

Nachweis von methylierten Tri5 und Tri14 Trichothezen-Genen in *Fusarium sporotrichioides* mit der Endonuklease *MspJI* bei Wirtspflanzen-Infektionen

Detection of the methylated Trichothecenegenes Tri5 and Tri14 in *Fusarium sporotrichioides* using the endonuclease *MspJI* during host plant infections

Zusammenfassung

Bei *Fusarium sporotrichioides* wurde die Methylierung von DNA der beiden Mykotoxin-Gene Tri5 und Tri14 bei verschiedenen Temperaturen und bei Infektionsbedingungen untersucht. Dazu wurde das Restriktionsenzym *MspJI* verwendet, das DNA immer nur dann schneidet, wenn diese auch bei der Nukleotid-Folge Guanosin/Cytosin (G/C) methyliert ist. Unmethylierte G/C-haltige DNA wird von diesem Enzym nicht geschnitten, weshalb hier in einfacher Weise eine Unterscheidung in der Methylierung möglich ist. Eine Restriktion oder Nichtrestriktion wurde mit PCR-Primern nachgewiesen, die die Sequenzen beider Gene abdeckten. So war eine Methylierung der für die Mykotoxin-Gene Tri5 und Tri14 codierende DNA mit *MspJI* nur nachweisbar, wenn *F. sporotrichioides* seine Wirtspflanzen Gerste und Mais erfolgreich infizierte. Alle anderen Bedingungen hatten keinen Einfluss auf die Methylierung der DNA beider Gene.

Stichwörter: Restriktionsendonuclease *MspJI*, *Fusarium*-DNA-Methylierung, PCR, Wirtspflanzen-Infektion

Abstract

A survey was made for *Fusarium sporotrichioides* on its methylation of DNA by choosing the mycotoxin genes Tri5 and Tri14 and applying different temperature and infection conditions. The restriction endonuclease *MspJI* was used which only digests DNA when the nucleotide

sequence Guanosin/Cytosine (G/C) is methylated. Unmethylated G/C-DNA is not restricted by this enzyme and therefore a differentiation is possible in a simple way. A successful restriction and non-restriction was proved by using PCR-primer, covering both genes. Methylation of the coding DNA for the two mycotoxin genes Tri5 and Tri14 was detected by *MspJI*, only when *F. sporotrichioides* infected its host plants barley and maize. All other conditions did not have any influence on the methylation of the two genes.

Key words: Restriction endonuclease *MspJI*, *Fusarium*-DNA-methylation, PCR, host plant infection

Einleitung

Mit Hilfe der Epigenetik, der Lehre von der Gen-Regulierung durch deren An- bzw. Ausschaltung, kann auch die Aktivität von Genen erkannt werden, die für die Pathogenese wichtig sind. Dabei handelt es sich um eine Methylierung bzw. Nicht-Methylierung von DNA-Abschnitten, die sich neuerdings in einfacher Weise mit Hilfe spezieller Restriktionsenzyme nachweisen lassen, die an ganz bestimmten methylierten nukleotiden Sequenzen die DNA schneiden können. Eines dieser Enzyme ist *MspJI*, das nur schneidet, wenn ein methyliertes Cytosin (^mC) neben zwei beliebigen Nukleotiden (N) und einem darauffolgenden Guanosin (G) oder Adenosin (A) [^mCNNG/A] liegt. Es schneidet dann in einer Distanz von 12 bis 16 Nukleotiden den DNA-Strang. Dieses Enzym

Institut

Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

Kontaktanschrift

PD Dr. Frank Niepold, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, E-Mail: frank.niepold@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

13. Oktober 2011

schneidet aber die gleiche DNA-Sequenz nicht, wenn das Cytosin unmethyliert ist (COHEN-KARNIA et al., 2011). Da die Erkennungssequenz ^mCNNG/A relativ unspezifisch ist, sind deshalb viele Schnittstellen im Tri5- und Tri14-Gen vorhanden, wenn eine Methylierung vorliegt. Mit dem Enzym *Msp*JI lässt sich also z.B. feststellen, ob bei einem pflanzenpathogenen Pilz ein bestimmtes Gen methyliert oder nicht methyliert ist, je nachdem, welche Bedingungen der Pilz vorfindet.

Der pflanzenpathogene Pilz *F. sporotrichioides* wurde für epidemiologische Studien aus der JKI-eigenen Stammsammlung verwendet, um diejenigen Methylierungen von Genen nachzuweisen, die bei Infektionen an- oder ausgeschaltet sind. Dazu dienten das Trichothezen (Tri)5-Gen und das Tri14-Gen aus dem 19 kb Mykotoxin-Cluster von *F. sporotrichioides* (WARD et al., 2002; ALEXANDER et al., 2009), da vermutet wird, dass speziell diese beiden Gene nicht nur in der Synthese von Mykotoxinen involviert sind, sondern auch mit der Virulenz des Pilzes in Verbindung stehen (BROWN et al., 2001; DREYER et al., 2007).

Mit einer Kombination der Restriktionsanalyse mit *Msp*JI und einem anschließenden PCR-Nachweis des Tri5- und des Tri14-Gens konnte der Methylierungszustand der Gene unter den gewählten Bedingungen nachgewiesen werden, da das Restriktionsenzym *Msp*JI ausschließlich die methylierten ^mCNNG/A-Regionen im Genom schneidet. Das Tri5- und das Tri14-Gen wurden immer dann mit der Endonuklease *Msp*JI geschnitten, d.h. die Gene waren methyliert, wenn *F. sporotrichioides* auf seinen Wirtspflanzen Gerste und Mais wuchs. Es war kein PCR-Fragment nachweisbar, weil die geschnittene DNA nicht mehr komplett war und in der PCR mit den spezifischen Primern kein Fragment zeigte. Unter anderen Bedingungen – wie Warm- und Kalt-Aufzuchten auf Agarnährböden, oder DNA extrahiert aus Sporen – war keine Methylierung des Tri5- oder des Tri14-Gens mit der *Msp*JI-Restriktionsanalyse nachzuweisen. Da das DNA-Fragment ungeschnitten geblieben war, war somit auch ein PCR-Signal sichtbar.

Bei Verwendung der Gruppe von Restriktionsenzymen, die eine Methylierung zum Schneiden als Voraussetzung haben, ermöglicht diese neue Methode epidemiologische Untersuchungen von Pflanzenpathogenen, da diejenigen Gene, die während der Pathogenese angeschaltet oder ausgeschaltet sind, durch ihre Methylierung bzw. Nichtmethylierung identifizierbar sind.

Material und Methoden

Anzucht und Kultivierung von *F. sporotrichioides*
F. sporotrichioides 69072 (isoliert von Weizen) stammt aus der JKI-eigenen Stammsammlung und wurde für alle durchgeführten Versuche als Myzel auf Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA) angeimpft und kultiviert. Sporen wurden nach zwei Monaten Inkubation bei Raumtemperatur vom PDA geerntet, in sterilem Wasser suspendiert und ihre Konzentration mikroskopisch bestimmt.

Inokulation von *F. sporotrichioides* in Gerstenähren und Maiskolben

Das verwendete *Fusarium* wurde als ausgeschnittene Myzel-Agar-Stücke entweder am Stängelende von abgeernteten Gerstenähren oder embryonalen Maiskolben in Petrischalen mit angefeuchtetem Papier bei 100% Luftfeuchte aufgelegt. Parallel wurde Myzel von *F. sporotrichioides*, gewachsen auf PDA-Petrischalen, an die Basis von embryonalen Maiskolben gegeben und ebenfalls in Petrischalen mit 100%iger Luftfeuchte inkubiert. Nach vier, sechs, bzw. 13 Tagen erfolgte eine Sichtbonitur, und anschließend wurden die Spitzen der Ähren bzw. Maiskolben abgeschnitten und die DNA-Extraktion mit DNA-Aufreinigungsröhrchen (DNeasy-Plant Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde für weitere Aufarbeitungen bei -20°C aufbewahrt.

Nachweis der Methylierung beim Tri5- bzw. Tri14-Gen bei *F. sporotrichioides* durch die Restriktion mit der Endonuklease *Msp*JI mit anschließender PCR

Die Endonuklease *Msp*JI wurde nach den Vorschriften der Fa. Biozym (Frankfurt/M.) angewendet. Um eine komplette Restriktion von methylierter *Fusarium*-DNA zu erzielen, wurde die Endonuklease 17 h bei 37°C und mit je ca. 500 ng DNA über DNA-Säulen gereinigte DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl inkubiert. Ein Aliquot von 2 µl wurde für die daran sich anschließende PCR zum Nachweis des Tri5- und Tri14-Gens verwendet, in 30 µl Gesamtvolumen. Zur Kontrolle wurde der gleiche Ansatz parallel ohne das Enzym *Msp*JI zeitgleich inkubiert.

Zum Nachweis der Methylierung des Tri5-Gens wurden die Primersequenzen 5' agcgactacaggtcttcctc 3' (Forward-Primer) und 5' aaaccatccagttctccatct 3' (Reverse-Primer) verwendet (DOOHAN et al., 1999), die bei *F. sporotrichioides* ein PCR-Amplifikat von 680 bp ergaben. Die 21mer-Primersequenzen zum Nachweis des Tri14-Gens wurden mit einem PCR-Primer-Programm vom sequenzierten *F. sporotrichioides* Tri-Gencluster aus der NCBI-Datenbank mit der Zugangsnummer AF359360 gewonnen und lauten 5'ggagagttcttcccgttaa 3' für den Forward-Primer und 5'ttcgcagttctgaactcgt 3' für den Reverse-Primer, wobei sich ein Amplifikat von 563 bp ergab. Es war immer dann ein Amplifikat sichtbar, wenn die chromosomale DNA nicht mit der Endonuklease *Msp*JI geschnitten wurde.

Ergebnisse

Restriktionsanalyse von chromosomaler DNA aus *Fusarium sporotrichioides*, gewachsen unter verschiedenen Bedingungen

Das *Fusarium sporotrichioides*-Isolat 69072 wurde auf PDA-Petrischalen unter verschiedenen Temperaturen kultiviert, um so den Einfluss von physikalischen Bedingungen auf die Methylierung der Tri14-DNA zu ermitteln. Dazu wurde chromosomale *F. sporotrichioides*-DNA über Qiagen DNA-Säulen extrahiert und anschließend mit

dem Restriktionsenzym *Msp*JI geschnitten. Da nur methylierte DNA von diesem Enzym geschnitten wird, wird ein methyliertes Tri14-Gen komplett zerschnitten. Die anschließend durchgeführte PCR mit den Tri14-spezifischen Primern zeigt nur bei ungeschnittenen intakten, also nicht methylierten DNA-Fragmenten im Agarosegel eine sichtbare Bande an.

Alle Bedingungen (10°C, 30°C, Raumtemperatur und auch die DNA aus Sporen) zeigten das Vorhandensein von PCR-Fragmenten an, wenn die DNA zuvor mit der Endonuklease *Msp*JI geschnitten worden war (Abb. 1).

Experimente zur Erfassung der Funktion des Tri14-Gens bei der Infektion von Ähren

Eine der Schlüsselfragen im Zusammenhang des Tri14-Gens zur Pathogenese sollte ein Infektionsversuch von *F. sporotrichioides* an jungen Getreideähren zeigen. Dazu wurde der Methylierungsgrad des Tri14-Gens nach erfolgter Infektion an Gerstenähren, ebenfalls eine Wirtspflanze, untersucht. Den am Stängelende inokulierten Gerstenähren wurden nach 4 bzw. 6 Tagen die Spitzen abgeschnitten und die DNA des darauf gewachsenen Myzel- und Pflanzenmaterials mit einem Qiagen-DNA-Säulchen extrahiert. Wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *Msp*JI geschnitten, zeigte die anschließende PCR des Tri14-Gens kein Fragment. Demzufolge fand also nach der erfolgten Infektion eine Methylierung statt, denn die Tri14-DNA wurde mit *Msp*JI komplett zerschnitten, weshalb kein PCR-Fragment sichtbar war. Die als Kontrollen fungierenden Extraktionen von auf PDA gewachsener Myzel- und Sporen-DNA zeigten keine Methylierung. Um den Erfolg der Restriktion mit der Endonuklease *Msp*JI zu zeigen, wurde ungeschnittene chromosomale DNA in der PCR mit den gleichen Tri14-Primern amplifiziert, die alle das erwartete PCR-Fragment von 563 bp zeigten (Abb. 2). Nach vier Tagen Inkubationszeit war die Infektion von *F. sporotrichioides* noch nicht bis



Abb. 1. Temperatureinflüsse auf die Methylierung der Tri14-DNA. Nach der DNA-Extraktion und kompletter Restriktion über Nacht mit dem Enzym *Msp*JI, sowie anschließender PCR, war bei allen Proben ein Fragment von 563 bp sichtbar. Die ungeschnittenen Proben sind zum Vergleich neben den mit *Msp*JI geschnittenen Proben aufgetragen (1a–5a). S = 100 bp DNA-Standard der Fa. Biolabs, 1 = Wasserkontrolle, 2 = *F. sporotrichioides* kultiviert bei Raumtemperatur, 3 = *F. sporotrichioides* kultiviert bei 10°C, 4 = *F. sporotrichioides* kultiviert bei 30°C, 5 = *F. sporotrichioides* Sporen-DNA. Proben 1a bis 5a repräsentieren die ungeschnittenen Kontrollen.

zur Ährenspitze vorgedrungen, weshalb sich auch kein PCR-Signal bei der *Msp*JI-geschnittenen bzw. ungeschnittenen Probe nachweisen ließ (Abb. 2).

Verwendung des Tri5-Gens zum Nachweis der Methylierung bei *F. sporotrichioides* während der Infektion von Pflanzenmaterial

Ob nur speziell das Tri14-Gen während der Infektion methyliert ist oder auch andere Strukturgene des Tri-Genklusters, wurde am Tri5-Gen untersucht, das die Trichodiensynthese codiert und am Synthesebeginn des Mykotoxins steht (PROCTOR et al., 1995). Dazu wurden die Tri5-Primer (DOOHAN et al., 1999) im gleichen Versuchsansatz wie die Tri14-Primer verwendet. Das dabei amplifizierte PCR-Fragment war bei *F. sporotrichioides* mit 680 bp größer als beim verwendeten *F. graminearum*-Isolat (545 bp, DOOHAN et al., 1999).

Bei Verwendung der Tri5-Primer zeigte sich, dass das Tri5-Gen von *F. sporotrichioides* bei der Infektion an der Gerstenähre ebenfalls methyliert ist, also kein PCR-Fragment mit den Tri5-Primern gebildet wird. Die Kontrollen zeigten die erwarteten Ergebnisse, indem sie alle ein PCR-Fragment von 680 bp amplifizierten (Abb. 3).

Infektion anderer Wirtspflanzen von *F. sporotrichioides* am Beispiel von Mais und der Untersuchung auf Methylierung der Tri14-DNA

F. sporotrichioides infiziert neben Getreide auch andere Wirtspflanzen wie z.B. Mais. Um die Bedeutung der beiden Tri-Gene 5 und 14 auch bei der Infektion beim Mais

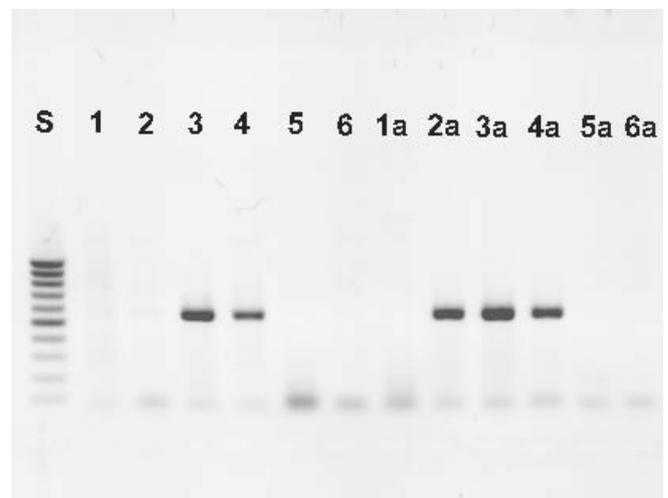


Abb. 2. Unterschiedliche Methylierung von *F. sporotrichioides* bei Infektion von Gerstenähre und Myzel-Wachstum auf PDA bzw. Sporen-DNA. Deutlich kann der Unterschied in der PCR zwischen der mit *Msp*JI geschnittenen (2) und der ungeschnittenen Ährenprobe (2a) gezeigt werden, wenn die Tri14-Primer verwendet werden. Sämtliche Kontrollen sind nicht methyliert und zeigen die erwarteten Fragmente von 563 bp in den *Msp*JI geschnittenen sowie ungeschnittenen Varianten an. Nach einer Inkubation von nur vier Tagen ließ sich kein PCR-Signal von *F. sporotrichioides* auf der Ähre nachweisen. S = 100 bp DNA-Standard, 1 = Gerstenähre infiziert mit *F. sporotrichioides*, 4 Tage Inkubation, 2 = Gerstenähre infiziert mit *F. sporotrichioides*, 6 Tage Inkubation, 3 = *F. sporotrichioides*-Sporen-DNA, 4 = Myzel auf PDA gewachsen, 5 = Gerste gesund, 6 = Wasserkontrolle. Proben 1a bis 6a repräsentieren die ungeschnittenen Kontrollen.

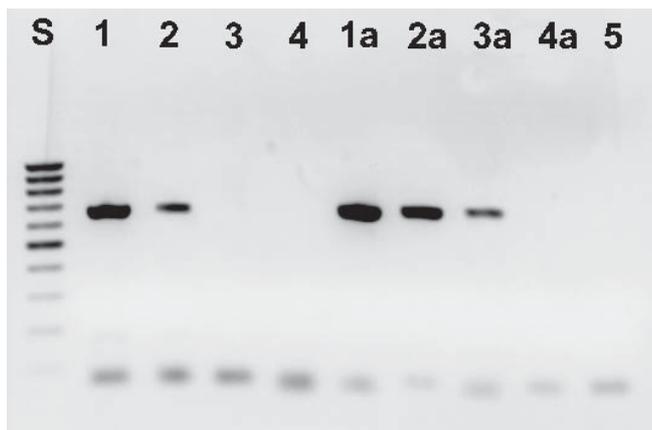


Abb. 3. Unterschiedliche Methylierung von *F. sporotrichioides* bei Infektion von Gerstenähre und Wachstum auf PD-Agarplatte bzw. Sporen-DNA. Auch hier kann deutlich der Unterschied in der PCR zwischen der mit *Msp*JI geschnittenen und der ungeschnittenen Ährenprobe gezeigt werden, wenn die Tri5-Primer verwendet werden. Sämtliche Kontrollen sind nicht methyliert und zeigen die erwarteten Fragmente in den geschnittenen sowie ungeschnittenen Varianten an. Das mit den Tri5-Primern erhaltene Amplifikat hat eine Größe von 680 bp.

S = 100 bp DNA-Standard, 1 = Myzel auf PDA gewachsen, 2 = *F. sporotrichioides*-Sporen-DNA, 3 = Gerstenähre infiziert mit *F. sporotrichioides*, 6 Tage Inkubation, 4 = Gerste gesund, 5 = Wasserkontrolle. Proben 1a bis 4a repräsentieren die ungeschnittenen Kontrollen.

zu untersuchen, wurden Maiskolben im Embryonalstadium an der Pflanze und am Übergang Stängel-Maiskolben in der Petrischale mit einer *F. sporotrichioides*-Myzel-Suspension infiltriert. Nach einer Inkubationszeit von 12 Tagen bei Raumtemperatur wurde das Myzelwachstum bonitiert und an der Basis und Spitze des Maiskolbenembryos die DNA extrahiert (Abb. 4).



Abb. 4. Infektion von Maiskolbenembryonen mit *F. sporotrichioides*. Die Ausgangsinfektion fand am Kolbenende statt. Das Myzel wurde nach 13 Tagen an der Basis und Spitze des Kolbens geerntet und die DNA mit dem Qiagen-Säulchen-Kit aufgearbeitet.

Auch hier unterschied sich die Methylierung zwischen dem auf PDA gewachsenen *F. sporotrichioides* und dem auf dem Maiskolben kultivierten Pilz. Zeigte sowohl die auf Nährboden als auch die direkt an der Inokulationsstelle extrahierte DNA keine Restriktion der *Msp*JI-Endonuklease und demzufolge auch ein PCR-Signal mit den Tri5 und Tri14-Primern, so war nur an der Spitze nach 13 Tagen eine Methylierung der chromosomalen DNA von *F. sporotrichioides* nachzuweisen (Abb. 5 und 5a).

Zur Überprüfung der erfolgreichen Restriktion der chromosomalen DNA bei *F. sporotrichioides* wurde einmal die mit *Msp*JI gesplante DNA und im Vergleich dazu die ungesplante DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen (Abb. 6). Eine deutliche Bande von 32 bp tritt nach der Restriktion der DNA von *F. sporotrichioides*-Pilzmyzel, gewachsen an der Maiskolbenspitze, auf. Diese Bande ist nach Angabe der Vertreiberfirma Biolabs ein Indiz für

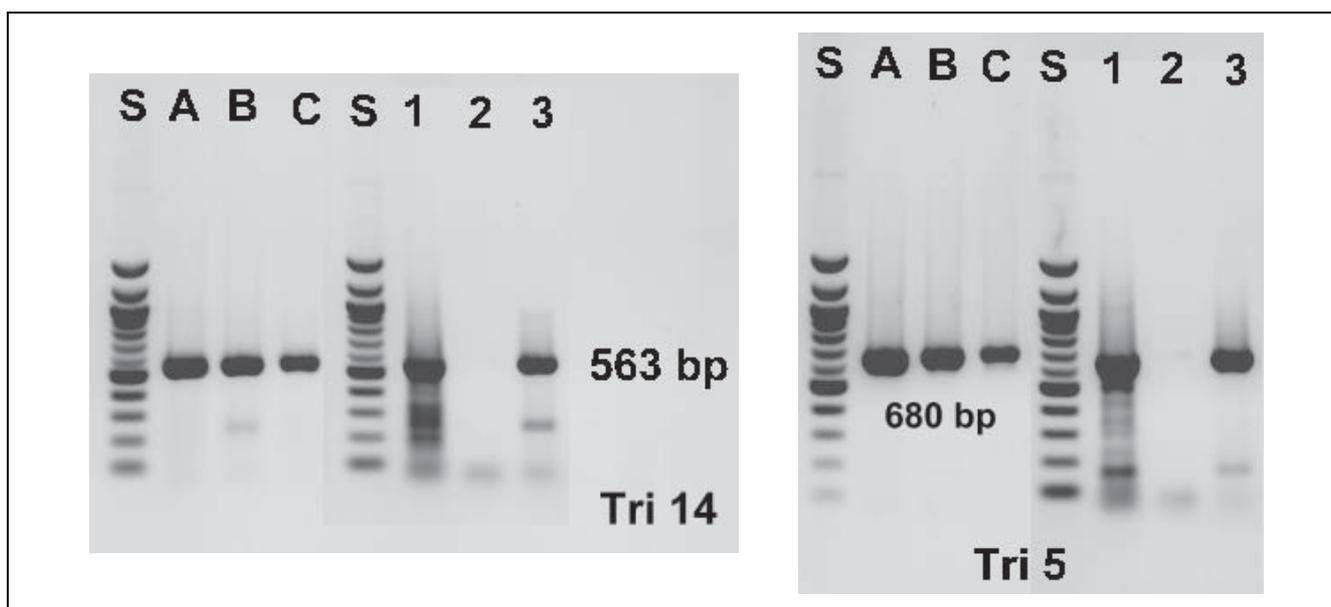


Abb. 5 und 5a. Methylierungsmuster von *F. sporotrichioides* bei Infektion von embryonalem Maiskolben und Wachstum auf PD-Agarplatte. Hier kann ebenfalls deutlich der Unterschied in der PCR zwischen der mit *Msp*JI geschnittenen und der ungeschnittenen, infizierten Maiskolbenprobe gezeigt werden, wenn die Tri5- bzw. Tri14-Primer verwendet werden. Links (A, B, C) sind in beiden Abbildungen die ungeschnittenen Kontrollen und rechts die mit *Msp*JI geschnittenen (1, 2, 3) Proben zu sehen. Nur die extrahierte DNA von *F. sporotrichioides* (B bzw. 2) an der infizierten Maiskolbenspitze (s. Abb. 4) ist methyliert und mit *Msp*JI schneidbar, an der Basis nicht (A bzw. 1). Als Marker wurde der 100 bp DNA-Standard der Fa. Nextec verwendet.

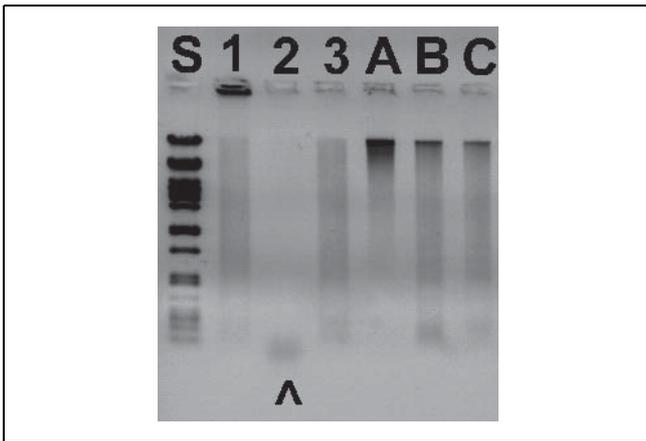


Abb. 6. Vergleich von *MspJI* geschnittener (1–3) und ungeschnittener (A–C) chromosomaler DNA von *F. sporotrichioides*. Die Proben entsprechen denen von Abb. 5, bevor eine PCR durchgeführt wurde. Deutlich ist die 32 bp-Bande (Pfeil) bei der Probe 2 (Pilz-DNA aus der Spitze des Maiskolbens) zu sehen, die nach COHEN-KARNIA et al. (2011) immer dann zu sehen ist, wenn eine Methylierung vorlag und die Restriktion mit *MspJI* somit erfolgreich war.

eine erfolgreiche *MspJI*-Restriktion bei methylierter DNA. Damit wird das mit der PCR erhaltene Ergebnis bestätigt (vgl. Abb. 5 und 5a).

Diskussion

F. sporotrichioides synthetisiert wie fast alle pflanzenpathogenen Fusarien Mykotoxine. Diese gehören dem Trichothezen (Tri)-Typ A an und sind hoch toxisch für Mensch und Tier (FOROUD und EUDES, 2009). Für eine mögliche Inaktivierung oder Hemmung des gesamten Mykotoxin-Komplexes ist es wichtig, diejenigen Mechanismen bei *F. sporotrichioides* zu verstehen, die für die Synthese von Mykotoxinen verantwortlich sind. Ein Weg, Faktoren zu evaluieren, die den gesamten Mykotoxin-Tri-Genkomplex von mindestens 14 geklusterten Genen bei *F. sporotrichioides* beeinflussen, ist das Ein- oder Ausschalten von Genen durch Methylierung. Methylierungen innerhalb der DNA sind mittlerweile in einfacher Weise mit dem Restriktionsenzym *MspJI* nachweisbar (COHEN-KARNIA et al., 2011).

Bei den hier durchgeführten Infektionsversuchen mit *F. sporotrichioides* zeigte sich an der Gerstenähre am Tri14-Gen und auch an der alternativen Wirtspflanze Mais (embryonaler Maiskolben) am Tri5- und Tri14-Gen, dass sowohl das Tri5- als auch das Tri14-Gen immer dann methyliert ist, wenn *F. sporotrichioides* beide Pflanzenarten infiziert hatte. Keine Methylierung hingegen war feststellbar, wenn der Pilz Temperaturschwankungen ausgesetzt oder es zu einer Sporenbildung gekommen war.

In vorherigen Untersuchungen hingegen zeigte ein anderes *F. sporotrichioides*-Isolat mit der Nummer 62423 aus der JKI-Stammsammlung (isoliert von Kiefer) eine Beeinflussung der Methylierung beim Temperaturwech-

sel (NIEPOLD, 2011). Diese unterschiedlichen Ergebnisse machen deutlich, dass es sich bei *F. sporotrichioides* um eine sehr heterogene Pilzart handelt, die unterschiedlich auf äußere Einflüsse reagiert.

Nach STEPHENS et al. (2008) sind sowohl Tri5 als auch Tri14 als Virulenzgene beim verwandten *Fusarium graminearum* identifiziert worden und sind deshalb während der Infektion vermehrt angeschaltet (up-regulated). Die synchrone Methylierung der beiden Tri-Gene 5 und 14 passt also zu den Genexpressionsergebnissen. Die Methylierung beider Gene bedeutet aber auch, dass diese während der Infektion wohl nicht ablesbar sind, d.h. sie sind ausgeschaltet oder stumm. Dieser Widerspruch könnte sich aber wie folgt aufklären lassen: STEPHENS et al. (2008) beschreiben, dass zum Beginn der Infektion die beiden Gene Tri 5 und 14 bei *F. graminearum* eine hohe Expression zeigen; dennoch sind nur geringe Mengen an Mykotoxin während der ersten Infektionsphase nachweisbar. Erst 28 Tage nach Infektion lassen sich dann wieder große Mengen von Mykotoxinen nachweisen.

So wären die Methylierungsergebnisse der Tri5- und 14-Gene bei *F. sporotrichioides* dadurch erklärbar, dass eine Abwehrreaktion der Wirtspflanze in Form von reaktiven Sauerstoffverbindungen (z.B. H_2O_2) so lange wie möglich unterdrückt werden soll, bis sich der Pilz komfortabel in der Pflanze ausgebreitet hat. Das konnte beim von Fusarien gebildeten Toxin Deoxynivalon (DON) gezeigt werden. Die Synthese dieses Toxins findet erst relativ spät statt, um zu verhindern, dass die Pflanze zu früh mit Abwehrreaktionen (Ausschüttung von H_2O_2) auf den Pilz reagiert (DESMOND et al., 2008).

Auch MUDGE et al. (2006) konnten zeigen, dass zwar eine Expression von Mykotoxin-Genen während der frühen Infektion stattfand, dass aber die Mykotoxine nur in geringen Mengen synthetisiert wurden.

So sollte nach den Ergebnissen der beiden Veröffentlichungen eine Demethylierung des Tri5- und Tri14-Gens erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion erfolgen, um so größere Mengen an Toxinen zu bilden. Diese Hypothese soll am Beispiel von *F. graminearum* am Mais untersucht werden. Da beim Tri14-Gen bislang keine eindeutige funktionelle Zuordnung stattfand, konnten die *MspJI*-Restriktionsanalysen zumindest einen Zusammenhang zwischen Infektion und Methylierung des Tri14-Gens nachweisen. Auch das Tri5-Gen, das für den ersten Schritt der Trichothezen-Biosynthese zuständig ist, wurde parallel zum Tri14-Gen methyliert, sodass hier wohl beide Gene im Regulationsmechanismus für die Synthese von Trichothezenen im Einklang stehen, wie PROCTOR et al. (1995) vermuteten. Ein paralleler serologischer Nachweis könnte dann diese Ergebnisse bestätigen.

Bei der Fragestellung zum Einfluss der minimalen Aufwandmengen von Fungiziden auf die Mykotoxin-Produktion soll die Methylierung von Tri-Genen herangezogen werden. DOOHAN et al. (1999) hatten bereits beim Tri5-Gen gezeigt, dass eine Inkubation von Fusarien mit den Fungiziden Prochloraz und Tebuconazol eine höhere Tri5-Genexpression zur Folge hatte. Dieses wird auch in

einer neueren Arbeit von AUDENAERT et al. (2010) bestätigt, die zeigte, dass subletale Konzentrationen des Fungizids Prothioconazol zu einer verstärkten DON-Bildung bei *F. graminearum* führten. So ließe sich mit der *MspJI*-Methylierungsanalyse der Einfluss von verschiedenen Fungiziden mit unterschiedlichen Angriffsorten auf die Methylierung der Tri-Gene in Zukunft bestimmen.

Danksagung

Frau S. BONSE aus unserem Institut danke ich für ihre exzellente technische Arbeit, Frau Dr. K. RICHERT-PÖGGELER für die kritische Durchsicht dieser Veröffentlichung und Frau Dr. E. OLDENBURG, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, für die Bereitstellung von Maispflanzenmaterial.

Literatur

- ALEXANDER, N.J., R.H. PROCTOR, S.P. MCCORMICK, 2009: Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* **28**, 198-215.
- AUDENAERT, K., E. CALLEWAERT, M. HÖFTE, S. DE SAEGER, G. HAESAERT, 2010: Hydrogen peroxide induced by the fungicide prothioconazole triggers deoxynivalenol (DON) production by *Fusarium graminearum*. *BMC Microbiology* **10**, 112.
- BROWN, D.W., S.P. MCCORMICK, N.J. ALEXANDER, R.H. PROCTOR, A.E. DESJARDINS, 2001: A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **32**, 121-133.
- COHEN-KARNIA, D., X. DERRICK, L. APONE, A. FOMENKOV, S. ZHIYI, P.J. DAVIS, S.R. MOREY KINNEY, M. YAMADA-MABUCHI, X. SHUANG-YONG, T. DAVIS, S. PRADHAN, R.J. ROBERTS, Z. YU, 2011: The *MspJI* family of modification-dependent restriction endonucleases for epigenetic studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (27), 11040-11045.
- DESMOND, O.J., J.M. MANNERS, A.E. STEPHENS, D.J. MACLEAN, P.M. SCHENK, D.M. GARDINER, A. MUNN, K. KAZAN, 2008: The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 435-445.
- DOOHAN, F.M., G. WESTON, H.N. REZANOOR, D.W. PARRY, P. NICHOLSON, 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**, 3850-3854.
- DREYER, J., H. EICHHORN, E. FRIEDLIN, H. KURNSTEINER, U. KÜCK, 2007: A homologue of the *Aspergillus* velvet gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 3412-3422.
- FOROUD, N.A., F. EUDES, 2009: Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 147-173.
- MUDGE, A.M., R. DILL-MACKY, Y.H. DONG, D.M. GARDINER, R.G. WHITE, J.M. MANNERS, 2006: A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **69**, 73-85.
- NIEPOLD, F., 2011: Epigenetik – ein neuer Weg, Reaktionen pflanzenpathogener Pilze zu verstehen. *Journal für Kulturpflanzen* **63**, 29-32.
- PROCTOR, R.H., T.M. HOHN, S.P. MCCORMICK, A.E. DESJARDINS, 1995: *Tri6* encodes an unusual zinc-finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1923-1930.
- STEPHENS, A.E., D.M. GARDINER, R.G. WHITE, A.L. MUNN, J.M. MANNERS, 2008: Phases of infection and gene expression of *Fusarium graminearum* during Crown Rot Disease of wheat. *MPMI* **21**, 1571-1581.
- WARD, T.J., J.P. BIELAWSKI, H.C. KISTLER, E. SULLIVAN, K. O'DONNELL, 2002: Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9278-9283.