

Pilzwachstum in der lebenden Rapspflanze auf dem Prüfstand

Systematische Analyse einer Pilz-Wirtspflanzeninteraktion: Genom, Proteom und Metabolom

Pflanzen interagieren mit einer Vielzahl von Pilzen. Diese Interaktion kann sich sowohl positiv als auch negativ auf das Pflanzenwachstum auswirken. Bei den pathogenen Pilzen unterscheidet man im wesentlichen zwei Gruppen, die biotrophen und die nekrotrophen Pilze. Während die nekrotrophen Pilze die Pflanze abtöten und dann das verbleibende Material abbauen, gelingt den biotrophen Pilzen die Ausbreitung in der lebenden Pflanze. Dazu haben biotrophe Pilze Mechanismen entwickelt, um die Abwehrsysteme der Pflanze zu umgehen. Das Projekt BioFung untersucht den filamentösen Pilz *Verticillium longisporum*, einen biotrophen Pilz, der im Raps wachsen kann. Die Nachfrage nach Rapsölen als Speisezusatz und als Biokraftstoff nimmt zu. Der Pilzbefall wird auf den Feldern sehr spät bemerkt und die wirtschaftlichen Verluste steigen stetig. Ziel des Projektes ist es, das Wachstum des Pilzes in der lebenden Pflanze zu kontrollieren und den Pflanzenschutz zu verbessern. Hierzu dient die systematische Analyse des Erregers während der biotrophen Wachstumsphase in seinem Wirt.

Susanna A. Braus-Stromeyer und Gerhard H. Braus

Rapsfelder sind auffallend gelb und der unvoreingenommene Beobachter kann den fortschreitenden Erfolg der Rapspflanze *Brassica napus* an der Zunahme der leuchtend gelben Felder im zentralen und nördlichen Europa leicht selbst abschätzen. Zur Aufwärtsentwicklung des Rapsanbaus tragen die hohen Konzentrationen an Omega-3-Fettsäuren bei, die das Rapsöl zu einem besonders hochwertigen Speiseöl machen. Dies lässt sich auch an Zahlen festmachen. Während andere Öle in ihrer Nachfrage bestenfalls stagnieren oder gar rückläufig sind, hat sich der Anteil von Rapsöl als verkauftem Speiseöl von 7,2% im Jahr 2004 auf 10,7% im Jahr 2008 erhöht.

Weiter fordern die Mitgliedsstaaten der Europäischen Union vermehrt den Einsatz von Biokraftstoffen, um Versorgungssicherheit zu schaffen und den Umweltschutz zu stärken. Dies ist ein Teil des Maßnahmenpaketes zur Einhaltung des Kyoto-Protokolls. Darüber hinaus verbinden viele mit Biokraftstoff die Hoffnung auf eine geringere Abhängigkeit von Energieeinfuhren wie Erdöl. Deutschland und Frankreich sind die größten Rapsproduzenten Europas. Die deutsche Steigerung des Bioanteils am Kraftstoffmarkt stieg von 1,2% auf 9,9% in den Jahren 2003 bis 2008. Während Deutschland im Jahr 2000 eine Biodieselpkapazität von 0,27 Millionen Tonnen aufgewiesen hat, stieg dieser theoretische Wert im Jahr 2007 um das fast 20-fache auf 5,1 Millionen Tonnen.

Gleichzeitig mit dem Ausbau der Rapsflächen in Deutschland und Nordeuropa hat auch die Infektion durch *Verticillium longisporum* stark zugenommen. Dieser Pilz verursacht die sogenannte Raps- oder Verticilliumwelke, die erst seit 1985 in Deutschland bekannt ist und sich mittlerweile im gesamten Bundesgebiet verbreitet hat. Neben Raps werden weitere verwandte Pflanzen, wie beispielsweise Blumenkohl, Chinakohl, Ölrrettich oder Senf von *V. longisporum* befallen. Der Pilz ist hartnäckig und kann im Boden

mehr als 10 Jahre überdauern, weil er widerstandsfähige Mikrosklerotien bilden kann, die unter geeigneten Bedingungen auskeimen und dann die Pflanzen infizieren.

Drei *Verticillium*-Arten infizieren mehr als 400 verschiedene Pflanzen

V. longisporum ist nicht der einzige Vertreter seiner Gattung. Auch seine Verwandten fallen Pflanzen an. *V. albo-atrum* wurde 1870 in Deutschland aus Kartoffeln und *V. dahliae* 60 Jahre später aus Dahlien isoliert. Die beiden Arten verursachen die Verticilliumwelke in den unterschiedlichsten Pflanzen. Zu Beginn der 80er-Jahre – mehr als 100 Jahre nach der Erstbeschreibung – kam dann *V. longisporum* als dritte pflanzenpathogene Art mit dem bisher engsten Wirtsspektrum dazu. Die drei Verticilliumstämme verursachen in mehr als 400 Pflanzen die Verticilliumwelke.

Alle Verticillien sind bodenbürtig (d.h. über den Boden übertragbar) und können Mikrosklerotien bilden. Aus diesen wächst der Pilzfaden, der als Hyphe bezeichnet wird, zu den Wurzeln der Wirtspflanze. Der Pilz dringt in die Wurzel ein und wächst auf die Leitgewebe zu. Er nutzt speziell das Xylem, die nährstoffarme Wasserleitung der Pflanze, um sich nach oben im lebenden Wirt auszubreiten. Als biotropher Pilz dringt er nicht in die Pflanzenzellen ein, so dass die Besiedlung von außen kaum sichtbar ist. Der harmlose Schein trägt allerdings, weil das Wachstum der Hyphe in manchen Wirtspflanzen die Leitgefäße verstopfen kann. Spätere Symptome einer Verticilliuminfektion sind verfärbte Blätter, frühe Blüte und gestauchtes Wachstum und damit Ertragsverlust. Alle diese Symptome sind Zeichen einer verfrühten Alterung der Wirtspflanze, und könnten ein Hinweis darauf sein, dass der Pilz den Hormonhaushalt der Pflanzen gezielt zu steuern weiß.

Arbeitsmaterial

Modul 4 Mikrobielle Systeme



Abb. 1: Raps (*Brassica napus*) und der pathogene Pilz *Verticillium longisporum*. Nicht-infizierte (linke Collage) und infizierte (rechte Collage) Rapspflanzen sind dargestellt. *V. longisporum* lässt sich im Labor ohne Pflanzen auf der Platte kultivieren (rechte Collage, unten links) und kann mit Hilfe der durch Melanin dunkel gefärbten Mikrosklerotien (rechte Collage, unten rechts) jahrelang im Boden überdauern. Der Pilz infiziert über die Wurzeln das Gefäß-System der Pflanze und wächst im Xylem (rechte Collage, oben rechts). © Braus-Stromeyer/von Tiedemann, Universität Göttingen)

Aggressive *Verticillium*-Stämme nehmen zu

Die Intensität der durch *Verticillium* ausgelösten Welke kann bei verschiedenen Wirten sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Während die Ernteeinbuße bei Kartoffeln üblicherweise bei 10 bis 20% liegt und gelegentlich auf bis zu 50% steigen kann, führt der Befall des Salates zu einem völligen Ernteaussfall. Alle Salatköpfe werden welk und ungenießbar. Diese leidvolle Erfahrung wurde vor einigen Jahren im Salinas Valley, einem der wichtigsten und größten Gemüseanbauggebiete der USA in Kalifornien gemacht. Zwischen der ersten Beobachtung von *V. dahliae* im Jahre 1995 und dem Befall von 71 Feldern mit einer Fläche von über 600 ha im Jahre 2008 liegen nur 13 Jahre. Die intensive Bewirtschaftung mit Gemüse führte zu bis zu 2200 Mikrosklerotien pro Gramm Boden. 150 Mikrosklerotien pro Gramm Boden sind bereits eine gefährliche Grenzkonzentration für die Infektion.

*Verticillium*infektionen haben an vielen Orten auf der Welt in den letzten 10 Jahren bedenklich zugenommen. Neben der intensiven Bewirtschaftung scheint ein weiterer wichtiger Aspekt eine zunehmende Virulenz des Pathogens zu sein. Ein Beispiel für den Wandel sind die traditionellen Hopfenanbauggebiete in Bayern, England, Tschechien und Slowenien. Zwar gab es schon seit den 20er-Jahren des letzten Jahrhunderts gelegentliche leichte Infektionen mit einem *V. albo-atrum*-Stamm, die zu verschmerzbaaren Einbußen geführt haben. Seit 1997 wird in diesen Anbaugebieten jedoch in zunehmendem Maß ein aggressiver Stamm angetroffen, der zu 100%-igem Ernteaussfall führt. Ähnlich sind in Südeuropa insbesondere Olivenbäume stark von *Verticillium*infektionen betroffen. Bei der mildereren Form der Infektion werden an einem Teil des Baumes die Blätter gelb und die Oliven zeigen deutliche Welkesymptome, während die stärkere Form den Baum völlig entblättert. Diese Bäume tragen dann gar keine Oliven mehr.

Verticillium-Stämme können den Wirt wechseln

Die *Verticillium*-Stämme scheinen sich fortlaufend an neue Wirte adaptieren zu können. So wurden befallene Oliven-Anbauflächen

häufig vorher mit Baumwolle bewirtschaftet und *Verticillium* hat offensichtlich einen unerwarteten Wirtswechsel vollzogen. Ein ähnlicher Wirtswechsel scheint im Salinas Valley zum Verlust der Salaternte geführt zu haben. Der Eintrag von *Verticillium*mikrosklerotien ist über kontaminierte Spinatsamen erfolgt, die vor dem Salat angebaut wurden und die so früh geerntet werden, dass der Befall nicht bemerkt wurde. Für den Menschen ist der Verzehr von infiziertem Spinat ungefährlich. Die moderne Landwirtschaft achtet auf die Fruchtfolge, was einen Organismus, der den Wirt wechseln kann, besonders erfolgreich macht. Hinzu kommt, dass das restliche Pflanzenmaterial nach der Ernte zum Mulchen verwendet wird. Wenn die Pflanze infiziert war, ergibt sich damit für den Pilz eine weitere Verbreitungsmöglichkeit. Daneben breiten sich *Verticillium* auch über kontaminierte Samen aus und können so in bisher nicht kontaminierte Böden gelangen.

Der Ursprung von *V. longisporum* ist unklar: Hybrid-Genom oder Ergebnis einer Genomduplikation?

V. longisporum fällt durch seine langen Sporen auf, die ihm den Namen gegeben haben und ihn von den beiden anderen *Verticillium*-Arten unterscheiden. Ein weiterer bemerkenswerter Unterschied ist der fast doppelt so hohe DNA-Gehalt der Zellkerne von *V. longisporum*. Bisherige Untersuchungen haben kein klares Bild ergeben, ob *V. longisporum* das Ergebnis einer Verdopplung eines *Verticillium*-Genoms oder die Fusion der Genome zweier unterschiedlicher *Verticillium*-Arten darstellt. Der Zeitpunkt der Entstehung von *V. longisporum* könnte in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts gelegen haben. Vermutlich gab es nach dem initialen Ereignis (Genomduplikation oder Hybridbildung) noch eine Reorganisation des Genoms und möglicherweise eine Reihe von Deletionen. Es gibt mehrere Hinweise, dass *V. dahliae* ein Elternteil darstellt, aber der Rest des Genoms ist unklar und es wird auch ein bisher unbekannter weiterer *Verticillium*-Vertreter diskutiert.

Arbeitsmaterial

Modul 4 Mikrobielle Systeme

Die Sequenzierung der *V. longisporum* DNA soll das Geheimnis um die Elternschaft(en) des Pilzes lüften. Ein Genomvergleich soll weiter zeigen, welche Genbereiche im Vergleich zu den Ausgangsgenomen in *V. longisporum* verloren gegangen sind. Dann ist zu prüfen, welche Bedeutung diese Genom-Veränderungen für den Erwerb der neuen Wirtsspezifität für den Raps haben. Es stellt sich zudem die Frage, ob verschiedene Hybridbildungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattgefunden haben und gegenwärtig noch stattfinden. Hybridbildung zur Erlangung einer anderen Wirtsspezifität bei Pilzen könnte einen interessanten, wengleich auch besorgniserregenden Evolutionsmechanismus für die Entwicklung neuartiger Interaktionen zwischen Organismen darstellen.

Forschungsverbund BioFung

BioFung wird seit 2010 durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Förderprogramm "Anwendungsorientierte Forschung an nicht-pathogenen Mikroorganismen für Gesundheit, Ernährung und ressourceneffiziente Industrieproduktion – Genomik-Transfer" im Rahmenprogramm "Biotechnologie – Chancen nutzen und gestalten" gefördert. Im Mittelpunkt des BioFung-Projektes steht das geschilderte biotrophe Wachstum des filamentösen Pilzes *V. longisporum* in der Wirtspflanze Raps (*Brassica napus*) und die Frage, wie dieser Pilz in der nährstoffarmen Umgebung im Leitgewebe (Xylem) der Pflanze wachsen und gedeihen kann. Am Anfang steht die Entschlüsselung und Annotation der Genomsequenz von *V. longisporum*. Näher untersucht werden mögliche Zielgene zur Entwicklung neuartiger Fungizide, aber auch Gene, deren zelluläre Funktion als Grundlage zur gezielten Züchtung neuer resistenter Rapsorten dienen könnte. Mit der Norddeutschen Pflanzenzucht (NPZ) wurde deshalb eine Vereinbarung zur Zusammenarbeit getroffen, die eine rasche Umsetzung der Ergebnisse in resistente Sorten ermöglichen soll. Gewonnene Erkenntnisse mit *V. longisporum* lassen sich möglicherweise auf die nahen Verwandten *V. dahliae* und *V. albo-atrum* übertragen. Von wirtschaftlicher Bedeutung sind hier insbesondere Welkekrankheiten bei wichtigen Kulturpflanzen wie Erdbeere, Tomate, Gurke, Salat, Baumwolle oder Olivenbäumen.

Parallel mit der Untersuchung des *V. longisporum*-Genoms wird eine integrative Untersuchung des biotrophen Wachstums des Pilzes im Xylem durchgeführt. Es wird gleichzeitig das Metabolom, das Transkriptom und das Proteom des Pilzes untersucht. Für alle diese Untersuchungen gibt es Experten in Göttingen, die sich an BioFung beteiligen. Der große Vorteil der engen Kooperation an einem Standort ist, dass die Untersuchungen mit demselben Probenmaterial durchgeführt werden können. Damit soll die Vergleichbarkeit der Daten maximiert werden. Interessante Gene, die sich aus den Untersuchungen ergeben, werden im Pilz ausgeschaltet und die Auswirkung auf die Infektion der Pflanze wird untersucht. Angestrebt wird ein umfassendes Bild der Interaktion von Pflanze und Pilz, das Aufschluss über den Infektionsmechanismus liefert. Dadurch sollten sich Ansatzpunkte ergeben, um das Wachstum des Pilzes kontrollieren und auch inhibieren zu können und damit den Pflanzenschutz zu verbessern.

Kontakt

Prof. Dr. Gerhard H. Braus, Dr. Susanna A. Braus-Stromeyer
Georg-August-Universität Göttingen
Institut für Mikrobiologie & Genetik
E-Mail: gbraus@gwdg.de



Arbeitsaufträge

Lesen Sie den Text und bearbeiten Sie die folgenden Arbeitsaufträge:

- 1. Erstellen Sie einen Kurzsteckbrief der Raps- und des Pilzes *Verticillium longisporum*. Stellen Sie Informationen zur Bedeutung der Omega-3-Fettsäuren für Menschen dar und kennzeichnen Sie die Rolle der *Verticillium*-Arten für andere Nutzpflanzen.**
- 2. "Pflanzen interagieren mit einer Vielzahl von Pilzen". Erläutern Sie diese Aussage mit Hilfe des Materials und Ihrer Kenntnisse aus dem Biologieunterricht.**
- 3. Diskutieren Sie auch unter Einbeziehung aktueller Umweltdebatten den Einsatz der Rapspflanzen.**
- 4. Formulieren Sie begründete Hypothesen, die die schnelle Verbreitung von *Verticillium longisporum* erklären könnten.**
- 5. Stellen Sie die Rolle der Sequenzierung bei der Ursprungsfindung von *Verticillium longisporum* heraus und notieren Sie die aktuellen Forschungsziele auf diesem Gebiet.**