



Zastosowanie metod molekularnych do wykrywania, identyfikacji i charakterystyki grzybów z rodzaju *Fusarium*

Barbara Golińska, Dorota Narożna, Cezary J. Mądrzak
Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Molecular Methods for Detection, Identification and Characterization of *Fusarium*

Summary

Pathogenic fungi of the genus *Fusarium* form a diverse, cosmopolitan group of species. Their importance is significant due to the fact that they are responsible for numerous storage rots, plant diseases and human and animal disease caused by *Fusarium* toxic secondary metabolites. By reason of great extent of variability and plasticity of *Fusarium* easily accommodating to changing environmental condition, this genus comprises of species that remain very challenging for systematics. Since the reliable and simple detection methods are essential to avoid the losses and health risks, molecular biology methods have been recently implemented for the analysis of *Fusarium* populations. In this paper, we present a review of selected PCR-based techniques applicable for diagnostic and taxonomic purposes. The RAPD analysis, followed by SCAR-PCR and RFLP method to study fungal rDNA are presented. A number of primer sequences useful for the above methods are also listed.

Key words:

Fusarium, pathogenic fungi, RAPD, SCAR, RFLP, molecular taxonomy.

1. Wprowadzenie

Rodzaj *Fusarium* tworzą kosmopolityczne gatunki grzybów szeroko rozpowszechnione w glebie, oraz na podłożach organicznych wszystkich stref klimatycznych świata. Organizmy zali-

Adres do korespondencji

Cezary J. Mądrzak,
Katedra Biochemii
i Biotechnologii,
Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego,
ul. Wołyńska 35,
60-637 Poznań;
e-mail:
madrzak@owl.au.poznan.pl

czane do tej grupy mogą żyć jako saprofity; są także groźnymi patogenami roślin wyższych, a w rzadkich przypadkach również – zwierząt. Zainteresowanie biologią rodzaju *Fusarium* datuje się od końca wieku XIX i wynika nie tylko stąd, że porażenia roślin wyższych (fuzariozy) powodują znaczne straty w plonach, lecz spowodowane jest również faktem, iż grzyby te mają zdolność syntezy mikotoksyn – specyficznych metabolitów wtórnych – nazywanych w tym przypadku również toksynami fuzaryjnymi lub fuzariotoksynami. Zdolność do syntezy mikotoksyn nie jest bowiem unikatowa dla rodzaju *Fusarium*; cechuje ona również gatunki klasyfikowane w obrębie innych rodzajów grzybów, np. *Alternaria*, *Aspergillus* i *Penicillium*.

Zakażenia roślin wyższych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (porażenia fuzaryjne) objawiają się jako choroby roślin. Z oczywistych względów, szczególną uwagę poświęca się chorobom roślin uprawnych takim jak: fuzarioza kłosów (również – wiech i kolb), zgorzel siewek, zgnilizna podstawy źdźbła (2). Występowanie chorób fuzaryjnych nie ogranicza się do roślin jednoliściennych (zbóż). Duże straty wywołują groźne tracheomikozy, takie jak: fuzaryjne więdnienie goździka, fuzaryjne więdnienie pomidora (zgorzel naczyniowa pomidora), czy sucha zgnilizna bulw ziemniaka. To, że znacznie mniej wiemy o fuzariozach roślin dziko rosnących wynika nie tylko z faktu, że nie mają one, z reguły, znaczenia dla gospodarki żywnościowej, ale również stąd, iż rośliny uprawiane w monokulturze są znacznie bardziej podatne na masowe porażenia niż gatunki będące składnikami naturalnych zespołów roślinnych.

Aby uzmysłowić sobie wielkość strat powodowanych przez choroby fuzaryjne wystarczy stwierdzić, że w samym tylko roku 1990, w USA, wartość utraconych z powodu fuzariozy kłosów (*Fusarium Head Blight* – FHB) plonów pszenicy i jęczmienia wyniosła 3 mld USD (dane z pracy van Sanford i in. (3))

Znacznie groźniejszym w skutkach niż zmniejszenie plonu, i wynikające stąd straty ekonomiczne, aspektem porażenia upraw przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium* jest zanieczyszczenie płodów rolnych toksynami fuzaryjnymi. Szacuje się, że średnio 20-30% plonów może zawierać te związki (4).

Mikotoksyny to duża i zróżnicowana grupa związków syntetyzowanych jako wtórne metabolity grzybów. Uważa się, że ponad 350 gatunków grzybów syntetyzuje ponad 300 związków zaliczanych do tej klasy (5). Znaczna ich liczba syntetyzowana jest również przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Wśród toksycznych metabolitów wtórnych *Fusarium*, największe znaczenie mają związki będące pochodnymi diketopiperazyn, poliketydów, oraz syntetyzowane w przemianach kwasu mewalonowego, jako pochodne farnezylowe – seskwiterpeny. Tworzą one liczną i ważną grupę trichotecenów. Ponadto mikotoksyny mogą być peptydami, a także diterpenami (6). Toksynotwórcze właściwości różnych gatunków *Fusarium* są stosunkowo obszernie opisane w literaturze (7-17).

2. Identyfikacja i klasyfikacja *Fusarium*

Dla uniknięcia opisanych zagrożeń, niezbędne jest możliwie dokładne poznanie natury tych organizmów. Tymczasem, nawet klasyfikacja organizmów zaliczanych do rodzaju *Fusarium* napotyka na znaczne trudności. Dotychczas stosowane procedury klasyfikacyjne opierają się głównie na analizie morfologii mycelium (z reguły postaci anamorficzej). Analiza morfologii bywa uzupełniana badaniami fizjologicznymi (klasyfikacja do poszczególnych *formae speciales* i ras patogenów) i genetycznymi, jak określanie zdolności do koniugacji strzępek wegetatywnych – czyli przynależności tzw. *vegetative compatibility groups* (VCE).

Wadą wszystkich wymienionych technik identyfikacji i klasyfikacji *Fusarium* jest ich złożoność i czasochłonność. Wymagają one zawsze przeprowadzenia izolacji indywidualnych zarodników, wyszczepienia ich na specyficzne pożywki, hodowli grzybni, przeprowadzenia testów patogeniczności na roślinnym materiale kontrolnym, a nawet izolacji mutantów dla określenia zgodności genetycznej izolatów (VCG). Dlatego takie nadzieje budzą możliwości zastosowania metod opierających się na analizie struktury DNA, jako prostszych, powtarzalnych, niezawodnych i możliwych do wykonania w sytuacji bardzo ograniczonej (pod względem ilościowym) dostępności tkanki grzyba.

2.1. Metoda RAPD

Metoda RAPD (*random DNA amplification of polymorphic DNA*) została zaprojektowana dla umożliwienia porównawczej analizy struktury genomów (18-20). Polega ona na równoległej amplifikacji (metodą PCR) genomowych DNA badanych organizmów, przy użyciu krótkich (z reguły – dziesięcionukleotydowych) starterów, o arbitralnie zaprojektowanej sekwencji. W efekcie, uzyskuje się w przypadku każdej reakcji amplifikacji, zestaw od kilku do kilkudziesięciu fragmentów DNA, których długość wynika z odległości, w jakiej zlokalizowane są na niciach genomowego DNA sekwencje komplementarne do zastosowanego startera. W efekcie, po rozdzieleniu produktów amplifikacji na żelu, uzyskuje się charakterystyczny dla danego genomu układ prążków.

Metoda RAPD powinna być stosowana z zachowaniem szczególnej ostrożności i wyłącznie dla porównywania organizmów blisko ze sobą spokrewnionych (21). W przypadku wyższych eukariontów daje się przy jej użyciu wykazywać podobieństwa i różnice w obrębie rodzaju, w przypadku prokariotów i niższych eukariontów (w tym grzybów) uznaje się, że należy ją stosować wyłącznie dla określania podobieństwa struktury genomów organizmów należących do tego samego gatunku. Dodatkowym ograniczeniem metody jest również możliwość nie w pełni specyficznego wiązania się starterów z matrycowym DNA, co wynika z niskiej temperatury topnienia krótkich oligonukleotydów (10 nt) (18,22). Istnieją ponadto rozbieżności dotyczące oceny tego, jaka część genomu stanowi matrycę dla dominującej frakcji

produktów amplifikacji; czy są to sekwencje unikatowe, czy też raczej powtarzające się sekwencje genomowego DNA (24). Dodatkowym, lecz bardzo istotnym problemem, jak się wydaje, jest zagadnienie powtarzalności metody (24,25), co może mieć podłoże czysto metodologiczne. Wyniki jakościowe (lecz niekoniecznie – wydajność) reakcji RAPD-PCR w znacznej mierze zależą od zastosowanych warunków (skład mieszaniny reakcyjnej, zastosowane temperatury reakcji, zastosowana polimeraza Taq). Wobec tych uwag, celowe jest, jak się wydaje, sformułowanie postulatu, że w przypadku analizy porównawczej struktury genomów grzybów z rodzaju *Fusarium*, metoda RAPD-PCR dobrze spełnia swoje zadanie pod warunkiem, że interpretację wyników przeprowadza się z wielką ostrożnością. Porównywać można, w istocie rzeczy, wyłącznie wyniki uzyskane w ramach jednego eksperymentu, analizowane podczas jednego rozdziału elektroforetycznego.

Wyniki opublikowane w licznych pracach opisujących zastosowanie metody RAPD-PCR do analizy zróżnicowania genetycznego grzybów z rodzaju *Fusarium* (26-34), jakkolwiek niezwykle interesujące, są jednocześnie dość trudne do interpretacji. W wielu przypadkach, dużym wsparciem dla autorów w formułowaniu wniosków końcowych są metody statystyczne (35-37). Warto jednak pamiętać, że analizie poddawany jest rozkład wielkości fragmentów DNA, a nie podobieństwa i różnice ich sekwencji nukleotydowych. Jednocześnie, daje się zauważyć, że metoda RAPD tak silnie dyskryminuje badane organizmy, że umożliwia np. podzielić rasę 1 patogenicznej formy *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na grupy wirulencji, lub nakazuje umieszczać różne *formae speciales* gatunku *Fusarium oxysporum* w różnych gałęziach drzewa filogenetycznego, w sposób nie odzwierciedlający wcześniej ustalonych zakresów podobieństwa. Profile RAPD są stosunkowo zróżnicowane nawet w przypadku szczepów izolowanych z tkanek tego samego żywiciela i z tych samych obszarów (29,38).

Można przyjąć, że RAPD-PCR jest doskonałą metodą do wykazania zróżnicowania w obrębie grup blisko spokrewnionych organizmów. Należy jednak jednocześnie stwierdzić, że w przypadku grzybów patogenicznych, jej przydatność do określania relacji filogenetycznych jest ograniczona. Wynika to zarówno z wysokiej czułości metody, jak i jej wrażliwości na zmianę warunków doświadczalnych.

Metoda RAPD, niezależnie od kilku wymienionych ograniczeń, ma wiele zalet. Do jej zastosowania nie jest konieczna znajomość sekwencji, które będą poddane amplifikacji. Do przeprowadzenia reakcji potrzeba bardzo małej ilości DNA, a technicznie metoda ta jest prosta i szybka. Zakładając, że dostęp do urządzenia do PCR (termocyklera) nie stanowi problemu, metoda jest również relatywnie tania. Nie wymaga znakowania izotopami radioaktywnymi. Te same startery mogą służyć do analizy struktury genomu wielu różnych organizmów. Najważniejszą z zalet metody jest jednak to, że może ona dostarczyć informacji umożliwiających zaprojektowanie starterów do metody SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) (por. rozdz. 2.2).

Przeгляд znacznej liczby profili RAPD, których uzyskanie nie stanowi większego problemu, umożliwia wybranie amplikonów, które, jak się wydaje, są przydatne dla porównywania organizmów wchodzących w skład badanej grupy. Po oznaczeniu ich

sekwencji nukleotydowych możliwe jest zaprojektowanie starterów, za pomocą których będzie można wybiórczo amplifikować oznaczone sekwencje.

2.2. Metoda SCAR

Metoda SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) polega na wybiórczej amplifikacji PCR wybranego fragmentu genomowego DNA badanych organizmów. Do przeprowadzenia reakcji stosuje się zwykle parę dwóch różnych starterów flankujących sekwencję, której występowanie w porównywanych organizmach staramy się ustalić. Uzyskane wyniki mogą dostarczyć informacji dwojakiego typu. Po pierwsze, można ustalić czy analizowana sekwencja występuje we wszystkich badanych organizmach, czy też jest charakterystyczna wyłącznie dla niektórych z nich. Po drugie, produkty amplifikacji, nawet jeżeli pojawiają się we wszystkich badanych próbach, mogą wykazywać polimorfizm, który w najprostszym przypadku można wykryć, jako różnice w wielkości uzyskanych amplikonów, jeżeli zaś takie różnice nie występują, uzyskane preparaty DNA mogą być dogodnym obiektem badań metodą analizy RFLP, analizy heterodupleksów, lub w końcu, analizy i porównania sekwencji nukleotydowych.

Startery stosowane w analizie SCAR są z reguły dłuższe niż te, których używa się w metodzie RAPD. Najczęściej projektuje się startery o długości 17-24 nt. W konsekwencji, temperatury ich wiązania w reakcji PCR są wyższe, a przez to metoda jest bardziej powtarzalna – mniej podatna na wpływ warunków eksperymentalnych.

Projektowanie starterów do amplifikacji SCAR może opierać się na informacjach uzyskanych z przesiewowych badań metodą RAPD, może również wykorzystywać znajomość sekwencji nukleotydowych wcześniej zbadanych genów, które można wyszukać w dostępnych bazach danych.

Analiza SCAR jest bardzo przydatna w wykrywaniu, identyfikacji i charakteryzowaniu grzybów patogenicznych z rodzaju *Fusarium*.

Głównym jej zastosowaniem jest porównawcza analiza genomów badanych organizmów. Możliwe jest zaprojektowanie starterów umożliwiających wybiórczą amplifikację sekwencji, które występują tylko w określonych grupach izolatów. Udaje się zatem wykorzystywać dane molekularne do ustalania, bądź weryfikowania przynależności gatunkowej badanych grzybów. O znaczeniu informacji tego typu dla określenia powiązań filogenetycznych, a w konsekwencji do ustalenia systematyki grzybów, nie trzeba nikogo przekonywać. Jednakże ważnym celem, dla którego prowadzi się analizy SCAR jest badanie występowania określonych genów w analizowanych populacjach szczepów. Ten aspekt, choć znacznie mniej rozwinięty, jest szczególnie ważny w kontekście znanych właściwości patogenów grzybowych: zróżnicowanej patogeniczności, oraz zdolności do syntezy miktotoksyn. Istnieje pilna potrzeba rozwinięcia narzędzi diagnostycznych umożliwiających detekcję w środowisku glebowym i w przechowywanych produktach roślinnych, szczególnie groźnych szczepów syntetyzujących duże ilości miktotoksyn, oraz tych, które wykazują szczególnie

silne cechy patogeniczności. W tabeli 1 zawarto zestawienie niektórych ze starterów zastosowanych w badaniach nad grzybami patogenicznymi z rodzaju *Fusarium*. Łatwo zauważyć, że większość z nich umożliwia detekcję amplikonów o znaczeniu taksonomicznym. Liczba starterów zaprojektowanych dla identyfikacji markerów genetycznych patogeniczności i toksynotwórczości jest znacznie mniejsza.

Tabela 1

Zestawienie starterów stosowanych w analizie SCAR grzybów patogenicznych z rodzaju *Fusarium*

Nazwa startera	Sekwencja nukleotydomowa	Zastosowanie	Literatura
1	2	3	4
PFO2	5'-CCCAGGGTATTACACGGT-3' (forward)	startery umożliwiają amplifikację fragmentu (80 pz.) 28S rDNA <i>F. oxysporum</i> . Uzyskano produkty amplifikacji dla 16 szczepów <i>F. oxysporum</i> . Negatywny wynik dała analiza 80 szczepów 23 innych gatunków <i>Fusarium</i>	(39)
PFO3	5'-CGGGGGATAAAGCGCG-3' (reverse)		
Wilt-1	5'-TGATGTGAGGACGGCCAGG-3' (forward)	startery umożliwiają wykrycie obecności <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> (szczepów patogenicznych) w preparatach DNA gospodarza roślinnego (<i>Cicer arietinum</i>) przed wystąpieniem symptomów porażenia	(40)
Wilt-2	5'-TATCAGAGCATCTCCCTCCC-3' (reverse)		
FUS1	5'-CTTGTCATGGGCCAGTCAAGAC-3' (forward)	startery umożliwiają identyfikację <i>F. moniliforme</i> w porażonych ziarniakach kukurydzy. Produkt amplifikacji (1,6 kpz.) nie był wykrywany w innych gatunkach <i>Fusarium</i>	(41)
FUS2	5'-CACAGTCACATAGCATTGCTAGCC-3' (reverse)		
Fp1-1	5'-CGGGGTAGTTTCACATTC(C/T)G-3' (forward)	startery zaprojektowane na bazie sekwencji czynnika elongacyjnego EF-1 α . Produkt amplifikacji jest wykrywany w <i>F. pseudograminearum</i> – gatunku wydzielonym z <i>F. graminearum</i>	(42)
Fp1-2	5'-GAGAATGTGATGA(C/G)GACAATA-3' (reverse)		
BIO3	5'-GGCGATCTTGATTGTATTGTGGTG-3' (forward)	dwie pary starterów umożliwiające identyfikację <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> . Wielkość uzyskiwanych amplikonów: BIO3/FOA1-204 pz., TL3/FOA28-400 pz.	(43)
FOA1	5'-CAGTTTATTAGAAATGCCGCC-3' (reverse)		
TL3	5'-GGTCGTCGCCAGAGTATACCGGC-3' (forward)		
FOA28	5'-ATCCCCGTAAGCCCTGAAGC-3' (reverse)		
WiltNF-1	5'-ATAGCCAAGCCGACCCTCAC-3' (forward)	dwie pary starterów WiltNF-2/ WiltNR-2 są zlokalizowane wewnętrznie względem WiltNF-1/ WiltNR-1. Produkt amplifikacji odpowiednio ok. 600 pz i ok.850 pz. Umożliwiają wykrycie <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> w glebie	(44)
WiltNR-1	5'-ACGAGGTTCTGTCGTTGTTTC-3' (reverse)		
WiltNF-2	5'-TTGTAATGGCGTTGGAGAGGG-3' (forward)		
WiltNR-2	5'-TTGTTTCAGATTCGGAATCGGG-3' (reverse)		

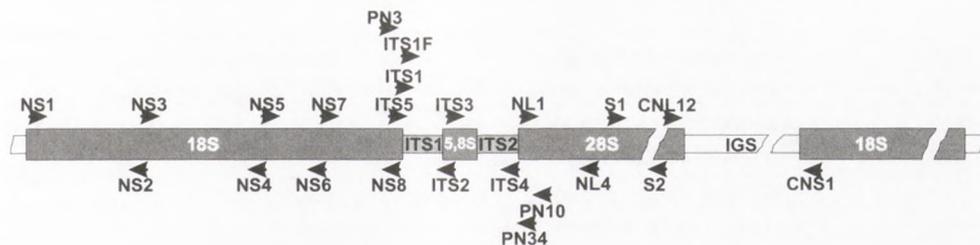
1	2	3	4
Fc01F	5'-ATGGTGAACCTCGTCGTGGC-3' (forward)	para starterów umożliwiająca identyfikację <i>F. culmorum</i> . Produkt amplifikacji (570 pz) nie był wykrywany w innych gatunkach <i>Fusarium</i>	(45)
Fc01R	5'-CCCTTCTTAGCCAATCTCG-3' (reverse)		
Fcg17F	5'-TCGATATACCGTGGCATTTC-3' (forward)	para starterów umożliwiająca identyfikację <i>F. culmorum</i> i <i>F. graminearum</i> . Produkt amplifikacji (340 pz.) nie był wykrywany w innych gatunkach <i>Fusarium</i>	(45)
Fcg17R	5'-TACAGACACCGTCAGGGGG-3' (reverse)		
Fg16F	5'-CTCCGGATATGTTGCGTCAA-3' (forward)	para starterów umożliwiająca identyfikację <i>F. graminearum</i> . Przy użyciu tych starterów otrzymywano produkty amplifikacji o różnej wielkości (400-500 pz.)	(45)
Fg16R	5'-GGTAGGTATCCGACATGGCAA-3' (reverse)		
Fg16NF	5'-ACAGATGACAAGATTCAGGCACA-3' (forward)	para starterów umożliwiająca identyfikację <i>F. graminearum</i> . Przy użyciu tych starterów otrzymywano tylko jeden produkt amplifikacji o wielkości 280 pz. i nie był on wykrywany w innych gatunkach <i>Fusarium</i>	(45)
Fg16NR	5'-TTCTTTGACATCTGTTCAACCCA-3' (reverse)		
FcF	5'-CAAAAGCTTCCCGAGTGTTTC-3' (forward)	para starterów umożliwiająca identyfikację <i>F. culmorum</i> na pojedynczych roślinach pszenicy ozimej przed wystąpieniem symptomów porażenia. Produkt amplifikacji ma wielkość 700 pz.	(46,47)
FcR	5'-GGCGAAGGTTCAAGGATGAC-3' (reverse)		
AF	5'-CAAGCATTGTCGCCACTCTC-3' (forward)	para starterów umożliwiająca identyfikację <i>F. avenaceum</i> na pojedynczych roślinach pszenicy ozimej przed wystąpieniem symptomów porażenia. Produkt amplifikacji ma wielkość 920 pz.	(46,47)
AR	5'-GTTTGGCTCTACCGGGACTG-3' (reverse)		
Fov1	5'-CCCCTGTGAACATACCTTACT-3' (forward)	para starterów, której sekwencja nukleotydo- wa została zaprojektowana na podstawie wielkich różnic w sekwencji nukleotydo- wej wewnętrznych przerywników genów rybosomalnych RNA pozwala na identyfikację <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (FOV) w tkankach z bawełny. Produkt amplifikacji o wielkości 400 pz nie był wykrywany w innych gatunkach <i>Fusarium</i>	(48)
Fov2	5'-ACCAGTAACGAGGGTTTTACT-3' (reverse)		
Fa-U17f	5'-CAAGCATTGTCGCCACTCTC-3' (forward)	para starterów umożliwiająca identyfikację <i>F. avenaceum</i> amplifikująca prązek o długości 345 pz tylko DNA <i>F. avenaceum</i> , a nie amplifikująca DNA z <i>F. tricinctum</i> .	(49)
Fa-U17r	5'-GTTTGGCTCTACCGGGACTG-3' (reverse)		
Fp82F	5'-CAAGCAAACAGGCTTTCACC-3' (forward)	para starterów pozwalająca na identyfikację <i>Fusarium poae</i> . Para tych starterów bała wykorzystywana w trakcie badania FEB w pszenicy	(50)
Fp82R	5'-TGTTCCACTCAGTGACAGTT-3' (reverse)		

1	2	3	4
Primer A	5'-CATCTCCAGACAACATTAGGG-3' (forward)	pary starterów A,B i E,F stosowano do identyfikacji <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG) w bulwach podziemnych zainfekowanych przez FOG. Fragmenty DNA AB i EF były amplifikowane w izolatach rasy I. Wielkość amplikonów: startery A/B-609 pz, E/F-1196 pz.	(51)
Primer B	5'-AAGCTCACGAAAGTTGGTGGG-3' (reverse)		
Primer E	5'-CAGCTCACGACCTGTATG-3' (forward)		
Primer F	5'-CAGCTCACGATGGGAATC-3' (reverse)		
OPT18F470	5'-GATGCCAGACCAAGACGAAG-3' (forward)	para starterów stosowana do identyfikacji <i>F. culmorum</i>	(52) cyt. za: (53)
OPT18R470	5'-GATGCCAGACGCACTAAGAT-3' (reverse)		
UBC85F410	5'-GCAGGGTTTGAATCCGAGAC-3' (forward)	para starterów stosowana do identyfikacji <i>F. graminearum</i>	(54) cyt. za: (53)
UBC85R410	5'-AGAATGGAGCTACCAACGGC-3' (reverse)		
Tox5-1	5'-GCTGCTCATCACTTTGCTCAG-3' (forward)	para starterów PCR umożliwiających amplifikację fragmentu genu <i>tri5</i> (syntaza trichodieny). Uzyskano produkty amplifikacji (658 pz.) w badanych 64 gatunkach <i>Fusarium</i>	(55)
Tox5-2	5'-CTGATCTGGTCACGCTCATC-3' (reverse)		

2.3. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych

Metoda RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) polega na porównawczej analizie rozkładu sekwencji rozpoznawanych przez wybraną endonukleazę restrykcyjną w badanych preparatach DNA. Preparaty te poddaje się hydrolizie za pomocą wybranego enzymu, a następnie produkty trawienia rozdziela się na żelach agarozowych lub poliakrylamidowych. Informację, którą udaje się dzięki temu uzyskać, stanowi rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych, które pojawiają się w wyniku poszczególnych reakcji. Ponieważ produkty trawienia restrykcyjnego genomowych DNA organizmów eukariotycznych są zbyt liczne by mogły być zidentyfikowane na żelach, jako indywidualne prążki, zwykle stosuje się procedurę przeniesienia rozdzielonych fragmentów DNA na błony nitrocelulozowe (*Southern blotting*) i do uzyskanej w ten sposób repliki hybryduje się z odpowiednio dobraną, znakowaną sondą molekularną. Uwidocznione wówczas zostają tylko fragmenty DNA zawierające sekwencje komplementarne do zastosowanej sondy. Zwykle, analiza RFLP polega na równoległym zastosowaniu kilku endonukleaz restrykcyjnych. Nie trzeba dodawać, że bardzo istotne znaczenie ma właściwy dobór sondy molekularnej.

Specyficznym wariantem klasycznej analizy RFLP jest procedura polegająca na analizie rozkładu miejsc restrykcyjnych w zdefiniowanym obszarze genomu. Bardzo często wykorzystywany jest w tym celu rDNA organizmów eukariotycznych, a konkretnie sekwencja obejmująca geny kodujące 18S, 5,8S i 28S rybosomalne RNA, wy-



Rys. 1. Struktura powtarzalnej jednostki transkrypcyjnej rDNA organizmów eukariotycznych. Na rysunku zaznaczono przybliżoną lokalizację starterów najczęściej stosowanych do amplifikacji wybranych fragmentów DNA (56-60). Długość strzałek oznaczających lokalizację starterów nie jest proporcjonalna do ich rzeczywistej wielkości w obrębie przedstawionej struktury rDNA. ITS – *internal transcribed spacer*; IGS – *intragenic spacer*.

stępująca w postaci jednostek transkrypcyjnych ułożonych tandemowo, jako wielokrotne powtórzenia. Analizie poddaje się preparat DNA uzyskany na drodze amplifikacji (PCR) genomowego DNA, przeprowadzonej przy użyciu starterów zaprojektowanych w oparciu na znajomości sekwencji nukleotydowej, powtarzalnej jednostki transkrypcyjnej rDNA. Jej strukturę, wspólną dla większości organizmów eukariotycznych przedstawiono na rysunku 1. Zwykle, analizie poddaje się nie cały fragment obejmujący powtarzającą się jednostkę transkrypcyjną, lecz celowo wybrane jej fragmenty. Na rysunku 1 zaznaczono przybliżoną lokalizację starterów najczęściej stosowanych dla uzyskiwania fragmentów DNA, które się następnie analizuje. W tabeli 2 zestawiono sekwencje nukleotydowe tych starterów, oraz niektóre informacje na temat wielkości amplikonów generowanych przy ich użyciu.

Tabela 2

Zestawienie starterów najczęściej używanych do badania polimorfizmu w obrębie rDNA grzybów patogennych

Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa	Produkty amplifikacji (literatura)
1	2	3
ITS1F	5'-TAGGTGAAC TCGCGAGGG-3'	ITS1/ITS2 – 290 pz.
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAAC TCGCGG-3'	ITS5/ITS2 – 315 pz.
ITS2	5'-GCTCGTTC TCCATCGATGC-3'	ITS3/ITS4 – 330 pz. (56)
ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	ITS1F/ITS2 – 150-196 pz.
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS1/ITS4 – 560-680 pz. (58)
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	
S1	5'-CTAAAAAGGATCCCTTAGTAACGCGAGT-3'	S1/S2 – 1900 pz. (58)
S2	5'-GAGCCCAATCCTTTTCCCGAAGTTA-3'	

1	2	3
NS1	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	NS1/NS2 – 555 pz.
NS2	5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3'	NS3/NS4 – 597 pz.
NS3	5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'	NS5/NS6 – 310 pz.
NS4	5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'	NS7/NS8 – 377 pz. (56)
NS5	5'-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	NS1/NS8 – 1840 pz.
NS6	5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3'	NS1/NS4 – 1140 pz.
NS7	5'-GAGGCAATAACAGGTCGTGATGC-3'	NS5/NS8 – 700 pz. (58)
NS8	5'-TCCGCAGGTTACACTACGGA-3'	
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA-3'	ok. 600 pz. (58)
NL4	5'-CCGTCTTGAACACGGACC-3'	
CNS1	5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3'	ok. 2,6 kpz. (57,59)
CNL12	5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3'	
PN3	5'-CCGTGTTGTAACCAGCGGAGGGATC-3'	PN3/PN10 – 430-720 pz. w różnych próbach
PN10	5'-TCCGCTTATTGATATGCTTAAG-3'	
PN34	5'-TTGCCGCTTCACTCGCCGTT-3'	PN3/PN34 – 350-1000 pz. starter PN34 stosowano do analizy prób glebowych, w których nie udało się uzyskać amplifikacji ze starterem PN10 (60)

Cennych informacji dostarcza zarówno porównawcza analiza zachowawczych ewolucyjnie sekwencji kodujących rRNA, jak i badanie znacznie bardziej zmiennych fragmentów międzygenowych – tzw. łączników (*spacers*). Te pierwsze mogą posłużyć do porównywania organizmów bardziej od siebie oddalonych ewolucyjnie, np. różnych gatunków klasyfikowanych w obrębie jednego rodzaju (wśród wyższych eukariontów również – rodziny). Analiza sekwencji zmiennych jest wykorzystywana dla porównywania organizmów bliżej ze sobą spokrewnionych (na poziomie rodzaju, gatunku i podgatunków). Omawianej metodzie nadaje się często specyficzną nazwę, określając ją, jako ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*).

Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych rDNA oddała nieoczone usługi w badaniach nad ustaleniem relacji filogenetycznych grzybów patogennych z rodzaju *Fusarium*.

Wielkość powtarzającej się jednostki transkrypcyjnej tych organizmów określa się na 6-8,2 kpz.

Polimorfizmy umożliwiające rozróżnienie *F. oxysporum* i *F. solani* można odnaleźć w obrębie sekwencji 18S rDNA. Na podstawie analizy restrykcyjnej sekwencji kodującej 28S rRNA udaje się odróżnić *F. avenaceum*, *F. sambucinum* i *F. sporotrichioides*.

Analiza rozkładu miejsc restrykcyjnych w obrębie zmiennych regionów łączników – ITS (28,58,61), oraz IGS (59,62) dostarcza bardzo cennych informacji.

Na podstawie analizy restrykcyjnej amplifikowanego rDNA (obszar ITS) 34 gatunków *Fusarium*, Bateman i wsp. (61) podzielili 120 badanych izolatów na 20 grup. Podziału dokonano na podstawie porównania profili elektroforetycznych po trawieniu amplifikowanego fragmentu rDNA enzymami AluI, CfoI, DdeI, HaeIII, HinfI, HpaII,

Sau3AI i TaqI. Trawieniu poddano fragment amplifikowany przy użyciu starterów ITS4 i ITS5 (por. tab. 2 i rys. 1). Przebadane identyczną metodą dodatkowo 80 izolatów, tym razem *F. avenaceum* (28), wykazało charakterystykę (profile RFLP) odpowiadające grupom 5. i 8., do których zakwalifikowano wcześniej inne badane izolaty tego gatunku (61). Ten wynik sugeruje dużą przydatność klasyfikacji na podstawie profili RFLP, jako metody weryfikacji przynależności gatunkowej grzybów patogenicznych. W analizie 35 izolatów *F. avenaceum* przeprowadzonej przez autorów tego opracowania (38), również wykazano, że profile RFLP charakterystyczne są dla grup 5. i 8. wg typologii Batemana.

Analiza sekwencji nukleotydowych zmiennych regionów (ITS) i ich porównywanie dostarcza oczywiście jeszcze więcej informacji – mogą w ten sposób być wykryte polimorfizmy nie wpływające na obecność miejsc restrykcyjnych. Oczywiście interpretacja tych danych jest bardziej złożona i, dla celów praktycznych – jednocześniej analizy znacznej liczby izolatów, nie bywa stosowana.

3. Znaczenie metod molekularnych w badaniach nad biologią i występowaniem grzybów patogenicznych z rodzaju *Fusarium*

O roli grzybów z rodzaju *Fusarium* wspomniano już we wstępie. Ich znaczenie dla naturalnych ekosystemów również nie podlega dyskusji. Niezależnie od patogenicznego charakteru wielkiej liczby ich przedstawicieli, w skład tej grupy wchodzi również liczne organizmy pędzące wyłącznie saprofityczny tryb życia. Zresztą, nawet fuzaria zdolne do porażania roślin nie są z reguły patogenami obligatoryjnymi.

Aby skutecznie unikać strat na skutek patogeniczności *Fusarium*, oraz zagrożeń wynikających z ich toksynotwórczości, należy najpierw poznać możliwie dokładnie zakres bioróżnorodności w obrębie tego rodzaju, jego biologię, a następnie opracować skuteczne metody detekcji i identyfikacji poszczególnych gatunków, podgatunków i patotypów tak, aby w porę stosować środki zaradcze, bądź uniknąć spożywania zakażonej mikotoksynami żywności.

Jest to tym ważniejsze, że organizmy te są niezwykle plastyczne. W wyniku tego, ustalanie relacji filogenetycznych w obrębie grupy organizmów takich jak rodzaj *Fusarium*, jest niezwykle trudne. Teleomorfy większości gatunków klasyfikowanych w obrębie tego rodzaju nie są znane. Jako organizmy, w swojej większości, nie przechodzące stadium płciowego, fuzaria najprawdopodobniej rozwinęły się, jako wielka liczba linii genetycznych, przystosowując się do lokalnych warunków. Obserwacje, które wspierają to stwierdzenie zostały poczynione już dawno i są niezwykle czytelne w swej wymowie. Stwierdzono, że szczepy *F. avenaceum* utrzymywane w kulturach *in vitro* zmieniają w czasie kolejnych przeszczepień zarówno morfologię mycelium (63,64), jak i swoją patogeniczność. Stwierdzono przy tym, że tak zmienione szczepy mogą okazywać się bardziej wirulentne niż ich linie rodzicielskie (65).

Dlatego tak ważne jest, aby poprzez wnikliwe i szeroko zakrojone studia zdobyć informacje na temat markerów genetycznych, które mogą być identyfikowane w sposób nie budzący wątpliwości, z wysoką czułością i niezależnie od stanu troficznego organizmu grzybowego.

Literatura

1. Booth C., (1971), *The Genus Fusarium*, Commonwealth Mycological Institute, Kew.
2. Parry D. W., Jenkinson P., McLeod L., (1995), *Plant Pathol.*, 44, 207-238.
3. van Sanford D., Anderson J., Campbel K, Costa J., Cregan P. B., Griffey C., Hayes P., Ward R., (2001), *Crop Sci.*, 41, 638-644.
4. Smith J. E., Lewis C. W., Anderson J. G., Solomon G. L., (1994), *Mycotoxins in human nutrition and health*, European Commission CG XII,
5. Pohland A. E., (1993), *Food Additiv. Contam.*, 10, 17-28.
6. Perkowski J., (1999), *Badania zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie zbóż*, Wyd. AR, Poznań.
7. Vesonder R. F., Goliński P., (1989), *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, Ed. Chełkowski J., 1-39, Elsevier.
8. Sharman M., Gilbert J., Chełkowski J., (1991), *Food Additiv. Contam.*, 4, 459-466.
9. Kostecki M., Grabarkiewicz-Szczęsna J., Chełkowski J., Wiśniewska H., (1995), *Microbiol. Alim. Nutr.*, 13, 67-70.
10. Goliński P., Kostecki M., Lasocka I., Wiśniewska H., Chełkowski J., Kaczmarek Z., (1996), *J. Phytopathol.*, 144, 495-499.
11. Goliński P., Perkowski J., Kostecki M., Grabarkiewicz-Szczęsna J., Chełkowski J., (1996), *Sydowia*, 48, 12-22.
12. Chełkowski J., Zawadzki M., Zajkowski P., Logrieco A., Bottalico A., (1990), *Mycotoxin Res.*, 6, 41-45.
13. Sinha R. C., Savard M. E., (1997), *Can. J. Plant Pathol.*, 19, 8-12.
14. Tanaka T., Hasegawa A., Yamamoto Y., Lee U. S., Sugiura Y., Ueno Y., (1988), *J. Agricult. Food Chem.*, 36, 980-983.
15. Nelson P. E., Desjardins A. E., Plattner R. D., (1993), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31, 233-252.
16. Jelen H. H., Mirocha C. J., Wasowicz E., Kaminski E., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3815-3820.
17. Payne G. A., Brown M. P., (1998), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36, 329-362.
18. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., (1990), *Nucl. Acids Res.*, 18, 6531-6535.
19. Welsh J., McClelland M., (1990), *Nucl. Acids Res.*, 18, 7213-7218.
20. Rafalski J. A., Tingey S. V., Williams J. G. K., (1991), *AgBiotech News Infor.*, 3, 645-648.
21. Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A., Tingey S. V., (1993), *Meth. Enzymol.*, 218, 704-740.
22. Golińska B., Narożna D., Króliczak J., Mądrzak C. J., (2001), *Przykłady analiz DNA*, Ed. Słomski R., 166-172, Wyd. AR, Poznań.
23. Crowhurst R. N., Hawthorne B. T., Rikkerink E. H. A., Templeton M. D., (1991), *Curr. Genet.*, 20, 391-396.
24. Devos K. M., Gale M. D., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 84, 567-572.
25. Skov E., (1998), *Silvae Genetica*, 47, 283-287.
26. Manulis S., Kogan N., Reuven M., Ben-Yephet Y., (1993), *Phytopathology*, 84, 98-101.
27. Bentley S., Pegg K. G., Dale J. L., (1994), *J. Phytopathol.*, 142, 64-78.
28. Satyaprasad K., Bateman G. L., Ward E., (2000), *J. Phytopathol.*, 148, 211-219.
29. Yli-Mattila T., Paavanen S., Hannukkala A., Parikka P., Tahvonon R., Karjalainen R., (1996), *Plant Pathol.*, 45, 126-134.
30. Hering O., Nirenberg H. I., (1995), *Mycopathologia*, 129, 159-164.

31. Schilling A. G., Möller E. M., Geiger H. H., (1994), *Modern assays for plant pathogenic fungi: Identification, detection, and quantification*, Eds. Schots A., Dewey F. M., Oliver R., 47-56, CAB International, Oxford.
32. Smith S. N., DeVay J. E., Hsieh W. H., Lee H. J., (2001), *Mycologia*, 93, 737-743.
33. Bentley S., Pegg K. G., Dale J. L., (1995), *Mycol. Res.*, 99, 1378-1384.
34. Chiocchetti A., Ghignone S., Minuto A., Gullino M. L., Garibaldi A., Migheli Q., (1999), *Plant Dis.*, 83, 576-581.
35. del Mar Jimenez-Gasco M., Perez-Artes E., Jimenez-Diaz R. M., (2001), *Eur. J. Plant Pathol.*, 107, 237-248.
36. Mes J. J., Weststeijn E. A., Herlaar F., Lambalk J. J. M., Wijbrandi J., Haring M. A., Cornelissen B. J. C., (1999), *Phytopathology*, 89, 156-160.
37. Vakalounakis D. J., Fragkiadakis G. A., (1999), *Phytopathology*, 89, 161-168.
38. Golińska B., Kwaśna H., Narożna D., Kostecki M., Wakuliński W., Króliczak J., Mądrzak C. J., Goliński P., (2001), *Phytopathol. Pol.*, 22, 47-60.
39. Edel V., Steinberg C., Gautheron N., Alabouvette C., (2000), *Mycol. Res.*, 104, 518-526.
40. Kelly A. G., Bainbridge B. W., Heale J. B., Perez-Artes E., Jimenez-Diaz R. M., (1998), *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 52, 397-409.
41. Murillo I., Cavallarin L., San Segundo B., (1998), *Eur. J. Plant Pathol.*, 104, 301-311.
42. Aoki T., O'Donnell K., (1999), *Mycologia*, 91, 597-609.
43. Fernandez D., Ouinten M., Tantaoui A., Geiger J. P., Daboussi M. J., Langin T., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 633-636.
44. Garcia-Pedrajas M. D., Bainbridge B. W., Heale J. B., Perez-Artes E., Jimenez-Diaz R. M., (1999), *Eur. J. Plant Pathol.*, 105, 251-259.
45. Nicholson P., Simpson D. R., Weston G., Rezanoor H. N., Lees A. K., Parry D. W., Joyce D., (1998), *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 53, 17-37.
46. Doohan F. M., Parry D. W., Jenkinson P., Nicholson P., (1998), *Plant Pathol.*, 47, 197-205.
47. Turner A. S., O'Hara R. B., Rezanoor H. N., Nuttall M., Smith J. N., Nicholson P., (1999), *Plant Pathol.*, 48, 742-748.
48. Moricca S., Ragazzi A., Kasuga T., Mitchelson K. R., (1998), *Plant Pathol.*, 47, 486-494.
49. Turner A. S., Lees A. K., Rezanoor H. N., Nicholson P., (1998), *Plant Pathol.*, 47, 278-288.
50. Parry D. W., Nicholson P., (1996), *Plant Pathol.*, 45, 383-391.
51. de Haan L. A. M., Numansen A., Roebroek E. J. A., van Doorn J., (2000), *Plant Pathol.*, 49, 89-100.
52. Lees A., Nicholson P., Rezanoor H. N., Parry D. W., (1995), *Mycol. Res.*, 99, 1003-1007.
53. Chelkowski J., Witkowska I., (1999), *Post. N. Rol.*, 4, 49-60.
54. Nicholson P., Lees A. K., Maurin N., Parry D. W., Rezanoor H. N., (1996), *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 48, 257-271.
55. Niessen M. L., Vogel R., (1998), *System. Appl. Microbiol.*, 21, 618-631.
56. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., (1990), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, Eds. Innes M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., 315-322, Academic Press, Inc., San Diego.
57. Appel D. J., Gordon T. R., (1995), *Exp. Mycol.*, 19, 120-128.
58. Duggal A., Dumas M. T., Jeng R. S., Hubbes M., (1997), *Mycopathologia*, 140, 35-49.
59. Hyun J. W., Clark C. A., (1998), *Mycol. Res.*, 102, 1259-1264.
60. Viaud M., Pasquier A., Brygoo Y., (2000), *Mycol. Res.*, 104, 1027-1032.
61. Bateman G. L., Kwaśna H., Ward E., (1996), *Can. J. Microbiol.*, 42, 1232-1240.
62. Fernandez D., Assigbetse K., Dubois M. P., Geiger J. P., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4039-4046.
63. Schneider R., (2002), *Phytopathologische Zeitschrift*, 32, 129-148.
64. Gerlach W., Nirenberg H., (1982), *The genus Fusarium – a Pictorial Atlas*, Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Fortwirtschaft, Berlin-Dahlem.
65. Cormack M. W., (1951), *Can. J. Bot.*, 29, 32-45.