



John Maina Wagacha (Autor)
**Development of *Fusarium* species differinh in mycotoxin
production and conidia formation on wheat plants**



universität**bonn**

**Development of *Fusarium* species
differing in mycotoxin production and
conidia formation on wheat plants**

John Wagacha Maina



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1228>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Kurzfassung

Entwicklung und Ausbreitung von *Fusarium*-Arten an Weizen, die sich in ihrer Mykotoxinproduktion und Konidienbildung unterscheiden

Zur Bedeutung des Einflusses vegetativer Abschnitte von Weizenpflanzen auf die Ausbreitung von *Fusarium*-Arten. Von der Bodenoberfläche zur Weizenähre wurden Sprosssegmente von Weizen hinsichtlich ihrer Besiedlung durch *Fusarium* spp. untersucht. Neunzehn *Fusarium*-Arten wurden als Pathogene der Partiellen Taubährigkeit aus Weizenähren der Nakuru-Region in Kenia identifiziert. Achtzig Prozent der *Fusarium*-Infektionen an Blatt, Stängel und Ähre wurden durch *F. chlamyosporum*, *F. boothi*, *F. poae*, *F. scirpi*, *F. arthrosporioides*, *F. oxysporum* und *F. graminearum* hervorgerufen. Zur Ernte wurden, basierend auf einer Analyse mittels LC/MS/MS, elf *Fusarium*-Mykotoxine im Weizen detektiert; DON-Belastungen wurden am häufigsten nachgewiesen. Zur Untersuchung der Anfälligkeit von Weizen gegenüber *Fusarium* spp. wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen oberirdische Sprossabschnitte zur Vollblüte mit *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae* und *F. tricinctum* inokuliert. Die Inokulation der *Fusarium*-resistenten Sorte Petrus und der anfälligen Sorte Ritmo zum Entwicklungsstadium BBCH 65 resultierte in einer signifikant stärkeren Partiellen Taubährigkeit und häufigeren Infektionen von Ährchen, Körnern und Stängeln als eine zu BBCH 47. In Stängeln wurde mittels real-time PCR der höchste DNA-Gehalt quantifiziert, gefolgt von Blättern und Körnern. Zur Ernte wurden in Stängeln die höchsten, in Körnern die niedrigsten Mykotoxin-Belastungen detektiert. Die Inokulation mit *F. culmorum* resultierte in der höchsten pilzlichen Biomasse und Mykotoxin-Belastung, gefolgt von *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* und *F. poae*. Nach *in vitro*-Wachstum der Pilze auf Körnern, Stängeln und Blättern wurde mittels HPLC in Weizenkörnern der höchste, in Stängeln der niedrigste Ergosterol-Gehalt ermittelt. Dagegen war der DNA-Gehalt einiger *Fusarium*-Arten in Körnern am höchsten, in Blättern am geringsten. Während der Konidienkeimung und des Keimschlauchwachstums wurde Konkurrenz zwischen den *Fusarium*-Isolaten beobachtet. Makrokonidien-bildende Arten verfügten über eine höhere Konkurrenzfähigkeit. Konidien, die häufig mit mehr als einem Keimschlauch je Konidienzelle auskeimten und ein intensives Keimschlauchwachstum auf der Pflanzenoberfläche, führten zur Ausbildung netzartiger Pilzstrukturen. Im Blattgewebe wurde inter- und intrazelluläres Hyphenwachstum festgestellt. Pilzliche Strukturen wurden nur in und nahe der Läsionen nachgewiesen. Eine 48-stündige Inkubation von seneszenten Blättern bei 100 %iger Luftfeuchtigkeit regte alle fünf *Fusarium*-Arten zur Sporulation an. *Fusarium*-Infektionen vegetativer Pflanzenabschnitte tragen zu Ähreninfektionen im Weizen bei und stellen durch ihre Verfütterung ein toxikologisches Risiko für die tierische Gesundheit dar.

Table of contents

Contents.....	page
1. Introduction	1
2. Materials and methods.....	12
2.1 Organisms.....	12
2.1.1 <i>Fusarium</i> isolates	12
2.1.2 Plant material.....	12
2.2 Chemicals	13
2.2.1 Chemicals for molecular and microbiological assays	13
2.2.2 Chemicals for mycotoxin and ergosterol quantification	13
2.3 Culture media	13
2.4 Cultivation of plants	15
2.4.1 Seedling plants	15
2.4.2 Mature plants.....	16
2.5 Growth of microorganisms.....	16
2.6 Inoculation.....	17
2.6.1 Harvesting of inoculum and testing viability of conidia	17
2.6.2 Inoculation techniques.....	17
2.7 Rating of pathogen and disease	18
2.7.1 Frequency of infections	18
2.7.2 Sampling.....	19
2.7.2.1 Field sampling	19
2.7.2.2 Seedling plants	19
2.7.2.3 Mature plants.....	20
2.7.3 Rating of pathogen	20
2.7.3.1 Conidia germination tests.....	20
2.7.3.2 Assessment of fungal growth	21
2.7.4 Disease severity.....	21
2.7.5 Yield assessment	22
2.8 Microscopic techniques.....	22
2.8.1 Light microscopy.....	22
2.8.1.1 Specimen preparation techniques.....	22
2.8.1.2 Fixation and staining	23
2.8.1.3 Microscopy.....	24
2.8.2 Stereo microscopy	24

2.8.3	Transmission electron microscopy.....	24
2.8.3.1	Specimen preparation techniques.....	24
2.8.3.2	Sectioning.....	26
2.8.3.3	Contrasting.....	26
2.8.3.4	Microscopy.....	27
2.9	Analysis of mycotoxins.....	27
2.9.1	Equipment and solvents.....	27
2.9.2	Trichothecenes and zearalenone.....	27
2.9.2.1	Extraction and clean-up.....	27
2.9.2.2	Detection and quantification.....	28
2.9.3	Moniliformin.....	29
2.9.3.1	Extraction and clean-up.....	29
2.9.3.2	Detection and quantification.....	29
2.9.4	Multi-mycotoxin analysis.....	30
2.10	Analysis of ergosterol.....	30
2.10.1	Extraction and clean-up.....	30
2.10.2	Detection and quantification.....	31
2.11	Molecular techniques.....	32
2.11.1	DNA extraction.....	33
2.11.1.1	DNA extraction from fungal cultures.....	33
2.11.1.2	DNA extraction from wheat tissue.....	34
2.11.1.3	DNA extraction for sequencing.....	35
2.12	Polymerase chain reaction (PCR).....	35
2.12.1	TaqMan [®] PCR reactions.....	35
2.12.2	SYBR green [®] PCR reactions.....	36
2.12.3	PCR for <i>tef</i> gene sequencing.....	37
2.12.4	Sequencing and blasting of <i>tef</i> gene.....	38
2.13	Data analysis.....	38
3.	Results	39
3.1	Occurrence of <i>Fusarium</i> species and associated mycotoxins in Kenya wheat.....	39
3.1.1	Production system data of sampling fields.....	39
3.1.2	Diversity and frequency of fungal species isolated from wheat at different growth stages.....	39
3.1.2.1	Fungal species isolated from kernels at harvest.....	40
3.1.3	Spatial distribution of <i>Fusarium</i> species in Nakuru.....	42

3.1.4	Colonization of wheat plants by <i>Fusarium</i> species at different growth stages.....	42
3.1.4.1	<i>Fusarium</i> species identified at anthesis and harvest	42
3.1.5	Spectrum of mycotoxins.....	45
3.2	Investigations under controlled conditions.....	47
3.2.1	Effect of wheat tissue on susceptibility of seedling plants to <i>Fusarium</i> species inoculated at GS 13	47
3.2.1.1	Effect of relative humidity on <i>Fusarium</i> infection.....	49
3.2.2	Susceptibility of different wheat parts to <i>Fusarium</i> species inoculated at GS 65.....	51
3.2.2.1	Variation in tissue colonization by <i>Fusarium</i> species.....	51
3.2.2.2	Effect of different <i>Fusarium</i> isolates on FHB severity and area under disease progress curves (AUDPC).....	52
3.2.2.3	Effect of <i>Fusarium</i> infection on kernel weight	54
3.2.3	Susceptibility of different wheat parts to <i>Fusarium</i> species inoculated at two growth stages.....	54
3.2.3.1	Variation in tissue colonization of wheat plants	54
3.2.3.2	Effect of different <i>Fusarium</i> species on disease severity and AUDPC	57
3.2.3.3	Effect of <i>Fusarium</i> infection on kernel weight	62
3.2.3.3	Effect of <i>Fusarium</i> infection on kernel weight	62
3.2.4	Development of real-time PCR for quantification of <i>Fusarium</i> DNA in different wheat matrices	62
3.2.4.1	Melting curve analysis	62
3.2.4.2	Calibration curves	63
3.2.4.3	Effect of wheat tissue on <i>Fusarium</i> biomass measured as species-specific DNA	66
3.2.4.4	Effect of plant matrix on mycotoxin production of <i>Fusarium</i> species	67
3.2.4.5	Relationship between fungal biomass (DNA) and mycotoxin production	70
3.3	Interactions between <i>Fusarium</i> isolates during conidia germination and germ tube growth.....	73
3.3.1	Size and characteristics of conidia	73
3.3.2	Effect of temperature on germination of conidia on glass surface.....	74
3.3.3	Conidia germination on leaves.....	77
3.3.4	Comparison of <i>Fusarium</i> germination on glass and attached leaves.....	80
3.3.5	Interactions between <i>Fusarium</i> isolates in water droplets on glass surface.....	82
3.3.6	Correlations among conidia size dimensions and germination.....	82