Aus dem
Institut für Zuckerrübenforschung
Göttingen

Daniela Sabine Christ

Fusarium in Zuckerrüben – Artspektrum, Pathogenität und Mykotoxinbildung sowie Kreuzpathogenität in Weizen

30 / 2010

Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Fusarium in Zuckerrüben – Artspektrum, Pathogenität und Mykotoxinbildung sowie Kreuzpathogenität in Weizen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Agrarwissenschaften

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Daniela Sabine Christ

geboren in Velbert

Göttingen, November 2010

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2011

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2010

978-3-86955-676-5

D 7

1. Referent: Prof. Dr. Mark Varrelmann

2. Korreferent: Prof. Dr. Heiko Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2010

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2011

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2011

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-676-5

The scientist does not study nature because it is useful; he studies it because he delights in it, and he delights in it because it is beautiful. If nature were not beautiful, it would not be worth knowing, and if nature were not worth knowing, life would not be worth living.

Jules Henri Poincaré

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I

Tabellenverzeichnis III

Abbildungsverzeichnis IV

1. Einleitung 1

1.1 *Fusarium*-Biologie 1

1.1.1 Systematik und Artbestimmung 1

1.1.2 Überdauerung, Vermehrung und Verbreitung 5

1.1.3 Pathogene, Saprobionten, Endophyten – Überlebensstrategien von *Fusarium* spp. .. 9

1.2 Mykotoxine 11

1.2.1 *Fusarium* Mykotoxine 12

Trichothecene 12

Zearalenon 15

Fumonisine 16

Cyclohexadepsipeptide 18

Moniliformin 18

1.3 *Fusarium* als Pathogen in landwirtschaftlichen Kulturpflanzen 19

1.3.1 Fusarium Head Blight in Weizen 21

Wirtschaftliche Bedeutung 21

Beteiligte *Fusarium* spp. 21

Infektion und Symptome 22

Bedeutung von ackerbaulichen Faktoren 24

1.3.2 *Fusarium* in Zuckerrüben 26

„Fusarium Yellows" 27

„Fusarium Root Rot" 28

Sekundäre Rübenfäulen 29

„Fusarium Stalk Blight" 30

Umfallkrankheit („Damping-off") 30

Lagerfäule 31

2. Ziele der Arbeit 34

3. Manuskript 1: Occurrence, Pathogenicity, and Mycotoxigenic Potential of *Fusarium* Species in Freshly-Harvested and Stored Sugar Beet 36

4. Manuskript 2: Pathogenicity, Symptom Development, and Mycotoxin Formation in Wheat by *Fusarium* Species Frequently Isolated from Sugar Beet 64

5. Diskussion 90

5.1 Lagerungsversuche Zuckerrüben 90

5.1.1 Auftreten unterschiedlicher *Fusarium* spp. in ungelagerten und gelagerten Zuckerrüben 90

5.1.2 Isolationsrate vs. Infektionsrate: Schwierigkeiten bei der Quantifizierung von *Fusarium* in Zuckerrüben 92

5.2 Pathogenität von *Fusarium* spp. in Zuckerrübe 94

5.3 Mykotoxinbildung von aus Zuckerrübe isolierten *Fusarium* spp. 98

5.4 Bedeutung einer möglichen Mykotoxinkontamination von Zuckerrüben 101

5.5 Pathogenität von aus Zuckerrübe isolierten *Fusarium* spp. in Weizen 104

5.6 *Fusarium* in Weizen-Zuckerrüben-Fruchtfolgen 109

6. Zusammenfassung 112

7. Literaturverzeichnis 114

Publikationen und Vorträge 137

Danksagung 139

Lebenslauf 140

Abkürzungsverzeichnis

15-ADON	15-Acetyldeoxynivalenol
2-AOD-3-ol	2-Amino-14,16-Dimethyloctadecan-3-ol
3-ADON	3-Acetyldeoxynivalenol
AVENA	Avenacein Y (syn. Antibiotic Y)
BEAU	Beauvericin
cv.	Sorte
DAS	Diacetoxyscirpenol
DI	Disease Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol
dpi	Tage nach Inokulation
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ENNI	Enniatin
EQUI	Equisetin
f. sp.	forma specialis
FB_1, FB_2, FB_3	Fumonisin B_1, B_2, B_3
FHB	Fusarium Head Blight
Fob	*Fusarium oxysporum* f. sp. *betae*
FUM	Fumonisin
FUS X	Fusarenon X (syn. 4-Acetylnivalenol)
HPLC-MS/MS	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
MAS	Monoacetoxyscirpenol
MON	Moniliformin

NEO	Neosolaniol
NIV	Nivalenol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Potato dextrose agar
QTL	Quantitative trait loci
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNA	Spezieller nährstoffarmer Agar
TKG	Tausendkorngewicht
VCG	Vegetative compatibility group
ZEA	Zearalenon
ZOL	Zearalenol

Tabellenverzeichnis

Tabellen in der Einleitung

Tabelle 1: Spezieskonzepte in der Gattung *Fusarium*..... 3

Tabelle 2: Gegenüberstellung von *Fusarium*-Anamorphen mit den entsprechenden teleomorphen Bezeichnungen. 7

Tabelle 3: Vergleich der akuten Toxizität einiger A- und B-Trichothecene nach intraperitonealer Verabreichung..... 14

Tabellen in Manuskripten

Manuskript 1:

Table 1: *Fusarium* species isolated from sugar beets subjected to different storage conditions in 2006/07..... 44

Table 2: Mycotoxins (mg/kg) produced by trichothecene producing *Fusarium* spp. isolated from sugar beet in autoclaved rice after four weeks incubation at 22°C. 48

Table 3: Mycotoxins (mg/kg) produced by trichothecene non-producing *Fusarium* spp. isolated from sugar beet in autoclaved rice after four weeks incubation at 22°C..... 50

Manuskript 2:

Table 1: Mean disease indices after artificial inoculation of cultivar 'Kadrilj' with seven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet compared to a *F. graminearum* control strain from wheat. Means within columns followed by the same letter are not significantly different (Tukey pair-wise test, $\alpha \leq 0.05$). 71

Table 2: Mycotoxins (µg/kg) detected in grains of wheat cv. 'Kadrilj' after head inoculation with *Fusarium* spp. isolated from sugar beet compared to a *F. graminearum* strain from wheat (means of two repetitions)..... 75

Table 3: Comparison of mycotoxin content in different kernel fractions of wheat cv. 'Tybalt' inoculated with *F. equiseti*. 77

Table 4: Comparison of mycotoxin content in different kernel fractions of wheat cv. 'Tybalt' inoculated with *F. tricinctum*. 77

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen in Einleitung und Diskussion

Abbildung 1: Infektionsverlauf von FHB. 23

Abbildung 2: Ernterückstände nach Weizen und Mais..... 24

Abbildung 3: Lagerfäule bei Zuckerrüben..... 32

Abbildung 4: Unterschiedliche Lebensformen von *F. cerealis* 96

Abbildung 5: Zuckerrübenernterückstände nach nicht-wendender Bodenbearbeitung..... 110

Abbildungen in Manuskripten

Manuskript 1

Figure 1: Results of greenhouse pathogenicity tests of *Fusarium* spp. in sugar beet (n=20). Beet symptoms were rated according to a 0 (healthy) to 5 (beet completely necrotic) scale. Numbers above bars indicate average disease score. 45

Manuskript 2:

Figure 1: Characteristic symptoms caused by *F. tricinctum* and *F. equiseti* isolated from sugar beet on wheat cv. 'Kadrilj' following spray inoculation. Necrotic edges of glumes were typical symptoms of *F. tricinctum* (A). Slight discolorations on palea and lemma, sometimes only visible when twisting glumes or florets, were usually the only sign of infection (B-C).. 72

Figure 2: Percentage of scabby kernels (A) and black point kernels (B) induced in wheat cultivar 'Kadrilj' following artificial inoculation with seven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet compared to a *F. graminearum* strain from wheat. Medians with non-overlapping letter ranges differed significantly ($\alpha \leq 0{,}05$, adjustment:Tukey–Kramer pair-wise test). 74

1. Einleitung

1.1 *Fusarium*-Biologie

1.1.1 Systematik und Artbestimmung

Fusarium gehört genauso wie z.B. auch *Aspergillus* und *Penicillium* zu den Schimmelpilzen. Diese filamentösen Pilze bilden, systematisch gesehen, eine sehr heterogene Gruppe und werden in unterschiedliche Abteilungen eingeordnet. Für viele Fusarien ist bisher noch keine Hauptfruchtform (Teleomorph) bekannt, von daher werden sie zu den Deuteromyceten (= Fungi imperfecti) gezählt. Die teleomorphen Formen gehören dagegen zu den Ascomyceten (Hoffmann et al., 1994). Die Gattung *Fusarium* wurde von Heinrich Friedrich Link im Jahr 1809 eingeführt – wie viele Arten genau dazu gehören, ist jedoch umstritten. Laut Leslie und Summerell (2006) sind es zwischen neun und über 1.000. Diese stark schwankende Anzahl liegt darin begründet, dass es unterschiedliche Spezieskonzepte und darin wiederum unterschiedliche taxonomische Strömungen gibt. Eine Art kann u.a. dadurch definiert werden, dass sie sich durch typische morphologische Merkmale von einer anderen unterscheidet (morphologische Spezies), sich mit anderen Mitgliedern derselben Art kreuzen lässt (biologische Spezies) oder auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeht (phylogenetische Spezies). Es gibt bisher keinen Konsens darüber, welches Konzept bei *Fusarium* angewendet werden sollte. Daher ist die Kenntnis der einzelnen Theorien wichtig für die Interpretation von Forschungsergebnissen zum Vorkommen von unterschiedlichen *Fusarium* spp. in Kulturpflanzen.

Das morphologische Spezieskonzept bildet das Rückgrat der *Fusarium*-Taxonomie. Die morphologische Artdifferenzierung beruht in der Theorie auf wenigen, dafür aber leicht voneinander zu unterscheidenden Merkmalen. Dazu zählen u.a. Größe, Form, Art der Apikal- und Fußzelle sowie die Septenanzahl der Makrokonidien. Weitere Sporenformen (sofern vorhanden) wie Mikrokonidien, Mesokonidien, Chlamydosporen und Ascosporen genauso

wie die Pigmentierung des Myzels können als zusätzliche Anhaltspunkte dienen. All diese Merkmale weisen eine natürliche Variation auf. Je nachdem, wie viel Gewicht auf die Konstanz einzelner Merkmale gelegt wird, kann eine unterschiedliche Anzahl an Arten definiert werden. Nelson et al. (1994) teilen daher die *Fusarium*-Taxonomen in „Lumpers" (to lump: engl. Klumpen bilden), „Splitters" (to splitt: engl. spalten) und „Moderates" (moderate: engl. gemäßigt) ein (Tabelle 1, S. 3). Wollenweber und Reinking waren die Ersten, die ein einheitliches Spezieskonzept für die Gattung *Fusarium* aufstellten. Alle weiteren Konzepte beruhen auf ihrem 1935 erschienenen Standardwerk „Die Fusarien". In diesem werden die über 1.000 unterschiedlichen Artbezeichnungen 16 Sektionen zugeordnet, welche insgesamt 65 Arten, 55 Varietäten und 22 Formen enthalten. Snyder und Hansen (1940, 1941, 1945), die „ultimate lumpers" (Nelson et al. 1994), kombinierten diese zu nur neun Arten. Eine Einteilung, die bis in 1980er Jahre weit verbreitet war, ermöglichte sie doch eine sehr einfache Bestimmung. Die moderne *Fusarium* Taxonomie lehnt das Spezieskonzept nach Snyder und Hansen jedoch als zu verallgemeinernd ab. Allein die von Snyder und Hansen beschriebene Art *F. roseum* besteht nach Gerlach und Nirenberg (1982) bzw. Nelson et al. (1993) aus mindestens 14 morphologisch zu unterscheidenden *Fusarium* spp., darunter auch *F. graminearum*. Auch *F. oxysporum* und *F. solani*, die ebenfalls von Snyder und Hansen definiert wurden, bestehen aus heutiger Sicht aus mehreren unterschiedlichen Arten. Eine Aufspaltung anhand der Sporenmorphologie, wie bei *F. roseum*, ist jedoch nicht möglich. *F. oxysporum* wurde daher schon sehr früh auf Grund des sehr weiten Wirtsspektrums in formae speciales (f. sp.) eingeteilt (Snyder und Hansen, 1940). Snyder (1981) definiert diese folgendermaßen: „The species epithet tells what a fungus is; the forma specialis, what it does". Das heißt, eine forma specialis ist theoretisch nur an einer bestimmten Pflanzenart oder einer Pflanzengruppe pathogen. Außerdem wurde Rassenbildung beobachtet (Gordon und Martyn, 1997).

Das biologische Spezieskonzept definiert dagegen eine Art als eine Gruppe von Organismen, die, zumindest theoretisch, miteinander kreuzbar sind und einen gemeinsamen Genpool teilen oder teilen könnten (Leslie und Summerell, 2006). Dieses Konzept kann nur mit einigen Schwierigkeiten auf die Gattung *Fusarium* angewendet werden. Zum einen gibt es viele „Arten", die keine sexuelle Reproduktion zeigen und nur in anamorpher Form vorkommen (siehe Kapitel 1.1.2 Überdauerung, Vermehrung und Verbreitung), zum anderen gibt es nur eine sehr begrenzte Anzahl an fertilen Stämmen, die als weiblicher Elter verwendet werden können (Leslie und Summerell, 2006).

Tabelle 1: Spezieskonzepte in der Gattung *Fusarium*. Je nachdem, welche Philosophie hinter dem Konzept steht, werden die *Fusarium*-Taxonomen als „Lumpers", „Splitters" oder „Moderates" bezeichnet. Die absolute Anzahl der postulierten Spezies ist dabei nicht entscheidend (nach Nelson et al., 1994).

„Lumpers"	„Moderates"	„Splitters"
Snyder und Hansen 1940er – USA 9 Arten	Gordon 1952 – Kanada 26 Arten	Wollenweber und Reinking 1935 – Deutschland 65 Arten
Messiaen und Cassini 1968 – Frankreich 9 Arten	Booth 1971 – England 44 Arten	Raillo 1950 – Russland 55 Arten
Matuo 1972 – Japan 10 Arten	Nelson, Toussoun und Marasas 1983 – USA 30 Arten	Bilai 1955 – Russland 26 Arten
		Joffe 1974 –Israel 33 Arten
		Gerlach 1982 – Deutschland 78 Arten

Derzeit wird die *Fusarium* Taxonomie mit Hilfe molekularer, phylogenetischer Methoden neu geordnet. Das phylogenetische Spezieskonzept beruht auf der Annahme, dass alle Angehörigen einer Art einen gemeinsamen Vorfahren haben, also monophyletisch sind (Leslie und Summerell, 2006). Molekulargenetische Untersuchungen von *F. oxysporum*

haben jedoch gezeigt, dass es selbst innerhalb einer forma specialis polyphyletische Ursprünge gibt (O'Donnell et al., 1998). Daher werden *F. oxysporum* und auch *F. solani* mittlerweile als Spezieskomplexe bezeichnet (Kistler, 1997; Zhang et al., 2006). Dies gilt auch für *F. graminearum*. Bei Snyder und Hansen war *F. graminearum* noch nicht mal eine eigenständige Art – nach phylogenetischer Untersuchung der DNA-Sequenzen von 13 Einzelkopie-Genen enthält der *F. graminearum*-Spezieskomplex dagegen mindestens 11 Arten: *F. acaciae-mearnsii*, *F. asiaticum*, *F. austroamericanum*, *F. boothii*, *F. brasilicum*, *F. cortaderiae*, *F. gerlachii*, *F. graminearum*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum* und *F. vorosii* (Starkey et al., 2007). Diese Einteilung hat sich jedoch in der praktischen Phytomedizin (noch) nicht durchgesetzt. Zum einen lassen sich die einzelnen Arten der Spezieskomplexe nur durch aufwendige molekulargenetische Untersuchungen voneinander unterscheiden, zum anderen, wie im Falle von *F. oxysporum* und *F. solani*, gibt es noch keine offizielle Nomenklatur für evtl. neue Arten. Von daher wird auch in der vorliegenden Arbeit keine weitere Unterteilung von *F. graminearum*, *F. oxysporum* und *F. solani* vorgenommen.

Auch bei der Artbestimmung von im Feld isolierten *Fusarium* spp. gibt es unterschiedliche Ansätze. Die morphologische Artdifferenzierung beruht auf der mikroskopischen Unterscheidung von typischen Sporenmerkmalen und dem Vergleich mit entsprechender Bestimmungsliteratur (u.a. Gerlach und Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983; Leslie und Summerell, 2006). Für eine Grobeinteilung eignet sich außerdem die Pigmentierung des Myzels (Summerell et al., 2003). Problematisch dabei ist, dass Fusarien in Kultur zur Degeneration und Mutation neigen und eine hohe Variabilität aufweisen (Leslie und Summerell, 2006). Zudem sind die Unterschiede manchmal so graduell, dass eine Artdifferenzierung nur mit sehr viel Erfahrung sicher durchzuführen ist. Biologische Verfahren beinhalten die Durchführung von Testkreuzungen bei Arten mit bekannter sexueller Reproduktion und die Einteilung in sogenannte „Vegetative Compatibility Groups" (VCG) (Leslie und Summerell, 2006). Moderne, molekulargenetische Verfahren