoid CM 139; Basingstoke, GB) plates and incubation for 1 week at 28°C. Single colonies were subcultured on synthetic low nutrient agar (SNA) with 1 x 2 cm pieces of sterile paper placed on the hardened agar (Nirenberg 1976). The cultures were incubated for 10 - 14 days at 20°C and tentatively identified according to the morphological key of Nirenberg and O'Donnell (1998). The strains are maintained at the culture collection of Institute of Applied Microbiology, IAM, University of Agricultural Science, Vienna, Austria, but representative examples of genotypes described in this study have also been deposited at CBS.

#### 3.2. Toxin production and analysis

*Fusarium* strains were tested for mycotoxin production *in vitro* as described previously (Lew et al. 1991). Briefly, the *Fusarium* isolates were grown on 50 g of maize kernels in 500 ml Erlenmeyer flasks to which 25 ml of water had been added before autoclaving (121°C for 20

min). The substrate was inoculated with pieces of SNA (Nirenberg 1981) single spore cultures containing mycelium and spores of the isolate being tested. The cultures were incubated in diffuse daylight at 28°C for 1 week and at 20°C for 2 weeks. The culture material thus prepared was immediately stored at –20°C until examined. Uninoculated maize was used as control.

Analysis of fumonisins was performed by means of immunoaffinity column clean-up and reversed phase HPLC with fluorescence detection of the OPA derivatives (Visconti, 1995). Moniliformin was determined by using a combination of reverse phase SPE and ion-pair extraction for sample clean-up followed by ion-pair HPLC with diode-array detection (Lew et al., 2001).

### 3.3. DNA extraction and PCR-amplification of *tub1* and *tefl*

DNA was extracted by the CTAB method as described earlier (Kullnig et al. 2000).

A 548-bp DNA fragment of the  $\beta$ -tubulin-encoding gene (*tub1*), including the highly variable introns 1 and 2, was amplified as described by O'Donnell and Cigelnik (1997), using the primer combination T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') and tub566 (5'-TGACCGAAAACGAAGTTGTC-3'; this study) and the following amplification protocol: 60 sec initial denaturation at 94°C, followed by 30 cycles of 60 sec denaturation at 94 °C, 1 min primer annealing at 51 °C, 60sec extension at 74 °C, and a final extension period of 7 min at 74°C.

A 0.3 kb fragment of *tefl*, containing the large intron, was amplified by the primer pair EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') and EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') as described elsewhere (Druzhinina *et al.*, 2004).

The PCR-amplicons were purified by means of a PCR-product purification kit (Cleanmix; Talent, Trieste, Italy), and sequenced by the aid of a LI-COR 4000L automatic sequencing system (Middendorf *et al.*, 1992), using cycle sequencing (Robocycler 40; Stratagene, La Jolla, CA, USA) with the ThermoSequenase-kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). All sequences obtained in this study have been submitted to NCBI GenBank, their accession numbers are indicated in Table 1. Previously published sequences used for phylogenetic analyses in this study are given by accession numbers as they were retrieved from GenBank.

#### 3.4. Phylogenetic analysis

DNA sequences were visually aligned using Genedoc 2.6 (Nicholas and Nicholas, 1997). The interleaved NEXUS file was formatted using PAUP\*4.0b10 and was manually edited in order for it to be recognized by MrBayes v3.0B4 program. The Bayesian approach to phylogenetic reconstructions (Rannala and Yang, 1996; Yang and Rannala, 1997) was implemented using MrBayes 3.0B4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) sampling was performed with four incrementally heated chains that were simultaneously run for 1,000,000 generations, using prior parameters calculated by MODELTEST for GTR model. To check for potentially poor mixing of MCMCMC, each analysis was repeated four to six times. The convergence of MCMCMC was monitored by examining the value of the marginal likelihood through generations. Convergence of substitution rate and rate heterogeneity model parameters was also checked. Bayesian posterior probabilities (PP) were obtained from the 50% majority rule consensus of 80,00 trees sampled every 100 generations after removing the 2,000 first trees as the "burn-in"

stage. PP values lower than 0.95 were not considered significant while values below 0.9 were not shown on phylograms.

#### 4. Results

A total number of 43 *Fusarium* spp. have been isolated from infected maize ears from 12 different locations in Eastern and South Eastern Austria between 1994 and 2002 (Table 1). Thirtyfour of them were preliminarily identified as *Fusarium subglutinans*, nine as *F. verticillioides* and one as *F. proliferatum* by standard morphological traits. Sequence analysis of part of the  $\beta$ -tubulin encoding *tub1* gene (O'Donnell et al. 1998) of all isolates confirmed the identity of *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. However, the sequence of the 34 other isolates significantly diverged from that of the *F. subglutinans* ex-type strain in most cases. In contrast, a BLASTN search of the NCBI database resulted in 100 % nt-identity with the *tub1* sequence of the still undescribed *Fusarium* sp. NRRL 25622 (=MRC 1077), isolated from maize in South Africa Steenkamp et al. 1999; O'Donnell et al. 2000).

In order to verify whether these 34 isolates in fact were cospecific with this undescribed species NRRL 25622, we also sequenced the large intron of the translation elongation factor 1-alpha encoding gene *tef1* (O'Donnell et al. 2000). Submission of the resulting sequence to a BLASTN search implemented in FUSARIUM ID 1.0 (Geiser et al. 2004) yielded *Fusarium* sp. NRRL 25622 as best hit, thereby confirming cospecificity. In order to test whether *F. sp.* NRRL 25622 and *F. subglutinans* are in fact two different species, we made use of the genealogical concordance phylogenetic species recognition (GCPSR) concept (Taylor et al. 2000). By this analysis, a species is confirmed by the concordance of its relative position in different gene trees. To this end, we have selected one sequence for each

haplotype of *tub1* and *tefl*, and subjected them to separate Bayesian analysis with a set of its closest phylogenetic neighbors *F. subglutinans* MP E, *F. bactridioides*, *F. succisae*, *F. circinatum*, *F. anthophilum*, *F. bulbicola* and four further yet unnamed phylogenetic *Fusarium* species (O'Donnell et al. 2000). *F. oxysporum* was used as an outgroup in this analysis. The resulting *tefl* and *tub1* trees are given in Fig. 1 and 2: in *tefl*, *F. sp.* NRRL 25622 and the isolates from this study formed a separate clade which was supported by a high posterior probability coefficient (0.99), which was clearly separated from the also strongly supported clade (posterior probability coefficient 1.00) containing the tester strain of *F. subglutinans* (*G. fujikuroi* mating type E) and other isolates of *F. subglutinans*. While the other branches leading to other species of the “American Clade” of the *G. fujikuroi* complex (O'Donnell et al. 2001) were less well supported in the *tefl* tree, this analysis is in accordance with the assumption that *F. sp.* NRRL 25622 is indeed a species different from *F. subglutinans*.

The same type of analysis with *tub1*, on the other hand, yielded a poorly resolved tree characterized by high homoplasy. *F. subglutinans* and *F. sp.* NRRL 25622 were contained in the same clade, which however was not supported by posterior probability coefficients. It is notable that 7 strains exhibited the same *tub1* sequence as *F. subglutinans*, suggesting non-orthologous development of *tub1* in some species of *Fusarium*. As we will explain below, we rule out recombination between the two strains as an alternative explanation.

The low nt-variability in *tub1* and *tefl* of the Austrian isolates of this new *Fusarium* sp. did not allow a deeper investigation on their population structure. This finding was also corroborated by RAPD analysis, using primer M13. These data (not shown) revealed that most of the isolates had patterns with >95 % identity. Identity of only three isolates (MA1838, MA1843 and MA1837) was somewhat lower (> 80 %; Fig. 2). The deviating RAPD pattern

of these three strains did not correlate with nt differences in either *tefl* or *tubl*. We conclude from these data that the Austrian population of *Fusarium* NRRL 25622 has a high genetic stability and is probably clonal.

Since the toxin production pattern of this new *Fusarium* sp. is unknown, we tested whether it would produce moniliformin or fuminosin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. These three were selected because they were detected in infected Austrian corn in the past years. The results of this analysis showed that the Austrian isolates of *Fusarium* sp. NRRL 25622 did not produce the two fuminosins, but produced moniliformin at levels of 1.5 – 18 mg/kg sterilized maize kernels. Interestingly, the three isolates with deviating RAPD patterns (MA1837, MA1838, and MA1843) produced the lowest amounts of moniliformin (6.2, 1.3 and 2.4 mg/kg, respectively, Tab. 1).

## 5. Discussion

We have shown here that the causal agent for the current maize ear rot in Austria (and probably Central Europe) is a *Fusarium* spp. whose *tefl* and *tubl* sequences are cospecific with the yet unnamed *F.* sp. NRRL 25622. Individual and combined parsimony analysis of mitochondrial small subunit (mtSSU), *tefl*, *tubl* and calmodulin (*call*) sequences placed this species into the “American” clade of the *Gibberella fujikuroi* species complex (O’Donnell et al. 2000). The discrepancy between the American phylogenetic origin and the isolation of NRRL 25622 from South Africa has been interpreted in terms of introduction of the species from South America on corn. This explanation would be consistent with the results of Steenkamp et al. (2001, 2002), who – using parsimony analysis of six nuclear regions from a set of 29 *bona fide* isolates of *F. subglutinans* – showed *F. subglutinans* to separate into two

stringly supported clades, of which one contained the mating type E tester strain, whereas the other clade contained *F. sp. 25622* and other isolates from South Africa and Central America (Mexico, Guatemala). Interestingly, congruence of individual tree lengths suggested that these two groups – although reported to be capable of mating under laboratory conditions (Steenkamp et al. 1999) – have already undergone reproductive isolation.

We do not know whether the occurrence of this species in Austria is also due to seed or crop import from Central or South America to Europe. It should be noted that the isolates from South Africa have been sampled since 1976, whereas the earliest sample of *F. sp. NRRL 25622* from Austria is known only from 1994. In any case, if the species was in fact introduced from elsewhere this must have been taking place at least 10 years ago, its dominance today being due to appropriate changes in the climatic conditions, and less likely due to recent introduction. Today, this population has apparently completely competed *F. subglutinans* because this species was not detected anymore in the samples from 2002 and 2003 (unpublished data).

Maize ear rot is not only a concern because of the significant crop loss, but also because of the contamination with mycotoxins. The new *Fusarium sp.* forms only moniliformin, thereby resembling *F. subglutinans*, which leads to intestinal haemorrhage and – in chronic studies – to heart dysfunction (Chelkowski et al. 1995). The LD50 for rodents is > 25 mg/kg, but in 4 day old cockerels only 4 mg/kg (<http://micotoxinas.com.br/monilifacts.htm>). While moniliformin production by the Austrian species is low compared to that obtained by *F. subglutinans* (Lew et al. 1991), the data nevertheless document that the present Austrian *Fusarium* population causing ear rot also presents a hazard with respect to food intoxication.



## Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Federal Austrian Ministry of Agriculture and Forestry (No. FP 1264) to RLM. The authors are grateful to K. O'Donnell for gift of strain F. sp. NRRL 25622, and to B. Wingfield, E. Steenkamp and W. Marasas for helpful comments and information.

## 6. References

- Adler A. (1993). Fusarien auf heimischen Feldfrüchten. Veröffentlichungen der Bundesanstalt für Agrarbiologie Linz/Donau 21, 43-51
- Charmley L.L., Rosenberg A. & Trenholm H.L. (1994) Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grain, foods and feedstuffs. In: Mycotoxins in Grains. Miller J.D. and Trenholm H.L. (eds). St. Paul, MN: Eagan Press. p471.
- Chelkowski J., Pronczuk, P., Lew, H. and Edinger, W. 1995. Occurrence of the mycotoxin moniliformin in maize (*Zea mays* L.) ears infested with *Fusarium subglutinans*. Food Additive and Contaminants 13, 321 - 324.
- Druzhinina, I.S., Chaverri, P., Payam, F., Kubicek, C.P. and Samuels, G.J. (2004) *Hypocrea flavoconidia*, a new species with yellow conidia from Costa Rica. Stud. Mycol., in press
- Geiser, D. M., del Mar Jimenez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G. and O'Donnell, K. 2004. Fusarium-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Europ. J. Plant Pathol. 110: 473 – 479.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754 - 755.

- Koehler B. (1959). Corn ear rot in Illinois. Illinois Agricultural Experiment Station Bulletin 639.
- Lew H., Adler, A. and Edlinger, W. (1991). Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). Mycotoxin Research 7, 71-76.
- Lew, H., A. Adler and W. Edinger (1991): Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). Mycotoxin Research 7A, 71 - 76.
- Lew, H., A. Adler, W. Edinger, W. Brodacz, E. Kiendler and J. Hinterholzer (2001): *Fusarium* species and their toxins in Austrian maize. Die Bodenkultur, 52: 199-207
- Middendorf, L.R., Bruce, J.C., Bruce, R.C., Eckles, R.D., Grone, D.L., Roemer, S.C., Sloniker, G.D., Steffens, D.L., Sutter, S.L., Brumbaugh, J.A. & Patonay, G. (1992). Continuous, on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus. Electrophoresis 13, 487 - 494.
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr. 1997. Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nirenberg, H. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. Mitt. Bundesanst. Land-Forstw. Berlin-Dahlem 169, 1-117.
- Nirenberg, H. I. (1981): A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. Can. J. Bot. 59, 1599 - 1609.
- Nirenberg, H.I., and O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90, 434-458.
- O'Donnell K. and Cigelnik E. (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution 7, 103-116

- O'Donnell, K., E. Cigelnik, and H. I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493
- O'Donnell K., Nirenberg H.I., Aoki T. & Cigelnik E. (2000) A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41: 61-78.
- Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304 - 311.
- Shurtleff M.C. Ed. (1980). Compendium of corn diseases. Published by the American Phytopathological Society.
- Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Coutinho T.A., Wingfield M.J. and Marasas W.F.O. (2000) Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3401 – 3406
- Steenkamp, E.T., Coutinho, T.A., Desjardins, A.E., Wingfield, B.D., Marasas, W.F.O. and Wingfield, M.J. (2001) *Gibberella fujikuroi* mating type population E is associated with maize and teosinte. *Mol. Plant Pathol.* 2, 215 – 221
- Steenkamp, E.T., Wingfield, B.D., Desjardins, A.E., Marasas, W.F.O. and Wingfield, M.J. (2002) Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 94, 1032 - 1043
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21 - 32.
- Visconti A., Boenke A., Doko M.B., Solfrizzo M., Pascale M. 1995. Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR - Measurements and Testing Programme. *Natural Toxins* 3: 269-274.

Yang Z, Rannala B (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 14: 717 - 724.

## **Legends to Figures**

### Figure 1

Phylogenetic position of Austrian *F. sp.* NRRL-like isolates in Bayesian analysis of the *tef1* large intron. Posterior probabilities are given in italic numbers over the branches.

### Figure 2

Phylogenetic position of Austrian *F. sp.* NRRL-like isolates in Bayesian analysis of the *tub1* large intron. Posterior probabilities are given in italic numbers over the branches.

strain	year of isolation	host/part of plant
MA1250	1994	Maize ear
MA1730	1994	Maize ear
MA1839	1999	Maize ear
MA1840	1999	Maize ear
MA1841	1999	Maize ear
MA1847	1999	Maize ear
MA1852	1997	Maize ear
MA1854	1997	Maize ear
MA1855	1997	Maize ear
MA1838	1999	Maize ear
MA1843	1999	Maize ear
MA1837	1999	Maize ear
MA1833	1999	Maize ear
MA1835	1999	Maize ear
MA1836	1999	Maize ear
MA1856	1995	Maize ear
MA1857	1995	Maize ear
MA1737	1995	Maize ear
MA1739	1995	Maize ear
M-0785	2001	Maize ear
M-0786	2001	Maize ear
M-0787	2001	Maize ear
M-0788	2001	Maize ear
M-0789	2001	Maize ear
M-0791	2001	Maize ear
M-0792	2001	Maize ear
M-0793	2001	Maize ear
M-0794	2001	Maize ear
M-0795	2001	Maize ear
M-0797	2001	Maize ear
M-0800	2001	Maize ear
M-0803	2001	Maize ear
M-0804	2001	Maize ear
M-0805	2001	Maize ear
M-0806	2001	Maize ear
M-0809	2001	Maize ear

**Tab. 1** Strains used throughout this study

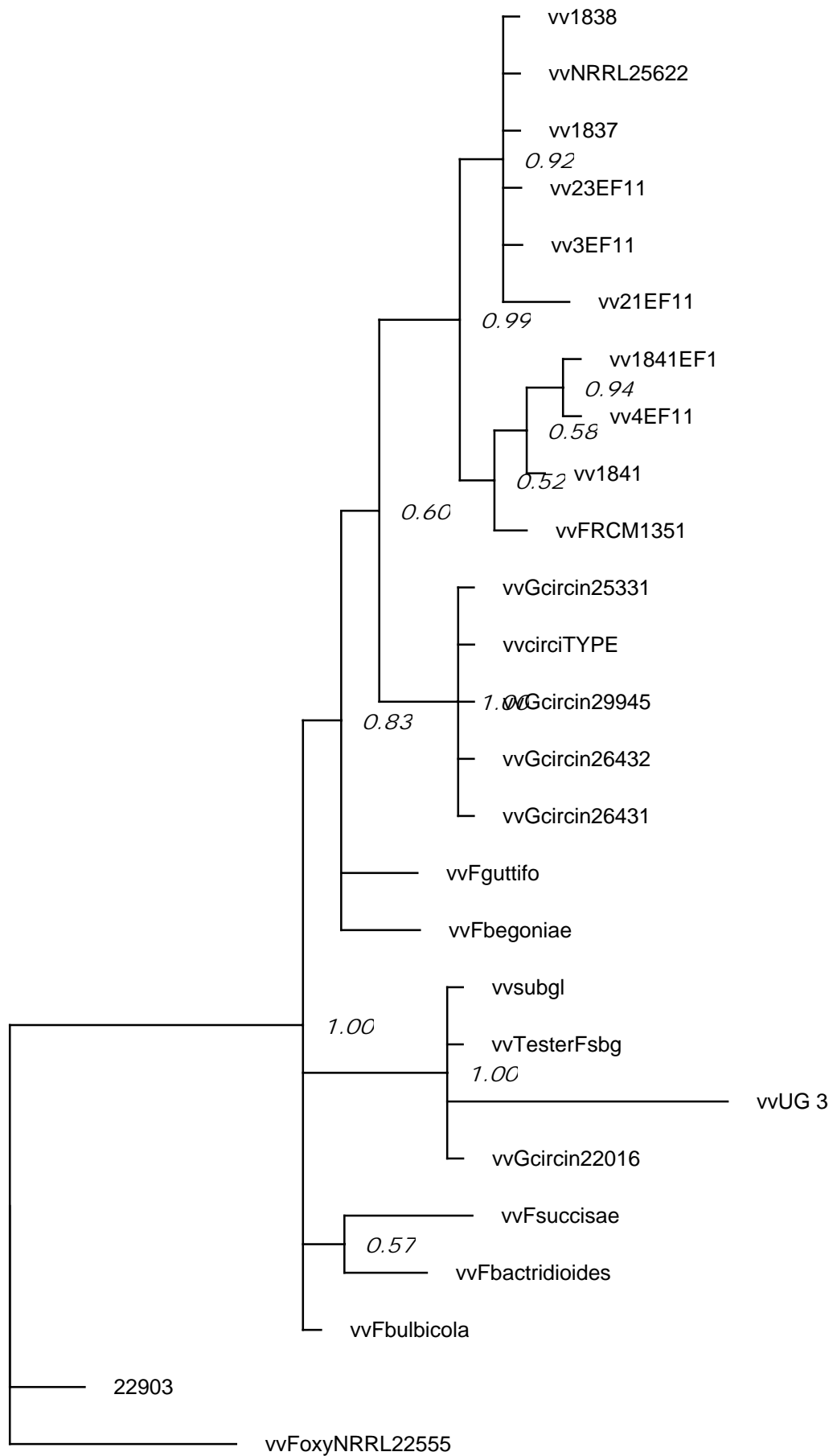
Number	Isolate	Species	Host	Part of plant	Location	Crop	Cultivar	Further description	Toxin production of <i>Fusarium</i> isolates on sterilized maize kernels (mg/kg)			
									MON	FUM B <sub>1</sub>	FUM B <sub>2</sub>	
M-2001-0035	MA 1837	subglutinans	Maize	ear	Großnondorf	NÖ	1998	Banguy	ex Adler 05.99 = 98-0664 D	6,2	n.d.	n.d.
M-2001-0036	MA 1838	subglutinans	Maize	ear	Großnondorf	NÖ	1998	Banguy	ex Adler 06.99 = 98-0664 L	1,3	n.d.	n.d.
M-2001-0037	MA 1839	subglutinans	Maize	ear	Breitbrunn	OÖ	1998	Banguy	ex Adler 07.99 = 98-0677 D	18	n.d.	n.d.
M-2001-0038	MA 1840	subglutinans	Maize	ear	Breitbrunn	OÖ	1998	Banguy	ex Adler 08.99 = 98-0677 I	12,5	n.d.	n.d.
M-2001-0039	MA 1841	subglutinans	Maize	ear	Gleisdorf	ST	1998	DK 300	ex Adler 09.99 = 98-0701 D	8,5	n.d.	n.d.
M-2001-0040	MA 1843	subglutinans	Maize	ear	Hörzendorf	K	1998	Prinz	ex Adler 11.99 = 98-0717 D	2,4	n.d.	n.d.
M-2001-0041	MA 76	verticillioides	Maize						DSM 62264	n.d.	65	21
M-2001-0042	MA 1856	verticillioides	Maize	ear	Hartberg	ST	1994		ex Adler 171.95 = 94-1372 A	n.d.	2,8	n.d.
M-2001-0043	MA 1857	verticillioides	Maize	ear	Breitbrunn	OÖ	1994		ex Adler 172.95 = 94-1400 R	n.d.	97	32
M-2001-0044	MA 1833	verticillioides	Maize	ear	Großnondorf	NÖ	1998	DK 300	ex Adler 01.99 = 98-0667 E	n.d.	42	13
M-2001-0045	MA 1835	verticillioides	Maize	ear	Breitbrunn	OÖ	1998	Prinz	ex Adler 03.99 = 98-0678 B	n.d.	40	25
M-2001-0046	MA 1836	verticillioides	Maize	ear	Hofing	OÖ	1998	Prinz	ex Adler 04.99 = 98-0721 A	n.d.	18	n.d.
M-2001-0047	MA 1730	proliferatum	Earth			China			BBA	26	113	20
M-2001-0094	MA 1250	proliferatum	Maize			USA			NRRL 13569	6,6	41	n.d.

detection limit for MON, FUM B<sub>1</sub>: < 0,5 mg/kg

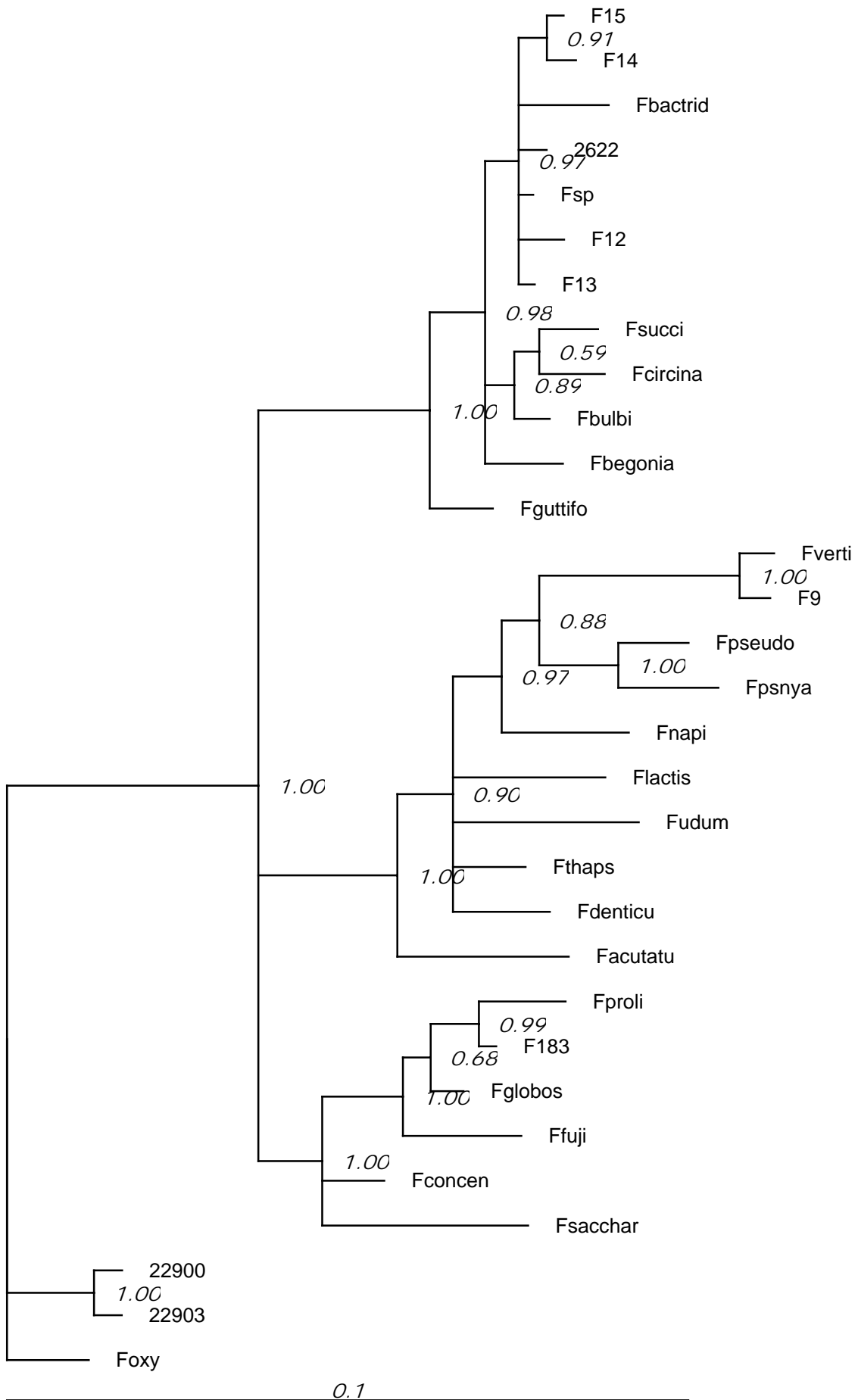
detection limit for FUM B<sub>2</sub>: < 1 mg/kg

n.d. = not detected

**Tab2.** Toxin production by selected isolates of the *G. fujikuroi* complex



0.1





## **4. Literaturverzeichnis**

Adler, A. (1993). "Fusarien auf heimischen Feldfrüchten." Veröff. Bundesanstalt für Agrarbiologie Linz **21**: 43-51.

Cullen, D. W., A. K. Lees, et al. (2001). "Conventional PCR and Real-time Quantitative PCR Detection of *Helminthosporium Solani* in Soil and on Potato Tubers." Eur. J. Plant Pathol. **107**: 387-398.

Doohan, F. M., G. Weston, et al. (1999). "Development and Use of a Reverse Transcription-PCR Assay To Study Expression of Tri5 by *Fusarium* Species In Vitro and In Planta." Appl. Environ. Microbiol. **65**(9): 3850-3854.

Edwards, S. G., S. R. Pirgozliev, et al. (2001). "Quantification of Trichothecene-Producing *Fusarium* Species in Harvested Grain by Competitive PCR To Determine Efficacies of Fungicides against *Fusarium* Head Blight of Winter Wheat." Appl. Environ. Microbiol. **67**(4): 1575-1580.

Filion, M., M. St-Arnaud, et al. (2003). "Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR." J. Microbiol. Methods **53**(1): 67-76.

Lee, T., Y. K. Han, et al. (2002). "Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*." Appl. Environ. Microbiol. **68**(5): 2148-54.

Lee, T., D. W. Oh, et al. (2001). "Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR." Appl Environ Microbiol **67**(7): 2966-72.

Lew, H. (1995). "Mykotoxinbelastung von Getreide und Konsequenzen für seine Verarbeitung." Getreide Mehl und Brot **49**: 16-19.

Marasas, W. F. O., P. E. Nelson, et al. (1984). Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. University Park, The Pennsylvania State University Press.

McCartney, H. A., S. J. Foster, et al. (2003). "Molecular diagnostics for fungal plant pathogens." Pest. Manag. Sci. **59**(2): 129-142.

Reischer, G. H., M. Lemmens, et al. (2004). "Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe." J Microbiol Methods **59**(1): 141-6.

Ruegg, J., M. Frank, et al. (1992). "Fusariumwelke an Cyclamen Biologische Bekämpfung mit Mycostop." Der Gartenbau **10**: 362-364.

Sweeney, M. J. and A. D. W. Dobson (1999). "Molecular biology of mycotoxin biosynthesis." FEMS Microbiol. Lett. **175**: 149-163.

Sweeney, M. J. and A. D. W. Dobson (1999). "Molecular biology of mycotoxin biosynthesis." FEMS Microbiology Letters **175**: 149-163.

Talbot, N. J., P. Vincent, et al. (1996). "The influence of genotype and environment on the physiological and metabolic diversity of *Fusarium compactum*." Fungal Genet Biol **20**(4): 254-67.

Winton, L. M., J. K. Stone, et al. (2002). "Simultaneous One-Tube Quantification of Host and Pathogen DNA with Real-Time Polymerase Chain Reaction." Phytopathol. **92**: 112-116.

# **A thorough investigation of the biological activity of Austrian *Fusarium spp.* on natural substrates**

**Prof. Dr. R. L. Mach, DI G. Reischer, Prof. Dr. C. Kubicek and Dr. Irina Druzhinina**

Fungi of the genus *Fusarium* are distributed in natural and agricultural soils throughout the world; their growth is saprophytic and they invade living plants and destroy the plant tissue. In Austria, the most of the damage is done in maize and other crops; however the pathogen also affects legumes, potato and some ornamental plants (Ruegg et al., 1992; Adler, 1993). The gravest part of the damage caused by the infection of plant material by *Fusarium* is not the decrease in production but the contamination of the crop by toxins formed by *Fusarium* species. These toxins are often only formed by specific species or even clonal populations (Lew, 1995; Talbot et al., 1996) which fact allows a rough prediction of the mycotoxin pattern by exact determination of the infecting species.

Strategies for control of the pathogen are currently based on the morphological and sometimes molecular biological identification of the Fusaria or on the detection of the produced toxins. The biggest drawback of this approach is the lack of correlation between species identification and toxin formation because of the strong differences in toxin formation by different but taxonomically closely related isolates. The reason for this phenomenon is the high genetic variability of imperfect fungal species. The species *Fusarium graminearum* (teleomorph: *Gibberella zeae*) plays an especially important role in Austria, but also in the rest of the world. This plant pathogenic fungus shows an ubiquitary distribution and is a source of several toxins, the Trichothecenes Nivalenol and Deoxynivalenol, and Zeralenon being the most relevant compounds.

The aim of this study was the development of a molecular biological detection system for *F. graminearum*. This system has to meet the demands of highest specificity, optimal sensitivity and the smallest possible time demand. Furthermore it has to be possible to detect and quantify *F. graminearum* directly from infected plant material. Thus it is possible omit the as yet necessary cultivation steps that are needed for the morphological Identification of the Fungus and which do not allow a Quantification of the fungal biomass. The developed method meets all these requirements for the quantification of *F. graminearum* in plant material (Reischer et al., 2004).

In addition a method for the quantitative detection of the activity of toxin production was developed. On the one hand the molecular biological analysis of genes contributing to toxin formation allows the differentiation of *Fusarium* strains in respect to the toxins they are producing (e.g.: differentiation between Nivalenol and Deoxynivalenol formation). On the other hand the quantitative detection of the expression rate of these genes in combination with the determination of the fungal biomass allows an estimation of the rate of toxin formation ergo the biological activity of the respective strain directly on the plant.

As part of the study the local population structure of *F. cf. subglutinans* was investigated. The results show that a new as yet not described species has become prevalent in the whole of Austria in the monitored timeframe (1994-2001). This species was proven not to be *F. subglutinans* and has replaced the selfsame species as a common isolate.

Adler, A. (1993). "Fusarien auf heimischen Feldfrüchten." Veröff. Bundesanstalt für Agrarbiologie Linz **21**: 43-51.

Lew, H. (1995). "Mykotoxinbelastung von Getreide und Konsequenzen für seine Verarbeitung." Getreide Mehl und Brot **49**: 16-19.

Reischer, G. H., M. Lemmens, et al. (2004). "Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe." J Microbiol Methods **59**(1): 141-6.

Ruegg, J., M. Frank, et al. (1992). "Fusariumwelke an Cyclamen Biologische Bekämpfung mit Mycostop." Der Gartenbau **10**: 362-364.

Talbot, N. J., P. Vincent, et al. (1996). "The influence of genotype and environment on the physiological and metabolic diversity of *Fusarium compactum*." Fungal Genet Biol **20**(4): 254-67.