

Pathogenität von fumonisinbildenden *Fusarium* spp. an Spargel (*Asparagus officinalis* L.) und Differenzierung zweier essentieller Gene des Fumonisin-Genclusters

Pathogenicity of fumonisin-producing Fusarium spp. on asparagus (Asparagus officinalis L.) and differentiation of two essential genes of the Fumonisin gene cluster.

MARTINEZ O., VON BARGEN S., GOßMANN M., EISOLD A.M, HUMPF H.-U., BÜTTNER C.

Zusammenfassung

Fünf *Fusarium* spp.-Isolate der Arten *F. oxysporum*, *F. proliferatum* und *F. redolens* wurden in einem Pathogenitätstest an Spargeljungpflanzen der Sorte ‚RAMOS‘ getestet. Die Isolate von *F. proliferatum* und *F. redolens* erwiesen sich als hochvirulente Fäulniserreger, während *F. oxysporum* eine insgesamt schwächere Virulenz zeigte. In Mischproben aus Wurzel- und Kronenbereichen infizierter Jungpflanzen waren Fumonisin B-Toxine nachweisbar. Untersuchungen mittels linearer Korrelationsanalyse wiesen Zusammenhänge zwischen den *ad planta* ermittelten Fumonisin B₁- bzw. B₃-gehalten und erhobenen Parametern zur Beurteilung der Virulenz nach. Essentielle Gene der Fumonisin-Biosynthese (*fum1* [Polyketidsynthase] und *fum8* [Aminoacyltransferase]) waren in allen Pathogenitätstest-Stämmen nachweisbar. Zur Ermittlung der intra- und interspezifischen Heterogenität dieser Gene wurden entsprechende Fragmente aus weiteren *Fusarium* spp.-Isolaten aus Spargel und anderen Nutzpflanzenherkünften differenziert. Dabei waren Abweichungen bezüglich der phylogenetischen Beziehungen nachweisbar, die nach *multi-locus* Sequenzanalysen zur Implementierung von phylogenetischen Artkomplexen geführt haben. Eine Diagnose fumonisinbildender Arten der Gattung *Fusarium* und die Einschätzung der davon ausgehenden Infektionspotentiale sollte deshalb auf Basis kombinierter Untersuchungen speziesrelevanter Genabschnitte wie z.B. *tef1α* mit Abschnitten der zur Fumonisin-Biosynthese essentiellen Gene *fum1* und *fum8* erfolgen.

Schlüsselwörter

Spargel, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. redolens*, Fumonisine, Pathogenität, Polyketidsynthase, Aminoacyltransferase

Summary

We tested five Isolates of the *Fusarium* species *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* in a pathogenicity assay on asparagus seedlings of the cultivar ‚RAMOS‘ in regard to pathogenicity and virulence. It turned out, that the Isolates of *F. proliferatum* and *F. redolens* are highly virulent putrefactive agents, whereas *F. oxysporum* overall exhibit a lower virulence. We detected fumonisin B toxins in all mixed samples of root and crown parts of infected seedlings. Linear correlation analyses revealed an interrelation of fumonisin B₁ and B₃ concentrations determined *ad planta* and investigated virulence parameters. In all isolates of the pathogenicity assay fumonisin

biosynthesis genes (*fum1* [polyketide-synthase] and *fum8* [aminoacyltransferase]) could be detected. Intra- and interspecific variability of these genes were determined including corresponding sequences from further *Fusarium* spp. isolates from asparagus and other crops. We found similar clustering by means of phylogenetic analyses of *fum* genes. However, derived phylogenetic relations were inconsistent to species complexes, established by multi locus sequence analysis of other marker genes. Discrimination of fumonisin producing *Fusarium* spp. in conjunction with the assessment of possible damages and risks should therefore include combined analyses of species relevant genes like *tef1a* and the essential genes of the fumonisin biosynthesis *fum1* and *fum8*.

Keywords

Asparagus, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. redolens*, Fumonisin, Pathogenicity, Polyketide-synthase, Aminoacyltransferase

Einführung

Zahlreiche Pilze der Gattung *Fusarium*, darunter die als Hauptverursacher der Wurzel-, Stängel-, und Kronenfäule des Spargels (*Asparagus officinalis* L.) geltenden Arten *Fusarium oxysporum* SCHLECHT., *F. proliferatum* (MATSUSHIMA) NIRENBERG sowie *F. redolens* WOLLENW. sind in der Lage, Mykotoxine aus der Klasse der Typ B Fumonisine zu bilden und damit neben einer Ertragsminderung auch eine qualitative Beeinträchtigung des Erntegutes zu verursachen. Deshalb werden *Fusarium* spp. neben ihren phytopathogenen Eigenschaften verstärkt auch als potentielle Toxinkontaminanten von Spargelstangen diskutiert (LOGRIECO et al., 1998; SEEFELDER et al., 2002). Eine eradikative Bekämpfung bodenbürtiger *Fusarium* spp. ist in der Anbaupraxis nicht möglich (ELMER, 2004). Zudem stehen bislang keine *Fusarium*-resistenten Spargelsorten zur Verfügung (PONTAROLI et al., 2000). Daher ist die rechtzeitige Erkennung einer *Fusarium* spp.-Infektion sowohl zur objektiven Befalls- und Risikoeinschätzung, als auch zur Vermeidung von *Fusarium* spp.-Risikopotentialen in betroffenen Anlagen, ebenso wie in für eine Spargelproduktion vorgesehenen Böden und Jungpflanzen von großer Bedeutung. Hierzu ist neben der Entwicklung von einfachen molekularen Nachweisverfahren auch eine Einschätzung der durch die verschiedenen *Fusarium*-Arten und -Stämme ausgehenden Schad- und Kontaminationspotentiale nötig. Dieses ermöglicht es, die Wirkung dieser Pilz-Infektionen auf Ertrags- und Qualitätsparameter als Grundlage für eine Risikoabschätzung und ein Risikomanagement zu nutzen.

Material und Methoden

In einem 81-tägigen Gewächshausversuch wurden ausgewählte Isolate der im *Fusarium* spp.-Komplex der Wurzel-, Kronen- und Stängelfäule an *Asparagus officinalis* L. häufig vorkommenden

Arten *F. oxysporum*, *F. proliferatum* und *F. redolens* auf ihre Pathogenität an Spargeljungpflanzen getestet. Hierzu wurden Parameter wie Frisch- und Trockenmasse der unter- wie oberirdischen Pflanzenorgane sowie Bonitur und Quantifizierung von Symptomen der Wurzel- und Kronenbereiche in Form von Befallsgraden erhoben und unter Einsatz statistischer Verfahren zur Ermittlung der Pathogenität und Virulenz herangezogen. Weiterhin erfasst wurde das Fumonisin-Bildungsvermögen dieser Isolate *ad planta*, lineare Korrelationen zwischen Fumonisin-Gehalten und Virulenz und das Vorhandensein zweier initialer, essentieller Gene (*fum1* [Polyketidsynthase] und *fum8* [Aminoacyltransferase]) des Fumonisin-Biosyntheseweges. Um die Möglichkeiten einer Artdifferenzierung von Fumonisinbildnern anhand von definierten Abschnitten dieser Gene zu evaluieren, erfolgte die Ermittlung der inter- und intraspezifischen Sequenzvariabilitäten der untersuchten Genabschnitte von *fum1* (~525 bp) und *fum8* (~800 bp) einschließlich weiterer *Fusarium* spp.-Isolate, die aus Spargel und anderen Nutzpflanzen isoliert worden waren, mittels direktem Sequenzvergleich sowie *bootstrap*-gestützten *maximum parsimony*-Analysen. Zusätzlich zu den Sequenzen aus eigener Arbeit wurden alle verfügbaren Sequenzen aus der öffentlichen Datenbank NCBI in die Untersuchungen mit einbezogen.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Die Isolate von *F. proliferatum* und *F. redolens* erwiesen sich an den Versuchspflanzen insbesondere hinsichtlich der ermittelten Befallsgrade und realisierten Frisch- und Trockenmassen zum Versuchsabschluss als hochvirulente Fäulniserreger, während *F. oxysporum* hierbei eine insgesamt schwächere Virulenz zeigte. Ebenso waren in den Wurzel- und Kronenbereichen aller infizierten Jungpflanzen Fumonisin B-Toxine (FB₁, FB₂, FB₃) nachweisbar (Abb.1). Die Ergebnisse nach linearer Korrelationsanalyse zeigten Zusammenhänge zwischen den *ad planta* ermittelten Fumonisin B₁- bzw. B₃-Gehalten und erhobenen Parametern zur Beurteilung der Virulenz auf. In allen fünf Isolaten waren artübergreifend beide zur Fumonisin-Biosynthese essentiellen Gene nachweisbar. Erstmals konnten Bereiche dieser Fumonisin-Gene aus *F. redolens* sequenziert werden. Gene, die in die Biosynthese von Mykotoxinen involviert sind, gelten als Basis für einen genauen, empfindlichen und spezifischen Nachweis von toxigenen Stämmen (KONIETZNY & GREINER, 2003). Der Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen Fumonisinbildung *ad planta* und dem kumulativem Nachweis der *fum1*- und *fum8*-Gene in den Pathogenitätstest-Stämmen bestätigt den methodischen Wert dieses Verfahrens zum Nachweis potenzieller FB-Produzenten.

Die Untersuchungen der *fum1*- und *fum8*-Fragmente zeigten Abweichungen bezüglich der phylogenetischen Beziehungen betreffender *Fusarium*-Arten, die nach *multi-locus* Sequenzanalysen (β -Tubulin, mtSSU rDNA, 28S rDNA; O'DONNELL et al., 1998), zur Implementierung von phylogenetischen Artkomplexen geführt haben (O'DONNELL et al., 1998; PROCTOR et al., 2004). Arten des *Gibberella fujikuroi* species complex 2 und 3 wurden anhand der

fum1- bzw. *fum8*-Sequenzen in zwei deutlich divergierende Cluster aufgetrennt, während Sequenzen aus Isolaten des *Gibberella fujikuroi* Artkomplexes 1 und *F. oxysporum* beiden Gruppen zugeordnet wurden (Abb.2). Fumonisinbildende Arten der Gattung *Fusarium* können aufgrund der untersuchten *fum1*- bzw. *fum8*- Sequenzabschnitte nur eingeschränkt differenziert bzw. identifiziert werden. Eine Diagnose fumonisinbildender Arten der Gattung *Fusarium* und die Einschätzung der davon ausgehenden Schad- und Kontaminationspotentiale sollte deshalb auf Basis kombinierter Untersuchungen speziesrelevanter Genabschnitte wie z.B. *tef1a* (GEISER et al., 2004) mit Abschnitten der essentiellen Gene *fum1* und *fum8* des Fumonisin-Genclusters erfolgen.

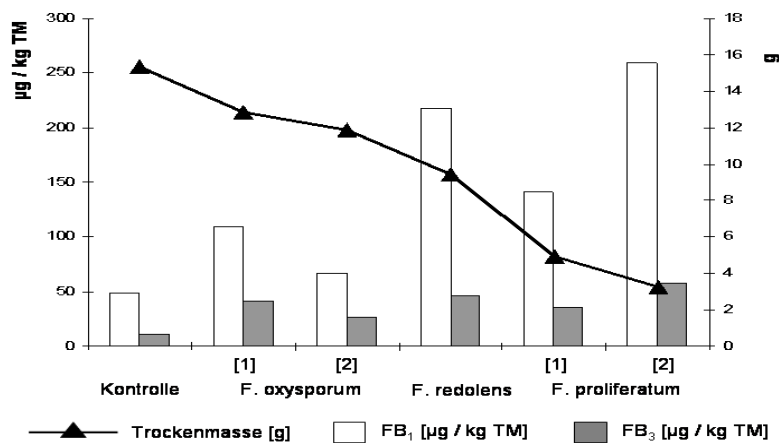


Abbildung 1: Durchschnittliche Trockenmassen der Versuchspflanzen 81 dpi und ermittelte Fumonisin B₁- und B₃-Gehalte in Wurzel- und Kronenmischproben der einzelnen Varianten.

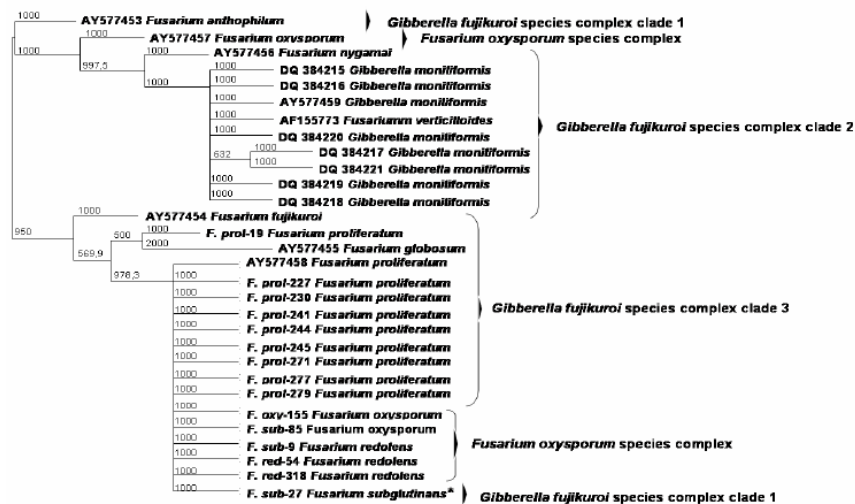


Abbildung 2: Phylogramm der *fum1*-DNA-Fragmente (491 bp) nach *maximum parsimony*-Analyse (*bootstrap*-Einstellung, n = 1000).

Literatur

ELMER W.H. (2004) Combining nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* with sodium chloride to suppress fusarium crown rot of asparagus in replanted fields. Plant Path. Vol. 53, p. 751 - 758.

- GEISER D.M., DEL MAR JIMENEZ-GASCO M., KANG S., MAKALOWSKA I., VEERARAGHA VAN N., WARD T.J., ZHANG N., KULDAU G.A., O'DONNELL K. (2004)** *Fusarium*-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Europ. J. Plant Pathology* Vol. 110, p. 473 – 479.
- KONIETZNY U., GREINER R. (2003)** The Application Of PCR In The Detection Of Mycotoxigenic Fungi In Foods. *Brazilian Journal of Microbiology* 34, 283-300
- LOGRIECO A., DAKO B., MORETTI A., FRISSULLO S., VISCONTI A. (1998)** Occurrence of fumonisin B1 and B2 in *Fusarium proliferatum* infected asparagus plants. *J. Agric. Food Chem.* Vol 46, p. 5201 - 5204.
- O'DONNELL K., CIGELNIK E., NIRENBERG H.I. (1998)** Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* Vol. 9, No. 3, p. 465 - 493.
- PONTAROLI A.C., CAMADRO E.L., BABINEC F.J., RIDAO A. (2000)** Responses of *Asparagus officinalis* pollen to the culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Scientia Horticulturae* 84, p. 349 - 356.
- PROCTOR R.H., PLATTNER R.D., BROWN D.W., SEO J.-A., LEE Y.-W. (2004)** Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycol. Res.* Vol. 108, p. 815 – 822.
- SEEFELDER W., GOSSMANN M., HUMPF H.-U. (2002)** Analysis of fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 50, p. 2778 - 2781.

Autoren

Oliver MARTINEZ*, Dr. Susanne VON BARGEN, Dr. Monika GOßMANN, Anne-Mareen EISOLD, Prof. Dr. Hans-Ulrich HUMPF, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER. Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin

* korrespondierender Autor: oliver.martinez@gmx.de