

Genomforschung an *F. graminearum*: relevant für zukünftige Bekämpfungsstrategien?

Gerhard Adam^{1*}

Zusammenfassung

Die Kontrolle des pathogenen Pilzes *Fusarium graminearum*, des Erregers der Ährenfusariose von Getreide und der Kolbenfäule von Mais und Krankheiten ist schwierig. Der Pilz hat ein enorm breites Wirtsspektrum, und es sind keine vollständigen Resistenzen im Zuchtmaterial bekannt. Fungizidbehandlung und Biokontrolle sind ineffizient, und gegenwärtige Trends im Pflanzenbau (nichtwendender Bodenbearbeitung) dürften den Befallsdruck in Zukunft noch erhöhen. Eine Hoffnung ist, dass Genomforschung an *Fusarium* zu einem verbesserten Verständnis der Virulenzmechanismen dieses Pilzes führen wird. Aufgrund der erstaunlichen Zahl an vorhergesagten Genen mit einer Rolle in der Biosynthese von (derzeit weitgehend unbekannt) Sekundärmetaboliten im *Fusarium*-Genom, ist unsere Arbeitshypothese, dass der Pilz mit mehreren redundanten Sekundärmetaboliten („Toxinen“) die Pathogenabwehr von Pflanzen lahm legen kann. Es erscheint daher nötig durch interdisziplinäre Ansätze (Methoden der Genomik und Metabolomik) zu erforschen, um welche Metaboliten es sich handelt, welchen Wirkungsmechanismus sie in Pflanzen haben, und wie sie von Pflanzen neutralisiert werden können. Die Detoxifikation von Metaboliten mit einer Virulenzfunktion sollte daher wesentlich zur *Fusarium*-Resistenz beitragen. Die Identifizierung solcher Kandidatengene sollte neue Wege für die *Fusarium*-Resistenzzüchtung öffnen.

Abstract

The fungal pathogen *Fusarium graminearum* which causes severe diseases of small grain cereals, maize and many other plants is difficult to control. Complete genetic resistance is not available in the breeding material, fungicide treatment and biocontrol lack efficacy, and changes in agricultural practice (low tillage) increase disease pressure. Analysis of the *F. graminearum* genome has the potential to provide increased understanding of the virulence mechanisms of this pathogenic fungus. Based on the amazing content of predicted secondary metabolite biosynthesis genes our working hypothesis is that the pathogen uses redundant metabolites („toxins“) which can suppress plant defense. Interdisciplinary approaches (genomics, metabolomics) should lead to new ways to identify metabolites corresponding to gene clusters, to explore their mode of action in plants, and how they are antagonized by plants. Detoxification of metabolites with a virulence function seems to be important for *Fusarium* resistance of plants, the identification of candidate genes with such a role should open new ways for resistance breeding.

Key words:

Fusarium, polyketide synthase, non-ribosomal peptide synthase, terpenoid synthase, glucosyltransferase

Einleitung

Im Gegensatz zu Mehltau- und Rostpilzen von Getreide hat *Fusarium graminearum* (und andere „nekrotrophe“ pflanzenpathogene Pilze) ein extrem breites Wirtsspektrum. Monogene vollständige Resistenzen sind in keinem der Wirte bekannt, sondern es wurden polygen vererbte quantitative Unterschiede in der Resistenz identifiziert (BUERSTMAYER et al. 2008). Dies deutet darauf hin, dass von Seite des Pilzes multiple Virulenzmechanismen benutzt werden, die in höher resistenten Linien zumindest partiell neutralisiert werden können. Über die molekularen Mechanismen, die es *F. graminearum* erlauben ein so breites Spektrum von Pflanzen zu befallen, ist noch wenig bekannt. Die Produktion des Proteinbiosynthese-inhibitors Deoxynivalenol (DON) ermöglicht es dem Pilz die Abwehrreaktion der Wirtspflanze (zumindest partiell) lahm zu legen oder zu verzögern. Gendisruptionsmutanten, die

keine Trichothecene mehr bilden, können sich in befallenen Weizen-Ähren nicht mehr ausbreiten. Der wirkungsvollste QTL für *Fusarium*-Ausbreitungsresistenz in Weizen geht mit erhöhter Toxinresistenz einher (LEMMENS et al. 2005), wobei DON in inaktives DON-Glucosid übergeführt wird (POPPENBERGER et al. 2003).

Durch den enormen Fortschritt in den Sequenzieretechniken und die Verfügbarkeit von Methoden der Genomforschung ist es nun möglich geworden, die Frage, welche anderen Gene für die Virulenz von *Fusarium* notwendig sind, neu zu stellen.

Werkzeuge und Ergebnisse der *Fusarium*-Genomforschung

Finanziert mit Mitteln des US Department of Agriculture (etwa 2 Millionen US \$) wurde die Sequenz des Genoms von

¹ Department für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 WIEN

* Ansprechpartner: Dr. Gerhard ADAM, gerhard.adam@boku.ac.at

Fusarium graminearum (sensu strictu) am Broad Institute ermittelt. (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_graminearum/Home.html).

Die Genomgröße von *Fusarium graminearum* beträgt annähernd 36 Mb (Millionen Basen), und ist somit etwa 12x größer als das Genom des Bakteriums *Escherichia coli*, oder 83x kleiner als das Genom des Menschen oder anderer Säugetiere. Die Strategie war dabei, die Enden von zufälligen Klonen aus Genbanken anzusequenzieren („shot-gun“ Methode), wobei solange sequenziert wurde, bis jede Base im Genom statistisch 10,6-fach abgedeckt war. Das daraus resultierende Puzzle (Sequenzen aus über 600.000 Sequenzläufen) wurde mittels eines Computerprogramms zusammengesetzt, wobei immer wieder kleine Lücken auftreten. Die Sequenz hat jedoch hervorragende Qualität, 97% aller Basen befinden sich in einer durchgängigen Sequenz („Contig“) größer 1,6 Mb.

Die Vorhersage, für welche Genprodukte die DNA Sequenz kodiert, ist bei Pilzen zur Zeit noch schwierig, da Programme zur Erkennung von Introns noch viele Fehler liefern. Verschiedene bioinformatische Algorithmen führten zu divergierenden Vorhersagen über die Zahl und Struktur der etwa 12.000 Proteine von *F. graminearum*.

Im Rahmen des österreichischen Genomforschungsprogrammes GEN-AU (Pilotprojekt FUSARIUM, Koordinator G. ADAM) wurde daher ein Schwerpunkt auf die manuelle Annotation und den benutzerfreundlichen Informationszugang gesetzt. Im Projekt wurde von Dr. Ulrich GÜLDENER (MIPS, Munich Information Center for Protein Sequences) eine für die weltweite *Fusarium*-Forschergemeinde nunmehr extrem wichtige Genomdatenbank (FGDB siehe: <http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/>) erstellt (GÜLDENER et al. 2006a). Basierend auf den Genmodellen wurde mit US Mitteln ein Affymetrix Gen-Chip erstellt (GÜLDENER et al. 2006b), der es nun erlaubt, die Expression aller *Fusarium*-Gene in einem Experiment zu verfolgen. Dies führte zum Beispiel zur Identifizierung von *F. graminearum* Genen, die ausschließlich während des Befalls der Pflanze exprimiert werden. Weiters wurden Gene gefunden, die

Tabelle 1: Vergleich der Genome von *Neurospora crassa* und *Fusarium graminearum*

Eigenschaft/Proteingruppe	<i>N. crassa</i>	<i>F. graminearum</i>
Genomgröße (Kb)	38.044	36.093
Vorhergesagte Zahl an Proteinen	10.082	11.640
Vorhersage „Sekretierte Proteine“	891	1.442
Transkriptionsregulator-Proteine	114	320
Major Facilitator Superfamily	121	292
Esterase/Lipase/Thioesterase	73	169
CYP Cytochrome P450	43	115
Zucker-Transportproteine	34	91
ABC transporter	44	76
NPS (nicht-ribosomale Peptid-Synthasen)	3	20
PKS (Polyketidsynthasen)	7	15
TPS (Terpenoidsynthasen)	7	17
Pektat-Lyase	2	13
Cutinasen	2	9
Pektin-Lyase	0	4

Ausgewählte Gruppen von Proteinen sortiert nach Häufigkeit. Fett gedruckt: Genprodukte mit einer vermutlichen Rolle im Sekundärmetabolismus und Transport von Metaboliten.

nur in *F. graminearum* vorkommen, in nahe verwandten *Fusarium*-Arten jedoch nicht. Weltweit bemühen sich nun Forscher mit Hilfe dieser neuen Ressourcen attraktive Kandidatengene auszuwählen und deren Relevanz experimentell zu testen. Die Ergebnisse der Arbeiten von 45 Forschern (davon 16 aus USA und Kanada, und 21 aus Europa) wurden in einem Ende 2007 erschienen Science-Artikel (und insbesondere im Supporting Online Material) zusammengefasst (<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/317/5843/1400/DC1>, CUOMO et al. 2007). Interessant ist zum Beispiel die Fragestellung, welche Unterschiede zwischen dem Genom eines nichtpathogenen Saprophyten (z.B. *Neurospora crassa*), und dem Phytopathogen *F. graminearum* bestehen (siehe *Tabelle 1*). Zwar ist das Genom des Pathogens etwas kleiner, es kodiert jedoch für etwa 1500 Gene mehr, wobei die Zahl der vorhergesagten „sekretierten Proteine“, von denen viele eine Rolle im Angriff auf die Pflanzenzellwand spielen dürften, im Pathogen deutlich größer ist. Auffällig ist auch, dass der pathogene Pilz mehr Transkriptionsregulator-Proteine aufweist. Neben Proteinen, welche die Zellwandpolymere angreifen (in *Tabelle 1* sind nur Pektinabbauende als Beispiel gezeigt) sind vor allem Zuckertransporter im Pathogenom überrepräsentiert. Besonders augenscheinlich ist jedoch, dass *F. graminearum* über eine wesentlich höhere Kapazität zur Biosynthese und zum Transport von Sekundärmetaboliten verfügt, wobei weitgehend unbekannt ist, was die Produkte dieser Synthesewege sind. Bekannte Produkte von Polyketidsynthasen (PKS) von *F. graminearum* sind z.B. das rote Pigment (Aurofusarin) und das östrogene Mykotoxin Zearalenon (ZON). Ein wichtiges Problem für pathogene Organismen ist generell die Versorgung mit dem Spurenelement Eisen. *Fusarium* produziert dazu die Siderophore Triacetylfusarinin, Ferricrocin und Malonichrom. Diese Verbindungen sind Produkte von nicht-ribosomalen Peptidsynthasen (NPS), Inaktivierung von *NPS6* (notwendig für Triacetylfusarinin-Synthese) führt zu verminderter Virulenz (OIDE et al. 2006). Die Trichothecene (z.B. Deoxynivalenol) dagegen sind Produkte einer Terpenoidsynthese (*TPS = TRI5*), die anschließend von Cytochrom P450 (*CYP*) Enzymen weiter modifiziert werden.

Die Bäckerhefe besitzt weder *PKS* noch *NPS* Gene und hat nur 5 *TPS* und 4 *CYP* Gene. Im Gegensatz dazu ergibt die bioinformatische Vorhersage für *F. graminearum* 20 *NPS*, 15 *PKS*, 17 *TPS* und 115 *CYP* Gene. Diese Zahlen sind auch wesentlich höher als beim Saprophyt *N. crassa* (zum Vergleich siehe *Tabelle 1*). Weiters besitzt der pathogene Pilz eine viel größere Zahl von Transporterproteinen (MFS und ABC), von denen zumindest ein Teil die Funktion haben dürfte, gebildeten Sekundärmetaboliten auszuschleusen.

Mehrere dieser Gene oder Gencluster sind nach Microarray-Analysen nur während der Infektion in planta exprimiert (z.B. *PKS15*, siehe *Abbildung 1*), und die korrespondierenden Metaboliten sind folglich bisherigen chemischen Analysen von Extrakten aus inokuliertem autoklavierten Getreide entgangen. Weiters war der bisherige Fokus durch die zur Fraktionierung von Extrakten eingesetzten Bioassays auf akut toxische Substanzen eingengt. Unsere Hypothese ist, dass einige der *Fusarium*-Metaboliten in wesentlich subtilerer Weise die Signaltransduktion in Pflanzen

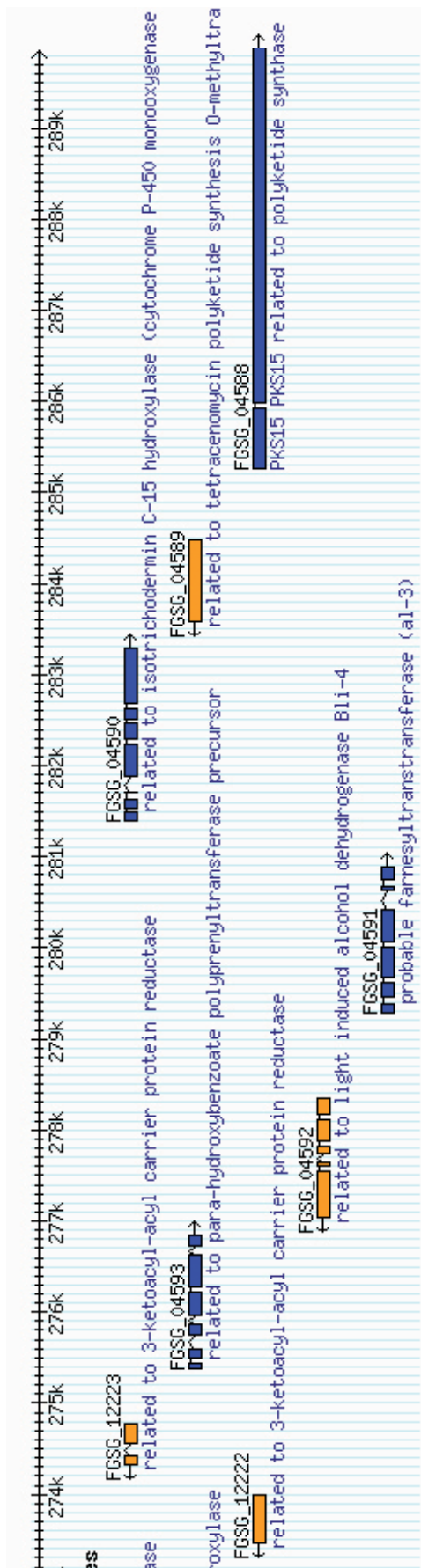


Abbildung 1: In planta induzierter Gencluster um *PKS15* (automatisierte Annotationen laut FGDB)

stören. Noch unveröffentlichte Ergebnisse unserer Gruppe zeigen dass *F. graminearum* einen kaum phytotoxischen Metabolit produziert, der Hsp90 (heat shock protein 90 kd) ATPase Inhibitor Aktivität aufweist (TORRES-ACOSTA et al., in Vorbereitung). Hsp90 ist notwendig für die korrekte Faltung und Stabilität einer Vielzahl von Proteinen mit einer Funktion als Signaltransduktionskomponenten (e.g. Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, Produkte von Resistenzgenen). Beispielsweise interagiert Hsp90 mit dem Produkt eines Resistenzgens aus Tomate, das gegen *F. oxysporum* wirksam ist (DE LA FUENTE VAN BENTEM et al. 2005).

Die Aufklärung der Struktur der Metaboliten, die den verschiedenen bioinformatisch vorhergesagten Biosynthesegenen zuzuordnen sind, und deren Funktion in Pflanzen gehört zu den Zielen eines neuen an der BOKU eingerichteten und vom FWF (Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung, <http://www.fwf.ac.at/de/abstracts/abstract.asp?L=D&PROJ=F37>) geförderten Spezialforschungsbereichs (SFB). In diesem Projekt arbeiten Pilz-Molekularbiologen, Bioinformatiker (externer Partner MIPS - nunmehr Helmholtz Zentrum für Systembiologie, München), Pflanzenmolekularbiologen, Pflanzenzüchter, Phytopathologen und insbesondere Chemiker eng zusammen. Mit den modernen Methoden der Genomik und Metabolomik, und unter Heranziehung von Modellsystemen wie Bäckerhefe, *Arabidopsis thaliana* und *Brachypodium distachyon* sollte es möglich werden die komplexe Materie in neuem Licht zu betrachten und neue Metaboliten und ihre Funktion in Pflanzen aufzuklären. Der nächste Schritt wäre dann die Identifikation von pflanzlichen Detoxifikationsmechanismen und die Klärung der Frage, ob es diesbezüglich Unterschiede im Zuchtmaterial gibt. Dies sollte zur Identifizierung von Kandidatengen führen, wobei auch hier die Problematik der Redundanz besteht. So gibt es, als Extrembeispiel, annähernd 200 UDP-Glucosyltransferasen in Genomen diploider Gräser, die für Entgiftungsenzyme mit vermutlich überlappender Substratspezifität kodieren, sodass die Analyse in Pflanzen kaum möglich oder sehr schwierig ist. Heterologe Expression einzelner Gene in Bäckerhefe ist hier eine attraktive Option, wie am Beispiel von DON- und ZON-inaktivierenden Glucosyltransferasen von *Arabidopsis* gezeigt (POPPENBERGER et al. 2003, POPPENBERGER et al. 2006).

Danksagung

Der Autor bedankt sich beim österreichischen Genomprogramm GEN-AU und FWF (Spezialforschungsbereich F 37) für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- BUERSTMAYR, H., T. BAN and J.A. ANDERSON, 2009: QTL mapping and marker assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat - a review. *Plant Breeding*, 128, 1-26.
- CUOMO, C.A., U. GÜLDENER, J.R. XU, F. TRAIL, B.G. TURGEON, A. DI PIETRO, J.D. WALTON, L.J. MA, S.E. BAKER, M. REP, G. ADAM, et al. and H.C. KISTLER, 2007: The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317(5843), 1400-2.

- DE LA FUENTE VAN BENTEM, S., J.H. VOSSEN, K.J. DE VRIES, S. VAN WEES, W.I. TAMELING, H.L. DEKKER, C.G. DE KOSTER, M.A. HARING, F.L. TAKKEN and B.J. CORNELISSEN, 2005: Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *Plant J.* 43, 284-98.
- Güldener, U., G. MANNHAUPT, M. MÜNSTERKÖTTER, D. HAASE, M. OESTERHELD, V. STÜMPFLEN, H.W. MEWES and G. ADAM (2006a) FGDB: a comprehensive fungal genome resource on the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Res* 34, D456-8.
- GÜLDENER, U., K.Y. SEONG, J. BODDU, S. CHO, F. TRAIL, J.R. XU, G. ADAM, H.W. MEWES, G.J. MUEHLBAUER and H.C. KISTLER, 2006b: Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genet Biol.* 43, 316-25.
- LEMMENS, M., U. SCHOLZ, F. BERTHILLER, C. DALL'ASTA, A. KOUTNIK, R. SCHUHMACHER, G. ADAM, H. BUERSTMAYR, A. MESTERHÁZY, R. KRŠKA and P. RUCKENBAUER, 2005: The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 1318-24.
- OIDE, S., W. MOEDER, S. KRASNOFF, D. GIBSON, H. HAAS, K. YOSHIOKA, B.G. TURGEON, 2006: *NPS6*, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* 18, 2836-53.
- PERUCI, M., F. BERTHILLER, M. LEMMENS, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, A. CZIFERSZKY, R. MITTERBAUER and G. ADAM, 2006: Phosphopantetheinyltransferase required for post-translational activation of polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthases is a virulence factor of *Fusarium graminearum*. *Biol Plant Microbe Interact* 5, 580-585.
- POPENBERGER, B., F. BERTHILLER, D. LUCYSHYN, T. SIEBERER, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, K. KUCHLER, J. GLÖSSL, C. LUSCHNIG and G. ADAM, 2003: Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278, 47905-14.
- POPENBERGER, B., F. BERTHILLER, H. BACHMANN, D. LUCYSHYN, C. PETERBAUER, R. MITTERBAUER, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, J. GLÖSSL and G. ADAM, 2006: Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4404-10.