

Nachweis von Fumonisin-Biosynthesegenen und Fumonisin-Bildung bei *Fusarium proliferatum*- und *Fusarium oxysporum*-Isolaten aus Spargel (*Asparagus officinalis*) sowie Untersuchungen zur Pathogenität *in vitro*

Detection of fumonisin genes, fumonisin production and pathogenicity of Fusarium proliferatum and Fusarium oxysporum strains from asparagus

ALEXANDRA SCHOLZ, JULIA-KRISTIN PLATE,
MONIKA GOßMANN, SUSANNE VON BARGEN & CARMEN BÜTTNER

Summary

Fusarium oxysporum and *F. proliferatum* are causal agents of the crown and root rot of asparagus. They are able to produce fumonisins, which are toxic to humans and may increase the virulence of the fungi. Studies showed that already young asparagus plants can be infected with *Fusarium* spp. The genetic analysis (PCR) of selected strains of the species mentioned above demonstrated, that essential genes involved in fumonisin biosynthesis (*FUM1* and *FUM8*) were detectable in investigated strains of *F. proliferatum* but not in all strains of *F. oxysporum*.

Besides, the HPLC showed that these strains were not able to produce fumonisins. All tested *F. oxysporum* and *F. proliferatum* strains were pathogenic to asparagus, although they differed significantly in their virulence.

Keywords

Asparagus officinalis, fumonisins, *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, HPLC, pathogenicity test

Zusammenfassung

Die zu den Fumonisin-Bildnern gehörenden Arten *Fusarium oxysporum* und *F. proliferatum* sind Verursacher der Wurzel- und Kronenfäule an Spargel. Fumonisine stellen ein Gesundheitsrisiko dar und spielen ggf. eine Rolle bei der Pathogenese an der Pflanze. Untersuchungen zeigten, dass bereits Spargelpflanzgut mit *Fusarium* spp. infiziert ist.

Eine Überprüfung ausgewählter Isolate durch PCR ergab, dass essentielle Gene des Fumonisin-Biosyntheseweges (*FUM1* und *FUM8*) in den untersuchten *F. proliferatum*-Isolaten, nicht aber in allen Isolaten von *F. oxysporum* nachweisbar waren. Die HPLC bestätigte zudem, dass diese *F. oxysporum*-Isolate keine Fumonisine bilden.

Eine Korrelation zwischen dem Fumonisin-Bildungsvermögen der Isolate und deren Pathogenität konnte nicht festgestellt werden. Die Isolate unterschieden sich aber in ihrer Virulenz.

Schlüsselwörter

Asparagus officinalis, Fumonisine, *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, HPLC, *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest

Einführung

Fusarium oxysporum und *F. proliferatum* sind Verursacher der Wurzel- und Kronenfäule an Spargel und in der Lage Fumonisine zu bilden [1]. Fumonisine stellen ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar und werden als Virulenzfaktoren an der Pflanze diskutiert [2].

Fumonisine und deren Biosynthesegene

FUM1 (kodiert für eine Polyketidsynthase) und *FUM8* (kodiert für eine Aminoacyltransferase) stellen essentielle Gene der Fumonisin-Biosynthese dar [3]. Auf diese Gene hin untersucht wurden zwei *F. proliferatum*- und fünf *F. oxysporum*-Isolate aus Spargel. Dabei konnte mittels PCR bei beiden *F. proliferatum*-Isolaten und bei einem *F. oxysporum*-Isolat (Foxy-155-Sp) das *FUM1*- und das *FUM8*-Gen nachgewiesen werden. Bei den restlichen *F. oxysporum*-Isolaten zeigten sich bei der *FUM1*-PCR nur schwache oder keine Amplifikate (Abb.1). Das *FUM8*-Genfragment konnte bei diesen Isolaten nicht amplifiziert werden.

Eine Kultivierung der Isolate auf Maisextrakt-Agar erlaubte eine Fumonisin-Quantifizierung (FB₁ und FB₂) per HPLC. Dabei erwies sich die *F. proliferatum*-Isolate als starke FB₁- und FB₂-Bildner. Bei den *F. oxysporum*-Isolaten bildete nur das Isolat Foxy-155-Sp FB₁ (Abb. 2).

Bei den anderen *F. oxysporum*-Isolaten muss, trotz teilweise vorhandener Messwerte, davon ausgegangen werden, dass keine Fumonisine gebildet wurden.

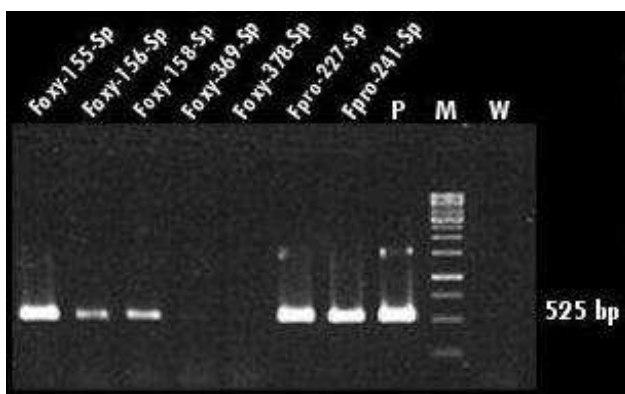


Abb. 1: PCR-amplifiziertes *FUM1*-Genfragment (525 bp) der Isolate, P = Positivkontrolle, M = Marker, W = Negativkontrolle

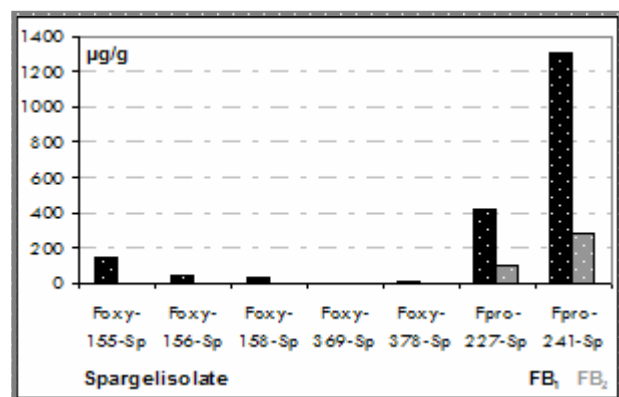


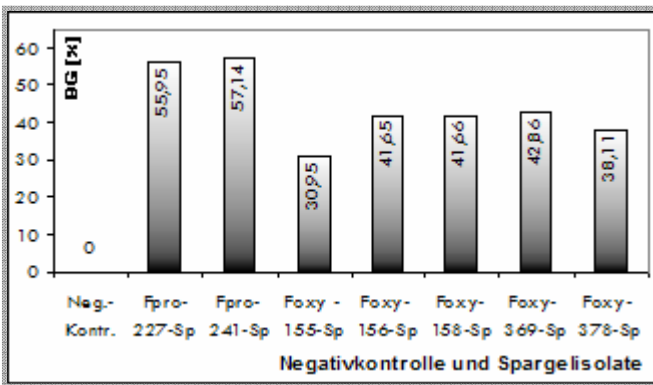
Abb. 2: Mittelwerte (n = 6) der FB₁- und FB₂-Gehalte der Spargelisolates kultiviert auf Maisextraktagar

In vitro-Pathogenitätsschnelltest

Ein Pathogenitätsschnelltest [4] an Spargeljungpflanzen (Sorte RAMOS) sollte von den o. g. genannten Isolaten die Fähigkeit zur Besiedelung und Etablierung in der Pflanze ermitteln und mögliche Korrelationen zwischen der Fumonisin-Bildung und der Virulenz untersuchen.

Der Befallsgrad (errechnet anhand der Wurzelbonitur bzw. Einteilung der Wurzeln anhand ihres Zustandes in 4 Schadensklassen) bestätigte die Fähigkeit aller Isolate in die Wurzel einzudringen,

sich in den Leitbahnen anzusiedeln und zu Verbräunungen zu führen. Die *F. proliferatum*-Isolate unterschieden sich dabei in ihrer Virulenz signifikant von den *F. oxysporum*-Isolaten und wiesen



Befallsgrade von fast 60 % auf, während bei *F. oxysporum* die Befallsgrade zwischen 31 und 43 % lagen (Abb 3).

Abb. 3: Befallsgrade der geprüften *Fusarium* spp.-Isolate an Spargeljungpflanzen nach zweiwöchiger Inkubation

Freilanduntersuchungen

Im Frühjahr 2009 wurden zwei Flächen auf dem Versuchsfeld der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät in Berlin-Dahlem mit Spargelpflanzen (Sorte RAVEL) bepflanzt.

Um die Pilzbesiedlung des einjährigen Spargelpflanzgutes zu ermitteln, wurden 100 Jungpflanzen vor der Pflanzung zufällig ausgewählt und drei Wurzelstücke pro Pflanze kronennah entnommen, oberflächendesinfiziert und auf Nährmedium (Spezieller Nährstoffarmer Agar) ausgelegt. Nach einer zehntägigen Inkubation erfolgte eine lichtmikroskopische Determinierung des Pilzauswuchses auf morphologischer Basis. Bei 90 Pflanzen waren die Wurzeln mit Pilzen besiedelt (31 Wurzeln mit einem Pilz, 28 mit zwei Pilzen und 31 mit drei oder mehreren Pilzen).

Ein besonderer Fokus lag auf der endophytischen Besiedlung durch *Fusarium* spp. (Abb. 4). Insgesamt waren die Wurzeln von 44 Pflanzen mit *Fusarium* spp. kontaminiert; davon entfiel ein hoher Anteil (26 Pflanzen) auf eine Besiedelung mit *F. oxysporum* und anderen Pilzen (z. B. *Chaetomium* sp., *Monocillium* sp., *Acremonium* sp.). *F. redolens* wurde an fünf Pflanzen in Kombination mit weiteren Pilzen gefunden. An sechs Pflanzen konnte eine alleinige Kontamination mit *F. oxysporum* und an einer Pflanze eine alleinige Kontamination mit *F. redolens* nachgewiesen werden. Mischinfektionen von *F. oxysporum* und *F. redolens*, sowie weiteren Pilzen traten an fünf Pflanzen auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass schon Jungpflanzen mit *Fusarium* spp. kontaminiert sein können.

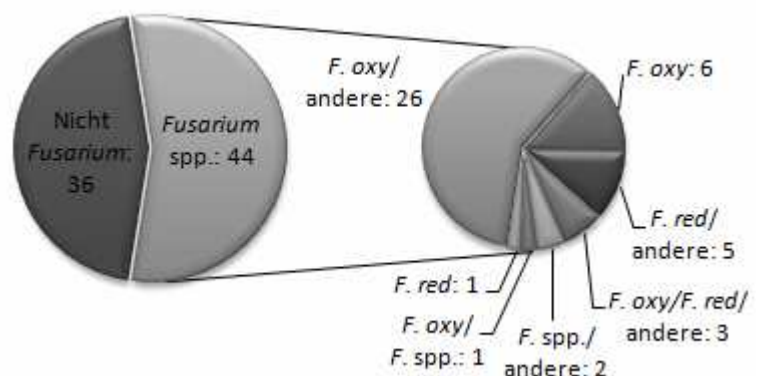


Abb. 4: Zusammensetzung der Kontamination der Wurzeln von Spargeljungpflanzen (n = 100) mit *Fusarium* spp.

Diskussion

Infektionen mit *Fusarium* spp. stellen ein erhebliches Problem im Spargelanbau dar. Wie kürzliche Untersuchungen erneut belegten, können bereits Spargeljungpflanzen mit *F. oxysporum* u. a. *Fusarium*-Arten belastet sein. *F. oxysporum* zählt zu den Fumonisin-Bildnern [1], wobei nicht alle Isolate, aufgrund der hohen genetischen Varianz dieser Art [5], Fumonisine bilden können.

Mittels PCR wurden essentielle Gene (*FUM1* und *FUM8*) des Biosyntheseweges bei den *F. proliferatum*-Isolaten sowie bei einem *F. oxysporum*-Isolat (Foxy-155-Sp) nachgewiesen. Zudem konnte bei diesen Isolaten die Fumonisin-Bildung mittels HPLC belegt werden. Bei den restlichen *F. oxysporum*-Isolaten kann davon ausgegangen werden, dass weder das kodierende Gen für die *FUM1*-Polyketidsynthase noch für die Aminoacyltransferase (*FUM8*) vorliegen. Der negative Nachweis der Fumonisin-Bildung bestätigen diese Annahme. Bei den Isolaten Foxy-156-Sp und Foxy-158-Sp zeigten sich zwar schwache Amplifikate bei der *FUM1*-PCR, wobei es zu bedenken gilt, dass Polyketidsynthasen sowohl Grundgerüste für die Fumonisine, wie für andere Stoffwechselprodukte sind [6]. Bei diesen beiden Isolaten scheint, im Gegensatz zu den restlichen *F. oxysporum*-Isolaten, auf genetischer Ebene eine Polyketidsynthase mit sehr ähnlicher Sequenz, wie die der *FUM1*-Polyketidsynthase im Bereich der Primerbindung vorzuliegen.

Der *in vitro*-Pathogenitätstest zeigte keine Korrelation zwischen der Fumonisin-Bildung und der Pathogenität. Alle getesteten Isolate erwiesen sich als pathogen an Spargel, unterschieden sich aber in ihrer Virulenz. Die starken Fumonisin-Bildner (Fpro-227-Sp und Fpro-241-Sp) stellten sich im Test als sehr virulent heraus. Bei *F. oxysporum* hingegen waren diejenigen Isolate die keine Fumonisine bildeten aggressiver. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Isolate andere/weitere Virulenzfaktoren besitzen, die eine erfolgreiche Infektion von Spargel ermöglichen. Dies können beispielsweise andere Mykotoxine sein, die durch *F. oxysporum* gebildet werden [7].

Literatur

1. SEIFERT et al. (2004): European Journal of Plant Pathology **110**, 449-471
2. DESJARDINS et al. (1995): Applied and Environmental Microbiology **61**, 79-86
3. BROWN et al. (2007): Eukaryotic Cell **6**, 1210-1218
4. SCHOLZ et al. (2009): ALVA-Mitteilungen **7**, 61-64
5. KISTLER (1997): Phytopathology **87**, 474-479
6. KROKEN et al. (2003): PNAS **100**, 15670-15675
7. MARASAS et al. (1984): The Pennsylvania State University Press, University Park

Autoren

Alexandra SCHOLZ, Julia-Kristin PLATE, Dr. Monika GOßMANN, Dr. Susanne VON BARGEN, & Prof. Dr. Carmen BÜTTNER, Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin, phytomedizin@agrار.hu-berlin.de